



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**  
**PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM**  
**BIOTECNOLOGIA**

**“Processo de obtenção e avaliação do potencial analgésico, anti-inflamatório, toxicidade pré-clínica de zerumbona obtido dos rizomas de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith (Zingiberaceae).”**

**CARLOS CLEOMIR DE SOUZA PINHEIRO**

**Manaus-AM**  
**(2009)**

**CARLOS CLEOMIR DE SOUZA PINHEIRO**

**“Processo de obtenção e avaliação do potencial analgésico, anti-inflamatório, toxicidade pré-clínica de zerumbona obtido dos rizomas de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith (Zingiberaceae).”**

**Tese apresentada à Universidade Federal do Amazonas, UFAM - Curso de Pós-Graduação Multi-institucional em Biotecnologia, para obtenção do grau de Doutorem Biotecnologia.**

**Orientadora:** Prof<sup>ª</sup>. Dra. Cecília Verônica Nunez

**Manaus-AM  
(2009)**

## FICHA CATALOGRÁFICA

PINHEIRO, CARLOS CLEOMIR DE SOUZA

**“Processo de obtenção e avaliação do potencial analgésico, anti-inflamatório, toxicidade pré-clínica de zerumbona obtido dos rizomas de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith (Zingiberaceae)” / Carlos Cleomir de Souza Pinheiro. Manaus-AM, 2009.**

**xiv, 119p.**

Tese (Doutorado) - Universidade Federal do Amazonas - UFAM. Curso de Pós-Graduação multi-Institucional em Biotecnologia

**“Process of attainment and analgesic, antiinflammatory potential and toxicity pro-clinic of zerumbone gotten of *Zingiber zerumbet* (L.) Smith, (Zingiberaceae)**

### **Sinopse:**

São apresentados os resultados do processo de obtenção, potencial analgésico, anti-inflamatório e toxicidade pré-clínica de zerumbona, método de recristalização com grau de pureza de 99,95%. Os estudos farmacológicos da Zerumbona e dos extratos diclorometânico (DCM) e metanólicos (MeOH), obtidos dos rizomas de *Z. zerumbet* não mostraram efeitos tóxicos por via oral em dose de 5g/Kg e ainda apresentou potente atividade analgésica, anti-inflamatória e baixa toxicidade em experimentação animal por via oral e intraperitoneal *in vivo* e *in vitro* em doses dependente em modelos de dor e nas atividades antiedematogênica no modelo de edema de pataem camundongos e ratos.

**CARLOS CLEOMIR DE SOUZA PINHEIRO**

**“Processo de obtenção e avaliação do potencial analgésico, anti-inflamatório, toxicidade pré-clínica de zerumbona obtido dos rizomas de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith (Zingiberaceae).”**

**Projeto apresentado à Universidade Federal do Amazonas, UFAM - Curso de Pós-Graduação Multi-institucional em Biotecnologia, para obtenção do grau de Doutorem Biotecnologia.**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Área de concentração: SAÚDE.

Orientador (a): Profa. Dra. Cecília Verônica Nunez (Orientadora) - INPA

Aprovada em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

Banca Examinadora

Prof (a) Dr (a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof (a) Dr (a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof (a) Dr (a): \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

*Aos meus pais “in memoriam”, lembranças.  
À minha família, carinho e gratidão pelo  
apoio, incentivo e compreensão durante esta  
caminhada.*

*Aos meus irmãos, em particular, Eunete  
Pinheiro Santana pelo apoio e incentivo  
durante a realização desta.*

## **AGRADECIMENTOS**

Á Deus por minha vida e saúde.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA e a Universidade do Federal do Amazonas - UFAM pelo apoio concedido na realização desta.

Aos professores do Curso de Biotecnologia da Universidade do Federal do Amazonas - UFAM, pelos incentivos e ensinamentos que contribuíram para a minha formação.

Aos servidores, alunos de PIBIC e voluntários da Coordenação de Pesquisas em Produtos Naturais CPPN/INPA, em especial a Orlando Libório Pereira Júnior, Ananias Soares da Silva, Rubens Bessa de Moura, Ana de Souza Lima, Júlio Nino de Souza Neto, Gabrielly Galdino Conrado, Danielle Rachel Silva dos Santos, Jaqueline de Oliveira Souza, que direta ou indiretamente contribuíram para que fosse possível percorrermos este caminho.

Aos pesquisadores e técnicos do biotério do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia-INPA, em especial a Sra. Risonilce Fernandes Silva de Souza da Coordenação de Ciências da Saúde - CPCS pelo apoio prestado durante a realização das pesquisas laboratoriais.

À minha amiga e colaboradora Helita da Conceição Cardoso pela disponibilidade para ajudar na digitalização, organização e estruturação da estruturação deste trabalho.

Ao Gláucio Belém da Silva, da Coordenação de Pesquisas em Botânica CPBO/INPA, pela presteza.

Aos fotógrafos do INPA, Felipe França Moraes e Jorge Saldanha, pelo apoio.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>ZZ</b>	= <i>Zingiber zerumbet</i> L. Smith
<b>ZER</b>	= Zerumbona
<b>INPA</b>	= Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
<b>UFAM</b>	= Universidade Federal do Amazonas
<b>CIM</b>	= Concentração inibitória mínima
<b>CI50</b>	= Concentração máxima inibitória
<b>CL50</b>	= Concentração Letal Média
<b>DP</b>	= Desvio Padrão
<b>DL50</b>	= Dose letal média
<b>DP</b>	= Desvio Padrão
<i>p.o</i>	= por via Oral

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>Introdução .....</b>	<b>1</b>
1.1	Aspectos gerais.....	2
<b>2</b>	<b>Objetivos .....</b>	<b>5</b>
2.1	Geral .....	6
2.2	Específicos .....	6
<b>3</b>	<b>Revisão da Literatura .....</b>	<b>7</b>
..		
3.1	Aspectos Geográficos da família Zingiberaceae e do gênero <i>Zingiber</i> .....	8
3.2	Classificações botânica e gerais da família Zingiberaceae .....	9
3.3	A Planta .....	10
3.3.1	Caule subterrâneo (rizoma) de <i>Zingiber zerumbet</i> .....	12
3.3.2	Aspecto químico e farmacológico de <i>Zingiber zerumbet</i> (L.) Smith .	13
3.4	Interações da planta e produção de metabólitos secundários .....	21
3.5	Prospecção Tecnológica do Potencial Químico e Medicinal de <i>Zingiberzerumbet</i> e da zerumbona .....	24
3.6	Patentes Publicadas da Zerumbona .....	26
<b>4</b>	<b>Material e Métodos .....</b>	<b>32</b>
4.1	Parte Experimental .....	33
4.1.1	Obtenção do <i>Zingiber zerumbet</i> (L.) Smith .....	33
4.1.2	Técnicas de utilizadas nas extrações de óleos essenciais de <i>Zingiber zerumbet</i> .....	34
4.2	Perfil Físico-Químico dos Óleos Essenciais dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i> .....	37
4.3	Verificação do grau de pureza das substâncias .....	39
4.3.1	Especificação dos equipamentos utilizados na identificação estrutural dos cristais obtidos dos óleos essenciais dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i> : Solventes Reagentes e Materiais Cromatográficos .....	39
4.4	Parte Farmacológica .....	40



4.4.1	Testes de Atividade Analgésica, Anti-inflamatória e análise pré-clínica (toxicidade aguda dose simples e dose repetida) de Zerumbona obtida de <i>Zingiber zerumbet</i> (L.) Smith .....	40
4.4.2	Teste de Atividade analgésica do composto sesquiterpênico zerumbona (ZER) obtida dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i> .....	41
4.5	Teste da placa quente .....	42
4.5.1	Modelo de medida da Hiperalgisia utilizando o aparelho analgesímetro .....	43
4.5.2	Atividade antiedematogênica; Edema de Pata Induzido por Carragenina .....	44
4.6	Edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	45
4.6.1	Testes gerais de atividade farmacológica e toxicidade aguda de zerumbona (ZER) e extratos obtidos dos óleos essenciais de <i>Zingiber zerumbet</i> (L.) Smith .....	46
4.7	Análise pré-clínica em animais de laboratório .....	47
4.8	Teste de toxicidade aguda doses: repetidas ou subcrônica .....	48
4.9	Teste de toxicidade geral: <i>Artemia salina</i> .....	49
4.9.1	Análises estatísticas dos experimentos .....	50
<b>5</b>	<b>Resultados e Discussão .....</b>	<b>51</b>
5.1	Obtenção dos óleos essenciais .....	52
5.1.1	Processo de Extração e Rendimentos de Óleos Essenciais dos Rizomas de <i>Zingiber zerumbet</i> (L.) Smith .....	52
5.1.2	Teores da substância zerumbona dos óleos essenciais de <i>Z. zerumbet</i> .....	53
5.2	Determinação estrutural dos cristais recristalizados obtido dos óleos essenciais dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i> (L.) Smith .....	68
5.2.1	Teste da atividade da atividade antinociceptiva da substância zerumbona (ZER) nas contorções abdominais, induzidas pelo ácido acético em Camundongo .....	71
5.2.2	Teste de atividade analgésica de zerumbona (ZER), por estímulo químico do formol .....	75
5.2.3	Atividade analgésica de zerumbona (ZER), induzida pela dor da capsaicina .....	77

5.2.4	Atividade analgésica de zerumbona (ZER) no estímulo da placa quente (PQ) .....	78
5.2.5	Modelo de medida do efeito analgésico da substância ZER na hiperalgesia causado por estímulo mecânico (analgesímetro) .....	82
5.3	Resultados e Discussões dos efeitos analgésico e anti-inflamatório da substância zerumbona (ZER) .....	84
5.3.1	Modelos de determinação da atividade antiinflamatória da substância zerumbona (ZER) .....	86
5.3.2	Edema de orelha induzido por óleo de cróton .....	88
5.3.3	Modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico .....	90
5.4	Efeito da substância zerumbona (ZER) na potenciação do sono induzido por barbitúrico .....	91
5.4.1	Efeitos gerais de ZER e DCM e MeOH de <i>Z. zerumbet</i> (rizomas) via intraperitoneal (i.p) em camundongos e ratos .....	92
5.4.2	Teste geral de atividade por via oral (v.o) em ratos e camundongos de Zerumbona (ZER), extrato diclorometânico (DCM) e metanólico (MeOH), dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i> .....	97
5.4.3	Estudo toxicológico agudo .....	99
5.5	Toxicidade subcrônica do composto zerumbona (ZER) obtido dos óleos essenciais de <i>Z. zerumbet</i> .....	104
5.5.1	Análises estatísticas dos resultados .....	107
<b>6.</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>108</b>
<b>7.</b>	<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>111</b>



## LISTA DE FIGURAS

1	Mapa da distribuição geográfica de <i>Z. zerumbet</i> Smith .....	8
2	Classificações botânica e gerais da família Zingiberaceae .....	9
3	Perfil da <i>Z. zerumbet</i> cultivada em Manaus-AM, 2004 .....	11
4	Rizomas de <i>Z. zerumbet</i> cultivado em Manaus-AM, 2008 .....	12
5(a)	Principais componentes químicos de <i>Z. zerumbet</i> de origem européia .....	14
5(b)	Substâncias identificadas dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i> Smith .....	15
5(c)	Constituintes flavonóides isolados dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i> Smith .....	16
6	Proposta de interação biossintética para compor o sesquiterpênico Zerumbona ..	23
7	Autores que publicaram artigos sobre zerumbona .....	26
8	Distribuição das patentes do produto zerumbona por ano, segundo a base de dados “Derwent Innovations Index” .....	26
9	Distribuição das patentes por área, segundo base de dados da fonte .....	27
10	Origem das Patentes - distribuição por área, segundo base de dados da fonte ...	27
11	Distribuição das patentes por país de depósito, segundo base de dados da fonte	28
12	Tipos de documentos usados para as publicações das patentes da zerumbona ..	28
13	Índices anuais dos maiores números das publicações da <i>Z. zerumbet</i> .....	29
14	Revistas e Jornais que publicaram as patentes da <i>Z. zerumbet</i> .....	29
15	Países que mais publicaram patentes de zerumbona .....	30
16	Áreas de estudos que a zerumbona foi publicada .....	30
17	Instituições que mais publicaram as patentes de zerumbona .....	31
18	Exsicata de <i>Z. zerumbet</i> (L.) Smith .....	33
19	Extrator de óleo essencial por arraste-vapor utilizado na obtenção do óleo essencial de <i>Z. zerumbet</i> Smith .....	35
20	Hidrodestilador acoplado ao refrigerador circulador de água .....	35
21	Processo de obtenção dos extratos DCM e MeOH de <i>Z. zerumbet</i> .....	36
22	Aparelho HOT PLAT utilizado no modelo experimental de atividade analgésica ..	42

23	Aparelho Analgesímetro Digital utilizado no modelo experimental de hiperalgesia em ratos e camundongos .....	44
24	Aparelho Plestimómetro Digital utilizado no modelo experimental para medir o processo inflamatório em edema de pata de ratos e camundongos .....	45
25	Processo de medição de edema de patas de ratos e camundongos. ....	45
26	Aquário adaptado a medir a atividade exploratória de animais a nível campo aberto .....	46
27	Aquário adaptado a medir a atividade de toxicidade aguda em camundongos e ratos .....	48
28	Materiais utilizados nos ensaios para a atividade citotóxica em <i>Artemia salina</i> ....	49
29	Óleo essencial obtido por arraste a vapor dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i> de Manaus-AM .....	53
30(a)	Cromatograma líquido (CLAE) da zerumbona e dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i> por amostras .....	54
30(b)	Espectro de absorvância obtido na região do ultravioleta (UV) dos cristais da zerumbona .....	55
31	O cromatograma apresenta tempo de retenção e percentual dos cristais obtidos do óleo essencial de <i>Z. zerumbet</i> .....	56
32	Cromatograma a gás e percentual dos cristais obtidos do óleo essenciais de <i>Z. zerumbet</i> por hidrodestilação .....	57
33	Processo de extração por Hidrodestilação: O cromatograma apresenta tempo de retenção e percentual dos cristais obtidos do óleo essencial de <i>Z. zerumbet</i> .....	58
34	Processo de extração por solvente (DCM) - Espectro de absorvância obtido na região do ultravioleta (UV) dos cristais obtido por extração dos óleos essenciais de <i>Z. zerumbet</i> .....	59
35	Espectro de absorvância na região do ultravioleta (UV) dos cristais obtido por DCM dos óleos essenciais de <i>Z. zerumbet</i> .....	59
36	Cromatografia a gás dos cristais obtidos do óleo dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i> .....	60
37	Espectro de fragmentação de massas (EM) da substância recristalizada dos óleos essenciais .....	61
38	Espectro na região do infravermelho (IV) da Zerumbona obtida dos cristais do óleo essencial .....	62
39	Comparativo de patentes e rendimento da <i>Z. zerumbet</i> (L.) Smith .....	63
40(a)	Cromatografia em camada delgada dos cristais e extratos diclorometânico (DCM), metanólico (MeOH) obtidos dos óleos essenciais de <i>Z. zerumbet</i> .....	64

40(b)	Cromatografia dos cristais e extratos diclorometânico (DCM), metanólico (MeOH) obtidos dos óleos essenciais de <i>Z. zerumbet</i> .....	65
40(c)	Cromatografia em camada fina de sílica gel do composto recristalizado da zerumbona, óleos essenciais dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i> .....	66
40(d)	Cromatografia em camada fina de sílica gel do composto recristalizado da zerumbona, óleos essenciais dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i> .....	67
41	Espectro RMN de <sup>1</sup> H dos cristais obtidos dos óleos essenciais dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i> (500 m/z CdCl <sub>3</sub> ) .....	69
42	Espectro de COSY - <sup>1</sup> H <sup>1</sup> H acoplado dos cristais obtidos dos óleos essenciais de <i>Z. zerumbet</i> (D Cl <sub>3</sub> , 500 m/z) .....	70
43	Percentual de inibição por i.p., obtida no teste de contorção induzida por ácido acético e expressa durante 3 horas. Os símbolos e linhas indicam as médias ± erro padrão das médias do tempo (minutos) de reatividade ao estímulo térmico. *indica diferença significativa em relação ao controle (p<0,05) .....	72
44	Percentual de inibição por v.o., obtida no teste de contorção induzida por ácido acético e expressa durante 3 horas. Os símbolos e linhas indicam as médias ± erro padrão das médias do tempo (minutos) de reatividade ao estímulo térmico. *indica diferença significativa em relação ao controle (p<0,05) .....	73
45	Efeito do produto Zerumbona 50 mg/Kg v.o., 1 hora no número de contorções induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos. Os símbolos e linhas indicam as médias ± erro padrão das médias do tempo (minutos) de reatividade ao estímulo térmico. *indica diferença significativa em relação ao controle (p<0,05)	73
46	Efeito da substancia ZER 50 mg/Kg v.o, 1 hora no modelo de dor induzido por formalina 2,5% (primeira fase) em camundongos. Os símbolos e linhas indicam as médias ± erro padrão das médias do tempo (minutos) de reatividade ao estímulo térmico .....	75
47	Efeito do produto Zerumbona 50 mg/Kg v.o 2 h no modelo de dor induzida por formalina 2,5% (segunda fase) em camundongos. Os símbolos e linhas indicam as médias ± erro padrão das médias do tempo (segundos) de reatividade ao estímulo térmico .....	76
48	Efeito do Produto ZER 50 mg/Kg v.o., 1 h no modelo de dor induzido por capsaicina 1,6 µg/pata em camundongos. Os símbolos e barras verticais representam as médias ± erro padrão de n=10 animais do tempo (segundos) de reatividade ao estímulo térmico .....	77
49	Teste da placa quente por via oral (v.o). Os símbolos e linhas indicam as médias ± erro padrão das médias do tempo (minutos) de reatividade ao estímulo térmico. *indica diferença significativa em relação ao controle (p<0,05) .....	80

50	Efeitos da administração da substância ZER (150-500 mg/Kg, i.p, fentanest 20 µg/kg, i.p. ou salina (basal), em camundongos expostos a um estímulo termoceptivo em modelo da placa quente. Os símbolos e linhas indicam as médias ± erro padrão das médias do tempo (minutos) de reatividade ao estímulo térmico. *indica diferença significativa em relação ao controle (p<0,05) .....	80
51(a)	Efeitos da administração do composto zerumbona (150 a 1500 mg/Kg, i.p.), fentanest 20 µg/kg, i.p. ou salina (basal), em camundongos expostos a um estímulo mecânico de 50 Watts. Os símbolos e linhas indicam as médias ± erro padrão das médias do tempo (minutos) de reatividade ao estímulo térmico. *indica diferença significativa em relação ao controle (p<0,05) .....	83
51(b)	Efeitos da administração do composto zerumbona (150 a 1500 mg/Kg, v.o.), fentanest 20 µg/kg, i.p. ou salina (basal), em camundongos expostos a um estímulo mecânico de 50 Watts. Os símbolos e linhas indicam as médias ± erro padrão das médias do tempo (minutos) de reatividade ao estímulo térmico. *indica diferença significativa em relação ao controle (p<0,05) .....	83
52	Efeitos da administração v.o. de zerumbona (500-500 mg/kg), indometacina (Indom, 25 mg/kg) ou salina (controle) em ratos injetados com carragenina 1% (s.c.) na pata traseira esquerda e salina na direita. Os símbolos e linhas indicam as médias ± erro padrão das diferenças de volumes entre as patas direita e esquerda de cada animal. *indica diferença significativa em relação ao controle (p < 0,05) .....	87
53	Efeitos da administração i.p. de zerumbona (150-500 mg/kg), indometacina (Indom, 25 mg/kg) ou salina (controle) em ratos injetados com carragenina 2% (s.c.) na pata traseira esquerda e salina na direita. Os símbolos e linhas indicam as médias ± erro padrão das diferenças de volumes entre as patas direita e esquerda de cada animal *indica diferença significativa em relação ao controle (p<0,05) .....	87
54	Efeitos da administração v.o de zerumbona (50mg/kg), em ratos injetados com carragenina 300µ/pata (s.c.) na pata traseira esquerda e salina na direita. Os símbolos e linhas indicam as médias ±erro padrão das diferenças de volumes entre as patas direita e esquerda de cada animal. *indica diferença significativa em relação ao controle (p < 0,05) .....	88
55(a)	Efeito do produto zerumbona creme 1% (30 minutos) no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton 1mg/orelha (6horas) em camundongos .....	89
55(b)	Efeito do produto zerumbona creme 3% (30 minutos) no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton 1mg/orelha (6 horas) em camundongos .....	89
56(a)	Efeito da substância ZER creme 1% (30 minutos) no modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico 2 mg/orelha (1 hora) em camundongos	90
56(b)	Efeito do produto Zerumbona creme 3% (30 minutos) no modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico 2 mg/orelha (1 hora) em camundongos	90

57	Efeito de zerumbona por v.o, obtida dos óleos essenciais dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i> Smith (150-1500 mg/kg), no tempo de indução do sono barbitúrico (T.I). Os símbolos e linhas indicam as médias $\pm$ erro padrão das diferenças de volumes entre as patas direita e esquerda de cada animal. *indica diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ) .....	91
58	Efeito da substância ZER obtido dos óleos essenciais de <i>Z. zerumbet</i> (150-500 mg/kg) via intraperitoneal no tempo de indução (T.I) e o tempo de recuperação do sono (T.R), induzido em camundongos pela injeção de pentobarbital. As colunas e barras representam as medias $\pm$ erro padrão das médias de 10 animais. **indica diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,005$ )	92
59	Percentual de mortalidade via intraperitoneal em camundongo do composto Zerumbona (ZER) obtidos dos óleos essenciais dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i> .....	103

#### LISTA DE QUADRO

1	Espécies do gênero <i>Zingiber</i> estudadas quimicamente e os principais metabólitos secundários .....	17
---	---	----



## LISTA DE TABELAS

1	Métodos de obtenção dos óleos essenciais de <i>Z. zerumbet</i> (L.) Smith.....	53
2	Tempo de retenção e percentual de área do cromatograma dos cristais obtidos por arraste a vapor do óleo essencial de <i>Z. zerumbet</i> .....	54
3	Tempo de retenção no cromatograma a gás e percentual de área do cromatograma dos cristais obtidos do óleo essencial de <i>Z. zerumbet</i> .....	55
4	Tempo de retenção e percentual de área do cromatograma dos cristais obtidos hidrodestilação do óleo essencial dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i> .....	56
5	Tempo de retenção no cromatograma a gás e percentual da zerumbona do óleo essencial obtido por hidrodestilação dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i> .....	57
6	Tempo de retenção e percentual de área do cromatograma de cristais de <i>Z. zerumbet</i> obtidos do óleo essencial por extração com DCM .....	58
7	Comparações entre os sinais dos deslocamentos químicos obtidos de dados espectroscópicos de RMN de <sup>13</sup> C e de <sup>1</sup> H da literatura e de zerumbona obtida do óleo essencial dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i> (L.) .....	68
8	Efeito da substância ZER nas doses de 50-1500 mg/kg v.o e fentanest (20 µg/kg i.p) na resposta dor induzidas pelo ácido acético 2% .....	72
9	Efeito da substância ZER no teste da placa quente, em camundongos. Dados expressam média ± EPM; a p < 0,05 em relação ao controle; p < 0,01 em relação ao controle; n = 10 .....	79
10	Percentual dos efeitos antiinflamatório em edema de pata de rato da substância zerumbona (ZER) por via intraperitoneal (i.p) e por via oral (v.o.) .....	86
11(a)	Parâmetros toxicológicos observados, nas doses de 10 - 1000 mg/kg por via intraperitoneal (i.p) em camundongos (CAM) de Zerumbona (ZER), dos extratos diclorometano (DCM) e metanólico (MeOH) de <i>Z. zerumbet</i> .....	93
11(b)	Parâmetros toxicológicos observados, nas doses de 1500; 2500 e 5000 mg/kg via intraperitoneal (i.p) em camundongos de Zerumbona e dos extratos DCM e MeOH dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i> . .....	94
11(c)	Parâmetros toxicológicos observados, nas doses de 10; 100 e 1000 mg/Kg via intraperitoneal (i.p) de Zerumbona (ZER) em <i>Ratus novergicus</i> (ratos) e dos extratos DCM e MeOH dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i> .....	95
11(d)	Parâmetros toxicológicos observados, nas doses de 1500; 2500 e 5000 mg/kg via intraperitoneal (i.p) em <i>Ratus novergicus</i> , de Zerumbona e dos extratos DCM e MeOH de <i>Z. zerumbet</i> .....	96

12	Parâmetros toxicológicos observados, em camundongos nas doses de 1500; 2500 e 5000 mg/kg por via oral (v.o) de Zerumbona (ZER) e dos extratos DCM e MeOH de <i>Z. zerumbet</i> .....	98
13	Parâmetros toxicológicos observados, em <i>Ratus norvegicus</i> (ratos) nas doses de 1500, 2500 e 5000 mg/kg por via oral (v.o) de Zerumbona (ZER) e dos extratos DCM e MeOH de <i>Z. zerumbet</i> .....	99
14	Prova de toxicidade aguda via intraperitoneal (i.p) em camundongo de Zerumbona(ZER) e dos extratos DCM e MeOH dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i> ...	100
15	Toxicidade aguda (DL <sub>50</sub> ) via intraperitoneal em camundongos dose simples de Zerumbona (ZER) e dos extratos DCM e MeOH obtidos dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i> (L.) Smith cultivada em Manaus/AM .....	101
16	Toxicidade Aguda DL <sub>50</sub> via intraperitoneal em camundongos de Zerumbona (ZER) DCM e MeOH dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i> .....	102
17	Variação de toxicidade aguda (DL <sub>50</sub> ) via intraperitoneal .....	103
18	Efeito da Administração oral de zerumbona (ZER) obtido dos óleos essenciais dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i> Smith (500 e 1000 mgKg) .....	104
19	Efeito da Administração oral de zerumbona (ZER) obtido dos óleos essenciais dos rizomas de <i>Z. zerumbet</i> Smith (500 e 1000 mgKg) .....	105
20	Efeito da administração oral de zerumbona (ZER) em doses de 500 e 1000 mg/Kg 1 vez ao dia por 30 dias sobre o consumo de água em ratos .....	105
21	Efeito da administração oral de zerumbona em doses de 500 e 1000 mg/Kg 1 vez ao dia por 30 dias sobre os parâmetros hematológicos em ratos .....	106
22	Efeito da administração oral do veiculo (controle) do composto sesquiterpenico zerumbona (500 e 100 mgKg 1 vez ao dia por 30 dias) sobre os parâmetros bioquímicos em ratos .....	106
23	Efeito da administração oral do veiculo (controle) do composto sesquiterpenico zerumbona (500 e 100 mg Kg 1 vez ao dia por 30 dias) sobre os pesos relativos de órgãos internos, em ratos .....	107

**“PROCESSO DE OBTENÇÃO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANALGÉSICO, ANTIINFLAMATÓRIO E TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE ZERUMBONA OBTIDA DE *ZINGIBER ZERUMBET* (L.) SMITH (ZINGIBERACEAE).”**

**RESUMO**

A substância zerumbona é o principal sesquiterpeno obtido dos óleos essenciais dos rizomas de *Zingiber zerumbet* (L) Smith, vem sendo estudado há décadas, por apresentar potente atividade citotóxica contra células tumorais de câncer de fígado, cólon e pele. A planta é rica em terpenos e flavonóides glicosilados que apresentam atividades farmacológicas, destacando-se a potente atividade contra células neoplásicas de câncer e antiviróticas para os vírus EBV do Herpes e HIV. A presente tese diz respeito ao aperfeiçoamento do processo de obtenção e o estudo pré-clínico e toxicológicos do composto zerumbona (ZER). O *screening* fitoquímico dos extratos foi através da metodologia de Mattos (1997). A Cromatografia de camada delgada (CCD) em sílica gel utilizando como reveladores o iodo, sulfato sérico e UV 254nm e 365nm. As frações e extratos obtidos foram caracterizados com relação ao rendimento e o teor do composto sesquiterpeno por espectrofotometria de absorvância UV-visível, Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), por cromatografia gasosa e identificada por RMN de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C. Para o estudo pré-clínico dos extratos e ZER, foram utilizados camundongos e ratos, aprovado pelo Conselho de Ética em Experimentação Animal - CEUA/INPA. Os testes de toxicidade aguda e subaguda dos extratos e ZER foram avaliados durante 14 e 30 dias. Para o estudo da atividade antinociceptiva de extratos e ZER foram utilizados os métodos químicos e mecânicos, através dos testes de contorção abdominal. A atividade anti-inflamatória da atividade antinociceptiva foram avaliadas pelos métodos de edema de orelha e pata de induzida por capsaicina, óleo de cróton, ácido acético, teste de placa quente. Para o teste de citotoxicidade de ZER foram realizados utilizando-se os testes com *Artemia salina* segundo Meyer (1982). Os resultados obtidos com os óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor foi o que forneceu menor percentual de rendimento, mas com elevado grau de pureza (99,95%), superior ao método anterior (97%), postulado na patente de número P10505343-9/28/11/2007. O *screening* fitoquímico dos extratos DCM, MEOH e ZER revelou a presença dos seguintes compostos: terpenóides, xantonas, flavonóides, fenóis, taninos e alcalóides. Na CCD do EM e DCM indicou uma mancha revelada no iodo e sulfato sérico com o fator de retenção de aproximadamente 0,7cm semelhante ao da Zerumbona (0,8) e MEOH apresentaram manchas reveladas em iodo e UV 254nm. Nos testes farmacológicos específicos e toxicidade pré-clínica de toxicidade aguda e subcrônica em camundongos e ratos, pode-se afirmar que os extratos e a ZER nas doses superiores a 5g/kg não provocaram mortalidade dos animais e não apresentaram efeitos tóxicos p.o. Nos ensaios de avaliação da atividade analgésica da zerumbona (ZER) verificou-se potente efeito analgésico em modelos químicos e térmicos de dor em camundongos (*Mus músculo*). A ZER, administrada por via oral e intraperitonal, produziu atividade analgésica significativa e dependente da dose contra os modelos da dor, como nos testes do ácido acético, formalina e capsaicina. Além disso, a ZER aumentou significativamente a latência dos animais no modelo de dor no teste da placa-quente (49-54°C) e por estímulo mecânico da dor aplicado (analgesímetro). Os resultados dos efeitos da atividade anti-inflamatória da substância zerumbona em modelo do processo inflamatório edematogênico (carragenina, óleo cróton e ácido araquidônico), produziu efeitos anti-inflamatórios significativos e dependentes da dose na inibição da resposta inflamatória da carragenina no edema de pata de rato. Nos modelos da atividade anti-edematogênica de ZER na inibição da resposta inflamatória, na aplicação tópica de óleo de cróton e ácido araquidônico em edema de orelha de rato, mostraram efeitos expressivos, mas que precisam ser avaliadas com doses superiores à testada. Os efeitos da substância zerumbona sobre o sono barbitúrico, utilizando o pentobarbital sódico (nembutal), mostraram que a ZER alterou o tempo de indução (T.I) do sono barbitúrico no tempo de recuperação (T.R) em  $\pm$  600 minutos. Na avaliação e caracterização da toxicidade aguda e subcrônica da zerumbona, revelou que a substância não possui efeitos tóxicos por via oral em doses de até 5g/kg de peso durante 30 dias. Nas medidas bioquímicas e de células hematócritas do sangue de rato, os efeitos tóxicos de doses-repetidas (subcrônicas) de ZER a 1000 mg/kg durante 30 dias em ratos, os valores máximos não foram alterados. Nos ensaios *in vitro* de citotoxicidade a zerumbona produziu a mortalidade para a *Artemia salina* de CL<sub>50</sub> - 45 µg/mL, mostrando uma correlação positiva entre atividades antitumoral, anti-inflamatória. Os resultados mostraram que a ZER, apresentou potente efeito antinociceptivo, anti-inflamatório, e não apresentou toxicidade em animais de laboratório por via oral introduzindo um produto biotecnológico diferenciado no mercado e contribuindo para os estudos científicos desta valiosa planta medicinal.

**Palavras-chave:** 1. *Z. zerumbet*, Zerumbona 2. processo de obtenção 3. estudo pré-clínico 4. Analgésico 6. Anti-inflamatório

"PROCESS OF OBTAINING AND EVALUATING THE ANALGESIC POTENTIAL, ANTIINFLAMMATORY AND PRE-CLINICAL TOXICITY OF ZERUMBONE OBTAINED FROM ZINGIBER ZERUMBET (L.) SMITH (ZINGIBERACEAE)."

## ABSTRACT

Zerumbone is the main sesquiterpene extracted from the essential oils of the rhizomes of *Zingiber zerumbet* (L.) Smith, which is being studied for decades on account of its antiinflammatory, antisparmodic and cytotoxic analgesic activity against liver, colon and skin cancer tumor cells. The plant is rich in terpenes and glycosylated flavonoides that present pharmacological activities, highlighting its potent activity against cancer neoplastic and Herpes and HIV EBV virus antiviral cells. The present thesis relates to the improvement of the obtaining process and the preclinical study of the zerumbone compound (ZER). **Thin layer chromatography (TLC) on silica gel using iodine, serum sulfate and UV 254nm and 365nm as developers.**Essencial oils extracted by hydrodistillation, steam drag, dicloromethane (DCM) and metanol (MeOH) extracts were assessed and the DCM extract showed to bear the highest, but less pure yield. The obtained extracts were characterized with respect to the sesquiterpene compound yield and content by UV-Visible Absorption Spectrophotometry, High Performance Liquid Chromatography (HPLC), gas chromatography and identified by <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR.. The extracts' phytochemical tests were performed by Mattos (1997) methodology. Mice and rats were used for the preclinical study. For the use of pharmacological animals in vivo and in vitro, the present project was submitted to the Animal Use Ethics Committee-CEUA/INPA. The acute toxicity tests being evaluated during 14 and 30 days and cytotoxicity testing were performed using the *Artemia salina* test according to Meyer (1982). The acetic acid-induced abdominal contortion test, hot plate and hyperalgesic test were utilized for the study of antinociceptive activity through the chrotonic and capsaicin oil models.The anti-inflammatory and antinociceptive activity were evaluated by the methods of ear and paw edema induced by capsaicin, croton oil, acetic acid, hot plate test.The results obtained with the essential oils extracted by steam distillation provided the lowest, yet very pure, yield percentage (99.95%) purer than that of the previous method (97%), postulated in the patent number PI0505343 -9/28/11/2007.DCM, MEOH and ZER extracts phytochemical screening findings revealed the presence of the following compounds: terpenoids, xanthones, flavonoids, phenols, tannins and alkaloids. EM and DCM TLC indicated a stain revealed in iodine and ceric sulfate with the retention factor of approximately 0.7 cm similar to that of Zerumbona (0.8) and MEOH showing stains in iodine and UV 254 nm. In specific pharmacological and preclinical acute and subchronic toxicity tests in mice and rats, one may state extracts and ZER at doses greater than 5 g / kg did not cause mortality of the animals and did not present toxic effects p.o. Tests of the assessment of the analgesic activity of zerumbone (ZER) in the doses from 250 to 1000mg/kg, showed a potent analgesic effect on pain thermal and chemical models in mice (*Mus musculo*). ZER administered orally and intraperitoneally produced significant and dose-dependent analgesic activity against the pain, acetic acid, formalin, and capsaicin models. In addition, ZER significantly increased the dormancy of the animals in the hotplate test pain model (49-540C).The results of the effects of the anti-inflammatory activity of zerumbone in a model of the edematogenic inflammatory process (carrageenan, chrotonic oil and arachidonic acid) produced significant dose-dependent antiinflammatory effects in inhibiting the carrageenan inflammatory response in the rat's paw edema. The effects of the zerumbone substance on barbiturate sleep, using sodium pentobarbital (Nembutal), showed that ZER altered the induction time (I.T) of barbiturate sleep at recovery time (RT) in + 600 minutes. In the in vitro cytotoxicity assays Zerumbone produced the mortality for *Artemia salina* of - 45 µg / mL, showing a positive correlation between antitumor, anti - inflammatory activities. Findings show ZER to present potent analgesic, antiinflammatory effects, but no toxicit in the laboratory animals orally, to introduce a differentiated biotechnological product into the market and, to make a valuable contribution to the scientific studies on this rich medicinal plant.

**Keywords:** 1.*Z.zerumbet*, Zerumbone 2.obtainin process 3.preclinical study 4. Analgesic 6. Antiinflammatory.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 ASPECTOS GERAIS

No século XVII, descobriu-se que a casca do salgueiro era tão amarga quanto a de uma árvore do Peru, a quina (*Cinchona magnifolia*, Rubiaceae), cujo extrato era tido como remédio supremo contra a malária. Assim, uma infusão da casca do salgueiro passou a ser usada como medicamento antitérmico pelos europeus. Em 1928, o francês Leurox obteve da casca do salgueiro, uma substância que denominou salicina (ácido salicílico). Anos depois, foi sintetizado o ácido salicílico, precursor do ácido acetilsalicílico, que é consumido em grande escala em todo o mundo, como analgésico e antitérmico (Pelt, 1979).

A capacidade de aliviar a dor, através do uso de plantas ou de preparações à base delas, foi provavelmente a grande vitória da medicina e precede em muito a capacidade de curar. Plantas como meimendo (*Hyokymus albus*, Solanaceae) e papoula (*Papaver somniferum*, Papaveraceae), figuram nas primeiras farmacopéias da Babilônia e da Suméria (Pelt, 1979; Borsato, 2000).

Por suas propriedades terapêuticas ou tóxicas, as plantas adquiriram fundamental importância na medicina popular (Martins et al., 2000). Com o desenvolvimento das ciências naturais e do método científico na medicina, os medicamentos de origem vegetal tornaram-se objeto de análise científica. Esforços têm sido feitos no sentido de melhorar as substâncias naturais aumentando as propriedades desejadas e minimizando seus efeitos colaterais adversos (Schulz et al., 2002). Inúmeros são os registros que mostram a busca incessante, nas plantas medicinais, para a cura ou mesmo alívio de moléstias que têm atingido impiedosamente a humanidade (Carlini, 1995). A procura por novos agentes farmacologicamente ativos, obtidos de plantas tem levado a descoberta de muitas drogas clinicamente ativas. Diversas plantas da flora brasileira são utilizadas na medicina popular, mas muitas delas ainda necessitam de estudos que dêem suporte científico ao seu uso na terapêutica (Souza Brito e Souza Brito, 1993).

A atividade biológica de plantas medicinais usadas na medicina popular com finalidades terapêuticas tem sido investigada. Tais estudos visam a obtenção de substâncias com potencial terapêutico e que possam ser futuramente usadas como protótipos para a síntese de moléculas de interesse medicinal. Essa demanda exige

uma atenção mais acurada dos **organismos** de vigilância oficiais. Por outro lado, o número de laboratórios credenciados para realizar esses ensaios e a disponibilidade de pessoal com conhecimento técnico necessário é bastante reduzido. Isso torna morosa a introdução de novos produtos ou, o que é pior, na maior parte das vezes, serve de justificativa para o lançamento de produtos, **medicamentos**, cosméticos sem os estudos pré-clínicos necessários, usando como argumento a condição de país em desenvolvimento e baseando-se exclusivamente nos resultados de testes realizados em centros de pesquisa do exterior (Wilson, 1994).

As plantas aromáticas, além de fornecedoras de óleos voláteis ou essenciais, são também freqüentemente medicinais e estão presentes no cotidiano das pessoas. Pesquisas indicam que as substâncias voláteis delas extraídas tem tido aumento regular no mercado de produtos naturais, apresentando a média anual de crescimento estimada em 22%, nos setores industriais de perfumaria, aromatizantes, produtos alimentícios, farmacêutica e cosmética, assim como em setores de processamento de óleos essenciais (Verlet, 1992).

Nos últimos anos a biodiversidade ganhou mais importância e passou a ser muito mais valorizada. Observa-se que, quanto maior diversidade **de vida** possui um país, mais e variados produtos podem surgir, principalmente em termos farmacológicos. Com o desenvolvimento da biotecnologia começaram a observar a importância da diversidade de vida para o desenvolvimento dos mais variados produtos e principalmente os farmacológicos. A retirada de nossas riquezas naturais já vem desde o descobrimento, quando então se iniciou a evasão do nosso patrimônio. Por sua vez a crescente demanda por produtos químicos e fármacos, aumentou o interesse sobre a biodiversidade existente nas áreas silvestres pouco ou ainda não exploradas como no caso da Amazônia (Reid et al., 1993).

Plantas aromáticas produtora de óleos essenciais tem utilização maior nas áreas de alimentos (condimentos e aromatizantes de alimentos e bebidas); cosméticos (perfumes e produtos de higiene). Nas farmácias, as drogas vegetais ricas em óleo voláteis são empregadas *in natura* para a preparação de infusões e/ou sob a forma de preparações galênicas simples. Muitos óleos voláteis são utilizados também em função de suas propriedades terapêuticas e para aromatizar medicamentos destinados ao uso oral (Furlan, 1998).

A indústria farmacêutica recentemente retomou o entendimento de que a cura de diversas enfermidades humanas pode estar nos produtos extraídos dos recursos

naturais biológicos das florestas tropicais, o que está fazendo com que suas atenções se voltem então para o nosso país. Segundo várias estatísticas e estudos amplamente divulgados na imprensa em geral, cerca de 30% dos medicamentos existentes foram elaborados com ingredientes ativos extraídos de plantas, devendo ser registrada a relação de 119 substâncias químicas usadas regularmente na medicina em todo o mundo, referidas por Wilson (1994), o que mostra a importância do uso da flora. Dessa forma, a matéria-prima, no caso a diversidade de vida, passou a ter maior valor de mercado e conseqüentemente mais atenção dos países detentores, o que aliado à crescente consciência da valoração da biodiversidade fez com que se buscassem regras para a sua exploração.

Atualmente tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas. Isto pode ser claramente observado pelo aumento de trabalhos publicados nesta área, tanto em congressos como em periódicos nacionais e internacionais, além do surgimento de novos periódicos específicos sobre produtos naturais ativos, como *Phytomedicine*, *Phytochemical Analysis*, *Natural Product Letter* entre outros (Martins et al., 2000).

Com o desenvolvimento de novas técnicas espectroscópicas, os químicos orgânicos têm conseguido elucidar mais rapidamente estruturas moleculares complexas de constituintes naturais, até há pouco tempo difíceis de serem identificados. Constantemente são relatadas na literatura novas moléculas, algumas de relevante ação farmacológica, como por exemplo, o taxol, a forskolina, a artemisinina, etc. Neste contexto é importante mencionar que as plantas, além de seu uso na medicina popular com finalidades terapêuticas, têm contribuído, ao longo dos anos para a obtenção de vários fármacos, até hoje amplamente utilizados na clínica (Martins et al., 2000; Souza Brito, 1993). Como exemplo, podemos citar a morfina, emetina, vincristina, colchicina, rutina, etc (Borsato, 2000).

Há enorme interesse por parte de grandes empresas multinacionais neste setor da indústria, uma vez que elas estão capacitadas tecnologicamente para a nova tendência do mercado. Como exemplo, pode-se citar no Brasil, a Merck, que possui plantações próprias de jaborandi e fava-d'anta, para extração de pilocarpina e rutina, respectivamente, que são comercializadas no mercado externo (Simon, 1993).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

- Avaliar o processo de obtenção e determinar os efeitos farmacológicos de zerumbona obtida de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith (Zingiberaceae).

### 2.2 ESPECÍFICOS

Aprimorar o processo de obtenção e determinação fitoquímica do óleo essencial dos rizomas de *Z. zerumbet*.

Avaliar a citotoxicidade de zerumbona.

Avaliar a toxicidade *in vivo* de zerumbona.

Avaliar o efeito analgésico de zerumbona obtida dos óleos essenciais de *Z. zerumbet* em modelo da dor.

Avaliar a atividade anti-inflamatória do composto zerumbona em modelo de processos inflamatórios.

Examinar os efeitos sobre o sistema nervoso central e periférico de zerumbona em camundongos.

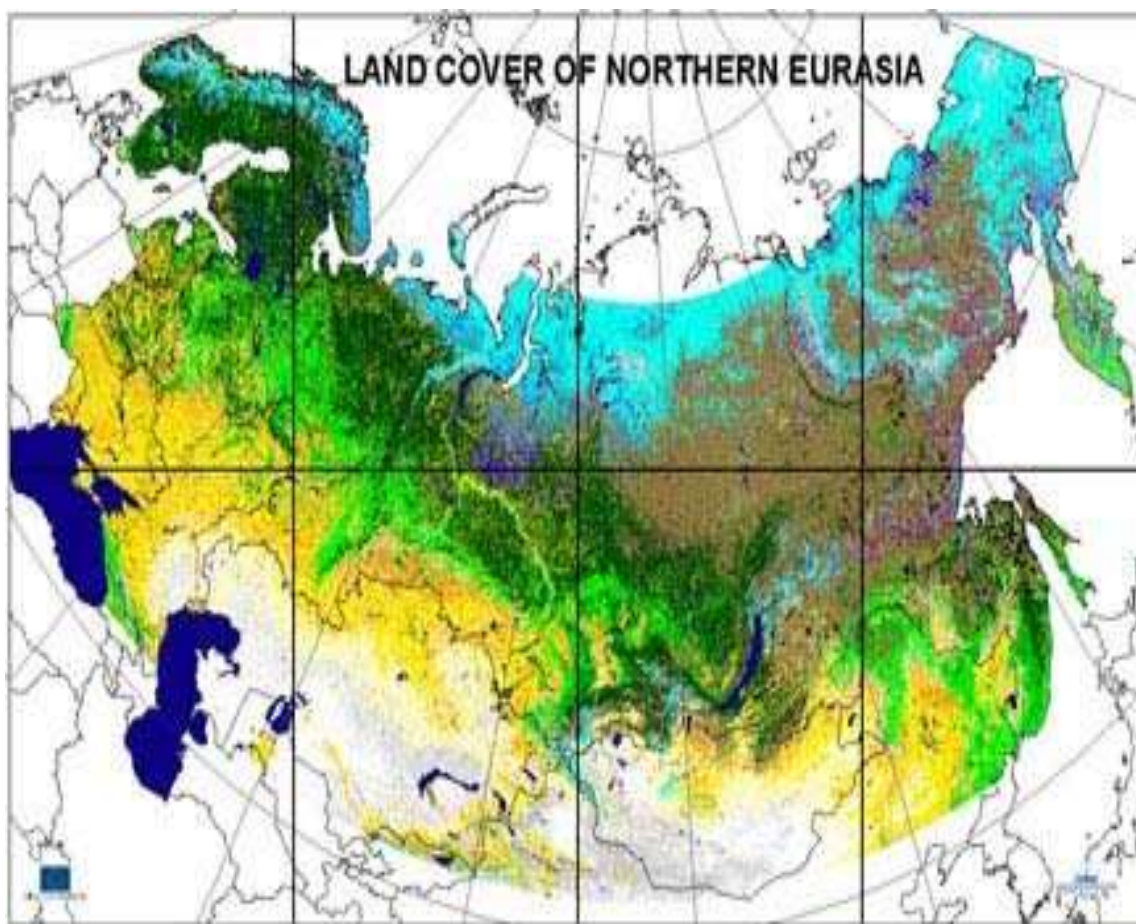


### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Aspectos geográficos da família Zingiberaceae e do gênero *Zingiber*

A família Zingiberaceae de distribuição geográfica Pantropical (figura 1), está incluída na ordem Zingiberales e compreende, cerca de 8 famílias e 100 gêneros. É representada nos Trópicos e neotrópicos pelo gênero *Zingiber* com cerca de 1.200 espécies.

As espécies do gênero *Zingiber* são ervas rizomáticas originárias do sudoeste e norte da Ásia e do Arquipélago Malaio, onde a sua cultura tem grande importância, não somente para o consumo local da população indígena, como também para a exportação, destinada a países ocidentais que o consomem em grandes quantidades (Govindarajan, 1982 e Chen et al., 1986).



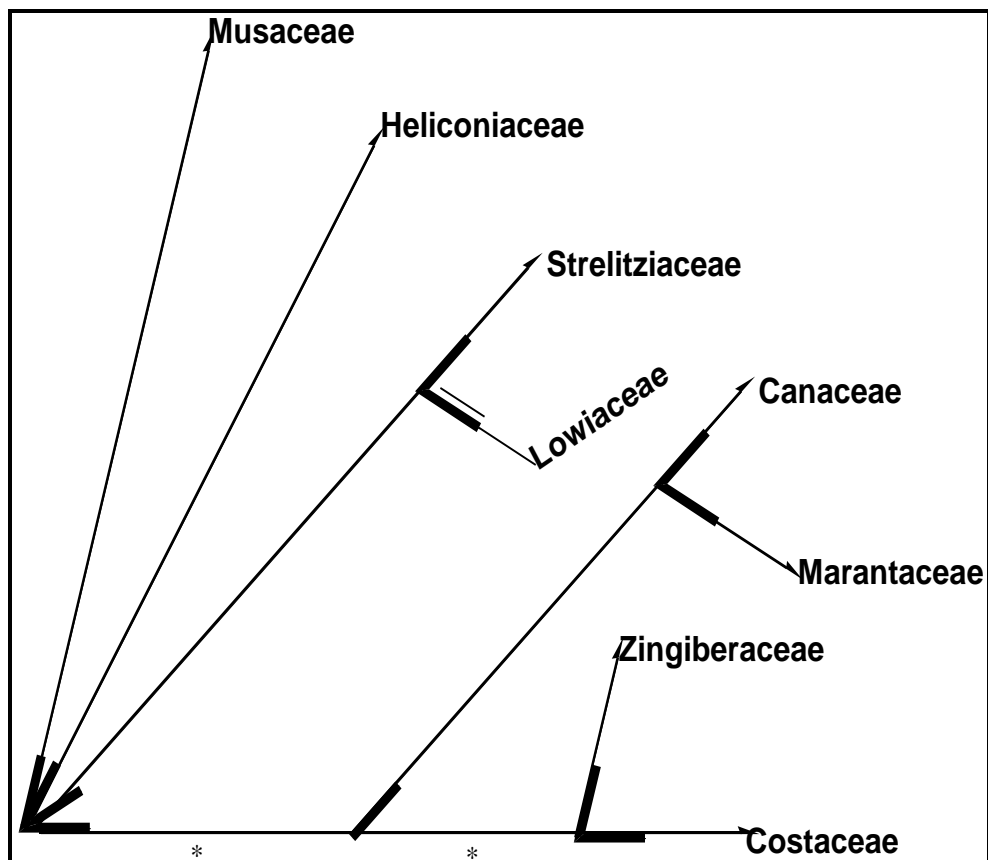
**Figura 1:** Mapa da distribuição geográfica de *Z. zerumbet* Smith

**Fonte:** Mapa obtido do Jardim Botânico do Missouri

### 3.2 Classificações botânica e gerais da família Zingiberaceae

A classificação das primeiras famílias foi proposta em 1889 e reorganizadas em 4 tribos (*Globbeoe*, *Heddychieae*, *Alpinieae* e *Zingibereae*) e a classificação científica baseadas em sua filogenia morfológica, conforme mostra a figura 2.

As investigações filogenéticas para a classificação das Zingiberaceae obedecem a uma nova reorganização, para 4 tribos e 4 subfamílias: Siphonochiloideae (Siphonochileae), Tamijioideae (Tamijieae), Alpinioideae (Alpinieae, Riedelieae) e Zingiberoideae (Zingibereae, Blobbeae). As características morfológicas em vários gêneros monotípicos da família foram responsáveis pela sua classificação taxonômica (Kresse et al., 2002).



**Figura 2:** Classificação filogenética da família Zingiberaceae pertencente à ordem Zingiberales (Price et al.).

**Fonte:** Mapa obtido do Jardim Botânico do Missouri

O gênero *Zingiber* é nativo do Sudeste da Ásia, mas foi cultivada extensamente em área tropical e subtropical em torno do mundo, com frequência na Índia, Malásia até a Polinésia. Gengibres de vários tipos são cultivados comercialmente em todas as regiões mornas, notadamente na Jamaica, que produz alguns dos melhores rizomas frescos, adquiridos para tempero. Os rizomas podem ser cultivados em recipientes como plantas de folhagens exóticas. O nome *Zingiber* vem do grego “zingiberis” (gengibre), *Zingiber officinale* era cultivado desde tempos antigos para fins medicinais e culinários (Joly, 1985; Katzer, 2002). Na medicina Ayurvédica, *Z. officinale* é conhecido como "medicamento universal", e, tanto na medicina Ayurvédica como na chinesa está presente em aproximadamente todas as prescrições médicas. Enfim, o *Z. officinale* (gengibre) é uma planta utilizada com fins medicinais há muitos anos, com eficácia comprovada na medicina tradicional pelo uso e por diversos trabalhos científicos realizados. Gengibre é rico em óleos voláteis, e seus principais constituintes químicos são: citral, zingibereno, bisaboleno, geraniol, gigeróis, zingiberol, borneol, linalol, acetato de geranila que são produtos da quebra do gingerol (Le Cointe, 1947).

Outras espécies usadas para fins culinários incluem: as do sudoeste asiático, *Z. cassumara*, *Z. mioga* (gengibre japonês) que tem um aroma parecido com o da bergamota e *Z. zerumbet* (gengibre selvagem ou gengibre amargo) que é uma espécie do Indo-Malásia (Corrêa, 1968).

### 3.3 A Planta estudada

*Zingiber zerumbet* (L.) Smith (Zingiberaceae) é uma erva de rizoma perene articulado, anguloso e muito ramoso, caules eretos, 30-120 cm de altura, 1-2 cm de espessura, carnosos, com folhas dísticas, glabras a pubescentes na parte abaxial, sendo as basilares reduzidas a simples bainhas superiores, terminam com limbo séssil, lanceolado, 25-28 cm de comprimento, 2-3 cm de largura. Brácteas esverdeadas a avermelhadas. Flores hermafroditas, zigomorfas, dispostas em espigas ovóides ou elipsóides (Figura 3).



**Figura 3:**Perfil da espécie *Z. zerumbet* cultivada. Manaus-AM. 2004.

**Fonte:**Felipe, F.M. (Herbário do INPA)

### **3.3.1 CAULE SUBTERRÂNEO (RIZOMA) DE *ZINGIBER ZERUMBET***

ELEMENTOS MORFOLÓGICOS CARACTERÍSTICOS: O rizoma do *Z. zerumbet* apresenta corpo alongado, um pouco achatado, com ramos fragmentados irregularmente, de 3 a 16 cm de comprimento, 3 a 4 cm de largura e 2 cm de espessura. Externamente, sua coloração vai do amarelo couro à marrom brilhante, estriado na longitudinal, algumas vezes fibroso, com terminações conhecidas como “dedos” que surgem obliquamente dos rizomas; achatadas, obovatadas, curtas, de 1 a 3 cm de comprimento, conforme figura 4. O amido é o principal constituinte do córtex do cilindro central. Internamente de cor marrom amarelado, apresentando umas endodermes amarelas, que separa o córtex estreito do estelo largo, com numerosos

feixes fibrovasculares e abundantes células oleoresinosas com conteúdos amarelos e numerosos pontos acinzentados, feixes vasculares espalhados sobre toda a superfície (Trease, 1966; British Herbal Pharmacopoeia, 1983; British Pharmacopoeia, 1993; WHO, 1999).



**Figura 4:** Rizomas de *Z. zerumbet* cultivado em Manaus-AM. 2008

**Fonte:** Jorge Saldanha, INPA- Manaus, AM.

### 3.3.2 Aspecto químico e farmacológico de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith.

#### 3.3.2.1 Zerumbona (ZER)

A Zerumbona (2,6,10-cycloundecatrien- 1-one, 2,6,9,9-tetramethyl), um sesquiterpeno cíclico é o componente majoritário dos óleos essenciais das raízes e folhas de *Zingiber zerumbet* L. Smith, esta substância apresenta atividade citotóxica para células cancerígenas, possuindo atividade anti-inflamatória, antioxidante e atualmente este composto é recomendado para o tratamento do câncer e HIV.

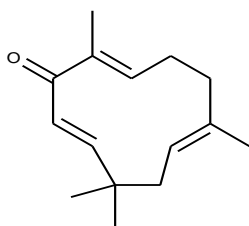


Figura 4- Estrutura química da Zerumbona.

Fonte: SOFTWARE CHEMDRAW.

Dai et al. (1997), demonstraram que Zerumbona teve atividade citotóxica e inibiu o vírus do HIV. Em estudos de Chien e col. (2008), utilizaram a Zerumbona (10mg/kg) para o teste do edema de pata, onde obteve uma excelente atividade induzido por carragenina em camundongos, esta substância demonstrou ser tão eficaz quanto à indometacina (100 mg/kg) um anti-inflamatório não esteroidal - AINE.

A ZER inibiu a proliferação da linhagem de células humanas de adenocarcinoma, enquanto as células normais humanas: fibroblastos da derme e do colo do útero, foram menos afetados. O  $\alpha$ -humuleno, uma estrutura análoga faltando apenas uma carbonila do grupo da Zerumbona, foi inativo em todos os experimentos conduzidos, indicando que o grupo carbonílico  $\alpha$ ,  $\beta$ - insaturado da Zerumbona que é responsável pela atividade inibitória (MURAKAMI et al., 2002).

Sulamain e colaboradores (2009) relataram que ZER foi responsável por inibir a liberação de mediadores responsáveis pela inflamação incluindo: histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandina, o autor cita que a zerumbona pode ser utilizado em reações inflamatórias agudas (SULAMAIN, 2009).

A literatura relata o uso de uma substância leitosa obtidas das flores de *Z. zerumbet* (figura 5) na fabricação de shampoo comercial na Ásia e Havaí, além de estar na medicina tradicional da Indonésia (Matthes, 1980).

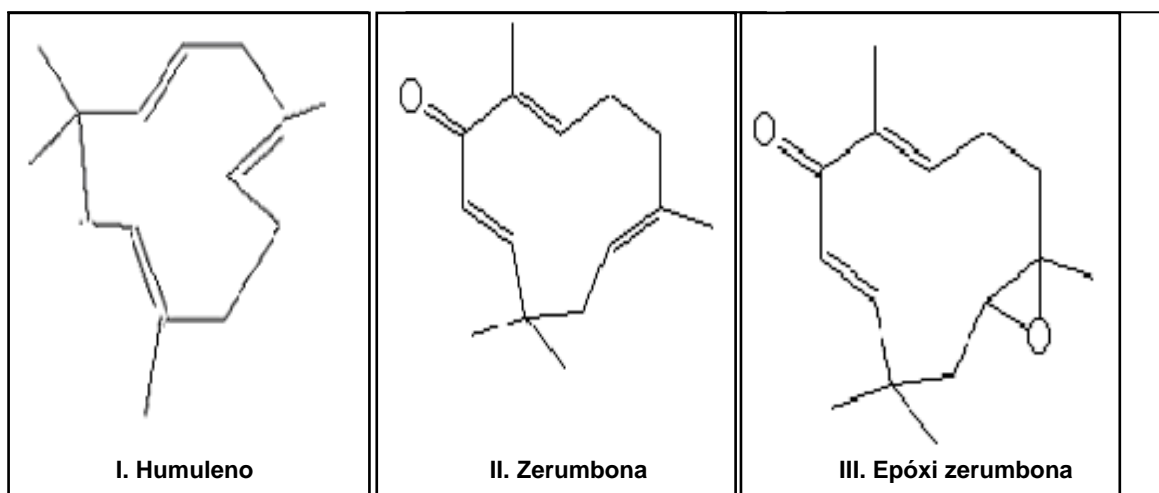
Estudo químico-farmacológico dos extratos pentânicos dos rizomas *Z. zerumbet* (rizomas), revelaram presença dos compostos, humuleno, zerumbona, epóxi-zerumbona, diferuolmetano, *di-p-coumaroilmetano* e kaempferol, que apresentaram atividade citotóxica, **para linhagens** de células de fígado de rato neoplásica cultivada *in vitro*. Outro estudo relata que os compostos zerumbona e 3",4"-O-diacetilafzelina, isolados dos extratos pentânico de *Z. zerumbet* e *Z. aromaticum* (Zingiberaceae), mostraram atividades citotóxica e inibidora do HIV (Daí, 1997 e Matthes, 1980).

Em trabalhos recentes utilizando-se o óleo essencial obtido por hidrodestilação do rizoma de *Z. zerumbet* (L.) Smith, cultivado no Amazonas, produziu um teor relativamente alto de zerumbona (**97%**), o qual mostrou-se ativo, nos ensaios *in vitro*, para atividade contra *S. aureus* e *E. coli*, larvas de *Artemia franciscana* e *Aedis aegypti* (Pinheiro et al., 2001; 2002).



Estudos da composição química, do óleo essencial dos rizomas de *Z. zerumbet* (L.) Smith da Índia, obtido por hidrodestilação analisado espectroscópica CG/EM, revelou a presença de 36 compostos, curzerenona (14,4 %), zerumbona (12,6 %), cânfora (12,8%), Isoborneol (8,9%) e 1,8-cineol (7,1%) foram os que apresentaram maiores teores (Srivastava e Srivastava et al., 1997).

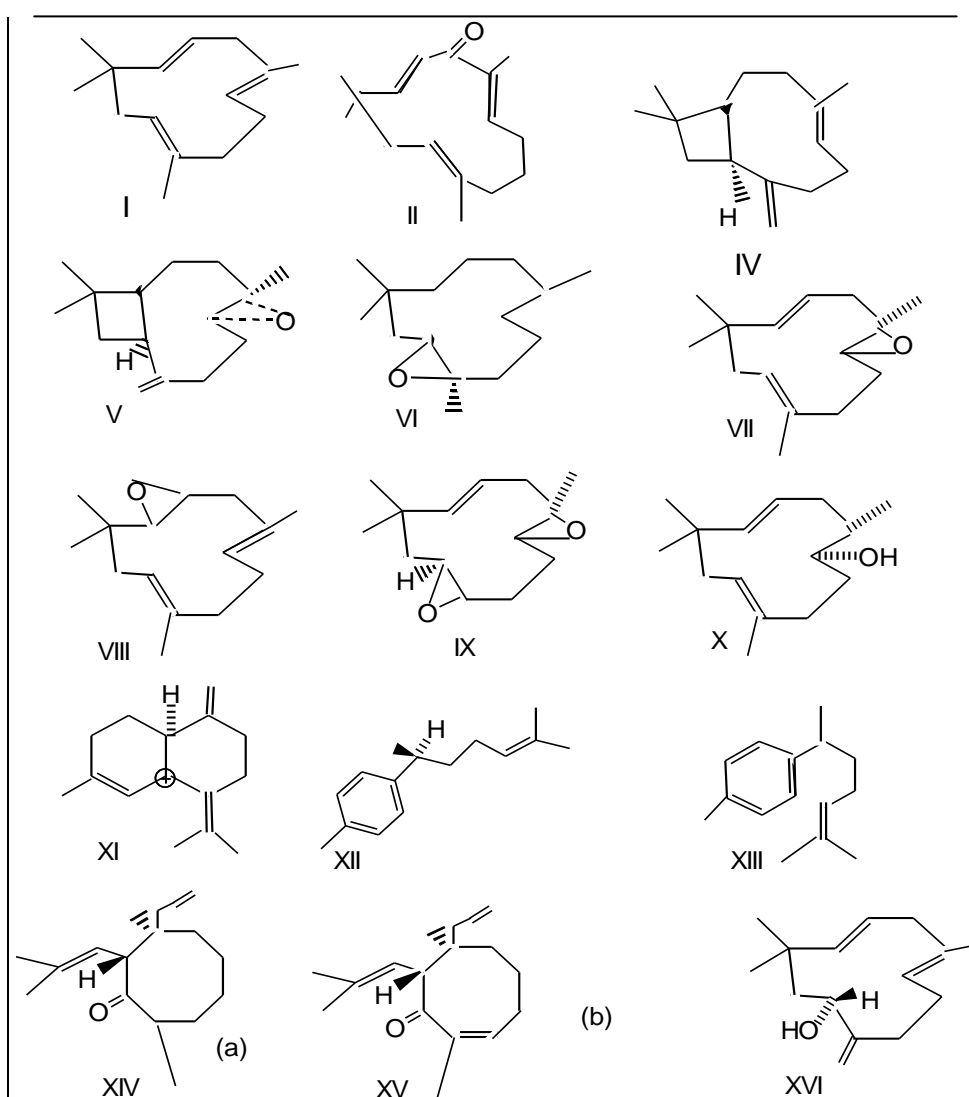
Nos estudos fitoquímicos dos extratos pentânicos de *Z. zerumbet*, de origem européia, foram isolados três compostos e estes foram ativos para células neoplásicas de fígado de rato (Matthes, 1980). A análise dos dados espectroscópicos de RMN de  $^1\text{H}$  dessas substâncias permitiu a elucidação dos compostos humuleno, zerumbona e epóxi-zerumbona, conforme mostra a figura 5(a).



**Figura 5(a):** Principais componentes químicos de *Z. zerumbet* de origem européia

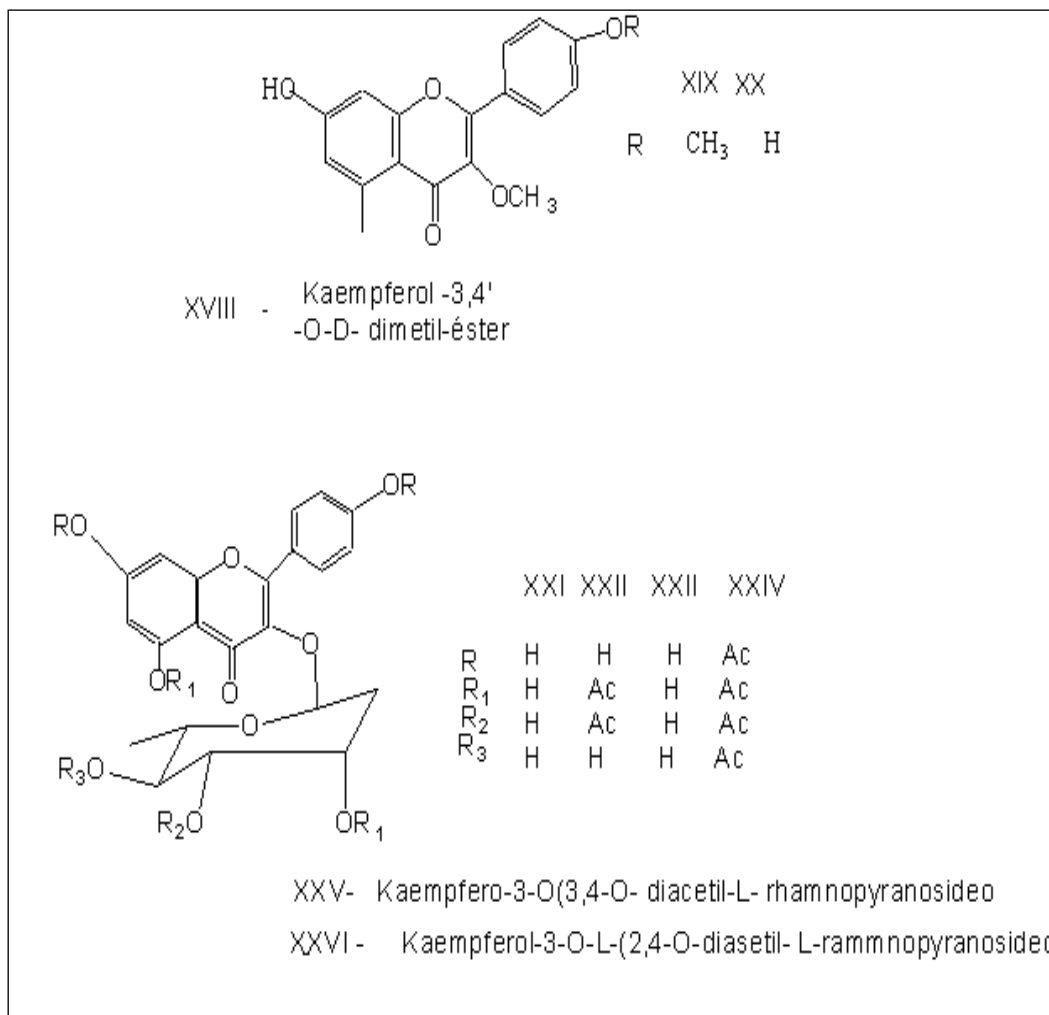
A composição química do óleo essencial da espécie *Z. zerumbet* L. Smith (Zingiberaceae), foi investigado por (Dev 1956 e 1960). Foram isolados e identificados vários monoterpenos e sesquiterpenos cíclicos. A análise fitoquímica mostrou uma mistura complexa para vários terpenóides. Os estudos espectroscópicos apontou a presença de vários sesquiterpenos de importância medicinal: I=humuleno; II=zerumbona; III=epóxi-humuleno; IV=cariofileno; V=epóxi cariofileno; VI= $\gamma$ -epóxi-humuleno; VII-4=epóxi-humuleno; VIII=diepóxi humuleno; IX= $\gamma$ -cardineno X-(+)=*ar*-curcumeno; XI=dihidro- $\Psi$ -fotozerumbona  $\hat{y}$  I; XII=dihidro- $\Psi$ -fotozerumbona (a,b); XIII- $\Psi$  - fotozerumbona; XV - humulenol, como são vistos nas figuras 5(b e c).

Os pesquisadores Mattes et al. (1980), isolaram seis compostos dos extratos pentânicos dos rizomas de *Z. zerumbet*, *Curcuma zedoaria* e *Curcuma domestica*. Os compostos mostraram potente atividade citotóxica para células **neoplásicas**. As substâncias são mostradas nos tópicos: XVI - 1,8 "3", "4" -O-diacetilazefzelin; Ilepóxi-zerumbona já é conhecido em *Z. zerumbet*. Os curcuminoides e os flavonóides, difuloilmetano XVII; feruloil-*p*-coumaroilmetano XVIII; -*p*-coumaroilmetano XIX são conhecidas nas espécies de *Curcuma zedoaria* e *Curcuma domestica*.



**Figura 5(b):** Substâncias identificadas dos rizomas de *Z. zerumbet* Smith





**Figura 5(c).** Constituintes flavonóides isolados dos rizomas de *Z. zerumbet* Smith

No quadro 1, estão relacionados estudos realizados com várias espécies do gênero *Zingiber* em vários países os quais mostraram a presença de vários compostos sesquiterpênicos cetônicos monocíclicos, flavonóides glicosilados, curcuminóides e diterpenos, além de três flavonóides glicosilados acetilados.

**Quadro 1:** Espécies do gênero *Zingiber* estudadas quimicamente e os principais metabólitos secundários.

Espécies Estudadas Quimicamente	Local da coleta	Parte da planta	Extrato vegetal (Óleo essencial)	Principais substâncias isoladas	Referências
<i>Z. zerumbet</i>	Irlanda	Folhas, flores	Óleo essencial	$\alpha, \beta$ , cariofileno, cânfora, (E) -nerolidol, zerumbol, linalol, $\beta$ pineno	Chane-Ming et al. 2003
<i>Z. zerumbet</i>	Japão Índia China	rizomas	Óleo essencial	Zerumbona, cineol- humuleno, canfora epóxi- zerumbona, cafeno, curzerenona, cardineno, isoborneol, zerumbol	Dev. 1956; Dev. 1960
<i>Z. zerumbet</i>	Japão China	rizomas	DCM, Acetônico, Pentânico	Humuleno, Zerumbona, epóxi-zerumbona, difuloilmetano, Flavonóides glicosídeo	Welankimet al., 1969; Gupta et al. 1979
<i>Z. cassumar</i>	Japão Índia China	rizomas	Óleo essencial	Humuleno, Zerumbona, Flavonóides, glicosídeo, nerolidol, cânfora, linalol, $\alpha, \beta$ pineno	Srivastaet al., 2000; Masudaet al. 1991
<i>Z. cassumar</i>	Japão Índia China	rizomas	Ext. pentânico	Acetilados flavonóides, Humuleno, Zerumbona, epoxi-zerumbona, Flavonóides glicosídeo	Srivastaet al. 2000; Kishore et al., 1992.
<i>Z. officinal</i>	Japão Índia China	rizomas	Óleo Essencial	Citral, gigeróis, borneol zingibereno, geraniol, bisaboleno, linalol.	Le Cointe, 1947 Correa, 1968.
<i>Z. officinale</i>	Japão Índia China	rizomas	Hidro-alcoólico	citral, linalol, zingibereno, bis aboleno, geraniol, gigeróis, zingiberol, borneol	Le Cointe, 1947; Correa, 1968.

Os estudos farmacológicos de sete extratos dos rizomas das espécies da família das Zingiberaceae (*C. domestica*, *C. xanthorrhiza*, *Z. cassumunar*, *Z. officinale* (variedade vermelha), *C. xanthorrhiza*, *Kaempferia galanga*, *Z. officinale* e *Z. zerumbet*), em triagem para a atividade antitumoral, promoveram a inibição do composto 12-O-tetradenoyl phorbol -13 - acetato (TPA) que induz a ativação precoce do antígeno (EBV-EA), na célula de Ragi (Matthes, 1980; Daí, 1997).

Consequentemente, estes estudos mostram que diversas espécies da família Zingiberaceae, usadas na Malásia e outros países Asiáticos, contêm compostos não-tóxicos naturais com ações e efeitos na inibição e ativação do vírus EBV que poderá atuar na prevenção inicial do câncer em seu estágio inicial (Matthes, 1980).

Foram isolados por Masuda et al. (1991) e Natakani & Jltoe (1991) diversos derivados de cinamoilmetano dos rizomas de *Z. zerumbet* e os extratos apresentaram como principais constituintes o tricinoilmetano e triferuloilmetano. Estes outros derivados mostraram atividade citotóxica para células neoplásicas.

A expansão do anel da zerumbona para 12 membros do anel foi estudada via sistema em **anel cíclico cadeia da zerumbona**. O estudo teve como premissa na síntese de derivado da zerumbona com 12 membros do anel, no tipo alleno zerumbona. Para a primeira etapa foi adotado o método de síntese Doering - LaFlame alleno e a estrutura foi confirmada por Difração de Raio X monocristal (Takashi Kitayama, 2006). O resultado do processo de síntese foi a obtenção do composto zerumbona com 27,7% de rendimento.

Os óleos essenciais dos rizomas frescos de *Z. ottensii* Valet e *Z. zerumbet* (L.), foram pesquisados por Malek et al. (2005), vinte oito componentes foram identificados dos rizomas de *Z. ottensii* e dezoito de *Z. zerumbet*.

Zacaria e colaboradores (2011) avaliaram a atividade de contorção abdominal, utilizaram o Ácido Acetil Salicílico - ASA (5 mg / kg) que produziu cerca de 63% de anti-nocicepção em comparação com o extrato metanólico (100 mg / kg) de *Zingiber zerumbet* resultando numa faixa entre 17-55% de antinocicepção. Também utilizaram a Morfina no teste nociceptivo, os resultados foram um aumento de latência 90min após a sua administração, enquanto o extrato metanólico de *Z.zerumbet* (100 mg/kg) exerceu alta atividade antinociceptiva a 120 min após a sua administração. No teste da formalina, o ASA e a morfina produziram na primeira fase 8% e 63% de anti-nocicepção, e na segunda fase 67% e 23%. Em comparação, o extrato metanólico de *Z.zerumbet* produziu aproximadamente 27-45% e 34-62% de anti-nocicepção em ambas as fases, respectivamente.

Khallid e col. (2011), relataram o efeito do óleo essencial de *Zingiber zerumbet* utilizando o teste de contorção abdominal induzido por ácido acético nas doses de 50, 100, 200 e 300 mg/kg. Na administração do óleo essencial via intraperitoneal, obteve-se uma boa inibição do efeito nociceptivo, a porcentagem de inibição foram: 23.02, 53.89, 83.63 e 98.57% respectivamente, similar aos resultados administrando via oral, 13.04, 28.30, 54.69 e 75.68% respectivamente. O Ácido acetil salicílico-ASA (100 mg/kg, *i.p.* e *v.o.*), droga comercial utilizado para

comparação, produziu um efeito similar ao óleo essencial de *Z. zerumbet*. A dose intraperitoneal do óleo essencial foi mais potente via intraperitoneal do que via oral.

O tumor de úlcera e a doença de Crohn's são uma desordem inflamatória de causa desconhecida e são difíceis de tratar. Alguns produtos químicos sintéticos, incluindo ligantes para receptores proliferativos-ativados peroxissomos (PPARs), são usados como drogas (Murakami et al., 2004). A atividade supressiva e a eficácia da zerumbona (ZER), obtido dos rizomas de *Z. zerumbet* Smith, mostraram que a zerumbona é uma fonte natural e um fator para exploração atenuante ao de uma combinação dos agentes, com as diferentes modalidades das ações eficazes, que poderá ser uma estratégia na atividade anti-inflamatória.

Rashid e Pihie (2005) investigaram os efeitos dos extratos de éter de petróleo, aquoso e metanólico dos rizomas de *Zingiber zerumbet* para determinar a atividade anticancerígena em linhagem de células humana com câncer de mama (MCF-7). Os extratos exibiram um efeito anticancerígeno, produziram uma  $CE_{50}$   $4.25 \pm 0.05$ ,  $8.38 \pm 0.08$ ,  $21.31 \pm 0.43$ , respectivamente, em comparação com o tamoxifeno ( $4.39 \pm 0.21$ ) agente quimioterapêutico padrão para o câncer de mama.

Foram obtidos por Sadhu, Samir Kumar et al. (2007) nove sesquiterpenos e oito flavonóides isolados no extrato pentânico da espécie *Z. zerumbet* pela primeira vez. As estruturas foram determinadas por métodos de espectroscópicos, sendo o composto mais importante zerumbona e humuleno, e estes foram testados para células de câncer de colo sendo o composto zerumbona o mais ativo (**IC<sub>50</sub> 13 µg/mL**) inibindo células em crescimento SW480.

O composto bioativo zerumbona isolado dos rizomas de *Z. zerumbet* L. Smith foi investigado para atividades e mecanismos em células de câncer de fígado de linhagem humana por Sakinah et al. (2007). O estudo comprova a indução de apoptose em células HepG2, inibindo a proliferação de células de câncer. A inibição, segundo o mesmo autor, foi causada por diminuir os níveis da proteína anti-apoptótica, do Bcl-2 e do regulamento de Bax (pre-apoptótica).

Os óleos essenciais dos rizomas frescos de *Z. ottensii* Valet e *Z. zerumbet* (L.), foram pesquisadas por (Malek et al., 2005). Vinte oito componentes foram identificados dos rizomas de *Z. ottensii* e dezoito de *Z. zerumbet*. Os componentes

foram identificados por comparação com padrões existente à base do tempo de retenção com aqueles informados na literatura e comparados com os dados de espectros de massa com aqueles espectros de massa de banco de dados.

Os extratos etanólicos, aquosos e os óleos essenciais dos rizomas de seis plantas Zingiberaceas selecionadas, incluindo *C. mangga*, *Kaempferia galanga*, *Kaempferia parviflora*, *Z. cassumunar*, *Z. officinale* e *Z. zerumbet* foram investigados para atividades antialérgicas usando RBL-2H3 uma linhagem de células (Supinya et al., 2006). O extrato etanólico de *K. parviflora* exibiu o mais potente efeito antialérgico contra o antígeno hexosaminidase induzido marcador de desgranulação em células RBL-2H3, com um valor de 10,9 µg/mL, seguido por *Z. cassumunar* (EtOH, IC50 = 12,9 g/mL) e *C. mangga* (água, IC50 = 36,1 g/mL). Os resultados observados com os extratos das espécies foram inativos contra a atividade da enzima de hexosaminidase no tratamento de doenças alérgicas.

Nos estudos químico-farmacológico de Daí & Cardellina (1997); Murakami & Takashi (1999), o extrato pentânico dos rizomas de *Z. zerumbet* cultivado na Índia, revelou a presença dos compostos humuleno, zerumbona, epóxi-zerumbona, diferuolmetano, di-*p*-coumaroilmetano e kaempferol e estes compostos quando testados *in vitro* em linhagem de cepas de células neoplásicas de fígado de rato (CTH), apresentaram potente atividade citotóxica e não apresentou toxicidade para célula de fibroblasto normais [3T3], o que sugere uma citotoxicidade seletiva.

### 3.4 Interações da Planta e Produção de Metabólitos Secundários

A investigação da composição química dos óleos essenciais foi iniciada no século XIX e levou à descoberta de vários hidrocarbonetos: os terpenóides. Os óleos essenciais são misturas complexas contendo carbono, oxigênio, hidrogênio e ocasionalmente, nitrogênio e enxofre como mostra. Os óleos essenciais mais conhecidos e utilizados são constituídos basicamente por duas classes de compostos os fenilpropanóides e os terpenos, sendo estes os mais abundantes (Waterman & Hay, 1993).

A estrutura dos fenilpropanóides consiste basicamente de um anel benzênico e uma cadeia lateral com três carbonos apresenta dupla ligação, podendo conter grupo funcional com oxigênio.

A proposta biossintética para os sesquiterpenos monocíclicos é a obtenção dos compostos a partir do *cis trans* farnesol nas plantas e que está associada com a

presença de estruturas secretoras especiais, como células produtoras de resinas e óleos na epiderme glandular, que compartimentalizam todos os componentes tóxicos provenientes da atividade metabólica das células, proposto por (Lewinson et al., 1998).

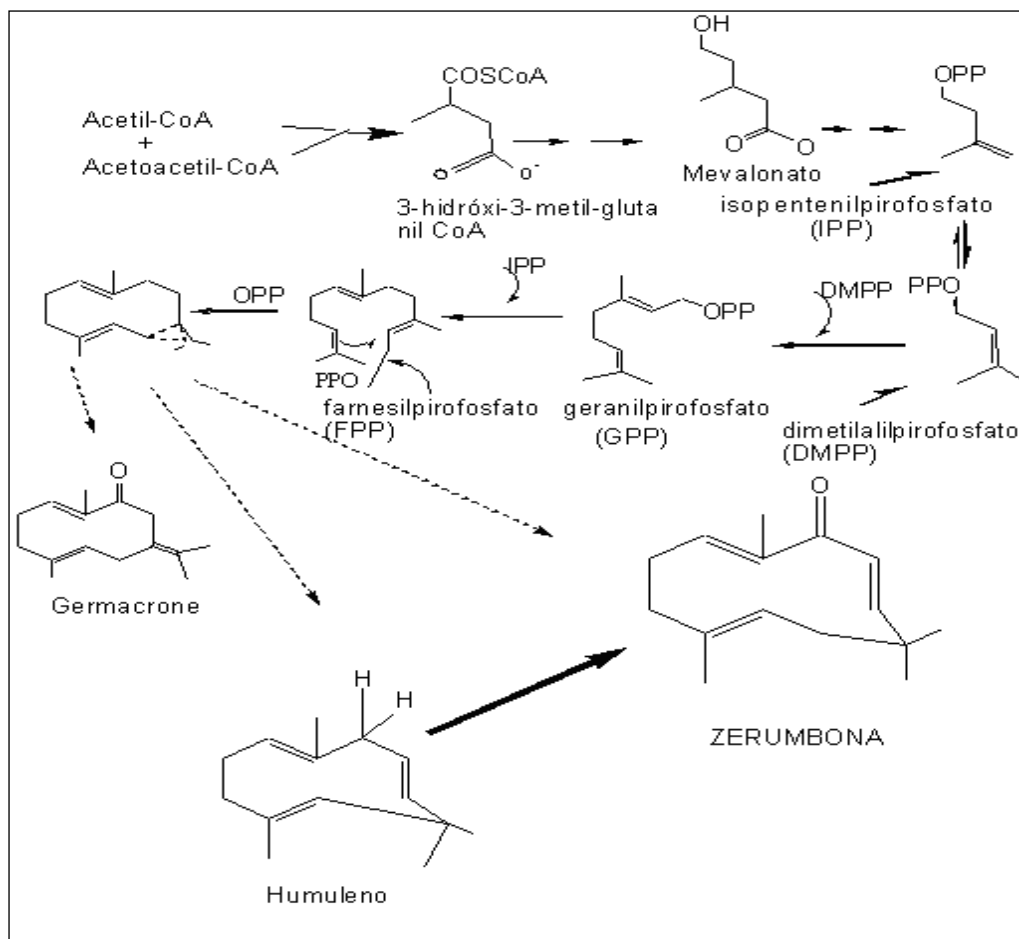
As alterações secundárias nas estruturas dos terpenos (ligação-dupla, isomerização e oxidação) são bastante conhecidas para os compostos curcumeno, lanceol e atlactono entre outros. Os íons dos compostos podem ser transformados por despronação ou por ataque na ligação dupla sendo importante para a obtenção dos compostos sesquiterpênicos: humuleno e cariofileno. Os sesquiterpenos obtidos a partir do *cis* e *trans* farnesol tem como produto inicial o anel fechado do humuleno e maliol.

Os produtos do metabolismo secundário apresentam vasta diversidade estrutural, mas são provenientes de quatro rotas biossintéticas conhecidas acetato, mevalonato, chiquimato e desoxibilidade. Os terpenos de baixo peso molecular podem acoplar para formar o geranyl pirofosfato (GPP). Existem opções de futuras modificações controladas por enzimas específicas, reações (condensação, ciclização, eliminação, adição nucleofílica e oxidação) e mecanismo iônico para a formação do primeiro sesquiterpeno farnesil pirofosfato.

A família Zingiberaceae, onde se encontra classificada a espécie *Z. zerumbet*, produz flavonóides acetilados, e vários terpenóides (monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos).

Na Amazônia, elas se parecem com a mangarataia, bastante utilizada contra inflamações na garganta. Em algumas áreas rurais de Manaus, a espécie *Z. zerumbet* é utilizada como: antiespasmódico, anti-inflamatório, contra cólicas, no tratamento de doenças estomacais e já tem estudos de efeitos citotóxicos contra células cancerosas ([notícias inpa/ascom-2006-02-02-16:05:35](#)).

A figura 6 mostra uma proposta biossintética para a zerumbona isolada de *Z. zerumbet* (L.) Smith. O ácido mevalônico é um intermediário químico com seis carbonos que é formado na planta pela combinação de três moléculas de acetato, o qual é derivado da acetil-coenzima A. Inicialmente o ácido mevalônico é convertido no isopentenilpirofosfato (IPP), que se isomeriza para 3,3-dimetilalilpirofosfato (DMAPP), pela ação da enzima isopentenil pirofosfatase que sob influência de outras enzimas reagem com outra molécula de IPP.



**Figura 6:** Proposta de interação biossintética para compor o sesquiterpênicos Zerumbona

### 3.5 ESTADO DE ARTE DA ZERUMBONA

**PROSPECÇÃO TECNOLÓGICA DO POTENCIAL QUÍMICO E MEDICINAL DE *ZINGIBER ZERUMBET* E DA ZERUMBONA:** Neste estudo foi usada a zerumbona obtido de *Z. zerumbet* (L) Smith, cultivada na Amazônia, com a finalidade de estudar seus princípios ativos, ou seja, a verificação do seu potencial farmacológico, mas, especificando as atividades desenvolvidas com a mesma.

A possibilidade de empregar a zerumbona como precursor da **paclitaxel** na utilização para o tratamento do câncer foi verificada por (Kitayama et al., 2007). Sendo a zerumbona uma substância natural **aquiral**, eles introduziram assimetria através da aplicação da hepoxidação assimétrica Sharpless - Katsuki do álcool atílico racêmico, zerumbol. Estas **epoxidações** são agora estabelecidas como um

dos métodos mais poderosos para introdução de centros estereogênicos em uma variedade de álcoois **etílicos** pró-quirais.

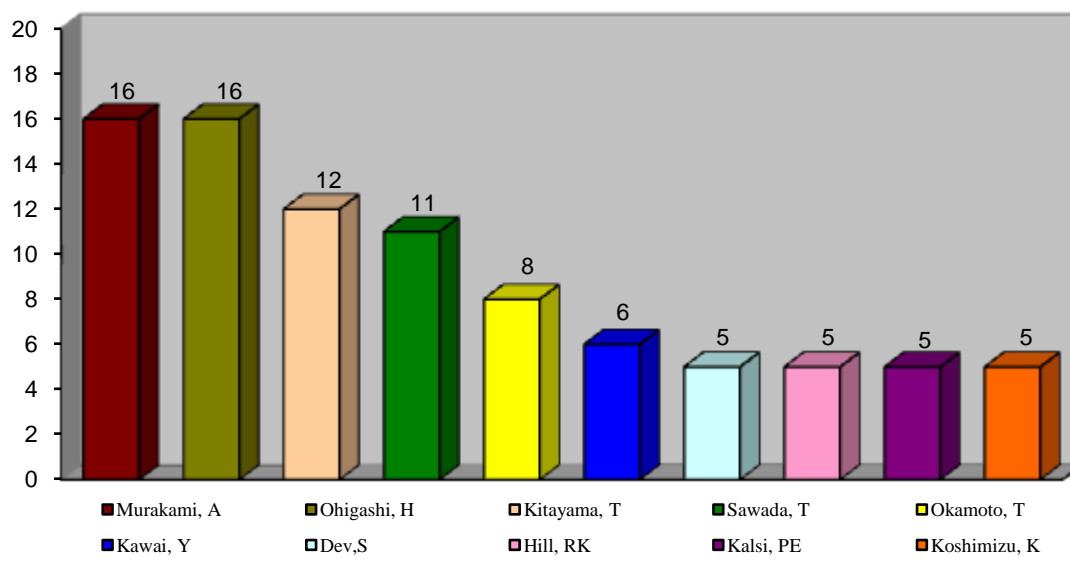
Novos substratos opticamente ativos, como os blocos de construção quiral da zerumbona contendo três duplas ligações, podem possivelmente ser usados em variedades de campos industriais, tais como, na medicina, perfumaria, indústria de cristal líquido e na indústria eletrônica. Entretanto, espécies oxidadas de zerumbona têm o potencial para não somente serem convertidas em derivados de açúcares naturais, mais também serem incorporadas em materiais como um auxiliar quiral. Do ponto de vista da diversidade, a zerumbona tem um grande potencial, já que, uma variedade de compostos estereoquimicamente distintos podem ser teoricamente gerados da epoxidação da zerumbona, providenciado que cada isômero possa ser sintetizado e isolado como um composto opticamente ativo. Uma rota versátil para obtenção de compostos isomericamente puros vem da utilização de enzimas para a resolução de epóxidos opticamente inativos da zerumbona, por exemplo, **se a lipase reconhece seletivamente os estereoisômeros diferentes e se ela catalisa transesterificações com alta eficiência essa técnica pode ser aplicada para a síntese e isolamento dos epóxidos enantiomericamente puros da zerumbona (Damodaran, 1965).**

As enzimas são catalisadores altamente seletivos e vêm sendo empregadas na biotransformação de moléculas bioativas. As modificações estruturais podem levar ao aumento da atividade biológica ou à inibição de efeitos indesejáveis. A redução enantiosseletiva de compostos carbonílicos mediada por leveduras tornou-se uma valiosa ferramenta para a preparação de álcoois quirais (Ishige e Shimizu, 2007). A levedura *Saccharomyces cerevisiae*, conhecida como fermento de pão, tem sido o microrganismo mais empregado pelos químicos sintéticos, principalmente na redução assimétrica de carbonilas. Esta levedura tem sido relatada há muito tempo como catalisador de transformações que geram produtos quirais e pode ser considerada como um biocatalisador ideal pelo fato de estar amplamente disponível e ser de fácil manuseio (Faber, 2007).

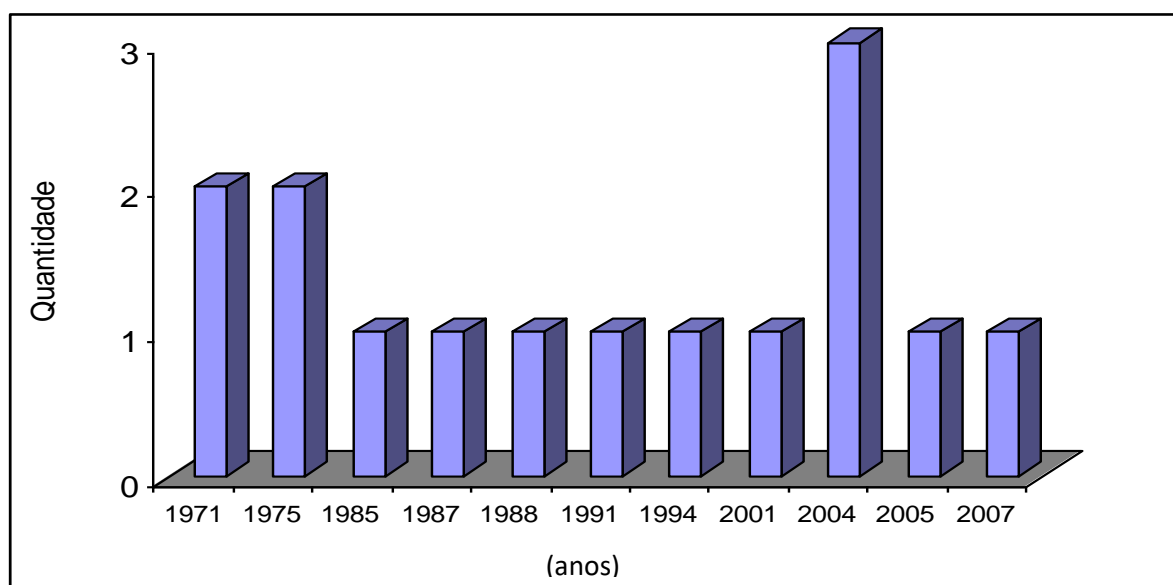


### 3.6 PATENTES PUBLICADAS DA ZERUMBONA

Foi feito levantamento de dados sobre as patentes de zerumbona. Usou-se o site Devent Innovations Index a partir do portal periódicos CAPES.

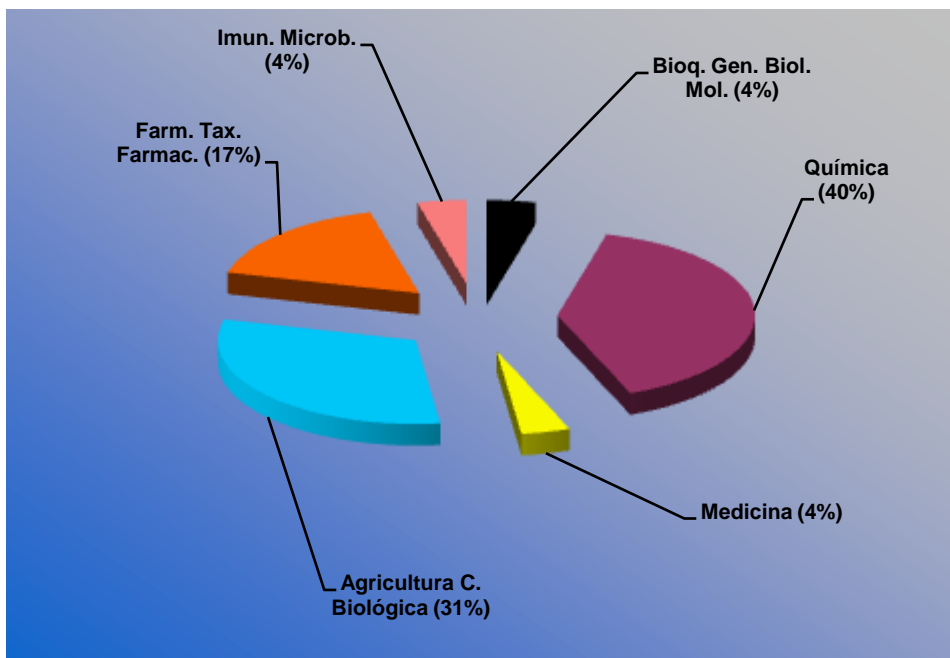


**Figura 7:** Publicações sobre a substância zerumbona entre os anos de 1971 a 2007.



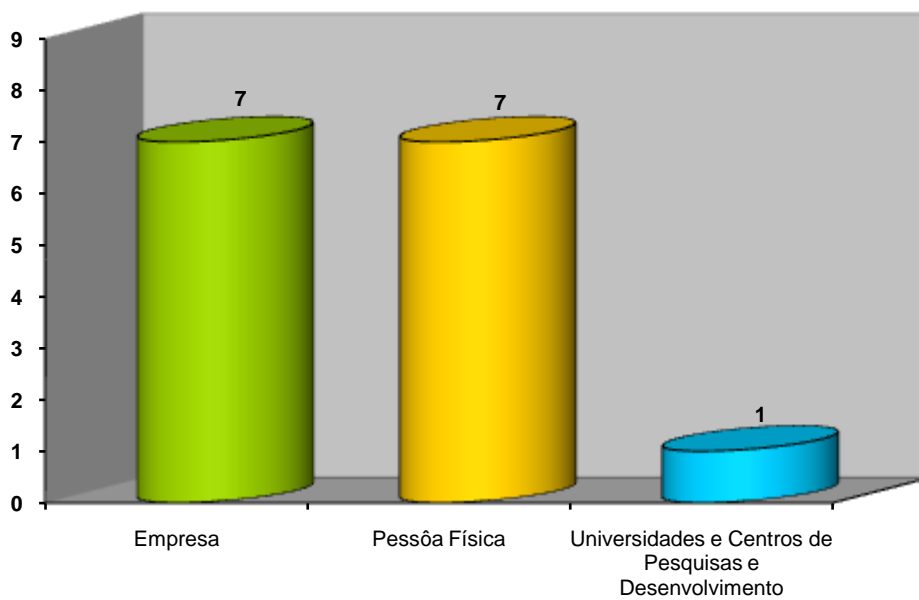
**Figura 8:** Distribuição das patentes da substância zerumbona nos anos (1971 a 2007).

Fonte: "Derwent Innovations Index".



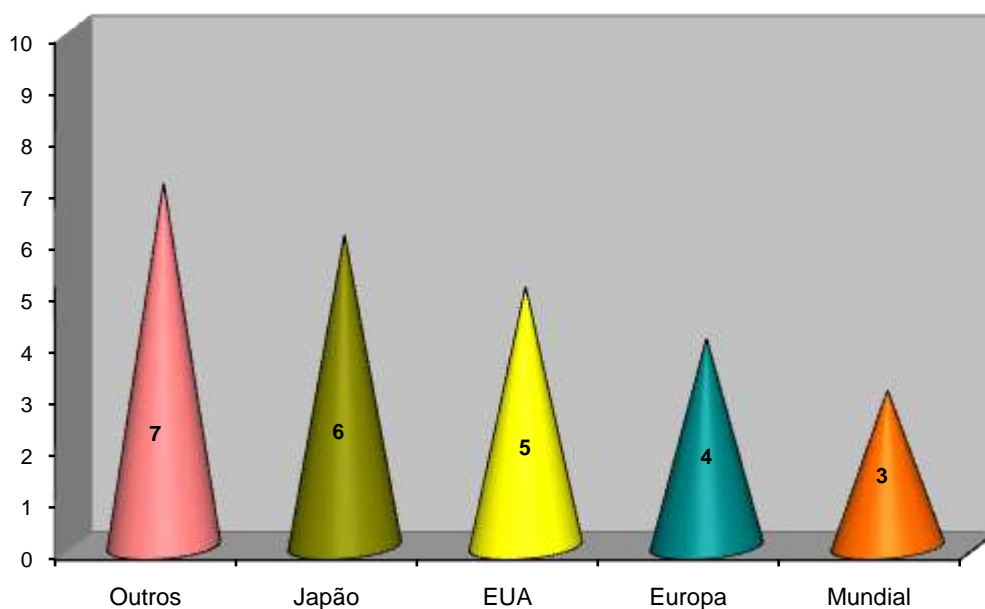
**Figura 9:** Distribuição das patentes de zerumbona por área (data)

Fonte: "Derwent Innovations Index"



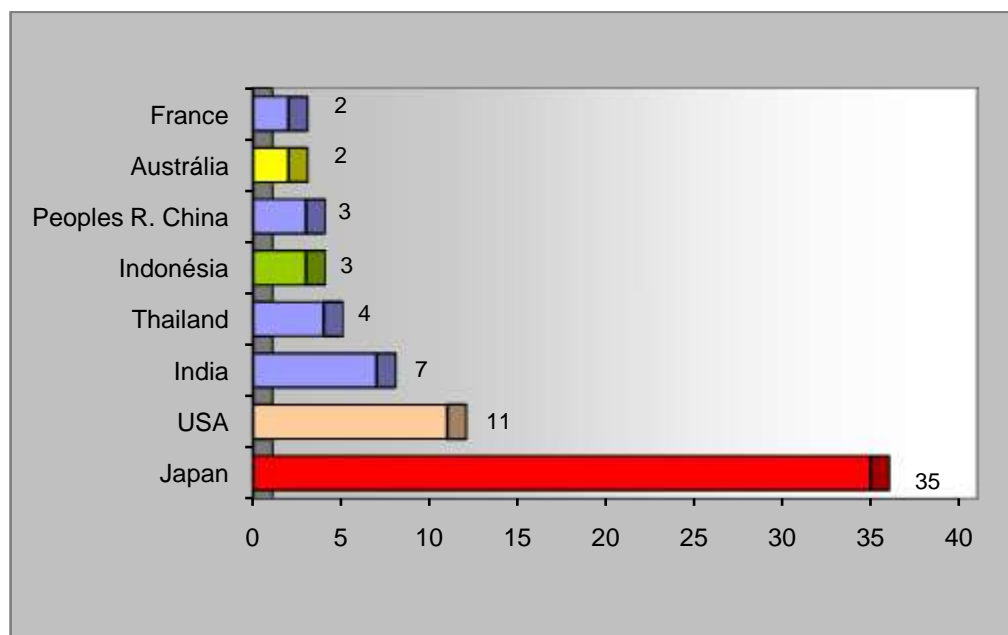
**Figura 10:** Origem e distribuição das Patentes de zerumbona (data)

Fonte: "Derwent Innovations Index"



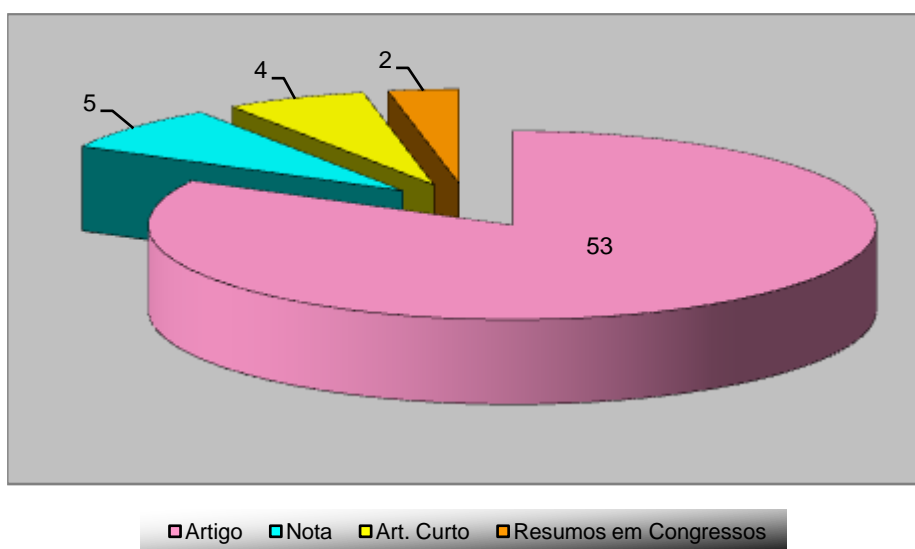
**Figura 11:** Distribuição das patentes da zerumbona por países(data)

Fonte: "Derwent Innovations Index"

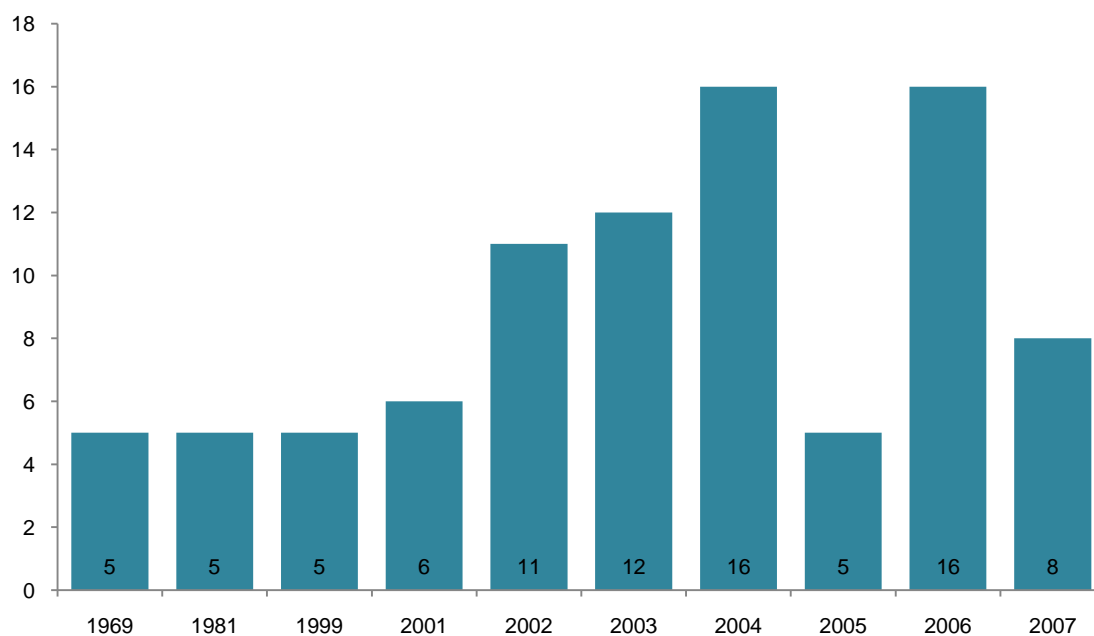


**Figura 12:** Países que mais publicaram patentes da zerumbona (data)

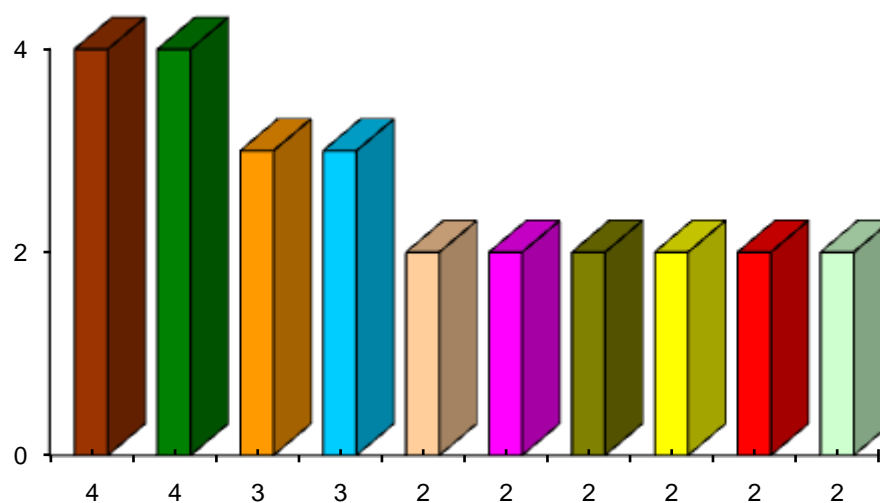
Fonte: "Derwent Innovations Index"



**Figura 13:** Documentos de publicações das patentes da zerumbona (data)



**Figura 14:** Índices anuais dos maiores números de publicações da Z. zerumbet (data)



**Figura 15:**Revistas e Jornais que publicaram as patentes da *Z. zerumbet* (data)

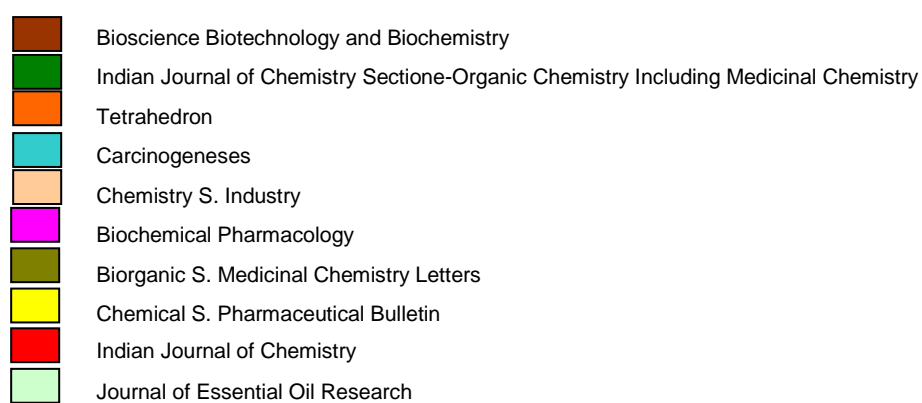




Figura 16. Áreas de estudos que a zerumbona foi publicada

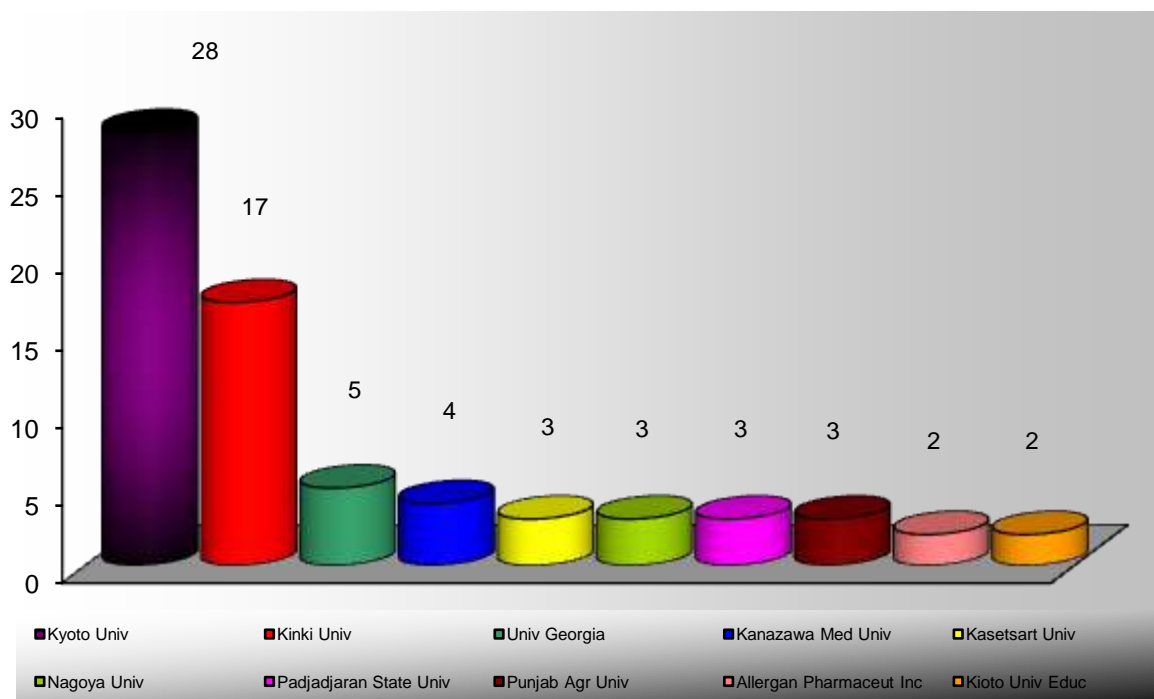


Figura 17. Instituições que mais publicaram as patentes de zerumbona

Esta tese aborda a otimização de processos químicos e farmacológicos dos rizomas de *Z.zerumbet* (L.) Smith, cultivada em Manaus-AM. Os estudos poderão explicar as ações e efeitos ainda não esclarecidos a partir de zerumbona obtido dos rizomas de *Z. zerumbet*. Baseado nessas informações, diante das diversas comprovações científicas das propriedades medicinais da espécie *Zingiber zerumbet* L. Smith.

Estes estudos são importantes à medida que se descobriram varias atividades farmacologiacas para essa substância, sendo as elimina a geração de radicais livres; anti-inflamatório, analgésica e possui atividades citotóxicas contra para várias linhagens células cancerosas acelerando apoptose. É possível que o estudo com a espécie *Z. zerumbet* esteja associado ao seu potencial para pesquisas no desenvolvimento de novas drogas.



## *4. MATERIAL E MÉTODOS*

---

---



## 4.1 PARTE EXPERIMENTAL

### 4.1.1 Obtenção do *Zingiber zerumbet* (L.) Smith

Os rizomas de *Z. zerumbet* foram coletados em área rural do município de Manaus-AM e a exsicata foi enviada ao herbário do INPA para ser identificada pelo Prof. Dr. Paul Maas (Departament of Plant Ecology and Evolutionary Biology) - herbarium University of Utrecht. O material encontra-se depositado no herbário sob nº 186913 (Figura 18).



**Figura 18.** Exsicata de *Z. zerumbet* (L.) Smith

**Foto:** Felipe, F.M. (Herbário do INPA)

#### **4.1.2 Técnicas de utilizadas nas extrações de óleos essenciais de *Zingiber zerumbet***

##### **a) Arraste por vapor d'água**

Os trabalhos foram conduzidos no Laboratório de Farmacologia da Coordenação de Pesquisas em Produto Naturais do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia-INPA (Manaus/Amazonas).

A técnica utilizada na extração dos óleos essenciais foi à produção de vapor por uma panela de pressão acoplada a um manômetro e tubo galvanizado conectado um frasco Mariott (contendo o material vegetal triturados rizomas verdes ou secos) e conectado por um tubo de vidro ligado ao condensador acoplado a aparelho modificado tipo Clevenger, Craveiro et al. (1981), conforme figura 19. A obtenção de Zerumbona dos óleos essenciais dos rizomas de *Z. zerumbet* (L.) Smith aclimatada em Manaus-AM, foi realizada utilizando-se por processo dehidrodestilação e arraste a vapor. Do rizoma de *Z. zerumbet* (20 Kg), foram triturados com ajuda de moinho elétrico e ralador manual e pesados em balança semi-analítica. Os materiais frescos e secos foram extraídos de forma qualitativa e quantitativa visando obter os óleos essenciais em duplicata dos rizomas, provenientes da mesma coleta ou lote. Dos rizomas frescos (10 Kg.), os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação e sistema arraste a vapor, utilizando-se um aparelho Clevenger modificado. Parte do material foi submetida à determinação da umidade relativa (UR) da biomassa fresca e a outra foi colocada em um balão de fundo redondo com capacidade de 12 litros. O volume de água foi proporcional à quantidade de material para Hidrodestilação e Arraste a Vapor. A temperatura inicial na destilação foi de 100°C e reduzida posteriormente a 80°C e o tempo de extração foi de 8 horas. Os volumes foram retirados e medidos diretamente no aparelho Clevenger graduado e os seus rendimentos de óleos foram expressos em percentagem (mL/100g e g/100g de planta verde ou seco). Após os arrastes, os óleos essenciais das amostras das coletas do *Zingiber*, foram centrifugados e secos com sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), para a eliminação total da umidade (Silva et al., 1995; Siqueira et al., 1986).



**Figura 19.** Extrator de óleo essencial por arraste-vapor utilizado na obtenção do óleo essencial de *Z. zerumbet* Smith.

### **b) Hidrodestilação**

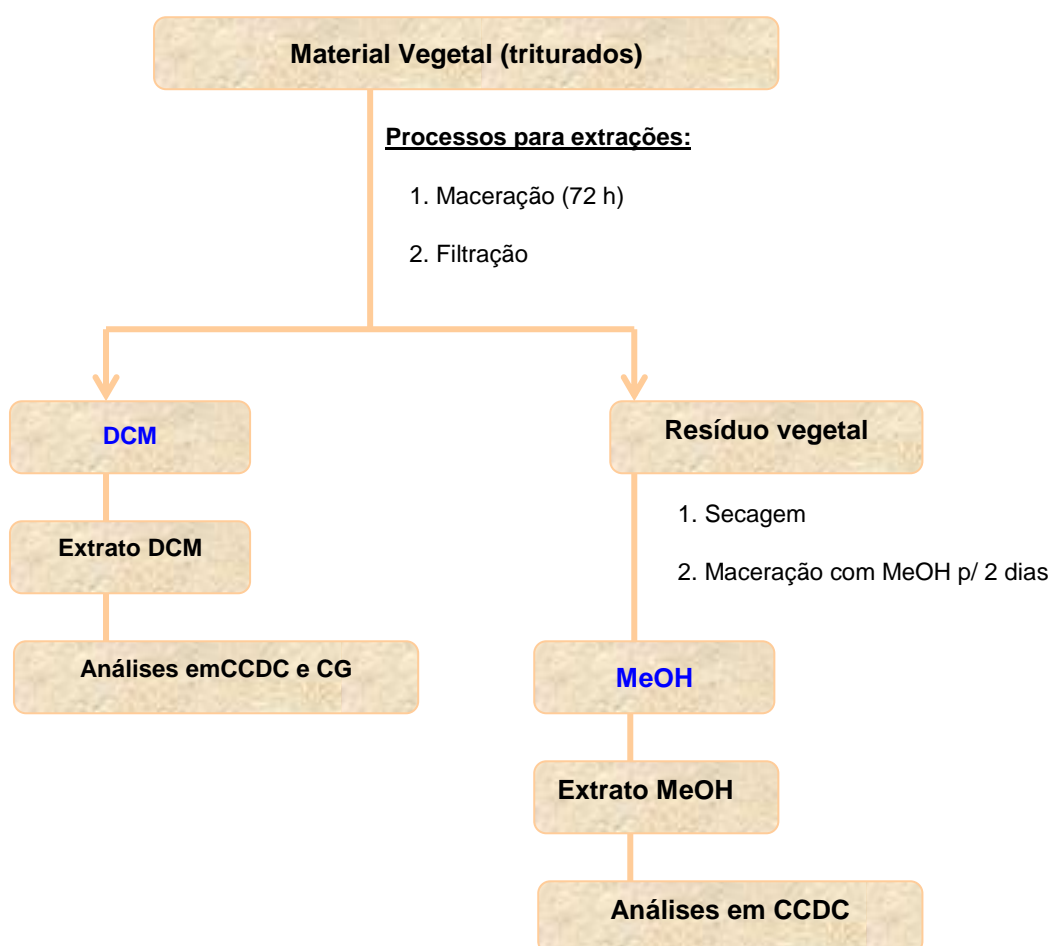
Para a extração por hidrodestilação foi utilizado o aparelho de Clevenger acoplado a balão de 2000 mL (figura 20). O *Zingiber* em pó (2 kg) e 4 L de água foram colocados no balão e levado para manta aquecedora. A extração foi feita durante 6 h contadas a partir da ebulição da amostra. O óleo essencial foi coletado do condensador (AOAC, 1995). Todo o sistema foi protegido da luz por meio de papel alumínio e o óleo essencial foi armazenado em frascos âmbar sob congelamento.



**Figura 20.** Hidrodestilador acoplado ao refrigerador circulador de água

### c) Extração por Solventes

O material vegetal (rizomas) foi seco em estufa a 45<sup>o</sup>C(72 horas) e triturado em moinho elétrico. Ao pó, foi colocado em um recipiente de vidro, foi adicionado diclorometano (volume suficiente para submergir o material e formar uma camada de aproximadamente 6 cm acima do material vegetal). A partir desse ponto fizemos dois tipos de extração. No primeiro, o material foi deixado em repouso, por aproximadamente 5 dias. Terminado esse período, o material foi filtrado e concentrado em rotaevaporador e determinado o teor extrativo, fornecendo o extrato diclorometânico (DCM). Após a extração com DCM, o material vegetal foi submetido à extração com metanol. Adicionamos metanol suficiente para submergir o material, formar uma camada de aproximadamente 6 cm acima do material vegetal. Após 72 horas o material foi filtrado e o extrato MeOH, foi concentrado e determinado o teor extrativo - (Figura 21).



**Figuras 21.** Processo de obtenção dos extratos DCM e MeOH de *Z. zerumbet*

O material foi colocado em um frasco Mariott e com capacidade de 12 litros, conectado a uma panela de pressão semi-industrial (20 L), adicionou-se um volume de  $\pm 15$  litros de água. O controle da temperatura ( $10^{\circ}\text{C}$ ) e pressão na destilação dos óleos essenciais foi registrado em circulador de água digital Tecnal conectado ao condensador (temperatura e pressão acoplado a um manômetro adaptado à tampa da panela) conectado ao aparelho Clevenger. Para a coleta e verificação dos rendimentos dos óleos essenciais foi utilizado o separador graduado. A temperatura inicial da destilação por vaporização inicial foi de  $80^{\circ}\text{C}$  e reduzida posteriormente a  $70^{\circ}\text{C}$  e a temperatura de condensação foi de  $+ 5 - 15^{\circ}\text{C}$ . O tempo de extração foi de 4 horas. Os rizomas foram submetidos à hidrodestilação e arraste a vapore os volumes de óleos essenciais foram retirados e medidos em tubo de ensaio graduado e o rendimento foi expresso em percentagem/peso (mL/100g/g/100g de planta seca).

A extração com uma sequência de solventes de polaridade crescente na seguinte ordem; Diclorometano (DCM) e Metanol (MeOH). *Zingiber* em pó (500 a 1000g) foi adicionada de 2000 mL de DCM e MeOH. Esta mistura foi mantida à temperatura ambiente por 72 horas sob maceração mistura foi filtrada em funil de Buchner utilizando papel de filtro. O solvente foi eliminado em evaporador rotatório (Tecnal TE 184) a  $45 - 50^{\circ}\text{C}$  (Singh et al., 2002b).

#### **4.2 Perfil Físico-Químico dos Óleos Essenciais dos rizomas de *Z. zerumbet***

Perfil físico-químico das amostras de óleos essenciais foi realizado as seguintes análises: rendimento na extração dos óleos essenciais, peso específico e quantificação dos teores de zerumbona (ZER) e perfil cromatográfico das amostras de óleos.

##### **a) Rendimento**

O rendimento foi determinado em três amostras pela relação massa/massa e em oito amostras pela relação volume/massa. As massas dos óleos essenciais foram determinadas em balança analítica e seus valores comparados às respectivas massas do *Zingiber* em pó utilizada e os volumes foram determinados pela leitura no aparelho de Clevenger (Tallon-Netto, 2004).

### **b) Determinação do peso específico**

O cálculo do peso específico dos óleos essenciais foi feito aplicando-se a fórmula  $d=m/v$ , fixando-se um volume constante de óleo essencial (1mL) e determinando-se a massa. A razão entre a massa do óleo e o volume constante da amostra, em g/mL foi determinada em balança analítica seguindo a metodologia descrita no IAL (1985) a temperatura de 25°C.

### **c) Teores de zerumbona nos óleos essenciais dos rizomas de *Z.zerumbet***

Os teores do composto zerumbona (ZER) das amostras de óleos essenciais foram determinados por espectrofotômetro Ultravioleta (UV) com leitura em absorbância a 252 a 254 nm de acordo com o método de (Takahashi, 1987). Foram pesadas inicialmente 0,05 g das amostras de óleo essencial em balança analítica diretamente em balões volumétricos para os óleos obtidos por hidrodestilação, arraste a vapor e DCM, respectivamente. As amostras foram diluídas em metanol grau cromatográfico. Estas soluções foram diluídas e homogeneizadas de forma a se obter concentrações de 0,57 mg/mL e 0,002 mg/mL dos óleos obtidos por hidrodestilação, arraste a vapor e, respectivamente. Em seguida, as amostras foram novamente diluídas de forma que as leituras pudessem ser interpoladas em curva-padrão. Foi construída a curva padrão utilizando-se o padrão de zerumbona com grau de pureza de 97%, de acordo com a patente nº PI-0505343-9/28/11/2007 (Pinheiro, 2005). A solução padrão estoque foi preparada pesando-se 0,077g para balão volumétrico de 50 mL (0,154 mg/mL). Em seguida foram feitas cinco diluições da solução padrão estoque (2,5 a 8,75 mL) em balões de 25 mL o que correspondem as concentrações de: 0,015; 0,030; 0,038; 0,045 e 0,053 mg/mL. Essas soluções foram lidas em espectrofotômetro. UV-VIS (Shimadzu, Kyoto, Japão) em absorbância a 252 a 254 nm, em triplicata. Para o cálculo das concentrações (mg/mL) os valores encontrados para as leituras, foram comparados à curva padrão. O resultado foi expresso em mg de óleo essencial por 100g de amostra.

### **d) Análises dos óleos essenciais**

Os óleos essenciais e os extratos e foram analisados por cromatografia comparativa em camada delgada, utilizando-se solventes ou mistura de solventes de diversas polaridades e reveladores como iodo-ressublimado, luz ultravioleta e sulfato cérico e

anisaldeído, para a verificação da presença de terpenóides (Daí et al., 1997; Ohe et al., 2000; Tanaka et al., 2001).

### **4.3 Verificação do grau de pureza das substâncias**

O grau de pureza de cada substância foi verificado preliminarmente através de Cromatografia Camada Delgada Comparativa (CCDC), utilizando-se como fase móvel, solventes puros ou em mistura de solventes de diversas polaridades reveladas com os reveladores citados.

Nos casos de substâncias Isoladas que se apresentaram no estado sólido, foi determinado o seu ponto de fusão (PF).

#### **4.3.1 Especificação dos equipamentos utilizados na identificação estrutural dos cristais obtidos dos óleos essenciais dos rizomas de *Z. zerumbet*: Solventes Reagentes e Materiais Cromatográficos.**

##### **a) Solventes**

Os solventes e os reagentes comerciais utilizados nos processos cromatográficos e para os ensaios, foram produtos das marcas Carlo-Erba, Merck, Aldrich. O grau de pureza variou dependendo da finalidade do uso.

##### **b) Suportes e reveladores para cromatografia**

Sílica-gel G 60 Merck, para cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC).

As revelações foram efetuadas com vapores de iodo, irradiação ultravioleta de 254 e 366 nm de comprimento de onda, DPPH CSO<sub>4</sub><sub>2</sub>, anisaldeído, químicos.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN de <sup>1</sup>H) foram registrados em espectrômetro Varian-Mercury 500 MHz. (Centro de Biotecnologia da Amazônia - CBA). As amostras foram dissolvidas em CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD, D<sub>2</sub>O e usado TMS como padrão interno. Os espectros Ressonância Magnética Nuclear de Carbono treze (RMN <sup>13</sup>C) foram registrados em espectrômetros da Brüker mod. AC-200 operando a 50,3 MHz o solvente utilizado foram o CDCl<sub>3</sub> e o padrão utilizado como referência interna foi TMS. Os espectros na região do infravermelho (I.V), foram realizados em espectrômetro 1420 da

Perkin-Elmer utilizando-se pastilhas de Brometo de Potássio (KBr). Os Espectros de Massas (EM) foram registrados espectrômetros da Finnigan, modelo 4020.

O perfil cromatográfico das amostras foi também determinado por técnica analítica de separação por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) em fase estacionária líquido-sólido. Os cromatogramas obtidos da zerumbona obtida dos rizomas de *Z. zerumbet*, foram analisados utilizando-se um cromatógrafo marca Shimadzu coluna  $\mu$ -Bondapak CN, 100x8 mm tendo como fase móvel em água; metanol (80;20) a 6mL/min e detectado por absorvância e UV (254 nm). Essas análises foram realizadas em triplicata.

#### **4.4 Parte Farmacológica**

Para a determinação da atividade analgésica, antiinflamatória e a determinação dos efeitos tóxicos do composto zerumbona, utilizamos vários modelos teste estabelecido pela Organização Mundial da Saúde - OMS e de acordo com as normas técnica estabelecida.

##### **4.4.1 Testes de Atividade Analgésica, Anti-inflamatória e análise pré-clínica (toxicidade aguda dose simples e dose repetida) de Zerumbona obtida de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith.**

###### **4.4.1.1 Animais Experimentais**

Os animais utilizados nos experimentos foram camundongos albinos (*Mus musculus* - variedade albinus) pesando entre 18 a30 g, ratos albinos, machos e fêmeas do Biotério do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA, com peso variando entre 150 a300 gramas; e *Artemia salina* através de ovos adquiridos no comércio de Manaus-AM, provenientes da cidade do Arraial do Cabo-RJ e comercializado pela Maramar Aquacultura Ltda.

##### **4.4.2 Teste deAtividade analgésica do composto sesquiterpênico zerumbona (ZER) obtida dos rizomas de *Z. zerumbet*.**

###### **a) Teste de contorção abdominal induzida pelo ácido acético em camundongos**

O efeito analgésico central e periférico da substância foi avaliado pelo teste de contorções abdominais em 5 grupos de camundongos (n=5), induzidos pelo ácido acético 1% (0,01 mL/100 g; i.p.). O produto ZER dos rizomas de *Z. zerumbet* (50 a 1500 mg/Kg) foi administrado por via oral (p.o) 1 hora antes do agente nociceptivo. Dez minutos após a



administração do ácido observamos o número de contorções durante 15-120 min. Dipirona e indometacina (50 e 25 mg/kg, p.o.), foram utilizadas como padrões do teste (Koster, 1959).

#### **b) Teste da contorção abdominal induzida pela formalina**

O efeito antinociceptivo foi também avaliado pelo teste da formalina. Neste experimento observamos grupos de 5 camundongos que permaneceram lambendo a pata posterior esquerda após administração, via subcutânea, de 0,02 mL de formalina 2,5%. O composto Zerumbona, dos rizomas de *Z. zerumbet* (50 mg/Kg; p.o.) foi administrado 1 hora antes da injeção de formalina.

#### **c) Atividade nonceptiva produzida pela Capsaicina**

Ação do efeito analgésico foi também avaliado pela via da Capsaicina. A determinação da ação analgésica da Zerumbona foi testada na dor neurogênica +-Para isso, cada animal foi colocado individualmente dentro de um funil de vidro transparente, por um período de adaptação de 20 min. Após este período, os camundongos foram tratados p.o. com a Zerumbona na dose de 50 mg/kg por 1 hora antes da injeção intraplantar de capsaicina (20 µl; 1,5 µg/pata). Registrou-se, então, durante 5 min, o período em que o animal permaneceu lambendo ou mordendo as patas injetadas, medida esta indicativa de dor. Foi preparada a solução de capsaicina que é instável e não deve ser usada por mais de 20-30 minutos. Após este período, preparou-se uma nova solução (Calixto et al., 1990).

### **4.5 Teste da placa quente**

Este teste caracterizou-se pela colocação do animal sobre uma superfície aquecida a mais de 50°C que determinará uma resposta característica, na qual o animal troca rapidamente o apoio dos pés, levanta ou lambe as patas. O aparecimento destas respostas pode ser indicativo da intensidade da resposta nociceptiva a um estímulo térmico (Lapa, A.J. et. al., 2005). Os animais foram colocados individualmente no equipamento HOT PLATE F361-INSIGHT (figura 22) com temperatura constante de 52 a 54°C e dois valores basais são obtidos com intervalos de 30 minutos. Após a obtenção de dois valores basais os camundongos foram tratados, por via oral com doses (250 - 1500 mg/Kg p.o) e intraperitoneal (150 - 500 mg/kg i.p), com o produto ZER, veículo (salina 0,9 % + tween 20 1%), com as diferentes doses do composto ZER e fentanest (20µg/kg; controle positivo). A resposta é novamente avaliada decorridos 30, 60, 120, 180 e 360 minutos da administração das

drogas. O tempo máximo de contato do animal com a placa quente foi mantido em 25s, (tempo de corte) com o objetivo de evitar lesões nas patas dos animais.

A redução da temperatura da placa quente associada à aplicação de um estímulo inflamatório intraplantar forneceu um modelo simples e sensível para a avaliação da hiperalgesia térmica. Para tanto, após a obtenção dos valores basais (tempo de corte = 15 segundos), os animais foram tratados por via oral com o veículo (grupo controle, 10 mL/kg), com as diferentes da ZER ou fentanest 20  $\mu$ /kg; controle positivo).



**Figura 22.** Aparelho HOT PLAT utilizado no modelo experimental de atividade analgésica.

#### **4.5.1 Modelo de medida da Hiperalgesia utilizando o aparelho analgesímetro**

Neste ensaio foram realizadas as injeções subcutâneas de carragenina na pata de camundongos, induzindo o aumento agudo e progressivo do volume desta, evidenciando a intensidade da resposta inflamatória, sendo um parâmetro útil na avaliação da atividade analgésica e antiinflamatória de novos compostos (Lapa, A.J. et al., 2005).

Quatro a cinco grupos de camundongos foram estudados com cerca de cinco animais cada. Em todos, os animais era realizada a medida do volume basal de

ambas as patas, utilizando o aparelho LE 7306 Analgesy Meter. Em seguida os camundongos foram tratados por gavagem (v.o) e parenteral (i.p), sendo que os grupos tratados receberam ZER nas doses de 150 a 1500 mg/kg nas vias escolhidas, o grupo controle recebeu (10 mL/Kg) e o controle positivo recebeu opióide sintético fentanest (20 µg/kg), Indometacina (25mg/Kg) e salina (0,9 % + Twen 20 1%).

Uma hora após a gavagem (p.o.) ou via i.p o edema foi induzido nas patas traseiras dos animais, injetando uma solução de carragenina a 1 % e na pata contralateral injetado o mesmo volume de solução de salina (0,9 %).

Com o auxílio do aparelho foi possível determinar a resposta à estimulação da dor através da pressão aplicada à pata dos camundongos. Esta força é aplicada através de uma ponta cônica que pressionava o membro do animal posicionado em uma plataforma abaixo da ponta. Esta ponta move-se para baixo (aumento da força) e para cima (libera o estímulo) através de um motor controlado por um pedal.

Esta ponta cônica foi conectada a uma célula extensiométrica (medidor de força), que fazia a determinação da força real (g), que é exercida no momento da estimulação da ponta. No modelo de medição da atividade analgésica utilizando este equipamento permitiu uma rápida e precisa na medida da atividade nociceptiva nos animais utilizados nas avaliações (Figura 23).



**Figuras 23.** Aparelho Analgesimetro Digital utilizado no modelo experimental de hiperalgesia em ratos e camundongos.

#### 4.5.2 Atividade antiedematogênica; Edema de Pata Induzido por Carragenina

Para este teste utilizamos *Ratus norvegicus* machos ou fêmeas (200-300g) em grupos de cinco animais por grupo experimental tratados por gavagem (v.o) e parenteral (i.p) com a zerumbona 250 a 1500 mg/kg, grupo com salina (0,9% + tween20 2%) em volume igual ao do composto e um terceiro grupo com indometacina (25 mg/kg), escolhido como padrão positivo. Após uma hora dos tratamentos, injetamos nos animais na região suplantar (s.c) nas patas traseiras direitas com 0,01 mL de carragenina (1%) igual volume de salina (0,9%) na pata contra lateral. Imediatamente após a injeção, medimos o volume das patas e repetimos a medida a cada hora até completar 5 horas da injeção da carragenina. Para a medida dos volumes imergimos as patas traseiras até o maléolo lateral em um Pletismômetro Digital marca PAN LAB (Figuras 24 e 25). O volume líquido deslocado traduziu de forma digital o valor do edema é a diferença de volumes das patas injetadas. Ao final da experiência, representou-se a evolução do edema em função do tempo e testou-se estatisticamente a diferença entre os grupos (Winter, 1962).



**Figura 24.** Aparelho Pletismometro Digital utilizado no modelo experimental para medir o processo inflamatório em edema de pata de ratos e camundongos.



**Figura 25.** Processo de medição de edema de patas de ratos e camundongos.

#### **4.6 Edema de orelha induzido por óleo de cróton**

O efeito antinociceptivo foi também avaliado para este modelo, sendo utilizados cinco camundongos por grupo experimental (Calixto et al., 1990). Para este teste aplicamos topicamente 20 mL das substâncias testes (indometacina 50 mg/mL ou zerumbona 1 a 2 %) nas orelhas direitas e os veículos nas orelhas esquerdas dos animais, mantendo as soluções em contato com a orelha por 5 min. Uma hora após os tratamentos foi aplicado também topicamente 10 mL de óleo de cróton (5%v/v em acetona) na orelha direita e o mesmo volume de acetona na orelha esquerda. Após 4 horas, sacrificamos os animais por deslocamento cervical, retiramos os fragmentos de 6 mm de diâmetro de cada orelha e pesamos em balança analítica.

##### **4.6.1 Testes gerais de atividade farmacológica e toxicidade aguda de zerumbona (ZER) e extratos obtidos dos óleos essenciais de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith**

Os efeitos gerais de toxicidade do composto ZER e extratos diclorometânico (DCM) e metanólico (MeOH) obtidos dos óleos essenciais dos rizomas de *Z. zerumbet*, foram realizados utilizando-se camundongos (*Mus musculus*) e ratos (*Ratus norvegicus*) machos e fêmeas, com peso de 20-30 g e 200-300g. Dez (10) grupos de cada animal contendo 6 animais foram injetados nas via intraperitoneal (i.p) e por via oral (p.o), com o produto ZER e com os extratos, DCM e MeOH, nas doses de 10 a 5000 mg/Kg e um animal de cada grupo serviu de controle, injetando-se solução salina (0,9%) e Tween 20 (1%). Após, injeção de zerumbona, os animais foram observados acuradamente por 180 minutos sobre uma

superfície plana e deixados em observações posteriores de 24, 48 horas e 14 dias. Os parâmetros observados foram anotados em tabela adaptada da descrita por (Rocha et al., 1968). Todos os efeitos observados foram comparados imediatamente com os animais controle (Figura 26). Os testes gerais de atividades foram repetidos em ratos injetados com as mesmas dosagens e vias, sendo um deles reservados para controle (Rocha Silva, 1968 e Salustiano et al., 1966).



**Figura 26.** Aquário adaptado a medir a atividade exploratória de animais a nível campo aberto.

Com os resultados obtidos, outros grupos de animais foram tratados com doses maiores ou iguais por via oral (v.o). Os resultados foram representados por testes estatísticos, médias, erros e desvios padrão (Sokal et al., 1969).

#### 4.7 Análise pré-clínica em animais de laboratório

##### ✓ **Teste de toxicidade aguda (DL<sub>50</sub>) - doses: simples e repetidas**

A toxicidade aguda será avaliada via oral e/ou intraperitoneal pela determinação, em camundongos, da dose letal 50% (DL<sub>50</sub>) segundo o método de (Morrison et al., 1998; Litchfield, Wilcoxon, 1949). Doses crescentes de extrato foram administradas em diferentes grupos de camundongos após uma noite de completo jejum. No caso da via oral o extrato será suspenso em água ( $\pm$  PEG) e introduzido no esôfago do animal por meio de uma cânula e no caso da via intraperitoneal o extrato foi suspenso em solução salina e

administrado por injeção. Grupos controle (um grupo por dose e por via) receberam volumes dos respectivos veículos. Os animais permaneceram em observação diária por 14 dias, períodos durante o qual foi contabilizado o número de morte em cada grupo. A  $DL_{50}$  foi determinada a partir da representação gráfica da porcentagem de mortes observada em função da dose administrada.

Nesses estudos foram realizadas as avaliações estimativas e preliminares das propriedades tóxicas dos extratos ou substância Chan et al. (1982), isolada dos óleos essenciais dos rizomas de *Z. zerumbet* (L.) Smith. Nestes experimentos as análises farmacológicas nos forneceram informações importantes, acerca dos riscos para a saúde resultante de uma exposição de curta duração pela via escolhida em ratos e camundongos (Figura 27). A toxicidade aguda dos efeitos produzidos pelo ZER ou extratos foi avaliada em um curto período de tempo através da administração das substâncias diluídas em diferentes concentrações e vias diferenciadas por um período de 24-48 h, com acompanhamentos posteriores de 14 dias (Stoughton et al., 1964). Os animais que tiveram mortes, foram necropsiados para análise anatomopatológica e determinando a *causa mortis*. Após a tabulação dos dados obtidos, foram utilizadas as análises estatísticas de ANOVA uma via, seguida do teste ANOVA, teste Student-Newman-Kelus. Os valores foram considerados estatisticamente significativos em nível de 5% ( $P < 0,05$ ) das dosagens letais em valores de probitos ( $DL_{50}$ ).



**Figura 27.** Aquário adaptado a medir a atividade de toxicidade aguda em camundongos e ratos.

#### 4.8 Teste de toxicidade aguda doses: repetidas ou subcrônica

Foi avaliada através da exposição única e diária de ratos Wistar, ao veículo (1 mL/100 g pc) ou zerumbona nas doses de 500 e 1000 mg/Kg por um período de 30 dias. O peso corporal e a quantidade de água e ração foram monitorados diariamente ao longo dos 30 dias estabelecidos, assim como, a presença de sinais e sintomas de toxicidade (Wilson, 1994; Morrison et al., 1998). Ao final desse período os animais foram anestesiados e o sangue coletado através da veia cava inferior, para a realização de exames hematocritos (contagem de leucócitos, plaquetas, hemácias, Hb, Ht, VCM, HCM, CHCM e linfócitos) e bioquímicos (glicoses, TGO, TGP, albuminas, colesterol total, uréia e creatinina) em seguida os animais foram sacrificados e seus órgãos foram pesados e retirados para análises anatomopatológicas. Os exames foram analisados em laboratório de análises clínicas particular.

#### 4.9 Teste de toxicidade geral: *Artemia salina*

O bioensaio envolvendo *Artemia salina* consiste em avaliar a exposição de um determinado composto frente a esse crustáceo (Figura 28). A análise é feita mediante o cálculo da Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub>), ou seja, a concentração que dizima metade de uma população. O efeito tóxico de ZER e extratos naturais foram testados pelo método para se adequar às condições de nosso laboratório. O modelo utilizado consistiu em dissolver as amostras em determinado solvente e aplicá-las conforme concentração desejada nas placas de tratamento onde também foram colocadas 10 larvas de *Artemia salina*, em volume final de 4 mL. O controle continha somente o veículo e as larvas. Uma placa contendo um grupo controle para cada tratamento foi incubada a 28°C, sendo feita após 24 horas à leitura do número de indivíduos sobrevivente e morto. Os valores de CL<sup>50</sup> 24 horas, com limite de intervalo de confiança de 95% foram calculados de acordo com o método (Meyer et al., 1982).

Para cada amostra, os testes foram realizados em triplicata, numa concentração inicial de 500 µg/mL do extrato ou substância isolada. As atividades foram determinadas pelas porcentagens de mortalidades observadas após 24 horas de incubação. Para cada amostra ativa os testes foram repetidos em triplicatas, reduzindo a concentração para 250, 125, 65, 35 e 25 µg/mL de ZER ou extratos. As atividades foram determinadas pelas porcentagens de mortalidades observadas após 24 horas de incubação. Os resultados foram tabelados e



os valores da Concentração Letal Média (CL<sub>50</sub>), foram avaliados pela análise estatística pelo método em nível de 10% (Gomes et al., 1970).



**Figura 28.** Materiais utilizados nos ensaios para a atividade citotóxica em *Artemia salina*.

#### 4.9.1 Análises estatísticas dos experimentos

Os resultados, expressos através de Média±DP (ou EPM) e Mediana, serão organizados e resumidos na forma de gráficos, tabelas, quadros e figuras. A distribuição de frequência será obtida por meio da aplicação do teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ) sob IC95%. Todas as variáveis sob estudo serão testadas para a hipótese de normalidade. Para verificar diferenças significativas entre os grupos estudados (toxicidade, antiinflamatório e antitumoral), aplicar-se-ão, por meio de *software* validado (Origin<sup>TM</sup> 5.0 ou SigmaStat<sup>TM</sup>), os testes de análise de variância (ANOVA). Quando detectada diferença significativa entre os grupos, aplicar-se-á o teste “*t*” de Student e o teste de contraste de Tukey. Para a curva de sobrevivência dos grupos portadores do tumor e portadores/tratados utilizaremos o teste Log-rank. A variabilidade ou dispersão dos dados obtidos para um determinado parâmetro será medida através da faixa de variação ou *range* (diferença entre o valor máximo e o valor mínimo), desvio-padrão da média e variância. Para todos os grupos consideram-se estatisticamente significativos quando  $P < 0,05$  (Malone et al., 1996).

## ***5. RESULTADOS E DISCUSSÃO***

---

---

## 5.1 Obtenção dos Óleos Essenciais

### 5.1.1 Processo de Extração e Rendimentos de Óleos Essenciais dos Rizomas de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith.

Nas análises de variância dos percentuais de rendimentos dos óleos essenciais obtidos dos rizomas de *Z. zerumbet* (L.) Smith, verifica-se que nas médias dos rendimentos em função dos tratamentos aplicados nas extrações, houve aumento significativa extração com DCM (35,50mL/100g.), comparado aos obtidos (32,66mL/ 20,45g.) e arraste a vapor fresco e seco (17,17mL; 11,27g.) - Tabela 1.

**Tabela 1.** Métodos de obtenção dos óleos essenciais de *Z. zerumbet* (L.) Smith

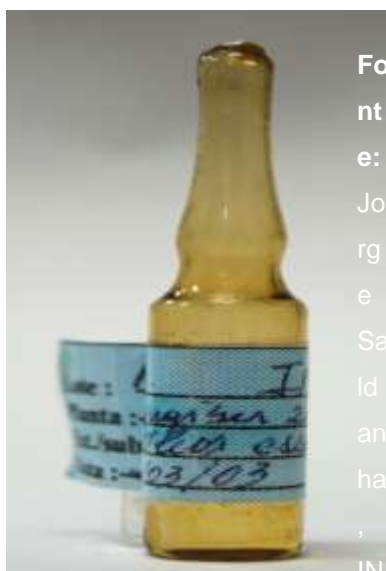
Rendimento (mL/100g) -Método de Extração									
TRATAMENTOS POR LOTES		ARRASTE A VAPOR		HIDRODESTILAÇÃO		DCM		MeOH	
<b>Frescos</b>	<b>MASSA(g)</b>	<b>*R/OE (%mL)</b>	<b>*R/OE (%g)</b>	<b>*R/OE (%mL)</b>	<b>*R/OE (%g)</b>	<b>*R/OE (%mL)</b>	<b>*R/OE (%g)</b>	<b>*R/OE (%mL)</b>	<b>*R/OE (%g)</b>
1	1.671,50	12,00	*1,71	28,00	1,89	-	-	-	-
2	2.560,10	17,50	1,66	37,50	**1,86	-	-	-	-
3	2.260,00	22,00	*1,97	32,50	**1,88	-	-	-	-
<b>Médias</b>		<b>17,17</b>	<b>1,78</b>	<b>32,66</b>	<b>1,88</b>	-	-	-	-
<b>Secos</b>	<b>Massa(g)</b>	<b>*R/OE (%mL)</b>	<b>*R/OE (%g)</b>	<b>*R/OE (%mL)</b>	<b>*R/OE (%g)</b>	<b>*R/OE (%mL)</b>	<b>*R/OE (%g)</b>	<b>*R/OE (%mL)</b>	<b>*R/OE (%g)</b>
1	155,00	13,01	*8,38	18,00	*11,61	-	-	-	-
2	165,00	10,95	*6,63	17,95	*10,30	-	-	-	-
3	225,50	9,84	*4,37	25,40	**11,28	-	-	-	-
<b>Médias</b>		<b>11,27</b>	<b>6,60</b>	<b>20,45</b>	<b>11,10</b>	-	-	-	-
<b>Extratos secos</b>	<b>Massa(g)</b>	<b>*R/OE (%mL)</b>	<b>*R/OE (%g)</b>	<b>*R/OE (%mL)</b>	<b>*R/OE (%g)</b>	<b>*R/OE (%mL)</b>	<b>*R/OE (%g)</b>	<b>*R/OE (%mL)</b>	<b>*R/OE (%g)</b>
1	210	-	-	-	-	35,00	**16,66	-	-
2	229	-	-	-	-	39,50	**17,24	-	-
3	210	-	-	-	-	32,00	*15,23	-	-
<b>Médias</b>		<b>Massa(g)</b>	-	-	-	<b>35,50</b>	<b>16,38</b>	-	-

\* Rendimento dos óleos

\*\* Valores das médias e erros padrão iguais indicam diferença significativa (ANOVA, P<0,05)

Os óleos essenciais obtidos quando adicionados a uma mistura de álcool 96°C (10%), água destilada (90%) e sequencialmente nos métodos de extração por arraste a vapor, hidrodestilação e por DCM, apresentaram características físico-químico semelhante, mas, diferenciaram-se pela cor dos obtidos por arraste a vapor d'água e mostraram coloração amarela clara, enquanto que, o obtidos com solvente DCM apresentam cor amarela mais intensa.

Ao avaliar os rendimentos em volume do óleo essencial por massa fresca e seca triturada de *Z. zerumbet*, obtidos pelos quatro métodos de extração, os resultados foram significativos, ou seja, os maiores rendimentos nas extrações com DCM, hidrodestilação e arraste a vapor. A extração por diclorometano (DCM), além de fornecer um maior rendimento, foi mais simples e rápida, mas com menor grau de pureza, enquanto que o extrato metanólico (MeOH) apresentou apenas uma matéria bruta, diferente dos outros processos de extração - (Figura 29).



**Figura 29.** Óleo essencial obtido por arraste a vapor dos rizomas de *Z. zerumbet* de Manaus-AM

### 5.1.2 Teores da substância zerumbona dos óleos essenciais de *Z. zerumbet*

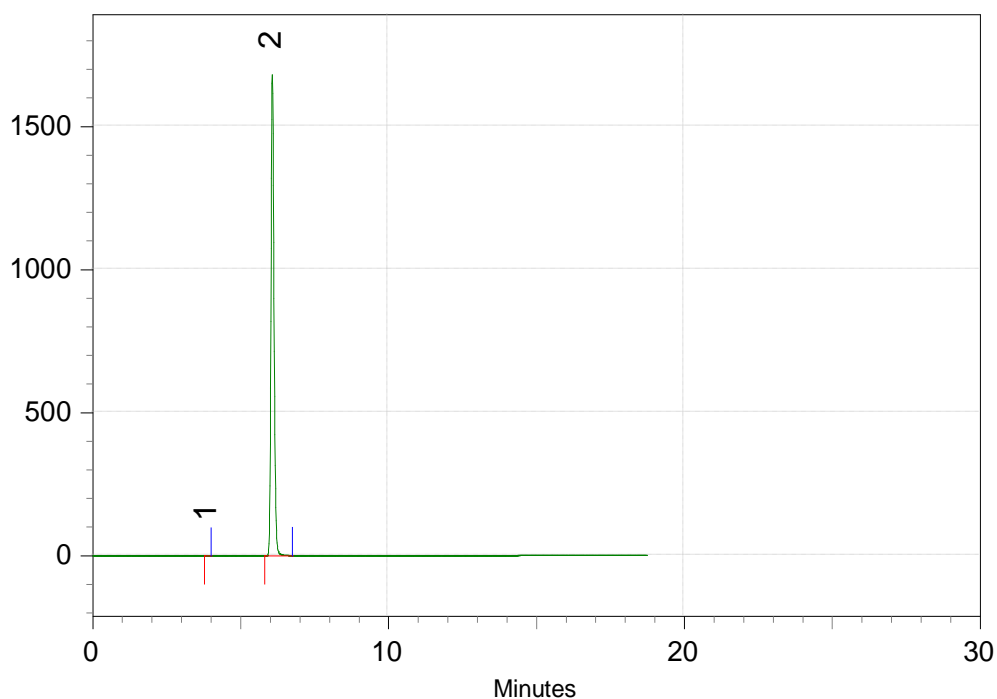
As análises dos cromatogramas de CLAE e gasoso dos óleos essenciais obtidos dos rizomas de amostras do produto zerumbona revelaram que as mesmas apresentam percentuais expressivos que variaram de 74,78 a 99,95% e banda de absorção em UV de

252 a 254 nm, com características e composição química semelhante de seus constituintes. Tabelas e seus respectivos cromatogramas, a seguir.

**Tabela 2.** Tempo de retenção e percentual de área do cromatograma dos cristais obtidos por arraste a vapor do óleo essencial de *Z. zerumbet*

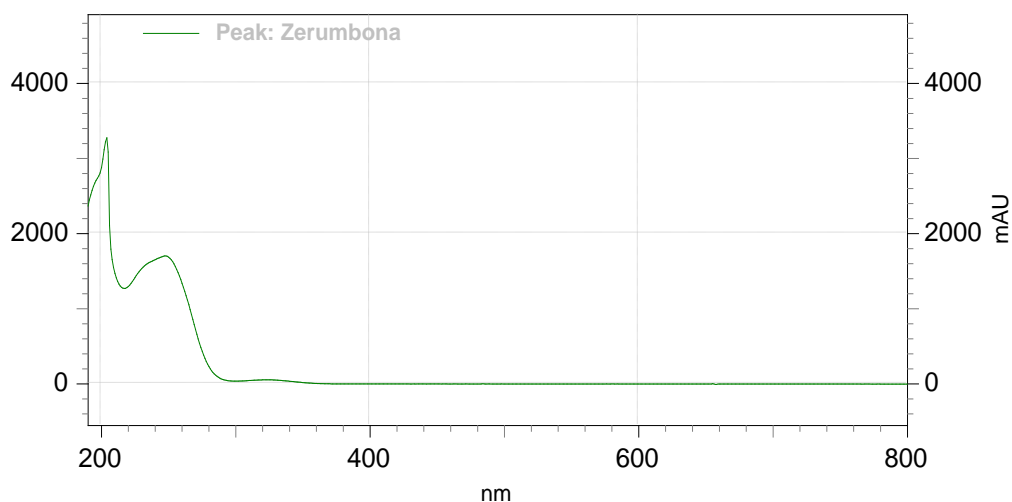
Detector A-252 NM				
Sinal	Nome	*T. R	Área	% da área
1		3.886	5550	0.05
2	Cristais - ZER	6.062		99.95
<b>Total</b>			<b>12100330</b>	<b>100.00</b>

\*Tempo de retenção



**Figura30(a).** Cromatograma líquido (CLAE) da zerumbona e dos rizomas de *Z. zerumbet* por amostras

Peak: Zerumbona

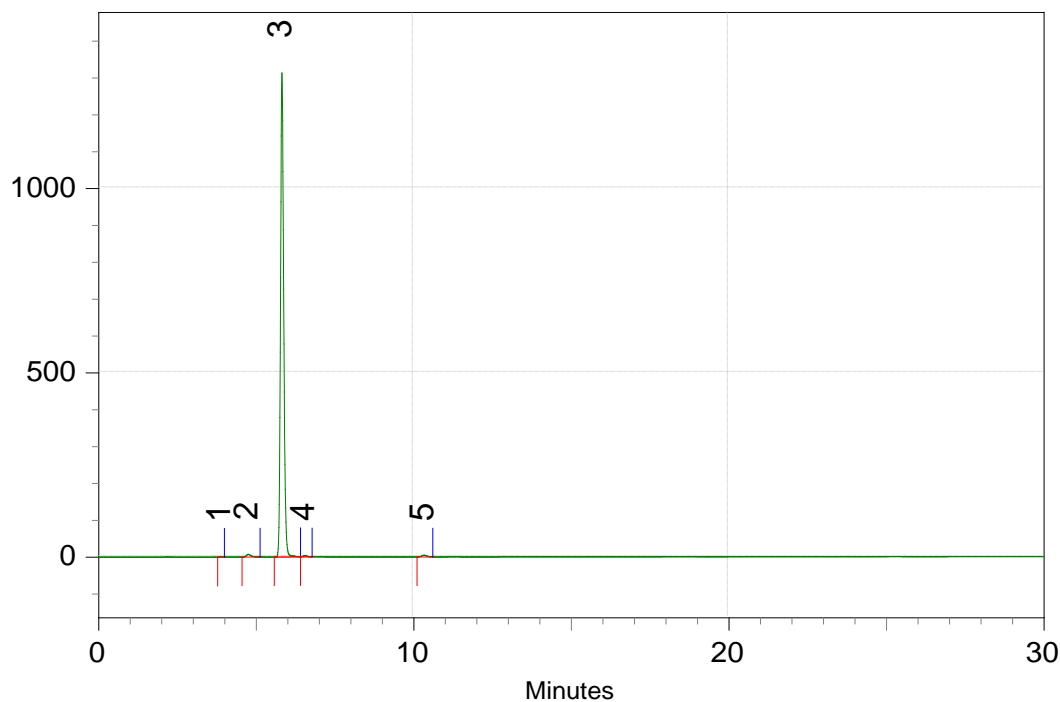


**Figura 30(b).** Espectro de absorvância obtido na região do ultravioleta (UV) dos cristais da zerumbona

**Tabela 3.** Tempo de retenção no cromatograma a gás e percentual de área do cromatograma dos cristais obtidos do óleo essencial de *Z. zerumbet*

Detector A-222 NM				
Picos	Nome	*T. R	Área	% da área
1		3.868	6204	0.07
2		4.741	74551	0.80
3	Cristais - ZER	5.809	9204396	98.27
4		6.541	30826	0.33
5		10.319	50064	0.53
<b>Total</b>			<b>9366041</b>	<b>100.00</b>

\*Tempo de retenção

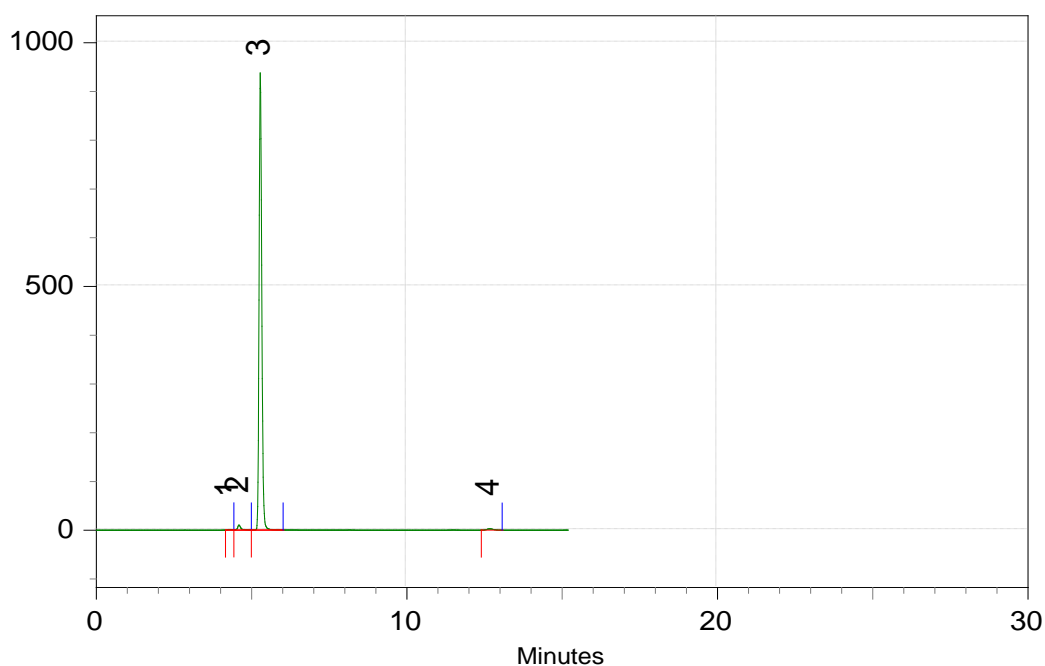


**Figura 31.** O cromatograma apresenta tempo de retenção e percentual dos cristais obtidos do óleo essencial de *Z. zerumbet*

**Tabela 4.** Tempo de retenção e percentual de área do cromatograma dos cristais obtidos hidrodestilação do óleo essencial dos rizomas de *Z. zerumbet*

Detector A-252 NM				
Picos	Nome	*T. R	Área	% da área
1		4.276	9507	0,16
2		4.587	75914	1,31
3	Cristais - ZER	5.274	5667707	97,87
4		12.665	37905	0,65
<b>Total</b>			<b>5791032</b>	<b>100,00</b>

\*T. R = Tempo de retenção



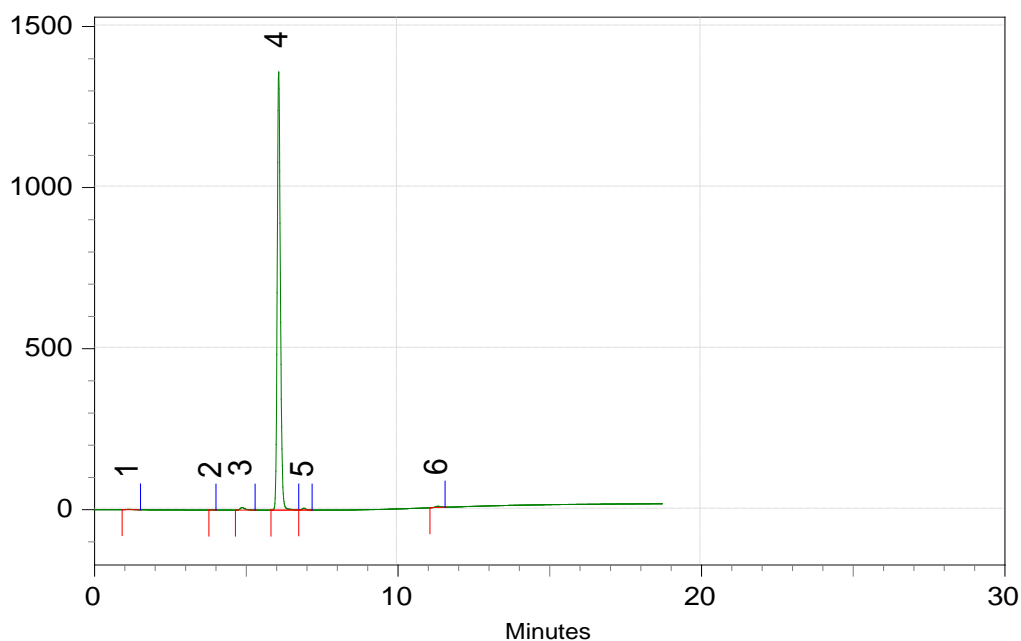
**Figura 32.** Cromatograma a gás e percentual dos cristais obtidos do óleo essenciais de *Z. zerumbet* por hidrodestilação

**Tabela 5.** Tempo de retenção no cromatograma a gás e percentual da zerumbona do óleo essencial obtido por hidrodestilação dos rizomas de *Z. zerumbet*

Detector A-222 nm				
Picos	Nome	*T.R	Área	% da área
1		1.133	20442	0.20
2		3.881	7474	0.07
3		4.859	88020	0.87
4	Zerumbona	6.062	9880287	97.95
5		6.894	47197	0.47
6		11.313	43995	0.44
<b>Total</b>			<b>10087415</b>	<b>100.00</b>

\*T. R = Tempo de retenção.

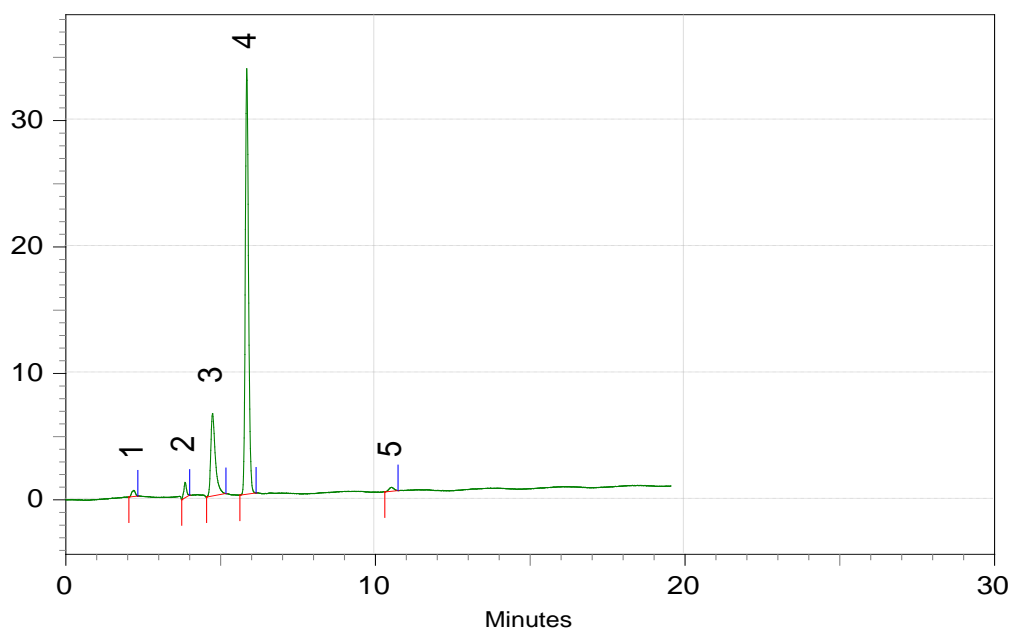




**Figura 33.** Processo de extração por Hidrodestilação: O cromatograma apresenta tempo de retenção e percentual dos cristais obtidos do óleo essencial de *Z. zerumbet*.

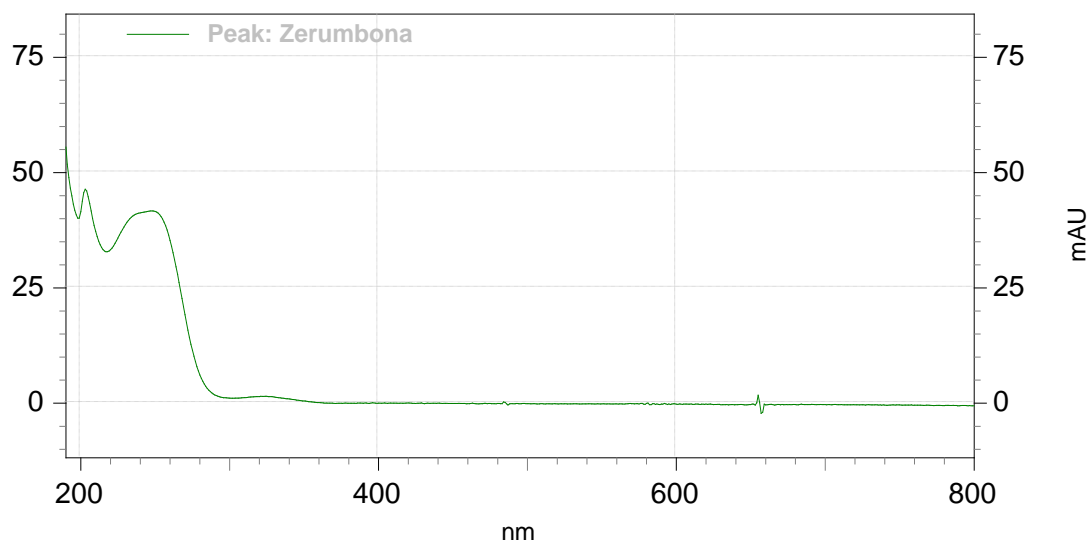
**Tabela 6.** Tempo de retenção e percentual de área do cromatograma de cristais de *Z. zerumbet* obtidos do óleo essencial por extração com DCM.

Detector A-222 NM				
Picos	Nome	*T. R	Área	% da área
1	-	2.192	4008	1.23
2	-	3.850	7433	2.29
3	-	4.734	66864	20.60
4	Cristais-ZER	5.840	242688	74.78
5	-	10.523	3560	1.10
			<b>324552</b>	<b>100.00</b>



**Figura 34.** Processo de extração por solvente (DCM) - Espectro de absorvância obtido na região do ultravioleta (UV) dos cristais obtido por extração dos óleos essenciais de *Z. zerumbet*.

Peak: Zerumbona

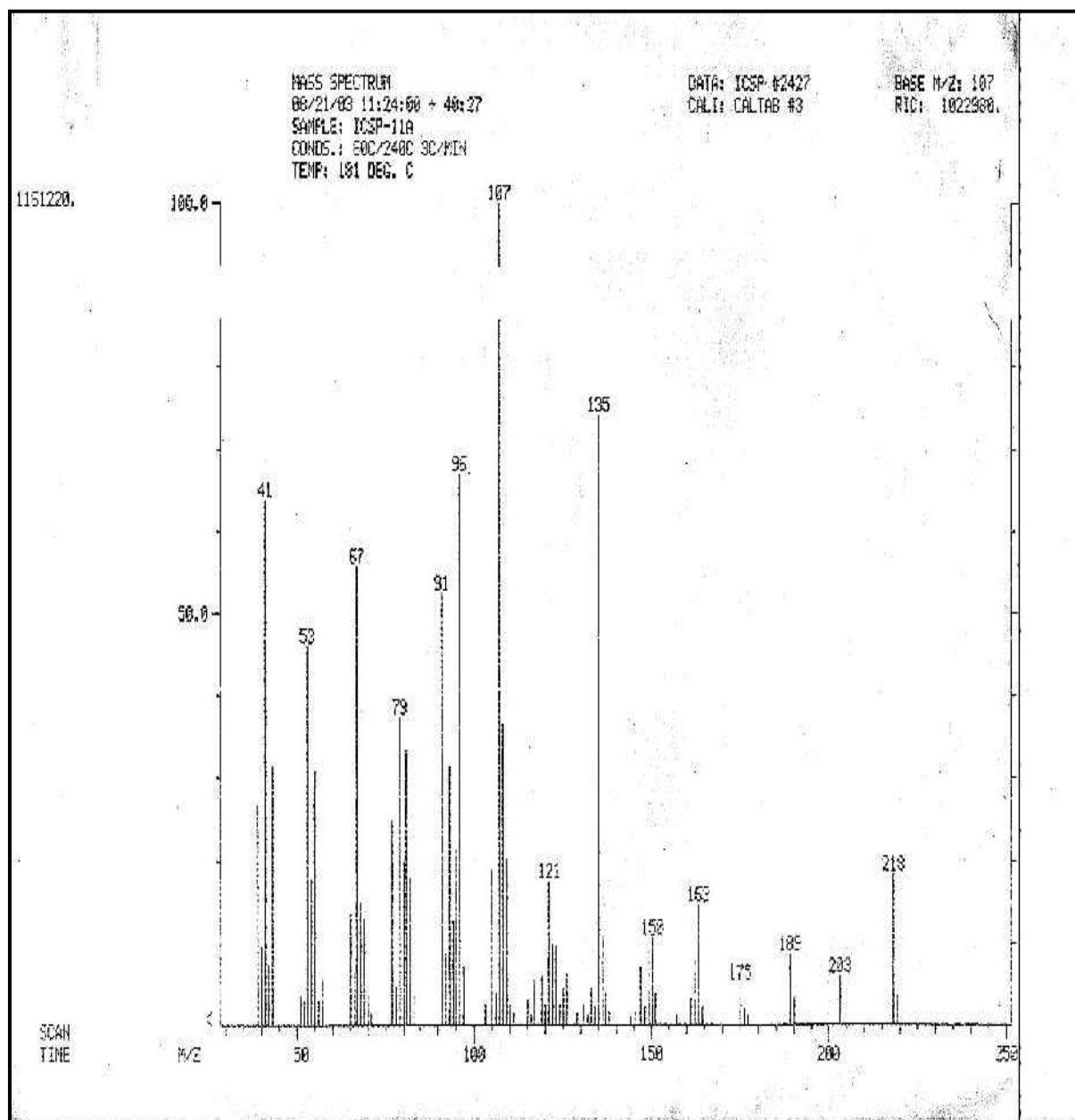


**Figura 35.** Espectro de absorvância na região do ultravioleta (UV) dos cristais obtido por DCM dos óleos essenciais de *Z. zerumbet*



**Figura 36.** Cromatografia a gás dos cristais obtidos do óleo dos rizomas de *Z. zerumbet*.

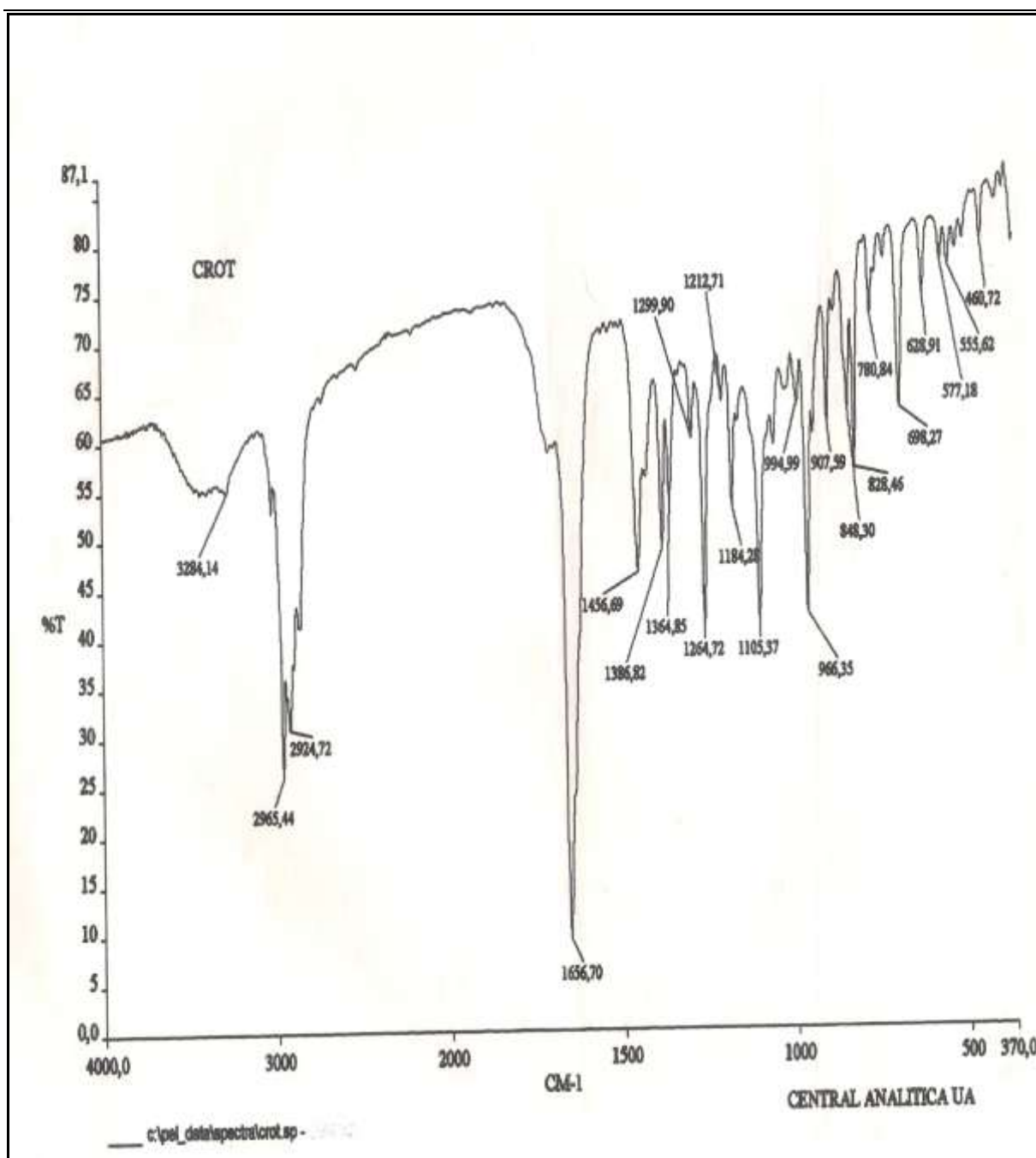
Os dados especificados nos espectros de massas, figura 37, mostram o íon molecular (m/z) 218, com fórmula molecular  $C_{15}H_{22}O$ , confirmadas com os dados da literatura (Daí et al., 1997 e Mattes et al., 1980).



**Figura 37.** Espectro de fragmentação de massas (EM) da substância recristalizada dos óleos essenciais

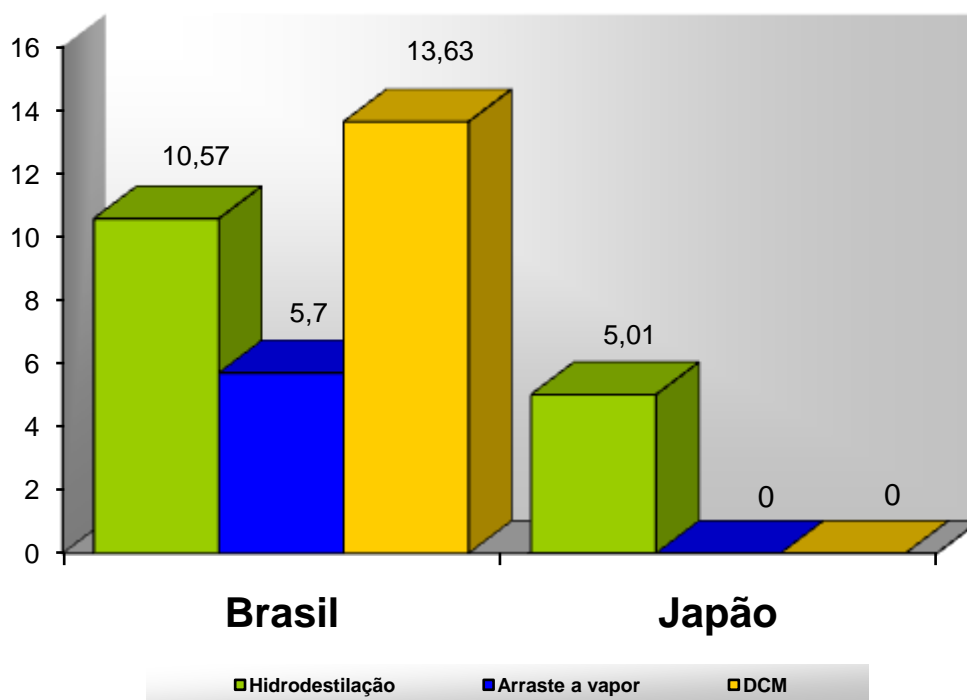
A figura 38 mostra o espectro de infravermelhos cristais obtidos dos óleos essenciais dos rizomas de *Z. zerumbet*, apresentou, bandas de absorções em 967, 1.656, 14

e  $1.456,92\text{ cm}^{-1}$  atribuídas aos estiramentos - C=O e C=C de carbonila e duplas conjugadas e em  $2969,31$  e  $1463,35\text{ cm}^{-1}$  indicativas de estiramentos C-H alifático, A ausência de absorção em aproximadamente em  $1520$ ,  $1600$  e  $3020\text{ cm}^{-1}$  comprova a característica alifática do composto (Mattes et al., 1980 e Murakami et al., 1999).



**Figura38.**Espectro na região do infravermelho (IV) da Zerumbona obtida dos cristais do óleo essencial.

Conforme a figura 39, observamos que o Japão é o maior detentor de patentes, mas, no que diz respeito ao rendimento de zerumbona, o Brasil é maior detentor.

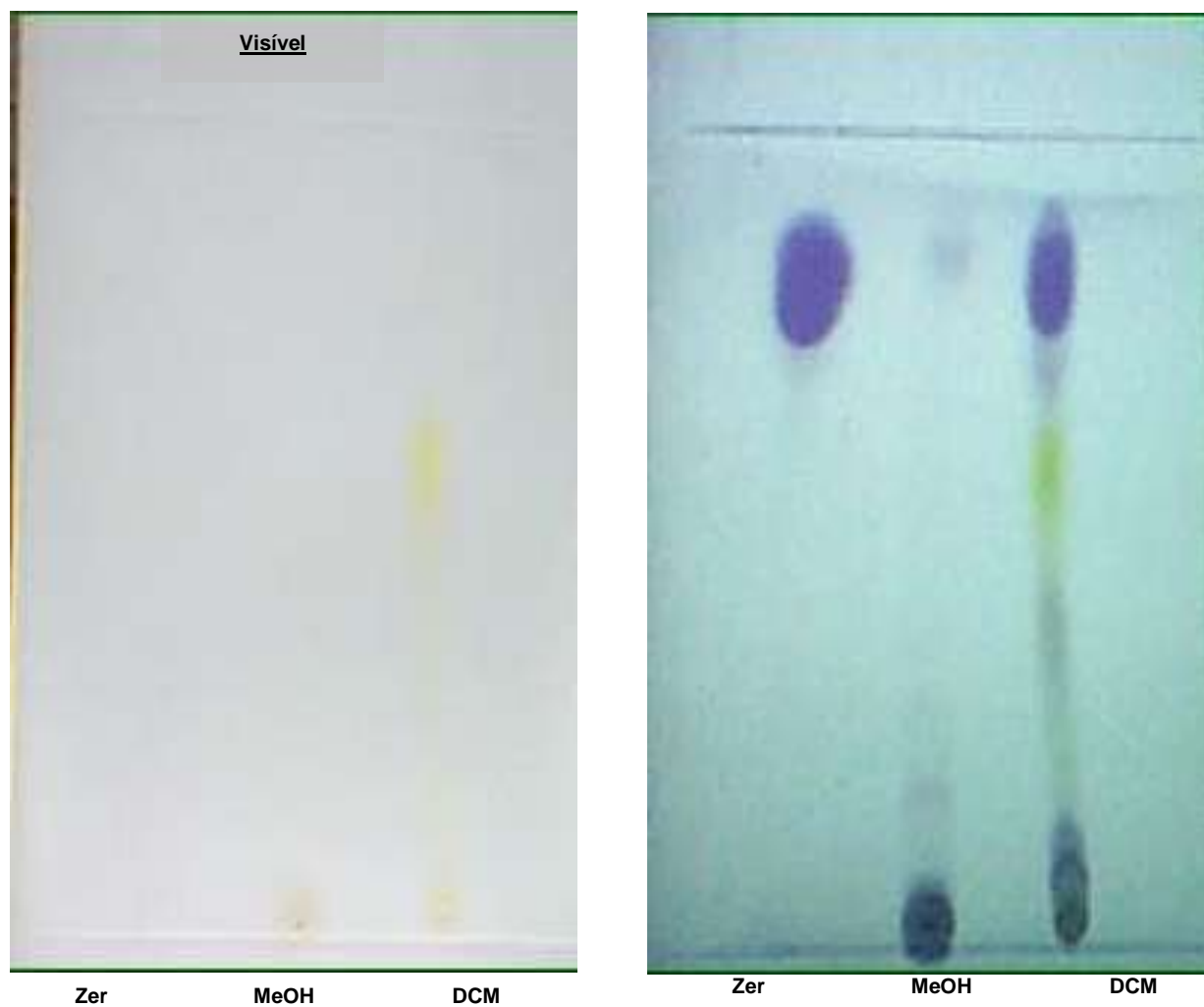


Fonte: Pinheiro (2005) e Chane & ming (2003)

**Figura 39.** Comparativo de patentes e rendimento da *Z. zerumbet* (L.) Smith

A revelação da placa cromatográfica com o sulfato cérico com anisaldeidocorou a substância recristalizada e o extrato DCM como uma mancha de coloração laranja escuro com  $R_f=0.7$ , todas positivas para o reagente utilizado, sugerindo-se que as substâncias testadas possuem características para terpenóides. A revelação da cromatografia em iodo o composto cristalizado dos óleos essenciais e o DCM, mostraram manchas com  $R_f$  iguais. Enquanto que o MeOH mostrou várias manchas com espectro de absorção em U.V a 354 nm com deslocamento do  $R_f$  diferentes das outras substâncias. Os cristais obtidos por hidrodestilação e arraste-vapor, e extrato DCM, quando revelados no UV mostraram coloração azul nas faixas de absorção em 252 a 254 nm, que pode ser indício da presença do sesquiterpeno zerumbona, pois este apresenta um grupo cromóforo, conforme mostram as figuras 40(a, b, c e d).

## SULFATO CÉRICO



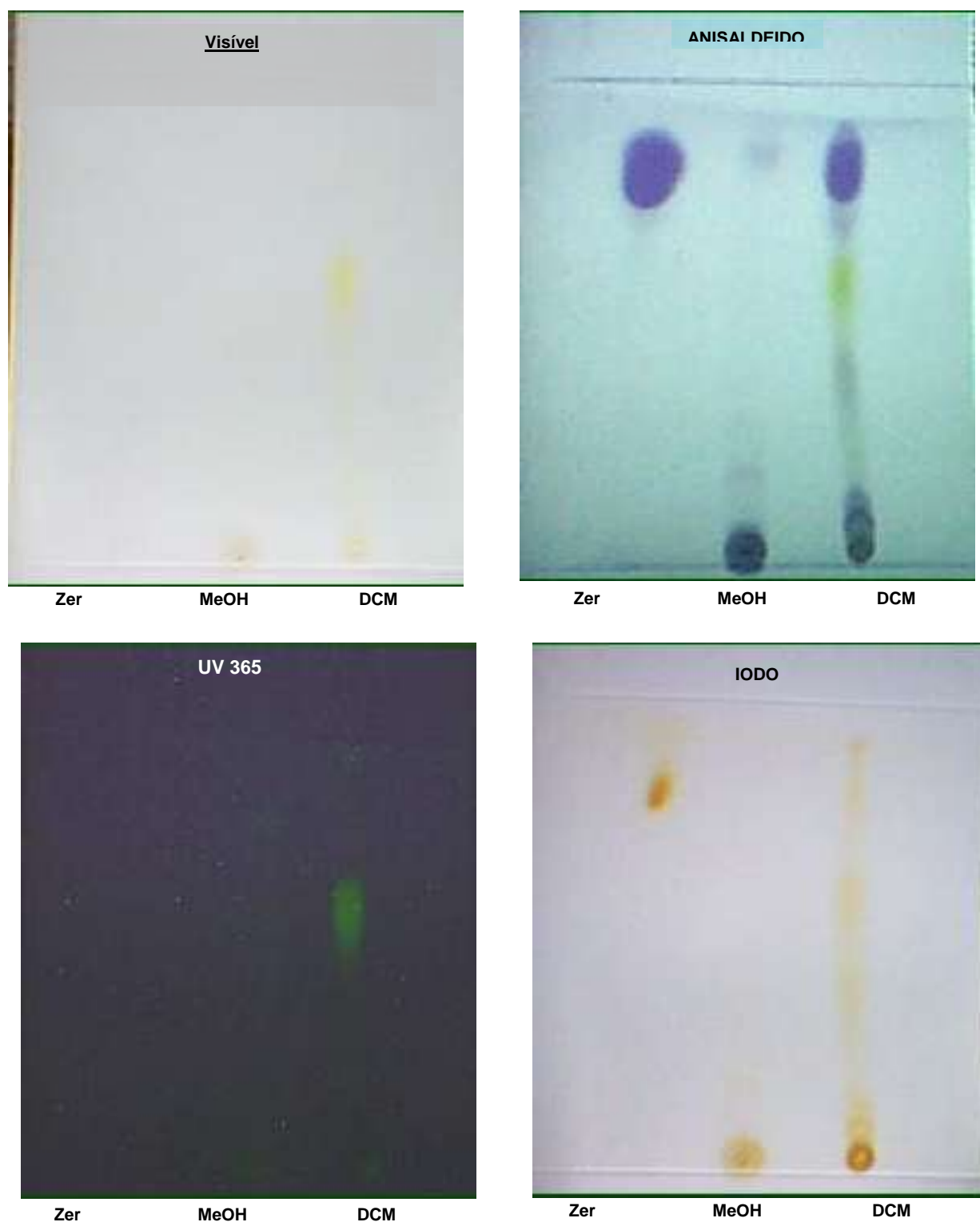
**Figura 40(a).** Cromatografia em camada delgada dos cristais e extratos diclorometânico (DCM), metanólico (MeOH) obtidos dos óleos essenciais de *Z. zerumbet*

IODO

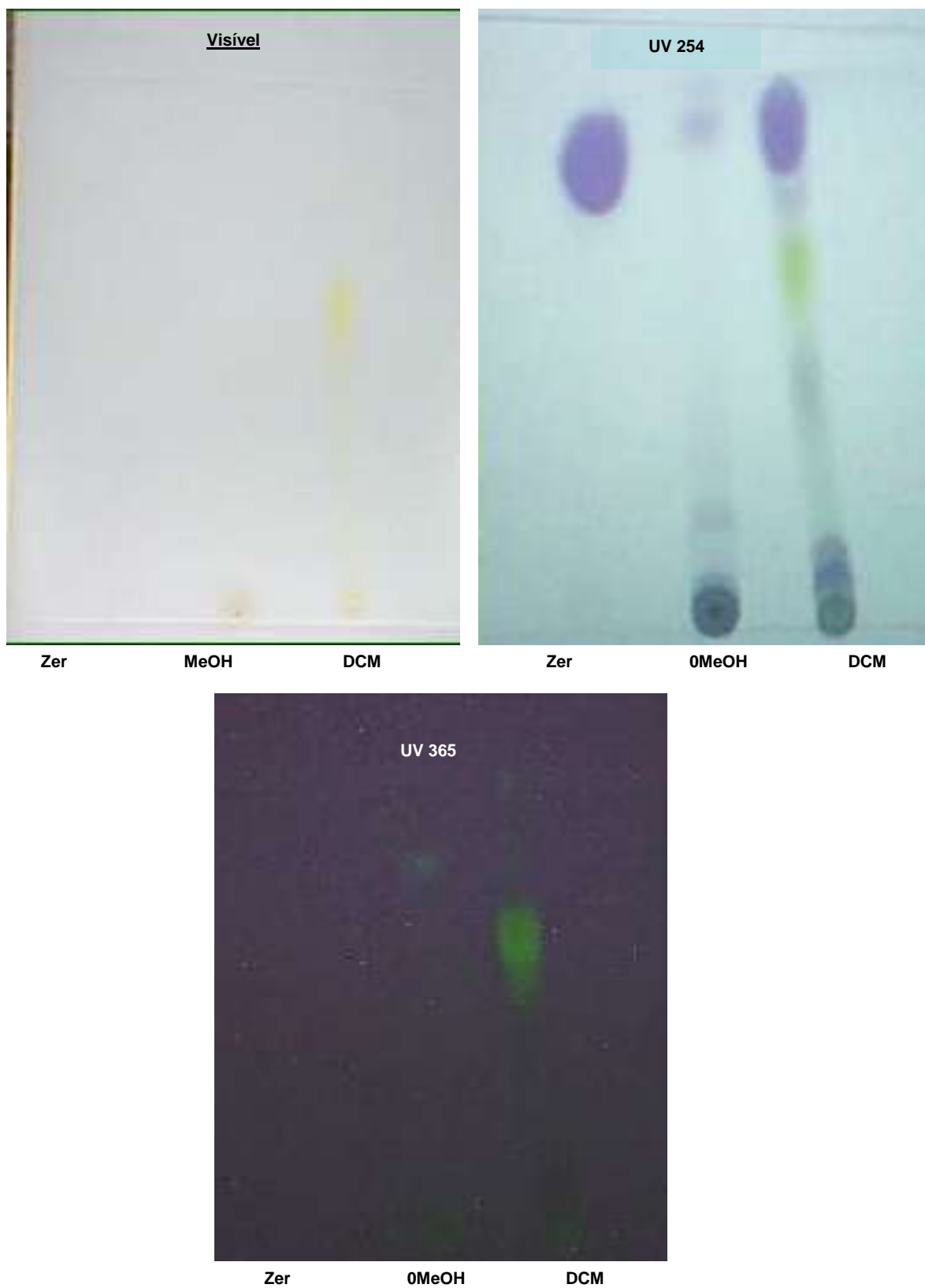


**Figura 40(b).** Cromatografia dos cristais e extratos diclorometânico (DCM), metanólico (MeOH) obtidos dos óleos essenciais de *Z. zerumbet*





**Figura 40(c).** Cromatografia em camada fina de sílica gel do composto recristalizado da zerumbona, óleos essenciais dos rizomas de *Z. zerumbet*



**Figura 40(d).** Cromatografia em camada fina de sílica gel do composto recristalizado da zerumbona, óleos essenciais dos rizomas de *Z. zerumbet*

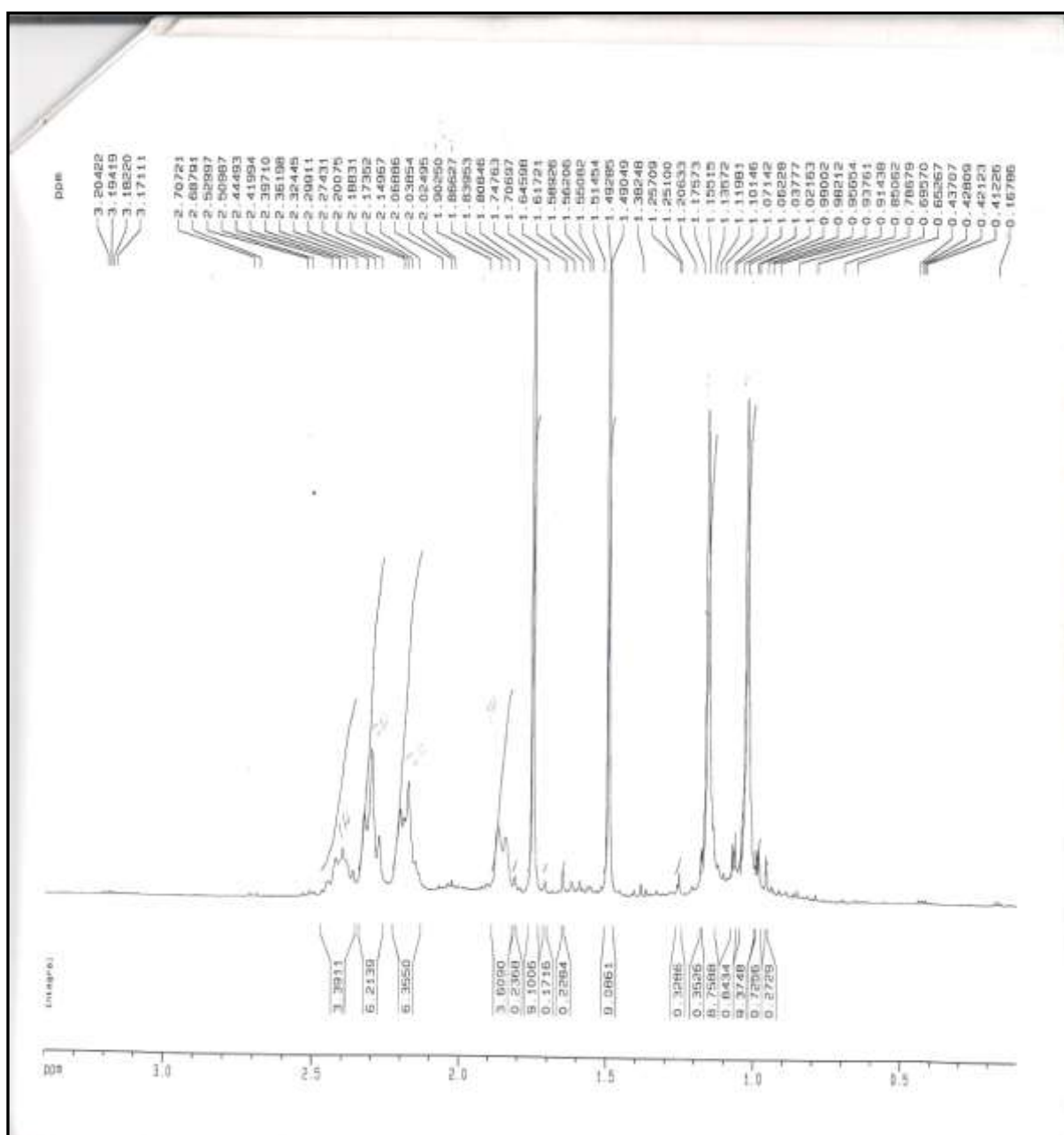
## 5.2 Determinação estrutural dos cristais recristalizados obtido dos óleos essenciais dos rizomas de *Z zerumbet* (L.) Smith

A tabela 7 exibe os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  que exibiram sinais de hidrogênios olefínicos à  $\delta$  5,25; 6,02; 5,99 e 5,87 com as multiplicidades semelhantes. Os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentaram sinais de 15 carbonos, sendo como 11 carbonos hidrogenados (4  $\text{CH}_3$ , 3  $\text{CH}_2$  e 4  $\text{CH}$ ), dados fornecidos pelo espectro DEPT-135.

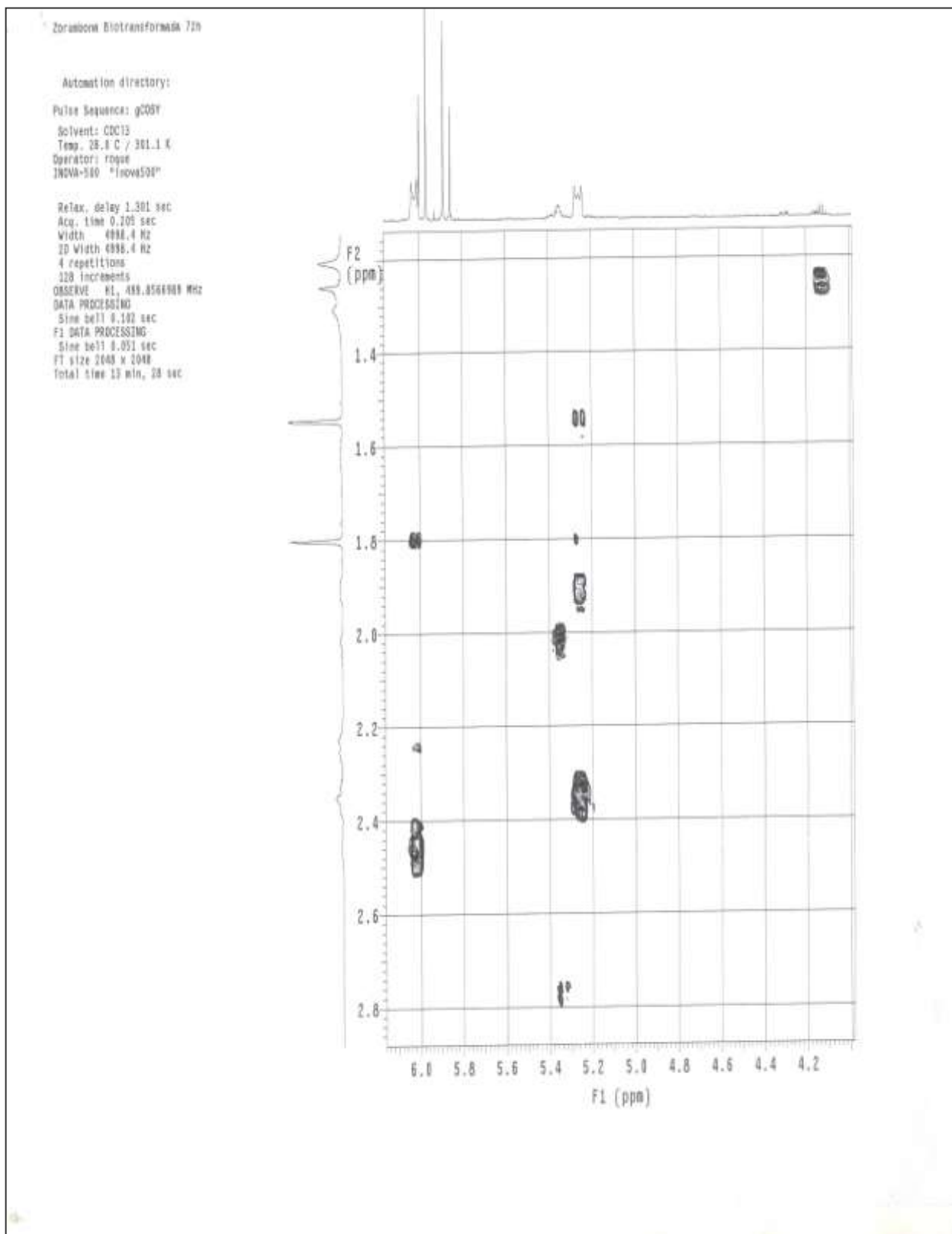
**Tabela 7.** Comparações entre os sinais dos deslocamentos químicos obtidos de dados espectroscópicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  e de  $^1\text{H}$  da literatura e de zerumbona obtida do óleo essencial dos rizomas de *Z. zerumbet* (L.).

RMN.C	Ref:	Zerumbona em $\text{CDCl}_3$		Hidrogênio	Ref:	Zerumbona.
	(Daí et al., 1997)	RMN $^{13}\text{C}$			(Daí et al., 1997)	RMN de $^1\text{H}$
	$\text{CDCl}_3, \delta$				em $\text{CDCl}_3$ . RMN $^1\text{H} \delta$	
C-1	42,2	42,37	$\text{CH}_2$	H-1	1,9 (d, J=16Hz) 2,2-2,5(m)	1,9 (d; J=16Hz) 2,17-2,36 (m)
C-2	125,0	124,97	CH	H-2	5,25 (dlJ= 16 Hz)	5,25(dl; J=16 Hz)
C-3	136,1	136,21	C	----	-----	----
C-4	39,4	39,39	$\text{CH}_2$	H-4	2,17-2,36 (m)	2,17-2,36 (m)
C-5	24,3	24,34	$\text{CH}_2$	H-5	2,2-2,35 (m)	2,17-2,36 (m)
C-6	148,5	148,74	CH	H-6	6,02 (dl; J=11Hz)	6,02 (dl; J=11Hz)
C-7	137,8	137,39	C	----	----	----
C-8	203,8	204,27	C=O	----	----	----
C-9	127,1	127,11	CH	H-9	5,93 (d; J=16,5Hz)	5,99 (d; J=16,5 Hz)
C-10	160,4	160,68	CH	H-10	5,87 (d; J=16,5Hz)	5,87(d; J=16,5 Hz)
C-11	37,8	3780	C	----	----	----
C-12	15,2	15,14	$\text{CH}_3$	H-12	1,55 (s)	1,55 (s)
C-13	11,7	117,1	$\text{CH}_3$	H-13	1,80 (s)	1,80 (s)
C-14	24,1	24,13	$\text{CH}_3$	H-14	1,08 (s)	1,07 (s)*
C-15	29,4	29,37- $\text{CH}_3$		H-15	1,21 (s)	1,21 (s)*

As figuras 41 e 42, mostram as placas contendo a zerumbona, extratos metanólico e diclorometânico eluídos com DCM/AcOEt (7:3). Os reveladores utilizados foram o sulfato cérico e anisaldeído, que tem alta especificidade para revelar inclusive pequenas quantidades de terpenóides. Nessas condições foi possível detectar terpenóides como os principais constituintes para a zerumbona e extrato DCM, mostrando também que o extrato MeOH, apresentou coloração branca com pequena quantidade de terpenóides.



**Figura 41.** Espectro RMN de  $^1\text{H}$  dos cristais obtidos dos óleos essenciais dos rizomas de *Z. zerumbet* (500 m/z  $\text{CdCl}_3$ )



de 15 carbonos, sendo como 11 carbonos hidrogenados (4 CH, 2 CH<sub>2</sub> e 4 CH<sub>3</sub>) dados  
 fo **Figura 42.** Espectro de COSY <sup>1</sup>H -<sup>1</sup>H acoplado dos cristais obtidos dos óleos essenciais  
 de *Z. zerumbet* (D Cl<sub>3</sub>, 500 m/z)

**Tabela 10.** Comparação entre os sinais dos deslocamentos químicos obtidos de dados espectroscópicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  e de  $^1\text{H}$  da literatura e de zerumbona obtida do óleo essencial dos rizomas de *Z. zerumbet*

## 5. Resultados: parte farmacológica

### ✓ **Teste da atividade antinociceptiva da substância zerumbona (ZER) nas contorções abdominais, induzidas pelo ácido acético em Camundongo.**

Os resultados obtidos apresentados nas tabelas 8 e figuras abaixo mostram que o sesquiterpeno ZER administrado intraperitoneal (i.p.) e por via oral (v.o) causaram inibição dependente da dose das contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético (0,8-2%) em camundongos.

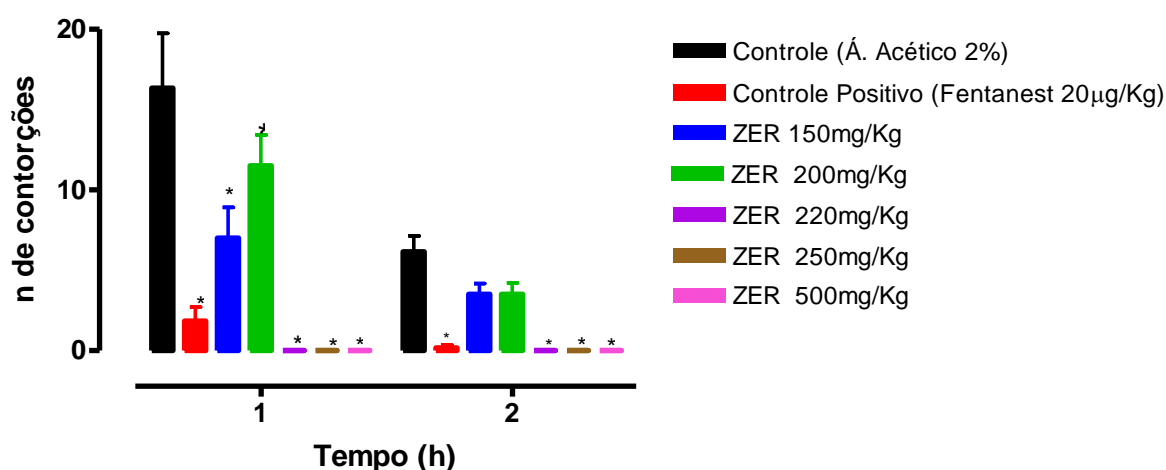
Os testes de contorção foram estatisticamente significativos tanto para a substância ZER quanto para o controle como fentanest (opióide sintético), os quais inibiram em 98,7% a 99,5% a dor (i.p ou v.o). Este efeito também foi observado, porém com maior intensidade com o aumento da dose e a via administrada para o composto ZER, o qual inibiu 100 a dor. O valor médio da  $DL_{50}$  (juntamente com seus intervalos de confiança de 95%) foi de 150,6 (200-500) mg/kg via i.p. e inibição foi de 97% nas doses de 250 a 1500 mg/kg, por via oral (v.o.).

O modelo inespecífico de dor foi utilizado para avaliar a atividade de drogas analgésicas quanto a ação central e periférica. O grupo de pesquisa de Duarte et al. (1988); Borsato et al. (2000) que descreve a quantificação de prostaglandinas por radio-imunoensaio no exudato peritoneal de ratos, obtidos após injeção i.p de ácido acético, observando-se altos níveis de prostaglandinas PGE2a e PGF2a durante os primeiros 30 minutos após sua administração. A administração intraperitoneal de ácido acético induz a liberação de prostaglandinas, mas também a liberação de mediadores do sistema nervoso simpático. Portanto, pode-se concluir que substâncias com atividade antiinflamatória podem estar envolvidas na atividade analgésica periférica - (Tabela 8).

**Tabela 8.** Efeito da substância ZER nas doses de 50-1500 mg/kg v.o e fentanest (20 µg/kg i.p) na resposta dor induzidas pelo ácido acético 2%

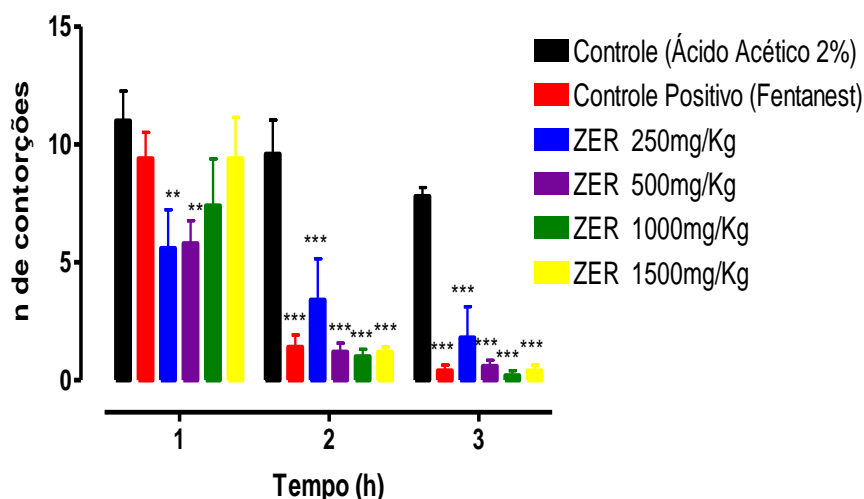
Tratamentos	Dose µg; mg/kg	Via	(%) de Inibição, contorções.			
			Tempo: 2 horas			
Veículo AA	2%	i.p	4,11 ± 0,36	3,82 ± 0,35	4,68 ± 0,55	5,70 ± 0,36
Fentanest	20	i.p	9,45 ± 1,14	12,4 ± 1,59	12,1 ± 1,7	12,8 ± 2,20
ZER	250	v.o	11,64 ± 1,77	8,64 ± 2,16	8,04 ± 2,52	8,53 ± 2,034
ZER	500	v.o	16,39 ± 1,02	10,18 ± 2,06	10,86 ± 1,78	18,01 ± 2,32
ZER	1000	v.o	17,04 ± 1,95	13,67 ± 2,33	13,45 ± 1,55	19,51 ± 0,49
ZER	1500	v.o	15,15 ± 0,35	16,55 ± 1,17	19,37 ± 0,16	20,86 ± 0,14

Os resultados obtidos no teste de contorção usando ácido acético foram estatisticamente significativos para a substância ZER v.o. e i.p e controle positivo dipirona, indometacina e fentanest (opióide sintético). Em dose-dependente inibiram 61,96 a 99,80% da dor duas a quatro horas após. Este efeito também foi observado, porém, com menor intensidade, com doses inferiores 50 mg/kg para a substância zerumbona, o qual inibiu 47,7% da dor em relação ao controle, como mostrado nas figuras 43, 44, 45.

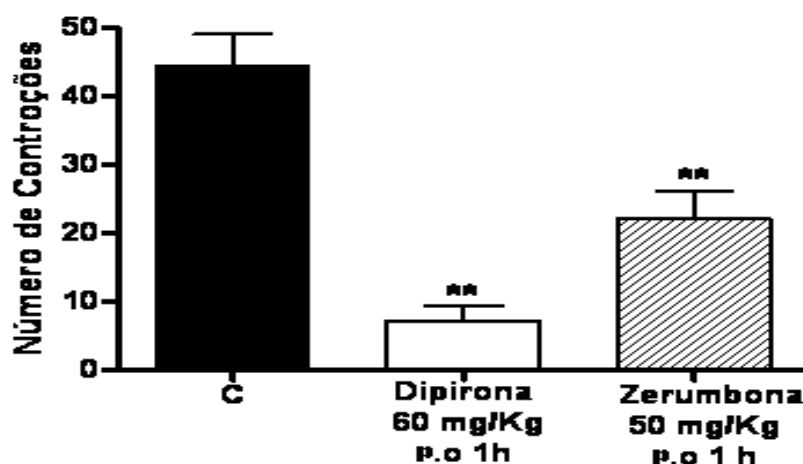


**Figura 43.** Percentual de inibição por i.p., obtida no teste de contorção induzida por ácido acético e expressa durante 3 horas. Os símbolos e linhas indicam as médias ± erro

padrão das médias do tempo (minutos) de reatividade ao estímulo térmico. \*indica diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ )



**Figura 44.** Percentual de inibição por v.o., obtida no teste de contorção induzida por ácido acético e expressa durante 3 horas. Os símbolos e linhas indicam as médias  $\pm$  erro padrão das médias do tempo (minutos) de reatividade ao estímulo térmico. \*indica diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ )



**Figura 45.** Efeito do produto Zerumbona 50 mg/Kg v.o., 1 hora no número de contorções induzidas pelo ácido acético 0,6% em camundongos. Os símbolos e linhas indicam as médias  $\pm$  erro padrão das médias do tempo (minutos) de reatividade ao estímulo térmico. \*indica diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).



Atualmente, o interesse para o uso de novas substâncias com atividade analgésica utilizadas principalmente para o tratamento de vários tipos de dor (tanto de origem neurogênica como inflamatória), vem aumentando significativamente. Vários modelos de dor em animais de laboratórios podem ser utilizados para verificar atividade analgésica de extratos e compostos. No entanto, de uma maneira geral, esses modelos possuem características próprias que devem ser consideradas, tais como simplicidade, reprodutibilidades e validade dos resultados obtidos e principalmente, a possibilidade de serem correlacionados com os estudos clínicos (Dickenson e Besson, 1997).

Dentre os modelos de dor utilizados neste trabalho de contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético é um modelo relativamente simples e com pouca especificidade, mas de fácil observação, rápido e com boa sensibilidade a várias drogas analgésica e antiinflamatória não esteroidais, bem como a drogas semelhantes a outros analgésicos que atuam centralmente. Além disso, os resultados obtidos correlacionam com várias classes de drogas analgésicas correlacionaram com outros estudos pré-clínicos, bem como em estudos clínicos (Siegmond et al, 1957 a, b; Koster et al., 1959; Blumberg et al., 1965).

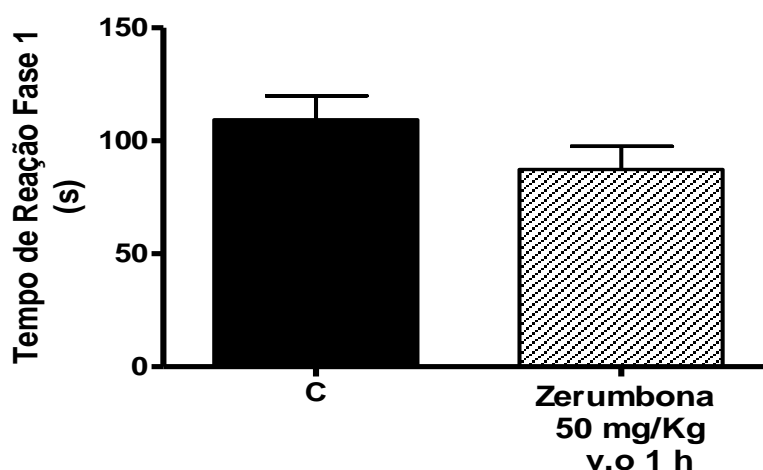
Foi postulado por Whittle (1964) que o ácido acético atua diretamente, causando a liberação de mediadores endógenos envolvidos na modulação de dor, incluindo a bradicinina, serotonina, histamina e as prostaglandinas.

Recentemente Ribeiro et al. (2000), mostraram que a nocicepção induzidas pelo ácido acético depende da liberação de citosinas, como IL- $\beta$  e a IL-8, a partir de macrófagos e bazófilos residentes na cavidade abdominal, e que em conjunto com outros mediadores podem induzir a nocicepção característica observada nesse modelo.

Utilizando esse teste foi possível demonstrar pela primeira vez que a substancia ZER quando administrada por via oral produziu inibição de mais de 100 %, do número de contorções abdominais provocadas pelo acido acético. Esse modelo descrito inicialmente em gatos e em ratos, por Dubuisson e Dennis (1977), vêm desde então sendo sistematicamente empregado para o estudo de drogas analgésicas.

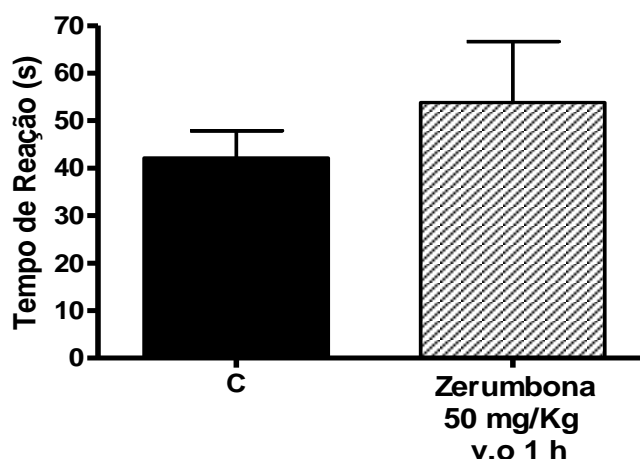
### **5.2.2 Teste de atividade analgésica de zerumbona (ZER), por estímulo químico do formol**

No teste da formalina 1%, a substância ZER na dose de 50 mg/kg, inibiu expressivamente os estímulo nociceptivo químico da formalina quando comparado com controle padrão. Neste modelo foi possível explicar os mecanismos da dor e analgesia, com melhores resultados nos testes de estímulos mecânicos ou térmicos. Os resultados mostrados na figura 46, apresentam inibição na primeira fase que representa o efeito irritante da formalina nas fibras sensorial.



**Figura 46.** Efeito da substancia ZER 50 mg/Kg v.o 1 h no modelo de dor induzido por formalina 2,5% (primeira fase) em camundongos. Os símbolos e linhas indicam as médias  $\pm$  erro padrão das médias do tempo (minutos) de reatividade ao estímulo térmico

Os efeitos da atividade analgésica da substância ZER na segunda fase, mostraram-se mais evidentes após duas horas. Os dose de 50 mg/kg (figura 47), no estímulo nociceptivo da resposta a dor inflamatória, mostrou uma ação analgésica de ação central tal como as drogas, aspirina e opióides que afetam as duas fases do teste; drogas de ação central, como os antiinflamatórios não-esteroidais e corticosteróides, inibem somente a segunda fase.



**Figura 47.** Efeito do produto Zerumbona 50 mg/Kg v.o 2 h no modelo de dor induzida por formalina 2,5% (segunda fase) em camundongos. Os símbolos e linhas indicam as médias  $\pm$  erro padrão das médias do tempo (segundos) de reatividade ao estímulo térmico

O modelo de dor induzida pela formalina consistiu na injeção intraplantar de solução de formaldéido na pata posterior do animal a qual desencadeia intensa a dor por estimulação direta dos nociceptores. A dor causada pela formalina é caracterizada por vigorosas lambidas, mordidas e batidas na pata injetada como irritante. A maioria dos estudos realizados com esse modelo utiliza roedores, predominantemente ratos e camundongos. Este teste é caracterizado por apresentar duas fases distintas à dor, que parecem envolver diferentes mediadores (Dubuisson e Dennis, 1977; Hunskar et al., 1985; Hunskar e Hole, 1987; Rosland, 1991).

Na primeira fase a dor inicia imediatamente após a injeção da formalina, estendendo-se pelos primeiros cinco minutos, o que acredita-se, ser devido a estimulação química direta dos nociceptores (Dubuisson e Dennis, (1977); Hunskar et al. (1985), predominantemente das fibras aferentes, em parte, de acordo com Heapy et al. (1987) e está associada a liberação de aminoácidos excitatório, óxido nítrico entre outros.

A segunda fase desse modelo ocorre entre 15-30 minutos após a injeção de formalina, e está relacionada principalmente com liberação de vários mediadores pró-inflamatórios como bradicininas, histamina, prostaglandinas e serotoninas, entre outros (Hunskar e Hole, 1987; Santos e Calixto, 1997).

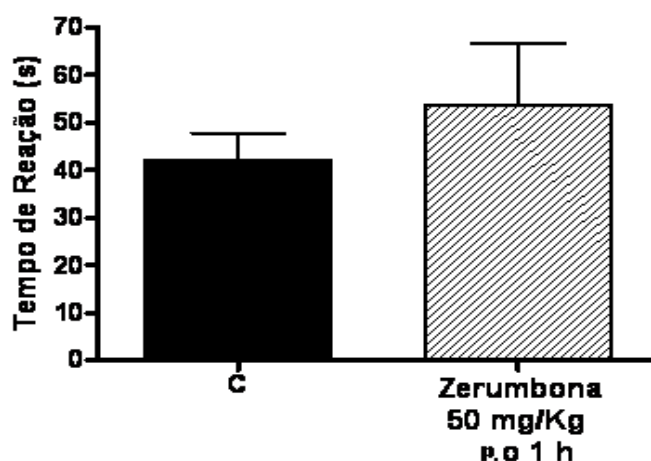
Os resultados deste estudo mostram que, quando avaliado no teste da formalina, a substância ZER, administrado via oral causou atividade analgésica máxima em 1 hora,

sendo significativa em até 6 horas após sua administração, em relação à segunda fase da dor induzida pela formalina.

Além disso, os dados desta pesquisa, também demonstram que a substância ZER, administrada v.o, produziu efeito analgésico significativo em dose dependente em relação a ambas as fases da dor induzida pela formalina, sendo, contudo mais efetivo em relação a segunda fase desse modelo. Dessa forma, os resultados reforçam a hipótese da importante atividade analgésica e/ou antiinflamatória.

### 5.2.3 Atividade analgésica de zerumbona (ZER), induzida pela dor da capsaïcina

O tratamento dos animais com a substância ZER (1-3%), causou redução significativa e dependente da dose da dor neurogênica induzida pelo edema de orelha através da injeção intraplantar de capsaïcina. Os resultados indicam que a substância zerumbona (ZER) na dose de 50 mg/kg quando comparado com o controle inibiu  $70 \pm 5\%$  da dor provocado pela capsaïcina, conforme e mostrado na figura 48.



**Figura 48.** Efeito do Produto ZER 50 mg/Kg v.o., 1 h no modelo de dor induzido por capsaïcina 1,6 µg/pata em camundongos. Os símbolos e barras verticais representam as médias  $\pm$  erro padrão de n=10 animais do tempo (segundos) de reatividade ao estímulo térmico

O resultado dessa resposta neurogênica mostra o composto possui um potencial analgésico a ser estudado como produto em dose dependente. Outro aspecto importante no presente estudo foi o fato que o ZER apresentou a mesma eficácia e potência nas doses dependentes administradas por via oral como por via i.p., sugerindo que a substância ZER

apresenta uma boa disponibilidade, o que torna este composto importante para um futuro fármaco com atividade analgésica. Os dados obtidos no modelo, revelam que a substância ZER, quando administrado v.o, foi capaz de inibir a nocicepção neurogênica causada pela capsaicina, abrindo, portanto, novas perspectivas para a utilização terapêutica neste tipo de dor.

#### 5.2.4 Atividade analgésica de zerumbona (ZER) no estímulo da placa quente (PQ)

A tabela 9 mostra a inibição da substância ZER, nos efeitos das respostas ao estímulo termoceptivo no modelo teste da placa quente (PQ) por via intraperitoneal (i.p) e por via oral (v.o), utilizado para medir a resposta à latência que de acordo com o método descrito por (Eddy & Leimback, 1953). Os camundongos (n=10) foram tratados com Tween 20 0,2% (0,1 mL/ 10kg), fentanest 10 20 µg/kg (i.p.) e 250-1500 mg/kg (v.o) de ZER. Foi colocado, individualmente, cada animal sobre a placa quente PQ (50±1)°C.

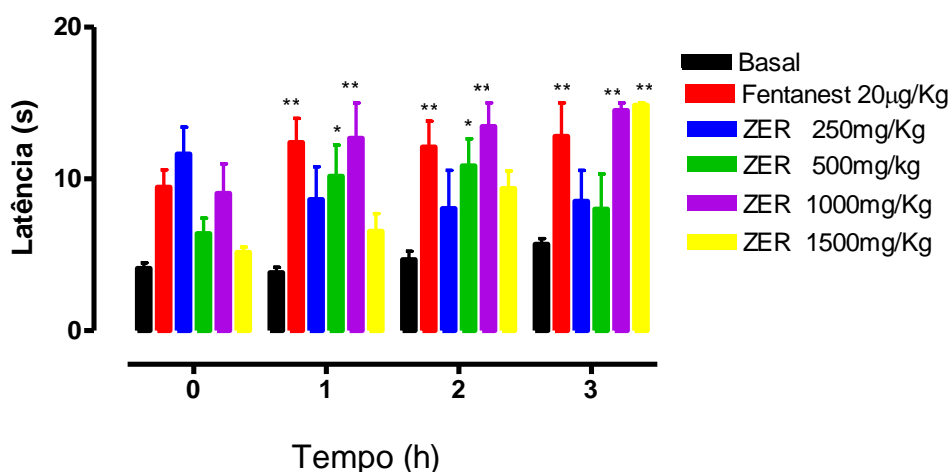
**Tabela 9.** Efeito da substância ZER no teste da placa quente, em camundongos. Dados expressam média ± EPM; a p < 0,05 em relação ao controle; p < 0,01 em relação ao controle; n = 10

TEMPO DE REAÇÃO (S)							
Basal							
Tratamento	Doses g/mgk-g	Via	30	60	90	120	180
Veiculo	-	i.p	4,11± 0,36	3,82±0,35	4,68±0,55	5,70±0,36	7,45±0,16
Fentanest	20	i.p	3,62±0,58;	3,62±0,61;	8,78±0,41	9,38±0,57	10,70±0,26
ZER	250	v.o	6,39 ± 1,10	7,59±1,98	10,18±2,06	10,86±1,78	8,01±2,33
ZER	500	v.o	8,09 ± 1,29	11,20± 2,26	12,67± 2,33	13,45± 1,55	14,51± 0,49
ZER	1000	v.o	5,15± 0,36	9,39± 0,32	12,85± 0,31	13,49± 0,26	14,95± 0,05
ZER	1500	v.o	7,18 ± 0,39	14,39± 1,34	15,05± 0,39	15,49± 0,29	15,95± 0,85

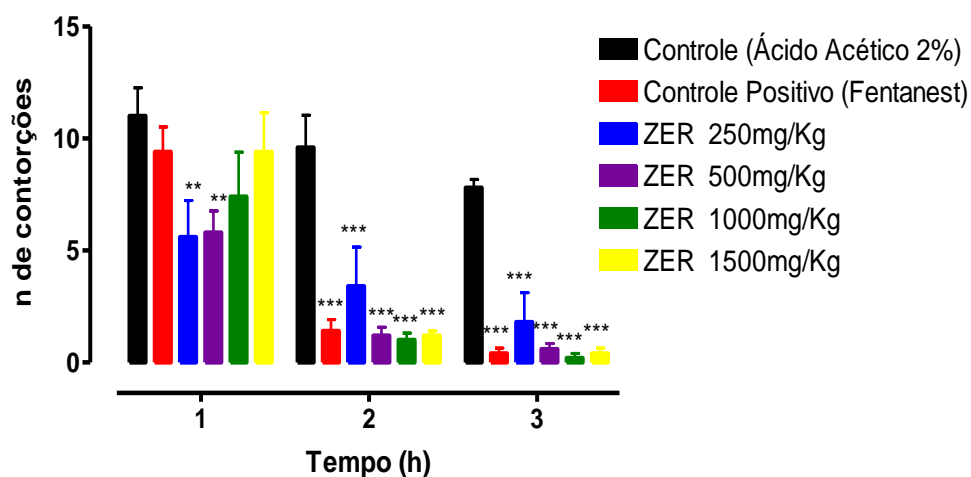
A medição do tempo foi interrompida quando o animal apresentou o comportamento instintivo de saltar sobre a placa e, logo em seguida, lambe as patas ou com 35 segundos, para evitar injúria tecidual. Foi realizada uma observação basal após 30, 60, 90 e 180 minutos dos tratamentos.

As temperaturas da PQ inferiores a 54°C elevam a variabilidade da medida devido ao aumento no tempo de latência. Em contrapartida, esta elevação permite uma melhor caracterização da resposta e uma redução da possibilidade de ocorrer lesão do tecido plantar, isto aumenta a confiabilidade e compensando a variabilidade (Lapa, 2005).

Os resultados obtidos no teste da PQ da substância ZER obtido de *Zingiber* por via i.p ou v.o (150-1500 mg/Kg) aumentou significativamente o tempo de latência dos camundongos em relação ao controle basal e positivo (fentanest) respectivamente. Em todos os experimentos, verificou-se aumento significativo no tempo de latência, minutos, em todas as doses via v.o ou i.p nas doses de 150 e 1500 mg/kg, propiciaram potencial efeito analgésico pelo aumento significativo do tempo de reação a PQ. Os resultados obtidos as doses de 500 a 1500 mg/Kg por v.o., mostrou potente efeitos significativos, aumentando o tempo de latência 99% dos animais à estimulação da dor. As doses 150 a 250 mg/kg por via i.p, após 180 minutos, mostraram-se extremamente significativas quando comparado com o controle basal e positivo, como são mostrados nas figuras 49 e 50.



**Figura 49.** Teste da placa quente por via oral (v.o). Os símbolos e linhas indicam as médias  $\pm$  erro padrão das médias do tempo (minutos) de reatividade ao estímulo térmico. \*indica diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).



**Figura 50.** Efeitos da administração da substância ZER (150-500 mg/Kg, i.p, fentanest 20 µg/kg, i.p. ou salina (basal), em camundongos expostos a um estímulo termoceptivo em modelo da placa quente. Os símbolos e linhas indicam as médias ± erro padrão das médias do tempo (minutos) de reatividade ao estímulo térmico. \*indica diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

A metodologia escolhida mostrou-se reprodutível e capaz de detectar variações induzidas pelo pré-tratamento com drogas não-esteroidais (DAINEs) ou analgésicos opióides, estando de acordo com o padrão de resposta relatado na literatura. Além disto, observamos que o número de medidas realizadas não interfere com o tempo de permanência na PQ, além de não ocorrerem modificações nos valores de patas normais (sem injeção de carragenina) afastando a possibilidade de que ocorra aprendizado da resposta ou de que a repetição do estímulo térmico cause lesões tissulares capazes de alterar a resposta. O padrão das respostas hiperálgica e edematogênica induzidas pela dose escolhida de carragenina (CG), 500 µg/pata foram consistentes em todos os experimentos realizados. A vantagem do uso desta dose é que ela, por si só, não induziu postura anti-álgica nos animais, o que inviabilizaria o teste da PQ - modificado.

As citocinas constituem uma ligação entre a injúria celular e o desenvolvimento de sinais e sintomas locais ou sistêmicos da inflamação. Neste contexto, foi demonstrado em um modelo de hiperálgica mecânica que a CG induziu uma resposta derivada da liberação combinada de produtos da ciclooxigenase e aminas simpáticomiméticas. Uma cascata de citocinas precede a geração destes mediadores. Tanto a CG quanto o lipopolissacarídeo bacteriano causam liberação de bradicinina, que estimula a liberação de TNF - Por sua vez o TNF - induz a liberação de IL-1 e IL-6, que estimulam a produção de produtos da COX e

de IL-8 que libera mediadores simpaticomiméticos). Esta seqüência de eventos foi confirmada em outros modelos experimentais. Por exemplo, as contorções abdominais induzidas pela injeção i.p. de ácido acético ou zimosa, em camundongos, também são mediadas por produtos da COX e aminas simpaticomiméticas (Ferreira e cols., 1972; 1979; 1985;). Estas citocinas parecem ser liberadas, inicialmente, pelos macrófagos peritoneais residentes e mastócitos, uma vez que a depleção destas células da cavidade abdominal de camundongos aboliu a resposta de contorções induzida pelo ácido acético ou pelo zimosa; além disto, o aumento no número destas células na cavidade peritoneal aumentou o número de contorção induzido por ambos os estímulos (Ribeiro e col., 2000).

A hiperalgesia é um fenômeno distinto da dor, embora ambas resultem da estimulação de um nociceptor (receptor de dor). No primeiro caso, o estímulo não chega a ativar o nociceptor, induzindo apenas a sua sensibilização, de modo que outros estímulos fracos, anteriormente não dolorosos, passam agora a produzir a sensação de dor. Por exemplo, após uma queimadura uma ligeira fricção da roupa sobre a área queimada pode ser dolorosa.

O estímulo algésico ativa os nociceptores porque abre os canais de sódio em sua membrana, causando uma variação em seu potencial eletroquímico de repouso. Desta forma, induz a geração de atividade elétrica que é conduzida pelos nervos sensitivos até o sistema nervoso central (SNC) é interpretada como dor. Na inflamação, ocorre a formação local de substâncias que podem causar estimulação dolorosa (bradicinina e histamina) ou hiperalgesia (prostaglandinas  $I_2$  e  $E_2$ ).

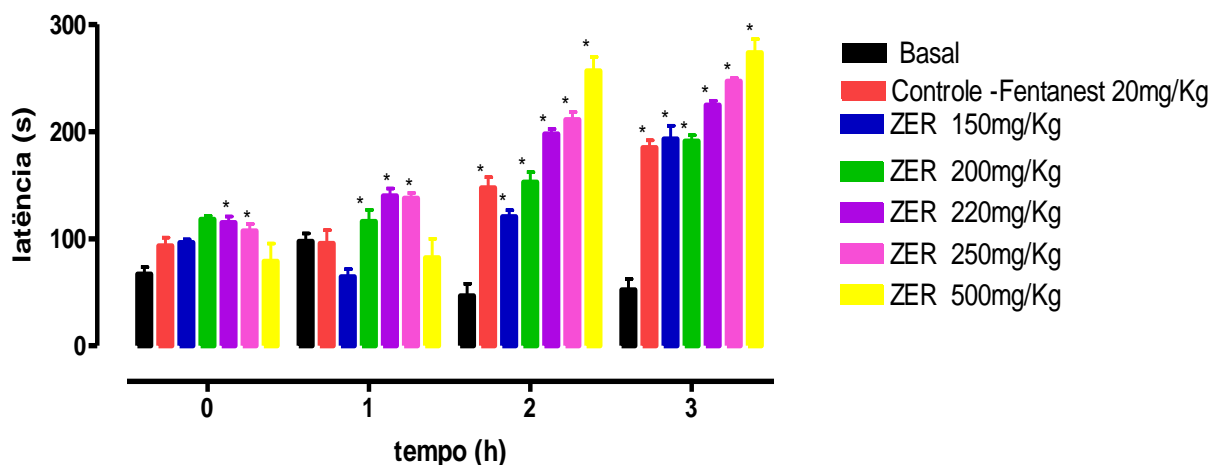
Segundo hipótese de Ferreira (1985), a hiperalgesia resulta de um aumento da concentração de AMPc e de  $Ca^{++}$  (importantes reguladores de vários processos fisiológicos e patológicos) nos nociceptores. A ação das prostaglandinas  $I_2$  ou  $E_2$  em receptores específicos existentes nas membranas dos nociceptores ocasiona este evento, que modula as “bombas iônicas” da membrana e facilita a atividade elétrica do nociceptor.

#### **5.2.5 Modelo de medida do efeito analgésico da substância ZER na hiperalgesia causado por estímulo mecânico (Analgésímetro)**

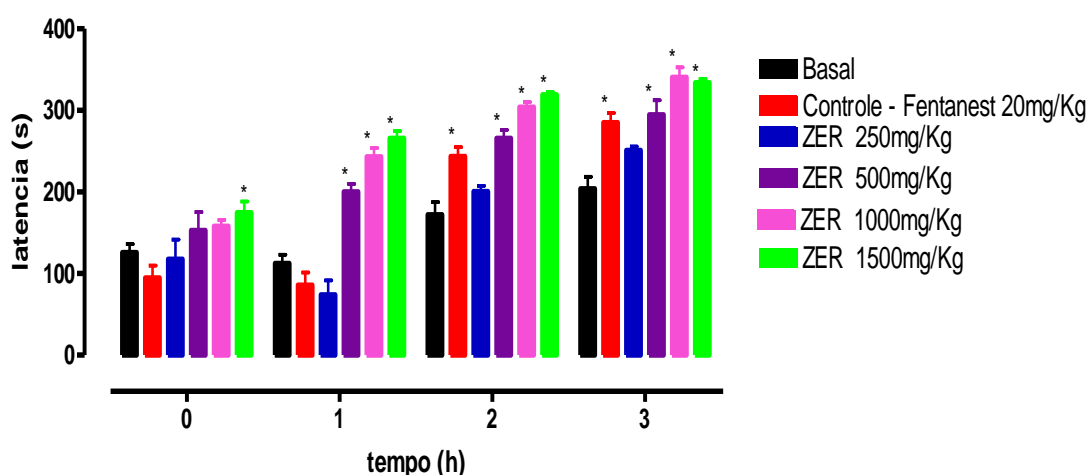
O tempo de reatividade ao estímulo mecânico da dor dos animais tratados com salina permaneceu estável, durante as três horas de observação, com resultados similares àqueles determinados no tempo zero ( $3,44 \pm 1,8$  minutos). O tratamento dos animais com Zerumbona (150-1500 mg/kg, i.p ou v.o.) alterou a resposta ao estímulo até 3 horas após a administração ( $3,52 \pm 0,21$  minuto). A aplicação de fentanest ( $20 \mu/Kg$ , s.c.) e zerumbona



aumentou o tempo de reatividade a aplicação do estímulo (força) em 660 % (figuras 51 a e b). Tais resultados demonstram que o composto zerumbona possui atividade analgésica periférica e central, a semelhança dos hipnoanalgésicos.



**Figura 51(a).** Efeitos da administração do composto zerumbona (150 a 500 mg/Kg, i.p.), fentanest 20  $\mu$ g/kg, i.p. ou salina (basal), em camundongos expostos a um estímulo mecânico de 50 Watts. Os símbolos e linhas indicam as médias  $\pm$  erro padrão das médias do tempo (minutos) de reatividade ao estímulo térmico. \*indica diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ )



**Figura 51(b).** Efeitos da administração do composto zerumbona (250 a 1500 mg/Kg, v.o.), fentanest 20  $\mu$ g/kg, i.p. ou salina (basal), em camundongos expostos a um estímulo mecânico de 50 Watts. Os símbolos e linhas indicam as médias  $\pm$  erro padrão das médias do tempo (minutos) de reatividade ao estímulo térmico. \*indica diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

### 5.3 Resultados e Discussões dos efeitos analgésico e antiinflamatório da substância zerumbona (ZER)

Os experimentos realizados com agonistas e antagonistas farmacológicos sugerem que os efeitos analgésicos causada pela substância ZER obtido de *Z. zerumbet* está provavelmente relacionada com uma interação com os sistemas opióide ou glutaminérgico sem envolver a via L-arginina-óxido nítrico e efeitos relaxante musculares ou sedativos sobre o sistema nervoso central e/ou periférico.

Os resultados desta tese mostram que, a substância ZER quando avaliada no teste da formalina, por administração via oral causou atividade analgésica máxima em 1 hora, sendo significativa em até 6 horas após sua administração, em relação à segunda fase do estímulo químico induzido pela formalina. Além disso, os dados deste estudo, também demonstram que o composto ZER, administrado v.o, produziu efeito significativo analgésico de forma dose-dependente em relação a ambas as fases pela formalina, sendo, contudo, mais efetivo em relação a segunda fase desse modelo. Dessa forma, os resultados reforçam a hipótese da importante efeito analgésico e/ou antiinflamatório.

Nesta pesquisa procurou-se analisar também a possível ação analgésica da substância ZER no estímulo químico da nocicepção neurogênica induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos, Sakurada et al. (1992), foram os primeiros a demonstrar que a capsaína na pata posterior de camundongos, causou vigorosa nocicepção, caracterizadas por lambidas e mordidas na pata injetada, sendo esse efeito relacionado com o estímulo de origem neurogênica.

Os resultados obtidos no modelo revelaram que a substância ZER quando administrada por via oral foi capaz de inibir os estímulos neurogênicos causado pela capsaicina, abrindo, portanto, novas perspectivas para a utilização terapêutica do composto ZER nestes tipos de dores.

Outro aspecto importante no presente estudo foi o fato que a ZER apresentou a mesma eficácia e potência, tanto na administração em dose dependente por via oral, como por via intraperitonal, sugerindo que esta substância, apresenta uma boa disponibilidade, o que torna este composto importante para um futuro fármaco com atividade analgésica.

A análise conjunta dos resultados obtidos com a ZER, nos modelos de nocicepção induzida pelo ácido acético, formalina, capsaicina, indicam que este composto apresenta

potencial terapêutico para o desenvolvimento de fármacos analgésicos, tanto que se refere ao controle da nocicepção de origem neurogênica como inflamatória.

Considerando que a nocicepção de origem neurogênica é muito complexa, e que até o momento não há alternativas terapêuticas satisfatórias para seu tratamento, esses resultados podem abrir novas perspectivas para o desenvolvimento de novas moléculas com potencial interesse terapêutico no tratamento da dor (Macfarlane et al., 1997; Furst, 1999; Millan, 1999).

Outro aspecto importante analisado no presente estudo foi a possibilidade do sesquiterpeno ZER em produzir efeito analgésico em modelo de nocicepção que utilizam estímulo nocivos térmico, como e o caso do modelo da placa quente. Este modelo foi descrito e modificado por Eddy e Leimback (1953), sendo bastante sensível para drogas que atuam em nível central. Além disso, este teste pode determinar hiperalgesia térmica bem como, pode servir de ferramenta para pesquisa de drogas analgésicas e anti-hiperalgésicas (Hwang e Wilcox, 1997; Carter, 1991).

É importante mencionar que as doses efetivas no teste da placa quente, a 50 °C, foram semelhantes àqueles necessário e eficaz efeito analgésico em modelo de estímulo químico, como no teste da formalina e da capsaïcina em camundongos. Além disso, pode-se observar na presente tese que o controle positivo fentanest (opioide sintético), foi efetivo em aumentar também o tempo a latência dos animais no estímulo da nocicepção térmica independente da temperatura utilizada. Isso talvez seja reflexo da diferença considerável dos estímulos, da integração das respostas a diferentes temperaturas (Julius e Basbaum, 2001).

Neste experimento ressaltamos que o resultado positivo no teste da placa quente, sugere uma importante participação de mecanismo supra-espinhais na mediação da potente efeito analgésico por via oral e parenteral (v.o ou i.p) demonstrada pela substância ZER.

### **5.3.1 Modelos de determinação da atividade antiinflamatória da substância zerumbona (ZER).**

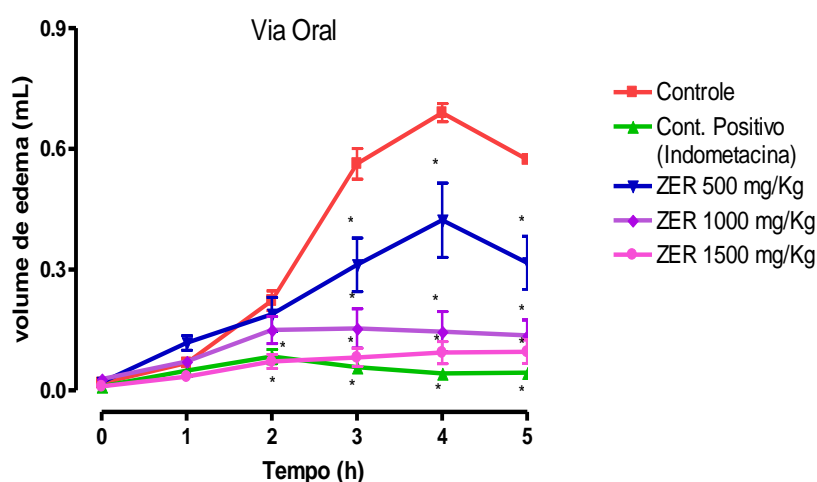
#### a) Medida do edema de pata induzido por carragenina em ratos

A tabela 10 e as figuras 52, 53 e 54, mostram os efeitos dos efeitos antiinflamatório de ZER (50-1500 mg/kg via i.p e v.o.), obtido dos óleos essenciais dos rizomas de *Z. zerumbet*

Smith. A indometacina reduziu o edema após 2, 3, 4 e 5 horas em 85,7%; 78,7%; 70,2% e 87,2%, respectivamente, em relação ao controle. Estes resultados são indicativos de que a substância zerumbona esteja inibindo a liberação de mediadores químicos da inflamação via prostaglandinas, indicando assim que o composto possui potente ação antiinflamatória.

**Tabela 10.** Percentual dos efeitos antiinflamatório em edema de pata de rato da substância zerumbona (ZER) por via intraperitoneal (i.p.) e por via oral (v.o.)

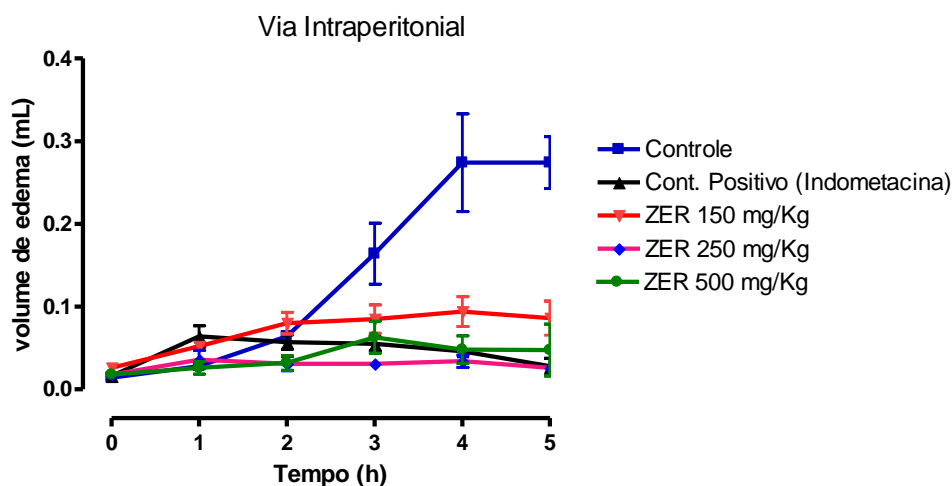
Tratamento (i.p.)	Carragenina (1%)	Fentanest (20µg/Kg)	ZER (250 mg/Kg)	ZER (500 mg/Kg)
Tempo (h)	Média ± EP (mL)			
0	0,36 ± 0,012	0,12 ± 0,006	0,07 ± 0,014	0,03 ± 0,010
1	0,11 ± 0,016	0,15 ± 0,016	0,14 ± 0,011	0,07 ± 0,010
2	0,28 ± 0,016	0,12 ± 0,023	0,16 ± 0,021	0,16 ± 0,041
3	0,46 ± 0,027	0,12 ± 0,024	0,20 ± 0,040	0,16 ± 0,037
4	0,54 ± 0,025	0,10 ± 0,014	0,14 ± 0,060	0,12 ± 0,026
5	0,38 ± 0,026	0,06 ± 0,015	0,31 ± 0,068	0,08 ± 0,017



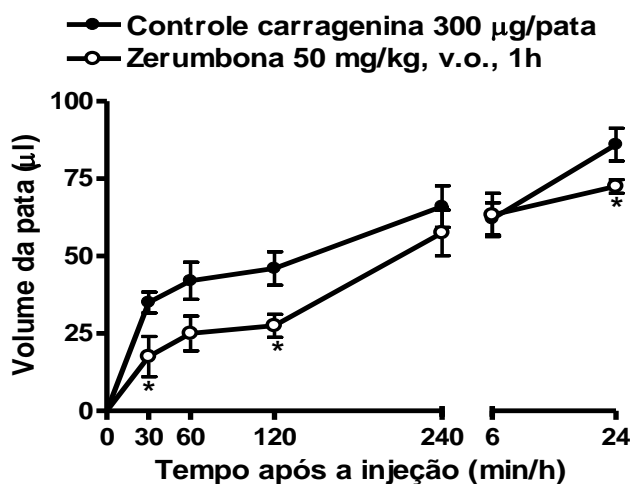
**Figura 52.** Efeitos da administração v.o. de zerumbona (500-500 mg/kg), indometacina (Indom, 25 mg/kg) ou salina (controle) em ratos injetados com carragenina 1% (s.c.) na pata traseira esquerda e salina na direita. Os símbolos e linhas indicam as médias ± erro

padrão das diferenças de volumes entre as patas direita e esquerda de cada animal.

\*indica diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ )



**Figura 53.** Efeitos da administração i.p de zerumbona (150-500 mg/kg), indometacina (Indom, 25 mg/kg) ou salina (controle) em ratos injetados com carragenina 2% (s.c.) na pata traseira esquerda e salina na direita. Os símbolos e linhas indicam as médias  $\pm$  erro padrão das diferenças de volumes entre as patas direita e esquerda de cada animal. \* indica diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ )

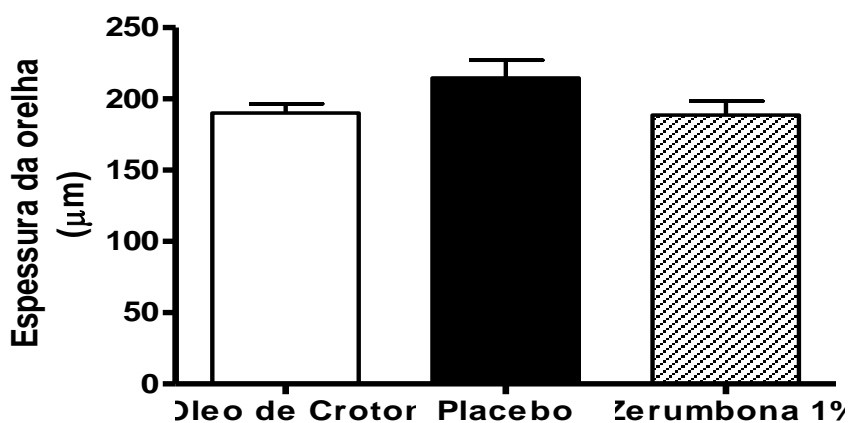


**Figura 54.** Efeitos da administração v.o de zerumbona (50mg/kg), em ratos injetados com carragenina 300µ/pata (s.c.) na pata traseira esquerda e salina na direita. Os símbolos e linhas indicam as médias  $\pm$  erro padrão das diferenças de volumes entre as patas direita e esquerda de cada animal. \*indica diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ ).

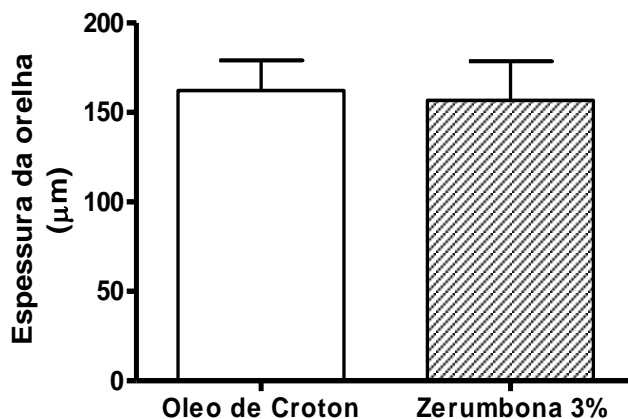
### 5.3.2 Edema de orelha induzido por óleo de cróton

O resultado da zerumbona em formulação cremosa, com as aplicações tópicas de 1 a 3%, provocou inibição do edema de orelha, de forma significativa quando comparado ao controle (negativo óleo de cróton) e o controle padrão (placebo alfa-humuleno), apenas na dose de 1mg/orelha, sendo esse efeito observado tanto pelo método de medição utilizando o paquímetro, como por punção auricular. A substância controle positivo também inibiu o edema em ambos os métodos.

O modelo de edema induzido na orelha de camundongos por agentes irritantes, como o óleo de cróton (*Cróton tiglium* L.), e ácido araquidônico utilizado na pesquisa da atividade de agentes antiinflamatórios de uso tópico, responde também à administração sistêmica de antiinflamatórios esteroidais (Schiantarelli e col., 1982). A fisiopatogenia do edema induzido pelo TPA (acetato de tetradecanoil-forbol), um dos componentes responsáveis pela ação irritante ao óleo de cróton, parece ser exercida entre outros mediadores, pelos produtores da ciclo-oxigenase, histamina e serotonina - Figuras 55 (a e b).



**Figura 55(a).** Efeito do produto zerumbona creme 1% (30 minutos) no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton 1mg/orelha (6horas) em camundongos

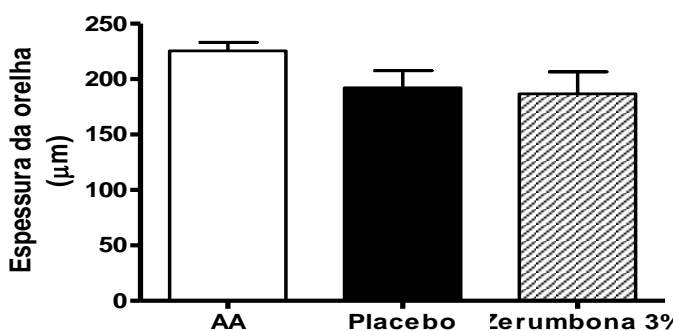


**Figura 55(b).** Efeito do produto zerumbona creme 3% (30 minutos) no modelo de edema de orelha induzido por óleo de cróton 1mg/orelha (6horas) em camundongos.

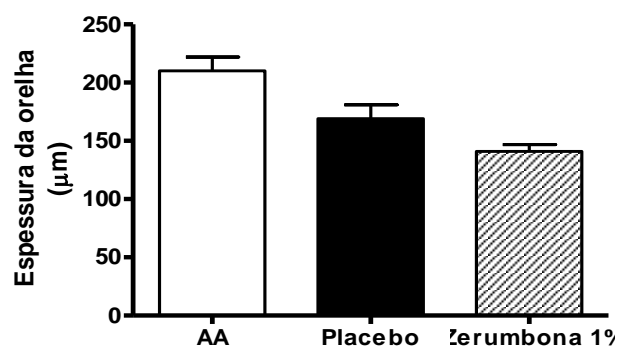
### 5.3.3 Modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico

O resultado segundo a figuras 56 (a e b), mostra que a substância ZER nas aplicações tópicas de 1 a 3%, provocou inibição do edema de orelha em  $\pm 50,5\%$ , de forma significativa quando comparado ao controle (negativo ácido araquidônico) e o controle padrão (placebo-alfa humuleno), apenas na dose de 1 mg/orelha, sendo esse efeito observado tanto pelo método de medição utilizando o paquímetro, como por punção auricular. A substância placebo também inibiu o edema em ambos os métodos. Mesmo em altas concentrações (3%) ele não apresentou efeito antiinflamatório tópicos nos dois modelos de inflamação não foram efetivos quando comparados com o controle.

**Figura 56(a).** Efeito da substância ZER creme 1% (30 minutos) no modelo de edema de



orelha induzido por ácido araquidônico 2 mg/orelha (1hora) em camundongos

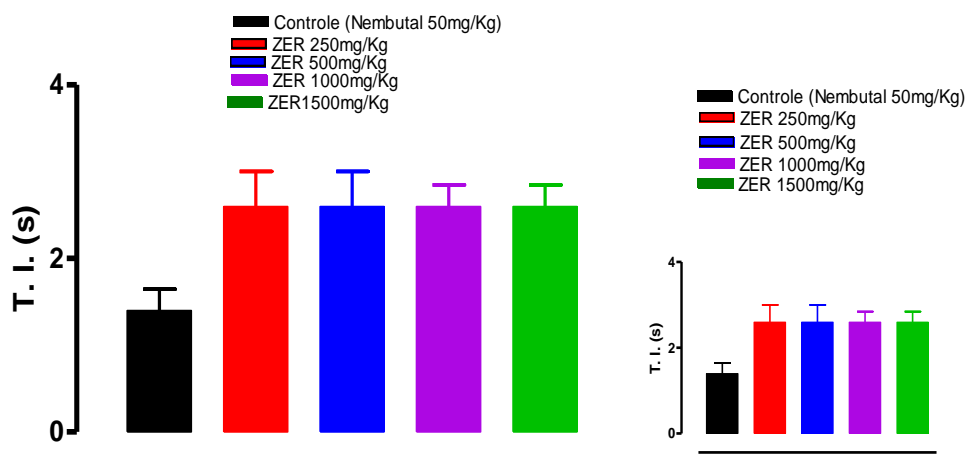


**Figura 56(b).** Efeito do produto Zerumbona creme 3% (30 minutos) no modelo de edema de orelha induzido por ácido araquidônico 2 mg/orelha (1 hora) em camundongos

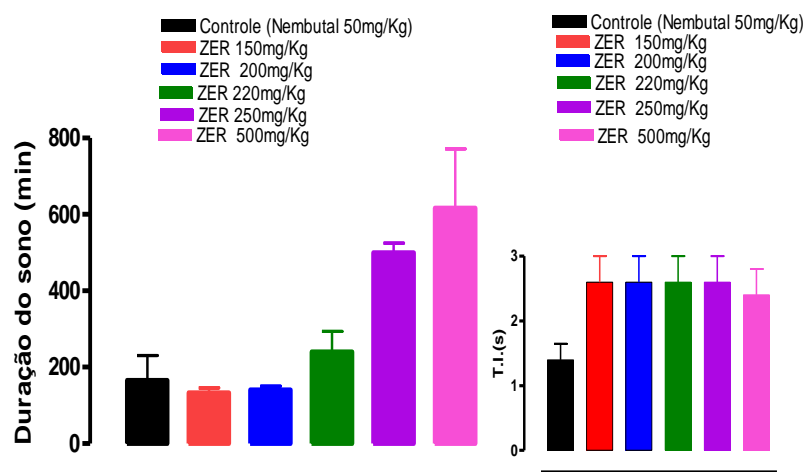
#### 5.4 Efeito da substância zerumbona (ZER) na potenciação do sono induzido por barbitúrico.

Os camundongos controle, tratados com salina 0,9% + Tween20 5% (i.p ou v.o) e 30 minutos depois de injetado com pentobarbital sódico (50 mg/kg i.p), apresentaram tempos de indução do sono (TI), de respectivamente  $2,6 \pm 0,2$  e  $2,9 \pm 0,1$  minuto. A recuperação do sono ocorreu após  $66 \pm 5$  e  $56 \pm 10$  minutos respectivamente. A administração prévia do composto zerumbona de 250-1500 por via oral (v.o) ou 150-500 mg/kg por via intraperitoneal (i.p), não alterou significativamente o tempo de indução do sono barbitúrico em comparação ao valor do controle (i.p -  $2,1 \pm 0,1$  minuto,  $2,3 \pm 0,2$  minuto respectivamente). A duração do sono foi aumentada significativamente pela administração prévia de 150 a 500 mg/kg i.p de zerumbona e para  $317,40 \pm 192,72$ ;  $321 \pm 73,09$ ;  $430 \pm 95,41$ ;  $678,80 \pm 156,29$  minutos, em respectivamente em relação ao controle  $139,40 \pm 29,30$  min. (figuras 57 e 58). Os tratamentos prévios dos animais com zerumbona em doses 150-1500 mg/kg potencializaram a duração de sono barbitúrico em relação ao controle.





**Figura 57.** Efeito de zerumbona por v.o, obtida dos óleos essenciais dos rizomas de *Z. zerumbet* Smith (150-1500 mg/kg) no tempo de indução do sono barbitúrico (T.I). Os símbolos e linhas indicam as médias  $\pm$  erro padrão das diferenças de volumes entre as patas direita e esquerda de cada animal. \*indica diferença significativa em relação ao controle ( $p < 0,05$ )



**Figura 58.** Efeito da substância ZER obtido dos óleos essenciais de *Z. zerumbet* (150-500 mg/kg) via intraperitoneal no tempo de indução (T.I) e o tempo de recuperação do sono (T.R), induzido em camundongos pela injeção de pentobarbital. As colunas e barras representam as medias  $\pm$  erro padrão das médias de 10 animais. \*\*indica diferença significativa em relação ao grupo controle ( $p < 0,005$ )

#### **5.4.1 Efeitos gerais de ZER e DCM e MeOH de *Z. zerumbet*(rizomas) via intraperitoneal (i.p) em camundongos e ratos**

As injeções de 10-5000 mg/kg em camundongos e ratos por via oral (v.o) e intraperitoneal (i.p) de Zerumbona e DCM e MeOH, produziram uma diminuição inicial da motilidade, seguida de uma depressão com reclusão dos animais às bordas da caixa, aumento da frequência respiratória, dispnéia, analgesia, cianose, piloereção, ataxia e morte dos animais por paralisia respiratória. Todos os efeitos foram proporcionais às doses mais intensas após administração intraperitoneal (i.p) em doses superiores a 1500 mg/Kg, ao mesmo tempo o aparecimento convulsões e de morte dos animais por paralisia respiratória. Em doses de 2500 e 5000 mg/kg de Zerumbona de extrato diclorometânico (DCM) e de metanólico (MeOH) de *Z. zerumbet* em camundongos e ratos, estes apresentaram parâmetros intensos tais como: aumento da frequência respiratória, dispnéia, analgesia, tremores finos e grosseiros e morte dos animais por paralisia respiratória (Salustiano et al., 1966; Rocha e Silva, 1968). Os efeitos observados na via i.p, não foram os mesmos quando injetado com solução salina (0,9%) + tween 20 (5%), nos animais controle conforme é indicada nas tabelas 11 (a, b, c e d).

**Tabela 11(a).** Parâmetros toxicológicos observados, nas doses de 10 - 1000 mg/kg por via intraperitoneal (i.p) em camundongos (CAM) de Zerumbona (ZER), dos extratos diclorometano ( DCM) e metanólico (MeOH) de *Z. zerumbet*.

<b>Grupos Animais</b>	<b>Peso (g)</b>	<b>Dose mg/kg/mL</b>	<b>Droga/ Veiculo</b>	<b>via</b>	<b>Parâmetros observados</b>
CAM	20-30	10	ZER	**i.p	↑ motilidade, ↑ freq. respiratória, piloereção.
II –CAM	20-30	100	ZER	i.p	↓ motilidade, ↑ freq. respiratória, piloereção.
III –CAM	20-30	1000	ZER	i.p	↓ motilidade, ↑ freq. respiratória, piloereção, dispnéia.
IV –CAM	20-30	10	DCM	i.p	↓ motilidade, ↑ freq. respiratória, piloereção, dispnéia.
V –CAM	20-30	100	DCM	i.p	↓ motilidade, ↑ freq. respiratória, piloereção, dispnéia.
VI –CAM	20-30	1000	DCM	i.p	↓ motilidade, ↑ freq. respiratória, piloereção, dispnéia, cianose.
VII - CAM	20-30	10	MeOH	i.p	↓ motilidade, ↑ freq. respiratória, piloereção.
VIII - CAM	20-30	100	MeOH	i.p	↓ motilidade, ↑ freq. respiratória, piloereção.
IX –CAM	20-30	1000	MeOH	i.p	↓ motilidade, ↑ freq. respiratória, piloereção, dispnéia, cianose.
<b>X/Controle CAM</b>	20-30		Salina 0, 9%+tween 20 1%	i.p	↓ motilidade, depressão as borda da caixa.

**Tabela 11(b).** Parâmetros toxicológicos observados, nas doses de 1500; 2500 e 5000 mg/kg via intraperitoneal (i.p) em camundongos de Zerumbona e dos extratos DCM e MeOH dos rizomas de *Z. zerumbet*.

Grupos Animais	Peso (g)	Dose mg/kg/mL	Droga/veiculo	via	Parâmetros Observados
ICAM	20-30	1500	ZER	*i.p	↓motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, analgesia, contorções abdominais, ataxia convulsões e morte dos animais por paralisia respiratória.
II - CAM	20-30	2500	ZER	*i.p	↓motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, analgesia, contorções abdominais, ataxia convulsões e morte dos animais por paralisia respiratória.
III - CAM	20-30	5000	ZER	*i.p	↓motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, Dispnéia, analgesia, contorções abdominais, ataxia convulsões e morte dos animais por paralisia respiratória.
IV - CAM	20-30	1500	DCM	*i.p	↓motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, Dispnéia, analgesia, contorções abdominais, ataxia convulsões e morte dos animais por paralisia respiratória.
V - CAM	20-30	2500	DCM	*i.p	↓motilidade, ↑freq. respiratória, Piloereção, Dispnéia, analgesia, contorções abdominais, ataxia convulsões e morte dos animais por paralisia respiratória.
VI - CAM	20-30	5000	DCM	*i.p	↓motilidade, ↑freq. respiratória, Piloereção, Dispnéia, Cianose, analgesia, contorções abdominais, ataxia convulsões e morte dos animais por paralisia respiratória.
VII - CAM	20-30	1500	MeOH	*i.p	↓motilidade, ↑freq. respiratória, Piloereção, dispnéia cianose, depressão as borda da caixa e morte dos animais por paralisia respiratória.
VIII - CAM	20-30	2500	MeOH	*i.p	↓motilidade, ↑freq. respiratória, dispnéia, piloereção, cianose, depressão as borda da caixa, e morte dos animais por paralisia respiratória.
IX - CAM	20-30	5000	.MeOH	*i.p	↓ motilidade, ↑freq. respiratória, dispnéia, piloereção, contorções abdominais, cianose, ataxia, convulsões, e morte dos animais por paralisia respiratória.
X - CAM	20-30	0,5	Salina 0,9%+tween20 (1%)	*i.p	↑motilidade, depressão as borda da caixa.

**Tabela 11(c).** Parâmetros toxicológicos observados, nas doses de 10; 100 e 1000 mg/Kg via intraperitoneal (i.p) de Zerumbona (ZER) em *Ratus norvegicus* (ratos) e dos extratos DCM e MeOH dos rizomas de *Z. zerumbet*.

Grupos Animais	Peso (g)	Dose mg/kg/mL	Droga/veiculo	via	Parâmetros observados
I - Ratos	200-280	10	ZER	*i.p	↑ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção.
I - IRatos	200-280	100	ZER	*i.p	↓ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção.
III - Ratos	200-280	1000	ZER	i.p	↓ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, dispnéia.
IV - Ratos	200-280	10	DCM	i.p	↓motilidade, ↑freq. Respiratória, piloereção, dispnéia.
V - Ratos	200-280	100	DCM	i.p	↓ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, dispnéia.
VI - Ratos	200-280	1000	DCM	i.p	↓ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, dispnéia, cianose.
VII - Ratos	200-280	10	MeOH	i.p	↓ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção.
VIII - Ratos	200-280	100	MeOH	i.p	↓ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção.
IX - Ratos	200-280	1000	MeOH	i.p	↓ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, dispnéia, cianose.
X - Controle / Ratos	200-280	0.5-0,9	SALINA 0,9%+twe en 20 (1%)	i.p	↑motilidade, depressão as borda da caixa.

\*i.p= intraperitoneal

**Tabela 11(d).** Parâmetros toxicológicos observados, nas doses de 1500; 2500 e 5000 mg/kg via intraperitoneal (i.p) em *Ratus norvegicus*, de Zerumbona e dos extratos DCM e MeOH de *Z. zerumbet*.

Grupos Animais	Peso (g)	Dose mg/kg/mL	Droga/veiculo	Via	Parâmetros observados
I - Ratos	200-280	1500	ZER	*i.p	↑ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, analgesia, contorções abdominais, ataxia convulsões e morte dos animais por paralisia respiratória.
II - Ratos	200-280	2500	ZER	*i.p	↓ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, analgesia, contorções abdominais, ataxia convulsões e morte dos animais por paralisia respiratória.
III - Ratos	200-280	5000	ZER	i.p	↓ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, dispnéia, analgesia, contorções abdominais, ataxia convulsões e morte dos animais por paralisia respiratória.
IV - Ratos	200-280	1500	DCM	*i.p	↑ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, dispnéia, analgesia, contorções abdominais, ataxia convulsões e morte dos animais por paralisia respiratória.
V - Ratos	200-280	2500	DCM	*i.p	↓ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, dispnéia, analgesia, contorções abdominais, ataxia convulsões e morte dos animais por paralisia respiratória.
VI - Ratos	200-280	5000	DCM	i.p	↓ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, dispnéia, cianose, analgesia, contorções abdominais, ataxia convulsões e morte dos animais por paralisia respiratória.
VII - Ratos	200-280	1500	MeOH	*i.p	↑ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, cianose, contorções abdominais.
VIII - Ratos	200-280	2500	MeOH	*i.p	↓ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, cianose, contorções abdominais, e morte dos animais por paralisia respiratória.
IX - Ratos	200-280	5000	MeOH	*i.p	↓ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, dispnéia, cianose, contorções abdominais, ataxia convulsões e morte dos animais por paralisia respiratória.
X - Controle / Ratos	200-280	0,5-0,9	Salina (0,9%)+Twee n 20 (1%)	*i.p	↓ motilidade, depressão as borda da caixa.

#### **5.4.2 Teste geral de atividade por via oral (v.o) em ratos e camundongos de Zerumbona (ZER), extrato diclorometânico (DCM) e metanólico (MeOH), dos rizomas de *Z. zerumbet***

A administração de ZER e dos extratos DCM e MeOH, por via oral (v.o) em camundongos e ratos nas doses 500; 1000; 1500; 2000; 2500 e 5000 mg/Kg produziu progressivamente, quietação, sonolência e diminuição da motilidade. Todos esses efeitos foram de intensidades proporcionais as doses mais elevadas (Salustiano et al., 1966; Rocha e Silva, 1968). A recuperação, dos animais foi dependente da dose aplicada tornando-se evidente após aplicação das doses mais altas utilizadas. Nos animais controles (solução salina 0,9% + Tween 20 a2%), os efeitos gerais observados não foram os mesmos, pois, os animais apenas tiveram uma leve depressão passageira recuperando-se após 5 minutos das aplicações, mostrando assim, que as substâncias obtidas dos rizomas de *Z. zerumbet* não foram observadas efeitos tóxicos quando injetado por via oral, mesmo em doses de 5000 mg/Kg, como pode ser observada na tabelas 12.

**Tabela 12.** Parâmetros toxicológicos observados, em camundongos nas doses de 1500; 2500 e 5000 mg/kg por via oral (v.o) de Zerumbona (ZER) e dos extratos DCM e MeOH de *Z. zerumbet*.

Grupos Animais	Peso (g)	Dose mg/kg/mL	Droga/veiculo	Via	Parâmetros observados
I - CAM	20-30	1500	ZER	v.o	↑ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção.
II - CAM	20-30	2500	ZER	v.o	↓ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção.
III - CAM	20-30	5000	ZER	v.o	↓ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, dispnéia.
IV - CAM	20-30	1500	DCM	v.o	↑ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, dispnéia.
V - CAM	20-30	2500	DCM	v.o	↓ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, dispnéia.
VI - CAM	20-30	5000	DCM	v.o	↓ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, dispnéia, cianose.
VII - CAM	20-30	1500	MeOH	v.o	↑ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, dispnéia.
VIII - CAM	20-30	2500	MeOH	v.o	↓ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção.
IX - CAM	20-30	5000	MeOH	v.o	↓ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, dispnéia, cianose.
X - CAM	20-30	0.5-0.9	Salina 0,9%+twe en 20 (1%)	v.o	↑ motilidade, depressão as borda da caixa.



**Tabela 13.** Parâmetros toxicológicos observados, em *Ratus norvegicus* (ratos) nas doses de 1500; 2500 e 5000 mg/kg por via oral (v.o) de Zerumbona (ZER) e dos extratos DCM e MeOH de *Z. zerumbet*

Grupos Animais	Peso (g)	Dose mg/kg/mL	Droga/veiculo	Via	Parâmetros observados
I - Ratos	200-280	1500	ZER	v.o	↑ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção.
II - Ratos	200-280	2500	ZER	v.o	↓ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção.
III - Ratos	200-280	5000	ZER	v.o	↓ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, dispnéia, cianose.
IV - Ratos	200-280	1500	DCM	v.o	↑ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, dispnéia.
V - Ratos	200-280	2500	DCM	v.o	↓ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, dispnéia.
VI - Ratos	200-280	5000	DCM	v.o	↓ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção, dispnéia, cianose.
VII - Ratos	200-280	1500	MeOH	v.o	↑ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção.
VIII - Ratos	200-280	2500	MeOH	v.o	↓ motilidade, ↑freq. respiratória, piloereção.
IX - Ratos	200-280	5000	MeOH	v.o	↓ motilidade, ↑freq., respiratória, piloereção, dispnéia, cianose.
X/Controle Ratos	200-280	0.5-1,0	Salina 0,9%+twe en 20(5%)	v.o	↑ motilidade, depressão as borda da caixa.

#### 5.4.3 Estudo toxicológico agudo

Comparações dos efeitos tóxicos agudos do composto ZER e extratos DCM e MeOH, foram feitas usando-se a DL50, foi calculada, após serem administrados via intraperitoneal (i.p) em camundongos e ratos nas doses 1500-5000 mg/kg. Para isso,

contamos o número e calculamos a percentagem de animais mortos em cada grupo, 4 e 48 horas e 14 dias após as injeções, (figura 59). Através da análise de probito Salustiano et al., (1966); Rocha e Silva, (1968), foi possível determinar a dose letal ( $DL_{50}$ ). A análise toxicológica ( $DL_{50}$ ) em camundongos de ZER dos extratos DCM e MeOH, por via intraperitoneal (i.p) dos rizomas de *Z. zerumbet*, mostram efeitos mais intensos com doses superiores 1500 mg/kg. A  $DL_{50}$  de ZER e DCM para 24, 48 e 14 dias. Colocando-se foram de: 1526,9 e  $\pm 0,017$ mg/kg; 1666,84 e  $\pm 0,239$  mg/kg; 6829,10 e de 1829,10 mg/Kg, respectivamente, como são mostrados nas tabelas de 13 a 16.

**Tabela 14.** Prova de toxicidade aguda via intraperitoneal (i.p) em camundongo de Zerumbona(ZER) e dos extratos DCM e MeOH dos rizomas de *Z. zerumbet*.

GRUPOS	Nº animais	Peso médio animal (g)	Veículo	Ext. Subst.	Dose mg/kg/ml	Via adm.	Mortalidade					
							24 h	%	48h	%	14 dias	%
I	30	22,0	salina/ Tween80	ZER	5000	i.p*	26	86,66	27	90	27	100
II	30	26,8	salina/ Tween80	ZER	2500	i.p*	18	60,00	21	70	21	80,0
III	30	22,3	salina/ Tween80	ZER	1500	i.p*	13	43,33	16	5,33	16	53,3
IV	30	25,9	salina/ Tween80	DCM	5000	i.p*	20	66,66	26	86,6	26	100
V	30	26,3	salina/ Tween80	DCM	2500	i.p*	14	46,66	17	56,6	17	60
VI	30	27,8	salina/ Tween80	DCM	1500	i.p*	11	36,66	13	43,3	13	33,3
VII	30	26,80	salina/ Tween80	MeOH	5000	i.p*	8	26,66	12	40,00	12	56,66
VIII	30	26,4	salina/ Tween80	MeOH	2500	i.p*	5	16,60	9	30,00	9	30,00
IX	30	28,6	salina/ Tween 80	MeOH	1500	i.p*	2	6,60	3	10,00	3	10,00
Controle	30	23,7	salina/Tween80	80	0,9	i.p*	0	0	0	0	0	0

**Tabela 15.** Toxicidade aguda (DL<sub>50</sub>) via intraperitoneal em camundongos dose simples de Zerumbona (ZER) e dos extratos DCM e MeOH obtidos dos rizomas de *Z. zerumbet* (L.) Smith cultivada em Manaus/AM.

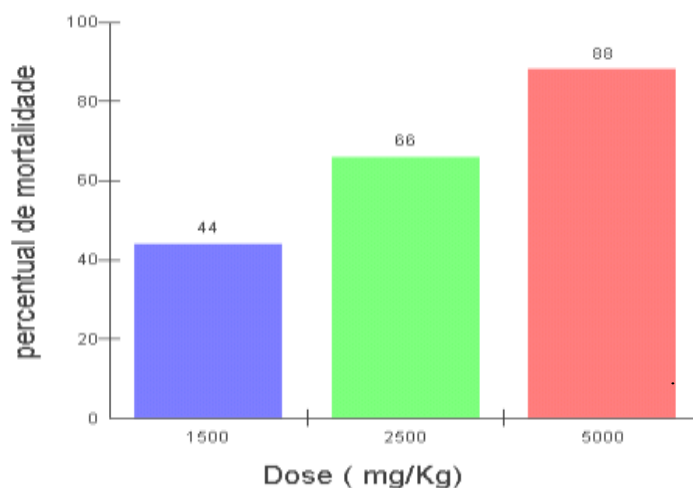
Grupos	Ext.Subst código	Peso médio animal (g)	Log. dose	24h (%)	Prob.	48h (%).	Pro.	14 dias (%)	Prob.
I	ZER	5000	3.69	86,66	6.08	90,00	6.08	100	7,4
II	ZER	2500	3.39	60,00	5.25	70,00	5.52	80,00	5,82
III	ZER	1500	3.17	46,66	4.4	53,33	4.47	53,33	4,90
IV	DCM	5000	3.69	66,66	5.41	86,66	6.17	100	7,4
V	DCM	2500	3.39	46,66	4.35	56,66	4.47	60	4,56
VI	DCM	1500	3.17	36,66	4.35	43,30	4.47	33,33	4,46
VII	MeOH	5000	3.69	26,66	4.26	40,00	4.57	56,66	4,57
VIII	MeOH	2500	3.39	16,60	4.00	30,00	4.19	30,00	4.19
IX	MeOH	1500	3.17	6,60	3.44	10,00	7.71	10,00	7.71
X-controle	salina/ Tween 20	50	1.69	0	2.6	0	2.6	0	2.6

**Tabela 16.** Toxicidade Aguda DL<sub>50</sub> via intraperitoneal em camundongos de Zerumbona (ZER) DCM e MeOH dos rizomas de *Z. zerumbet*

Grupos	Ext.Subst. código	Dose (mg/Kg) mL	Animais Mortos	Resultados		Grupos	Ext.Subst. código	Dose (mg/Kg) mL	Animais Mortos
				24h	48h				
							DL50	DL50	DL50
I	ZER	5000	26	27	27		.....	.....	
II	ZER	2500	18	21	21	.	.....	.....	
III	ZER	1500	13	16	16	1526,91	0,017	0,017	
IV	DCM	5000	20	26	26	.....	.....	.....	
V	DCM	2500	14	17	17	.....	.....	.....	
VI	DCM	1500	11	13	13	1666,84	0,239	0,239	
VII	MeOH	5000	8	12	12	4861,46	0,577	0,772	
VIII	MeOH	2500	5	9	9	.....	.....	.....	
IX	MeOH	1500	2	3	3	.....	.....	.....	
	salina/								
X-Controle	Tween20	50	0	0	0	.....	.....	.....	

**Tabela 17.**Variação de toxicidade aguda (DL<sub>50</sub>) via intraperitoneal (i.p)em camundongos de Zerumbona ZER obtida dos rizomas de *Z. zerumbet*

Drogas	DL <sub>50</sub> (mg/Kg)		Lim. Conf.		
	24 h	48 h	14 dias	Max.	Min.
ZER	<b>1526,91</b>	0,017	0,017	1675,00	2789,00
DCM	<b>1666,00</b>	0,239	0.239	0,114	0,313
MeOH	<b>4841,74</b>	0,577	0.577		



**Figura 59.** Percentual de mortalidade via intraperitoneal em camundongo do composto Zerumbona (ZER) obtidos dos óleos essenciais dos rizomas de *Z. zerumbet*.

### 5.5 Toxicidade subcrônica do composto zerumbona (ZER) obtido dos óleos essenciais de *Z. zerumbet*

Os resultados representados nas tabelas abaixo, mostram que o sesquiterpenico zerumbona (ZER), obtido de *Z. zerumbet* quando administrado por via oral (v.o) as doses de 500 e 1000 mg/kg por um período de 30 dias não alterou significativamente os níveis de

hematócritos e bioquímicos principalmente das Transaminases (TGO ou TGP) e os níveis da massa corporal durante período de tratamento dos animais em experimentação. Esses dados indicam que o composto não possui efeitos tóxicos por via oral em nível de órgãos como coração, fígado,baço e outros em doses de até 1000 mg/kg.

**Tabela 18.** Efeito da Administração oral de zerumbona (ZER) obtido dos óleos essenciais dos rizomas de *Z. zerumbet* Smith (500 e 1000 mgKg)

Peso (média $\pm$ E.P.M) - ZER (mg/Kg)			
	Veículo	500	1000
<b>M1</b>	20,78 $\pm$ 3,2	20,60 $\pm$ 3,60	19,36 $\pm$ 2,29
<b>M2</b>	16,53 $\pm$ 3,45	16,31 $\pm$ 2,66	25,88 $\pm$ 4,63
<b>M3</b>	7,71 $\pm$ 1,88	9,51 $\pm$ 1,91	11,95 $\pm$ 2,96
<b>M4</b>	6,7 $\pm$ 1,18	4,96 $\pm$ 1,43	1,75 $\pm$ 1,31
<b>M5</b>	3,15 $\pm$ 3,4	-3,15 $\pm$ 1,42	-1,54 $\pm$ 1,32

**ANOVA:** uma via, seguida do teste *t* de student, M (1-5), ganho médio de peso dos animais a cada 6 dias n = 6 animais /grupo

**Tabela 19.** Efeito da Administração oral de zerumbona (ZER) obtido dos óleos essenciais dos rizomas de *Z. zerumbet* Smith (500 e 1000 mgKg).

Peso (média $\pm$ E.P.M) <sup>n</sup> - ZER (mg/Kg)			
	Veículo	100	1000
<b>M1</b>	88,66 $\pm$ 4,64	84,25 $\pm$ 5,69	85,87 $\pm$ 5,23
<b>M2</b>	119,52 $\pm$ 8,98	114,98 $\pm$ 6,87	115,85 $\pm$ 7,07
<b>M3</b>	113,79 $\pm$ 1,88	104,98 $\pm$ 6,07	105,11 $\pm$ 5,78
<b>M4</b>	123, 67 $\pm$ 5,48	114,49 $\pm$ 6,98	117,89 $\pm$ 4,67
<b>M5</b>	128,31 $\pm$ 3,48	128,65 $\pm$ 2,57	125,76 $\pm$ 1,45

**ANOVA:** uma via, seguida do teste Student Newman – Kelus

**Tabela 20.** Efeito da administração oral de zerumbona (ZER) em doses de 500 e 1000 mg/Kg 1 vez ao dia por 30 dias sobre o consumo de água em ratos

Peso (média ± E.P.M) <sup>1</sup> - ZER (mg/Kg)			
	Veículo	100	1000
<b>M1</b>	134,66 ± 8,64	131,29 ± 7,69	137,86 ± 5,23
<b>M2</b>	159,52 ± 8,98	166,98 ± 6,87	176,85 ± 7,07
<b>M3</b>	171,79 ± 9,88	174,98 ± 6,07	180,11 ± 5,78
<b>M4</b>	173,67 ± 6,4	164,4 ± 6,98	165,89 ± 4,67
<b>M5</b>	178,31 ± 6,4	178,65 ± 2,57	195,76 ± 4,45

**ANOVA:** uma via, seguida do teste Student Newman Kelus / N =6 animais; grupo

**Tabela 21.** Efeito da administração oral de zerumbona em doses de 500 e 1000 mg/Kg 1 vez ao dia por 30 dias sobre os parâmetros hematológicos em ratos

Medida		Zerumbona - Controle	
		(mg/kg)	
		500	100
Leucócitos(10 <sup>3</sup> ; µL)	7,45 ± 0,84	7,68 ± 5,34	8,36 ± 1,04
Hemácias totais (10 <sup>3</sup> ; µL)	7,18 ± 0,62	7,03 ± 0,21	6,92 ± 0,20
Hemoglobina (g;dl)	14,47 ± 0,49	14,46 ± 0,29	14,56 ± 1,40
Hematócritos	38,90 ± 1,19	41,35 ± 1,205	40,63 ± 1,40
Plaquetas totais (10 <sup>3</sup> ; µL)	567,05 ± 28,56	605,17 ± 23,98	534 17 ± 61,41
Linfócitos absolutos (mm <sup>3</sup> )	6,53 ± 0,53	6,16 ± 0,73	6,67 ± 0,82
Linfócitos relativos (%)	82,43 ± 2,57	80,25 ± 1,54	80,74 ± 2,83

**ANOVA:** uma via, seguida do teste Student Newman - Kelus. N=6 animais; grupo.

**Tabela 22.** Efeito da administração oral do veículo (controle) do composto sesquiterpenico zerumbona (500 e 100 mgKg 1 vez ao dia por 30 dias ) sobre os parâmetros bioquímicos em ratos.

PESO (MÉDIA ± E.P.M) <sup>N</sup>			
Medida	Zerumbona		
	Controle	500	1000
Glicose (mg; dL)	80,0 ± 5,34	84,50 ± 7,27	78,83 ± 3,60
Uréia (mg; dL)	37,00 ± 4,43	41,17 ± 5,02	39,00 ± 4,73
Acido úrico	1,70 ± 0,34	1,08 ± 0,12	2,00 ± 0,61
TGO (U;l)	179,50 ± 12,36	181,33 ± 11,25	182,83 ± 16,63
TGP (U;l)	50,16 ± 2,24	61,83 ± 12,21	56,50 ± 7,797
Colesterol total (mg; dL)	70,50 ± 10,67	78,16 ± 9,62	71,66 ± 2,33
Triglicerideos (mg; dL)	81,33 ± 6,02	77,00 ± 10,2	75,83 ± 10,16
Linfócitos relativos (%)	80,25 ± 1,54	80,75 ± 2, 83	82,43 ± 2,57
Albumina	4,08 ± 0,11	4,31 ± 0,07	4,28 ± 0,13



**Tabela 23.** Efeito da administração oral do veículo (controle) do composto sesquiterpenico zerumbona (500 e 100 mg Kg 1 vez ao dia por 30 dias) sobre os pesos relativos de órgãos internos, em ratos.

<b>(Peso úmido do órgão; Peso do animal) x100 (média ±E.P.M)<sup>n</sup></b>						
<b>Controle</b>		<b>FÍGADO</b>	<b>CORAÇÃO</b>	<b>PULMÃO</b>	<b>RINS</b>	<b>BAÇO</b>
		15,73 ± 2,02	1,88± 0,23	2,63± 0,28	3,76± 0,60	1,01 ± 0,13
<b>Zerumbona</b>	<b>500</b>	14,32 ± 1,73	1,68±0,25	2,57±0,32	3,64±0,50	0,85±0,12
	<b>1000</b>	12,21±0,85	1,46±0,11	2,16±0,14	3,16 ±0,30	0,69±0,026

**ANOVA:** uma via, seguida do teste Student Newman - Kelus - N = 6 animais; grupo

## 5.6 Análises Estatísticas dos resultados

Todos os resultados obtidos foram efetivados por meio de análises estatísticas de variância (ANOVA); com média, erro e desvio padrão, com significância ou insignificância dos dados tabulados. Considerando as diferenças entre os grupos significativos para  $p < 0,05$ , foram organizados e resumidos na forma de gráficos, apresentados nos resultados a seguir.

## *6. CONCLUSÕES*

---

---

A pesquisa permitiu chegar às seguintes conclusões:

- ✓ A extração com DCM foi mais simples e rápida e apresentou um rendimento maior quando comparada com arraste a vapor e hidrodestilação, mas com menor grau de pureza da substância zerumbona.
- ✓ Os óleos essenciais obtidos por extração por arraste-vapor, hidrodestilação e DCM apresentaram valores significativamente maiores para o teor do sesquiterpeno zerumbona.
- ✓ Foram detectados cinco picos com tempo de retenção diferente e absorbância em 222-254 nm relacionadas a substâncias voláteis por CLAE e CG-EM sendo um na extração por arraste-vapor com um percentual de área (99,95%) e três no extrato hidrodestilado e cinco no extrato DCM. Uma substância foi identificada sendo esta da classe dos terpenos. No extrato MeOH foi descartado para a determinação de ZER.
- ✓ O processo de obtenção do composto sesquiterpênico ZER dos óleos essenciais de *Z. zerumbet* (L.) Smith, nos forneceu um percentual de 99,95% de cristais puros, translúcidos e claros. O composto puro foi identificado como o sesquiterpeno Zerumbona.
- ✓ Com base na interpretação dos dados espectroscópicos (RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , PF, IV, UV, EM) quando comparado com os dados da literatura nos forneceu subsidio na quantificação e identificação composto sequiterpênico.
- ✓ Quanto aos rendimentos da biomassa e dos óleos essenciais na produção vegetal de *Z. zerumbet*, estes foram significativos para os rizomas pelo teste de ANOVA. Uma análise econômica custo/benefício deverá ser realizada.
- ✓ Os resultados obtidos no presente estudo mostram claramente que o composto sesquiterpenico zerumbona (ZER) obtido dos óleos essenciais dos rizomas de *Z. zerumbet* apresentam uma importante ação analgésica por v.o e i.p, tanto na ação neurogênica e inflamatória quando avaliada em camundongos e ratos.

- ✓ O mecanismo envolvido nas ações do composto não está completamente esclarecida, contudo foi demonstrado que a ação antinociceptiva causada pelo ZER é particularmente interessante, tendo em vista que ele parece interagir com o sistema opióide.
  
- ✓ Neste sentido, no presente estudo foi obtido avanço significativo acerca do mecanismo de ação do composto ZER um princípio ativo importante e atraente para o aproveitamento de um novo produto com potencial ação antinociceptiva por via oral e intraperitoneal.
  
- ✓ Os resultados do presente estudo indicam que o sesquiterpeno zerumbona obtido de *Z. zerumbet* terá um lugar importante na descoberta de novas drogas analgésicas e antiinflamatórias de ação central e periférica

## ***7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

---

---

Albuquerque, P.M.; Witt, M.A.; Stambuk, B.U; Nascimento, M.G. 2007. Influence of sugars on enantioselective reduction using *Saccharomyces cerevisiae* in organic

solvent. *Process Biochem.* v. 42, págs. 141-147.

Alwi, Sharifah Sakinah Syed; Nallappan, Meenakshi; Pihie, Azimahtol Hawariah Lope. 2007. Zerumbone exerce atividade antiproliferativa via apoptose em Células HepG2, págs. 15-19.

AOAC-(Association Official Analytical Chemists), 1995. *Official methods of analysis*. 16. ed.Arlington: AOAC International. Cap.41, 3p.

Blumberg, H.; Wolf, P.S.; Dayron, H.B. 1965. Use of the writhing test for evaluating analgesic activity of narcotic antagonist. *Pro. Soc.Exp. Biol. Med.*, v.118, págs.163-166.

Borsato, M.L.C., Graef, C.F.F., Souza, G.E.P., Lopes, N.P. 2000. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. *Phytochemistry*, v.55, 809 - 813.

British Herbal Pharmacopoeia, 1983. London: *British Herbal Medicine Association*, p. 239.

British Pharmacopoeia. London: her Majesty's Stationery Office, 1993; add. 1994, 1995, 1996, 1997.

Calixto, J.B.; Yunes, R.A.; Rae, G.A.; Medeiros, Y.S. 1990. **In:** *Bradykinin Antagonists: Basic and Clinical Research*, R.M. Burch, Marcel Dekker Inc. New York, p. 88.

Carlini, E.A. 1995. Pesquisa com plantas brasileiras usadas em medicina popular, em "*Medicamentos, drogas e saúde*" (*Hucitec/Sobravime, ed.*), São Paulo, págs. 23-8.

Carter. R.B. 1991. Differentiating analgesic and non-analgesic drug activities on rat hot plate: affect of behaviorial endpoint. *Pain*, v.47, pags. 211-220.

Chan, P.K; Ohara, G.P; Hayesa, W. 1982. *Principles and methods for acutr and subcrônic toxicity*.

Chane Ming, J.; Vera, R.; Chalchat, J.C. 2003. Chemical Composition of the essential Oil from Rhizomes, Leaves and Flowers of *Zingiber zerumbet* Smith from Reunion Island. *Journal of essential Oil Researc* - (3): págs. 202-205.

Chen, C.C.; Kuo, M.C.; H.O, C.T. 1986. High Performance Liquid Chromatographic determination of Pungent gingerol compounds of ginger. *Journal of Food Science*, v.51, n. 5, págs. 1364-65.

Corrêa, M.P. 1968. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Brasília, IBDF.

Craveiro, A.A.; Fernandes, A.G.; Andrade, C.H.S.; Matos, F.J. de A.; Alencar, J.W.; Machado, M.I.L. 1981. *Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste*.

Fortaleza:Ed.UFC, 209p.

Daí J.R., Cardelina, J.H.I.; McMahon, J.B.; Boyd, M.R. 1997. Zerumbone, na HIV - Inibitory and Cytotoxic Sesquiterpene of *Zingiber zerumbet* and *Zingiber aromaticum*. *Nat. Prod. Letter* - 10: págs. 115-118.

Damodaran, N.P.; Dev, Sukh. 1965. Estereoquímica da zerumbone. Natl. Chem. Lab., Poona, India. *Tetrahedron Letters* (24), 1977-81. CODEN: TELEAY ISSN: 0040-4039. *Journal written in English*. CAN 63:46401 AN 1965:446401 CAPLUS.

Derwent World Patents Index® com - <http://science.thomsonreuters.com/pt/produtos/dii/>

Acessado em: 23/07/2009

Dev. S. 1956. "Zerumbone, a Monocyclic Sesquiterpene Ketone". *Chemistry & Industry* (39): págs. 1051-1052.

Dev. S. 1960. "Studies in Sesquiterpenes, 16. Zerumbone, a Monocyclic Sesquiterpene Ketone." *Tetrahedron* 8(3-4): págs. 171-180.

Dickenson, A. e Besson, J.M. 1997. *The Pharmacology of pain*. Berlin:Springer.

Duarte, J.D.G., Nakamura, M., Ferreira, S.H. 1988. Participation of the sympathetic system in acetic acid induced writhing in mice. *Brazilian J. Med. Res.*, v.21, págs. 341-343.

Dubuisson, D. e Dennis, S.G. 1977. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and ca. *Pain*, v.4, págs. 161-174.

Eddy, N.B. e Leimback, D. 1953. Synthes analgesics II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. *J. Amer.Pharmacol. Ther.*,v.107, págs. 385-393.

Eguchi, Ai; Kaneko, Yuki; Murakami, Akira; Ohigashi, Hajime. 2007. Zerumbone supressor do phorbol expressão de Ester - induzido de múltiplos receptores de genes em THP-1 células humanas monócitas. *Japan Society for Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry*. 71(4): págs. 935-945.

Faber, K. 2007. *Biotransformations in Organic Chemistry*. 5 ed. Berlin: Springer-Verlag, 402p.

Fardelone, L.C.; Rodrigues, J.A.R.; Moran, P.J.S. 2004. Baker's yeast mediated asymmetric reduction of cinnamaldehyde derivatives. *J. Mol. Catal. B:Enzym.*, v. 29, págs. 41-45.

Ferreira, S.H. 1972. Variação da Técnica (Ferreira, S.H. Prostaglandinas, aspirina-like drugs and analgesia). *Nature New Biology*, (240): págs. 200-203.

Ferreira, S.H. 1979. A new method for measuring variations of rat paw volume. *J.*

PharmPharmacol, (31): 648p.

Ferreira, S.H. 1985. Aspirinas X Dor. *Ciência hoje*, 17(3): págs. 56-62.

Furlan, M.R. 1998. Ervas e temperos: cultivo e comercialização. SEBRAE (*coleção Agroindústria*, vol 15). Cuiabá:128p.

Furst, S. Transmitter involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res. Bull.* 1999, v. 48, págs. 129-141.

Gomes, F.P. 1970. *Curso de Estatística Experimental*.4ª ed. Piracicaba: Nobel, p, 430 p.

Govindarajan, V.S. 1982. Ginger-Chemistry, Technology and Quality Evaluation: Part I - CRC *Critical Reviews - In: Food Science and Nutrition*. Quensland, pags.17-98.

Gupta, V.N.; Katakya, J.C.S. 1979. "Zerumbone From *Zingiber-Rerumbei* Sm". *Indian Journal of Chemistry Section B-Organic Chemistry Including Medicinal Chemistry* 18(3): págs. 290-291.

Heapy, C.G; Jamieson, A.; Russell, N.J.W. 1987. Afferent C-fibre and A delta activity in models of inflammation. *Br. J. Pharmacol.*, vol. 90, 164p.

Huang Guan-Cheng; Chien Ting-Yi; Chen Lih-Geeng; Wang Ching-Chiung. 2005. Efeitos antitumorais da zerumbone de *Zingiber zerumbet* em P-388D1 células *in vitro* e *in vivo*. *Planta medica*, 71(3), 219-24. *Journal code*: 0066751. ISSN: 0032-0943.

Hunskar, S.; Fasmer, O.B.; Hole, K. 1985. Formalin test in mice, auseful techniqu for evaluation mild analgeia. *J. Neurosci.Meth.*, v. 14, págs. 69-76.

Hunskar, S.; Hole, 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non - inflammatory pain. *Pain*, v.30, págs. 103-114.

Hwang, A.S. e Wilcox, G.L. 1997. Analgesic propestcies of intrathecally admistered heterocyclic antidepressants. *Pain*,v.28, págs. 343-355.

IAL - Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. 1985. *Métodos químicos e físicos para análise de alimentos*. São Paulo, 553p.

Ishige, T.H.K.; Shimizu, S. 2007. Whole organism biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, v. 9, págs. 174-180.

Joly, A.B. *Botânica*. 1985. Editora Nacional, São Paulo: 7ª edição, págs. 722-723.

Julius, D. E. 2001. Basbaum, A.I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v. 413, págs. 203-210,



Katzer. Disponível em: <http://www-ang.kfunigraz.ac.at/katzer/engl/Zing-off.html>. Acessado em: 26/03/2002.

Kishore, N., and R.S. Dwivedi. 1992. Nepeta oil-a potential fungitoxic factor against damping-off pathogens. *J. Indian Bot. Soc.* 71: págs. 43-45.

Kitayama, Takashi; Iwabuchi, Risa; Minagawa, Shu; Sawada, Seiji; Okumura, Ryo; Hoshino, Kazuki; Cappiello, John; Utsumi, Ryutaro. 2007. Síntese de um inibidor original contra MRSA e VRE: Preparação de zerumbone ring-opening apresentando inibição histidina - quinase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 17(4): págs. 1098-1101.

Koster, R., Anderson, M., Beer, E.J. 1959. *Acetic acid for analgesic screening. Fed. Proc.*, v.18, 412p.

Kresse, W.J.; Prince, L.M.; William, K.J. 2002. The phylogeny and a new classification of ginger (zingiberaceae): Evidence from molecular data. *American Journal of Botany*, 89(10), págs. 1682-1696.

Lapa, Antonio José et al. 2005. *Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Medicinais*. São Paulo: Lagoa Editora Ltda.

Lê Cointe, P. 1947. *Árvores e Plantas Úteis (Indígenas e aclimata) da Amazônia Brasileira*, 2ª ed. São Paulo. Brasiliana, 506p.

Lewinso H.N; E., Dudai; N., Tadmor, Y., Katzir, I., Ravid, U., Putievky, E., Joel, D.M. 1998. Histochemical localization of citral accumulation in lemongrassleaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf Poaceae). *Annals of Botany*, v.81. págs. 35-39.

Litchfield, J.T.; Wilcoxon, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. 1949. *J Pharm.Exper.Therap.*, v.95, págs. 99-113,

Macfarlene, B.V.; Wright, A.; O'Callaghan, J Benson, H.A. 1997. Chronic neuropathic pain and its control by drugs. *Pharmacol.Ther.*,v.75, págs. 1-19.

Malek, Sri Nurestri Abd.; Ibrahim, Halijah; Lai, Hong Sok; Serm, Lee Guan; Seng, Chan Kam; Yusoff, Mashitah Mohd.; Ali, Nor Azah Mohd. 2005. Óleos essenciais do *Zingiber ottensii* Valet. e *Zingiber zerumbet* (L.) Smith de Sabah, Malásia. *Malaysian Journal of Science*, 24(1): págs. 49-58.

Malone, R.A., 1996. Pharmacological approdreche to natural Products Screening analise evaluation. *New Products and Plantas With Pharmacological, biological or therapeutical activity*. Berlim, P.P, 23-25.

Martins, E.R.; Castro, D.M.; Castellane, D.C.; Dias, J.E. 2000. *Plantas Medicinais*. Viçosa: UFV, 220p.

Masuda, T.A.; Jitoe. 1991. "Constituents of Zingiberaceae.3. Acetylated Flavonol

Glycosides From *Zingiber-Zerumbet*." *Phytochemistry* 30(7): págs. 2391-2392.

Matthes, H.W.D., Luu, B.; and Orrisson, G. 1980. *Citotoxic Componentes of Zingiber zerumbet, Curcuma zedoaria and C domestica.*, *Phytochemistry* 19: págs. 2643-2650.

Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.b., Nichols, D.E. and Mclaughlin, J.L. 1982. *Planta Medica* 45, págs. 31-34.

Millan, M.J. 1997. The role of descending noradrenergic and serotonergic pathways in the modulation of nociception: Focus receptor multiplicity. **In:** The pharmacology of pain ( Dckenson,A. E Besson,J.M.). Berlin : Springer, págs. 385-446.

Millan, M.J. 1999. The introduction of pain: An integrative Review. *Prog. Neurobiol.*, v.57, págs.1-64.

Morrison, J.K., Quinton, R.M.,Reinter, 1998. M.The purpose and value of LD50 determination. **In:** Boyland, E., Goudind, R. (eEd.) *Modern Trends in toxicology*. London: Butterworth,

Murakami, A.M. Takashi, et al. 1999. Identification of Zerumbone in *Zingiberzerumbet*, Smith as a potent inhibitor of 12-O-tetradecanoyl phorbol - 13 - acetate, induced Epstein-Barr Virus activation. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 63(10): págs. 1811-1812.

Murakami, A.; Hayashi, R.; Takana, T.; Kwon, K.I Han; Ohigashi, H. Safitri, R. 2004. Supression of dextrab sodium sulfate-induced colitis in mice by zerumbone, a subtropical ginger sesquiterpene, and nimesulide: sepa. *Elservier Science B.V.* 66 (7): págs. 1253-1261.

Nascimento, M.G.; Zanotto, S.P.; Melegari, S.P, Moran, P.J.S. 2002. Estudos de proteção da célula de *Saccharomyces cerevisiae* para utilização em reações de redução em meio orgânico. *Quím. Nova*, v. 25, n. 4, págs. 567-571.

Natakani, N.A. Jitoe. 1991. "Constituents of Zingiberaceae 2. Flavonoid Constituents of *Zingiber Zerumbet* Smith". *Agricultural and Biological Chemistry*, 55(2): págs. 455-460.

Notícias - INPA/Ascom: 2006-02-02 - 16:05:35

Oguntimein, B.O.; weyerstahl, P.; Marschall-Weyerstahl, H. 1990. Essential oil of *Curcuma longa* L. leaves. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 5, págs. 89-90.

Ohe, K.K. Mikil. 2000. "Selective conjugate addition to zerumbone and transannular cyclization of its derivatives" *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions* 1(21): págs. 3627-3634.

Pelt, J.M. 1979. A revolução verde da Medicina, *O Correio da Unesco*.

Pinheiro, C.C.S. 2005. Processo de obtenção de zerumbona isolada dos óleos essenciais das raízes de *Zingiber zerumbet* (L.) Smith (Zingiberaceae). Pedido de depósito nacional de patente PI0505343-9. Data de depósito 28/11/2005.

Pinheiro, C.C.S.; Lima, M.P.; Costa, C.A. 2001. Aspecto Químico - Farmacológico de Zerumbone Isolado de *Zingiber zerumbet* (Zingiberaceae). *Reunião da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência (SBPC)*, Manaus - AM.

Pinheiro, C.C.S.; Pohlit, A.M. et al. 2002. Aspecto Químico e Farmacológico de *Zingiber zerumbet* (zingiberaceae). *Semana da Química*. Universidade Federal do Amazonas - UFAM. Manaus - AM.

Reid, Walter V. et al. 1993. Prospección de la biodiversidad Instituto Nacional de Biodiversidade, San José, Costa Rica. *Editado pelo World Resources Institute*.

Ribeiro, R.A.; Vale, M.L.; Thomazzi, S.M.; Paschoalato, A.B.P.; Poole, S.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q. 2000. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur.J.Pharmacol.*, v. 387, págs. 111-118.

Rocha e Silva, M. 1968. Métodos estatísticos aplicados à Farmacologia, cap. 3. em: *Fundamentos de Farmacologia e suas aplicações à Terapêutica* - volume 1, 2ª ed. Edart, Livraria, Editora Ltda., São Paulo.

Rosland, J.H. 1991. The formalin test in mice the influence of ambient temperature. *Pain*, v. 45, págs. 211-216.

Sa Sharifah Sakinah, S Handayani tri e LP Azimahtol Hawariah. 2007. Escola de Biociências e de Biotecnologia, faculdade de ciência e tecnologia, Universidade Nacional da Malásia (UKM), 43600 Bangi, Selangor, Malaysia *Pilha De Cancer Internacional*, 7:4 doi:10.1186/1475-2867-7-4.

Sadhu, Samir Kumar; Khatun, Amina; Ohtsuki, Takashi; Ishibashi, Masami. 2007. Primeira isolamento de sesquiterpenos e flavonóides da espécie *Zingiber* e indentificação da zerumbone o mais importante componente inibidor de crescimento de células. *Natural Product Research, Part B: Bioactive Natural Products*, 21(14): págs. 1242-1247.

Sakurada, T; Katsumata, K; Yogo, H.; Tan-no, K.; Sakurada, S.; Kisara, K. 1993. Antinociception induced by CP 96,345, a non-peptide NK-1 receptor antagonist, in the mouse formalin and capsaicin tests. *Neurosc.*, Vol. 151, págs. 142-145.

Salustiano, J.K. Hocino E.E.A. Carlini. 1966. Effects of Cannabis sativa and chlorpromazine on mice as measured by two methods used for evaluation of tranquilizing agents. *Med. Pharmacol. Exp. (Bonn)* (15): págs. 153-162.

Santos, A.R.S. e Carlixto, J.B. 1997a. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice.

Neuropeptides, v.31, págs. 381-389.

Schulz, V.R.; Hansel & V.E. Tyler, 2002. Plantas medicinais, fitomedicamentos e fitoterapia, em "*Fitoterapia racional - um guia de fitoterapia para as ciências da saúde*" (Mande, ed.), Barueri, págs. 1-40.

Sharma, R.K.; Misra, B.P.; Sarma, T.C.; Bordoloi, A.K.; Pathak, M.G.; Leclercq, P.A. 1997. Essential oils of *Curcuma longa* L. from Bhutan. *Journal Essential Oil Research*, v. 9, págs. 589-892.

Siegmund, E.A.; Cadmus, R.A.; Lu, G.A. 1957a. Method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.95, págs.729-731,

Silva, J.S., Afonso, A.D.L., Guimarães, A.C. 1995. *Estudos dos métodos de secagem*. In: Pré-processamento de produtos agrícolas. Juiz de Fora, MG: Instituto Maria, págs.105-143.

Simon, J.E. 1993. New crop introduction: exploration, research and commercialization of aromatic plants in the new world. *Acta Horticulturae*, nº 331, págs. 209-221.

Singh, R.; Chandra, R.; Bose, M.; Luthra, P.M. 2002b. Antibacterial activity of *Curcuma longa* rhizome extract on pathogenic bacteria. *Current Science*, v. 83, n. 6, págs. 737-740.

Siqueira, N.C.S., Silva, G.A.A.B., Alice, C.B. 1986. Análise dos óleos essenciais de algumas plantas aromáticas tradicionais ou nativas no Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Farm.*, v. 67, págs. 118-128.

Sirsi, M.; Indian Inst. Sci., Bangalore. 1963. A Farmacologia da Zerumbone, um sesquiterpeno cetona isolado do zingiber zerumbet Indian *Journal of Pharmacy* (1962), 24(4), 83-5. CODEN: I JPAAO ISSN: 0019-5472. *Journal language unavailable*. CAN 58:16763 - AN 1963:16763 CAPLUS.

Sokal, R.R & Rohf, F.J. 1969. *Biometry. The principle and practice of statistic Biological research*.

Souza Brito, A.R.M. & A.A. Souza Brito, 1993. *J. Ethnopharmacol.* 39: 53-67.

Srivastava, A.K., Srivastava S.K., et al. 1997. "Essencial Oil Composition of Zingiber zerumbet (L.), Smith, from India". *Journal of Essencial Oil Research* 12(5): págs. 595-597.

Stoughton, R.B. and Fritsch, W. 1964. Influence of dimethylsulfoxide on human percutaneous absorption. *Arch Dermat* (90): págs. 512-517.

Supinya Tewtrakul, Sanan Subhadhirasakul. 2006. Atividade anti-alérgica de algumas plantas selecionadas da Família Zingiberaceae. *Department of Pharmacognosy and Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Prince of Songkla University, Hat-Yai, Songkhla 90112, Thailand* Received 8 March 2006; received in revised form 31 July 2006; accepted 11 August 2006 Available online 15 August 2006.

Takahashi, M.Y. 1987. *Monografias de corantes naturais para fins alimentícios: padrões e identidade*. 2. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz,. 118p.

Takashi Kitayama, a,\* Tomomi Masuda, a Kumi Sakai, a Chika Imada, a Yuji Yonekura and Yasushi Kawaib. 2006. Síntese extraordinária e estrutura do tipo zerumbone allene., Kinki University, Nara 631-8505, Japan Nagahama Institute of Bio-Science and Technology, Nagahama, Shiga 526-0829, Japan .Available online 22 September.

Tallon-Netto, B.D. 2004. Influência do processamento na qualidade da cúrcuma em pó e dos pigmentos curcuminóides purificados. Belo Horizonte: Faculdade de Farmácia da UFMG, 79p. (*Dissertação, Mestrado em Ciência de Alimentos*).

Tanaka, T.M. Shimizu. 2001. "Chemoprevention of azoxymethane-induced rat aberrant crypt foci by dietary zerumbone isolated from *Zingiber zerumbet*." *Life Sciences* 69(16): págs. 1935-1945.

Trease, G.E. 1996. *A textbook of Pharmacognosy*. 9<sup>a</sup> ed., London: Baillière, Tindall and Cassell, págs. 340-348.

Verlet, N. 1992. The world herbs and essential oils economy - analysis of the medium term development. *Acta Horticultura*, nº 306, págs. 474-481.

Waterman P.G. & Hay, 1993. Biological Activity of Volatile Oils. **In:** Hay R.K.M; Waterman P.G (ed). Volatile oil crops: their biology, biochemistry.

Welankim, S.S, H.V. Kamath. 1969. "Terpenoids. Transformation Products of Zerumbone". *Indian Journal of Chemistry* 7(2): 126p.

Wilson, O. 1994. *Diversidade de vida*. Editora Companhia das Letras, 359p.

Winter CA, Risley EA, Nuss GW. 1964. Carrageenin-induced o edema in hind paw of the rat as a essay for antiinflamatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*; 111(1).

Winter, C.A., E.A. Risley & G.W. Nuss. 1962. *Proc. Soc. Exp. Biol.* 3: 544-7.

World Health Organization - WHO, 1999. *Monographs on selected medicinal plants*. v. 1. Geneva, págs. 277-28.

Zerumbone.com. Disponível em: <http://zerumbone.com> - Acessado em: 15 Mar. 2008.