



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

TAILANE CAÍNA DE SOUZA SANTOS

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE *Zingiber officinale* Roscoe E AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADE FRENTE A FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus aureus***

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Lagarto/SE  
Abril, 2018

TAILANE CAÍNA DE SOUZA SANTOS

**EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE *Zingiber officinale* Roscoe E  
AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADE FRENTE A FATORES DE VIRULÊNCIA DE  
*Staphylococcus aureus***

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

**Orientador:** Prof. Dr. James Almada da Silva  
**Co-orientador:** Prof. Dr. Rafael Ciro Marques Cavalcante

Lagarto/SE

Abril, 2018

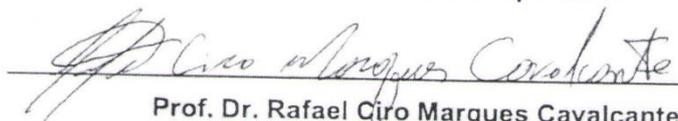
TAILANE CAÍNA DE SOUZA SANTOS

EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE *Zingiber officinale* Roscoe E  
AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADE FRENTE A FATORES DE VIRULÊNCIA DE  
*Staphylococcus aureus*

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

**Orientador:** Prof. Dr. James Almada da Silva  
**Co-orientador:** Prof. Dr. Rafael Ciro Marques Cavalcante

Aprovado em: 30/04/2018



Prof. Dr. Rafael Ciro Marques Cavalcante

Universidade Federal de Sergipe



Profa. Dra. Tamires Cardoso Lima de Carvalho

Universidade Federal de Sergipe

Dedico esse trabalho primeiramente a DEUS, por ser essencial em minha vida, a minha mãe, irmã, família, amigos, namorado e orientador, que estiveram comigo durante todo esse processo dividindo momentos de alegria e dificuldade.

“Na vida, não vale tanto o que temos, nem tanto importa o que somos. Vale o que realizamos com aquilo que possuímos e, acima de tudo, importa o que fazemos de nós”. (Chico Xavier)

# EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DE *Zingiber officinale* Roscoe E AVALIAÇÃO DA SUA ATIVIDADE FRENTE A FATORES DE VIRULÊNCIA DE *Staphylococcus aureus*

Tailane Caína de Souza Santos, Lagarto 2018

**INTRODUÇÃO:** *Zingiber officinale* (gingibre) apresenta como constituintes majoritários os gengerois, substâncias responsáveis pela maior parte das suas atividades terapêuticas, incluindo a ação antimicrobiana. Há poucos estudos relatando a atividade antimicrobiana da espécie de *Z. officinale* e nenhum avaliando a atividade contra fatores de virulência de *Staphylococcus aureus*, bactéria causadora de diversas infecções. Uma das formas de combater essas infecções é inibindo seus fatores de virulência, como DNases, lipases e a formação de biofilme. **OBJETIVO:** Extrair e isolar substâncias de *Zingiber officinale* para avaliação da atividade antimicrobiana e do seu efeito anti-fatores de virulência de *S. aureus* resistente à metilina. **METODOLOGIA:** Os extratos obtidos por maceração e turboextração, em etanol e hexano e as substâncias isoladas por cromatografia líquida clássica e cromatografia líquida de alta eficiência foram ensaiados para avaliar a atividade antibacteriana, anti-DNase, anti-lipase e anti formação de biofilme. **RESULTADOS:** Todos os extratos (T1: turboextração, hexano; T2: turboextração, etanol; M1: maceração, hexano; M2: maceração, etanol; 0,5 mg/mL e as substâncias (0,2 mg/mL) 6-, 8-, 10-gingerol e 6-shogaol apresentaram atividade frente a DNase. T1, T2, M1 e M2 inibiram a DNase em 33,9%, 28,8%, 34,7% e 26,1%, respectivamente, enquanto que apenas os extratos T1 (17,49%) e T2 (18%) foram ativos contra a lipase. As substâncias 6-, 8- e 10-gingerol mostraram atividade de 32,9%, 44,6% e 30,3% anti-DNase e apresentaram inibição da formação de biofilme em 39,8%, 65,9% e 52,6%, respectivamente. O 6-shogaol além de inibir a DNase, também mostrou ter um alto potencial antimicrobiano, com concentração inibitória mínima (CIM) de 50 µg/mL. **CONCLUSÃO:** É de grande relevância encontrar substâncias bioativas com potencial antimicrobiano e anti-fatores de virulência, para torna-los aplicáveis no tratamento de infecções causadas por bactérias multirresistentes.

Palavras-Chave: *Zingiber officinale*; gingerol; biofilme; Anti-DNase; Anti-Lipase.

# EXTRACTION OF BIOACTIVE COMPOUNDS FROM *Zingiber officinale* Roscoe AND EVALUATION OF ITS ACTIVITY AGAINST VIRULENCE FACTORS OF *Staphylococcus aureus*

Tailane Caína de Souza Santos, Lagarto 2018

**INTRODUCTION:** *Zingiber officinale* presents as main constituents the gingerols, substances responsible for most of its therapeutic activities, among them, antimicrobial. There are few studies reporting the antimicrobial activity of the *Z. officinale* species and none evaluating the activity against virulence factors of *Staphylococcus aureus*, bacterium causing various infections. One way to combat these infections is inhibiting their virulence factors, such as DNases, lipases and biofilm formation. **OBJECTIVE:** To extract and isolate substances from *Zingiber officinale* for evaluation of antimicrobial activity and of anti-virulence factors effect of methicillin resistant *S. aureus*. **METHODS:** The extracts obtained by maceration and turboextraction, in ethanol and hexane and the isolated substances by classical liquid chromatography and high performance liquid chromatography were tested to evaluate antimicrobial activity, anti-DNase, anti-lipase and biofilm formation. **RESULTS:** All extracts (T1: turboextraction, hexane; T2: turboextraction, ethanol; T3: maceration, hexane; T4: maceration, ethanol; 0.5 mg/mL) and substances (0.2 mg / mL), 6-, 8-, 10-gingerol and 6-shogaol showed activity against DNase. T1, T2, M1 and M2 inhibited the DNase in 33.9%, 28.8%, 34.7% and 26.1%, respectively, whereas only the extracts T1 (17.49%) and T2 (18%) were active against lipase. Six-, 8- and 10-gingerol showed activity of 32.9%, 44.6% and 30.3% anti-DNase and showed inhibition of biofilm formation 39.8%, 65.9% and 52, 6%, respectively. In addition to inhibiting DNase, 6-shogaol was also shown to have a high antimicrobial potential, with a minimum inhibitory concentration (MIC) of 50 µg/mL. **CONCLUSION:** With these results it is concluded that it is of great relevance to find bioactive substances with antimicrobial potential and anti-virulence factors, to make them applicable in the treatment of infections caused by multiresistant bacteria.

Keywords: *Zingiber officinale*; gingerol; biofilm; Anti-DNase; Anti-Lipase.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclo de vida do biofilme. ....	18
Figura 2: Imagem da espécie <i>Z. officinale</i> , onde se observa as folhas, frutos, flores, rizomas e caule.. ....	21
Figura 3: Principais formas de consumo do gengibre, fresco (A), seco (B) e em conserva (C).. ....	22
Figura 4: Estruturas químicas dos gingeróis e shogaóis isolados de <i>Z. officinale</i> .....	23
Figura 5: Ilustração de algumas etapas da avaliação do crescimento bacteriano.....	31
Figura 6: Ilustração de algumas etapas da avaliação da inibição da formação de biofilme.....	32
Figura 7: Etapas para avaliação da atividade anti-DNase.....	33
Figura 8: Etapas para avaliação da atividade anti-Lipase. ....	34
Figura 9: Perfil cromatográfica dos extratos de gengibre obtidos em diferentes condições de extração. ....	36
Figura 10: Rendimento dos principais metabólitos secundários do gengibre no extrato obtido por turbo-extração (T1 e T2), maceração (M1 e M2) e diferentes solventes. .	37
Figura 11: Rendimento dos principais metabólitos secundários do gengibre no extrato utilizando turbo-extração (T1 e T2), maceração (M1 e M2) e diferentes solventes...	38
Figura 12: Cromatograma obtido no isolamento dos gingeróis. A fração enriquecida com os gingeróis foi injetada em coluna C <sub>18</sub> (21,2 x 250 mm, 10 µ), fase móvel. ....	39
Figura 13: Efeito dos extratos de gengibre (0,5 mg/mL) no crescimento do <i>Staphylococcus aureus</i> . ....	41
Figura 14: Crescimento do <i>Staphylococcus aureus</i> na presença do 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol e 6-shogaol (0,2 mg/mL).....	42
Figura 15: Determinação da concentração inibitória mínima do 6-shogaol utilizando as seguintes concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781; 0,39; 0,195 e 0,097 µg/mL. ....	43
Figura 16: Efeito dos extratos (0,5 mg/mL) na formação de biofilme de <i>S. aureus</i> ...	44
Figura 17: Formação de biofilme na presença das substâncias isoladas do gengibre, 6-shogaol, 6-gingerol, 8-gingerol e 10-gingerol (0,2mg/mL).....	45

Figura 18: Formação de biofilme na presença do 6-shogaol nas concentrações 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781; 0,39; 0,195; 0,097 ug/mL.....	46
Figura 19: Efeito dos extratos de gengibre (0,5 mg/mL) na atividade da DNase... ..	47
Figura 20: Efeito dos extratos de gengibre (0,5 mg/mL) na atividade da Lipase.....	48
Figura 21: Efeito dos metabólitos secundários isoladas de gengibre (0,2 mg/mL) na atividade da DNase.. ..	49
Figura 22: Efeito do 6-shogaol (0,2 mg/mL) na atividade da DNase. ....	50
Figura 23: Estruturas químicas do 6-, 8-, 10-gingerol e 6-shogaol.....	50

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Fatores de virulência do <i>S. aureus</i> . .....	17
---	----

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições que foram utilizadas em cromatografia utilizando coluna de vidro. ....	30
--	----

Tabela 2: Rendimentos de obtenção dos extratos brutos de <i>Z. officinale</i> utilizando turbo-extração e maceração em etanol e hexano. ....	35
--	----

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	13
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	15
2.1 <i>Staphylococcus aureus</i> .....	15
2.2 Alternativas para o tratamento de infecções microbianas.....	15
2.3 Plantas medicinais .....	19
2.4 <i>Zingiber officinale</i> Roscoe .....	20
2.4.1 - Perfil químico .....	22
.....	23
2.4.2 – Atividade antimicrobiana .....	23
2.5 Processos de extração de metabólitos secundários de vegetais .....	25
3 OBJETIVOS .....	27
3.1 Objetivo Geral .....	27
3.2 Objetivos Específicos .....	27
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	28
4.1 Aquisição e secagem do material vegetal .....	28
4.2 Métodos de Extração .....	28
4.2.1 Maceração .....	28
4.2.2 Turboextração.....	28
4.3 Análise cromatográfica dos extratos de <i>Z. officinale</i> .....	29
4.4 Isolamento e purificação dos gingeróis .....	29
4.5 Avaliação do crescimento bacteriano e inibição de formação de biofilme .....	31
4.6 Avaliação da atividade anti-DNase .....	32
4.7 Avaliação da atividade anti-lipase .....	33
4.8 Análises Estatísticas .....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	35
5.1 Rendimento dos extratos de <i>Zingiber officinale</i> .....	35
5.2 Análise cromatográfica dos extratos .....	36
5.3 Isolamento e purificação dos gingeróis .....	39
5.4 Avaliação da inibição do crescimento bacteriano.....	40
5.5 Avaliação da inibição da formação de biofilme .....	43
5.6 Avaliação da atividade anti-DNase e anti-lipase dos extratos T1, T2, M1 e M2 .....	46
5.7 Avaliação da atividade anti-DNase do 6-, 8-, 10-gingerol, 6-shogaol.....	48

6. CONCLUSÕES .....	52
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	53

# 1 INTRODUÇÃO

*Staphylococcus aureus*, é um patógeno oportunista que está envolvido em infecções humanas tanto de origem comunitária, quanto hospitalar. É um agente que pode causar desde infecções simples como espinhas, furúnculos e celulites até infecções mais graves como pneumonia, meningite, endocardite, septicemia e outras (SANTOS et al., 2007).

Uma das formas de auxiliar o combate de infecções bacterianas é inibir os seus fatores de virulência, como: desoxirribonucleases (DNases), lipases, proteases, formação de biofilme etc. Um dos importantes fatores de virulência secretados por *S. aureus* é a DNase. Esta enzima pode ser usada como alvo terapêutico para o combate deste microrganismo em infecções, uma vez que, ao ser secretada, ela impede que o sistema imunológico do hospedeiro reaja e cause a morte das bactérias (KIODROWSKI, 2014; KATRIN et al., 2014).

A lipase é outro importante fator de virulência que pode ser utilizado como alvo terapêutico para o combate de infecções. Esta enzima desempenha um papel na metabolização de lipídios, como também interferindo com a fagocitose dos granulócitos no ser humano (KHOSASIH, SUWANTO, & KIM, 2012).

Além desses dois fatores de virulências, *S. aureus* produz biofilmes, que são definidos, em linhas gerais, como uma comunidade de microrganismos que adere a superfícies. Uma das principais propriedades dos microrganismos que residem em um biofilme é a diminuição da suscetibilidade aos agentes antimicrobianos (RICHTER, 2017). Com isso é necessário a busca por substâncias naturais que possam auxiliar no tratamento de infecções por *S. aureus*.

A utilização de plantas medicinais é uma prática comum em quase todas as culturas. Uma das plantas bastante utilizadas em todo o mundo há milhares de anos, e que possui grande valor terapêutico para o alívio de várias doenças é o gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) (ZICK et al., 2008). Trata-se de uma erva rizomática medicinal que apresenta como constituintes majoritários em sua oleoresina os gingeróis e shogaios. Estes são responsáveis por seu sabor pungente, e pela maior parte de suas atividades terapêuticas. Dentre elas destacam-se as atividades

antioxidantes, anti-inflamatórias, antitumorais e antimicrobianas (FUNK et al., 2009; HENROTIN et al., 2010; DUGASANI et al., 2010; SILVA et al., 2012).

Embora haja poucos dados disponíveis sobre atividade antimicrobiana de gengibre ou de seus metabólitos, alguns estudos indicam que os metabólitos secundários aumentam as atividades de antibióticos, elevando assim a sua eficácia, essa capacidade pode estar relacionada ao aumento da desintegração das paredes celulares bacterianas, aumentando assim a utilidade dos antibióticos (SEMWAL et al., 2015).

Para obtenção dos constituintes bioativos do gengibre com alto rendimento é necessário realizar a extração, levando-se em conta a eficiência e a estabilidade das substâncias extraídas, além do custo da técnica, para que o processo extrativo seja viável economicamente. Os processos mais utilizados na extração de produtos naturais são as técnicas de extração a frio: maceração, percolação e turboextração; e as técnicas de extração a quente: infusão, decocção, extração por arraste a vapor d'água e Soxhlet (SARKER et al., 2005).

O presente trabalho justifica-se, pela necessidade de buscar estratégias adicionais para o tratamento de infecções por *S. aureus*, uma vez que a inibição dos seus fatores de virulência fará com que o patógeno fique mais suscetível a atuação dos antimicrobianos e das células de defesa do sistema imunológico para sua erradicação. Isso tem importância no cenário atual pois as opções de antimicrobianos têm sido reduzidas, desde o surgimento da resistência à penicilina, à metilina e, mais recentemente, à vancomicina.

Os metabólitos secundários de *Z. officinale* apresentam elevado potencial terapêutico, já que há relatos de sinergismo desses compostos com antibióticos (SEMWAL et al., 2015), o que os torna bons candidatos à protótipos de fármacos. Vale ressaltar que, não há estudos com os gengerois e shogaois frente à DNase, lipase e na inibição da formação de biofilme de *S. aureus*, o que torna esta pesquisa inovadora e bastante promissora na busca de novas substâncias com tais atividades biológicas, para auxiliar no tratamento dessas infecções.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* foram descritos pela primeira vez em 1880, em pus de abscessos cirúrgicos, pelo cirurgião escocês Alexandre Ogston, e atualmente é um dos microrganismos mais comuns nas infecções piogênicas em todo o mundo. É uma bactéria esférica, do grupo cocos gram-positivo, comumente encontrada na pele e nas vias aéreas superiores de pessoas saudáveis, entretanto pode provocar doenças, que vão desde uma simples infecção (espinhas, furúnculos e celulites) até infecções graves (pneumonia, meningite, endocardite, síndrome do choque tóxico, septicemia e outras) (SANTOS et al., 2007).

A patogenicidade de *S. aureus* envolve vários elementos e está relacionada com diversos fatores de virulência que facilitam a fixação, colonização, interações célula-célula, evasão da resposta imune e danos teciduais. Estes fatores, geralmente, são macromoléculas com grande poder patogênico, e incluem enzimas e toxinas. As  $\beta$ -lactamases, coagulases, hialuronidases e catalases são algumas das enzimas que atuam como fatores de virulência. Além dessas enzimas, *S. aureus* também produz DNAses, lipases, proteases, esterases e biofilme. Entre as toxinas produzidas por esse patógeno destacam-se as seguintes: alfa, beta e gama toxinas, aleucocidina, esfoliatina, atoxina do choque tóxico e as enterotoxinas (SANTOS et al., 2007).

Como agente de infecções associadas aos serviços de saúde, denominadas infecções hospitalares, *S. aureus* é o patógeno isolado com maior frequência, realçando o seu papel como agente etiológico das principais infecções hospitalares, tais como: infecções de sítio cirúrgico, endocardites, pneumonias e bacteremias. Percebe-se, ainda, uma marcante tendência deste microrganismo em desenvolver resistência aos antimicrobianos (GRUNDMANN et al., 2010; RICARDO et al., 2004).

### 2.2 Alternativas para o tratamento de infecções microbianas

O tratamento de infecções por *S. aureus* tem se tornado um grande desafio, pois além de se tratar de um microrganismo com grande potencial de virulência, as

opções de antimicrobianos têm sido reduzidas a partir do surgimento da resistência à penicilina, meticilina e, mais recentemente, à vancomicina (FENG et al., 2008).

Estratégias adicionais de tratamento são necessárias para melhorar a resposta clínica e para reduzir a resistência a antibióticos. Uma dessas estratégias é a inibição dos fatores de virulência das bactérias. Em especial, *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA), que tem a produção aumentada desses fatores de virulência (KIODROWSKI, 2014; KATRIN et al., 2014).

Um dos importantes fatores de virulência secretados por *S. aureus* é a enzima desoxirribonuclease (DNAse). Esta enzima pode ser usada como alvo terapêutico para o combate destes microrganismos em infecções, uma vez que ela impede que o sistema imunológico do hospedeiro, especialmente os neutrófilos, reaja e destrua as bactérias (KIEDROWSKI, 2014; KATRIN et al., 2014).

Os neutrófilos estão diretamente envolvidos com a resposta imune inata contra infecções, fagocitando corpos estranhos, como os microrganismos, com ajuda de seus prolongamentos citoplasmáticos. Além disso, os neutrófilos secretam complexos macromoleculares, denominados de “armadilhas” extracelulares (NETs, *neutrophil extracellular traps*), que são constituídos de um esqueleto de DNA associados a peptídeos antimicrobianos, histonas e proteases (BERENDS, 2010). Diversas cepas de *S. aureus* e *Streptococcus* do grupo A atuam destruindo as NETs com auxílio de nucleases, secretadas nos locais de infecção, contribuindo fortemente para a patogenicidade destes microrganismos em diversos processos infecciosos em tecidos (BERENDS, 2010; KIEDROWSKI, 2014).

*S. aureus* é capaz de multiplicar-se rapidamente sobre a pele, produzindo enzimas que degradam lipídios (lipases e esterases) e uma “Enzima Modificadora de Ácidos Graxos” (EMAG) (GOMES, 2013). A lipase exerce um papel endógeno no *Staphylococcus* podendo ser de natureza patogênica, atuando na metabolização de lipídios e interferindo com a fagocitose dos granulócitos no ser humano. Logo, esta enzima pode ser usada como alvo terapêutico para o combate destes microrganismos em infecções (KHOSASIH, SUWANTO, & KIM, 2012).

No Quadro 1 pode-se observar diversos tipos de fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* e a sua ação sobre o tecido do hospedeiro.

Quadro 1: Fatores de virulência do *S. aureus*.

<b>Fatores de virulência</b>	<b>Ação no Hospedeiro</b>
<b>Polissacarídeo capsular</b>	Antifagocítica
<b>Componentes da parede celular</b>	
Peptidoglicano	Piogênico, quimioatrativo
Ácido teicóico	Liberado, pode proteger contra o complemento
<b>Proteínas da superfície celular</b>	
Proteína A	Interage com a região Fc da IgG
Proteína de ligação ao fibrinogênio	Liga-se ao fibrinogênio
Proteína de ligação à fibrinonectina	Liga-se à fibrinonectina
Proteína de ligação à laminina	Liga-se à laminina
Proteína de ligação ao colágeno	Liga-se ao colágeno
Proteína de ligação à vitronectina	Liga-se à vitronectina
<b>Toxinas extracelulares</b>	
Alfa, Beta, Gama e Delta toxinas	Citotóxica para tecidos e leucócitos.
Leucocidina P-V	Destrói leucócitos (leucocida)
Toxina da Síndrome do Choque Tóxico (TSCT)	Liga-se às moléculas do MHC da classe II induz síntese de citocinas causando múltiplas disfunções orgânicas
Enterotoxinas	Emética e diarreia
<b>Enzimas</b>	
Coagulase	Catalisa a conversão de fibrinogênio em fibrina
Lipase	Degrada os lipídios
Enzima Modificadora de Ácidos Graxos	Modifica ácidos graxos liberados na degradação lipídica e contribuí com a formação de Abscessos.
Proteases	Degrada proteínas, incluindo proteínas de defesa hospedeiro.
Fosfolipases	Degrada fosfolipídios
Estafiloquinase	Converte plasminogênio plasmina fibrinolítica
Hialuronidase	Degrada o ácido hialurônico
Nuclease	Cliva tanto o DNA quanto o RNA
<b>Biofilme</b>	Aderem a superfícies

*S. aureus* são capazes de produzir biofilmes. Estes são definidos como uma comunidade de microrganismos que aderem a superfícies úmidas, multiplicam-se e embebem-se em uma matriz viscosa composta por substâncias poliméricas extracelulares produzidas por eles próprios (SIMÕES et al., 2010). Uma das principais propriedades dos microrganismos que residem em um biofilme é a diminuição da suscetibilidade aos agentes antimicrobianos (RICHTER, 2017). Os biofilmes de *Staphylococcus* spp. tem como componentes principais: polissacarídeos, DNA extracelular e proteínas (OTTO, 2008).

A estabilidade dos biofilmes de vários microrganismos está relacionada a presença de DNA extracelular e de pequenas moléculas intracelulares liberadas (ALLESEN-HOLM et al., 2006; KIRKPATRICK e VIOLLIER, 2010), incluindo biofilmes maduros de *S. aureus* (BAYLES, 2007).

A maioria dos biofilmes maduros são submetidos a dispersão ativa e passiva, o que resulta na liberação de células planctônicas e flutuantes para o meio ambiente, como pode ser observado na Figura 1.

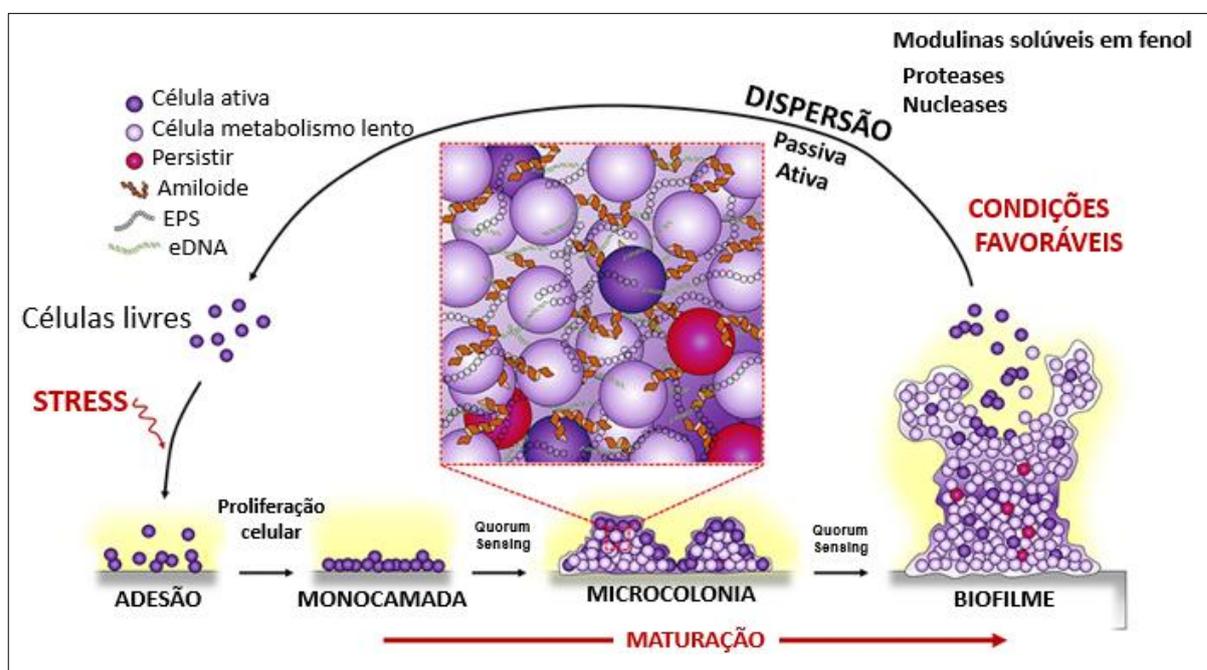


Figura 1: Ciclo de vida do biofilme. 1- forma planctônica de flutuação livre; 2- anexo inicial; 3- proliferação, anexo permanente com perda de mobilidade; 4- maturação do biofilme, diferentes fenótipos, como as células persistentes, estão presentes no biofilme; e 5- amadurecimento do biofilme, migração das células do biofilme e reinício do ciclo (adaptado de REFFUVEILLE et al 2017).

A dispersão passiva é um evento de destruição física provocado por forças externas, tais como cisalhamento líquido e sólido e intervenções mecânicas (por exemplo, escovação dentária). O biofilme pode ser removido da massa principal pelo fluxo de fluido intersticial. E, em feridas, pode ser fisicamente desbridado por um cirurgião. A dispersão ativa, por outro lado, é desencadeada pelos próprios microrganismos presentes no biofilme, em resposta a mudanças ambientais, como a falta de nutrientes, subprodutos tóxicos, bacteriófagos, presença de fagócitos, estresse antimicrobiano e níveis de oxigênio desfavoráveis. Assim, a dispersão ativa é um estágio vital no ciclo de vida de um biofilme contribuindo para a sobrevivência bacteriana e a progressão da doença (RAMAKRISHNAN, 2015).

Fatores, tais como: temperatura, presença de agentes antimicrobianos, quantidade de inóculo, forças hidrodinâmicas, características do substrato, variação de pH, disponibilidade de nutrientes e oxigênio, assim como as concentrações dos metabólitos microbianos implicam o desenvolvimento de um biofilme (NAVES et al., 2008).

Uma vez que as nucleases, lipases e o biofilme são importantes fatores de virulência em infecções causadas por *S. aureus* resistente à meticilina, a busca por substâncias naturais que inibam a produção ou ação dessas enzimas e a formação de biofilme é uma proposta promissora para o aumento da resposta clínica em infecções e para a redução do desenvolvimento de resistência a antimicrobianos.

## 2.3 Plantas medicinais

A utilização das plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, se constitui em uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) anunciou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde. Segundo a OMS, plantas medicinais são definidas como “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, compostos que podem ser utilizados com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (VEIGA, 2005).

Uma das plantas bastante utilizadas em todo o mundo há milhares de anos, e que possui grande valor terapêutico para o alívio de várias enfermidades (ZICK et al.,

2008) é o gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). Algumas doenças vêm sendo tratadas com o uso do gengibre incluindo: artrite, reumatismo, câimbra, distensões e dores musculares, constipação, indigestão, vômito, hipertensão, demência, febre, verminoses, e doenças infecciosas (ALI et al., 2008).

Dentre as principais ações farmacológicas do gengibre comprovadas cientificamente, estão anti-inflamatória (FUNK et al., 2009; HENROTIN et al., 2010; DUGASANI et al., 2010), antibacteriana e antipirética (AFZAL et al., 2001; MARTINS et al., 2001). A descoberta de novas substâncias antimicrobianas tem despertado interesse científico devido ao aumento de infecções causadas por microrganismos resistentes a diversos antibióticos.

## **2.4 *Zingiber officinale* Roscoe**

O gengibre, foi descrito primeiramente, pelo botânico inglês William Roscoe em 1807. É uma erva rizomática oriunda de países do sudoeste asiático e Arquipélago Malaio que engloba mais de 1200 espécies de plantas incluídas em 53 gêneros (STEVEN, 2002). O gênero *Zingiber* inclui aproximadamente 85 espécies. É cultivada facilmente em países de clima tropical e sub-tropical. A principal área de produção de gengibre no Brasil é a faixa litorânea que vai do Espírito Santo a Santa Catarina, em razão das condições de clima e solo mais adequados (DEBIASI et al., 2004; NEGRELLE et al., 2005; ELPO et al., 2008).

É uma planta herbácea que pode chegar a 1,50 m de altura, de caule articulado, rizoma horizontal, comprido lateralmente, com ramificações situadas num mesmo plano, digitiformes, no vértice das quais se encontram cicatrizes do caule foliáceo; de 14 a 16 cm de comprimento por 4 a 20 mm de espessura. Folhas compostas em duas séries, com bainha amplexicaule e flores amarelo-esverdeadas em espigas fusiformes. O fruto é uma cápsula trilocular que se fende em três válvulas; as sementes são azuladas e contêm um albúmem carnoso. O rizoma é geralmente articulado formado por tubérculos ovóides, rugosos e prensados uns contra os outros.

Uma imagem ilustrando *Z. officinale* pode ser observada na Figura 2 (EMBRAPA, 2011).

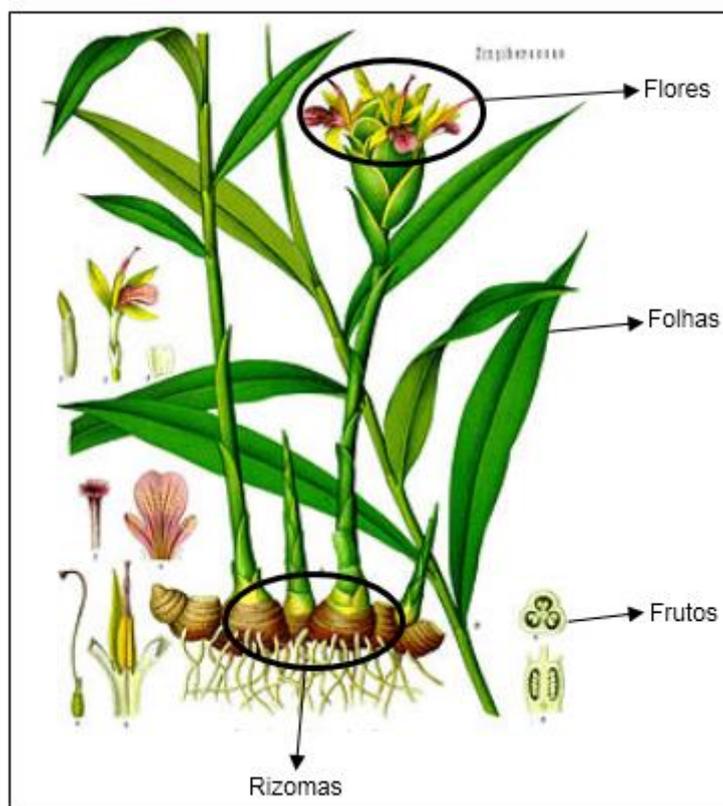


Figura 2: Imagem da espécie *Z. officinale*, onde se observa as folhas, frutos, flores, rizomas e caule.  
Fonte: [https://species.wikimedia.org/wiki/Zingiber\\_officinale](https://species.wikimedia.org/wiki/Zingiber_officinale).

O gengibre é amplamente comercializado em função de seu emprego na alimentação, na medicina popular e como matéria prima industrial, especialmente para fabricação de bebidas, perfumes e produtos de confeitaria como pães, bolos, biscoitos e geléias (ROGRIGUES e LIRA, 2013; ELPO, 2004). No Brasil é consumido, nas formas: seca, fresca, ou em conserva, como está ilustrado na Figura 3. É utilizado também nas diferentes formas farmacêuticas: cristalizada, pastilha, xarope ou em cápsula (SILVA, 2011).

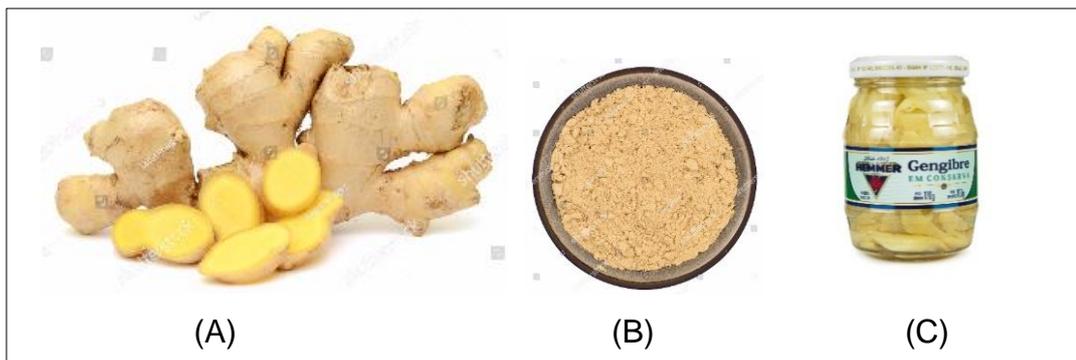


Figura 3: Principais formas de consumo do gengibre, fresco (A), seco (B) e em conserva (C). Fonte: <https://www.shutterstock.com/search?searchterm=zingiber+officinale>, <https://emporiohemmer.com.br/gengibre-em-conserva>.

### 2.4.1 - Perfil químico

Mais de 100 substâncias do gengibre já foram identificadas (JOLAD et al, 2004; JOLAD et al, 2005) e dezenas têm sido isoladas (ALI et al., 2008; PARK et al., 2008; MA et al., 2004; SILVA, 2011; WANG et al., 2011; LI et al., 2013). Os compostos majoritários são os monoterpenos e sesquiterpenos, encontrados no óleo essencial (1-3 %), e os derivados fenólicos, encontrados na sua oleoresina (4,5-7 %) (PUENGPHEAN e SIRICHOTE, 2008).

Os derivados fenólicos, principalmente os gingeróis e shogaois, são os responsáveis por seu sabor pungente, e responsáveis pela maior parte das atividades terapêuticas do gengibre. Dentre elas destacam-se as atividades antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral (FUNK et al., 2009; HENROTIN et al., 2010; DUGASANI et al., 2010).

Os gingeróis que se encontram em maior quantidade nesta espécie (6-, 8- e 10-gingerol) constituem uma cadeia homóloga, diferindo-se apenas no tamanho de sua cadeia hidrocarbônica por dois carbonos (HE et al., 1998). Os produtos de degradação (desidratação) dos gingeróis, os shogaois, são mais pungentes que os gingeróis e podem ser encontrados em maior quantidade nos rizomas do gengibre seco, devido ao processamento térmico ao qual os rizomas do gengibre são submetidos. Dentre os shogaois, o 6-shogaol é o mais abundante, pois é gerado pela desidratação do 6-gingerol, o principal gingerol encontrado no vegetal (ALI et al., 2008;

PARK et al., 2008). As estruturas químicas dos gingeróis e shogaóis podem ser observadas na Figura 4.

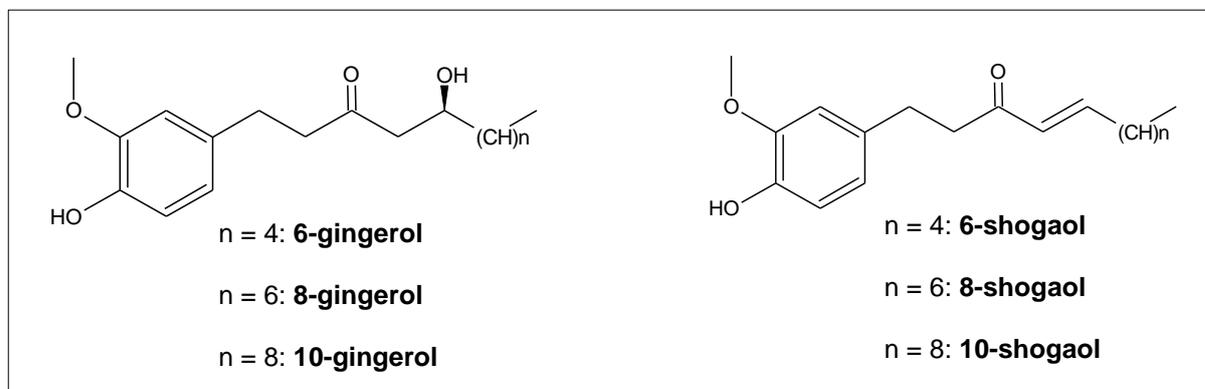


Figura 4: Estruturas químicas dos gingeróis e shogaóis isolados de *Z. officinale*.  
Fonte: Própria autora

Outras substâncias foram isoladas da oleoresina obtida por extração dos rizomas de *Z. officinale*. Entre eles, 6-gingerdiol, 6-paradol, 6-gingerdiona, alguns diarileptanoides, o diterpeno galanolactona, e os esteróides  $\beta$ -sitosterol e  $\beta$ -6-hidroxi-estigmastenona (JOLAD et al.; 2005; MA et al., 2004).

## 2.4.2 – Atividade antimicrobiana

A busca por alternativas terapêuticas para diferentes patologias faz da pesquisa de produtos naturais um campo produtivo em opções de moléculas com diferentes atividades biológicas. As plantas apresentam em seus metabólitos secundários uma grande fonte de possíveis fármacos, devido à diversidade de moléculas com as mais variadas estruturas e propriedades químicas (GRANDIS et al., 2015).

Há poucos estudos que relatam atividade antimicrobiana de extratos ou substâncias isoladas de gengibre. Os estudos encontrados mostram que o gengibre apresenta atividade antimicrobiana além de ser bem conhecido na medicina tradicional. Estudos realizados com óleo essencial dos rizomas de *Z. officinale* frente a diversos patógenos alimentares verificaram atividade antimicrobiana com CIM que variou de 2500 a 5000  $\mu\text{g/mL}$  frente a algumas espécies de *Salmonella* (MAJOLO et al., 2014).

Grandis e colaboradores mostraram que o extrato metanólico (3% p/v) dos rizomas de *Z. officinale* possui efeito antimicrobiano contra uma gama de bactérias, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Escherichia coli* (GRANDIS et al., 2015).

Mahady e colaboradores observaram que o extrato bruto metanólico bruto dos rizomas de gengibre inibiu o crescimento de isolados clínicos de *Helicobacter pylori* com concentração inibitória mínima (CIM) que variaram de 6,25 a 50 µg/mL. Os gingeróis e o 6-shogaol também foram testados frente a 19 estirpes de *H. pylori*. O 6-gingerol foi ativo contra todas as 19 estirpes com uma CIM de 5,12 µg/mL (intervalo de 3,125 a 100,0 µg/mL). Oito-gingerol apresentou uma CIM de 12,5 µg/mL (intervalo de 3,125 a 100,0 µg/mL) e o 10-gingerol, o mais ativo, uma CIM de 6,25 µg/mL (intervalo 0,78 a 50,0 µg/mL). Já o 6-shogaol, foi ativo apenas em concentrações mais elevadas com uma CIM de 25,0 µg/mL (intervalo 12,5 a 100,0 µg/mL).

Park e colaboradores verificaram que o 10-gingerol e o 12-gingerol obtidos dos rizomas de *Z. officinale* mostraram uma forte atividade antibacteriana in vitro contra bactérias anaeróbicas associado a periodontite, *Porphyromonas gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Porphyromonas intermedia* apresentando uma CIM na faixa de 6 a 14 µg/mL (PARK et al., 2008).

Wang e colaboradores analisaram a atividade antimicrobiana de 6-, 10-gingerol, 6-shogaol e 6-dehidrogingerdiona contra o *Acinetobacter baumannii*, e seus valores de CIM variaram de 132 a 347 µg/mL. 6-dehidrogingerdiona foi o composto mais ativo (132-207 µg/mL). O 6-gingerol e o 6-shogaol também foram ativos, porém eles apresentaram efeito inibitório menor que a 6-dehidrogingerdiona e o 10-gingerol. Esta foi a primeira demonstração de inibição de isolados de *A. baumannii* por compostos do gengibre.

Ashraf e colaboradores mostraram que, o óleo essencial do gengibre obteve um halo de inibição que variou de 5,9 a 24,2 mm quando comparados com tetraciclina que apresentou halos na faixa de 18,2 mm a 37,5 mm. O óleo essencial foi mais eficaz que a tetraciclina frente a alguns microrganismos, no qual o óleo apresentou halos de 11,5 mm, 21,9 mm e 22,9 mm, quando a tetraciclina mostrou halos de 9,6 mm, 19,8 mm e 21,6 mm para as respectivas bactérias *Shigella*, *Enterococcus hirae* e *Escherichia coli* (Ashraf et al., 2017). Essas atividades possivelmente foram devido aos seus constituintes ativos, como zingibereno e gingerol (AMEL et al., 2015).

No estudo de Amel, o efeito antibacteriano do gengibre foi avaliado por método de difusão em disco. O óleo essencial de gengibre na concentração de 25 µg/mL mostrou atividade considerável contra sete cepas de *S. aureus*, mostrando atividade antibacteriana no tratamento de infecção de garganta infantil (AMEL et al., 2015).

Devido à escassez de estudos que avaliem a atividade antimicrobiana e a ausência de estudos com avaliação anti-fatores de virulência para o extrato de gengibre e seus metabólitos secundários, faz-se necessário avaliar o efeito antibacteriano e anti-fatores de virulência frente a *S. aureus* com extratos e substâncias isoladas dos rizomas de *Z. officinale*.

## **2.5 Processos de extração de metabólitos secundários de vegetais**

Existe uma gama de processos para a extração de metabólitos secundários de produtos naturais. Os clássicos são: maceração, percolação, soxhlet, extração sob refluxo e destilação a vapor; enquanto que os menos utilizados são: extração assistida por: turboextração, ultrassom, micro-ondas, fluido supercrítico e enzimas (EAE). De forma geral os solventes mais utilizados nestes métodos são água, mistura de água/etanol, hidrocarbonetos clorados e ésteres.

A maceração é um processo em que as substâncias são extraídas em um recipiente fechado à temperatura ambiente, colocado em contato com o líquido extrator por um período prolongado e sob agitação ocasional.

A turboextração, ao contrário da maceração é um processo de extração físico que facilita o rompimento da parede celular das células vegetais favorecendo a rápida extração de metabólitos secundários sensíveis a solventes orgânicos apolares (REDDY et al, 2012; ORTH ET AL, 1999; SERRANO et al, 2013).

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

Extratos obtidos dos rizomas de *Z. officinale* e seus metabólitos secundários, principalmente os gíngerois, apresentam diversas atividades biológicas importantes, comprovadas por diversos autores (FUNK et al., 2009; HENROTIN et al., 2010; DUGASANI et al., 2010; SILVA, 2011; SILVA et al., 2012; VILLALVILLA et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014) sendo portanto, os gíngerois, substâncias de grande interesse terapêutico, pois podem ser utilizadas como protótipo para a descoberta de fármacos mais eficientes e com menos reações adversas.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo Geral

Extrair e isolar metabólitos secundários de *Zingiber officinale* para avaliação da sua atividade antimicrobiana e anti-fatores de virulência de *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA).

### 3.2 Objetivos Específicos

- Obter extratos dos rizomas de *Z. officinale* utilizando diferentes técnicas;
- Quantificar o 6-, 8-, 10-gingerol e 6-shogaol nos extratos, por CLAE;
- Isolar e purificar os gingeróis utilizando cromatografia líquida clássica e CLAE;
- Avaliar a atividade antimicrobiana frente uma cepa de *S. aureus* resistente a metilina (MRSA);
- Avaliar a atividade anti-DNAse, anti-lipase e contra formação de biofilme em MRSA dos extratos, 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol e 6-shogaol.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Aquisição e secagem do material vegetal**

Os gengibres frescos (Empresa, Frutas Lider®) foram lavados, cortados em pequenos pedaços com o auxílio de um processador de alimentos, desidratados em estufa com circulação forçada de ar, por 5 dias, a 40°C. Em seguida o material foi pulverizado, peneirado em peneira de aço (diâmetro da malha: 2 mm) e armazenado em frascos de vidro até o momento das extrações.

### **4.2 Métodos de Extração**

#### **4.2.1 Maceração**

O gengibre, seco e pulverizado foi submerso em álcool etílico 99,5% ou hexano, na proporção 1:10, (m/v, planta/solvente), mantido a temperatura ambiente, 25°C, durante um período de 6 dias (OK e JEONG, 2012; KUBRA et al., 2013). A cada dois dias o extrato líquido foi filtrado com papel de filtro simples, e o solvente evaporado sob vácuo em rotaevaporador a 40°C. Em seguida o solvente foi adicionado ao material vegetal para um novo ciclo de extração. Os três extratos brutos (triplicata) obtidos foram combinados e os extratos resultantes armazenados para as posteriores análises cromatográficas e ensaios biológicos.

#### **4.2.2 Turboextração**

O material vegetal, seco e pulverizado, foi submerso em solvente orgânico, álcool etílico 99,5% ou hexano, na proporção 1:10 (m/v, planta/solvente) e, em seguida submetido a 3 ciclos de turboextração de 10 minutos a 21.000 rpm e 25°C. Posteriormente, o extrato foi filtrado e o solvente evaporado sob vácuo em rotaevaporador a 40 °C (REDDY et al., 2012; ORTH et al., 1999; SERRANO et al.,

2013). Os extratos resultantes foram armazenados para as posteriores análises cromatográficas e ensaios biológicos.

### 4.3 Análise cromatográfica dos extratos de *Z. officinale*

Antes das análises foi realizado o preparo da amostra, onde os extratos foram preparados utilizando a micro-extração em fase sólida (SPME). Os extratos de *Z. officinale* foram analisados em HPLC-DAD analítico da Shimadzu Proeminence System, equipado com degaseificador DGU-20A5, bomba binária LC-20AT, injetor automático SIL-10A, detector UV-Vis SPD-M10Avp no comprimento de onda de 280 nm, interface CBM-20A e "software" LC solution. Todas as análises foram conduzidas em coluna C18 Eclipse Plus Agilent (4,6 x 100 mm, 3,5  $\mu$ ). A eluição foi realizada no modo gradiente usando água (A)/acetonitrila (B): 0,0-2,0 min, 10-55% B; 2,0-9,0 min 55% B; 9,0-13,0 min, 65% B; 13,0-20,0, 100% B. As análises foram precedidas por equilíbrio da coluna cromatográfica por 10 min. O volume de injeção foi de 20  $\mu$ L, e a vazão de 1 mL/min (YUDTHAVORASIT, 2014). Os padrões analíticos (6-, 8-, 10-gingerol e 6-shogaol) foram isolados e identificados previamente por nosso grupo de pesquisa. Uma curva de calibração com cada uma destas substâncias foi construída para a quantificação destes metabólitos nos extratos obtidos, utilizando as seguintes equações.

$$\text{6-gingerol: } y = 11291x + 20061, R^2 = 0,9989$$

$$\text{8-gingerol: } y = 2479x + 14132, R^2 = 0,9981$$

$$\text{10-gingerol: } y = 14822x - 35207, R^2 = 0,9995$$

$$\text{6-shogaol: } y = 9079x + 36467, R^2 = 0,9983$$

### 4.4 Isolamento e purificação dos gingeróis

Os gingeróis foram isolados a partir do extrato etanólico obtido dos rizomas de *Z. officinale* por maceração utilizando cromatografia clássica e cromatografia líquida de alta eficiência, da seguinte forma. Inicialmente 12 g do extrato bruto foi misturado com sílica gel 60 (70-230 mesh) até obter consistência de "farofa". Em seguida a

amostra foi submetida a cromatografia a vácuo utilizando uma coluna de vidro (3,6 cm de diâmetro) aberta empacotada com 20 cm de sílica gel 60 (70-230 mesh). Após aplicação do extrato à coluna, adicionou-se 1 L de hexano com o objetivo de eliminar os componentes graxos da amostra. Depois disso, 2 L da mistura de solventes acetato de etila e hexano (80:20, v/v) foi utilizado como eluente. Ao final foram coletadas três frações (A, B e C) contendo 1 L de eluente cada uma. Cada uma dessas frações foi evaporada em rotaevaporador a 40°C, e analisadas por CCDA, utilizando-se os gingeróis padrão que foram isolados previamente por nosso grupo de pesquisa.

Em seguida, a fração C na qual os gingeróis se encontravam, foi submetida a cromatografia em coluna utilizando coluna de vidro (3,6 cm de diâmetro) aberta empacotada com 20 cm de sílica gel 60 (70-230 mesh) e eluição em gradiente nas proporções apresentadas na Tabela 1. Foram coletadas cinquenta subfrações (30 mL cada) e, após análise por CCDA, aquelas com perfil químico semelhantes foram reunidas.

Tabela 1: Condições que foram utilizadas em cromatografia utilizando coluna de vidro.

<b>Volume da fase móvel</b>	<b>Fase móvel</b>	<b>Proporção</b>
500 mL	Hexano/AcOEt	60:40
500 mL	Hexano/AcOEt	50:50
500 mL	Hexano/AcOEt	40:60

Em seguida a fração rica em gingeróis foi injetada em HPLC (Shimadzu) para o isolamento e purificação dos gingeróis. O HPLC utilizado nesta etapa tinha a seguinte configuração: duas bombas LC-6AD, desgaseificador DGU-20A3R, auto-injetor SIL-20A, detector UV-Vis SPD-20A e controladora CBM-20A. As condições cromatográficas utilizadas seguiram a metodologia desenvolvida por SILVA (2012). Foram empregada as seguintes condições cromatográficas: coluna semipreparativa C18 Waters (21,2 x 250 mm, 10  $\mu$ ), fase móvel MeOH/ H<sub>2</sub>O (75:25), vazão de 10 mL/min;  $\lambda$  = 254, 280 nm e volume de injeção, 500  $\mu$ L.

## 4.5 Avaliação do crescimento bacteriano e inibição de formação de biofilme

Neste ensaio a suspensão bacteriana ( $1-5 \times 10^6$  UFC/mL) foi incubada junto com a amostra a ser testada, por um período de 24 horas a  $37^\circ\text{C}$ , em placa de 96 poços, utilizando o meio de cultura BHI (“Brain Heart Infusion”). Os extratos (T1, T2, M1 e M2) e as substâncias (gingerois e 6-shogaol) foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas em meio de cultura de modo que a concentração final nos poços fosse de 0,5 mg/mL para os extratos e 0,2 mg/mL para as substâncias isoladas. Como controle negativo foi utilizado a suspensão de *S. aureus* em meio de cultura. O equipamento foi zerado para cada experimento utilizando-se extrato/substância e/ou meio de cultura.

Após a adição de  $5\ \mu\text{L}$  da solução de extrato ou substância, foram adicionados  $195\ \mu\text{L}$  de suspensão bacteriana. A placa contendo o cultivo bacteriano em contato com as amostras foi incubada por um período de 24 horas a  $37^\circ\text{C}$ . Após a incubação foi realizada a leitura da absorbância a  $600\ \text{nm}$  em leitor de micro placas (ELISA) para determinar o Crescimento bacteriano na presença de cada amostra testada (Figura 5).

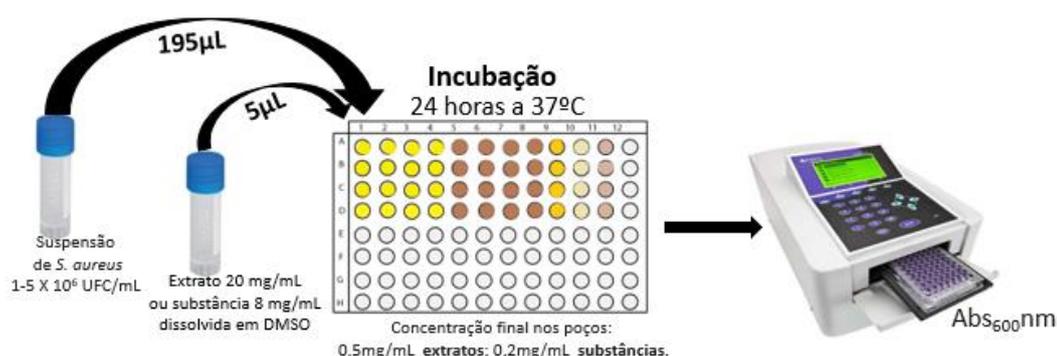


Figura 5: Ilustração de algumas etapas da avaliação do crescimento bacteriano  
Fonte: Própria autora

Posteriormente foi realizada a coloração do biofilme para a sua quantificação. Nesta etapa, as células foram descartadas, em seguida, a placa foi submersa em um

pequeno banho de água, por duas vezes, e depois seca por inversão em pano seco. Logo após, adicionou 150  $\mu\text{L}$  de uma solução 0,1% de cristal violeta (m/v) e incubou-se a placa a 25 °C por 15 min. Após esse período, a placa foi lavada quatro vezes com água e, em seguida, seca por inversão em pano seco. Adicionou-se 150  $\mu\text{L}$  de ácido acético 30% (m/v) para solubilizar o biofilme impregnado com cristal violeta e incubou-se a placa à 25 °C, por 15 min. Em seguida, transferiu-se 100  $\mu\text{L}$  da solução contendo biofilme corado e solúvel para uma nova microplaca para que a leitura fosse realizada em leitor de ELISA ( $\lambda = 600 \text{ nm}$ ). A solução de ácido acético 30% foi utilizada como branco (Figura 6) (STEPANOVIC et al., 2007; PANTANELLA et al., 20013).



Figura 6: Ilustração de algumas etapas da avaliação da inibição da formação de biofilme. Fonte: Própria autora

## 4.6 Avaliação da atividade anti-DNase

Os extratos obtidos por maceração, turbo-extração e as substâncias isoladas foram dissolvidas com dimetilsulfóxido (DMSO) e em seguida incorporados ao meio de cultura (ágar DNase), resultando nas concentrações finais: 0,5 mg/mL e 0,2 mg/mL para os extratos e substâncias isoladas, respectivamente.

A incorporação das amostras ao ágar DNase foram realizadas em placas de petri (90x15 mm). Com o auxílio de uma alça de platina calibrada foi inoculado 10  $\mu\text{L}$  de uma suspensão de *Staphylococcus aureus* ( $1-5 \times 10^6$  UFC/mL) no centro de cada quadrante da placa. Estas placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C, e, após esse período, foram reveladas com ácido clorídrico 0,5 mol/L para aferir o tamanho dos halos, e assim, determinar a atividade anti-DNase dos extratos e substâncias. Os experimentos foram realizados em quadruplicata.

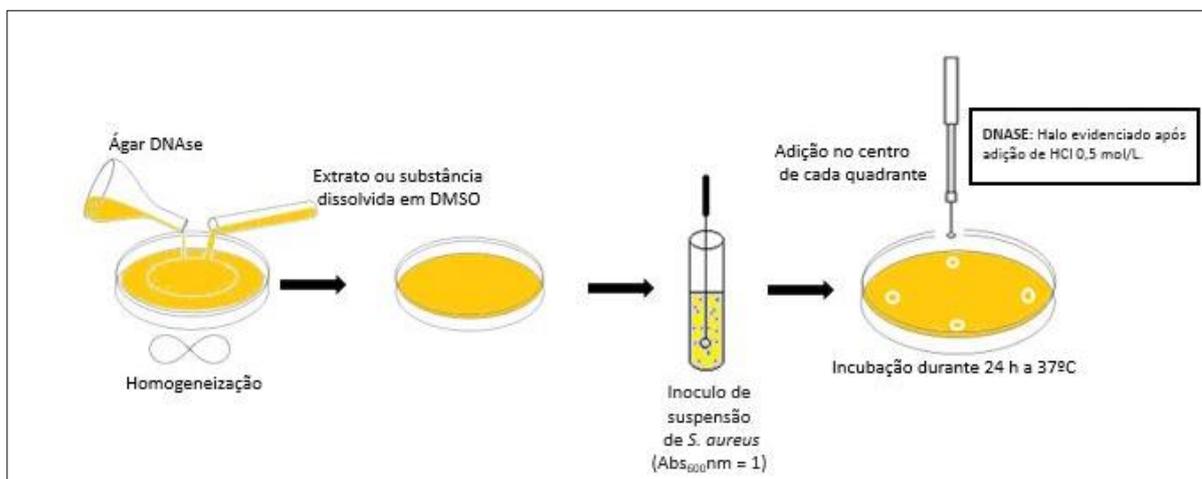


Figura 7: Etapas para avaliação da atividade anti-DNase.

Os resultados foram expressos em percentual de atividade relativa da DNase por meio da equação abaixo.

$$\text{Atividade relativa da DNase} = \frac{\text{diâmetro do halo}_{\text{amostra}}}{\text{diâmetro do halo}_{\text{controle}}} \times 100$$

#### 4.7 Avaliação da atividade anti-lipase

Os extratos obtidos por maceração, turbo-extração e as substâncias isoladas foram dissolvidas com dimetilsulfóxido (DMSO) e, em seguida, incorporados ao meio de cultura (ágar Baird Parker), resultando nas concentrações finais de: 0,5 mg/mL e 0,2 mg/mL para os extratos e substâncias, respectivamente.

A incorporação das amostras ao ágar foi realizada em placas de petri (90x15 mm). Com o auxílio de uma alça de platina calibrada foi inoculado 10 µL de uma suspensão de *S. aureus* ( $1-5 \times 10^6$  UFC/mL) no centro de cada quadrante da placa. Estas placas foram incubadas durante 24 horas a 37 °C e, após esse período o diâmetro dos halos foram aferidos e a atividade anti-lipase dos extratos determinada. Os experimentos foram realizados em quadruplicata.

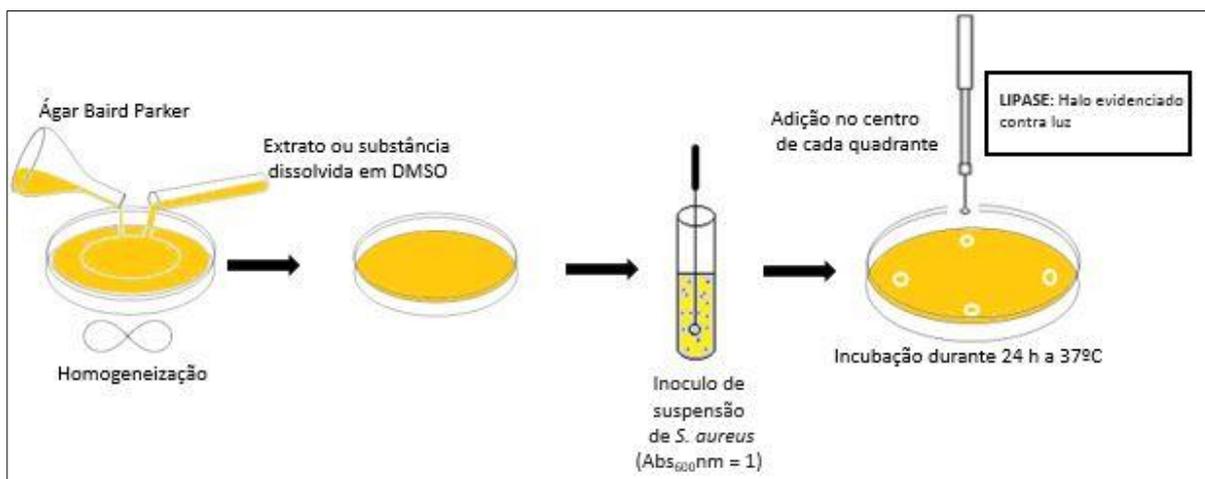


Figura 8: Etapas para avaliação da atividade anti-Lipase.

Os resultados foram expressos em percentual de atividade relativa da lipase por meio da equação abaixo.

$$\text{Atividade relativa da lipase} = \frac{\text{diâmetro do halo}_{\text{amostra}}}{\text{diâmetro do halo}_{\text{controle}}} \times 100$$

## 4.8 Análises Estatísticas

Os resultados obtidos nos diversos experimentos foram tratados estatisticamente utilizando-se o programa GraphPad Prism<sup>®</sup>, versão 7.0, através de Análise de Variância (ANOVA) de via única, seguido do pós Teste de Tukey ou Dunnett. Foram consideradas significativas as diferenças com  $p < 0,05$ .

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Rendimento dos extratos de *Zingiber officinale*

Os extratos brutos dos rizomas de *Z. officinale* foram obtidos utilizando-se turbo-extração (Turrtec®) (T1 e T2) e maceração (M1 e M2). Os solventes utilizados foram: hexano 100% e etanol 99,5%, na proporção 1:10, m/v (planta/solvente).

Foram utilizados aproximadamente 20 g de gengibre seco e quantidades de etanol ou hexano suficiente para manter a proporção massa de vegetal seco/volume de solvente (g/mL) de 1:10.

Os rendimentos obtidos para cada condição de extração podem ser observados na Tabela 2.

Tabela 2: Rendimentos de obtenção dos extratos brutos de *Z. officinale* utilizando turbo-extração e maceração em etanol e hexano.

	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>M1</b>	<b>M2</b>
<b>Solvente</b>	Hexano	Etanol	Hexano	Etanol
<b>Proporção</b>	1:10	1:10	1:10	1:10
<b>Rendimento (%)</b>	1,55	3,35	2,11	4,54

O extrato que utilizou a maceração e o etanol como condição de extração (M2), foi o que resultou no maior rendimento, cerca de 4,54%. Porém a turboextração utilizando o etanol como solvente extrator (T2) também apresentou bom rendimento (3,35%), demonstrando que o etanol foi o solvente capaz de extrair as maiores massas de extrato.

## 5.2 Análise cromatográfica dos extratos

Todos os extratos de *Z. officinale* foram analisados por cromatografia líquida alta eficiência (CLAE). Para a quantificação dos gingeróis e do 6-shogaol, construiu-se uma curva de calibração com os padrões analíticos destas substâncias.

O cromatograma proveniente da análise de cada extrato pode ser observado na Figura 9. O tempo de retenção das bandas referentes ao 6-gingerol, 8-gingerol, 6-shogaol e 10-gingerol foram de: 4,8; 7,7; 9,2 e 13,7 minutos, respectivamente.

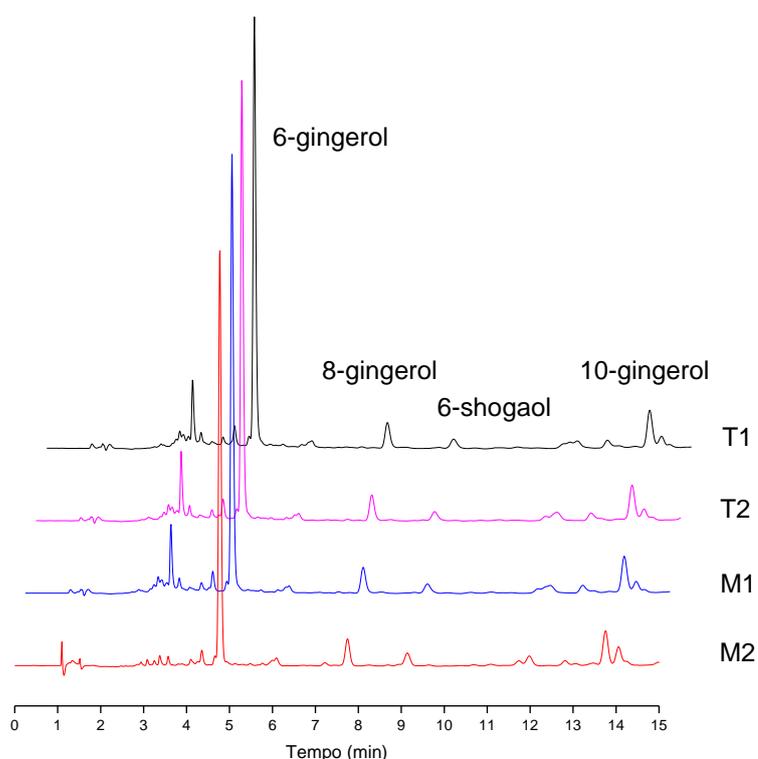


Figura 9: Perfil cromatográfica dos extratos de gengibre obtidos em diferentes condições de extração. T1: turboextração, hexano; T2: turboextração, etanol; M1: maceração, hexano; M2: maceração, etanol. Todas as análises foram conduzidas em coluna C18 Eclipse Plus Agilent (4,6 x 100 mm, 3,5  $\mu$ ). A eluição foi realizada no modo gradiente usando água (A)/acetonitrila (B): 0,0-2,0 min, 10-55% B; 2,0-9,0 min 55% B; 9,0-13,0 min, 65% B; 13,0-20,0, 100% B. As análises foram precedidas por equilíbrio da coluna cromatográfica por 10 min. O volume de injeção foi de 20  $\mu$ L, e a vazão de 1 mL/min (YUDTHAVORASIT, 2014)

Como pode ser observado na Figura 10, a condição de extração utilizada que resultou na maior quantidade de 6-gingerol por grama de extrato foi a M1 (maceração, hexano), mostrando ser a melhor condição de extração, com relação a seletividade (200 mg de substância/g de extrato). Para a extração de 8-, 10-gingerol e 6 shogaol

as quantidades extraídas para cada extrato foram semelhantes, não havendo diferença entre elas.

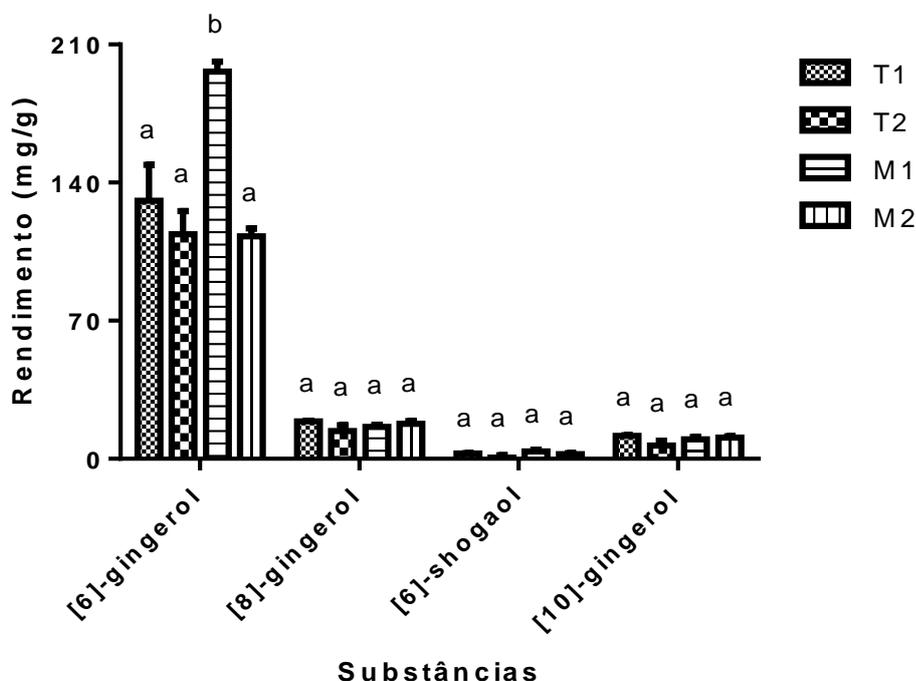


Figura 10: Rendimento dos principais metabólitos secundários do gengibre no extrato obtido por turbo-extração (T1 e T2), maceração (M1 e M2) e diferentes solventes: hexano (T1 e M1) e etanol (T2 e M2). A quantidade de cada substância foi calculada com base na massa de extrato. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (teste de Tukey).  $p < 0,05$ .

A maceração, mesmo tendo sido utilizada como parâmetro, já que é uma das técnicas de extração mais utilizadas na área de produtos naturais, foi a técnica que resultou no maior rendimento de extração.

No entanto, os extratos T1 e T2, obtidos por tubo-extração (hexano e etanol, respectivamente), também apresentaram bons rendimentos de extração, sendo uma técnica promissora por ser capaz de extrair os constituintes em tempos muito menores (30 minutos) quando comparados com a maceração (6 dias) (Figura 9).

Analisando o rendimento de extração em miligramas de substância por gramas de gengibre seco (Figura 11), a condição de extração utilizada que resultou na maior quantidade (5 mg/g) de 6-gingerol foi M2 (maceração e etanol). Para o 8-, 10-gingerol

e 6 shogaol as quantidades obtidas em cada extração foram semelhantes, não havendo diferença entre elas, como pode ser observado na Figura 10.

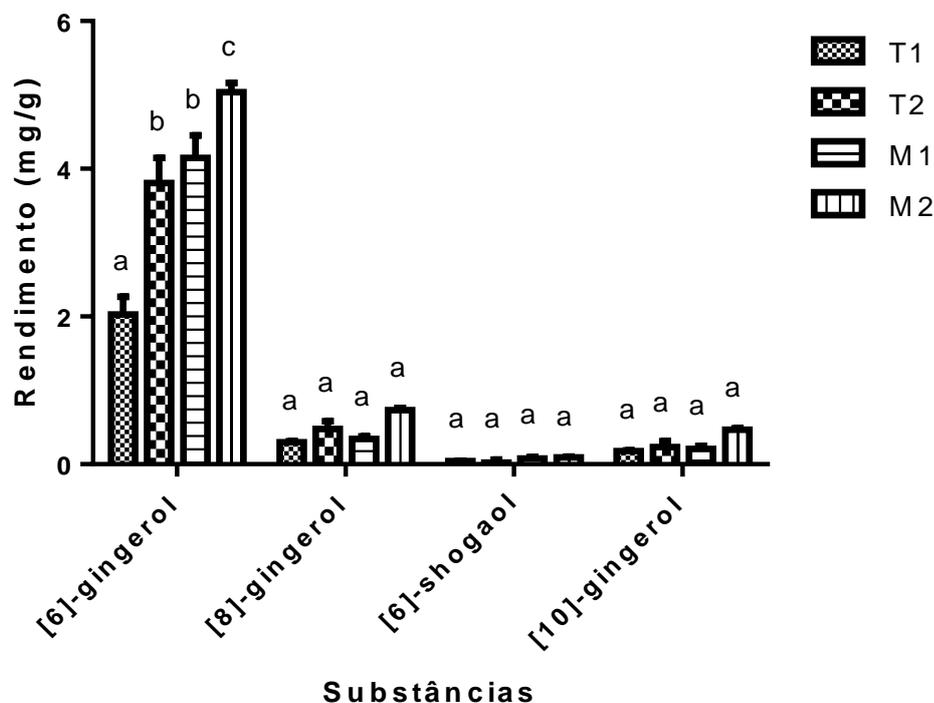


Figura 11: Rendimento dos principais metabólitos secundários do gengibre no extrato utilizando turbo-extração (T1 e T2), maceração (M1 e M2) e diferentes solventes: hexano (T1 e M1) e etanol (T2 e M2). A quantidade de cada substância foi calculada com base na massa de gengibre seco. Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (teste de Tukey).  $p < 0,05$ .

Com base no exposto, é possível afirmar que o etanol é o solvente extrator que é capaz de extrair a maior quantidade de gingerol por grama de gengibre seco. Dentre as duas técnicas de extração, mesmo com o maior rendimento para a maceração, a turbo-extração é bastante promissora, uma vez que o seu rendimento de extração (Figura 11) foi ligeiramente menor do que na maceração em um tempo de operação muito menor. Isto abre caminhos no sentido de otimizar a extração destes constituintes utilizando uma associação entre a turbo-extração e a maceração, com objetivo de reduzir o tempo do processo extrativo e atingir bons rendimentos.

### 5.3 Isolamento e purificação dos gingeróis

Após análise por CCDA, as subfrações com perfil químico semelhantes foram reunidas, resultando em quatro frações nomeadas A (1-12), B (13-17), C (18-32) e D (33-50). Análises por CCDA utilizando os padrões de gingerol, permitiram a identificação da fração rica em gingeróis (C: 18-32). Esta foi injetada em HPLC (Shimadzu) utilizando metodologia modificada de SILVA (2012). A separação cromatográfica dos gingeróis pode ser observada no cromatograma da Figura 11. Pode-se observar que houve uma excelente separação das bandas cromatográficas referentes aos gingeróis, tanto no modo analítico (Figura 9, página 36) como no modo preparativo (Figura 12).

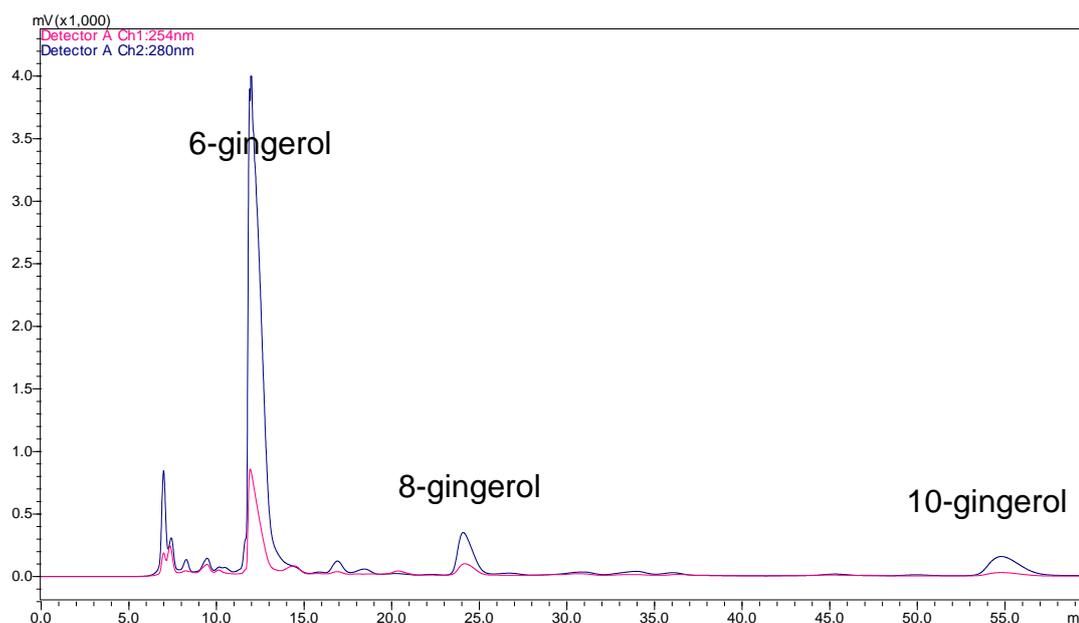


Figura 12: Cromatograma obtido no isolamento dos gingeróis. A fração enriquecida com os gingeróis foi injetada em coluna C<sub>18</sub> (21,2 x 250 mm, 10  $\mu$ ), fase móvel: MeOH/ H<sub>2</sub>O (75:25), vazão: 10 mL/min,  $\lambda$  = 254 e 280 nm. O volume de injeção foi de 500  $\mu$ L, na concentração de 200 mg/mL.

O grau de pureza das substâncias isoladas (>95%) foi determinado por HPLC analítico utilizando os comprimentos de onda de 254 e 280 nm.

## 5.4 Avaliação da inibição do crescimento bacteriano

As plantas apresentam uma variedade de substâncias em termos de estrutura e propriedades físico-químicas e biológicas, o que justifica o crescente interesse de indústrias farmacêuticas na síntese de fármacos a partir de fontes naturais (BRESOLIN & CECHINEL FILHO, 2003; BRESOLIN & CECHINEL FILHO, 2010). Extratos, frações e compostos isolados extraídos de plantas medicinais têm sido estudados por pesquisadores por mostrarem significativas propriedades, entre estas a antimicrobiana (DUARTE et al., 2005; MARTINI et al., 2009).

O ensaio de crescimento bacteriano foi realizado com o intuito de se observar o crescimento do *S. aureus* na presença do extrato (0,5 mg/mL) e das substâncias puras (0,2 mg/mL). Na Figura 13 pode-se observar que nenhum dos extratos inibiu o crescimento do microrganismo, o que permitiu avaliar a atividade anti-DNase utilizando estas mesmas concentrações.

Malu et al. (2009) avaliaram a atividade antibacteriana de extratos de gengibre obtidos com diferentes solventes como n-hexano, acetato de etila, etanol e água frente às linhagens de *Staphylococcus epidermidis* e *Streptococcus viridans*. Dentre os diferentes extratos, apenas o aquoso não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano. Porém, a inibição do crescimento bacteriano só pode ser observada na concentração mais alta (10 mg/mL). Assim, o presente estudo sugere que a inibição da atividade de crescimento bacteriano dos extratos é baixa e que dependente da concentração.

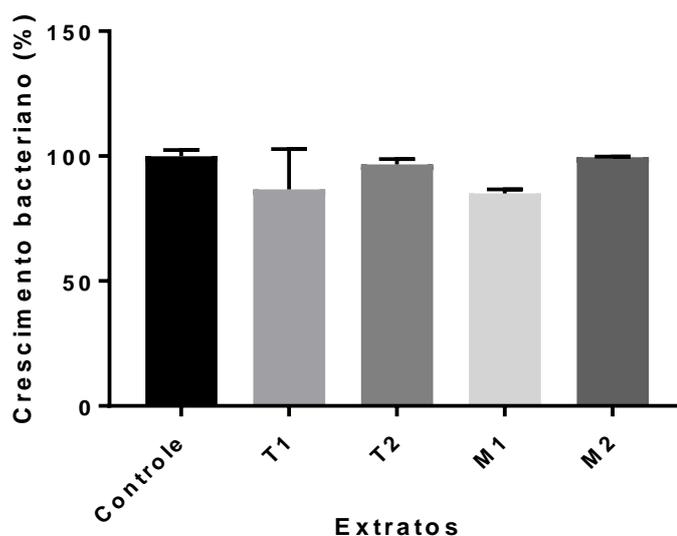


Figura 13: Efeito dos extratos de gengibre (0,5 mg/mL) no crescimento do *Staphylococcus aureus*. T1: turboextração, hexano; T2: turboextração, etanol; M1: maceração, hexano; M2: maceração, etanol. Não houve nenhum resultado diferente estatisticamente quando  $p < 0,05$ . (ANOVA seguida de teste de Dunnett)

O 6-gingerol e 8-gingerol exibiram diferença significativa quando comparados ao controle, mostrando crescimento bacteriano de aproximadamente 85%, diferente do 10-gingerol onde não houve inibição do crescimento. Porém, essa leve inibição do crescimento microbiano (15%) não foi considerada prejudicial na avaliação da atividade frente a DNase. O 6-shogaol apresentou uma inibição no crescimento bacteriano de 98% (0,2 mg/mL), não sendo possível utilizar essa concentração para avaliação da atividade anti-Dnase (Figura 14).

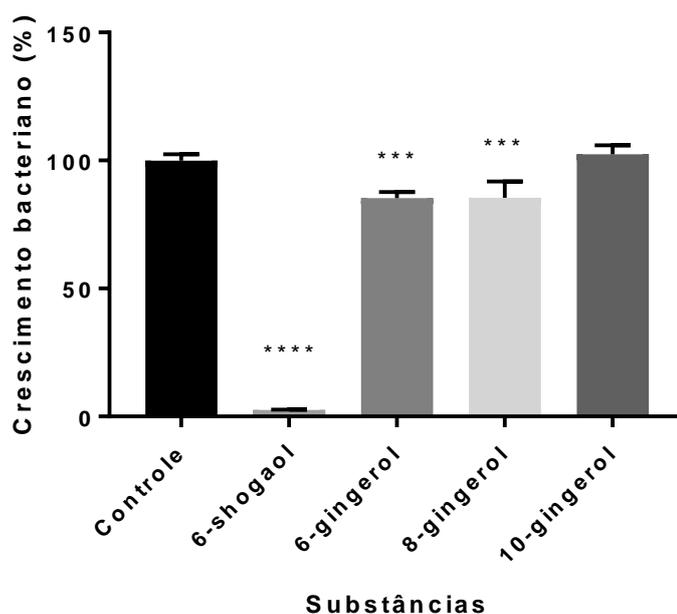


Figura 14: Crescimento do *Staphylococcus aureus* na presença do 6-gingerol, 8-gingerol, 10-gingerol e 6-shogaol (0,2 mg/mL). \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  em comparação com o controle (ANOVA seguida de teste de Dunnett).

Tegos *et al.* (2002) sugerem que compostos com grupos hidroxila possuem atividades antibacterianas, podendo ativar a função de depleção de mecanismos metabólicos dependentes de ATP, levando à morte bacteriana. No entanto, os resultados obtidos no trabalho não corroboram seus achados, visto que o 6-shogaol, a única substância capaz de inibir drasticamente o crescimento bacteriano de *S. aureus*, não apresenta em sua cadeia um grupo hidroxila. Em contrapartida os gingeróis, que apresentam tal grupamento, não desempenharam atividade antibacteriana.

Como o 6-shogaol inibiu 98% o crescimento microbiano na concentração de 0,2 mg/mL, determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) do 6-shogaol para estabelecer as concentrações que poderiam ser utilizadas para avaliar a atividade anti-DNase.

Como pode ser observado na Figura 15, a CIM do 6-shogaol foi de 50  $\mu\text{g/mL}$ . O 6-shogaol revela-se ser um forte agente antimicrobiano, pois foi capaz de apresentar efeito inibitório de 100% nas concentrações de 0,2; 0,1 e 0,05 mg/mL. Este foi o primeiro estudo que o 6-shogaol foi testado frente a *S. aureus*.

A partir da concentração 25  $\mu\text{g/mL}$  não houve inibição do crescimento microbiano, portanto, esta concentração poderia ser utilizada para avaliação da atividade anti-DNase.

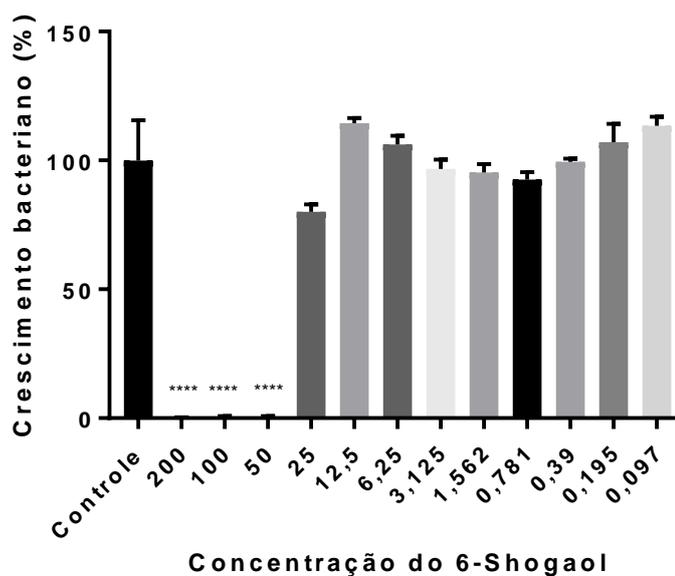


Figura 15: Determinação da concentração inibitória mínima do 6-shogaol utilizando as seguintes concentrações 200; 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781; 0,39; 0,195 e 0,097  $\mu\text{g/mL}$ . \*\*\*\* $p < 0,0001$  em comparação com o controle (ANOVA seguida de teste de Dunnett).

## 5.5 Avaliação da inibição da formação de biofilme

Nenhum dos extratos (0,5 mg/mL) foi capaz de inibir a formação de biofilme, como pode ser observado na Figura 16.

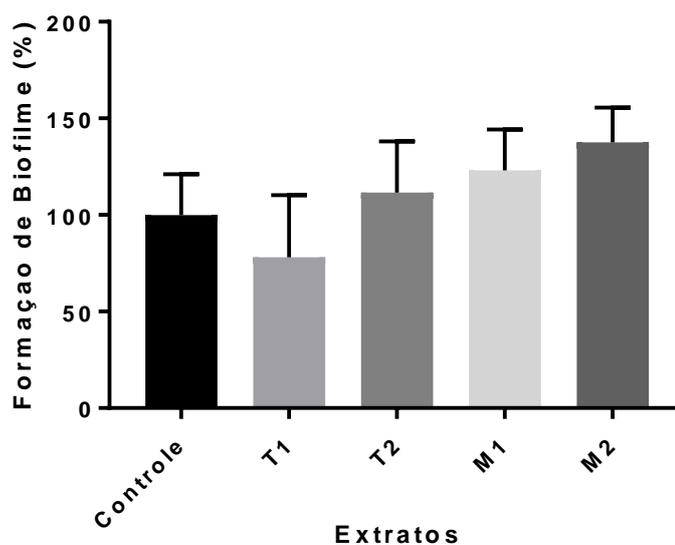


Figura 16: Efeito dos extratos (0,5 mg/mL) na formação de biofilme de *S. aureus*. T1: turboextração, hexano; T2: turboextração, etanol; M1: maceração, hexano; M2: maceração, etanol. Não houve nenhum resultado diferente estatisticamente quando  $p < 0,05$ . (ANOVA seguida de teste de Dunnett)

Apesar dos extratos não terem sido ativos, as substâncias isoladas apresentaram uma excelente inibição da formação do biofilme, todavia, na concentração de 0,2 mg/mL, ainda não foi possível afirmar que o 6-shogaol inibe a formação do mesmo, pois houve inibição do crescimento bacteriano. O 6-gingerol, 8-gingerol e 10-gingerol apresentaram diferença significativa quando comparadas ao controle, exibindo inibição da formação de biofilme de 39,8%, 65,9% e 52,6%, respectivamente (Figura 17).

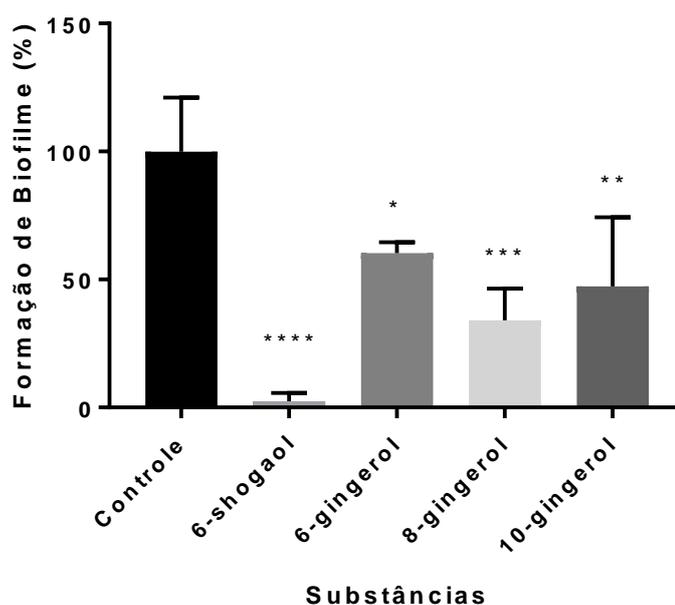


Figura 17: Formação de biofilme na presença das substâncias isoladas do gengibre, 6-shogaol, 6-gingerol, 8-gingerol e 10-gingerol (0,2mg/mL). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  em comparação com o controle (ANOVA seguida de teste de Dunnett).

Na avaliação da formação de biofilme utilizando o 6-shogaol nas concentrações sub-inibitórias de crescimento observou-se que esta substância foi capaz de inibir a formação do biofilme na concentração de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (50,45%) (Figura 18). Após análise estatística utilizando o teste de Dunnett, observou-se que houve apenas diferença estatística significativa entre a média do grupo controle e a média da concentração 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .

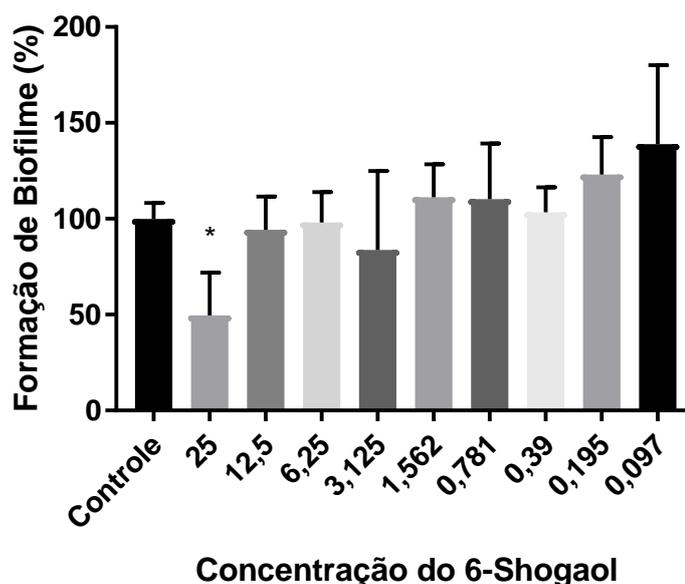


Figura 18: Formação de biofilme na presença do 6-shogaol nas concentrações 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,562; 0,781; 0,39; 0,195; 0,097 ug/mL. \* $p < 0,05$ , em comparação com o controle (teste de Dunnett).

## 5.6 Avaliação da atividade anti-DNase e anti-lipase dos extratos T1, T2, M1 e M2

Foi observada atividade anti-DNase para todos os extratos testados na concentração de 0,5 mg/mL (Figura 19). A inibição da DNase para T1, T2, M1 e M2 foram de 33,9%, 28,8%, 34,7% e 26,1%, respectivamente. No entanto, não é possível relacionar a atividade anti-DNase com as quantidades das substâncias em cada extrato, uma vez que as atividades foram estatisticamente semelhantes.

Apesar dos extratos não apresentarem atividade antibacteriana e nenhum efeito sobre a formação de biofilme, os mesmos se mostraram efetivos frente à DNase, que é um dos fatores de virulência mais importantes expressos por *S. aureus*. Esse é um ponto positivo, pois o grau de patogenicidade de *S. aureus* está relacionado com seus fatores de virulência. Uma vez inibindo a DNase, o microrganismo se torna mais suscetível a ação do sistema imunológico como também faz com que os antibióticos utilizados na clínica se tornem mais efetivos contra essa bactéria.

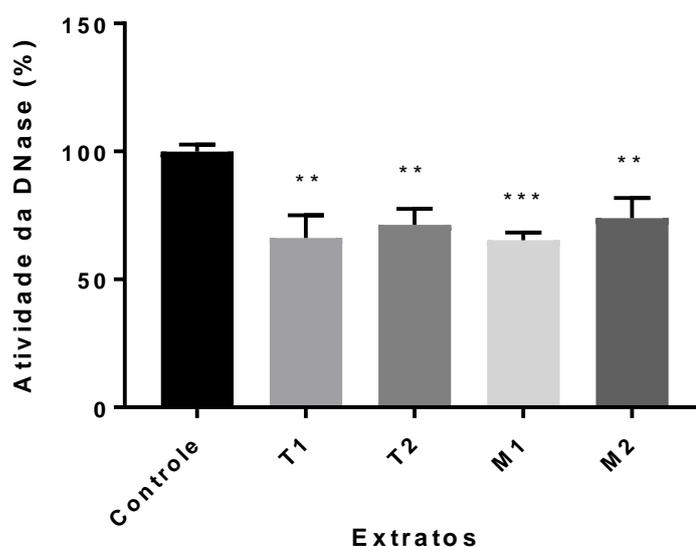


Figura 19: Efeito dos extratos de gengibre (0,5 mg/mL) na atividade da DNase. T1: turboextração, hexano; T2: turboextração, etanol; M1: maceração, hexano; M2: maceração, etanol. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  em comparação com o controle (ANOVA seguida de teste de Dunnett).

Já na avaliação da atividade anti-lipase, apenas os extratos T1 e T2 foram estatisticamente diferentes do controle, apresentando baixa atividade (17,49% e 18%, respectivamente), contra a lipase (Figura 20). M1 e M2 não foram capazes de inibir a produção, secreção ou atividade da lipase na concentração testada.

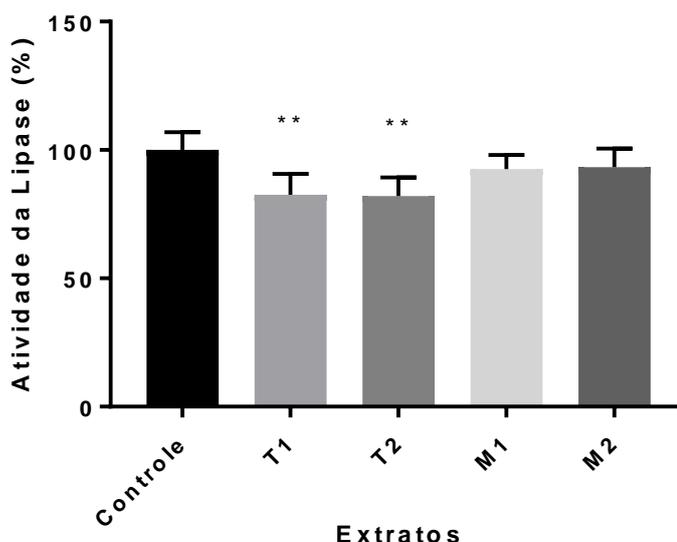


Figura 20: Efeito dos extratos de gengibre (0,5 mg/mL) na atividade da Lipase. T1: turboextração, hexano; T2: turboextração, etanol; M1: maceração, hexano; M2: maceração, etanol. \*\* $p < 0,01$ , em comparação com o controle (ANOVA seguida de teste de Dunnett).

Os extratos mostraram uma boa atividade frente à DNase e baixa atividade anti-lipase, porém se for analisada de uma maneira mais ampla, dois fatores de virulência foram inibidos, o que deixa os microrganismos ainda mais predispostos a ação dos antimicrobianos, revelando assim que dois extratos (T1 e T2) e os gingeróis que apresentaram atividade anti-DNase e anti-lipase são futuros candidatos a auxiliar no tratamento de infecções causadas por *S. aureus*.

### 5.7 Avaliação da atividade anti-DNase do 6-, 8-, 10-gingerol, 6-shogaol

As substâncias isoladas 6-, 8-, 10-gingerol, e 6-shogaol foram testadas com o intuito de se descobrir quais destas substâncias, que estão presentes no extrato, são responsáveis pela atividade anti-DNase.

Todas as substâncias se mostraram ativas frente a DNase na concentração de 0,2 mg/mL, havendo diferenças significativas quando comparadas com o controle: 6-gingerol (32,9%), 8-gingerol (44,6%) e 10-gingerol (30,3%). Os valores em parênteses são os valores de inibição da DNase para cada substância testada (Figura 21).

A disponibilidade de novas drogas antimicrobianas diminui de forma preocupante, resultado de uma série de fatores que em conjunto ameaçam a capacidade de combate a infecções, por mais simples que possam ser. Por isso a uma necessidade na busca de substâncias naturais que possam se tornarem protótipos a fármacos ou que venham auxiliar no tratamento dessas infecções. Sendo assim, as descobertas resultantes do presente trabalho sobre a inibição de fatores de virulência, projetam potencial sucesso na incessante luta contra microrganismos patogênicos.

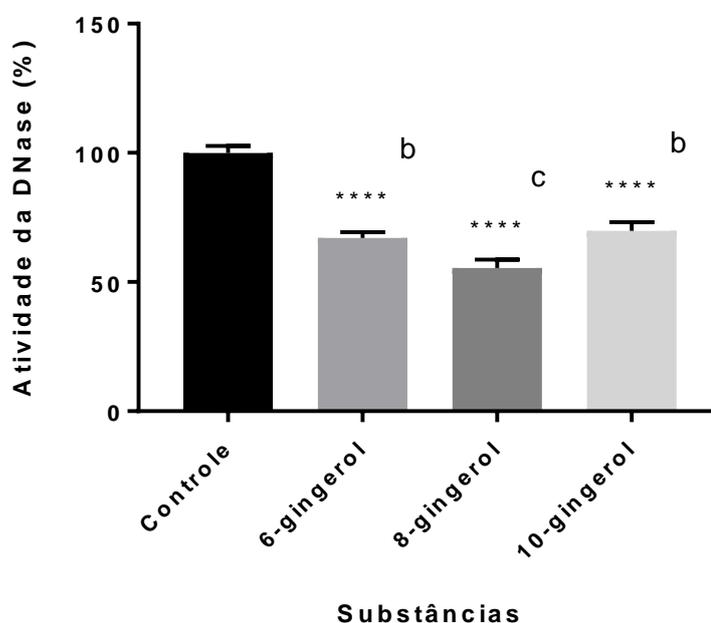


Figura 21: Efeito dos metabólitos secundários isoladas de gengibre (0,2 mg/mL) na atividade da DNase. \*\*\*\* $p < 0,0001$  em comparação com o controle (ANOVA seguida de teste de Dunnett). Letras diferentes indicam diferença estatística significativa (ANOVA seguida de teste de Tukey).

Na avaliação do efeito do 6-shogaol sobre a DNase, pode-se observar que ele apresentou baixa atividade (19,8%, 13,7% e 5,7%) nas concentrações 25; 12,5; 6,25  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (Figura 22). Embora não tenha apresentado uma boa atividade frente a DNase nessas concentrações, o 6-shogaol apresentou excelente atividade de inibição do crescimento microbiano, o que torna essa substância bastante promissora.

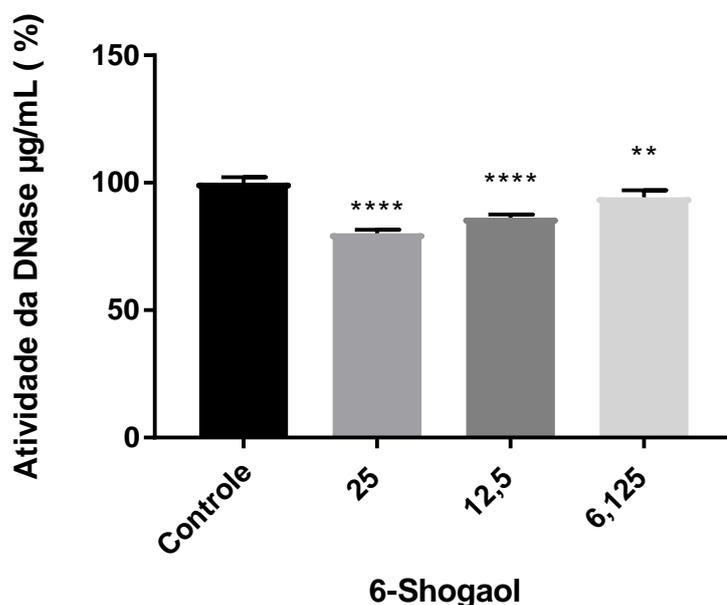


Figura 22: Efeito do 6-shogaol (0,2 mg/mL) na atividade da DNase. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  em comparação com o controle (ANOVA seguida de teste de Dunnett).

Analisando as estruturas químicas das substâncias avaliadas (Figura 23) quanto a atividade anti-Dnase (Figura 21), pode-se sugerir que o tamanho da cadeia carbônica do 8-gingerol ( $n = 6$ ) parece ser ideal para se atingir a atividade máxima anti-Dnase.

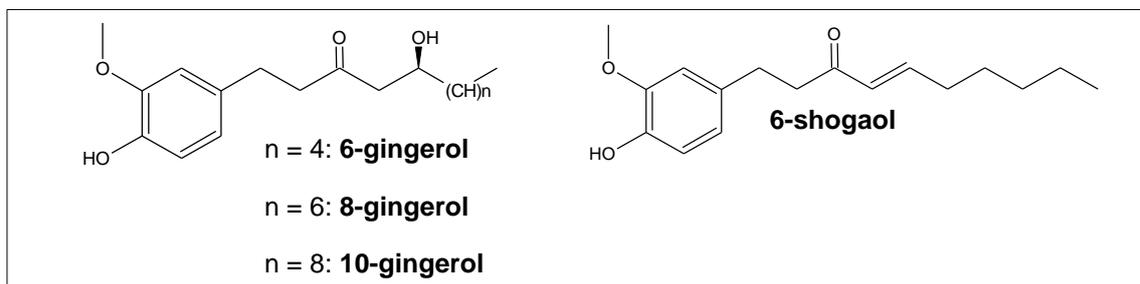


Figura 23: Estruturas químicas do 6-, 8-, 10-gingerol e 6-shogaol.

Contudo o 6-gingerol apresentou uma atividade menor do que o 8-gingerol, apresentando diferenças significativas entre ambas, dessa forma o tamanho de cadeia ideal para uma excelente atividade anti-DNase é a do 8-gingerol.

Não há relatos na literatura sobre a atividade de substâncias isoladas de *Z. officinale* frente à DNases secretadas por microrganismos, apesar de alguns autores relatarem atividade antifúngica (Agarwal, Walia, Dhingra, & Khambay 2001) e antibacteriana (Cruz-Vega et al., 2009) de substâncias isoladas.

Todos os extratos (T1: turboextração, hexano; T2: turboextração, etanol; M1: maceração, hexano; M2: maceração, etanol; 0,5 mg/mL e as substâncias (0,2 mg/mL) 6-, 8-, 10-gingerol e 6-shogaol apresentaram atividade frente a DNase.

T1, T2, M1 e M2 inibiram a DNase em 33,9%, 28,8%, 34,7% e 26,1%, respectivamente. Enquanto que apenas os extratos T1 (17,49%) e T2 (18%) foram ativos contra a lipase.

As substâncias 6-, 8- e 10-gingerol mostraram atividade de 32,9%, 44,6% e 30,3% anti-DNase e apresentaram inibição da formação de biofilme em 39,8%, 65,9% e 52,6%, respectivamente. O 6-shogaol além de inibir a DNase, também mostrou ter um alto potencial antimicrobiano, com concentração inibitória mínima (CIM) de 50 µg/mL.

## 6. CONCLUSÕES

Em virtude dos resultados que foram apresentados é de grande relevância encontrar técnicas e condições ótimas de extração que possibilite a obtenção de extratos ricos em substâncias bioativas de forma reprodutível.

Todos os extratos de gengibre e as substâncias isoladas apresentaram atividade contra DNase, enquanto que apenas os extratos T1 (turboextração/hexano) e T2 (turboextração/etanol) foram ativos frente a lipase.

As substâncias apresentaram excelente inibição da formação de biofilme e uma moderada atividade anti-DNase, o que as tornam promissoras, com chance de se tornarem protótipos à fármacos. Um fármaco com esse tipo de ação poderá ser utilizado como suporte no tratamento de infecções causadas por *S. aureus*, melhorando a resposta clínica e reduzindo o desenvolvimento de resistência a antibióticos.

O 6-shogaol além de inibir a DNase, também mostrou ter um alto potencial antimicrobiano, demonstrando ser uma substância promissora para ser utilizada como alternativa no tratamento de infecções por *S. aureus*.

Este trabalho por ser um estudo novo, vem encorajar novas pesquisas no sentido de demonstrar a atividade destes compostos, assim como torná-los aplicáveis e seguros para prática clínica.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGARWAL, M. *et al.* Insect growth inhibition, antifeedant and antifungal activity of compounds isolated/derived from *Zingiber officinale* Roscoe (ginger) rhizomes. **Pest Management Science**, v. 57, n. 3, p. 289-300, 2001.

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

ALLESEN-HOLM, M. *et al.* A characterization of DNA release in *Pseudomonas aeruginosa* cultures and biofilms. **Molecular Microbiology**, v. 59, n. 4, p.1114-1128, 2006.

AMEL A. S. *et al.* Antimicrobial Activity of *Zingiber officinale* (Ginger) oil against bacteria isolated from children throat. **Journal of Microbiology and biomedical research**, v.1, p. 01-06, 2015

ASHRAF, S. A. *et al.* In-vitro antimicrobial activity and identification of bioactive components using GC–MS of commercially available essential oils in Saudi Arabia. **Journal of food science and technology**, v. 54, n. 12, p. 3948-3958, 2017.

BAYLES, K. W. The biological role of death and lysis in biofilm development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 9, p. 721-726, 2007.

BERENDS, E. T. M. *et al.* Nuclease Expression by *Staphylococcus aureus* Facilitates Escape from Neutrophil Extracellular Traps. **Journal of Innate Immunity**, v. 2, n. 6, p. 576-586, 2010.

BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. Ciências farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: Univali, 2003. 239 p.

BRESOLIN, T.M.B.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar. São Paulo: Santos, 2010. 416 p.

BRONNER, S.; MONTEIL, H.; PREVOST, G. Regulation of virulence determinants in *Staphylococcus aureus*: complexity and applications. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 28, n. 2, p.183-200, 2004.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bactéria That Grow Aerobically; Approved Standard- Eighth Edition. Wayne, CLSI document M07-A8, 2009.

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

DUARTE, M. C. T. *et al.* Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

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

ELPO, E. R. S.; NEGRELLE, R. R. B.; RÜCKER, N. G. A. Produção de gengibre no município de Morretes, PR. **Scientia Agraria**, v. 9, n. 2, p. 211-217, 2008.

Emporio Hemer, gengibre em conserva. Disponível em: <https://emporiohemmer.com.br/gengibre-em-conserva>. Acesso em: 24 set. 2017.

FENG, Y. *et al.* Evolution and pathogenesis of *Staphylococcus aureus*: lessons learned from genotyping and comparative genomics. **FEMS Microbiology Reviews**. v. 32, n. 1, p. 23-37, 2008.

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

GAO, X. *et al.* Review of pharmacological effects of Glycyrrhiza radix and its bioactive compounds. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi = Zhongguo Zhongyao Zazhi = China Journal of Chinese Materia Medica**, 22 April. 2008, v. 34, n. 21, 2695-2700.

GRANDIS, R. A. *et al.* Avaliação da Atividade Antibacteriana do Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) e do Maracujá Amarelo (*Passiflora edulis* Sims). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n.1, p 77-82, 2015.

GOMES, M. J. P. Gênero *Staphylococcus* spp. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/labacvet/files/G%C3%AAnero%20Staphylococcus%20spp%204-2013-1.pdf>. 2013. Acesso em: 25 set. 2017.

GRUNDMANN; *et al.* Geographic Distribution of *Staphylococcus aureus* Causing Invasive Infections in Europe: A Molecular-Epidemiological Analysis. **Plos Medicine**. v. 7, n. 1, p. 1-15, 2010.

HENROTIN, Y. *et al.* Biological actions of curcumin on articular chondrocytes. **Osteoarthritis Cartilage**, v. 18, n. 2, p. 141-149, 2010.

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

JOLAD, S. D. *et al.* Commercially processed dry ginger (*Zingiber officinale*): Composition and effects on LPS-stimulated PGE2 production. **Phytochemistry**, v. 66, n. 13, p. 1614-1635, jul. 2005.

KATRIN, S. *et al.* Increased Neutrophil Extracellular Trap-Mediated *Staphylococcus aureus* Clearance Through Inhibition of Nuclease Activity by Clindamycin and Immunoglobulin. **Journal of Infectious Diseases**, v. 210, n. 3, p. 473- 482, 2014.

KIEDROWSKI, M. R. *et al.* *Staphylococcus aureus* Nuc2 Is a Functional, Surface-Attached Extracellular Nuclease. **PLOS ONE**, v. 9, n. 4, p. 1-13, 2014.

KIRKPATRICK, C. L.; VIOLLIER, P.H. Cell dispersal in biofilms: an extracellular DNA masks nature's strongest glue. **Molecular Microbiology**, v. 77, n. 4, p.801–804, 2010.

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 Food Science Technology**, v. 48, n. 9, p. 1828-1833, 2013.

LI, W-J. *et al.* Phenylalkanoids from *Zingiber officinale*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 49, n. 3, p. 440-442, 2013.

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

MAHADY, G. B.; *et al.* Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) and the gingerols inhibit the growth of Cag A+ strains of *Helicobacter pylori*. **Phytochemistry**. v. 23, p. 3699–3702, 2003.

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**, v. 16, n. 3, p. 505-512, 2014.

MALU, S. P., *et al.* Antibacterial Activity and medicinal properties of Ginger (*Zinziber officinale*). **Global Journal of Pure and Applied Sciences.**, v. 15, n. 3, p. 365-368, 2009.

MARTINI, S. *et al.* Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 1, p. 50-59, 2009.

NAVES, P.; *et al.* Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. **Microbial Pathogenesis.**, v. 45, p. 86-91, 2008.

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

OK, S.; JEONG, W-S. Optimization of Extraction Conditions for the 6-Shogaol-rich Extract from Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Preventive Nutrition Food Science.** v. 17, n. 2, p. 166-171, 2012.

ORTH, H. C. J.; RENDEL, C.; SCHMIDT, P. C. Isolation, Purity Analysis and Stability of Hyperforin as a Standard Material from *Hypericum perforatum* L. **Journal Pharmacy Pharmacology**, v. 51, n. 2 p. 193-200, 1999.

OTTO, M. Staphylococcal biofilms. **Current Topics in Microbiology and Immunology**, v. 322, 207–228, 2008.

PANTANELLA, F. *et al.* Analytical techniques to study microbial biofilm on abiotic surfaces: pros and cons of the main techniques currently in use. *Ann Ig.*v.25, n.1, p.31-42, 2013.

PARK, M.; BAE, J.; LEE D. S. Antibacterial activity of [10]-gingerol and [12]- gingerol isolated from ginger rhizome against periodontal bacteria. *Phytother Res.* 2008 Nov;22(11):1446-9.

PUENGPHEAN, C.; SIRICHOTE, A. [6]-gingerol content and bioactive properties of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) extracts from supercritical CO<sub>2</sub> extraction. **Asian Journal Food Agro-Industry**, v. 1, n. 1, p. 29-36, 2008.

RAMAKRISHNAN, Y., *et al.* Biofilms in chronic rhinosinusitis: What is new and where next?. **The Journal of Laryngology & Otology**, v. 129, n. 8, p. 744-751, 2015.

RANI, G. N.; RADHIKA, B.; Narasinga, R. B. Antimicrobial Activity of Honey with Special Reference to Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and Methicillin Sensitive *Staphylococcus aureus* (MSSA). **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. v. 11, n. 8, p. DC05-DC08, 2017.

REDDY, M.; MOODLEY, R.; JONNALAGADDA, S. B. Fatty acid profile and elemental content of avocado (*Persea americana* Mill.) oil –effect of extraction methods. **J. Environ. Sci. Health, Part B**, v. 47, n. 6, p. 529-537, 2012.

RICARDO, S. B. Emergência de *Staphylococcus aureus* metilina-resistente (MRSA) na comunidade. **Prática Hospitalar**, v. 34, p. 131-134, 2004.

RICHTER, K. *et al.* Innovative approaches to treat *Staphylococcus aureus* biofilm-related infections. **Essays In Biochemistry**, v. 61, n. 1, p. 61-70, 2017.

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

RODRIGUES, M. L.; LIRA, R. K. Perfil fitoquímico e biológico do extrato hidroalcoolicos dos rizomas do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). **Sabios Revista Saúde e Biologia**, v.8, n.1, p.44-52, 2013.

SEMWAL, R. B. *et al.* Gingerols and shogaols: Important nutraceutical principles from ginger. **Phytochemistry**, v. 117, n. 1, p. 554-568, 2015.

SANTOS, A. L. *et al.* *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. v. 43, n. 6, p. 413-423, 2007.

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

SERRANO, A. B. *et al.* Comparative assessment of three extraction procedures for determination of emerging *Fusarium* mycotoxins in pasta by LC-MS/MS. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 105-114, 2013.

Shutterstock, banco de imagens, fotos e vetores livres de direitos. Disponível em: <https://www.shutterstock.com/search?searchterm=zingiber+officinale>. Acesso em: 24 set. 2017.

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**. v.115, n.8, p.891-899, 2007.

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

SIMÕES, M.; SIMÕES, L. C.; VIEIRA, M. J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT – Food Science and Technology**, v. 43, p. 573-583, 2010.

STEVEN. Disponível em: < <http://www.stevenfoster.com/education/monograph/ginger.html> >. Acesso em: 09/ 10/2017.

TEGOS G. *et al.* Multidrug pump inhibitors uncover remarkable activity of plant antimicrobials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 46, n. 10, p. 3133-3141, 2002.

VILLALVILLA, A. *et al.* 6-Shogaol inhibits chondrocytes' innate immune responses and cathepsin-K activity. **Molecular Nutrition Food Research**, v.58, n. 2, p. 256-266, 2014.

WANG, Z. *et al.* Gingerol Derivatives from the Rhizomes of *Zingiber officinale*. **Z. Naturforsch.**, v. 66 p.740-744, 2011.

WANG, H. M. *et al.* *Zingiber officinale* (Ginger) Compounds Have Tetracycline-resistance Modifying Effects Against Clinical Extensively Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **Phytotherapy Research.**, v. 24, n. 1, p. 1825-1830, 2010.

Wikispecies, *Zingiber officinale*. Disponível em: [https://species.wikimedia.org/wiki/Zingiber\\_officinale](https://species.wikimedia.org/wiki/Zingiber_officinale). Acesso em: 24 set. 2017.

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

XIE, W. Characterization of Lipases from *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* Isolated from Human Facial Sebaceous Skin. **Journal Microbiology Biotechnology** , v. 22, n. 1, p. 84–91,2012.

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