



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JUSSARA OLIVEIRA DOS SANTOS

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE SESQUITERPENOS DE *Zingiber officinale* ROSCOE E AVALIAÇÃO DO SEU POTENCIAL BIOLÓGICO FRENTE A FATORES DE VIRULÊNCIA DE BACTÉRIAS





UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JUSSARA OLIVEIRA DOS SANTOS

Exame de defesa de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Sergipe, para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. James Almada da Silva

Coorientador: Prof. Dr. Rafael Ciro Marques Cavalcante



FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

S237o Santos, Jussara Oliveira dos
Otimização da extração de sesquiterpenos de *Zingiber officinale* roscoe e avaliação do seu potencial biológico frente a fatores de virulência de bactérias / Jussara Oliveira dos Santos ; orientador James Almada da Silva - São Cristóvão, 2019.
100 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2019.

1. Química. 2. Gengibre. 3. Agentes anti-infecciosos. 4. Enzimas proteolíticas. I. Silva, James Almada orient. II. Título.

CDU 54



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
 MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
 Programa de Pós-Graduação em Química
 PPGQ



Ata da 219ª Defesa de Dissertação de Mestrado em
 Química de Jussara Oliveira dos Santos.

No trigésimo dia do mês de julho do ano dois mil e dezenove, Miniáuditorio do CCBS, realizou-se em sessão pública perante a comissão julgadora constituída pelos seguintes Professores Doutores: James Almada da Silva (DFAL/UFS - Orientador), Pericles Barreto Alves (DQI/UFS) e Natalia Nogueira Saraiva (DFAL/UFS), a defesa da dissertação de Mestrado da aluna Jussara Oliveira dos Santos, intitulada "Otimização da extração de sesquiterpenos de *Zingiber officinale* Roscoe e avaliação de seu potencial biológico frente a fatores de virulência de bactérias". Aberta a sessão, o senhor Presidente explicou a sistemática de defesa, passando em seguida a palavra a candidata para que fizesse uma exposição do seu trabalho. Terminado, foi arguido pelos membros da Comissão Julgadora. Após as arguições, foi determinado um intervalo de tempo para que a Comissão procedesse ao julgamento, cujo resultado foi: Prof. Dr. James Almada da Silva "APROVADA"; Prof. Dr. Pericles Barreto Alves "APROVADA" e Prof.ª Dr.ª Natalia Nogueira Saraiva "aprovada". A seguir, na presença do público e candidata Jussara Oliveira dos Santos, o senhor Presidente anunciou que, a candidata ao título de Mestre em Química, foi "APROVADA". Para registro, lavrou-se a presente Ata que foi lida e assinada pelos membros da comissão julgadora. Cidade Universitária "Prof. José Aloísio de Lampos", 30 de julho de 2019.

James Almada da Silva

Prof. Dr. James Almada da Silva
 Departamento de Farmácia de Lagarto - UFS

Pericles Barreto Alves

Prof. Dr. Pericles Barreto Alves
 Departamento de Química - UFS

Natalia Nogueira Saraiva

Prof.ª Dr.ª Natalia Nogueira Saraiva
 Departamento de Farmácia de Lagarto-UFS

RESUMO

O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) é uma planta medicinal conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias, antitumorais, antioxidantes e antimicrobianas. O objetivo deste trabalho foi otimizar a extração de sesquiterpenos (α -curcumeno, α -zingibereno, α -farneseno, β -sesquifelandreno e β -bisaboleno), avaliar seu potencial antimicrobiano e antibiofilme contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *S. agalactiae*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, além da sua atividade antiproteásica. As análises dos compostos extraídos foram realizadas por CG-ES. Os ensaios antimicrobianos e formação de biofilmes foram realizados pela técnica de microdiluição em placas de 96 poços. Além de avaliar a inibição do biofilme, o índice de hidrofobicidade também foi determinado como uma forma indireta de avaliar a capacidade de adesão dos micro-organismos aos tecidos hospedeiros e superfícies abióticas. As melhores condições para obtenção da fração enriquecida em sesquiterpenos (FES) foram: tempo de extração: 4 min, razão planta/solvente: 1:20 (m/v) e potência de micro-ondas: 400 W. A FES apresentou CIM de 2000 $\mu\text{g/mL}$ frente a *S. mutans* e foi inefetivo na inibição do crescimento das outras bactérias. Apesar disso a FES (250 $\mu\text{g/mL}$) inibiu a formação de biofilme de *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* em 50%, 80% e 80%, respectivamente. Ademais, a FES (250 $\mu\text{g/mL}$) reduziu o índice de hidrofobicidade das bactérias *S. aureus*, *S. agalactiae* e *E. coli* em 61,86%, 73,44% e 49,10%, respectivamente. A FES (500 $\mu\text{g/mL}$) foi capaz de reduzir em 71,5% a atividade enzimática da papaína, apresentando IC_{50} 386,8 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados mostraram que a FES apresentou potencial no combate à produção de biofilmes bacterianos. Desse modo, essas substâncias representam-se como bons candidatos a protótipos de medicamentos utilizados no tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes. Até onde sabemos, esta é a primeira vez que a atividade antimicrobiana e antibiofilme da FES foi estudada.

Palavras-chave: Gengibre; Otimização; Antimicrobiano; Biofilme; Hidrofobicidade; Protease.

ABSTRACT

Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) is a medicinal plant known for its anti-inflammatory, antitumoral, antioxidant and antimicrobial properties. The objective of this study was to optimize the extraction of sesquiterpenes (α -curcumene, α -zingiberene, α -farnesene, β -sesquifelandrene and β -bisabolene), to evaluate their antimicrobial and antibiotic potential against *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *S. agalactiae*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, in addition to their antiproteic activity. Analyzes of the extracted compounds were performed by GC-MS. Antimicrobial and biofilm formation assays were performed by the 96 well plate microdilution technique. In addition to assessing biofilm inhibition, the hydrophobicity index was also determined as an indirect way of assessing the ability of microorganisms to adhere to host tissues and abiotic surfaces. The best conditions for obtaining the sesquiterpene-enriched fraction (SEF) were: extraction time: 4 min, plant / solvent ratio: 1:20 (m / v) and microwave power: 400 W. The SEF presented a MIC of 2000 μ g / mL compared to *S. mutans* and was ineffective in inhibiting the growth of other bacteria. Nevertheless, SEF (250 μ g / mL) inhibited the biofilm formation of *S. aureus*, *S. agalactiae* and *E. coli* by 50%, 80% and 80%, respectively. In addition, FES (250 μ g / mL) reduced the hydrophobicity index of *S. aureus*, *S. agalactiae* and *E. coli* bacteria by 61.86%, 73.44% and 49.10%, respectively. FES (500 μ g / mL) was able to reduce papain enzymatic activity by 71.5%, with an IC₅₀ of 386.8 μ g / mL. The results showed that SEF had potential to combat the production of bacterial biofilms. Thus, these substances are good candidates for drug prototypes used to treat infections caused by multi-resistant bacteria. To our knowledge, this is the first time that the SEF antimicrobial and antibiofilm activity has been studied.

Keywords: Ginger; Optimization; Antimicrobial; Biofilm; Hydrophobicity; Protease

Sumário

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	<i>Zingiber officinale Roscoe</i>	2
1.2	Perfil químico do <i>Z. officinale Roscoe</i>	4
1.3	Terpenos.....	7
1.4	Sesquiterpenos do <i>Z. officinale Roscoe</i>	10
1.5	Atividade antimicrobiana	12
1.6	Micro-organismos patogênicos	14
1.7	Fatores de virulência	16
1.7.1	Biofilmes.....	16
1.7.2	Proteases.....	20
2	OBJETIVOS.....	25
2.1	Objetivo Geral	25
2.2	Objetivos Específicos	25
3	MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1	Materiais e Equipamentos	26
3.2	Procedimento Experimental	27
3.2.1	Secagem do material.....	27
3.2.2	Métodos de Extração.....	27
3.2.2.1	Maceração	27
3.2.2.2	Turboextração.....	28
3.2.2.3	Ultrassom.....	28
3.2.2.4	Micro-ondas	28
3.2.3	Obtenção da fração enriquecida em sesquiterpenos.....	28
3.3	Condições Cromatograficas de análise.....	30
3.4	Planejamento Fatorial 2 ³	30
3.5	Inibição do crescimento microbiano	31
3.6	Inibição da formação de biofilme	32
3.7	Índice de hidrofobicidade da superfície celular.....	33

3.8	Ensaio de atividade frente à papaina	34
3.9	Análise Estatística	35
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1	Rendimento da fração enriquecida com sesquiterpenos de <i>Z.officinale</i> Roscoe.....	36
4.2	Identificação dos sesquiterpenos majoritários do <i>Z.officinale</i> e sua quantificação relativa.....	38
4.3	Otimização da extração do óleo essencial do <i>Z.officinale</i> para obtenção da FES.....	42
4.4	Atividade de inibição do crescimento microbiano.....	49
4.5	Atividade de inibição da formação de biofilme	54
4.6	Determinação do Índice de Hidrofobicidade bacteriana	57
4.7	Atividade de inibição proteásica.....	63
5	CONCLUSÕES.....	66
6	REFERÊNCIAS	67
7	ANEXOS.....	81
8	APÊNDICE	83

*Dedico este trabalho especialmente a
minha mãe Maria Enilde Oliveira.*

“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, que não conhece vitória nem derrota”

(Theodore Roosevelt)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por todas as graças até aqui alcançadas.

Ao meu orientador professor Dr. James Almada por todos os ensinamentos.

Ao meu coorientador professor Dr. Rafael Ciro Marques Cavalcante por toda paciência, ensinamentos, dedicação e comprometimento com este trabalho.

Ao professor Dr. Adalberto Menezes Filho responsável pelo Laboratório de Cromatografia do IFS pela colaboração.

A professora Dr. Isley Felberg por ter possibilitado a utilização dos laboratórios do IFS.

A Tailane e Mariane pela contribuição neste projeto em compartilhar seus conhecimentos com paciência, dedicação e por toda amizade.

A minha mãe, Maria Enilde, a minha irmã, Juecelia e a tia Maria por estarem sempre ao meu lado, incentivando e dando forças em todos os momentos.

As minhas sobrinhas Raquely, Rafaely e Valentina por tornarem as coisas mais leves nos momentos difíceis.

Aos meus amigos Karen, Gabriel, Markston e Keite por todo carinho e apoio.

Aos meus amigos de pós-graduação Raphael e Ramon por toda parceria e amizade.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CIM – Concentração inibitória mínima

CMIB50 – Concentração mínima de inibição da formação de biofilme em 50%

CC – Cromatografia Clássica

FPP – Difosfato Farnesila

IPP – Difosfato isopentenila

GPP – Difosfato Geranila

EAM – Extração Assistida por Micro-ondas

EAU – Extração Assistida por Ultrassom

FES – Fração Enriquecida em Sesquiterpenos

IHD – Índice de Hidrofobicidade

M – Maceração

MEP – Metileteritritol Fosfato

OE – Óleo essencial

TE – Turboextração

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diferente formas de consumo do gengibre.....	4
Figura 2 - Algumas estruturas químicas de monoterpenos e sesquiterpenos presentes nos rizomas de <i>Z.officinale</i>	5
Figura 3 - Algumas estruturas químicas de compostos fenólicos presentes nos rizomas de <i>Z. officinale</i>	6
Figura 4 – Estrutura química do isopreno (2-metil-but-1,3-dieno).....	8
Figura 5 – Síntese dos terpenos, pelas vias do mevalonato e metileritritol.....	9
Figura 6 – Estrutura química dos sesquiterpenos majoritários do óleo essencial do gengibre.....	10
Figura 7 – Ciclo do biofilme.....	17
Figura 8 – Mecanismo da reação de clivagem mediada pela cisteína protease de uma ligação peptídica.....	22
Figura 9 – Estrutura tridimensional da papaína.....	23
Figura 10 – Ilustração das etapas do processo de extração.....	29
Figura 11 – Ilustração de algumas etapas da avaliação da inibição de biofilme.....	33
Figura 12 – Etapas para avaliação da inibição da papaína.....	35
Figura 13 – Cromatograma obtido por cromatografia gasosa, da FES proveniente das extrações assistida por maceração, turboextração, micro-ondas e ultrassom.....	39
Figura 14 – Espectro de massas (IE: 70 eV) proveniente da injeção da Fração Enriquecida em Sesquiterpenos extraídos por maceração.....	39
Figura 15 – Áreas das bandas dos sesquiterpenos presente na FES, extraídos dos rizomas de <i>Z. officinale</i> por maceração, turboextração, micro-ondas e ultrassom.....	41

Figura 16 – Diagrama em cubo com o rendimento global (%) da FES para cada condição específica.....	44
Figura 17 – Diagrama em cubo com a área do constituinte majoritário (α -zingibereno), para cada condição específica.....	45
Figura 18 – Superfície de resposta apresentando o rendimento de extração e a interação do tempo de extração com a potência de irradiação.....	47
Figura 19 – Superfície repostada apresentando o rendimento de extração e a interação do tempo de extração com a razão massa/volume.....	47
Figura 20 – Superfície repostada apresentando o rendimento de extração e a interação da potência de irradiação com a razão massa/volume.....	48
Figura 21 – Efeito das diferentes concentrações da FES sobre o crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i>	50
Figura 22 – Efeito das diferentes concentrações da FES sobre o crescimento de <i>Streptococcus agalactiae</i>	50
Figura 23 – Efeito das diferentes concentrações da FES sobre o crescimento de <i>Streptococcus mutans</i>	51
Figura 24 – Efeito das diferentes concentrações da FES sobre o crescimento de <i>Escherichia coli</i>	52
Figura 25 – Efeito das diferentes concentrações da FES sobre o crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	52
Figura 26 – Efeito das diferentes concentrações da FES sobre a formação de biofilme de <i>Staphylococcus aureus</i>	54
Figura 27 – Efeito das diferentes concentrações da FES sobre a formação de biofilme de <i>Streptococcus agalactiae</i>	55
Figura 28 – Efeito das diferentes concentrações da FES sobre a formação de biofilme de <i>Escherichia coli</i>	56
Figura 29 – Efeito das diferentes sub-CIMs da FES sobre a hidrofobicidade de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	58

Figura 30 – Efeito das diferentes sub-CIMs da FES sobre a hidrofobicidade de <i>Staphylococcus aureus</i>	59
Figura 31 – Efeito das diferentes sub-CIMs da FES sobre a hidrofobicidade de <i>Streptococcus agalactiae</i>	60
Figura 32 – Efeito das diferentes sub-CIMs da FES sobre a hidrofobicidade de <i>Streptococcus mutans</i>	61
Figura 33 – Efeito das diferentes sub-CIMs da FES sobre a hidrofobicidade de <i>Escherichia coli</i>	61
Figura 34 – Porcentagem de inibição frente à papaína da FES em diferentes concentrações (500, 250, 125, 62, 31 e 16 µg/mL)	63
Figura 35 – Fotografia da placa do experimento com concentração 500 µg/mL frente a papaína com tempo de incubação de 24 horas. DMSO 2,5% usado como controle negativo.....	64
Figura 36 – Curva de inibição frente à enzima papaína da FES obtida do rizoma de gengibre (<i>Zingiber officinale</i>), utilizada para a determinação do valor de IC50.....	65
Figura 37 – Espectro de massas (IE: 70 eV) do α -curcumeno.....	81
Figura 38 – Espectro de massas (IE: 70 eV) do α -zingibereno.....	81
Figura 39 – Espectro de massas (IE: 70 eV) do α -farneseno.....	81
Figura 40 – Espectro de massas (IE: 70 eV) do β -bisaboleno.....	81
Figura 41 – Espectro de massas (IE: 70 eV) do β -sesquifelandreo.....	82
Figura 42 – Fotografia da placa de Petri do experimento com concentração de 125 e 62 µg/mL frente à papaína com tempo de incubação de 24 horas.....	83
Figura 43 – Fotografia da placa de Petri do experimento com concentração de 31 e 16 µg/mL frente à papaína com tempo de incubação de 24 horas.....	83
Figura 44 – Fotografia da placa de Petri do experimento com as concentração de 500 e 250 µg/mL frente à papaína com tempo de incubação de 24 horas.....	84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classificação taxonômica do rizoma <i>Zingiber officinale</i>	2
Tabela 2 - Classificação dos antimicrobianos.....	13
Tabela 3 - Algumas infecções humanas envolvendo formação de biofilmes.....	18
Tabela 4 - Planejamento fatorial 2^3 . Os fatores tempo, razão m/v e potência de irradiação apresentam-se dispostos em limite inferior e superior.....	31
Tabela 5 - Rendimento percentual da fração enriquecida com sesquiterpenos (FES) obtido pelas técnicas: maceração, micro-ondas, turboextração e ultrassom.....	36
Tabela 6 - Composição dos sesquiterpenos obtidos por maceração, micro-ondas, turboextração e ultrassom.....	40
Tabela 7 - Resultado de um planejamento fatorial 2^3 para otimização das condições de obtenção de uma Fração Enriquecida de Sesquiterpenos (FES). Fatores de respostas são o rendimento em porcentagem e área do sesquiterpeno majoritário.....	43
Tabela 8 - Interações dos efeitos principais do planejamento fatorial 2^3 para otimização da FES.....	46

1. INTRODUÇÃO

Zingiber officinale Roscoe (gingibre) é um rizoma de origem asiática, muito utilizado tanto na medicina tradicional quanto contemporânea. Os compostos extraídos do gengibre são eficazes no alívio de sintomas de diversas doenças, devido as ações anti-inflamatória, antioxidante e antimicrobiana [1, 2]. Seu óleo essencial possui grande importância nas áreas alimentícia, farmacêutica, cosmética e química em virtude das suas propriedades aromatizantes, antibacterianas e antitumorais [3, 4].

Os óleos essenciais são vistos como fontes alternativas na busca de inibidores naturais de micro-organismos patogênicos. São constituídos por compostos voláteis, monoterpenos e sesquiterpenos, que detêm as suas propriedades biológicas [5]. Estudos sobre a ação antimicrobiana dos sesquiterpenos majoritários do gengibre revelam potencial promissor no combate contra o biofilme produzido por *Pseudomonas aeruginosa* [6]. Investigações sobre o uso de compostos bioativos, presentes no extrato de gengibre, mostram que estes compostos são capazes de inibir fatores de virulência apresentados pela bactéria *Staphylococcus aureus* [7].

Os processos mais utilizados para obter os óleos essenciais são hidrodestilação, extração por arraste à vapor e extração com CO₂ supercrítico [8]. O óleo essencial do gengibre quando obtido por esses processos é rico em monoterpenos e sesquiterpenos. Os sesquiterpenos majoritários são α -curcumeno, α -zingibereno, α -farneseno, β -bisaboleno e β -sesquifelandreno [9]. Entretanto, para cada técnica de extração há alterações na composição e qualidade do óleo essencial obtido. Devido às diversas condições e variáveis inerentes à cada técnica, faz-se necessária a utilização de ferramentas adequadas para a otimização dos processos existentes [10,11].

As técnicas de planejamento e análise de resultados experimentais são algumas ferramentas utilizadas a fim de otimizar processos e melhorar a qualidade e as características de um produto. Baseados em princípios estatísticos pode-se extrair o máximo de informações úteis com custos relativamente baixos, em um número reduzido de experimentos e possibilidades de avaliar interações entre as

variáveis [12]. O planejamento experimental 2^3 o qual analisa a interação de três efeitos principais e suas variações sobre o fator resposta que se objetiva, como por exemplo, rendimento do óleo essencial [12,13]. Outra ferramenta também muito utilizada é a Metodologia de Superfície de Resposta (MRS), esta consiste no uso de técnicas matemáticas e estatísticas para otimização experimental [12].

Dessa forma, com a utilização de ferramentas estatísticas visou-se a determinação das melhores condições experimentais para extração dos sesquiterpenos majoritários dos rizomas de *Z. officinale* Roscoe. Visto que esses compostos apresentam potencial biológico, eles podem se tornar protótipos de fármacos utilizando-os no tratamento de doenças infecciosas, causadas por micro-organismos patogênicos.

1.1 *Zingiber officinale* Roscoe

O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) é uma das plantas mais conhecidas e utilizadas pelos povos antigos para fins medicinais e como condimento. Pertence à família Zingiberaceae, a qual engloba mais de 1200 espécies de plantas e seu gênero, *Zingiber*, inclui mais de 85 espécies [14,15]. Sua classificação taxonômica está apresentada na Tabela 1.

Tabela 1-Classificação taxonômica do rizoma *Zingiber officinale*. **Fonte:** ELPO, 2004 [16].

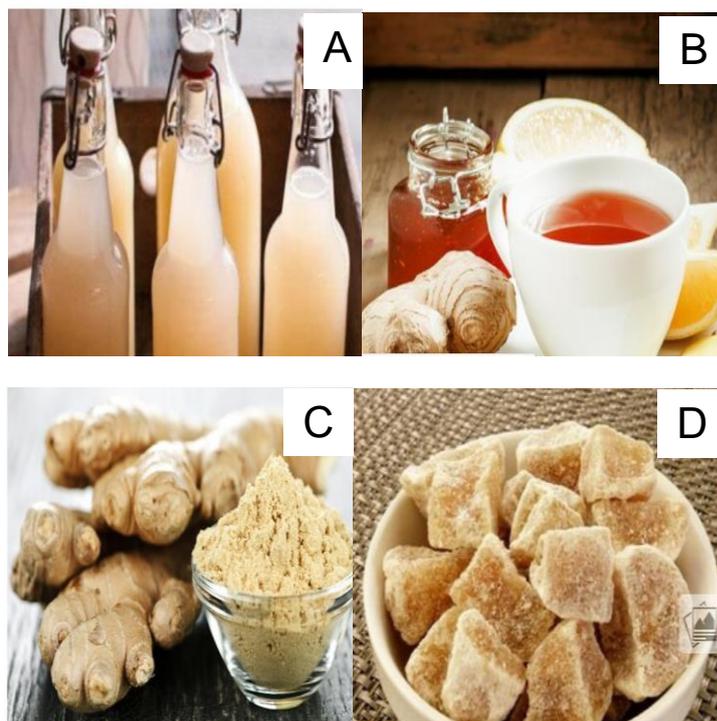
Taxonomia de <i>Zingiber officinale</i>	
Reino	Plantae
Filo	Magnoliophyta
Classe	Liliopsida
Ordem	Zingiberales
Família	Zingiberaceae
Gênero	<i>Zingiber</i>

Os rizomas do gengibre são provenientes de uma planta herbácea perene que pode atingir 1,5 m de altura, originária das florestas tropicais, do Sudeste da Ásia, cultivada nas Antilhas, Havaí, África, Austrália e no Brasil. No Brasil, a produção de gengibre abrange as regiões litorâneas de São Paulo, Paraná, Santa Catarina, Espírito Santo, litoral nordestino e algumas regiões de Minas Gerais, Goiás e Rio de Janeiro [16,17].

Embora sua boa adaptação a climas tropicais, subtropicais e também em regiões mais frias, há algumas restrições especialmente no seu cultivo. Esse deve ser realizado seguidamente no mesmo lugar, pois sofre queda acentuada na produção, e preferência de solo com pH 5,5 com boa preparação de forma a eliminar torrões muito grandes no solo, já que apresenta influência direta na qualidade e produtividade do gengibre. Em relação a colheita é realizada após 10 a 12 meses de plantio [16].

Os rizomas de gengibre frescos e secos, e seus extratos são usados extensivamente como alimento, em bebidas e nas indústrias de confeitaria, na fabricação de produtos tais como marmeladas, licores e biscoitos [18]. O gengibre pode ser consumido de diversas formas tais como, chá, em pó, cristalizado, xarope ou em bala (Figura 1).

Figura 1 – Diferentes formas de consumo do gengibre. A: xarope; B: chá; C: pó; D: balas. **Fonte:** (<https://melhorcomsaude.com.br/formas-de-consumir-gengibre/>)



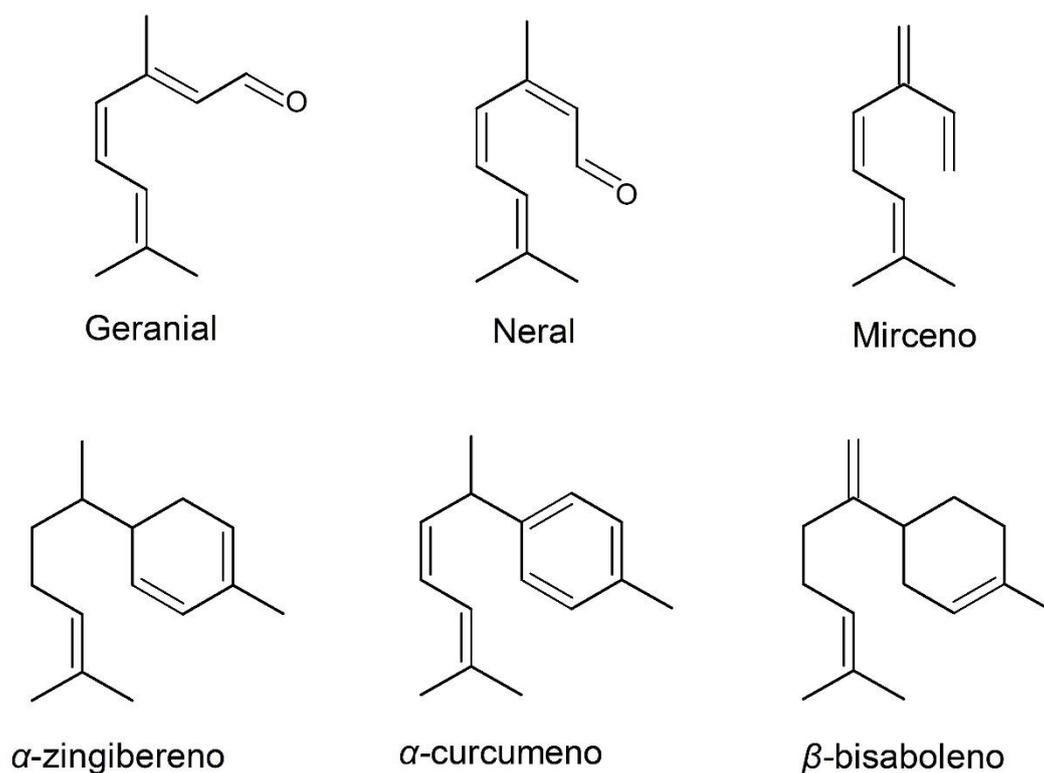
O gengibre bruto ou processado tem sido empregado na medicina tradicional para tratamento de diversas doenças que incluem doenças reumáticas, artrite, entorses, dores musculares, dores de garganta, febre e doenças infecciosas [19]. Esta planta também possui propriedades medicinais como antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatória, antiviral, analgésica, antitumoral, anti-hemorrágica e antifúngica [20-23].

1.2 Perfil químico do *Z. officinale* Roscoe

O rizoma do gengibre contém cerca de 60-70% de carboidratos, 3-8% de fibra bruta, 9% de proteína, 2-3% de óleo volátil e 4-7% de oleoresinas [24]. As propriedades organolépticas são atribuídas ao óleo essencial e aos seus compostos pungentes extraídos por solventes não voláteis [25].

Os óleos essenciais do gengibre são ricos em terpenos com 10 e 15 átomos de carbonos, denominados, respectivamente, de monoterpenos e sesquiterpenos (Figura 2).

Figura 2 - Estruturas químicas de monoterpenos e sesquiterpenos presentes nos rizomas de *Z.officinale*.

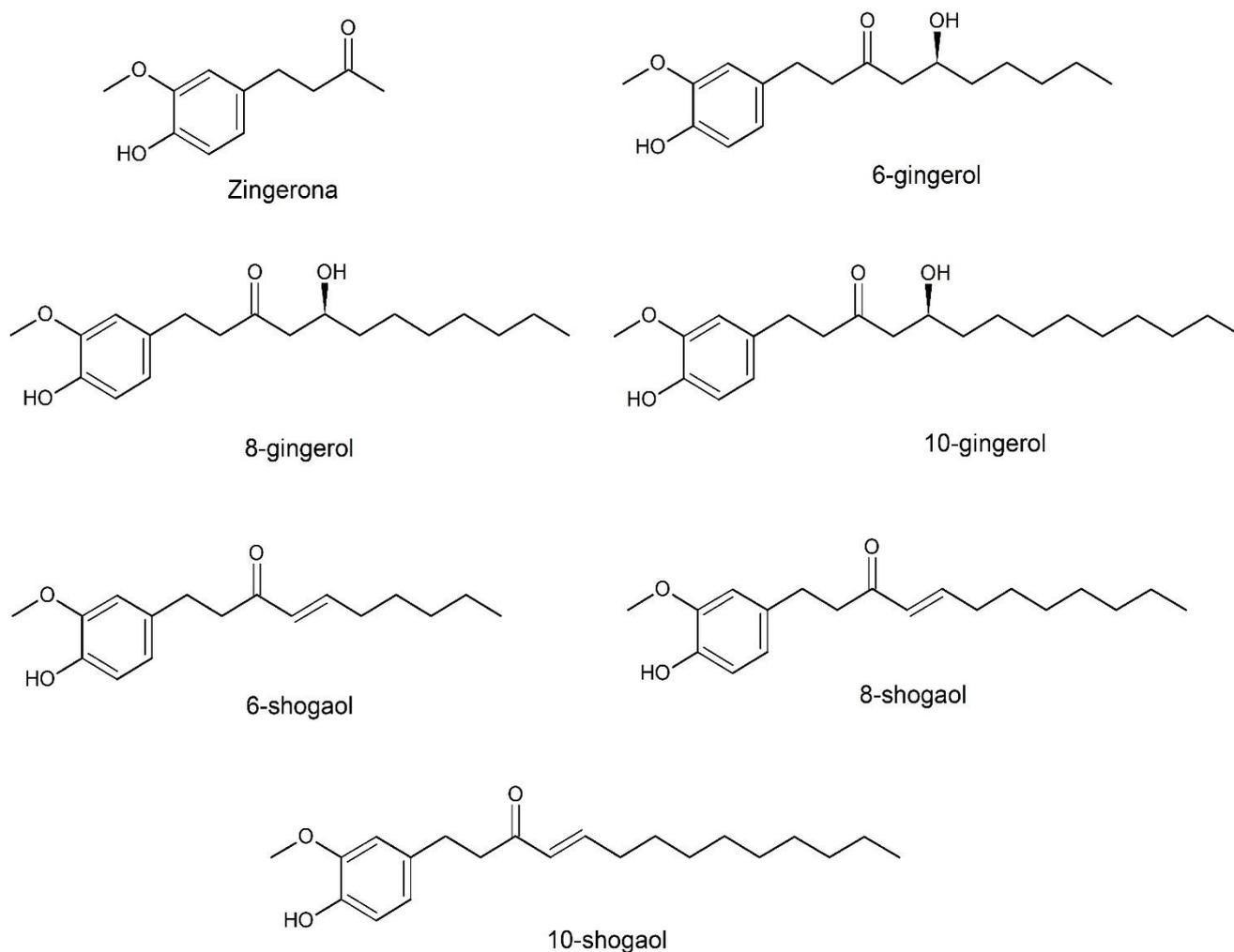


O geranial e neral são dois compostos isômeros ambos presentes no óleo essencial de gengibre e amplamente utilizados na indústria de perfumaria e de cosmético. Andrade et al. identificaram e quantificaram 25,06% e 16,47% de geranial e neral, respectivamente, como majoritários do óleo essencial de *Z. officinale*, o qual apresentou atividade antibacteriana frente a micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos [25]. Em conformidade, Mesomo et al. também analisaram a composição química deste óleo obtendo 3,21% e 10,66% de geranial por métodos de extrações diferentes, mas confirmando sua presença entre os principais constituintes [26].

Enquanto, que os sesquiterpenos α -curcumeno e α -zingibereno apresentam-se como repelentes contra moscas brancas de tomates. Caso este estudado por investigações de Bleek et al., os quais comparavam a ação biológica destes sesquiterpenos purificados com os obtidos no óleo de gengibre e pelo tomate [27]. Estudos antigos também relatam a função do curcumeno e zingibereno como inseticidas e repelentes, impedindo a proliferação de pragas em plantações [28].

Em relação as oleoresinas, elas são constituídas por compostos fenólicos não voláteis conhecidos como gingeróis, shogaios e zingerona, os quais são responsáveis pelo sabor pungente do gengibre [29] (Figura 3).

Figura 3 - Algumas estruturas químicas de compostos fenólicos presentes nos rizomas de *Z. officinale*.



A zingerona é um dos compostos fenólicos em menor concentração no gengibre. Shin et al. sugeriram que este composto, zingerona, possui ação antioxidante contra peroxinitrito que induz lesão tecidual, causando várias doenças humanas, como Alzheimer e aterosclerose [30].

Os gingeróis são responsáveis pelo forte sabor característico dos rizomas de gengibre fresco. O 6-gingerol é o principal composto responsável pela pungência dos rizomas e pela maioria das atividades farmacológicas, enquanto os outros gingeróis (4,8,10 e 12-gingerol) estão presentes em baixas quantidades (10%), sendo os shogaóis produtos de desidratação destes gingeróis [31].

Por seguinte as propriedades biológicas dos gingeróis e shoagaois são reconhecidas por apresentarem ação antimicrobiana, anticancerígena, antioxidante, anti-inflamatório e antialérgicas [31,32]. Os shogaóis são conhecidos por efeito anti-tosse, já os gingeróis são responsáveis pelas propriedades analgésicas do gengibre [33].

1.3 Terpenos

Os terpenos podem ser definidos quimicamente como “alcenos naturais”, ou seja, apresentam uma dupla ligação entre carbonos sendo caracterizados como hidrocarbonetos insaturados. Por outro lado, também podem conter em suas estruturas átomos de oxigênio, e assim passam a ser denominados de terpenóides. Com a presença do oxigênio na estrutura podem apresentar diferentes funções como: álcoois, ácidos, aldeídos, cetonas, éteres, fenóis ou epóxidos [34].

Esses compostos apresentam uma grande diversidade estrutural derivada da junção cauda-cabeça das unidades de isopreno (C_5H_8) (Figura 4), que se polimerizam formando uma variedade de terpenos, caracterizando a chamada “regra do isopreno” [34,35]. Eles são classificados de acordo com a quantidade de unidades isoprênicas (C_5) em: hemiterpenos (C_5), monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}), diterpenos (C_{20}), sesterpenos (C_{25}), triterpenos (C_{30}), tetraterpenos (C_{40}) e politerpenos ($>C_{40}$) [35].

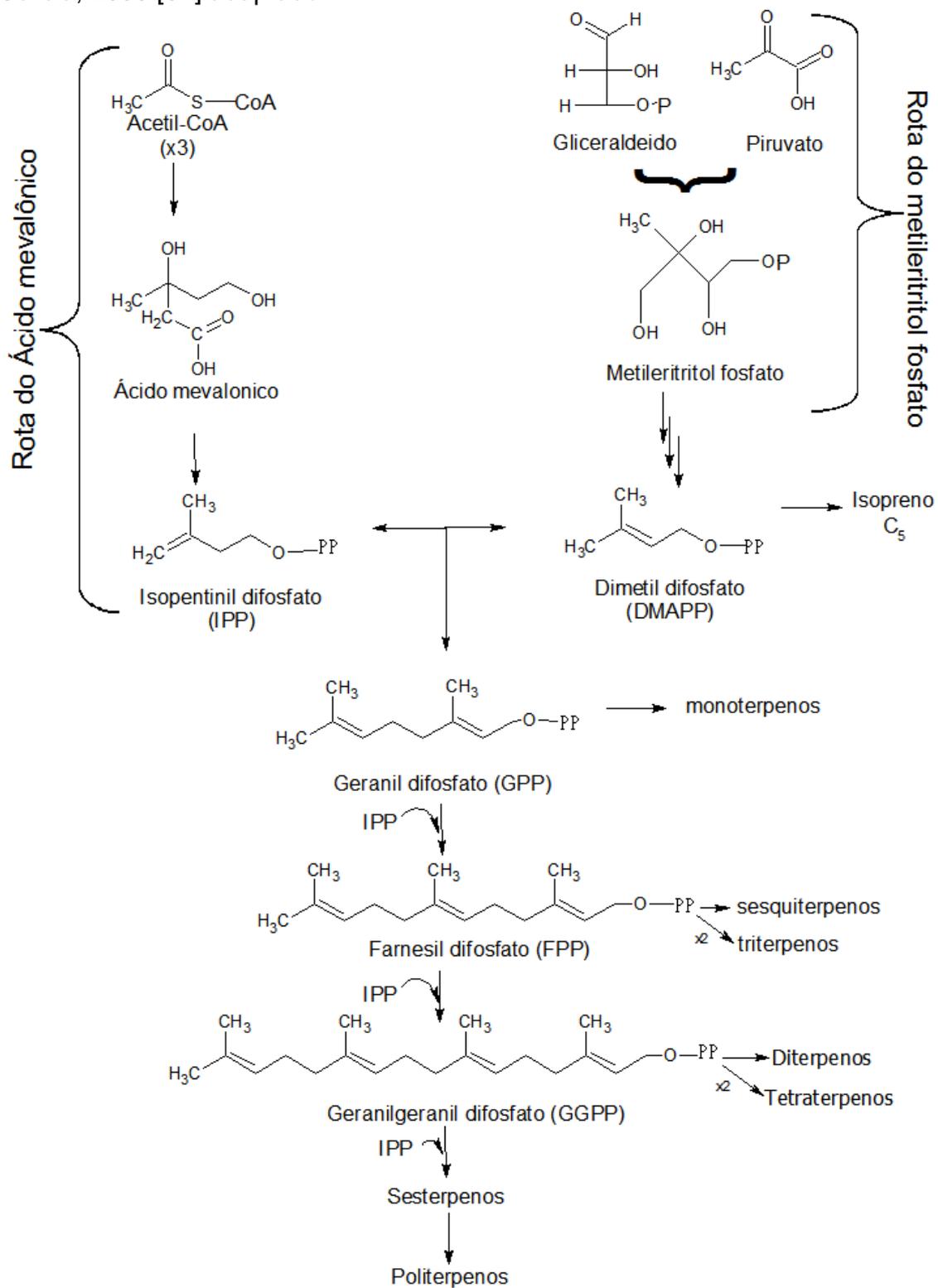
Figura 4 – Estrutura química do isopreno (2-metil-but-1, 3-dieno).



Os dois caminhos que levam à formação dos terpenos são descritos como a rota do mevalonato e mais recentemente a rota da desoxixilulose. Na rota do mevalonato três moléculas de acetil-CoA reagem para formar o ácido mevalônico, o qual após sofrer reações sucessivas de fosforilação, descarboxilação e desidratação resulta no difosfato isopentenila (IPP), que se converte no difosfato de dimetil alila (DMAPP) pelo processo de isomerização. Este também pode ser sintetizado pela rota da desoxixilulose, também denominada de fosfato de metileteritritol (MEP) [36].

Na biossíntese de terpenos, o IPP e DMAPP são utilizados como precursores, os quais por meio de reações de condensação formam moléculas maiores. Na formação dos monoterpenos o IPP e o DMAPP se unem e formam o difosfato de geranila (GPP), que contém 10 átomos de carbono. O GPP, por sua vez, pode reagir com outra molécula de IPP e formar o difosfato de farnesila (FPP) composto formado por 15 átomos de carbono, e assim sucessivamente. O FPP é precursor de todos os sesquiterpenos. [34] (Figura 5).

Figura 5 - Síntese dos terpenos, pelas vias do mevalonato e metileritritol. Fonte: Garcia, 2009 [57] adaptado.



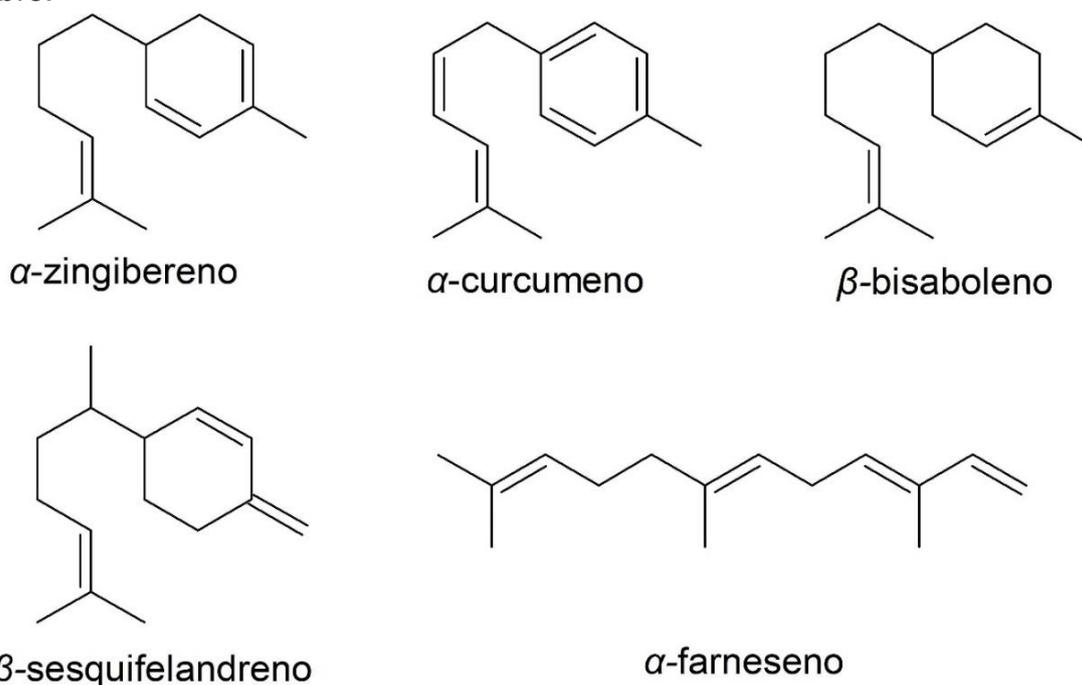
1.4 Sesquiterpenos de *Zingiber officinale* Roscoe

Os sesquiterpenos constituem uma subclasse dos terpenos formados por três unidades isoprênicas ($C_{15}H_{24}$). Os mesmos são facilmente oxidados e possuem baixa solubilidade em água e em soluções alcoólicas diluídas, por serem insaturados tendem a polimerizar provocando deterioração no sabor e odor dos óleos essenciais [34].

Estes compostos terpênicos são bastante encontrados em plantas, fungos e algas com mais de 7000 compostos conhecidos e identificados. Sua maioria apresenta algumas propriedades biológicas como larvicida, a exemplo, do *E*-nerolidol [37]. Destacam-se também um grande número de sesquiterpenóides monocíclicos, os quais apresentam extensas bioatividade citotóxica, antioxidante, anti-inflamatórias, anticancerígena e antibacteriana [38,39].

Os sesquiterpenos majoritários do óleo essencial de gengibre são α -curcumeno, α -zingibereno, α -farneseno, β -bisaboleno e β -sesquifelandreno [40] (Figura 6).

Figura 6 - Estruturas químicas dos sesquiterpenos majoritários presentes no gengibre.



Na literatura a abordagem das atividades biológicas dos extratos e óleos essenciais de gengibre são atribuídas aos seus compostos majoritários sesquiterpênicos. Estes apresentam variações em suas concentrações, devido a diversos fatores, como métodos extrativos, solventes extratores, tempo de extração e diferentes maneiras de cultivo dos rizomas de gengibre [41].

Silva [42], analisou a atividade inibitória da mistura dos sesquiterpenos majoritários do *Z. officinale* frente à enzima responsável pela degradação de proteínas na matriz óssea, a catepsina K. Observou-se que esta mistura de compostos é promissora na inibição enzimática após a determinação do IC₅₀ da mistura obtida da fração n-hexânica (1,61 ± 0,23 µg/mL) e do óleo essencial obtido por hidrodestilação (6,07 ± 0,98 µg/mL).

Gomes et al. [43], verificaram a atividade do óleo essencial dos rizomas frescos de *Z. officinale* Roscoe, frente ao mosquito *Aedes aegypti*. A extração realizada com auxílio de aparelho do tipo Clevenger foi capaz de obter um óleo com constituintes majoritários: α -zingibereno (27,14%), neroldiol (13,51%), β -sesquifelandreno (9,64%) e α -curcumeno (3,33%), os quais foram atribuídos ao efeito biológico apresentado. A concentração letal em cinquenta por cento, CL₅₀, obtida por estes autores foi 76,07 ± 0,24 µg/mL foi considerada significativa mediante os resultados.

Yahya et al. [7], determinaram a atividade antibiofilme do extrato etanólico do *Z. officinale* contra *Pseudomonas aeruginosa*. O extrato tinha como constituintes α -curcumeno (12,9%), α -zingibereno (45,24%), β -bisaboleno (17,2%) e β -sesquifelandreno (21,65%), os quais apresentaram concentração inibitória mínima de 12500 µg/mL. Além disso, a mistura mostrou-se promissora contra a formação de biofilme do micro-organismo utilizado.

Lameu [44], avaliou a ação de três óleos essenciais contra a formação de biofilme de *Salmonella entérica*. Dentre os óleos de *Z. officinale* na concentração de 4% (v/v) extraídos por hidrodestilação demonstrou forte capacidade inibitória. A composição química deste óleo apresentava α -zingibereno (13,56%), α -curcumeno (10,06%), β -sesquifelandreno (7,04%), β -bisaboleno (4,59%) e α -farneseno (4,23%) como constituintes majoritários.

Mediantes os resultados apresentados na literatura não é possível fazer uma atribuição efetiva das atividades biológicas com os constituintes majoritários. Pois, é necessário uma realização de testes isolados com os sesuiterpenos majoritários do óleo essencial de gengibre, a fim de se obter dados que comprovem a sua ação biológica.

1.5 Antimicrobianos

Os antimicrobianos são fármacos empregados para o tratamento das mais diferentes condições infecciosas que têm a capacidade de inibir o crescimento de micro-organismos como fungos e bactérias. São divididos em duas classes: os antibióticos, moléculas produzidas por seres vivos que inibem o crescimento de outros micro-organismos; e os quimioterápicos, substâncias sintéticas com alto poder lesivo contra agentes patogênicos [45,46].

A classificação dos antimicrobianos podem ser realizadas de várias maneiras. No entanto, devem ser considerados o seu espectro de ação, o tipo de atividade antimicrobiana, o grupo químico ao qual pertencem e o mecanismo de ação (Tabela 2) [47].

Tabela 2- Classificação dos antimicrobianos. **Fonte:** ZHANEL, 2001 [47].

Variáveis	Classificação	Exemplos
ESPECTRO DE AÇÃO	Antifúngicos Anaerobicidas Gram-positivos Gram-negativos Ampla espectro	Anfotericina B Metronidazol Oxacilina Aminoglicosídeo Ceftriaxona
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	Bactericida Bacteriostático	Quinolona Macrolídeo
GRUPO QUÍMICO	Aminoácidos Açúcares Acetatos/propionatos Quimioterápicos	Betalactâmico Aminoglicosídeo Tetraciclina Sulfa
MECANISMO DE AÇÃO	Síntese da parede celular Permeabilidade de membrana Síntese protéica Metabolismos dos ácidos nucleicos	Beta-lactâmico Anfotericina B Aminoglicosídeo Quinolona

A utilização dos antibióticos e quimioterápicos permitiu o controle e cura de doenças infecciosas, mudando a evolução natural dessas doenças de forma marcante. Os antibióticos são prescritos em larga escala em atendimentos ambulatoriais, em internações e também são muito usados na automedicação. Por outro lado, uso de antimicrobianos em animais alimentícios aumenta a seleção de bactérias resistentes, que podem se espalhar para as pessoas [45,48].

Muitos estudos foram conduzidos na área de antimicrobianos naturais, visando a identificação de novas fontes de compostos com propriedades antimicrobianas. Assim, extratos de plantas e óleos essenciais têm sido eficazes no controle do crescimento de uma variedade de micro-organismos incluindo fungos e bactérias. Além, no crescimento de novas moléculas (131 entre 1940 e 2014) aprovadas no combate ao câncer com acentuação em outras áreas, revelando a influencia e importâncias dos produtos naturais [49].

Dados da Organização Mundial de Saúde, relatam que cerca de 80% da população faz ou já fez uso de uma erva como forma de medicamento para alívio de sintomas que colocam em risco a saúde humana. No qual 30% se deu por indicação médica, devido ao fácil acesso, baixo custo e por serem consideradas inofensivas a saúde humana por grande parte da população [50].

Há diversas plantas conhecidas por suas propriedades fitoterápicas. Entre elas destacam-se o gengibre (*Zingiber officinale*), o açafrão (*Curcuma longa*), o alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*), a salvia (*Salvia officinale*), o agrião (*Nasturtium officinalis*), a arnica (*Arnica montana*), a malva (*Malva silvestres*) e o cravo (*Syzygium aromaticum*) [51,52].

Bactérias, fungos, vírus e protozoários foram descritos por muitos autores como micro-organismos sensíveis aos extratos vegetais das espécies citadas. Destacam-se *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Thyphimurium* e *Bacillus cereus* [53,54].

1.6 Micro-organismos patogênicos

A maior parte dos fungos, bactérias, vírus e protozoários são inofensivos à saúde humana, podendo garantir benefícios. No entanto, os microrganismos podem ser divididos em patogênicos e não patogênicos, dependendo do gênero da espécie e do sorotipo [55].

Os microrganismos patogênicos são aqueles capazes de desencadear doenças infecciosas no hospedeiro em condições favoráveis a sua sobrevivência e desenvolvimento, produzindo compostos tóxicos. Eles podem ser transmitidos pelo ar, pelo contato direto ou pelo consumo de alimentos contaminados por manipulação e procedimentos inadequados [55].

São classificados em patogênicos primários, onde as doenças infecciosas causadas são independentes dos fatores do hospedeiro, e em patogênicos secundários, os quais desenvolvem infecção quando existe desequilíbrio na relação parasita-hospedeiro, principalmente, imunodeficiência do hospedeiro [56].

Os patógenos mais frequentes causadores de infecções são os seguintes: *Escherichia coli*, *Klebsiella* sp, *Streptococcus* sp., *Enterobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus* sp [57]. Algumas bactérias do gênero *Streptococcus* fazem parte da microbiota oral humana e também podem estar presentes no intestino, trato respiratório e na pele. Por esta razão são de fácil transmissão, ocorrendo através de várias atividades no dia a dia [58]

Algumas espécies, como *Streptococcus pyogenes*, causam doenças como faringite estreptocócica, erisipela e infecções gerais na garganta [59]. Outros como *Streptococcus pneumoniae* podem levar o hospedeiro à morte com doenças como pneumonia e meningite [60]. Já *Streptococcus mutans* é o principal agente etiológico da cárie dental [61].

Nos últimos anos, observou-se um aumento da resistência bacteriana, principalmente, por patógenos potencialmente nocivos à saúde humana. O que consiste em um dos maiores e mais consideráveis obstáculos a saúde pública. Segundo a *World Health Organization (WHO)* a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* e *Treponema pallidum*, são exemplos de “superbactérias” por apresentarem resistência a múltiplos antimicrobianos [62].

Mycobacterium tuberculosis é outro patógeno que despertou bastante atenção na comunidade científica. No ano de 2014, o mesmo foi responsável por 9,4 milhões de casos de tuberculose multirresistentes no mundo. Sendo que 12% dos pacientes foram coinfectados com HIV, além do registro da ocorrência de 1,5 milhões de mortos [63].

O principal fator elencado para o aumento da resistência microbiana reside no uso indiscriminado de antimicrobianos. Essa prática seleciona os micro-organismos naturalmente resistentes e esses frequentemente são responsáveis por doenças infecciosas tecnicamente intratáveis.

1.7 Fatores de Virulência

Os fatores de virulência são estruturas, produtos ou mecanismos apresentados por agentes patogênicos tais como, vírus, bactérias e fungos que permitem a invasão de hospedeiro e/ou aumento da capacidade patogênica dos micro-organismos [64].

Por meio desses fatores, diversos micro-organismos conseguem aumentar a eficácia no desenvolvimento de infecções localizadas ou sistêmicas dependendo do estágio da doença e da resposta do hospedeiro. Esse processo infeccioso é favorecido pela ruptura do equilíbrio parasita-hospedeiro, aderência, produção de enzimas extracelulares e toxinas [64].

A aderência de muitas bactérias a tecidos do hospedeiro é um processo complexo que em muitos casos, envolve a participação de várias e distintas adesinas, as quais podem atuar ao mesmo tempo ou durante diferentes fases da infecção. Muitas bactérias patogênicas dispõem de fibras de polímeros designados por pilus ou fímbrias que facilitam a fixação das células do epitélio, garantindo uma maior aderência [65].

A expressão dos fatores de virulência pelos micro-organismos, não é apenas responsáveis pelas características de uma patologia, mas também em determinar a especificidade de patógenos. Algumas cepas de *Escherichia coli*, por exemplo, possuem fímbrias capazes de mediar a adesão às células epiteliais do intestino [66].

Staphylococcus aureus, desenvolveu vários mecanismos de virulência para escapar do sistema imunológico humano, incluindo uma série de proteínas de superfície, enzimas e toxinas. Tais mecanismos podem causar desde simples infecções até infecções mais graves como meningite, pericardite, bacteremia e síndrome do choque tóxico [67].

1.7.1 Biofilmes

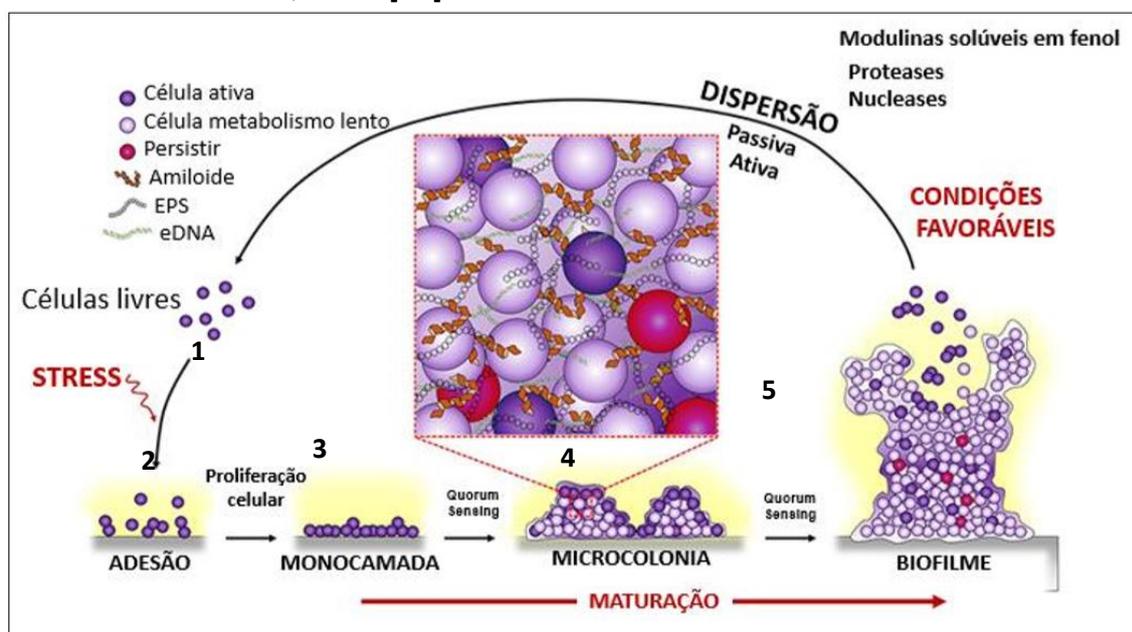
Os biofilmes podem ser definidos como formas de existência microbiana. São espacialmente e metabolicamente estruturadas em comunidades embebidas em matrizes de substâncias poliméricas extracelulares [68].

Essas estruturas são formadas por populações desenvolvidas a partir de uma única ou de múltiplas espécies. Sendo limitadas por características do microrganismo, do material aderente e do meio que o envolve, como pH, temperatura, tempo de agitação e uma variedade de outros fatores [68].

Em ambientes naturais cerca de 95 a 99% dos micro-organismos existem na forma de biofilmes, e podem ser encontrados em quase todos os substratos que possuem nível de umidade suficiente para suportar o seu crescimento [69].

A formação de biofilme é uma estratégia de sobrevivência dos micro-organismos. Há varias teorias sobre a sua formação, uma delas sugere cinco etapas: condicionamento da superfície pela adsorção de material orgânico; transporte de células e nutrientes para o sítio de aderência, início do processo de adesão, por atração eletrostática; crescimento celular, colonização e adesão irreversível; e liberação de células localizadas na periferia devido à alta atividade metabólica do biofilme [69] (Figura 7).

Figura 7- Ciclo do biofilme. 1-flutuação das células plactônicas; 2-adesão; 3-secreção e crescimento; 4-maturação do biofilme; 5-dispersão e reinício do ciclo.
Fonte: REFFUVEILLE, 2017 [70].



Estima-se que cerca de 65% de infecções hospitalares são derivadas da formação de biofilmes pelos micro-organismos. O que contribui com mais de 80% das infecções em humanos. Estima-se que anualmente cerca de 10 milhões de indivíduos, nos Estados Unidos, são acometidos por infecções associadas a biofilmes presentes em implantes ou decorrentes de procedimentos médico. Revelando a necessidade de erradicar as contaminações nas superfícies e em equipamentos médicos, a fim de controlar o risco de infecções hospitalares [69].

A Tabela 3 apresenta algumas infecções humanas causadas pela liberação de biofilmes produzidos por micro-organismos.

Tabela 3 - Algumas infecções humanas envolvendo formação de biofilmes. **Fonte:** <http://e-escola.tecnico.ulisboa.pt/topico.asp?id=355&ordem=1>.

Doença ou infecção	Espécies bacteriana comuns de biofilme
Cárie Dental	Cocos Gram-positivos(Ex.: <i>Streptococcus</i>)
Periodontite	Bactérias orais anaeróbias Gram-negativas
Inflamação na orelha	Cepas não tipificáveis de <i>Haemophilus influenzae</i>
Infecções musculoesqueléticas	Cocos Gram-positivos(Ex.: <i>Staphylococcus</i>)
Fasciite necrotizante	Gênero <i>Streptococcus</i>
Infecção do trato biliar	Bactérias entéricas (Ex.: <i>Escherichia coli</i>)
Osteomielite	Várias espécies bacterianas e fúngicas
Pneumonia por fibrose cística	<i>P. aeruginosa</i> e <i>Burkholderia cepacia</i>
Melioidose	<i>Pseudomonas pseudomallei</i>
Cistite do cateter urinário	<i>S. epidermidis</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>Proteus mirabilis</i>
Válvulas cardíacas mecânicas	<i>Streptococos</i> do grupo viridans e <i>Enterococos</i>

A bactéria gram-positiva, *Staphylococcus aureus* é grande produtora de biofilme. O seu estudo tem se tornado essencial para medicina, em razão da sua resistência aos tratamentos, ocasionando aumentos significativos na morbidade de pacientes [67].

O biofilme produzido por *S. aureus* é responsável pelo seu alto índice de virulência. Pois, permite o micro-organismo maior permanência no hospedeiro, bem como proteção do sistema imune e de antibióticos. Essa permanência permite que o micro-organismo cause infecção generalizada, disseminando-se principalmente pela via hematogênica [71].

A cárie dental também está associada à formação de biofilme por bactérias como *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus*. A placa dental é um tipo de biofilme, que fornece uma matriz para várias bactérias cariogênicas. Os micro-organismos da cavidade oral interagem entre si para produzir biofilmes mistos e mais resistentes, aumentando a gravidade da doença [72,73].

Um outro exemplo da influência dos biofilmes é a fibrose cística e doenças pulmonares crônicas, em que a resposta imune do hospedeiro causa alterações estruturais nos pulmões favorecendo à formação de biofilme de micro-organismos como *Pseudomonas aeruginosa* [74].

O biofilme também apresenta um papel importante em infecções no trato urinário. Estirpes de micro-organismos como *Proteus mirabilis* e *Escherichia coli*, as quais acarretam infecções no sistema urinário, já foram descritas por possuem um conjunto de genes de virulência, os quais estão associados à produção eficiente de biofilmes persistentes que os tornam bem adaptados para sobrevivência no trato geniturinário [74,75].

Um dos principais objetivos no combate de infecções causadas por bactérias capazes de formar biofilmes é a inibição ou o aumento de permeabilidade dessa estrutura. A inibição permite que os antibióticos e as células do sistema imunológico tenham acesso as bactérias, ao passo que o aumento da permeabilidade do biofilme pode aumentar a difusão dos antimicrobianos até os alvos das células bacterianas [68].

Dessa forma, a busca por compostos capazes de inibir a formação ou de aumentar a permeabilidade dos biofilmes é de grande valia como estratégia

terapêutica alternativa no tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes a múltiplos fármacos.

1.7.2 *Proteases*

Proteases são grupos de enzimas capazes de catalisar a clivagem hidrolítica de ligações peptídicas. Elas são produzidas por todos os organismos e desempenham um importante papel na regulação do metabolismo, bem como nas doenças infecciosas [76].

As proteases podem ser classificadas de acordo com a localização onde ocorre a clivagem na proteína alvo. Se a clivagem ocorrer perto do grupo carboxila ou amino, são consideradas exoproteases, mas se a clivagem acontecer longe desses grupos tem-se uma endoprotease [76].

Outra classificação é realizada de acordo com o resíduo de aminoácido presente no sítio catalítico da enzima, diretamente envolvido com a catálise. Assim, existem as serino-proteases, treonino-proteases, cisteíno-proteases, aspartil-proteases, metalo-proteases e glutamil-proteases [77].

Estas enzimas estão presentes em todos os seres vivos. As quais podem desempenhar diversas funções fisiológicas tais como, na digestão de alimentos, coagulação sanguínea, ativação de proenzimas, processos inflamatórios e entre outras funções importantes para sobrevivência dos seres vivos [77].

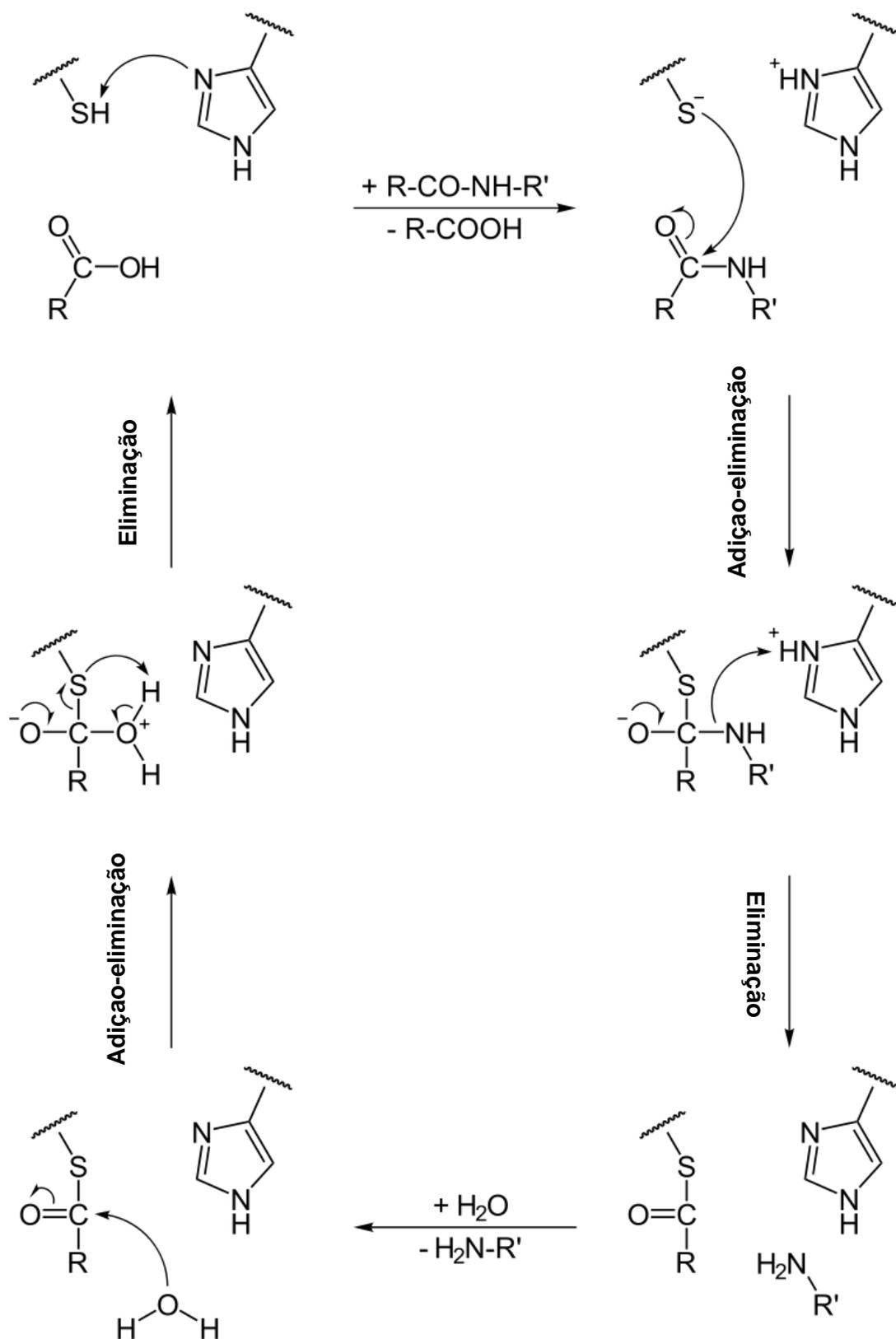
As proteases produzidas por bactérias funcionam como uma das suas principais fontes de energia. Além disso, a sua produção possibilita o aumento do dano tecidual, facilita a invasão e a disseminação do micro-organismo no hospedeiro. Garantindo as bactérias vantagens metabólicas e de defesa a resposta do sistema imunológico do hospedeiro [76].

Dentre as espécies oportunistas de importância médica *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, causam infecções em pacientes imune comprometidos por possuírem uma aspartil-protease extracelular, que é considerada seu principal fator de virulência [78].

Já o vírus da imunodeficiência humana (HIV), agente etiológico da AIDS, apresenta uma aspartil-protease essencial para o ciclo de vida do retrovírus. Sendo o alvo para a quimioterapia desta doença, utilizando inibidores específicos [79].

Em relação as cisteíno proteases, são enzimas presentes em diversos organismos desde bactérias, fungos, protozoários, animais e comumente em plantas. Sua estrutura apresenta como sítio ativo a tríade catalítica composta por Cy, Asp e His. O principal resíduo de aminoácido catalítico é a cisteína (Cys). A catálise ocorre via um éster tiol intermediário e é facilitada por cadeias adjacentes de histidina e ácido aspártico [80] (Figura 8).

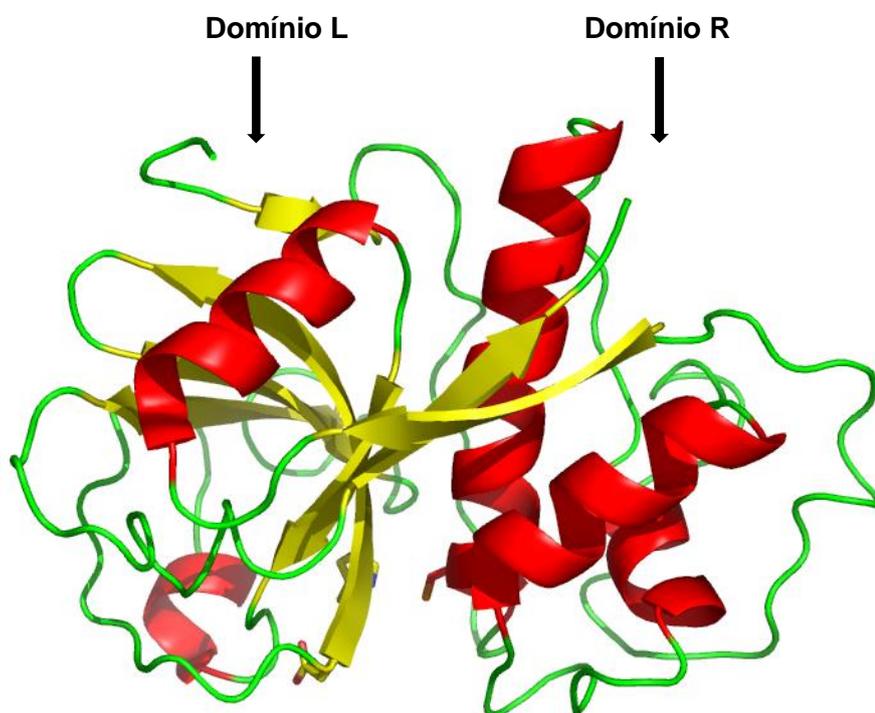
Figura 8 – Mecanismo da reação de clivagem mediada pela cisteína protease de uma ligação peptídica.



A bromelina, papaína e a ficina são exemplos de cisteíno proteases isoladas do abacaxi (*Ananas comosus*), mamão (*Carica papaya*) e figo (*Ficos carica*). Todas apresentam propriedades semelhantes, tais como pH na faixa de 4 a 5,5, na qual se possa garantir sua ação efetiva. O pH é um fator que exerce grande influência na manutenção da atividade enzimática, pois está vinculado às alterações do estado de ionização nos componentes do sistema em consequência da variação da concentração de H^+ [80,81].

A cisteíno protease, papaína, é a primeira da família com sua estrutura tridimensional determinada por cristalografia de raio-X. Esta protease tem uma cadeia peptídica composta por 212 aminoácidos (Figura 9) que se dobra para formar dois domínios L e R. Foi extraída do látex do mamão (*Caripapaya*) e tem ação bacteriostática, bactericida e anti-inflamatória [82].

Figura 9 – Estrutura tridimensional da papaína 9PAP. Fonte: <http://www.rcsb.org>.



Outra enzima em destaque é a cathepsina K, uma cisteína protease envolvida diretamente em doenças ósseas, tais como artroses e osteoporoses. A sua participação efetiva na degradação da matriz óssea, faz com que a mesma seja alvo na busca de novos fármacos, a fim de reverter o efeito da perda óssea, evitando danos maiores que coloque em risco a saúde humana [83].

O protozoário flagelado, *Trichomonas vaginalis*, responsável pela tricomoníase, doença sexualmente transmissível, também apresenta uma cisteína protease a qual está envolvida com o dano causado pelo parasita [84]. Além disso, muitas bactérias gram-negativas também produzem cisteína protease, como *Porphyromonas gingivalis*, fornecendo vantagens distintas e atuando como fatores de virulência para sobrevivência dessas bactérias [85].

O interesse no estudo de proteases vai além das suas funções fisiológicas. As enzimas proteolíticas são alvo moleculares atrativos para o desenvolvimento de novos fármacos, por desempenharem participações importantes no desenvolvimento de diversas doenças. Além, da configuração de resistência de micro-organismos patogênicos, contribuindo para sua sobrevivência [80].

Assim, o entendimento da atividade proteolítica nos processos biológicos tem como pré-requisito o conhecimento da contribuição dos inibidores naturais de proteases. Uma vez que podem ser classificados de acordo com o tipo de protease que inibem: inibidores de serino, cisteína, aspártico, treonino e metaloproteases [86].

As pesquisas sobre os inibidores naturais de proteases são relativamente recentes, sendo necessário maiores investigações nesta área. A fim de descobrir novos medicamentos eficazes e seguros para o seu uso. O que pode ocasionar o interesse em estudo de plantas popularmente conhecidas por suas propriedades medicinais, as quais ainda não foram investigadas [86].

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Otimizar as extrações dos principais sesquiterpenos do rizoma de *Zingiber officinale* Roscoe e avaliar o seu potencial na inibição de fatores de virulência de microrganismos de importância clínica.

2.2 Objetivo Especifico

- Avaliar o efeito de diferentes técnicas na extração de sesquiterpenos dos rizomas de *Z. officinale* Roscoe.
- Obter frações enriquecidas em sesquiterpenos (FES) dos rizomas de *Z. officinale* Roscoe por planejamento fatorial.
- Avaliar a ação antimicrobiana da FES.
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) da FES.
- Avaliar o efeito da FES sobre a formação de biofilme de bactérias.
- Avaliar o efeito da FES sobre o índice de hidrofobicidade das bactérias: *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e *Echeriachia coli*.
- Avaliar a ação anti cistéino protease da FES.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais e Equipamentos

- Multiprocessador de alimentos – modelo Philips Walita 750 W.
- Estufa – modelo SL-100 de circulação forçada de ar.
- Balança analítica – modelo AY220 da marca Marte.
- Freezer – modelo EFH350 da marca Esmaltec.
- Micro-ondas – modelo CMS45AB 30L da marca Consul.
- Banho ultrasônico – modelo SSBU20L SOLIDSTEEL.
- Ultra Turrax 2500 rpm – T-25 IKA.
- Evaporador Rotativo – modelo 820 da marca LABOQUÍMICA.
- Coluna Cromatográfica – RTX-5MS 95% de dimetilpolisiloxano (30 m x 0,25 mm/ 0,25 μ m).
- Cromatógrafo Gasoso acoplado à Espectrometria de Massa – modelo SHIMADZU.
- Coluna de vidro 40 cm x 4 cm.
- Microplacas de 96 poços fundo chato– ALFA.
- Placas de Petri (90x15 mm).
- Micropipeta multicanal – 20 canais, 200 μ l.
- Leitor de microplacas –modelo: LabSystem Multiskan RC/MS/EX (Thermo Fisher Scientific).
- Leite em pó (Nestlé®).
- BHI (Brain heart infusion) – KASVI.
- Glicose (Synth).
- Sacarose (Synth).
- Sílica gel (70-230 mesh).
- DMSO (Synth).
- Etanol (NEON).
- Hexano (NEON).
- Tampão de Fosfato 10 Mm (pH 6,7).
- Ácido acético 30%.

- Cristal de violeta 0,1%.
- Tolueno (Hexis Científica);
- Vortex – AMXH-C, AMISMED.
- Paquímetro – Digital 8” (Eda 7vt).

3.2 Procedimento Experimental

3.2.1 Secagem do material vegetal

Os gengibres frescos, comprados no comercio do município de Lagarto no estado de Sergipe, foram lavados, cortados em pequenos pedaços com o auxílio de um processador de alimentos. Na sequência foram desidratados em estufa com circulação de ar a 40°C, por um período de 7 dias. Em seguida, o material foi pulverizado, tamisado (diâmetro da malha: 2 mm) e armazenado em frascos de vidro até o momento das extrações

3.2.2 Métodos de Extração

3.2.2.1 Maceração

O gengibre seco e pulverizado foi submerso em álcool etílico (99,5%), na proporção de 1:10 m/v (planta/solvente), 25°C, durante um período de 2 dias. Posteriormente o extrato foi filtrado, e o solvente evaporado sob vácuo em rota-evaporador a 40°C [87].

3.2.2.2 Turboextração

O material vegetal seco e pulverizado foi submerso em álcool etílico, na proporção 1:10 m/v e em seguida submetido a turboextração por 10 min, a 21.000 rpm a 25°C. Posteriormente o extrato foi filtrado, e o solvente evaporado sob vácuo em rota-evaporador a 40°C [88].

3.2.2.3 Ultrassom

O material vegetal seco e pulverizado foi submerso em álcool etílico, na proporção 1:10 m/v e em seguida submetido ao ultrassom por 40 min, a 25°C. Posteriormente o extrato foi filtrado, e o solvente evaporado sob vácuo em rota-evaporador a 40°C [89,90].

3.2.2.4 Micro-ondas

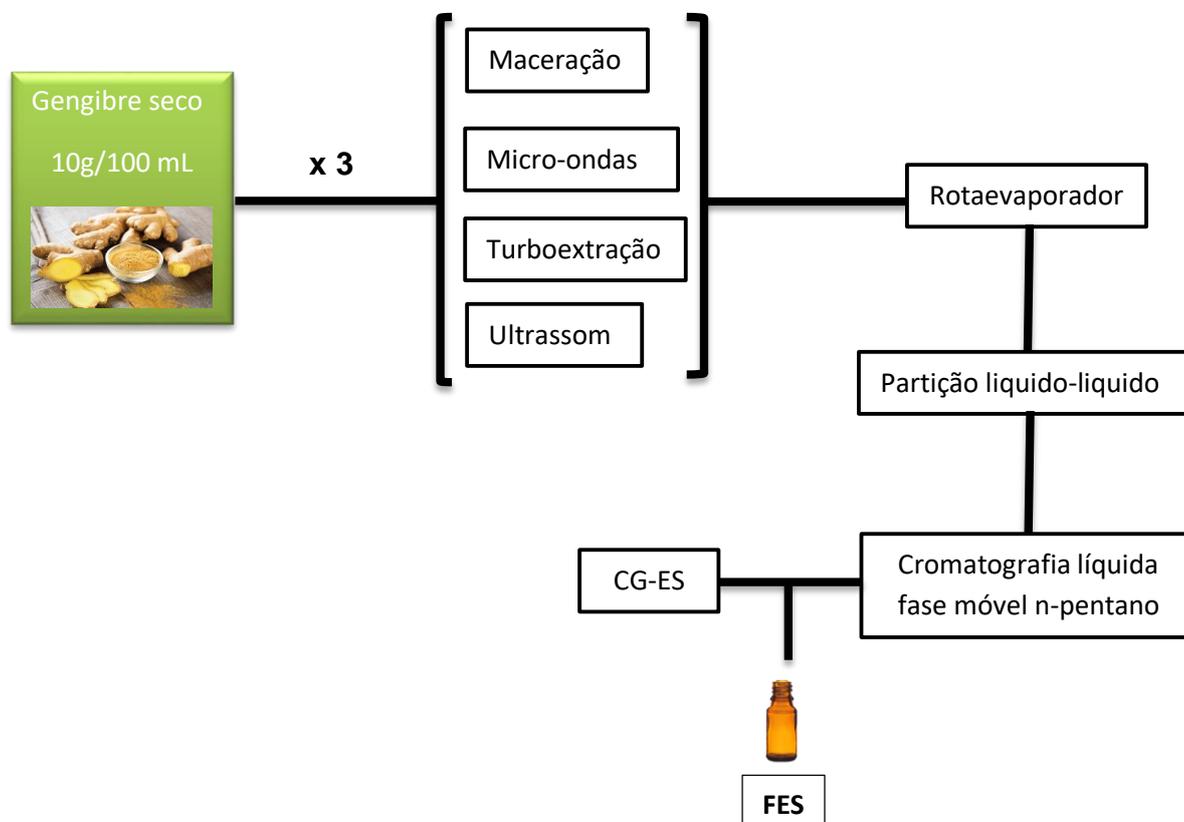
O material vegetal seco e pulverizado foi submerso em álcool etílico, na proporção 1:10 m/v e em seguida foi submetido ao micro-ondas por 1 minuto e 40 s, com potência de 800 W. Posteriormente, o extrato foi filtrado, e o solvente evaporado sob vácuo em rota-evaporador a 40°C [91-93].

3.2.3 Obtenção da fração enriquecida em sesquiterpenos

O extrato bruto obtidos dos rizomas de *Z. officinale* foi dissolvido em uma solução etanol/água, 70:30 (v/v), para realização de uma partição líquido-líquido, utilizando como solvente o *n*-hexânico (NEON). Este procedimento foi realizado em triplicata com recolhimento das frações apolares e rotaevaporação do solvente.

Por seguinte, as frações hexânicas foram submetidas à cromatografia líquida clássica, com a utilização de uma coluna de vidro preenchida com sílica gel (70-230 mesh, ASTM) e solvente *n*-pentano como fase móvel. Foram recolhidas cinco frações de 20 mL e analisadas por Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de massas, reunindo por fim as frações enriquecidas em sesquiterpenos em frascos de vidro âmbar (Figura 10).

Figura 10- Ilustração das etapas do processo de extração. Fonte: Própria autora.



3.3 Condições cromatográficas de análise

As análises cromatográficas foram realizadas por CG-EM (Shimadzu, GC-MS QP-2010 plus). O equipamento pertence ao Laboratório de Cromatografia do Instituto Federal de Sergipe (IFS) do Campus de Aracaju, gerenciado pelo Prof^o Dr. Adalberto Menezes Filho.

As condições cromatográficas foram as seguintes:

- Temperatura do injetor: 250 °C;
- Temperatura da interface: 250 °C;
- Gás de arraste: He (99,995 %);
- Fluxo do gás de arraste: 0,80 mL.min⁻¹;
- Injetor: Split/splitless (Foi utilizado no modo sem divisão);
- Volume de injeção: 1µL (Injeção automática);
- MS: Operado no modo Scan, com ionização por impacto de elétrons 70 eV;
- Rampa de aquecimento: Iniciou a 60 °C permanecendo por 1 min. A temperatura foi elevada até 100 °C com taxa de 25°C.min⁻¹ permanecendo 3 min. Em seguida a temperatura sofreu incremento até atingir 155 °C com uma taxa de 5 °C.min⁻¹, permanecendo por 5 min e finalmente chegando a temperatura de 200 °C com uma taxa de 10 °C.mn⁻¹, permanecendo por 2 min. O tempo de análise cromatográfica foi de 30 min.

3.4 Planejamento Fatorial 2³

No presente trabalho, para otimização da extração dos sesquiterpenos do gengibre, foi utilizado um planejamento fatorial de 2³ (Tabela 4). O rendimento e a quantidade de α -zingibereno são as respostas do experimento, as quais dependeram de três fatores: tempo, relação massa/volume e potência do micro-ondas. Foram realizados 8 ensaios em duplicata totalizando 16 experimentos. Os níveis e fatores utilizados no planejamento podem ser observado na matriz de planejamento (Tabela 4) [94].

Tabela 4- Planejamento fatorial 2^3 . Os fatores tempo, razão m/v e potência de irradiação apresentam-se dispostos em limite inferior e superior

	Limite Inferior (-)	Limite Superior (+)
Fatores:		
1: Tempo:	2	4
2: Razão m/v:	1:20	1:10
3: Potência:	400 W	800 W

Ensaio	1	2	3	Rendimentos		Média	Área do α -zingibereno
1	-	-	-	$X_{1.1}$	$X_{1.2}$	Y_1	Z_1
2	+	-	-	$X_{2.1}$	$X_{2.2}$	Y_2	Z_2
3	-	+	-	$X_{3.1}$	$X_{3.2}$	Y_3	Z_3
4	+	+	-	$X_{4.1}$	$X_{4.2}$	Y_4	Z_4
5	-	-	+	$X_{5.1}$	$X_{5.2}$	Y_5	Z_5
6	+	-	+	$X_{6.1}$	$X_{6.2}$	Y_6	Z_6
7	-	+	+	$X_{7.1}$	$X_{7.2}$	Y_7	Z_7
8	+	+	+	$X_{8.1}$	$X_{8.2}$	Y_8	Z_8

3.5 Inibição do crescimento microbiano

Os testes foram realizados em placas de 96 poços, com suspensão microbiana de $(1-5 \times 10^6 \text{ UFC/mL})$, incubadas por período de 24 horas a 37°C para os micro-organismos: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Para o cultivo desses micro-organismos utilizou-se o meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) suplementado com 6% de glicose [95].

Enquanto os micro-organismos: *Streptococcus mutans* (UA 159) [96] e *Streptococcus agalactiae* (VIR 2603) [97], foram incubados por 48 horas a 37°C

em meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion) suplementado com 6% de sacarose. O meio de cultura foi trocado após 24 horas de incubação [98].

A fração enriquecida em sesquiterpenos foi dissolvida em DMSO a uma concentração de 20 mg/mL e diluídas nos meios de cultura utilizados, de modo que a concentração máxima final nos poços foi de 2 mg/mL e mínima de 0,17 mg/mL. Para o controle negativo utilizou-se poços com apenas meio de cultura e como controle positivo foram utilizados apenas o inóculo dos micro-organismos.

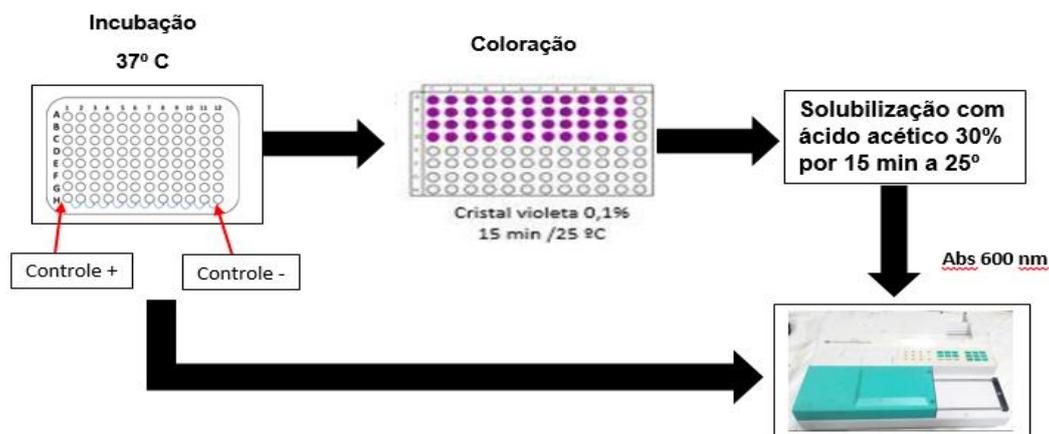
3.6 Inibição da formação de biofilme

Os ensaios para a avaliação da formação de biofilme foram executados em três etapas: lavagem das células plactônicas, coloração e solubilização do biofilme formado nas microplacas de 96 poços.

Inicialmente as células plactônicas foram removidas por inversão e por duas lavagens com água destilada. Após, a inversão final as placas foram secas a temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, adicionou-se 200 μ L de solução 0,1% m/v de cristal de violeta e incubou-se a placa a temperatura ambiente (25°C) por 15 min [99]. Decorrido esse período a placa foi lavada quatro vezes com água destilada e seca por inversão em papel toalha.

Para a quantificação do biofilme formado procedeu-se a adição de 150 μ L de ácido acético 30% (v/v) em cada poço para solubilização do cristal violeta seguida de incubação por 15 min a 25°C. Em seguida, transferiu-se 100 μ L do cristal de violeta solubilizado para uma nova microplaca, a qual foi lida a 600 nm em leitor de microplacas [100] (Figura 11).

Figura 11- Ilustração de algumas etapas da avaliação da inibição de biofilme.
Fonte: Própria autora.



3.7 Índice de hidrofobicidade da superfície celular

A hidrofobicidade da superfície celular das bactérias foi medida de acordo com o teste de adesão microbiana ao hidrocarboneto.

As células cresceram em BHI suplementado com 6% de glicose com concentrações sub-CIM da FES de 250, 125 e 61 µg/mL. Estas células foram lavadas três vezes e suspensas em solução salina estéril, para ajuste da densidade óptica de 0,3 a 600 nm. A suspensão de células (3 mL) foi transferida para tubos de ensaio nos quais adicionou-se 1 mL de tolueno. Em seguida os tubos foram agitados no vortex durante 2 minutos e mantidos a temperatura ambiente por 15 minutos. Após as separações das fases, foi medida a absorbância da fase aquosa em espectrofotômetro a 600 nm [101]. Assim, a equação abaixo foi utilizada para quantificar o Índice de Hidrofobicidade (IHD), onde a absorbância inicial é 0,3 e a final é a absorbância medida no final do experimento:

$$IHD = \frac{Abs(inicial) - Abs(final)}{Abs(inicial)} \times 100$$

3.8 Inibição da atividade proteásica da papaína

Para determinação da atividade enzimática foram realizados ensaios semi-quantitativos de difusão em ágar em placas de Petri. A metodologia baseia-se na detecção de atividade de proteases de microrganismos utilizando ágar leite [102].

Inicialmente, foi realizada a esterilização do ágar nutriente suplementados com 1% de leite em pó desnatado. Em seguida, foram adicionadas 50 mL dessa mistura em placas de Petri de diâmetro 14 cm. Após, a solidificação do gel, foram construídos poços de maneira uniforme na placa. A esses poços foram adicionados a solução formada entre a fração enriquecida em sesquiterpenos e a papaína na proporção de 1:40, em concentrações de FES de 16, 31, 62, 125, 250 e 500 µg/mL. A solução enzimática da papaína foi preparada em tampão fosfato 10 mM (pH 5,2), contendo 5 mM EDTA em uma concentração de 9,4 mg/mL. As soluções foram incubadas por um período de cinco minutos antes da sua utilização [103].

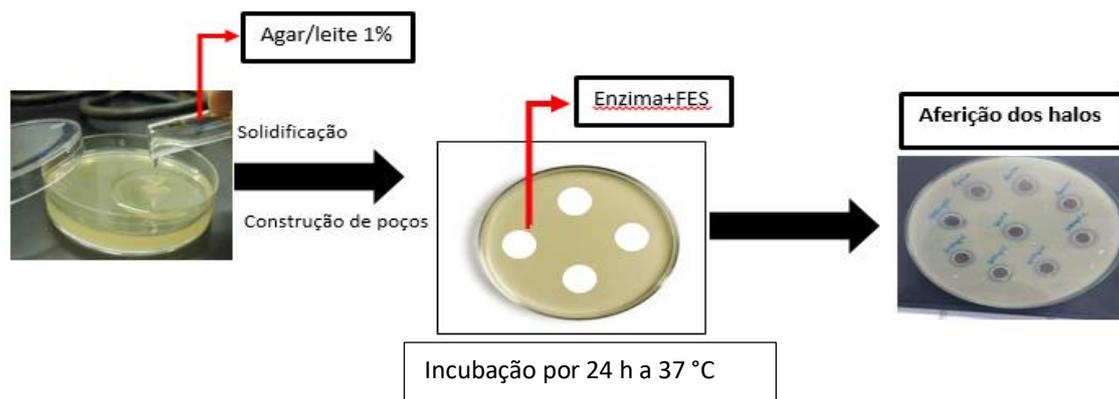
As placas de Petri foram incubadas a 37 °C em estufa bacteriológica por 24 horas. A atividade enzimática pôde ser observada a partir da formação de halos no ágar/leite, resultado da degradação da caseína presente no leite pela enzima. Adicionou-se uma solução de ácido clorídrico 1 M para melhor visualização dos halos formados, pois a adição do mesmo precipita a caseína no leite que não foi hidrolisada [103].

Os ensaios foram realizados em triplicata para cada concentração, e os halos foram aferidos com auxílio de um paquímetro. A equação abaixo foi utilizada para o cálculo de inibição percentual da papaína:

$$\text{Inibição enzimática (\%)} = 100 \times \left(1 - \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{enzima}}}\right)$$

Onde, A_{amostra} é a área do círculo formado na presença de FES e, A_{enzima} é a área do círculo formado quando apenas a solução enzimática estava presente no poço (Figura 12).

Figura 12- Etapas para avaliação da inibição da papaína. **Fonte:** Própria autoria



3.9 Análise Estatística

Os resultados obtidos nos experimentos envolvendo micro-organismos e enzimas foram tratados estatisticamente utilizando-se o programa GraphPad Prism®, versão 7.0, através de Análise de Variância (ANOVA) de 1 via, seguido Teste de Tukey e Dunnet. Foram consideradas significativas as diferenças com $p < 0,05$. Já para os experimentos envolvendo as extrações e a análise de superfície resposta foi por meio do programa computacional Statistics, versão 10.0 (Statsoft).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento da fração enriquecida em sesquiterpenos *Z. officinale* Roscoe

A Tabela 5 apresenta o rendimento das frações enriquecidas em sesquiterpenos obtidas pelas quatro tipos de extração: maceração, micro-ondas, turboextração e ultrassom. O rendimento foi calculado como porcentagem de extrato obtido em relação a massa seca de gengibre.

Tabela 5 - Rendimento percentual das frações enriquecidas em sesquiterpenos obtido pelas técnicas: maceração, micro-ondas, turboextração e ultrassom.

Método de Extração	Tempo de Extração	Rendimento (%)
Maceração (M)	48 h	1,07 ± 0,01^a
Extração assistida por micro-ondas (EAM)	1 min e 40 s	0,85 ± 0,01^b
Turboextração (TE)	10 min	0,81 ± 0,03^c
Extração assistida por Ultrassom (EAU)	40 min	0,76 ± 0,00^c

Letras diferentes indicam que houve diferença estatística entre os grupos. ANOVA seguido de teste de Tukey ($p < 0,05$).

Após análise estatística (ANOVA, seguido Teste de Tukey), foi possível verificar que não houve diferença significativa entre as extrações realizadas por turboextração (TE) e ultrassom (EAU), com $p = 0,171$ ($> 0,05$).

Como este foi o primeiro trabalho onde se realizou a extração de uma fração enriquecida em sesquiterpenos dos rizomas de *Z. officinale*, foram utilizados os dados da literatura referentes a extração de óleos essenciais para comparação,

pois os óleos essenciais apresentam os mesmos sesquiterpenos extraídos neste trabalho.

Ao analisar a variação de rendimento da fração enriquecida em sesquiterpenos (FES), ocorrida neste trabalho com a extração do óleo essencial de gengibre em outros trabalhos, observa-se que há diferenças nos rendimentos conforme o tempo e o método de extração que é utilizado. Vale ressaltar que a FES apresenta apenas uma fração dos componentes presentes no óleo essencial de gengibre e mesmo assim o rendimento de obtenção da FES foi maior quando comparado com os dados da literatura.

Pereira et al. [104] obtiveram rendimento do óleo essencial de gengibre fresco entre 0,2 e 2,7%, por arraste à vapor e extração por solvente. Enquanto, Oliveira [105] obteve um rendimento de 0,68% para o óleo essencial de gengibre a partir de seus rizomas desidratados. Dabague et al. [106] relatam que os rendimentos do óleo essencial de gengibre frescos por hidrodestilação são normalmente inferiores quando comparado com outras espécies aromáticas.

Meira et al. [107] obtiveram rendimentos de 1,4 a 2,4% do óleo essencial de *Melissa officinale* L. (erva-cidreira) utilizando diferentes tempos de extração. Foi observado, neste estudo que, a utilização de maiores tempos de extração proporciona um aumento significativo no rendimento.

Gasparin et al. [108] em seu estudo, verificaram a interferência do processo de secagem no rendimento do óleo essencial de hortelã pimenta (*Mentha x piperita*), atingindo valores de 1%(30 °C e 70 °C), 1,19%(40 °C), 1,4% (50 °C) e 1,35% (60 °C).

Costa et al. [109] conseguiram obter um rendimento de 4,6% do óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin*), valor superior ao relatado na literatura, onde outros autores mencionam um rendimento médio de 1,5 a 3,5%, quando extraído pelo método de hidrodestilação [110,111].

Já Boland e Bhophy [112] relatam rendimentos dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* (0,5-2%) e *Eucalyptus globulus* (07-2,4%) em seu trabalho de caracterização térmica de óleos essenciais de plantas aromáticas.

As diferenças nos valores de rendimento podem ser justificadas por fatores como, a época de colheita, o tipo de solo, o clima, tempo e temperatura de secagem. Deve-se levar em consideração também que os fatores abióticos, como as interações entre a planta e o ambiente, acarretam alterações no teor do óleo essencial produzido [113].

Finalmente os rendimentos das extrações apresentados neste trabalho encontram-se dentro da faixa de valores contidos na literatura. Uma vez que os sesquiterpenos apresentam-se como principais constituintes do óleo essencial de gengibre. No entanto, os óleos essenciais extraídos a partir de plantas requerem uma grande quantidade de material vegetal para obtenção de elevadas quantidades, sendo necessário mecanismos que objetivem sua simplificação, demonstrando eficiência, redução do tempo, material vegetal e solvente a ser utilizado em todo o processo.

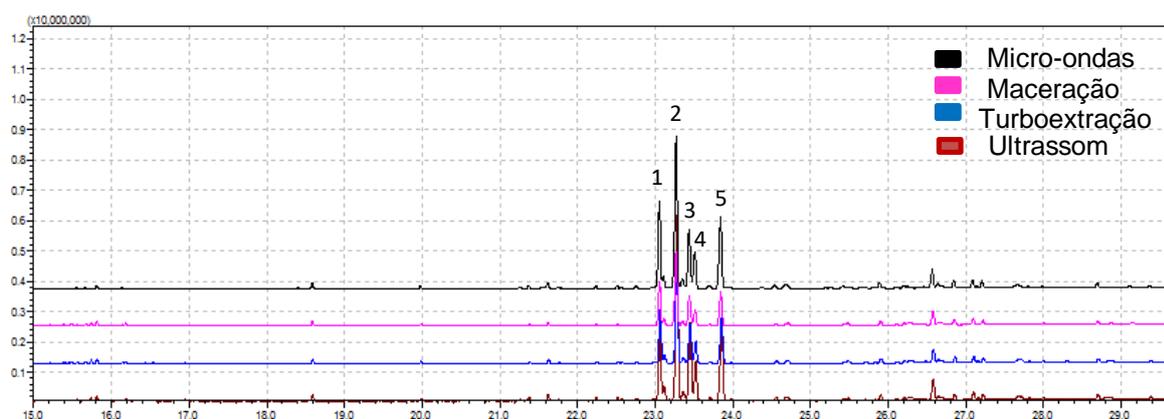
4.2 Identificação dos sesquiterpenos majoritários presentes nos rizomas de *Z. officinale* e sua quantificação relativa

Da fração *n*-hexânica obtida do extrato bruto dos rizomas de *Z. officinale*, isolou-se uma mistura de sesquiterpenos, utilizando uma coluna preenchida com sílica gel 70-230 mesh (40 x 4,0 cm, eluição isocrática: *n*-pentano 100%). Foram coletadas 5 subfrações (20 mL cada), e destas, a mistura de sesquiterpenos foi detectada nas frações 2, 3 e 4. Estas frações (FES) foram reunidas e analisadas por CG/EM.

Os perfis cromatográficos são semelhantes para todos os extratos obtidos e todos os picos foram identificados por similaridade dos espectros de massas da

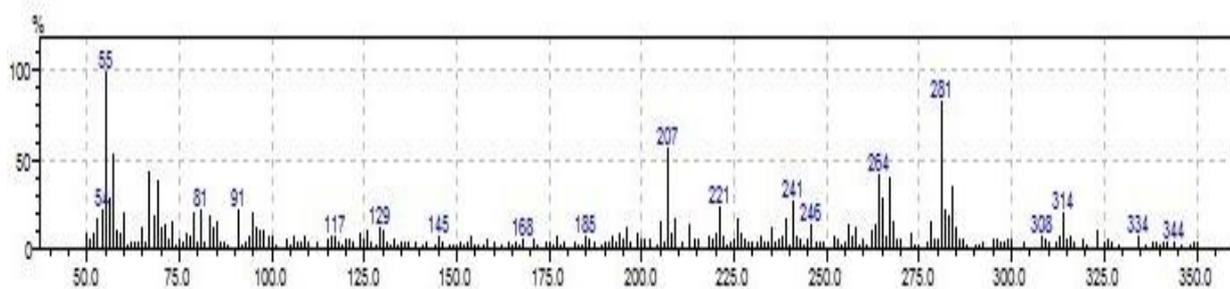
biblioteca NIST com auxílio da tese de doutorado de Silva [42], onde cada sesquiterpeno foi identificado utilizando o índice de Kovats. O pico 1 refere-se ao α -curcumeno, o 2 (majoritário) ao α -zingibereno, o 3 ao α -farneseno, o 4 ao β -bisaboleno e o pico 5 ao β -sesquifelandreno (Figura 13).

Figura 13 - Cromatograma obtido por cromatografia gasosa da FES proveniente da extração assistida por micro-ondas, maceração, turboextração e ultrassom. α -curcumeno (1), α -zingibereno (2), α -farneseno (3), β -bisaboleno (4) e β -sesquifelandreno (5).



Os tempos de retenções (t_R) do α -curcumeno, α -zingibereno, α -farneseno, β -bisaboleno, β -sesquifelandreno foram: 23,18; 23,32; 23,41; 23,53; 23,83 minutos. O espectro de massas referente aos sesquiterpenos estão representados abaixo (Figura 14).

Figura 14 – Espectro de massas (IE: 70 eV) proveniente da injeção da Fração Enriquecida com Sesquiterpenos extraídos por maceração.



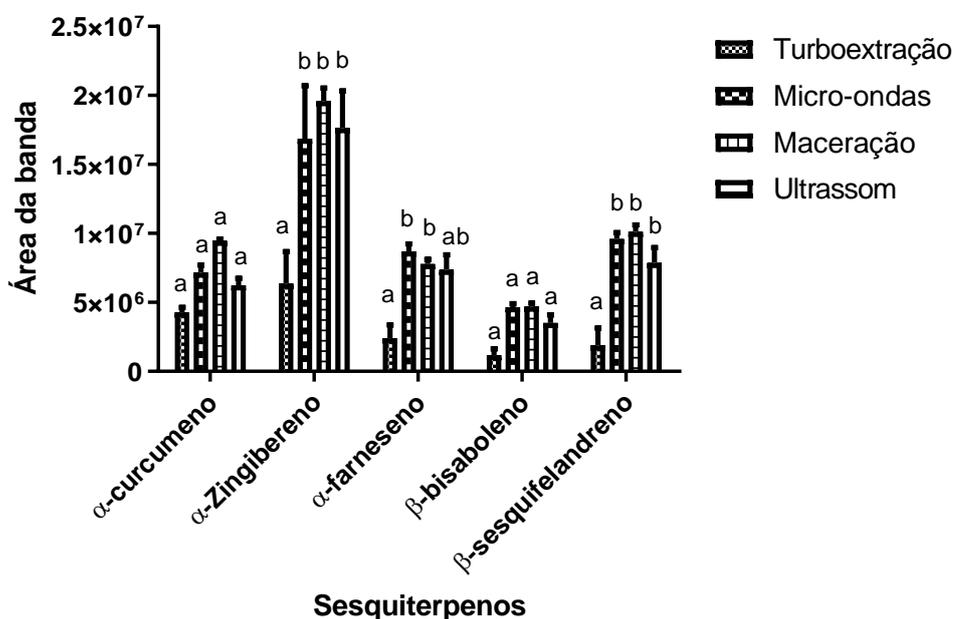
A Tabela 6 apresenta o percentual relativo dos constituintes da FES obtidos pelas quatro técnicas de extração. O percentual dos constituintes obtidos por micro-ondas, maceração e ultrassom se assemelham com os resultados obtidos por Yahya et al. [7]. Em seu estudo ao analisar o extrato etanólico obtido por maceração do rizoma *Z. officinale* por CG-EM, identificou-se α -curcumeno (12,9%), α -zingibereno (45,24%), β -bisaboleno (17,2%) e β -sesquilefandreno (24,65%).

Tabela 6- Composição dos sesquiterpenos obtidos por turboextração, micro-ondas, maceração e ultrassom.

	Turboextração	Micro-ondas	Maceração	Ultrassom
<i>α-curcumeno</i>	12,16%	15,50%	16,73%	14,66%
<i>α-zingibereno</i>	14,46%	40,88%	41,73%	41%
<i>α-farneseno</i>	5,6%	20,30%	18,21%	17,27%
<i>β-bisaboleno</i>	2,75%	11,15%	11,14%	8,30%
<i>β-sesquifelandreno</i>	4,45%	24%	23,7%	18,54%

Na Figura 15 pode-se observar o gráfico com os resultados das quantidades de sesquiterpenos extraídos dos rizomas de *Z. officinale* pelas quatro técnicas de extração.

Figura 15 – Áreas das bandas dos sesquiterpenos presente na FES extraídos dos rizomas de *Z. officinale* por maceração, turboextração, micro-ondas e ultrassom. ANOVA, seguida de teste de Tukey ($p < 0,05$). Letras iguais indicam que não houve diferença estatística entre as técnicas de extração. Esta análise foi realizada dentro do mesmo grupo.



A extração dos sesquiterpenos utilizando turboextração resultou na menor quantidade de α -zingibereno, α -farneseno e β -sesquifelandreno. As demais técnicas (M, EAM e EAU) foram capazes de extrair maiores quantidades de sesquiterpenos, sem diferença significativa entre estas técnicas para todos os compostos. Vale ressaltar a grande quantidade de α -zingibereno extraído pelas técnicas M, EAM e EAU, quando comparado com a turboextração.

Cutrim et al. [114] identificaram a presença de 18 componentes no óleo essencial de gengibre fresco extraídos por hidrodestilação em aparelho de Clevenger. Destes, apresentavam predominância os sesquiterpenos α -zingibereno (27,14%) e β -sesquifelandreno (9,45%).

Koroch et al. [115] ao analisar uma espécie de gengibre do Madagascar, encontraram 11 compostos no óleo essencial de gengibre fresco. Este foi submetido ao processo de extração por hidrodestilação, apresentando os principais constituintes químicos: α -zingibereno (22,9%), β -bisaboleno (8,5%), β -sesquifelandreno (6,5%), α -curcumeno (7,7%) e α -farneseno (0,9%).

Da mesma forma, Bhargava et al. [116] em seu estudo fitoquímico do *Zingiber officinale* encontrou 20,57% de α -zingibereno na extração com etanol como solvente. Enquanto, ao utilizar o metanol, como solvente, obteve-se 15,32% do mesmo composto.

Os resultados apresentados neste trabalho se assemelham-se com os da literatura, principalmente, aos sesquiterpenos majoritários do óleo essencial de gengibre, α -zingibereno e β -sesquifelandreno.

Observa-se que os maiores rendimentos seguido das maiores concentrações de sesquiterpenos obtidos neste trabalho foram por maceração e micro-ondas. Contudo, a extração por micro-ondas apresentou-se mais eficiente, uma vez que a maceração possui desvantagens como: elevados tempo, grande demanda de solvente a partir de rendimentos similares. A extração realizada por micro-ondas demonstrou-se eficiente e eficaz, devido a utilização de seu menor tempo de extração atingir um rendimento de extração muito semelhante ao obtido por maceração.

O aquecimento provocado pela potência de irradiação, na extração por micro-ondas, também pode ter contribuído para excelente extração dos sesquiterpenos, pois temperaturas mais elevadas aumenta a eficiência de extração [117]. Assim, a temperatura de extração mais elevada contribuiu para que a extração com micro-ondas ocorresse em tempo muito inferior utilizado na maceração.

Devido ao caráter promissor da extração dos sesquiterpenos por micro-ondas um estudo detalhado das variáveis do seu processo extrativo foi realizado. A fim de otimizar o seu processo para se obter uma fração enriquecida em sesquiterpenos.

4.3 Otimização da extração dos sesquiterpenos dos rizomas de *Z. officinale*

A matriz de planejamento fatorial com os valores dos rendimentos de extração pode ser observada na Tabela 7. O experimento 2, foi o que obteve maior rendimento da FES utilizando os limites inferiores de razão massa/volume e

potência, e o limite superior para o tempo de extração, no entanto, o α -zingibereno foi obtido em maior quantidade no experimento 1.

Tabela 7- Resultado de um planejamento fatorial 2^3 para otimização das condições de obtenção de uma Fração Enriquecida em Sesquiterpenos (FES). Fatores de respostas são o rendimento em porcentagem e área do sesquiterpeno majoritário.

	Limite Inferior (-)	Limite Superior (+)
Fatores:		
1: Tempo:	2	4
2: Razão m/v:	1:20	1:10
3: Potência:	400 W	800 W

Ensaio	1	2	3	Rendimentos	Media	σ	Área do α -zingibereno
1	-	-	-	0,78% 0,78%	0,78%	$\pm 0,03$	$3,37 \times 10^7$
2	+	-	-	0,94% 0,96%	0,95%	$\pm 0,08$	$3,24 \times 10^7$
3	-	+	-	0,78% 0,76%	0,77%	$\pm 0,08$	$2,50 \times 10^7$
4	+	+	-	0,67% 0,66%	0,66%	$\pm 0,07$	$2,78 \times 10^7$
5	-	-	+	0,77% 0,78%	0,77%	$\pm 0,03$	$2,19 \times 10^7$
6	+	-	+	0,55% 0,51%	0,53%	$\pm 0,16$	$2,96 \times 10^7$
7	-	+	+	0,44% 0,42%	0,43%	$\pm 0,16$	$1,82 \times 10^7$
8	+	+	+	0,43% 0,44%	0,44%	$\pm 0,09$	$1,46 \times 10^7$

Observa-se que a manutenção dos níveis de razão massa/volume e aumento do tempo de extração de 2 min para 4 min, favorecem a obtenção de maior rendimento (experimento 1-2). Entretanto, quando essa elevação do tempo de extração é acompanhada com a modificação em um nível dos fatores principais, razão massa/volume e potência, há um declínio tanto no rendimento de extração como na quantidade de α -zingibereno extraído (experimento 3-4 e 5-6), principalmente, quando o nível 3 (potência) passa de 400 W para 800 W.

Para melhor visualização foram traçados diagramas em cubo contendo as respostas rendimento de extração da FES e quantidade do sesquiterpeno majoritário (α -zingibereno), para cada experimento (Figuras 16 e 17).

Figura 16 - Diagrama em cubo com o rendimento global (%) da FES para cada condição específica.

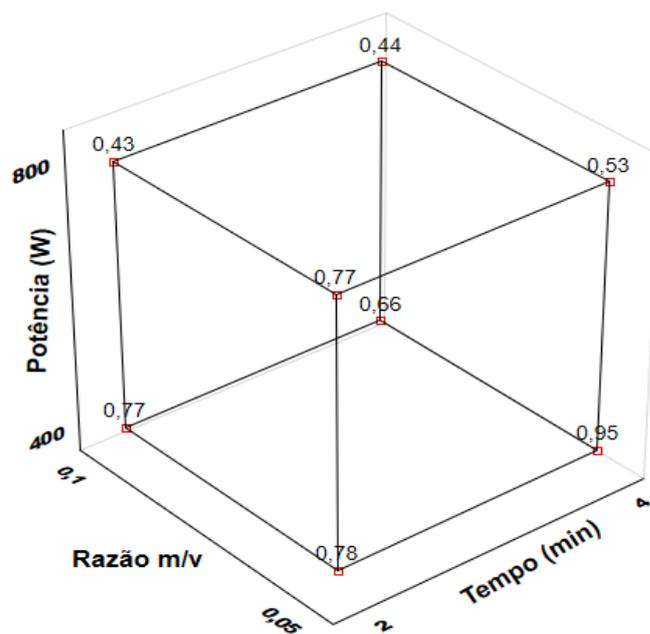
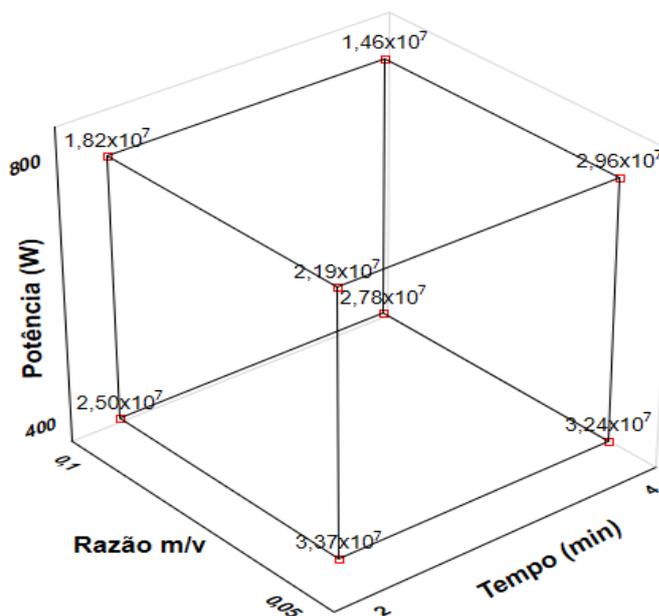


Figura 17 - Diagrama em cubo com a área do constituinte majoritário (α -zingibereno), para cada condição específica.



No diagrama em cubo da Figura 17 é demonstrado que a utilização de todas as variáveis nos menores níveis, referente ao experimento 1 (tempo: 2 min, razão massa/volume 1:20 e potência 400 W) favorece o maior rendimento do sesquiterpeno majoritário, diferente do que foi observado quando foi utilizado como resposta o rendimento de extração (diagrama 15). O rendimento do α -zingibereno do experimento 1 foi estatisticamente igual ao rendimento obtido no experimento 2 ($p > 0,05$, segundo teste de Tukey).

Racoti et al. [118] relataram a interação entre potência e o tempo na extração assistida por micro-ondas do óleo essencial de *Z. officinale* fresco. Seu estudo mostra que a utilização de 500 W e 4,8 min de tempo de extração favorece a maior obtenção de o α -zingibereno (31%). Enquanto, que o aumento da potência de 500 W para 1000 W mesmo com a diminuição do tempo de extração (2,4 min) reduz-se o rendimento para 25,5%. Isto foi observado no presente trabalho ao empregar a mais baixa potência do micro-ondas (400 W) para obtenção dos sesquiterpenos.

A partir dos três principais fatores tempo (1), razão massa/volume (2) e potência (3), tem-se três interações de dois fatores, 12, 13 e 23 e uma interação de três fatores 123. Fazendo uma análise estatística dos dados com o teste t em nível de confiança 95% verifica-se que todos os efeitos principais são significativos e

apenas a interação 12 (tempo de extração e razão massa/volume) é insignificativa (Tabela 8).

Tabela 8 - Interações dos efeitos principais do planejamento fatorial 2^3 para otimização da FES.

Efeitos Principais	Estimador	ERRO
1	-0,0425	0,007
2	-0,1825	0,007
3	-0,2475	0,007
Efeitos de interação de dois efeitos		
12	-0,0075	0,007 (*)
13	-0,0725	0,007
23	-0,0325	0,007
Efeitos de interação de três efeitos		
123	0,1325	0,007

(*) $p > 0,05$ para o efeito de interação entre tempo e razão massa/volume (*) $p > 0,05$ para o efeito de interação entre tempo e razão massa/volume.

A ausência de um efeito de interação insignificativo entre os efeitos principais indica que os mesmos devem ser interpretados individualmente. Os gráficos de superfície resposta (Figura 18,19 e 20) mostram essas interações, sendo possível verificar que o rendimento é crescente com o tempo de extração, mas é necessário utilizar condições brandas de potência de irradiação e proporções menores de massa/volume.

Figura 18 – Superfície de resposta apresentando o rendimento de extração da FES e a interação do tempo de extração com razão m/v.

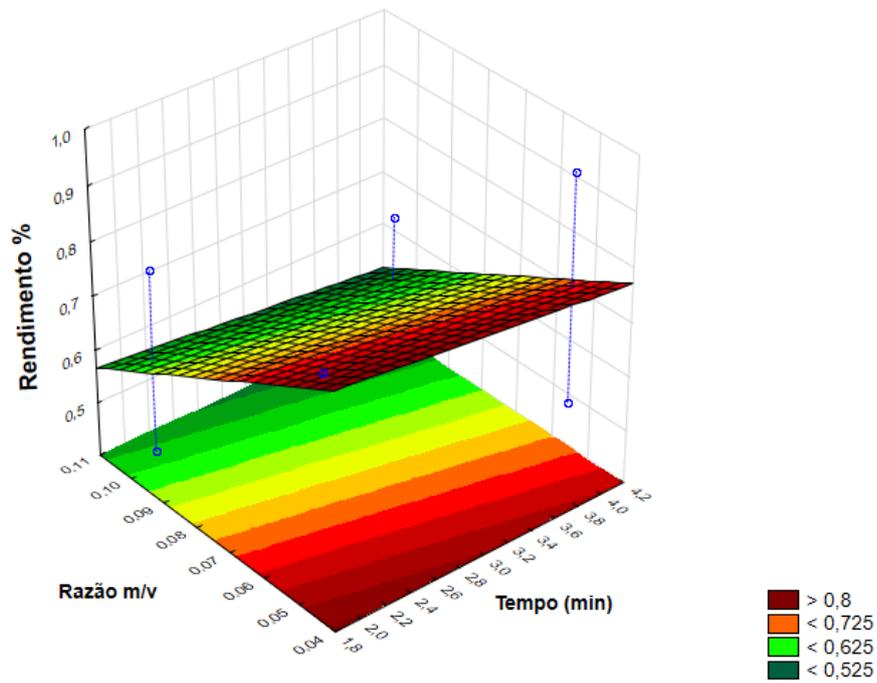


Figura 19 - Superfície de resposta apresentando o rendimento de extração da FES e a interação do tempo de extração com a potência.

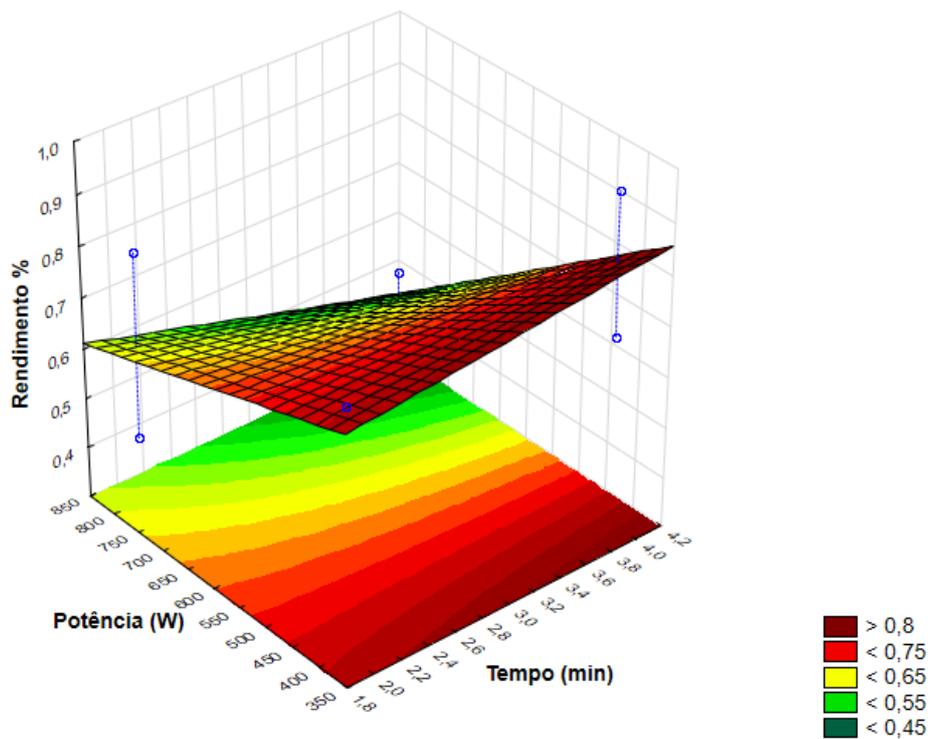
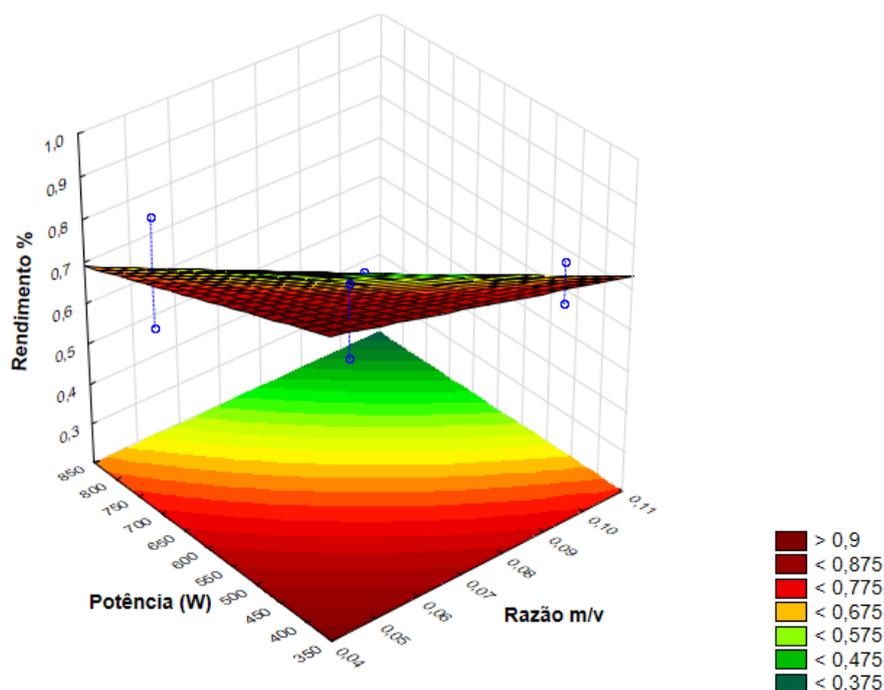


Figura 20 - Superfície de reposta apresentando o rendimento de extração da FES e a interação da potência com a razão massa/volume.



Alguns estudos de extração de óleos essenciais assistida por micro-ondas analisam o efeito do tempo e da potência no processo. Kusuma e Mahfud [119], estudaram o efeito das potências 400 e 600 W no rendimento do óleo essencial de patchouli, verificando que a 600 W há maior rendimento de extração. Já Abedil et al. [120], ao analisarem o efeito da interação da potência de irradiação com o tempo de extração do óleo essencial de *Nigela sativa* L. observaram que aumentando o tempo de extração de 15 para 30 min com potência de 180 para 450 W aumenta o rendimento de extração da FES, enquanto o mesmo começa a diminuir quando o tempo de extração e a potência foram elevados até 45 min e 720 W.

Isto pode ocorrer devido à volatilização e decomposição do óleo essencial e seus constituintes [121]. Fato este que pode explicar o motivo pelo qual os experimentos 6 e 8 apresentam os piores rendimentos, quando se utilizou o maior tempo de extração (4 min) e a maior potência de irradiação (800 W).

Assim, as melhores condições empregadas neste estudo foram utilizando 4 min de tempo de extração, razão massa/volume 1:20 e potência de radiação 400 W (experimento 2). Estas condições favoreceram tanto a obtenção do maior

rendimento do extrato (0,95%), como obtenção do principal sesquiterpeno da FES, α -zingibereno (Área da banda cromatográfica, 32430641,38). Desta maneira a FES obtida nesta condição, foi selecionada para realização dos ensaios biológicos.

4.4 Atividade de inibição do crescimento microbiano

Os ensaios de avaliação da atividade antimicrobiana foram realizados utilizando a fração enriquecida em sesquiterpenos (FES) obtida pelo experimento 2. A atividade antimicrobiana da FES foi verificada frente *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

A inibição do crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* em concentrações acima de 31 $\mu\text{g/mL}$ esteve na faixa de 47 a 77%. O maior percentual de inibição foi obtido em concentrações a partir de 500 $\mu\text{g/mL}$. Apenas, a concentração 16 apresentou insignificância estatística quando comparando com o controle, verificado após aplicação da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Dunnett (Figura 21).

Os resultados de inibição do crescimento da bactéria patogênica *Streptococcus agalactiae*, demonstraram inibição na faixa de 37,32 a 55,22% em concentrações acima de 250 $\mu\text{g/mL}$. Abaixo dessa concentração não ocorre inibição significativa quando comparada com o controle (Figura 22).

Figura 21 - Efeito das diferentes concentrações da FES sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus*. Foi realizado análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Dunnett (** $p < 0,0005$; ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$).

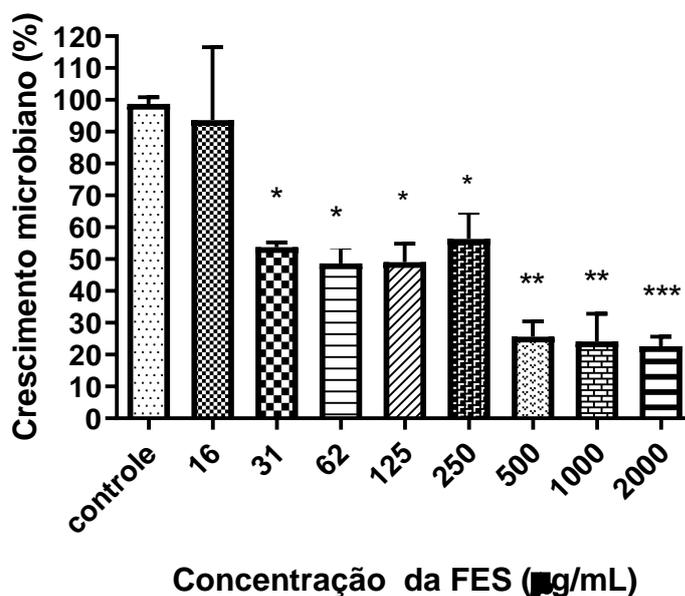
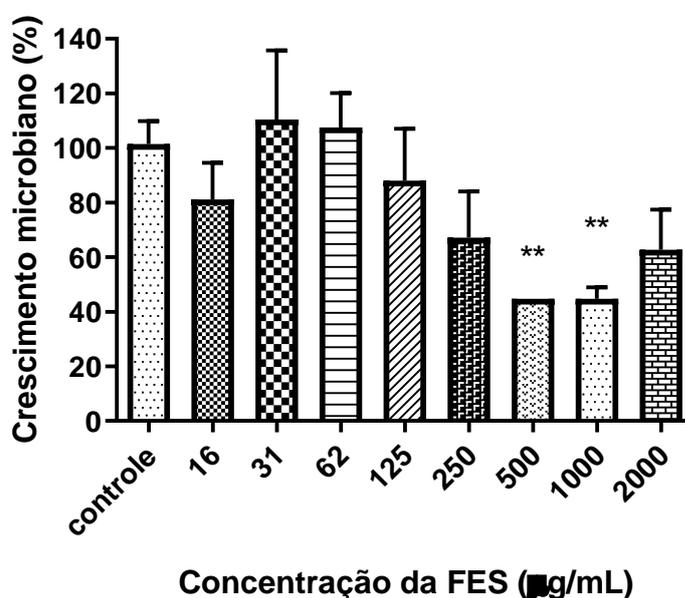


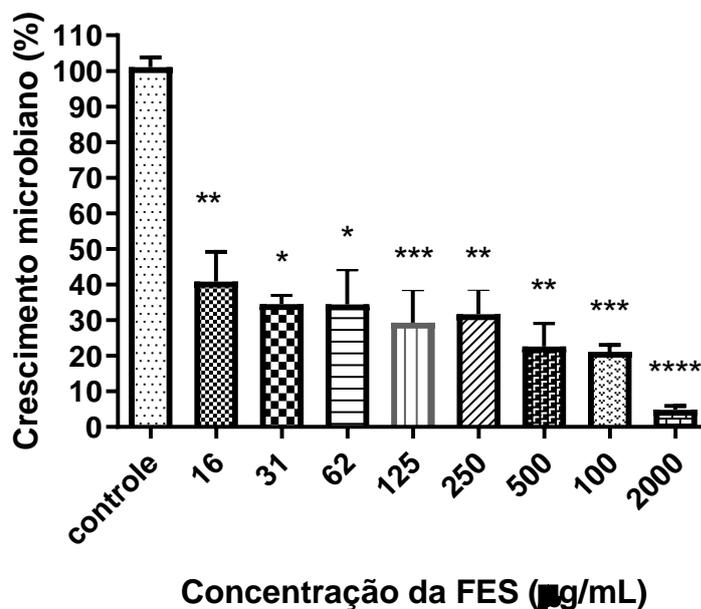
Figura 22 - Efeito das diferentes concentrações da FES sobre o crescimento de *Streptococcus agalactiae*. Foi realizado análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Dunnett (** $p < 0,05$).



A inibição do crescimento da bactéria *Streptococcus mutans* foi acima de 60% para todas as concentrações testadas (Figura 23), o que revela um grande

potencial da FES frente a esta bactéria. A concentração inibitória mínima foi de 2000 µg/mL, com crescimento microbiano menor que 5% (4,78 %).

Figura 23 - Efeito das diferentes concentrações da FES sobre o crescimento da *Streptococcus mutans*. Foi realizado análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Dunnett (****p < 0,0001, ***p < 0,005, **p < 0,01 e *p < 0,05)



Em relação, ao patógeno *Escherichia coli*, a inibição de seu crescimento nas concentrações de 16 a 1000 µg/mL esteve na faixa de 12 a 37%. Na concentração 2000 µg/mL a inibição do crescimento microbiano foi 65,64%. Esta concentração foi a única que apresentou diferença significativa quando comparada com o controle (Figura 24).

A bactéria *Pseudomonas aeruginosa* foi inibida de 55 a 84%, diante as concentrações testadas 16 a 2000 µg/mL, as quais apresentaram-se diferenças significativas em relação ao controle (Figura 25).

Figura 24 - Efeito das diferentes concentrações da FES sobre o crescimento de *Escherichia coli*. Foi realizado análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Dunnett (* $p < 0,05$).

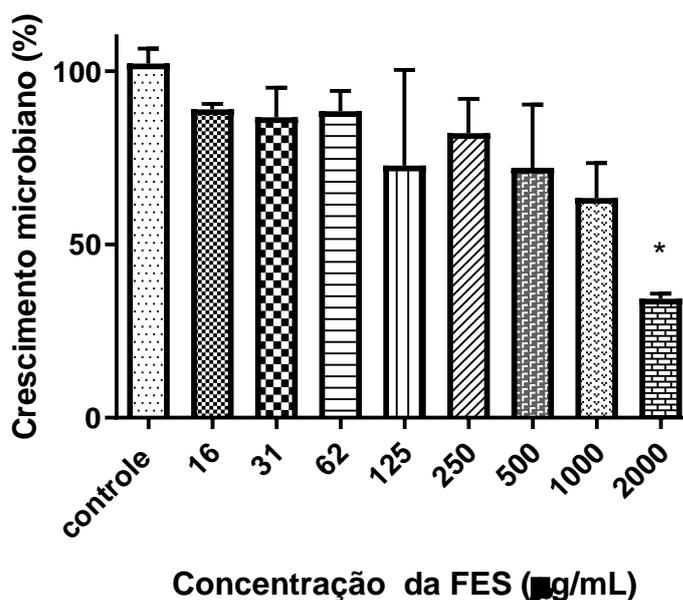
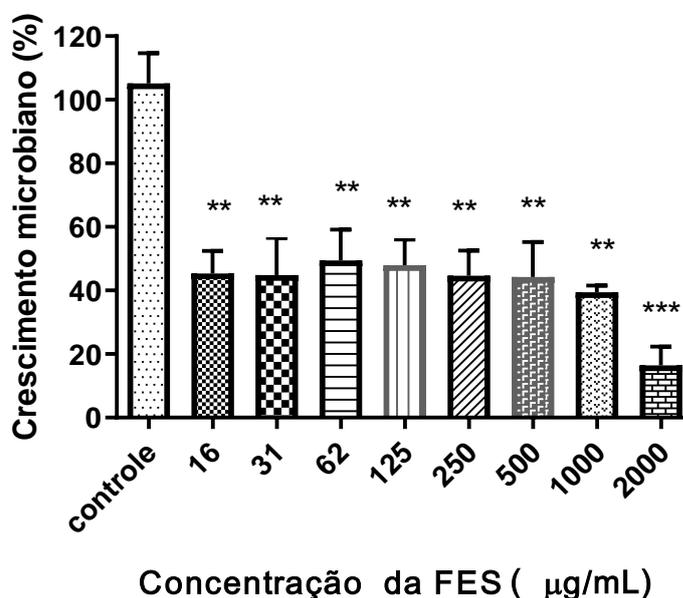


Figura 25 - Efeito das diferentes concentrações da FES sobre o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*. Foi realizado análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Dunnett (** $p < 0,05$ e *** $p < 0,005$).



A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) é de suma importância, pois possibilita identificar a eficácia do agente antimicrobiano. Uma baixa CIM pode indicar uma alta atividade [122].

Alligians et al. [123] propuseram a seguinte classificação da atividade microbiana para os materiais vegetais com relação a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Para ser considerado um inibidor forte para $CIM < 500 \mu\text{g/mL}$, inibido moderado $600 < CIM < 1000 \mu\text{g/mL}$ e inibidor fraco quando a $CIM > 1000 \mu\text{g/mL}$.

Diante dos resultados apresentados foi possível determinar o valor da CIM apenas para *S. mutans* em que a FES se enquadra como um inibidor fraco. A FES apresenta atividade pouco satisfatória no controle das bactérias patogênicas testadas, não havendo dados na literatura que possam comparar e confrontar os resultados deste trabalho em relação a FES.

Grégio e et al. [124] avaliaram a atividade antimicrobiana do *Zingiber officinale* frente a *S. aureus*, *S. mutans*, *E. coli* e *C. albicans*. O óleo essencial extraído dos rizomas de gengibre fresco pelo processo de hidrodestilação, apresentou baixa atividade frente aos micro-organismos testado. O seu extrato etanólico também foi avaliado com a determinação da CIM de $5000 \mu\text{g/mL}$, demonstrando baixo efeito antimicrobiano.

Yahya et al. [7], relatam uma concentração inibitória mínima de $12500 \mu\text{g/mL}$ de um extrato etanólico de gengibre frente a *Pseudomonas aeruginosa*. O extrato apresenta como constituintes α -curcumeno, α -zingibereno, β -bisaboleno e β -sesquifelandreno, os quais apresentaram uma baixíssima atividade antibacteriana.

Cutrim et al. [114] ao investigar a atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de *Z. officinale*, obteve CIM de $1000 \mu\text{g/mL}$ frente à *Escherichia coli* e $200 \mu\text{g/mL}$ frente a *S. aureus*. Enquanto, Andrade [125], verificou uma excelente atividade antimicrobiana do óleo essencial de gengibre com uma CIM de $7,81 \mu\text{g/mL}$ frente a *Staphylococcus aureus*, sendo classificado, segundo Alligianis como um forte agente inibitório.

As variações referentes a determinação da Concentração Inibitória Mínima podem ser atribuídas a diversos fatores. Dentre eles podem ser destacados os diferentes tipos de micro-organismos e cepas testadas, o tipo de bioensaio, a origem da planta, técnica de extração e quantidade de extrato ou substância utilizada no experimento, resultando em composições químicas diferentes no extrato e suscetibilidade ou não dos micro-organismos [126].

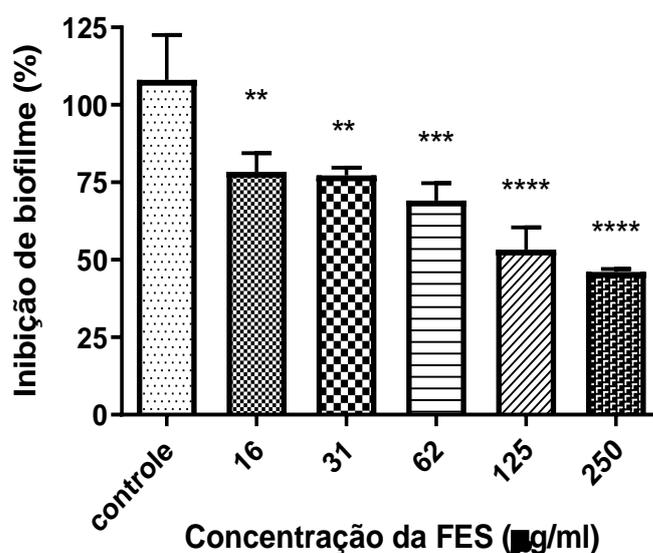
Assim, a fração enriquecida em sesquiterpenos apresenta uma baixa ou nenhuma atividade antibacteriana, uma vez que as bactérias testadas são pouco susceptíveis à amostra, corroborando com a maioria dos resultados na literatura sobre a investigação antimicrobiana do óleo essencial de gengibre e seus extratos.

4.5 Atividade de inibição da formação de biofilme

Foram avaliados o efeito de inibição da FES frente a formação de biofilme, apenas frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli*. As bactérias *Streptococcus mutans* e *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram um baixo crescimento microbiano, não sendo possível detectar a formação de biofilme.

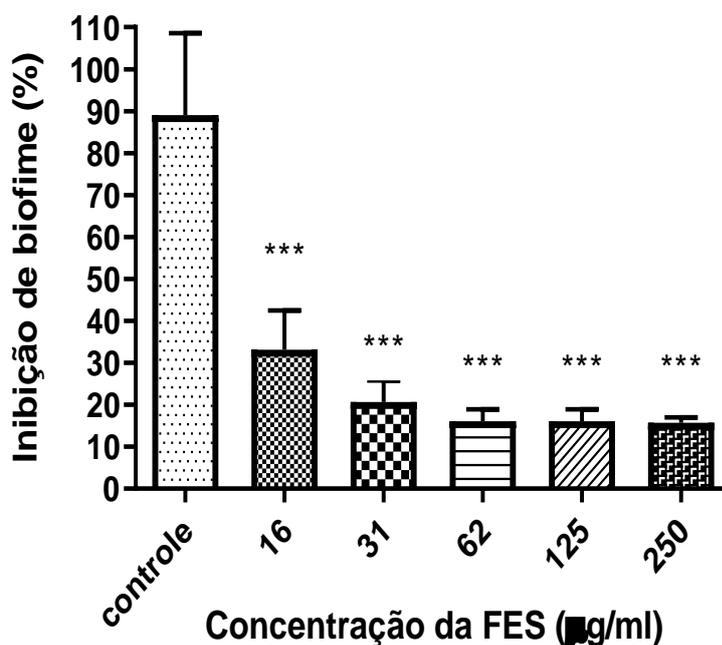
A FES, em concentrações sub-inibitórias, foi capaz de inibir a formação de biofilme frente a *Staphylococcus aureus*, em cerca de 55,6 % na concentração 250 µg/mL (Figura 26).

Figura 26 - Efeito das diferentes concentrações da FES sobre a formação de biofilme de *Staphylococcus aureus*. Foi realizado análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Dunnett (**** $p < 0,0001$, *** $p < 0,001$ e ** $p < 0,01$).



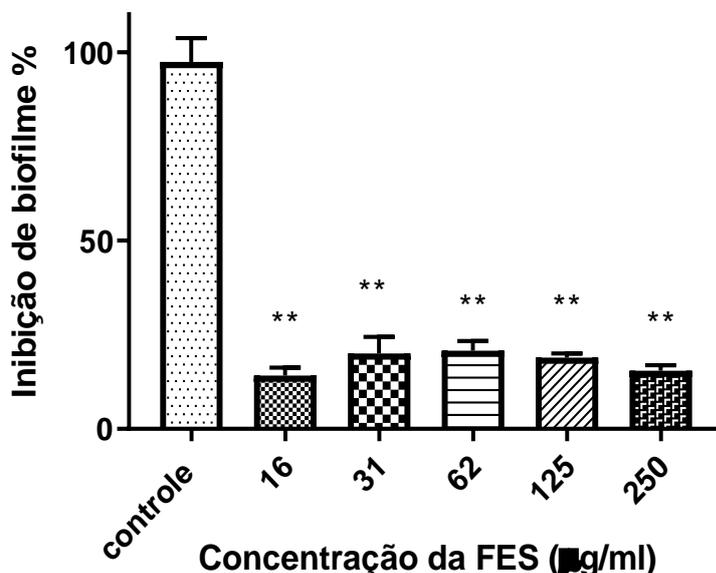
A inibição da formação de biofilme da bactéria *Streptococcus agalactiae* foi superior quando comparada com a inibição da formação de biofilme de *S. aureus*, para todas as concentrações testadas. Diante das concentrações utilizadas, a FES inibiu entre 66,88 a 84,30% a formação de biofilme (Figura 27).

Figura 27 - Efeito das diferentes concentrações da FES sobre a formação de biofilme de *Streptococcus agalactiae*. Foi realizado análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Dunnett ($***p < 0,001$).



A bactéria *Escherichia coli* demonstrou-se bastante susceptível frente a FES. Houve inibição acima de 80% na formação de biofilme. Não houve diferença significativa entre as concentrações utilizadas (Figura 28).

Figura 28 - Efeito das diferentes concentrações da FES sobre a formação de biofilme da *Escherichia coli*. Foi realizado análise de variância (ANOVA seguido de teste de Dunnett (** $p < 0,001$)).



A inibição da formação de biofilme pode ser apresentada pela porcentagem de concentração inibitória mínima de biofilme em 50% (CIMB50). Segundo Silva, [127], a CIMB50 é definida como a menor concentração do agente que apresenta redução de 50% ou mais na formação de biofilme.

Os valores determinados da CIMB50 foram 16 µg/mL para *Streptococcus agalactiae* e *Escherichia coli* e 250 µg/mL para *Staphylococcus aureus*. Apesar de na literatura conter estudos sobre a atividade antimicrobiana do óleo essencial de gengibre, não há relatos a respeito do potencial antimicrobiano e redução da formação de biofilme de frações enriquecidas em sesquiterpenos

Kim et al. [128] após ensaios de formação de biofilme estático, demonstraram que a formação de biofilme foi reduzida na faixa de 39 a 56% quando o extrato aquoso de gengibre foi testado frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Enquanto, Aghazadeh [129] em estudos de atividade antimicrobiana e antibiofilme com *Zingiber officinale*, observou um forte potencial do extrato de gengibre contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*, com destaque para a inibição de formação de biofilme frente à *C. albicans* com CIMB50 de 625 µg/mL.

Hasan et al. [130], em investigação do efeito inibitório de extratos de *Z. officinale* sobre os fatores de virulência de *Streptococcus mutans*, obtiveram significativos resultados contra o desenvolvimento de cárie. O extrato bruto de gengibre e sua fração metanólica apresentam CIMB50 de 16 µg/mL e 32 µg/mL, respectivamente.

Diversos estudos também relatam a ação antibiofilme dos óleos essenciais. Vale et al. [131] avaliaram a atividade antimicrobiana e antibiofilme do óleo essencial das folhas de *Vitex gardneriana* (predominância de 66,34% de sesquiterpenos). Apesar de apresentar-se inativo contra *P. aeruginosa*, o seu óleo essencial mostrou-se capaz de inibir a formação de biofilme com seu poder mais acentuado frente a *S. aureus*.

Nascimento et al. [132] verificaram a ação de óleo essencial de *Zingiber officinale* e outras espécies, na busca de extratos vegetais como inibidores de biofilme microbiano. Neste caso, foi relatado um baixo potencial antimicrobiano e antibiofilme do óleo essencial, extraído por hidrodestilação dos rizomas de gengibre fresco, frente a *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *E. coli*, *K. pneumoniae* e *B. thuringiensis*.

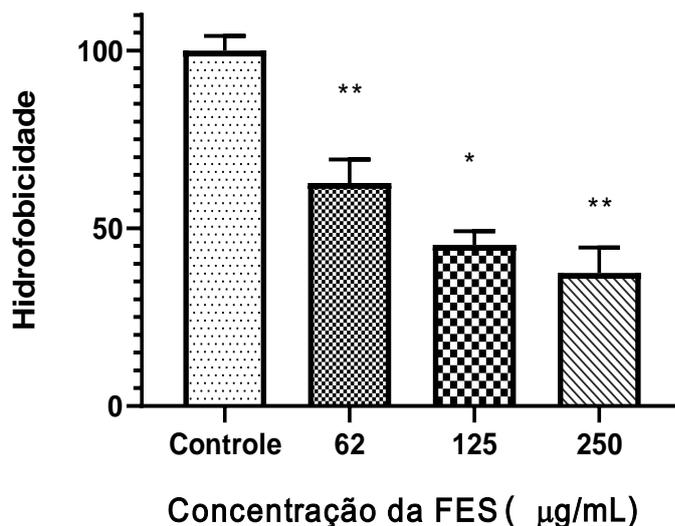
Segundo Carvalho et al. [133] o efeito redutor sobre a formação de biofilmes bacterianos de diversos óleos essenciais e seus constituintes, podem está intimamente relacionado a presença de terpenos em sua constituição química. Estes interagem com maior afinidade com a membrana bacteriana, impedindo que haja interação entre as bactérias impossibilitando a aderência das colônias em superfícies [134].

4.6 Determinação do índice de hidrofobicidade bacteriana

Foi avaliada a hidrofobicidade das superfícies bacterianas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus mutans* e *Escherichia coli* na presença e ausência de FES. Foi possível verificar se a FES consegue reduzir o índice de hidrofobicidade das bactérias, fenômeno importante para formação inicial do biofilme no estágio de adesão (Figuras 29-33).

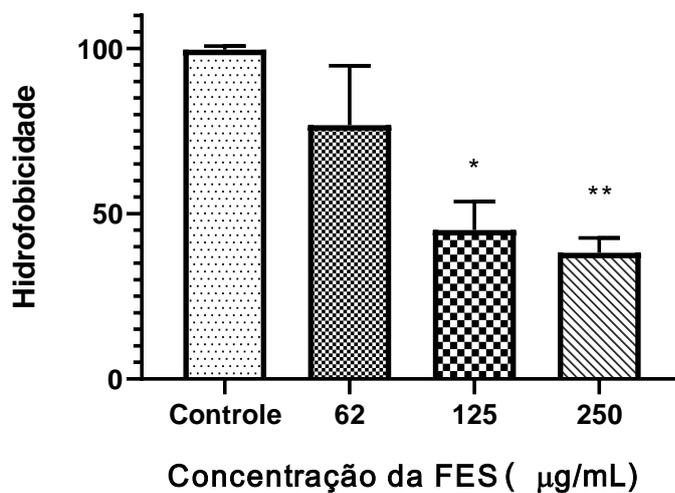
A hidrofobicidade de *Pseudomonas aeruginosa* foi significativamente reduzida pela FES. Pode-se observar uma redução de 35,27 a 62,6% nas sub-CIM de 62, 125 e 250 $\mu\text{g/mL}$. (Figura 29).

Figura 29 – Efeito das diferentes sub-CIMs da FES sobre a hidrofobicidade de *Pseudomonas aeruginosa*. Foi realizado análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Dunnett (** $p < 0,001$ e * $p < 0,01$).



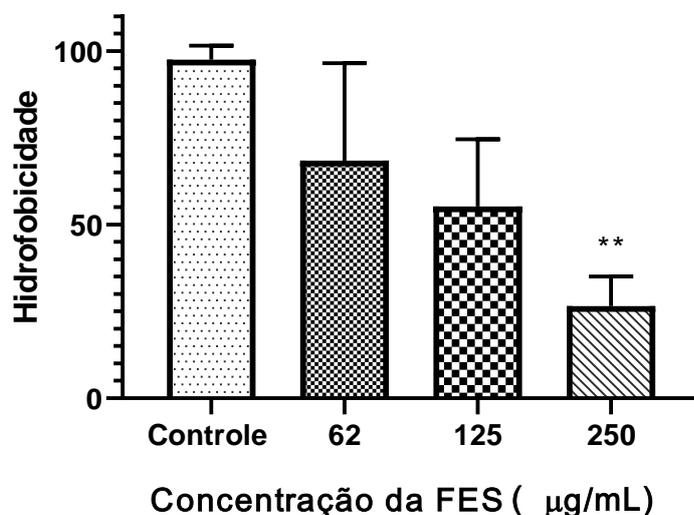
A redução do efeito de hidrofobicidade da bactéria *Staphylococcus aureus* entre as sub-CIM utilizadas foi de 23,24 a 61,86% (Figura 30). A análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Dunnett informa que não existe diferença significativa entre a sub-CIM de 62 $\mu\text{g/mL}$ e o controle.

Figura 30 – Efeito das diferentes sub-CIMs da FES sobre a hidrofobicidade de *Staphylococcus aureus*. Foi realizado análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Dunnett (**p < 0,005 e *p < 0,01).



Já a hidrofobicidade da bactéria *Streptococcus agalactiae* frente as sub-CIMs 62 a 250 µg/mL esteve na faixa de 31,55 a 73,44%. O teste de Dunnett revela que não existe diferença significativa das médias do controle quando comparado com a concentração 62 e 125 µg/mL, mostrando que a única concentração efetiva na redução da hidrofobicidade foi 250 µg/mL (Figura 31).

Figura 31- Efeito das diferentes sub-CIMs da FES sobre a hidrofobicidade de *Streptococcus agalactiae*. Foi realizado análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Dunnett (**p < 0,05).



Não houve redução da hidrofobicidade da bactéria *Streptococcus mutans*, apesar das médias de inibição estar na faixa de 33,33 a 58,03% em todas as concentrações testadas. Isto foi revelado após análise estatística (ANOVA pós-teste Dunnett), que demonstrou que as sub-CIM não apresentaram diferença significativa quando comparada com a média do controle (Figura 32).

A hidrofobicidade da bactéria *Escherichia coli* foi reduzido na faixa de 33,33 a 49,10%. Esta bactéria foi pouco afetada com respeito a hidrofobicidade quando comparada com as outras bactérias. Após análise de variância seguido de teste de Dunnett verifica-se que apenas a concentração de 62 µg/mL é insignificante quando comparada com a média do controle (Figura 33).

Figura 32- Efeito das diferentes sub-CIMs da FES sobre a hidrofobicidade de *Streptococcus mutans*. Foi realizado análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Dunnett.

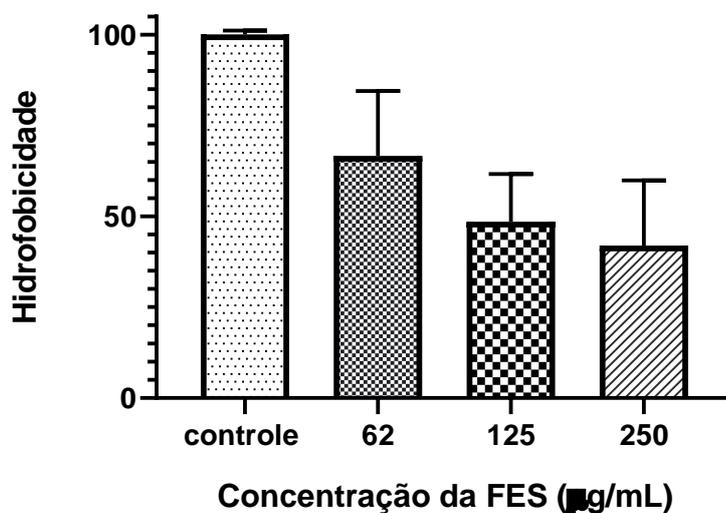
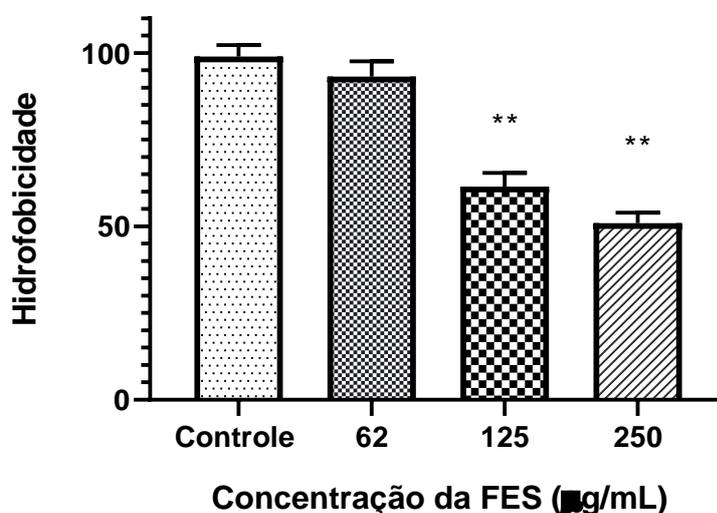


Figura 33 - Efeito das diferentes sub-CIMs da FES sobre a hidrofobicidade de *Escherichia coli*. Foi realizado análise de variância (ANOVA) seguido de teste de Dunnett (**p < 0,05).



A afinidade das bactérias por tolueno revela a hidrofobicidade das superfícies bacterianas. Quanto maior esta afinidade pelo solvente apolar, maior será a hidrofobicidade da superfície do micro-organismo avaliado [135].

Logo, o papel do agente antimicrobiano é reduzir ou inibir esta afinidade, a fim de evitar a formação de biofilme. A FES mostra-se eficaz na redução dos índices

de hidrofobicidade diante dos resultados relatados anteriormente. Logo, na sub-CIM de 250 µg/mL a maior redução do IHD da FES foi apresentado frente a bactéria *Streptococcus agalactiae* (73,44%). A FES tem um efeito promissor no controle de infecções causadas por esta bactéria, uma vez que inibiu fortemente a formação de biofilme em todas as concentrações testadas.

A redução das interações hidrofóbicas entre as células e a superfície, as quais as bactérias são capazes de aderir pode estar correlacionada com a redução de adesão inicial, um dos primeiros passos para a formação de biofilme [136]. Com a determinação da hidrofobicidade é possível prever se a formação de biofilme é favorável ou não, e se a FES apresenta potencial para modular o desenvolvimento e acúmulo deste fator de virulência expresso pelas bactérias utilizadas.

No entanto, os estudos sobre o impedimento da adesão e conseqüentemente o desenvolvimento e amadurecimento do biofilme precisam ser intensificados visando uma maior compreensão dos mecanismos celulares, moleculares e de resistência envolvidos em todo o processo [137].

Hasan et al. [130], ao pesquisar sobre a inibição dos fatores de virulência e desenvolvimento de cárie de *Zingiber officinale* contra *S. mutans*, avaliou o efeito de hidrofobicidade desta bactéria. Na concentração sub-CIM de 128 µg/mL, o extrato bruto de gengibre e sua fração metanólica apresentaram redução de hidrofobicidade de 71 e 75%, respectivamente. De modo que o gengibre pôde ser empregado como agente terapêutico no combate a cárie.

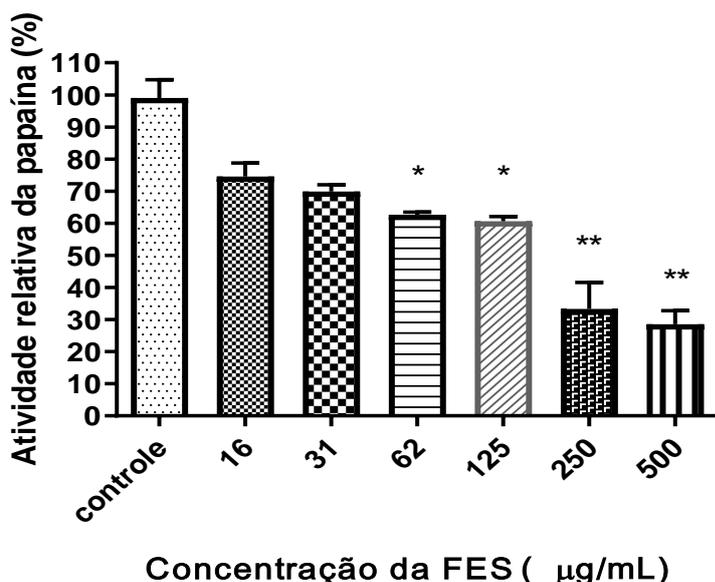
Assim, segundo Kuda et al. [138], a hidrofobicidade é um fator importante e fundamental para adesão bacteriana e formação de biofilme, como principal fator de virulência de muitas bactérias patogênicas. Sendo possível inferir que os agentes antimicrobianos inibidores de fatores de virulência, no caso biofilme, afetam a interação celular da superfície bacteriana com o possível meio aderente.

4.7 Atividade de inibição proteásica

A inibição de proteases também é de fundamental importância para o auxílio no tratamento de infecções causadas por micro-organismos, uma vez que proteases de diversas famílias são fatores de virulência de uma gama de micro-organismos. Pensando nisso, avaliou-se o efeito de inibição da FES frente a papaína modelo de cisteíno protease.

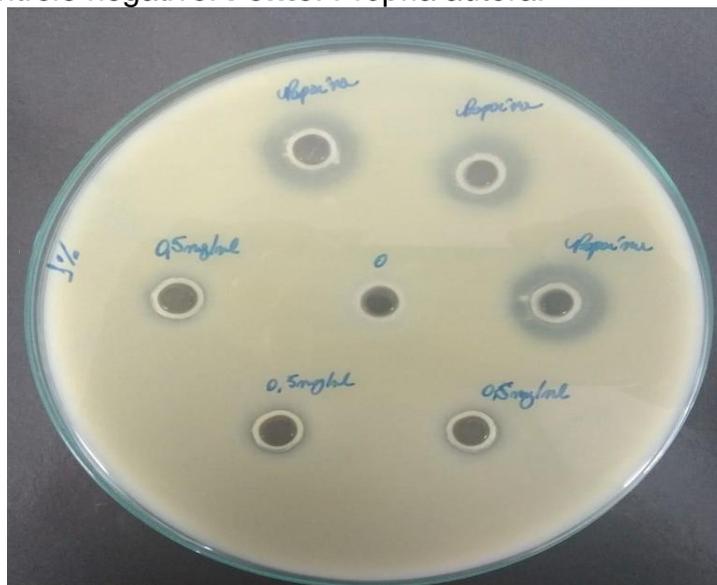
É possível observar na Figura 34 que a atividade inibitória da FES foi concentração-dependente, atingindo um máximo de inibição (71,5%) na maior concentração testada.

Figura 34 - Porcentagem de inibição frente à papaína da FES (500, 250, 125, 62, 31 e 16 $\mu\text{g/mL}$). Foi realizada análise de variância (ANOVA), seguido de teste de Dunnett (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).



A faixa de inibição deu-se entre 37,4 a 71,5% (Figura 34) para as concentrações que foram significativas quando comparadas com o controle. Os resultados obtidos demonstram o potencial da FES na inibição de cisteíno proteases. Uma placa evidenciando os halos formados na presença e ausência de FES pode ser observado na Figura 35.

Figura 35- Fotografia da placa de Petri do experimento com concentração de 500 µg/mL frente à papaína com tempo de incubação de 24 horas, DMSO 2,5% foi usado como controle negativo. **Fonte:** Própria autora.

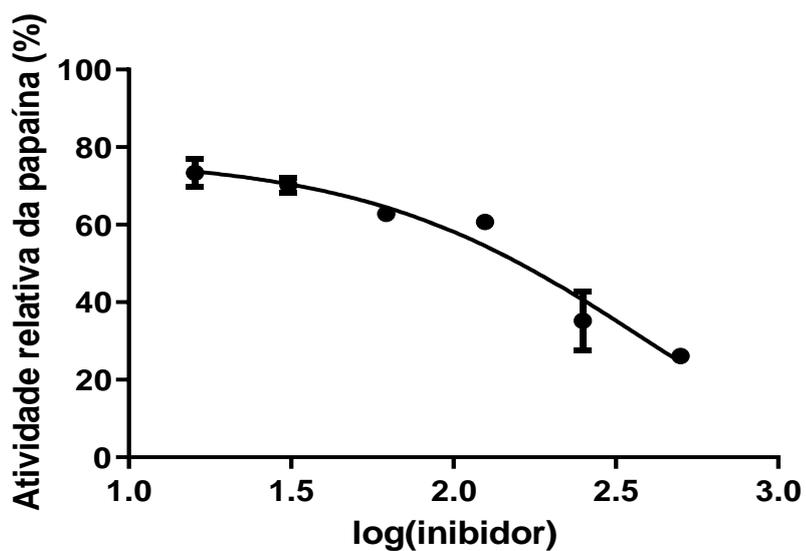


A FES obtida do gengibre apresentou inibição expressiva frente a papaína. O valor determinado do IC₅₀ FES foi de 386,8 µg/mL.

Silva [42] provou que a mistura de sesquiterpenos de *Z. officinale* apresenta uma excelente atividade inibitória contra a catepsina K. O valor de IC₅₀ do óleo essencial ($6,07 \pm 0,98$ µg/mL) e da FES (IC₅₀ = $1,61 \pm 0,23$ µg/mL), são considerados baixos o suficiente para tornar a mistura de sesquiterpenos promissora no controle de enfermidades onde esta enzima está envolvida (osteoporose, artrite, artrose). Esta atividade pode ser relacionada aos sesquiterpenos majoritários do gengibre, uma vez que eles são os únicos componentes presentes na FES.

A catepsina K, uma cisteíno protease, se assemelha estruturalmente com a papaína por pertencerem à mesma família, entretanto suas diferenças estruturais e conformacionais fazem com que a afinidade pelo mesmo inibidor seja diferente, o que pode explicar o diferente valor de IC₅₀ da FES frente a papaína. Outro fator que tem influência no resultado é o tipo de metodologia utilizada, como foi o caso. A metodologia de atividade enzimática realizada com a catepsina K por Silva [42] é muito mais sensível (quantitativo em espectrofluorímetro) do que a realizada com a papaína (semi-quantitativo em placa de petri)

Figura 36 - Curva de inibição da FES frente papaína utilizada para a determinação do valor de IC50.



Ávila et al. [139], em seus estudos com *Zingiber officinale* na avaliação da inibição de cisteíno proteases, obtiveram um extrato de acetato de etila, o qual mostrou-se efetivo frente a catepsina V (80%).

Andrade [103] também avaliou a inibição da papaína por extratos de diferentes espécies. Dentre elas o extrato etanoico do *Z. officinale* exibiu inibição superior a 25% nas concentrações de 100, 200 e 400 µg/mL, evidenciando mais uma vez a ação antiprotease da espécie *Zingiber officinale* Roscoe.

5 CONCLUSÕES

A extração dos sesquiterpenos a partir dos rizomas de *Zingiber officinale* Roscoe utilizando micro-ondas foi a técnica a qual mostrou-se com maior eficiência, em decorrência do seu menor tempo de extração e menor consumo de energia quando comparada às técnicas de maceração, ultrassom e turboextração.

O estudo de diferentes técnicas de extração e o planejamento fatorial 2³, proporcionou a otimização da extração dos sesquiterpenos majoritários do gengibre: α -curcumeno, α -zingibereno, α -farnaseno, β -bisaboleno e β -sesquifelandreno. Como resultados as melhores condições adquiridas foram em tempo de extração de 4 minutos, razão massa/volume 1:20 e potência de radiação 400 W, obtendo 0,95% da Fração Enriquecida em Sesquiterpenos (FES).

Apesar da baixa atividade antimicrobiana da FES, esta mistura inibiu consideravelmente a formação de biofilme das bactérias *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Assim, houve a redução dos índices de hidrofobicidade da superfície celular bacteriana.

Por seguinte, a FES também apresentou uma inibição, considerada significativa, da atividade proteásica (papaína). Com a determinação do valor IC₅₀ de 386,8 μ g/mL, sendo considerada uma mistura de compostos promissora na inibição de proteases pertencentes à família da cisteíno protease. Essas consideradas importantíssimas no aumento da resistência de bactérias a antimicrobianos, funcionando-as como fatores de virulência.

Dessa maneira, os resultados obtidos neste trabalho demonstram que a FES apresenta-se com um potencial considerável na candidatura para agente antibiofilme e antiprotease, a qual poderá ser utilizada como alternativa no tratamento de infecções provocadas pelas bactérias patogênicas estudadas. Estudos mais detalhados ainda precisam ser realizados para identificação do composto ou dos compostos responsáveis pelas atividades biológicas. Além disso experimentos in vivo também precisam ser realizados para a comprovação real dos efeitos mencionados neste trabalho.

6 REFERÊNCIAS

- [1] Singh, G., et al. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. Food And Chemical Toxicology, **2008**, 46 (10), 3295-3302.
- [2] Sivasothy, Y. et al. Essential oils of *Zingiber officinale* var. rubrum Theilade and their antibacterial activities. Food Chemistry, **2011**, 514-517.
- [3] Mesomo, M. C. et al. Supercritical CO₂ extracts and essential oil of ginger (*Zingiber officinale* R.): Chemical composition and antibacterial activity. The Journal Of Supercritical Fluids, **2013**, 80, 44-49.
- [4] Jakribettu, R. P. et al. Ginger (*Zingiber officinale* Rosc.) Oils. Essential Oils In Food Preservation, Flavor And Safety, **2016**, 447-454.
- [5] Kalemba, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. Current Medicinal Chemistry, **2003**, 10 (10), 813-829.
- [6] Souza, T. C. Extração de Compostos Biotivos de *Zingiber officinale* Roscoe e Avaliação da sua Atividade frente a Fatores de Virulência de *Staphylococcus aureus*. Trabalho de Conclusão de Curso, Universidade Federal de Seripe, **2018**.
- [7] Yahya, M.F.Z.R.; Saifuddin, N.F.HA, Hamid, U.M.A. Ginger Extract Inhibits Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. Plos One, **2013**, 27, 46-54.
- [8] Aziz, Z. A. A. et al. Essential Oils: Extraction Techniques, Pharmaceutical And Therapeutic Potential - A Review. Current Drug Metabolism, **2018**, 19 (13), 1100-111.
- [9] Zancan, K. C. et al. 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, **2002**, 24 (1), 57-76.
- [10] Silveira, J. C. et al. Levantamento e Análise de Métodos de Extração de Óleos essenciais. Enciclopédia Biosfera, Goiânia, **2017**, 238-252.

- [11] Castro, M. L.; Carmona, J. M.; Fernandez, P.V. Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants. *Trac Trends In Analytical Chemistry*, **1999**, 18 (11), 708-716.
- [12] Tarley, C. R. T. et al. Chemometric tools in electroanalytical chemistry: Methods for optimization based on factorial design and response surface methodology. *Microchemical Journal*, **2009**, 92(1), 58-67.
- [13] Anderson, V. L.; Mclean, R. A. *Design of Experiments: A Realistic Approach*. Crc Press New York, 1974; Vol. 5, p. 444.
- [14] Umar, G.; Karthik, L.; Rao, K. V. B. A Review on Pharmacological and Phytochemical Properties of *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae). *Journal Of Pharmacy Research*, **2011**, 9 (4), 2963-2966.
- [15] Ayse, N.; Duygu, A.T.; Hakký, A.I., Tansel, O.Y., Ýsmet, D.G., Ismail, K. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Zingiber officinalis* extracts, *FABAD J Pharm Sci*, **2008**, 33 (2), 77-86.
- [16] Elpo, E. R. S.; Negrelle, R. R. B. *Zingiber officinalis* Roscoe: aspectos botânicos e ecológicos. *Visão acadêmica*, **2004**, 5 (1), 27-32.
- [17] Debiasi, C.; Feltrin, F.; Micheluzzi, F.C. Micropopagação do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), *R.Bras. Agrociência*, **2004**, 10 (1), 61-65.
- [18] Lucio, I. B.; Freitas, R. J. S.; Waszczyński, N. Composição físico-química e aceitação sensorial da inflorescência de gengibre orgânico (*Zingiber officinale* Roscoe). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, **2010**, 30 (3), 652-656.
- [19] Nicacio, G. L. S. et al. Breve Revisão sobre as propriedades Fitoterápicas do *Zingiber officinale* Roscoe – O Gengibre. *Sinapse Múltipla*, **2018**, 7 (2), 74-80.
- [20] Silva, A.; Martins, H.; Silva, M. V. S.; Andrade, M. A.; Maeus, C.; Abreu, E.; Tomaz, J.; Azonsivo, R.; Silva, G. Propriedades Terapêuticas (*Zingiber officinale* Roscoe). *Portal de Plantas Medicinais e Fitoterápicas - Boletim Fitoterápico Gengibre (Zingiber officinale R.)*, **2017**, 1.

- [21] Palatty, P. L.; Haniadka, R.; Valder, B.; Arora, R.; Baliga, M. S. Ginger in the prevention of nausea and vomiting: a review. *Revista Food Science and Nutrition*, **2013**, 659-669.
- [22] Silva, N. C. C.; Fernandes, J.A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, **2013**, v. 16 (3), 402-413.
- [23] Suhad, A. et al. Study the Antibacterial Activity of *Zingiber officinale* roots against some of pathogenic bacteria. *Al-Mustansiriya Journal Sci*, **2012**, 23 (3), 63-70.
- [24] Puenghian, C.; Sirichote, A. “[6]-gingerol content and bioactive properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts from supercritical CO₂ extraction”. *As. J. Food Ag-Ind.*, **2008**, 1 (1), 29-36.
- [25] Andrade, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. *Revista Ciência Agronômica*, **2012**, 43 (2), 399-408.
- [26] Mesomo, M. C. et al. Supercritical CO₂ extracts and essential oil of ginger (*Zingiber officinale* R.): Chemical composition and antibacterial activity. *The Journal Of Supercritical Fluids*, **2013**, 80, 44-49.
- [27] Bleeker, P. M. et al. Tomato-produced 7-epizingiberene and R-curcumene act as repellents to whiteflies. *Phytochemistry*, **2011**, 72 (1), 68-73.
- [28] Antonious, G. F.; Kochhar, T. S. Zingiberene and Curcumene in Wild Tomato. *Journal Of Environmental Science And Health, Part B*, **2003**, 38 (4), 489-500.
- [29] Sharifi-Rad, M. et al. Plants of the Genus *Zingiber* as a Source of Bioactive Phytochemicals: From Tradition to Pharmacy. *Molecules*, **2017**, 22 (12), 2145.
- [30] Shin, S. et al. Zingerone as an Antioxidant against Peroxynitrite. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, **2005**, 53(19), 7617-7622.
- [31] Mahomoodaly, M.F. et al. Ginger and its active compounds in cancer therapy: From folk uses to nano-therapeutic applications. *Seminars In Cancer Biology*, **2019**, 1-32.

[32] Ko, M. J.; Nam, H. H.; Chung, M. S. Conversion of 6-gingerol to 6-shogaol in ginger (*Zingiber officinale*) pulp and peel during subcritical water extraction, *Food chemistry*, **2019**, 149-155.

[33] Semwal, R.B.; Semwal, D. K.; Combrinck, D.K.; Viljoen, A.M. Gingerols and shogaols: Important nutraceutical principles from ginger, *Phytochemistry*, **2015**, 554-568.

[34] Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. John Wiley & Sons: London, 2009, p. 539.

[35] Dewick, P. M. *Essentials of Organic Chemistry: For Students of Pharmacy, Medicinal Chemistry and Biological Chemistr.* John Wiley & Sons: London, 2006, p. 696.

[36] Mewalal, R. et al. Plant-Derived Terpenes: A Feedstock for Specialty Biofuels. *Trends In Biotechnology*, **2017**, 35(3), 227-240.

[37] Simas, N. K. et al. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue: atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Química Nova*, **2004**, 27 (1), 46-49

[38] Jia, F. et al. Reviews on natural monocyclic sesquiterpenoids and their bioactivities. *Journal Of Chinese Materia Medica*, **2019**, 44 (17), 3672-3683.

[39] Chen, Q. F.; Liu, Z. P.; Wang, F. P. Natural Sesquiterpenoids as Cytotoxic Anticancer Agents. *Mini-reviews In Medicinal Chemistry*, **2011**, 13 (11), 1153-1164.

[40] Koch, W. et al. Application of Chromatographic and Spectroscopic Methods towards the Quality Assessment of Ginger (*Zingiber officinale*) Rhizomes from Ecological Plantations. *International Journal Of Molecular Sciences*, **2017**, 18 (2), 452-4670.

[41] Haniadka, R. et al. A review of the gastroprotective effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Food & Function*, **2013**, 4 (6), 845-852.

[42] 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*, **2012**, 903, 157–162.

- [43] Gomes, P. R. B. et al. Avaliação da atividade larvicida do óleo essencial do *Zingiber officinale* Roscoe (gengibre frente ao mosquito *Aedes aegypti*.) *Veveista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **2016**, 597-604.
- [44] Lameu, G. S. Efeito de óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Illicium verum*, *Zingiber officinale* e *Eucalyptus globulus* em biofilmes de *Salmonella entérica subsp. Sorotipo Enteritidis* em cupons de aço inoxidável. Monografia, USP, Ribeirao Preto, 2014.
- [45] Collignon, P. C. et al. World Health Organization Ranking of Antimicrobials According to Their Importance in Human Medicine: A Critical Step for Developing Risk Management Strategies to Control Antimicrobial Resistance From Food Animal Production. *Clinical Infectious Diseases*, **2016**, 63 (8), 1087-1093.
- [46] Balakrishnan, I.; Shorten, R. J. Therapeutic drug monitoring of antimicrobials. *Annals Of Clinical Biochemistry*, **2016**, 53 (3), 333-346.
- [47] Zhanel, G. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of the new fluoroquinolones: focus on respiratory infections. *Current Opinion In Pharmacology*, **2012**, 5 (1), 459-463.
- [48] Mcewen, S. A.; Collignon, P.J. Antimicrobial Resistance: a One Health Perspective. *Microbiology Spectrum*, **2018**, 6 (2), 1-26.
- [49] Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal Of Natural Products*, **2016**. 79 (3), 629-661.
- [50] Zeni, A. L. B. et al. Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. *Ciência & Saúde Coletiva*, **2017**, 22 (8), 2703-2712.
- [51] Haniadka, R. et al. A review of the gastroprotective effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Food & Function*, **2013**, v. 4, n. 6, p.845-852, 2013. Royal Society of Chemistry (RSC).
- [52] Majolo, C. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de rizomas de açafrão (*Curcuma longa* L.) e gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a salmonelas entéricas isoladas de frango resfriado. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **2014**, 16 (4), 505-512.

[53] Krzysciak, W. et al. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **2013**, 33 (4), 499-515.

[54] Guimaraes, A. J. et al. *Acanthamoeba* spp. as a universal host for pathogenic microorganisms: One bridge from environment to host virulence. *Microbiological Research*, **2016**, 193, 30-38.

[55] Van, B. P. et al. Molecular mechanisms of pathogenicity: how do pathogenic microorganisms develop cross-kingdom host jumps. *Fems Microbiology Reviews*, **2007**, 31 (3), 239-277.

[56] Reva, O.; Korotetsky, I.; Ilin, A. Role of the horizontal gene exchange in evolution of pathogenic *Mycobacteria*. *Bmc Evolutionary Biology*, **2015**, 15 (1), 2-8.

[57] Tagini, F.; Greub, G. Bacterial genome sequencing in clinical microbiology: a pathogen-oriented review. *European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **2017**, 36 (11), 2007-2020.

[58] Mallicote, M. Update on *Streptococcus equi* subsp *equi* Infections. *Veterinary Clinics Of North America: Equine Practice*, **2015**, 31 (1), 27-41.

[59] Wessels, M. R. *Streptococcal Pharyngitis*. *New England Journal Of Medicine*, **2011**, 364 (7), 648-655.

[60] Engholm, D. H. et al. A visual review of the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Fems Microbiology Reviews*, **2017**, 41 (6), 854-879.

[61] Krzysciak, W. et al. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, **2013**, 33 (4), 499-515.

[62] World Health Organization. Improving diarrhea estimates Child and Adolescent Health and Development, World Health Organization. Geneva. Switzerland: WHO, 2002.

[63] Barbosa, E.L. et al. Analysis of TB/HIV coinfection as development factor for multidrug resistant tuberculosis: a systematic review. *Rev Pan Amaz Saude*, **2013**, 4, 57-66, 2013.

- [64] Armengaud, J.; Duport, C. Exoproteomics of Pathogens. *Methods In Enzymology*, **2017**, 211-227.
- [65] Rosini, R.; Margarit, I. Biofilm formation by *Streptococcus agalactiae*: influence of environmental conditions and implicated virulence factors. *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*, **2015**, 5, 1-4
- [66] Croxen, M. A.; Finlay, B. B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 2009, 8, 26-38.
- [67] Jenkins, A. et al. Differential Expression and Roles of *Staphylococcus aureus* Virulence Determinants during Colonization and Disease. *Mbio*, **2015**, 6 (1), 1-10.
- [68] Azeredo, J. et al. Critical review on biofilm methods. *Critical Reviews In Microbiology*, **2016**, 313-351.
- [69] Rabin, N. et al. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Medicinal Chemistry*, **2015**, 7 (4), 493-512.
- [70] Ruffuvelie, F. et al. A Broad-Spectrum Antibiofilm Peptide Enhances Antibiotic Action against Bacterial Biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **2017**, 5364-5371.
- [71] Lister, J. L.; Horswill, A. R. *Staphylococcus aureus* biofilms: recent developments in biofilm dispersal. *Frontiers In Cellular And Infection Microbiology*, **2014**, 4,1-9.
- [72] Schwendicke, F. et al. Inhibition of *Streptococcus mutans* Growth and Biofilm Formation by Probiotics in vitro. *Caries Research*, **2017**, 51 (2), 87-95.
- [73] Kim, S.; Lee, J. Biofilm dispersion in *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal Of Microbiology**, **2016**, 54 (2) 71-85.
- [74] Fusco, A. et al. Biofilm Formation and Immunomodulatory Activity of *Proteus mirabilis* Clinically Isolated Strains. *International Journal Of Molecular Sciences*, **2017**, 18 (2), n. 2, p.414-425.
- [75] Oloketuyi, S. F.; Khan, F. Strategies for Biofilm Inhibition and Virulence Attenuation of Foodborne Pathogen-*Escherichia coli* O157: H7. *Current Microbiology*, **2017**, 74 (12), 1477-1489.

[76] Ingmer, H.; Brondsted, L. Proteases in bacterial pathogenesis. *Research In Microbiology*, **2009**, 160 (9), 704-710.

[77] Giongo, J.L. Caracterização e aplicação de proteases produzidas por linhagens de *Bacillus* sp.2006. f. 95. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

[78] Monika, S.; Malgorzatarzata, B.; Zbigniew, O. Contribution of Aspartic Proteases in *Candida* Virulence. Protease Inhibitors against *Candida Infections*. *Current Protein & Peptide Science*, **2017**, 18 (10), 1-9.

[79] Cunico, W; Gomes, C. R. B.; Vellasco, W. J.T. HIV - recentes avanços na pesquisa de fármacos. *Química Nova*, **2008**, 31(8), 2111-2117.

[80] Wilkesman, J. Cysteine Protease Zymography: Brief Review. *Zymography*, **2017**, 25-31.

[81] Lunial, N. et al. Heterologous expression of the plant cysteine protease bromelain and its inhibitor in *Pichia pastoris*. *Biotechnology Progress*, **2016**, 33(1), 54-65

[82] Capucho, H.C. Desenvolvimento de formulações tópicas contendo papaína para o tratamento de feridas. 2007. p. 123. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

[83] Drake, Matthew T et al. Cathepsin K Inhibitors for Osteoporosis: Biology, Potential Clinical Utility, and Lessons Learned. *Endocrine Reviews*, **2017**, 38 (4), 325-350.

[84] Vatanshenassan, M. et al. *Trichomonas vaginalis*: Investigation of a novel diagnostic method in urine samples using cysteine proteinase 4 gene and PCR technique. *Experimental Parasitology*, **2010**, 126 (2), 187-190.

[85] Bostanci, N.; Belibasakis, G. N. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. *Fems Microbiology Letters*, **2010**, 333, 1-9.

[86] Scharpe, S. et al. Proteases and their inhibitors: today and tomorrow. *Biochimie*, **1991**. 73, 121-126.

- [87] Reddy, M.; Moodley, R.; Jonnalagadda, S.B. Fatty acid profile and elemental content of avocado (*Persea Americana* Mill.) oil –effect of extraction methods. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, **2012**, 529-537.
- [88] Martins, P. M. et al. Turbo-extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* using a fractional factorial design. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **2017**, 510-518.
- [89] Chemat, F. et al. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. *Ultrasonics Sonochemistry*, **2017**, 540-560.
- [90] Esclapez, M. D. et al. Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. *Food Engineering Reviews*, **2011**, 108-120.
- [91] Kubra, I.R.; Kumar, D.; Rao, L.J.M. Effect of microwave-assisted extraction on the release of polyphenols from ginger (*Zingiber officinale*). *International Journal of Food Science & Technology*, **2013**, 1828-1833.
- [92] Ho, K. H. Y. et al. Microwave-assisted extraction of lycopene in tomato peels: Effect of extraction conditions on all-trans and cis-isomer yields. *Lwt - Food Science and Technology*, **2015**, 160-168.
- [93] 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.* 2014, 155-168.
- [94] Collins, L. M. et al. Factorial Experiments. *American Journal Of Preventive Medicine*, **2014**, 47 (4), 498-504, out. 2014. Elsevier BV.
- [95] Watkins, Frances et al. Antimicrobial assays of three native British plants used in Anglo-Saxon medicine for wound healing formulations in 10th century England. *Journal of Ethnopharmacology*, **2012**, .408-415.
- [96] Ajdic, D. et al. Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proceedings of The National Academy Of Sciences*, **2002**, 14434-14439.

[97] Tettelin, H. et al. Complete genome sequence and comparative genomic analysis of an emerging human pathogen, serotype V *Streptococcus agalactiae*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, **2002**, 12391-12396.

[98] Balouri, M.; Sadiki, M.; Ibsnsouda, S.K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal Of Pharmaceutical Analysis*, **2016**, 71-79.

[99] Pantenella, F. et al. Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann*, **2013**, 3142.

[100] Stepanovic, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS*. **2007**, 91-899.

[101] Zhou, J. et al. Anti-Biofilm and Antivirulence Activities of Metabolites from *Plectosphaerella cucumerina* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Frontiers In Microbiology*, **2017**, 1-17.

[102] Morris, L; Evans, J; Marghesi J. A robust plate assay for detections of extracelular microbial protease activity in metagenomic screens and pure cultures. *Journal of Microbiological Methods*, **2012**, 144-146.

[103] Andrade, A.K.S. Desenvolvimento de Método Enzimático Simples e de Baixo Custo para a Busca de Inibidores de Proteases. TCC (Graduação) Universidade Federal de Sergipe, Lagarto, 2016.

[104] Pereira, R. C. B. et al. Obtenção do óleo essencial e oleoresina de gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) por arraste com vapor e extração com solvente. *Revista Universidade Rural: série ciências da vida*, **2007**, 22, 775.

[105] Oliveira, S. R. N et al. Anais da X Jornada de Iniciação Científica da Embrapa Amazônica Ocidental, Brasília, Brasil, **2013**.

[106] Dabague, I. C. M. et al. Rendimento do óleo essencial de *Zingiber officinale* em resposta a diferentes processamentos e tempos de extração yield of *Zingiber officinale* essential oil in response to different processing methods and extraction times. *Revista Acadêmica: Ciência Animal*, **2017**, 11, 163.

- [107] Meira, M.R.; Manganottil, S.A.I; Martins, E.R. Crescimento e produção de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. nas condições climáticas de Montes Claros – MG. *Biotemas*, **2011**,1-8.
- [108] Gasparin, P.P. Secagem de *Mentha piperita* em leito fixo utilizand diferentes temperaturas e velocidades de ar. Dissertação (Mestrado) -Universidade Estadual do Oeste do Parana, Cascavel, 2012.
- [109] Costa, G.A.; Carvalho Filho, J.I.s.; Deschanps, C. Rendimento e composição do óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin*) conforme o tempo de extração. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **2013**, 319-324.
- [110] Chaves, F.F.M. et al. Teor e caracterização química do óleo essencial de *Pogostemon cablin* Benth. In: Simpósio Brasileiro de óleos essenciais, Campinas. Livro de resumos. Campinas: Unicamp, 2011, 223.
- [111] Epagri. Normas técnicas para cultivo de capim-limão, citronela, palma-rosa e patchouli. Florianópolis, 2004, p. 58
- [112] Boland, D. J.; Brophy, J.J.; House, A.P.N. *Eucalyptus* leaf oils: use, chemistry, distillation and marketing. Melbourne: ACIAR/SCIRO, 1991.
- [113] Carvalho, C.O. Composição entre Métodos de Extração do óleo de *Maurita flexuosa* L.f. (Arecacea-buriti) para o uso Sustentavel na Reserva de Desenvolimento Tupé: Rebdimmento e Atividade Antimicrobiana. Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 2011.
- [114] Cutrim, E.S.M. et al. Evaluation of Antimicrobial and Antioxidant Activity of Essential Oils and Hydroalcoholic Extracts of *Zingiber officinale* (Ginger) and *Rosmarinus officinalis* (Rosemary). *Revista Virtual de Química*, **2019**, 60-81.
- [115] Koroch, A.; Ranarivelo, L.; Behra, O.; Juliani, H. R.; Simon, J. E. Quality Attributes of Ginger end Cinamon Essential Oils from Madagascar. *Botanical and Medicinals* **2007**, 338.
- [116] Bhargava, S. et al. *Zingiber Officinale*: Chemical and phytochemical screening and evaluation of its antimicrobial activities. *J. Chem. Pharm. Res*, **2012**, 360-364.

- [117] Brum, A. A. S. et al. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Química Nova*, **2009**, 849-854.
- [118] Racoti, A. et al. Microwave assisted hydro-distillation of essential oils from fresh ginger root (*Zingiber officinale* Roscoe). *Journal Of Essential Oil Research*, **2017**, 471-480
- [119] Kusuma, H. S.; Mahfud, M. Preliminary study: kinetics of oil extraction from basil (*Ocimum basilicum*) by microwave assisted hydrodistillation and solvent free microwave extraction. *South African Journal of Chemical Engineering*, **2017**, 49- 53.
- [120] Abedi, A. et al. Microwave-assisted extraction of *Nigella sativa* L. essential oil and evaluation of its antioxidant activity. *Journal of Food Science and Technology*, **2017**, 3779-3790.
- [121] Slilva, J. J. B. F.; Vargas, R. M. F. Extração de Oleo Essencial de Erva-Doce Utilizando CO₂ Supercritico com Pre-Tratamento de Micro-ondas. *Anais do Congresso Brasileiro de Engenharia Química em Iniciação Científica - Cobeq Ic*, **2015**,1-6.
- [122] Ostrosky, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **2008**, 301-307.
- [123] Aliginnis, N. et al. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Origanum* Species. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. **2001**, 4168-4170.
- [124] Gregio, A. M. T. et al. Ação Antimicrobiana do *Zingiber officinale* frente a Microbiota Bucal. *Rev. Biologia*, **2006**, 61-66.
- [125] Andrade, M.A. Oleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* e *Zingiber officinale*: caracterização química, atividade antioxidante e antimicrobiana. Dissertação. Univeridade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2010.
- [126] Miranda, G.S. et al. Atividade antibacteriana in vitro de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, **2013**, 104-111, 2013.

- [127] Silva, D. F. Eficacia dos Flavonoide Heperidina e Naringenina e o Fenol ácido Isonílico Complexos com Mg(II), para o Controle da Bacteria Xanrhomona Citri SSP. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Sao Carlos, Sao Carlos, 2017.
- [128] Kim, H.; Park, H. Ginger Extract Inhibits Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. *Plos One*, **2013**, 1-16.
- [129] Aghazadeh, M. et al. Survey of the Antibiofilm and Antimicrobial Effects of *Zingiber officinale* (in Vitro Study). *Jundishapur Journal Of Microbiology*. **2016**, 1-6.
- [130] Hasan, S.f; Danihuddin, M.; Khan, A.U. Inhibitory effect of *zingiber officinale* towards *Streptococcus mutans* virulence and caries development: in vitro and in vivo studies. *Bmc Microbiology*, **2015**, 1-14.
- [131] Vale, J.U.V.A. et al. Atividade antimicrobiana e antibiofilme do óleo essencial das folhas de *Vitex gardneriana*. *Ev. Bras. Farmacogn*, **2005**, 51-54.
- [132] Nascimento, G.F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology*, **2000**, .247-56.
- [133] Carvalho, V. R. A. Avaliação da atividade biológica in vitro do óleo essencial das folhas *Leonotis nepetifolia* (L.) R. Br. (Lamiaceae). Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2018.
- [134] Kiyimaci, M. E. et al. Quorum sensing signals and related virulence inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by a potential probiotic strain's organic acid. *Microbial Pathogenesis*, **2018**, 190-197
- [135] Tan, Y. et al. Antibiofilm efficacy of curcumin in combination with 2-aminobenzimidazole against single- and mixed-species biofilms of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *Colloids And Surfaces B: Biointerfaces*, **2019**, 28-34
- [136] Bai, J. et al. Antibiofilm activity of shikimic acid against *Staphylococcus aureus*. *Food Control*, **2019**, 327-333.
- [137] Chu, E. K. et al. Self-induced mechanical stress can trigger biofilm formation in uropathogenic *Escherichia coli*. *Nature Communications*, **2018**, 1-10.

[138] Kuda, T.; Yano, T.; Kuda, M. T. Resistances to benzalkonium chloride of bacteria dried with food elements on stainless steel surface. *LWT - Food Science and Technology*, **2008**, 988-993, 2008.

[139] Ávila, R. M. D. Obtenção de Derivados de Compostos Isolados de Zingiber officinale por Biotransformação e Semi-síntese e Avaliação Frente à Cisteinil-proteases. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Sao Carlos, Sao Carlos, 2016.

<http://e-escola.tecnico.ulisboa.pt/topico.asp?id=355&ordem=1>.

https://www.who.int/drugresistance/AMR_Importance/en/

<https://melhorcomsaude.com.br/formas-de-consumir-gengibre/>

<http://www.rcsb.org>

7 ANEXO

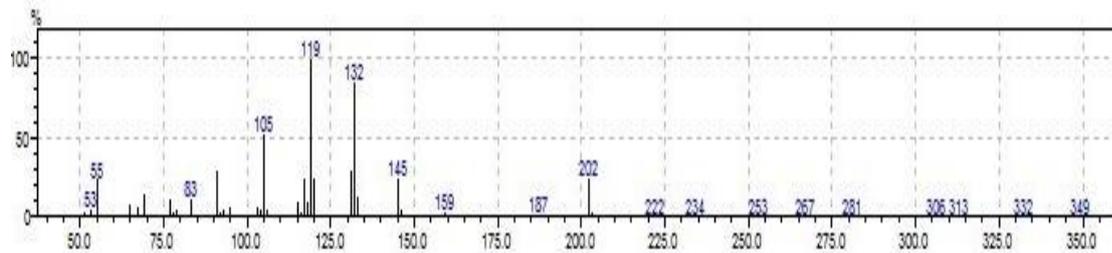
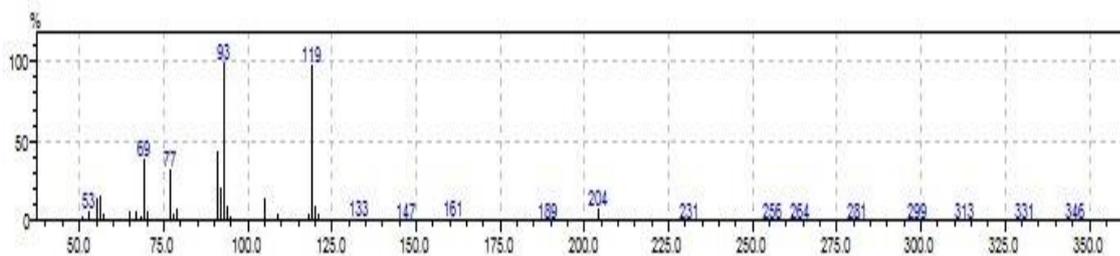
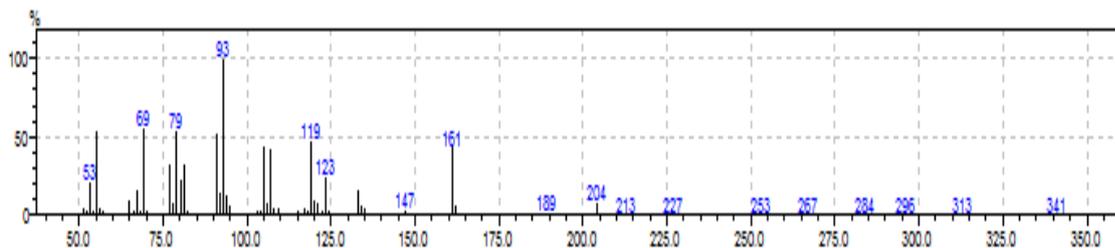
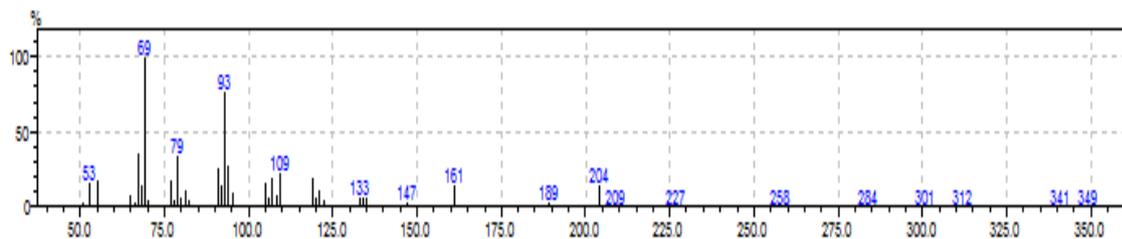
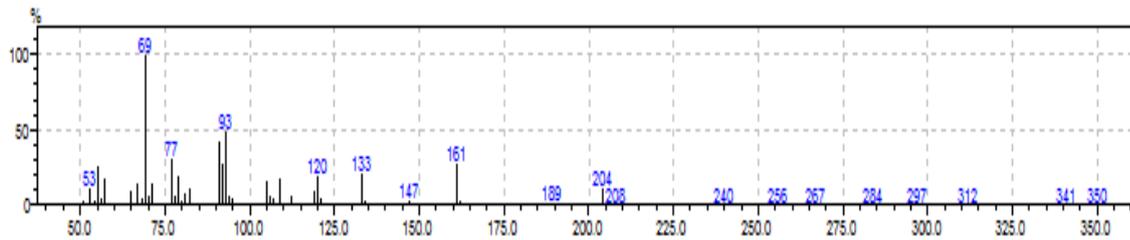
Figura 37- Espectro de massas (IE: 70 eV) do α -curcumeno.Figura 38- Espectro de massas (IE: 70 eV) do α -zingibereno.Figura 39- Espectro de massas (IE: 70 eV) do α -farneseno.Figura 40- Espectro de massas (IE: 70 eV) do β -bisaboleno.

Figura 41- Espectro de massas (IE: 70 eV) do β -sesquiefelandreno.

8 APÊNDICE

Figura 42 – Fotografia da placa de Petri do experimento com concentração de 125 e 62 $\mu\text{g/mL}$ frente à papaína com tempo de incubação de 24 horas. DMSO 2,5% foi utilizado como controle negativo. **Fonte:** Própria autora.

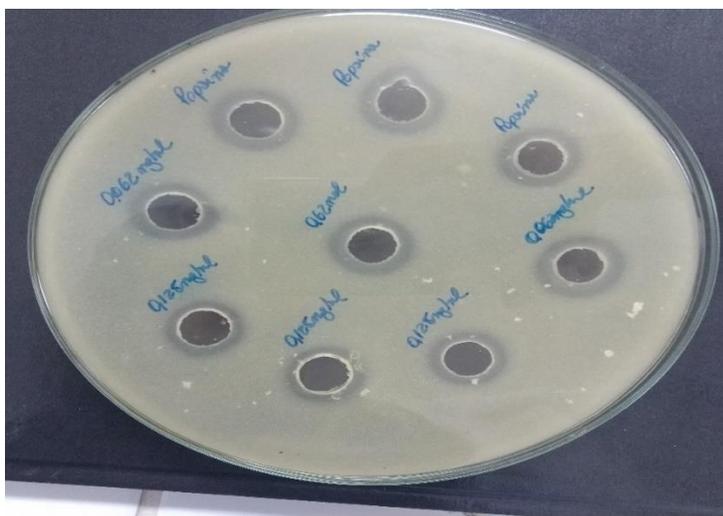


Figura 43 – Fotografia da placa de Petri do experimento com concentração de 31 e 16 $\mu\text{g/mL}$ frente à papaína com tempo de incubação de 24 horas. DMSO 2,5% foi utilizado como controle negativo. **Fonte:** Própria autora.

