



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO QUÍMICO DE RIZOMAS DE *Alpinia zerumbet*: INIBIDORES DA ENZIMA
DE CONVERSÃO DA ANGIOTENSINA, COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE E DE
INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE**

RICARDO FARIAS DE ALMEIDA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

FORTALEZA – CEARÁ

2012

**ESTUDO QUÍMICO DE RIZOMAS DE *Alpinia zerumbet*: INIBIDORES DA ENZIMA
DE CONVERSÃO DA ANGIOTENSINA, COM POTENCIAL ANTIOXIDANTE E DE
INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE**

RICARDO FARIAS DE ALMEIDA

**Dissertação submetida à coordenação do Curso de Pós-Graduação em
Química, como requisito para obtenção do grau de mestre.**

Orientador(a): Maria Teresa Salles Trevisan – UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

FORTALEZA – CE

2012

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

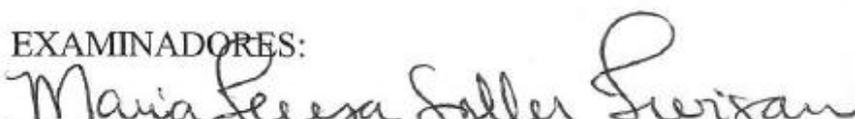
-
- A451e Almeida, Ricardo Farias.
Estudo químico de rizomas de alpinia zerumbet: inibidores da enzima de conversão da angiotensina, com potencial antioxidante e de inibição da acetilcolinesterase. / Ricardo Farias de Almeida. – 2013.
87 f. : il. color., enc. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química, Programa de Pós-Graduação em Química, Fortaleza, 2013.
Orientação: Profa. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan.
1. Hipertensão; 2. Enzima conversora de angiotensina. 3. Antioxidante. I. Título.

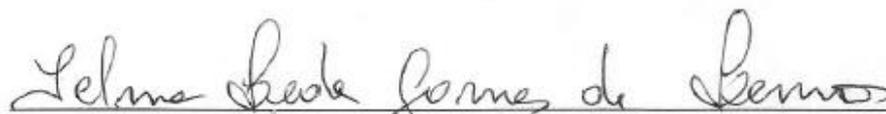
Esta dissertação foi aprovada como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica, outorgado pela Universidade Federal do Ceará, em cuja Biblioteca de Ciências e Tecnologia/UFC encontra-se à disposição dos interessados.


Ricardo Farias de Almeida.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 31/10/2012

EXAMINADORES:


Prof. Dra. Maria Teresa Salles Trevisan
Universidade Federal do Ceará – UFC


Prof. Dra. Telma Leda Gomes de Lemos
Universidade Federal do Ceará – UFC


Dr. Edy Sousa de Brito
Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS	I
LISTA DE FIGURAS	II
LISTA DE TABELAS	III
LISTA DE FLUXOGRAMAS	IV
RESUMO	V
ABSTRACT	VI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS	4
3. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO	5
3.1 Levantamento Bibliográfico dos metabólitos secundários isolados do gênero <i>Alpinia</i>	5
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	16
4.1 Determinação estrutural de DHD1, DHD2 e DHD3.....	16
4.2 Determinação estrutural de DD4 e DD5	41
4.3 Ensaio para inibição da enzima conversora de angiotensina	53
4.4 Atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase.....	53
4.5 Avaliação qualitativa da capacidade seqüestradora de radicais livres (DPPH)	54
4.5 Teste Larvicida frente ao <i>Aedes aegypti</i>	55
5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	56
5.1 Material Botânico.....	56
5.2 Métodos Cromatográficos	56
5.2.1 Cromatografia de Adsorção	56
5.3 Métodos Físicos	57
5.3.1 Ponto de Fusão.....	57
5.3.2 Espectroscopia de Ressonancia Magnetica Nuclear (RMN)	57
5.4 Estudo dos constituintes químicos não voláteis dos rizomas de <i>Alpinia zerumbet</i>	57
5.4.1 Preparação dos extratos de <i>Alpinia zerumbet</i>	57
5.4.2 Fracionamento cromatográfico de EHAZ	58
5.4.3 Fracionamento cromatográfico de EHAZ-D	59
5.4.4 Fracionamento cromatográfico de EHAZ-DHD e isolamento de DHD1, DHD2 e DHD3.....	59
5.4.5 Fracionamento cromatográfico de EHAZ-DD e isolamento de DD4 e DD5	60
5.5 Ensaio para inibição da enzima conversora de angiotensina	63
5.6 Ensaio para inibição da enzima acetilcolinesterase dos extratos	64
5.7 Avaliação qualitativa da capacidade seqüestradora de radicais livres (DPPH)	65
5.8 Teste Larvicida (utilizando as larvas de <i>Aedes aegypti</i>)	66
6. CONCLUSÃO.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
BB	Broad Band decoupling
δ	Deslocamento químico
J	Constante de acoplamento
MHz	Mega Hertz
CC	Cromatografia em Coluna Gravitacional
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazina
AchE	Enzima acetilcolinesterase
TNBS	Ácido 2,4,6-trinitrobenzeno sulfônico
DTNB	ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico)
ATCI	Iodeto de Acetilcolina
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
COSY	Correlation Spectroscopy
NOESY	Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy
s	Simpleto
d	Dupleto
t	Tripleto
m	Multipleteo

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fotografia da espécie <i>Alpinia Zerumbet</i> .	04
Figura 2: Representação estrutural do (E)-3,5-dimetoxiestilbeno.	17
Figura 3: Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) de DHD1.	19
Figura 4: Espectro de RMN ^{13}C -BB (75MHz, CDCl_3) de DHD1.	20
Figura 5: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (75MHz, CDCl_3) de DHD1.	20
Figura 6: Espectro bidimensional HSQC (300, 75 MHz, CDCl_3) de DHD1.	21
Figura 7: Espectro bidimensional COSY (300 MHz, CDCl_3) de DHD1.	22
Figura 8: Representação estrutural do (E)-15,16-bisnorlabda-8,11-dieno-13-ona.	24
Figura 9: Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) de DHD2.	27
Figura 10: Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) de DHD2.	28
Figura 11: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (75MHz, CDCl_3) de DHD2.	28
Figura 12: Espectro bidimensional HSQC (300, 75 MHz, CDCl_3) de DHD2.	29
Figura 13: Espectro bidimensional HMBC (300, 75 MHz, CDCl_3) de DHD2.	30
Figura 14: Espectro bidimensional COSY (300 MHz, CDCl_3) de DHD2.	31
Figura 15: Espectro bidimensional NOESY (300 MHz, CDCl_3) de DHD2.	32
Figura 16: Representação estrutural 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-3'-(3''-metil-6''-metil-etil-2''-ciclohexenil)chalcona .	33
Figura 17: Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) de DHD3.	36
Figura 18: Espectro de RMN ^{13}C -BB (75MHz, CDCl_3) de DHD3.	37
Figura 19: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (75MHz, CDCl_3) de DHD3.	37
Figura 20: Espectro bidimensional HSQC (300, 75 MHz, CDCl_3) de DHD3.	38
Figura 21: Espectro bidimensional HMBC (300, 75 MHz, CDCl_3) de DHD3.	39
Figura 22: Espectro bidimensional COSY (300 MHz, CDCl_3) de DHD3.	40
Figura 23: Representação estrutural do β -sitosterol.	41
Figura 24: Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) de DD4.	43

Figura 25: Expansão do espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) de DD4 na região de δ_{H} 0,2 a 2,45.	43
Figura 26: Espectro de RMN ^{13}C -BB (75MHz, CDCl_3) de DD4.	44
Figura 27: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (75MHz, CDCl_3) de DD4.	44
Figura 28: Representação estrutural de 5,6-dehidrokawain.	45
Figura 28: Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) de DD5.	48
Figura 29: Espectro de RMN ^{13}C -BB (75MHz, CDCl_3) de DD5.	49
Figura 30: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (75MHz, CDCl_3) de DD5.	49
Figura 31: Espectro bidimensional HSQC (300, 75 MHz, CDCl_3) de DD5.	50
Figura 32: Espectro bidimensional HMBC (300, 75 MHz, CDCl_3) de DD5.	51
Figura 33: Espectro bidimensional COSY (300 MHz, CDCl_3) de DD5.	52
Figura 34: Mecanismo para a reação enzimática do teste de Ellman.	53
Figura 35: Reações envolvidas na avaliação qualitativa da capacidade seqüestradora de radicais livres.	54
Figura 36: Análise da atividade larvicida do extrato hexânico de <i>Alpinia Zerumbet</i> .	55
Figura 37: Etapas do ensaio da metodologia modificada por Rhee.	65
Figura 38: Etapas do ensaio da metodologia descrita por Soler-Rivas.	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Chalconas, Diterpenos, Estilbenos e Kavapironas isoladas do gênero <i>Alpinia</i> .	5
Tabela 2: Deslocamento químico de RMN ¹³ C e seus respectivos hidrogênios mostrados pelo espectro de HSQC e dados comparativos de RMN ¹³ C de DHD1 com os descritos na literatura para (E)-3,5-dimetoxiestilbeno (NGO & BROW, 1997).	18
Tabela 3: Deslocamentos químicos de RMN ¹³ C de DHD2 por padrão de hidrogenação.	24
Tabela 4: Deslocamento químico de RMN ¹³ C e seus respectivos hidrogênios mostrados pelo espectro de HSQC, correlações a longa distância (HMBC) e dados comparativos de RMN ¹³ C-BB de DHD2 (75 MHz, CDCl ₃) com os descritos na literatura para (E)-15,16-bisnorlabda-8,11-dieno-13-ona (ITOKAWA et al, 1987).	26
Tabela 5: Deslocamento químico de RMN ¹³ C e seus respectivos hidrogênios mostrados pelo espectro de HSQC, correlações a longa distância (HMBC) e dados comparativos de RMN ¹³ C-BB de DHD3 (75 MHz, CDCl ₃) com os descritos na literatura para 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-3'-(3''-metil-6''-metil-etil-2''-ciclohexenil)chalcona. (SHIMOMURA et al., 1988).	35
Tabela 6: Dados comparativos de RMN ¹³ C-BB de DD4 (75 MHz, CDCl ₃) com os descritos na literatura para β-sitosterol (MACARI, 1990).	42
Tabela 7: Deslocamento químico de RMN ¹³ C e seus respectivos hidrogênios mostrados pelo espectro de HSQC, correlações a longa distância (HMBC) e dados comparativos de RMN ¹³ C-BB de DD5 (75 MHz, CDCl ₃) com os descritos na literatura para 5,6-dehidrokawain (DHARMARATNE et al., 2001).	47
Tabela 8. Valores de CL ₅₀ para extratos de <i>Alpinia Zerumbet</i> .	55
Tabela 9: Massa das frações obtidas com o fracionamento do extrato hexânico de <i>Alpinia zerumbet</i> .	58
Tabela 10: Massa das frações obtidas com o fracionamento de EHAZ-D.	59
Tabela 11: Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EHAZ-DHD.	60
Tabela 12: Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EHAZ-DD	61

LISTA DE FLUXOGRAMAS

- Fluxograma 1-** Obtenção dos extratos hexânico e etanólicos dos rizomas de *Alpinia zerumbet*. **58**
- Fluxograma 2-** Esquema de isolamento dos constituintes químicos DHD1, DHD2, DHD3, DD4 e DD5, partindo do extrato hexânico dos rizomas de *Alpinia zerumbet*. **62**

RESUMO

A hipertensão, uma das doenças mais comuns em todo o mundo, é uma doença crônica onde a pressão sanguínea elevada pode afetar a saúde. A enzima conversora de angiotensina I (ECA) pode aumentar a pressão arterial através da conversão da angiotensina I no potente vasoconstritor angiotensina II. Sendo assim, a inibição da atividade da ECA é considerada uma abordagem terapêutica útil para combater a hipertensão. *Alpinia zerumbet*, uma planta aromática abundante no nordeste do Brasil, é comumente utilizada na medicina popular devido suas propriedades diuréticas e hipotensivas. Além disso, vários estudos relatam atividade antihipertensiva para esta espécie. Dessa forma, *Alpinia zerumbet* pode ser uma importante fonte de inibidores de ECA. Sabendo disso, resolveu-se investigar os extratos dos rizomas desta espécie na busca de compostos inibidores de ECA. A prospecção química do extrato hexânico do rizoma permitiu o isolamento de cinco substâncias: Um estilbeno denominado (E)-3,5-dimetoxiestilbeno, inédito na espécie em estudo; um diterpeno de esqueleto labdano denominado (E)-15,16-bis-norlabda-8,11-dieno-13-ona; uma chalcona denominada 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-3'-(3''-metil-6''-metil-etil-2''-ciclohexenil)chalcona; um esteróide denominado β -sitosterol, comumente encontrado em plantas; e um hidrocarboneto aromático da classe kavapirona denominado 5,6-dehidrokawain. Na determinação estrutural dos compostos isolados, foram empregadas técnicas espectrométricas de análise unidimensionais [ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , e técnicas bidimensionais (^1H - ^1H -COSY, HSQC, HMBC, NOESY). Também foram realizados os testes de inibição da enzima conversora de angiotensina, antioxidante, de inibição da enzima acetilcolinesterase e larvicida dos extratos hexânicos e etanólicos dos rizomas de *Alpinia zerumbet*. Os dois extratos apresentaram potencial de inibição da enzima conversora de angiotensina e antioxidante. Somente o extrato hexânico apresentou atividade larvicida, com CL_{50} 823,1 ppm. Nenhum dos extratos em estudo apresentou potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase.

Palavras-chave: *Alpinia Zerumbet*; hipertensão; ECA; antioxidante; enzima acetilcolinesterase.

ABSTRACT

Hypertension is one of the most common diseases in the world, is a chronic disease in which high blood pressure can affect health. The angiotensin I converting enzyme (ACE) can increase blood pressure through the conversion of angiotensin I to the potent vasoconstrictor, angiotensin II. Thus, inhibition of ACE activity is considered a useful therapeutic approach to combat hypertension. *Alpinia zerumbet*, a herb abundant in northeastern Brazil, is commonly used in folk medicine due to its diuretic and hypotensive properties. Moreover, several studies reported for this species antihypertensive activity. Thus, *Alpinia zerumbet* can be an important source of ACE inhibitors. Knowing this, we decided to investigate the extracts of the rhizomes of this species in the search for compounds ACE inhibitors. Prospecting chemical hexane extract of the rhizome allowed the isolation of five substances: A stilbene, named (E) - 3,5-dimethoxystilbene, unprecedented in the species in this study, a labdane diterpene skeleton called (E) -15.16-bisnorlabda- 8,11-diene-13-one; one chalcone called 2',4'-dihydroxy-6'-methoxy-3'-(3''-methyl-6''- methyl - ethyl -2''-cyclohexenyl) chalcone; a steroid called β -sitosterol, commonly found in plants, and an aromatic hydrocarbon class kavapirone, called 5,6- dehidrokawain. In the structural determination of individual compounds, spectrometric techniques were employed dimensional analysis [nuclear magnetic resonance (NMR) ¹H and ¹³C and two dimensional techniques (¹H-¹H COSY, HSQC, HMBC, NOESY). Inhibition angiotensin converting enzyme, antioxidant potential, inhibition of acetylcolinestarase and larvicidal tests of ethanol and hexane extracts of the rhizomes of *Alpinia zerumbet* were tested. The two extracts showed potential for inhibition of angiotensin converting enzyme and antioxidant potential. Only the hexane extract showed larvicidal activity with LC₅₀ 823.1 ppm. None of the extracts studied showed potential inhibition of the enzyme acetylcholinesterase.

Keywords: *Alpinia Zerumbet*; hypertension; ACE; antioxidant; enzyme acetylcholinesterase.

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão, uma das doenças mais comuns em todo o mundo, é uma doença crônica onde a pressão sanguínea elevada pode afetar a saúde. Essa doença está associada a vários fatores de risco, como acidentes vasculares cerebrais, doenças do coração, insuficiência renal e aneurisma (GUYTON & HALL, 2006). Existem muitos fatores que podem causar hipertensão, tais como o sedentarismo, estresse e a obesidade visceral, que não se restringem aos idosos (EGAN *et al.*, 2004). A enzima conversora de angiotensina I (ECA) é peça chave no controle da pressão sanguínea: o sistema renina-angiotensina, que controla o volume extracelular e a vaso-constricção arterial (GANTEN *et al.*, 1984). A enzima conversora de angiotensina I (ECA) é um decapeptídeo que pode aumentar a pressão arterial através da conversão da angiotensina I no potente vasoconstritor angiotensina II (octapeptídeo) e pela degradação de um peptídeo hipotensor, a bradicinina (SKEGGS *et al.*, 1956). Por isso, a inibição da atividade da ECA é considerada ser uma abordagem terapêutica útil para combater a hipertensão. Vários inibidores de ECA quimicamente sintetizados são atualmente utilizados no tratamento de pacientes hipertensos, entretanto estas drogas podem provocar vários efeitos colaterais indesejáveis (KAPEL *et al.*, 2006). Além disso, os IECAs tradicionais podem chegar a custar até 140 reais mensais. Por essas razões, a busca por antihipertensivos do tipo IECAs em plantas medicinais e alimentos podem ser uma forma muito útil de alternativa terapêutica aliando eficácia a um baixo custo operacional.

Produtos naturais são reconhecidamente importante fontes de IECAs. Uma série de compostos de plantas foram identificados possuindo atividade inibidora da ECA, como taninos hidrolisáveis, fenilpropanóides, proantocianidinas, flavonóides, xantonas, ácidos graxos, terpenóides, alcalóides, oligossacarídeos, peptídeos/aminoácidos, entre outros (NYMAN *et al.*, 1998).

Alpinia zerumbet (sinonímia: *Alpinia speciosa*), membro da família Zingiberaceae, é uma planta aromática abundante no nordeste do Brasil, onde é comumente conhecida como "colônia". Infusões ou decocções de folhas de *A. zerumbet* são comumente utilizadas por suas propriedades diuréticas e hipotensivas (MATOS *et al.*, 2001). Decocção de folhas de *A. zerumbet* apresentaram uma ligeira diurese e diminuição da pressão arterial em voluntários saudáveis, sem afetar parâmetros de função renal (LARANJA *et al.*, 1991).

O óleo essencial de *Alpinia zerumbet* possui ação comprovada na regulação da pressão arterial. Essa ação é atribuída ao constituinte majoritário, terpinen-4-ol

(LAHLOU *et al.*, 2002). Tratamento com o óleo essencial de *Alpinia zerumbet* e com este principal constituinte, terpinen-4-ol, diminuiu a hipertensão arterial em ratos. Okamura *et al.* (1992) em seu trabalho sobre atividade biológica de monoterpenos descreve α -terpineol, composto presente no óleo *Alpinia zerumbet*, como inibidor da ECA (LAHLOU *et al.*, 2003).

Produtos naturais também têm ganhado importância na procura de fitoterápicos com atividade antioxidante e inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE).

Atualmente, a literatura revela atividade relativamente intensa na busca de inibidores de AChE em extratos de plantas, verificando-se expressivo interesse no isolamento e na identificação de novos inibidores (TREVISAN *et al.*, 2003). Inibidores da enzima acetilcolinesterase são utilizados no tratamento na doença Mal de Alzheimer, procedimento esse baseado na hipótese colinérgica. Essa hipótese tem como base que, após o aumento da inibição dessa enzima, existirá um aumento da concentração de acetilcolina no processo de sinapse e conseqüentemente diminuição na progressão dos sintomas da doença (DOOLEY & LAMB, 2000).

Os cânceres em adultos são, em sua maioria, carcinomas, que têm como locais primários tecidos de origem epitelial como: pulmão, seio, cólon e útero, refletindo a vulnerabilidade seletiva destes tecidos aos insultos carcinogênicos, resultado de exposição ininterrupta a fatores ambientais. Quimioprevenção é o processo de inibir, retardar ou inverter a carcinogênese na fase pré-maligna e objetiva deter ou inverter o desenvolvimento e progressão de células pré-cancerosas por uso de nutrientes não citotóxicos e/ou agentes farmacológicos durante o período de tempo entre iniciação e progressão do tumor (KELLOFF *et al.*, 1994).

Uma grande variedade de compostos fenólicos, particularmente aqueles encontrados em plantas medicinais, foi relatada por possuírem atividades anticarcinogênica e antimutagênica. A maioria destes compostos fenólicos de ocorrência natural possui propriedades antioxidativas que parece contribuir para a quimioprevenção e atividade quimioprotetiva (OWEN *et al.*, 2000). Vários autores relatam atividades antitumorais para rizomas do gênero *Alpinia* (GRAHAM *et al.*, 2000; HEO *et al.*, 2001; ; HOUGHTON *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2008; KUO *et al.*, 2010). Xu *et al.* (1996) descobriram dois novos diterpenos do tipo labdano, denominados de Zerumina A e Zerumina B. Pesquisas mais recentes realizadas com *Curcuma amada* Roxb., também uma Zingiberaceae, referem a presença da Zerumina B no rizoma desta espécie e atribui a este composto pronunciada atividade citotóxica e antitumoral (ABAS *et al.*, 2005).

Como vários estudos relatam atividade antihipertensiva de *Alpinia zerumbet*, resolveu-se investigar os extratos dos rizomas desta espécie na busca de novos compostos inibidores de ECA. Em adição, também foi objetivo do presente estudo avaliar o potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase, potencial antioxidante e potencial larvicida dos extratos hexânico e etanólico dos rizomas dessa planta.

2. CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

A família Zingiberaceae é constituída de 53 gêneros e mais de 1.200 espécies nativas de regiões tropicais, especialmente do sul e sudeste da Ásia expandindo-se através da África tropical até a América do Sul e Central. O gênero *Alpinia* é o maior da família com mais de 200 espécies de ocorrência na Malásia e nas ilhas do Oceano Pacífico (KRESS *et al.*, 2002).

A espécie *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burtt & Smith é conhecida pelos nomes vulgares de colônia, paco-seroca, cuité-açu, pacová, gengibre-concha, cardamomo-domato, cardamomo-falso, cana-do-brejo, cana-domato e paco-seroso (Machado 1996).

Albuquerque & Neves (2004) descrevem *Alpinia zerumbet* da seguinte forma:

Alpinia zerumbet é uma planta herbácea, perene, atingindo 2,5 m altura, rizomatosa, com caule aéreo curto, folhas lanceoladas em disposição dística, de base aguda e ápice cuspidado, pubescentes nos bordos. As folhas são curto-peciouladas, com longa bainha aberta e lígula desenvolvida. A sobreposição das bainhas origina um pseudo-caule. Lâmina foliar - A epiderme, em visão frontal, mostra células poligonais de paredes retas, levemente espessadas, por vezes arqueadas ordenadas em fileiras. Tricomas ocorrem somente nos bordos, e estômatos, do tipo paracítico, acham-se em densidade equivalente a 7,3/mm² na face adaxial, e a 149/mm² na abaxial. Nesta face encontram-se ainda estômatos do tipo tetracítico. As células epidérmicas sobre as regiões costais têm dimensões reduzidas, paredes suberificadas e encerram corpúsculos arredondados de natureza silicosa.



Figura 1: Fotografia da espécie *Alpinia Zerumbet*.

3. LEVANTAMENTO BIBLIOGRÁFICO

3.1 Levantamento Bibliográfico dos metabolitos secundários isolados do gênero *Alpinia*

Neste capítulo serão registradas as estruturas de todos diterpenos, chalconas estilbenos e kavapironas isoladas do gênero *Alpinia*. A busca foi realizada no programa computacional Scifinder scholar utilizando o termo “*Alpinia diterpene*”, para pesquisa de compostos da classe de diterpenos, “*Alpinia chalcone*” para pesquisa de compostos da classe das chalconas, “*Alpinia stilbene*”, para procura de compostos da classe de estilbenos e “*Alpinia kavapirone*” para procura de compostos da classe das kavapironas (Tabela 1).

Tabela 1. Chalconas, Diterpenos, Estilbenos e Kavapironas isoladas do gênero *Alpinia*.

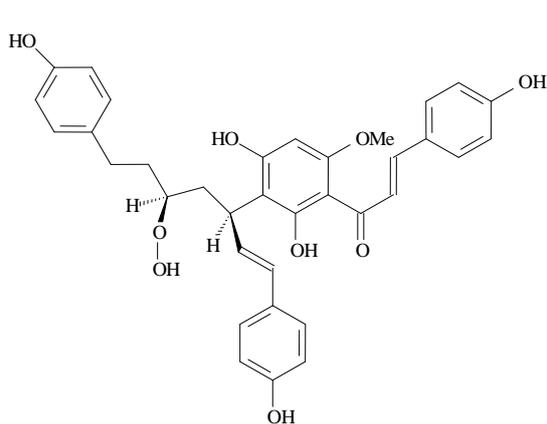
Nº	Chalconas	Espécies	Referências
1	Calixina A	<i>Alpinia blepharocalyx</i>	PRASAIN <i>et al.</i> , 1998
2	Calixina B	<i>Alpinia blepharocalyx</i>	KADOTA <i>et al.</i> , 1996 PRASAIN <i>et al.</i> , 1998 PRASAIN <i>et al.</i> , 1997
3	Calixina H	<i>Alpinia blepharocalyx</i>	PRASAIN <i>et al.</i> , 1998
4	Calixina Y	<i>Alpinia katsumadai</i>	YANG <i>et al.</i> , 2011
5	Calixina F	<i>Alpinia blepharocalyx</i>	PRASAIN <i>et al.</i> , 1998
6	Cardamonina	<i>Alpinia katsumadai</i> <i>Alpinia rafflesiana</i> <i>Alpinia malaccensis</i> <i>Alpinia speciosa</i> <i>Alpinia pricei</i>	NGO & BROWN, 1998 ISRAF <i>et al.</i> , 2007 NUNTAWONG & SUKSAMRAM, 2008 KRISHNA&CHAGANTY, 1973 XIAO <i>et al.</i> , 2011 CHANG <i>et al.</i> , 2012
7	Calixina B	<i>Alpinia blepharocalyx</i>	PRASAIN <i>et al.</i> , 1998 PRASAIN <i>et al.</i> , 1997

N°	Chalconas	Espécies	Referências
8	Epicalixina H	<i>Alpinia blepharocalyx</i>	PRASAIN <i>et al.</i> , 1998
9	Flavokavaina B	<i>Alpinia pricei</i> <i>Alpinia mutica</i> <i>Alpinia pricei</i>	KUO <i>et al.</i> , 2010 HSEU <i>et al.</i> , 2012 MALEK <i>et al.</i> , 2011 CHANG <i>et al.</i> , 2010
10	Helicrisetina	<i>Alpinia katsumadai</i>	NGO & BROWN, 1998 NUNTAWONG & SUKSAMRAM, 2008
11	Isorubrain	<i>Alpinia katsumadai</i>	HUA <i>et al.</i> , 2009
12	Pinocembrina chalcona	<i>Alpinia katsumadai</i>	XIAO <i>et al.</i> , 2011
13	Pinostrobina chalcona	<i>Alpinia mutica</i>	MALEK <i>et al.</i> , 2011
14	Rubrain	<i>Alpinia katsumadai</i>	HUA <i>et al.</i> , 2009
15	Sumadain C	<i>Alpinia katsumadai</i>	HUA <i>et al.</i> , 2009
16	Sumadain A	<i>Alpinia katsumadai</i>	HUA <i>et al.</i> , 2008
17	Sumadain B	<i>Alpinia katsumadai</i>	HUA <i>et al.</i> , 2008
18	6-hidroxicalexina F	<i>Alpinia blepharocalyx</i>	PRASAIN <i>et al.</i> , 1998
N°	Diterpenos	Espécies	Referências
19	Alpindenoside A	<i>Alpinia densespicata</i>	KUO <i>et al.</i> , 2009
20	Alpindenoside B	<i>Alpinia densespicata</i>	KUO <i>et al.</i> , 2009
21	Alpindenoside C	<i>Alpinia densespicata</i>	KUO <i>et al.</i> , 2009
22	Alpindenoside D	<i>Alpinia densespicata</i>	KUO <i>et al.</i> , 2009
23	Calcaratarins A	<i>Alpinia calcarata</i>	KONG <i>et al.</i> , 2000
24	Calcaratarin B	<i>Alpinia calcarata</i>	KONG <i>et al.</i> , 2000
25	Calcaratarin C	<i>Alpinia calcarata</i>	KONG <i>et al.</i> , 2000

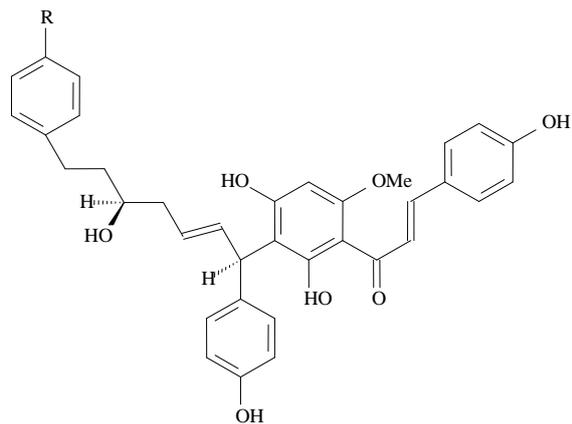
N°	Diterpenos	Espécies	Referências
26	Calcaratarin D	<i>Alpinia calcarata</i>	KONG <i>et al.</i> , 2000
27	Calcaratarin G	<i>Alpinia calcarata</i>	KONG <i>et al.</i> , 2004
28	Calcaratarin H	<i>Alpinia calcarata</i>	KONG <i>et al.</i> , 2004
29	Coronarin A	<i>Alpinia malaccensis</i>	NUNTAWONG & SUKSAMRAM, 2008
30	Coronarin C	<i>Alpinia chinensis</i>	SY <i>et al.</i> , 1997
31	Coronarin E	<i>Alpinia chinensis</i> <i>Alpinia malaccensis</i> <i>Alpinia javaicana</i> <i>Alpinia zerumbet</i>	SY <i>et al.</i> , 1997 NUNTAWONG & SUKSAMRAM, 2008 SIRAT <i>et al.</i> , 1994 XU <i>et al.</i> , 1996
32	(E)-15-nor-16-oxo-8(17),12-labdadieno	<i>Alpinia tonkinensis</i>	ZHANG & KONG, <i>et al.</i> , 2004
33	(E)-12,15-Dihidroxilabda-8(17)-13-dien-16-al	<i>Alpinia chinensis</i>	SY <i>et al.</i> , 1997
34	(E)-14,15-Dihidroxilabda-8(17),12-dien-16-al	<i>Alpinia chinensis</i>	SY <i>et al.</i> , 1997
35	(E)-15-Hidroxilabda-8(17),11,13-trien-16,15-olide	<i>Alpinia chinensis</i>	SY <i>et al.</i> , 1997
36	(E)-Labda-8(17), 12-diene-15,16-dial	<i>Alpinia calcarata</i> <i>Alpinia chinensis</i> <i>Alpinia speciosa</i> <i>Alpinia formosana</i> <i>Alpinia galanga</i> <i>Alpinia javaicana</i> <i>Alpinia malaccensis</i> <i>Alpinia katsumadai</i> <i>Alpinia zerumbet</i>	HEMA & NAIR, 2009 SY <i>et al.</i> , 1997 TAKAHASHI <i>et al.</i> , 1980 ITOKAWA <i>et al.</i> , 1988 MORITA & ITOKAWA, 1986 SIRAT <i>et al.</i> , 1994 NUNTAWONG & SUKSAMRAM, 2008 NGO & BROWN, 1998 CHOMPOO <i>et al.</i> , 2011
37	(E)-14,15-Epoxilabda-8(17),12-dien-16-al	<i>Alpinia chinensis</i>	SY <i>et al.</i> , 1997
38	(E)-15,16-bisnorlabda-8,11-dien-13-ona	<i>Alpinia speciosa</i> <i>Alpinia calcarata</i> <i>Alpinia zerumbet</i> <i>Alpinia formosana</i>	TAKAHASHI <i>et al.</i> , 1980 KONG <i>et al.</i> , 2000 XU <i>et al.</i> , 1996 ITOKAWA <i>et al.</i> , 1988

N°	Diterpenos	Espécies	Referências
39	(E)-15,16-Epoxilabda-8(17),11,13-trien-16-ol	<i>Alpinia chinensis</i>	SY <i>et al.</i> , 1997
40	(E)-labda-8(17), 12-diene-15-ol-16-al	<i>Alpinia calcarata</i> <i>Alpinia formosana</i>	KONG <i>et al.</i> , 2000 ITOKAWA <i>et al.</i> , 1988
41	(E,E)-15-Hidroxilabda-8(17),11,13-trien-16-al	<i>Alpinia chinensis</i>	SY <i>et al.</i> , 1997
42	(E)-8 β (17)-Epoxilabd-12-ene-15,16-dial	<i>Alpinia katsumadai</i> <i>Alpinia galanga</i>	NGO & BROWN, 1998 MORITA & ITOKAWA, 1986 HARAGUCHI <i>et al.</i> , 1996
43	Galanal A	<i>Alpinia galanga</i>	MORITA & ITOKAWA, 1986
44	Galanal B	<i>Alpinia galanga</i>	MORITA & ITOKAWA, 1986
45	Galactona	<i>Alpinia galangal</i> <i>Alpinia katsumadai</i>	MORITA & ITOKAWA, 1986 NGO & BROWN, 1998
46	Hedyforrestin B	<i>Alpinia malaccensis</i>	NUNTAWONG & SUKSAMRAM, 2008
47	Noralpindenoside A	<i>Alpinia densespicata</i>	KUO <i>et al.</i> , 2009
48	Noralpindenoside B	<i>Alpinia densespicata</i>	KUO <i>et al.</i> , 2009
49	Zerumin A	<i>Alpinia calcarata</i> <i>Alpinia zerumbet</i>	HEMA & NAIR, 2009 KONG <i>et al.</i> , 2000 Xu <i>et al.</i> , 1995 XU <i>et al.</i> , 1996
50	Zerumin B	<i>Alpinia zerumbet</i>	XU <i>et al.</i> , 1996
51	(12S)-15,16-epoxi-8(17), 13(16), 14-labdatrien-12-ol	<i>Alpinia tonkinensis</i>	PHAN, <i>et al.</i> , 2005
52	15-Hidroxi-11,14-peroxilabda-8(17),12-dien-16-al	<i>Alpinia chinensis</i>	SY <i>et al.</i> , 1997
53	6 β -hidroxi-15,16-epoxi 8(17),11(trans),13(16), 14-labdatetrano.	<i>Alpinia zerumbet</i>	WEN <i>et al.</i> , 1997

N°	Estilbenos	Espécies	Referências
54	(E)-3-metoxi-5-hidroxiestilbeno	<i>Alpinia katsumadai</i> <i>Alpinia calcarata</i>	NGO & BROWN, 1998 HEMA & NAIR, 2009
55	(E)-3,5-dihidroxiestilbeno	<i>Alpinia katsumadai</i>	NGO & BROWN, 1998
56	(E)-3,5-dimetoxiestilbeno	<i>Alpinia katsumadai</i>	NGO & BROWN, 1998
57	(E)-3,5-dihidroxi-12-metoxiestilbeno	<i>Alpinia katsumadai</i>	NGO & BROWN, 1998
58	(Z) 3-metoxi-5-hidroxiestilbeno	<i>Alpinia katsumadai</i>	NGO & BROWN, 1998
59	(Z)-3,5-dihidroxiestilbeno	<i>Alpinia katsumadai</i>	NGO & BROWN, 1998
60	(Z)-3,5-dimetoxiestilbeno	<i>Alpinia katsumadai</i>	NGO & BROWN, 1998
61	(E) 1-(1-terpinen-4-olil)-3-metoxiestilbeno	<i>Alpinia katsumadai</i>	NGO & BROWN, 1998
N°	Kavalactonas	Espécies	Referências
62	5,6-dehidrokawain (DK)	<i>Alpinia zerumbet</i> <i>Alpinia malaccensis</i> <i>Alpinia nutans</i>	KUSTER <i>et al.</i> , 1999 NUNTAWONG & SUKSAMRAM, 2008 UPADHYAY <i>et al.</i> , 2011 HABSAH <i>et al.</i> , 2003
63	Dihidro-5,6-dehidrokawain (DDK)	<i>Alpinia zerumbet</i>	KUSTER <i>et al.</i> , 1999 ELZAAWELY <i>et al.</i> , 2011 UPADHYAY <i>et al.</i> , 2011
64	Desmetoxiyangonin	<i>Alpinia pricei</i>	CHANG <i>et al.</i> , 2010
65	Katsumadain	<i>Alpinia katsumadai</i>	LY <i>et al.</i> , 2010

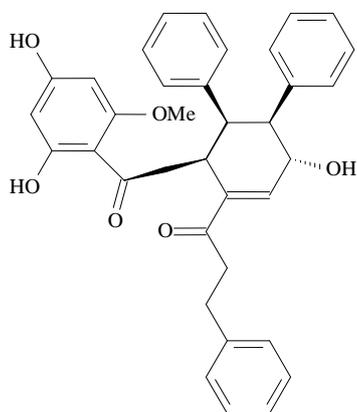


(1)

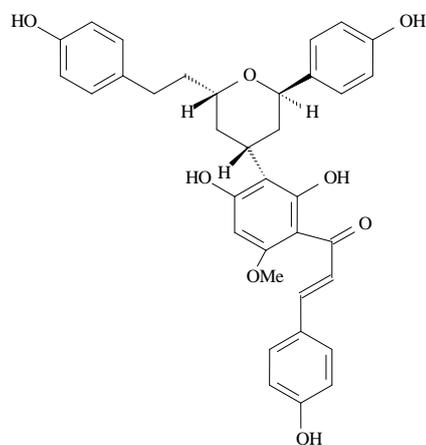


(2) R = OH

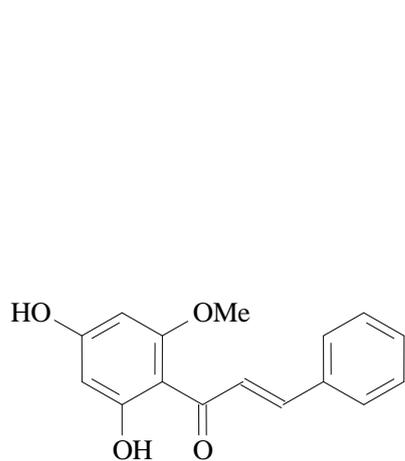
(3) R = H



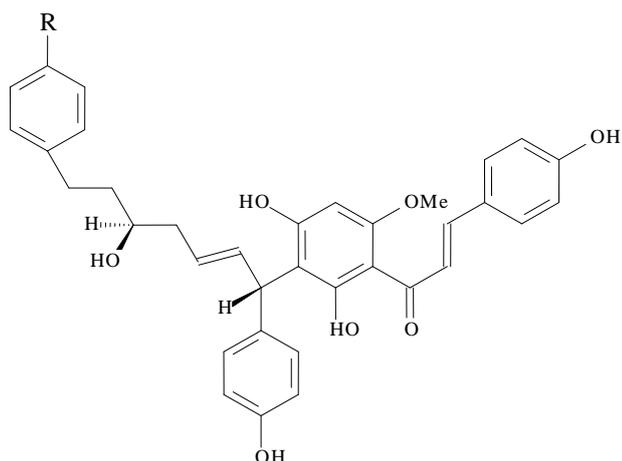
(4)



(5)

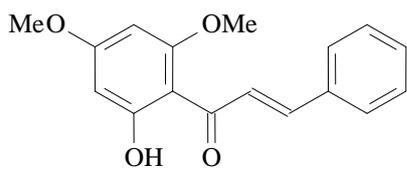


(6)

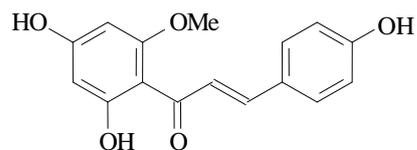


(7) R = OH

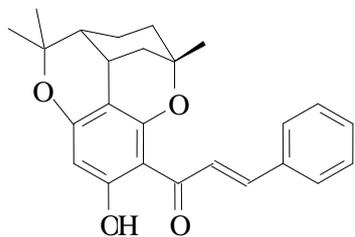
(8) R = H



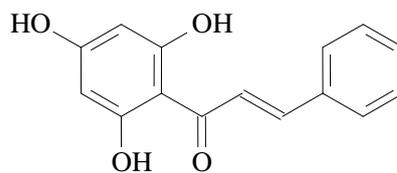
(9)



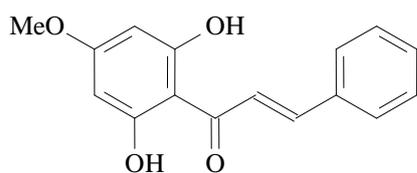
(10)



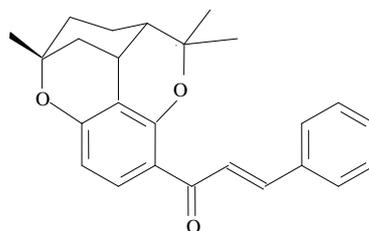
(11)



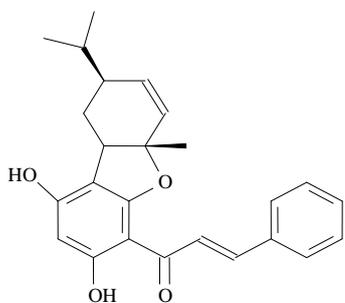
(12)



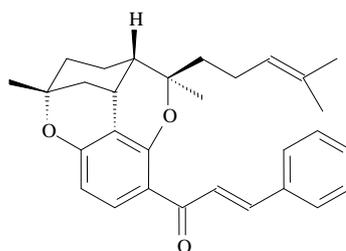
(13)



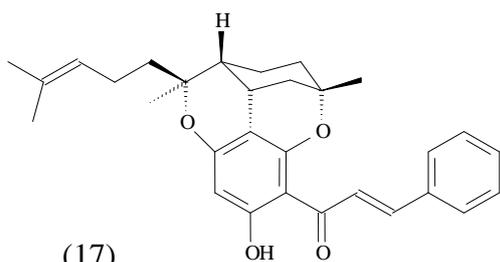
(14)



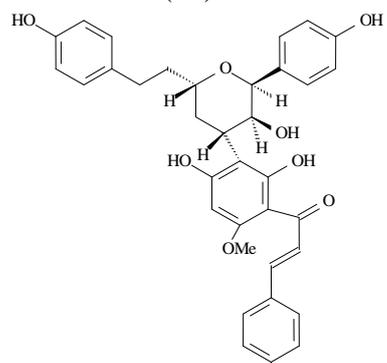
(15)



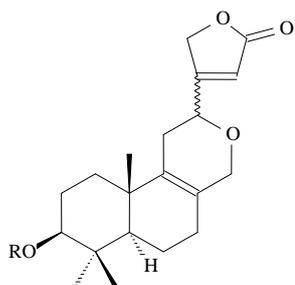
(16)



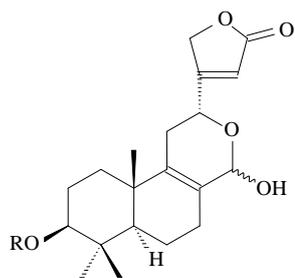
(17)



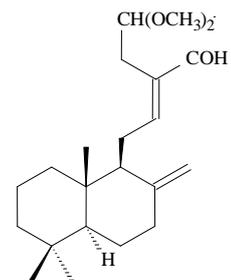
(18)



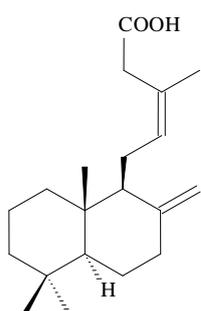
(19) R = -Glc₂-Rha ———
 (20) R = -Glc₂-Rha ·····



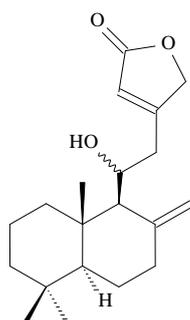
(21) R = -Glc₂-Rha
 (22) R = -Glc₂(Rha)₆(OAc)



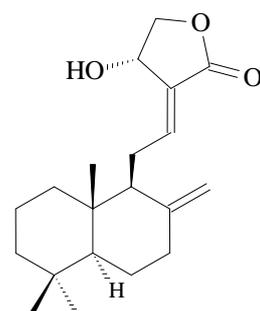
(23)



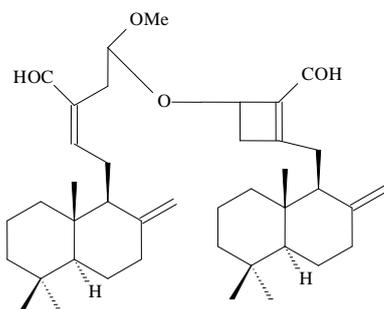
(24)



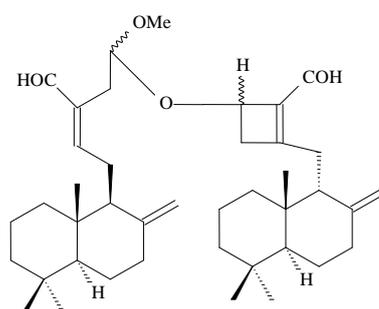
(25)



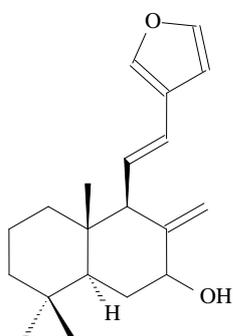
(26)



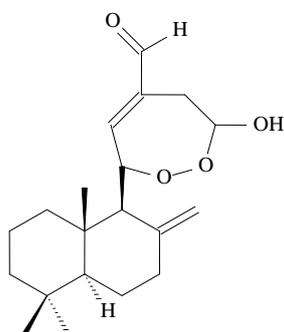
(27)



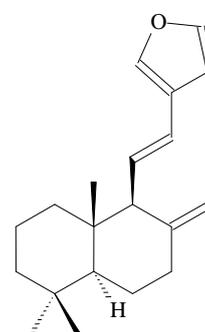
(28)



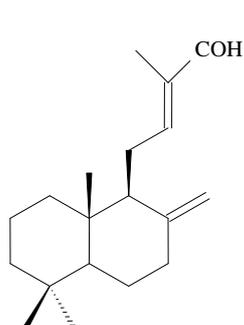
(29)



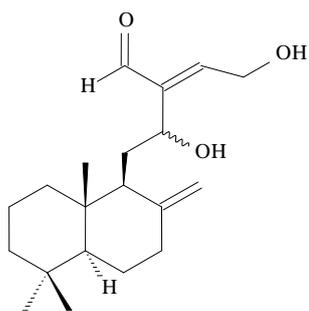
(30)



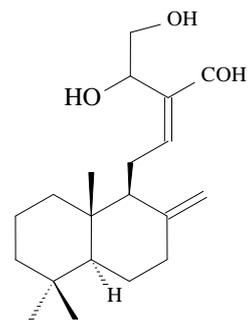
(31)



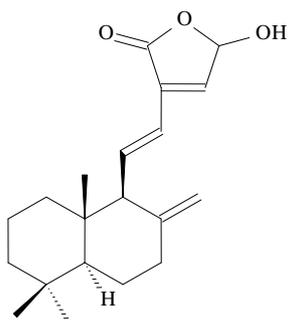
(32)



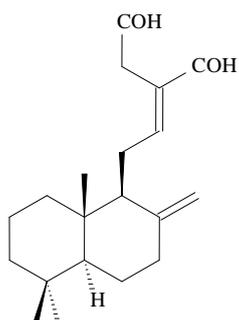
(33)



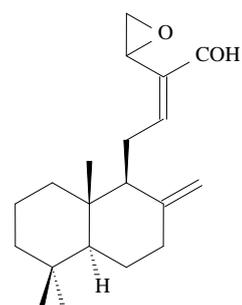
(34)



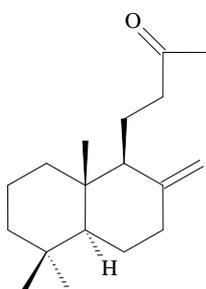
(35)



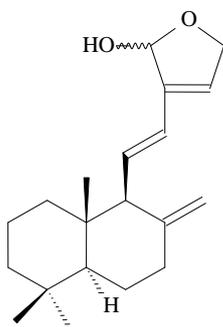
(36)



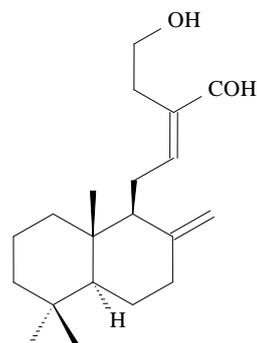
(37)



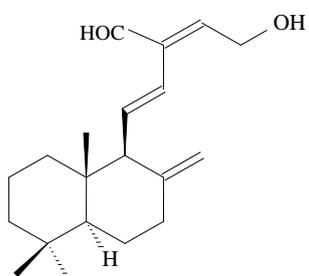
(38)



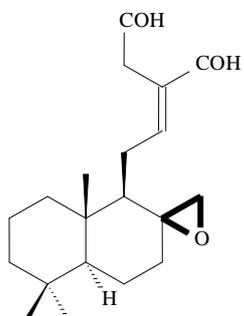
(39)



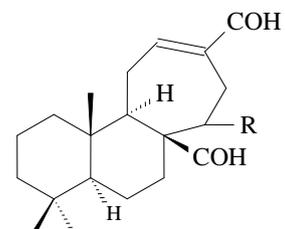
(40)



(41)

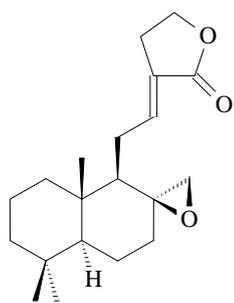


(42)

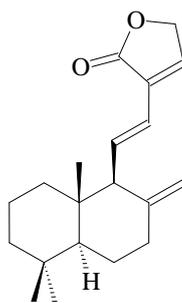


(43) R = OH

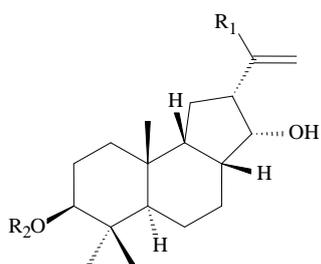
(44) R = OH —



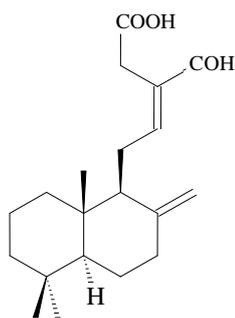
(45)



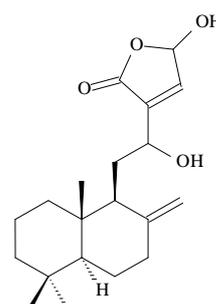
(46)



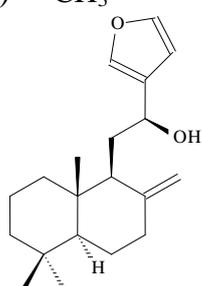
R_1
 (47) $-CH_2OH$ R_2
 (48) $-CH_3$ $-Glc_2-Rha$
 $-Glc_2-Rha$



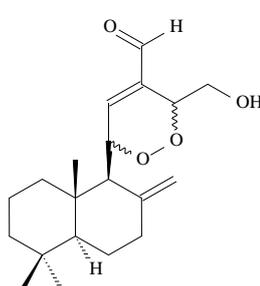
(49)



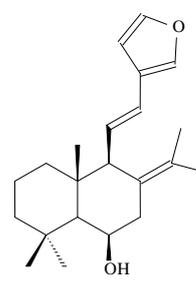
(50)



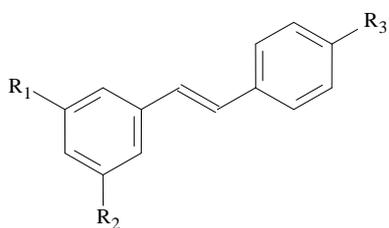
(51)



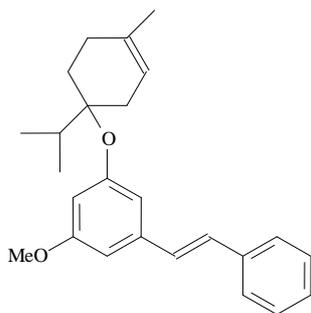
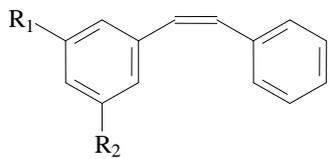
(52)



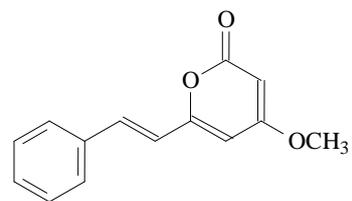
(53)



	R_1	R_2	R_3
(54)	OH	OMe	H
(55)	OH	OH	H
(56)	OMe	OMe	H
(57)	OH	OH	OMe

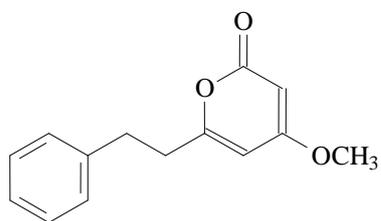


(61)

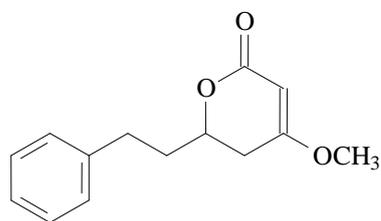


(62)

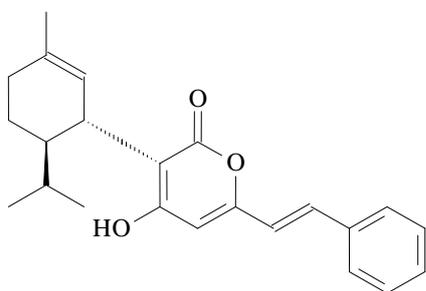
	R ₁	R ₂
(58)	OH	OMe
(59)	OH	OH
(60)	OMe	OMe



(63)



(64)



(65)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação estrutural de DHD1, DHD2 e DHD3

O fracionamento de EHAZ-DHD resultou no isolamento de três substâncias: um sólido de cor amarelada (DHD1), cristais incolores (DHD2) e um sólido de cor amarelo intenso (DHD3).

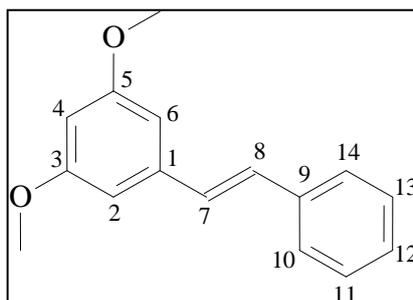
A substância DHD1 é solúvel em clorofórmio e tem ponto de fusão na faixa de 52,3-55,5 °C. No espectro de RMN ^1H (Figura 3, p.19) observou-se sinais à δ_{H} 7,51 (2H, dd, $J = 7,26$ Hz), 7,35 (2H, td, $J = 7, 50$ Hz), 7,25 (1H, t, $J = 8,31$ Hz), 6,67 (2H, d, $J = 2,40$ Hz), 6,40 (1H, t, $J = 2,10$ Hz) que devido aos deslocamentos químicos e valores de J característicos, são correspondentes a hidrogênios ligados a carbono aromático. O espectro também apresentou: dois sinais em δ_{H} 7,10 (1H, d, $J = 16,20$ Hz) e δ_{H} 7,03 (1H, d, $J = 15,75$ Hz), que devido aos valores de J característicos são correspondentes a hidrogênios ligados a carbono olefínico; um sinal em 3,83 (6H, s), que com base na integração e deslocamento químico é referente a dois grupamentos metoxila (O-CH_3).

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Figura 4, p. 20) apresentou 10 linhas espectrais, entretanto as intensidades relativamente altas de quatro linhas (δ_{C} 161,22; 126,78; 104,83; 55,58) sugeriram que cada uma delas represente dois átomos de carbono e a linha em δ_{C} 128,89, pela mesma razão, represente três átomos de carbono. Essas suposições foram confirmadas através do espectro HSQC (Figura 6, p.21). Desta forma, DHD1 possui dezesseis átomos de carbono em sua composição (Tabela 2, p. 18). Em relação à absorção observada em δ_{C} 55,58, pode-se confirmar a presença de dois grupamentos metoxila ($-\text{OCH}_3$) na estrutura. Todos os sinais, exceto este em δ_{C} 55,58, se encontram na região de carbono aromático e olefínico.

A comparação do espectro de RMN ^{13}C -BB com o espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figura 5, p.20) possibilitou a identificação de quatro carbonos não hidrogenados (C), dez carbonos metínicos (CH), e dois carbonos metílicos (CH_3).

Após análise dos dados espectrais, além da comparação com os dados da literatura (Tabela 2, p.18), foi possível sugerir para DHD1 a estrutura de um estilbeno (Figura 2) denominado (E)-3,5-dimetoxiestilbeno. Para confirmação desta suposição, os espectros de HSQC e COSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ foram analisados.

Figura 2: Representação estrutural de *trans*-3,5-dimetoxiestilbeno.



Os espectros de RMN bidimensional HSQC demonstram correlações $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ onde são observados acoplamentos entre carbonos e hidrogênios ligados entre si (SILVERSTEIN, 2000). O espectro de HSQC de DHD1 (Figura 6, p.21) possibilitou a observação das seguintes correlações: o sinal de hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 7,51$ com o sinal de carbono em $\delta_{\text{C}} 126,78$ (C-10, C-14), o sinal de hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 7,35$ com o sinal de carbono em $\delta_{\text{C}} 128,89$ (C-11, C-13), o sinal de hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 7,25$ com o sinal de carbono em $\delta_{\text{C}} 127,93$ (C-12), o sinal de hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 7,03$ com o sinal de carbono em $\delta_{\text{C}} 128,89$ (C-7), o sinal de hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 6,67$ com o sinal de carbono em $\delta_{\text{C}} 104,83$ (C-6, C-2), o sinal de hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 6,40$ com o sinal de carbono em $\delta_{\text{C}} 100,23$ (C-4) e o sinal de hidrogênio em $\delta_{\text{H}} 3,83$ com o sinal de carbono em $\delta_{\text{C}} 55,58$ (C-3', C-5') (Tabela 2, p.18). Com base nos dados acima, foi possível localizar a posição dos grupamentos metoxilas.

No espectro de RMN bidimensional COSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$ (Figura 7, p. 22) foi possível observar a correlação entre o hidrogênio H-4 ($\delta_{\text{H}} 6,40$) com os hidrogênios H-6 e H-2 ($\delta_{\text{H}} 6,67$). Também foi possível correlacionar os hidrogênios H-10 e H-14 ($\delta_{\text{H}} 7,51$) com os hidrogênios H-11 e H-13 ($\delta_{\text{H}} 7,35$).

Diante de todos os dados espectrais, pôde-se confirmar que DHD1 trata-se do estilbeno denominado (E)-3,5-dimetoxiestilbeno.

Esse composto já foi isolado das partes aéreas de *Alpinia katsumadai* (NGO & BROW, 1997), bem como de espécies de plantas de outros gêneros, como do caule de *Pinus sylvestris* (PARROTT *et al.*, 2010) e da casca da raiz de *Lonchocarpus chiricanus* (IOSET *et al.*, 2001), mas é inédito na espécie em estudo, segundo consulta feita nos sites acadêmicos <https://scifinder.cas.org> e <http://www.sciencedirect.com> (acesso em 01/10/2012). Essa substância é relatada sendo um potente larvicida, tão quanto à substância rotenona (IOSET *et al.*, 2001).

Tabela 2: Deslocamento químico de RMN ^{13}C e seus respectivos hidrogênios mostrados pelo espectro de HSQC e dados comparativos de RMN ^{13}C de DHD1 com os descritos na literatura para (E)-3,5-dimetoxiestilbeno (NGO & BROW, 1997).

C	δ_{C}	HSQC	Literatura
		δ_{H}	δ_{C}
1	139,58	-	139,40
2/6	104,83	δ_{H} 6,67 (d, $J=2,4$ Hz)	104,60
3/5	161,22	-	161,00
3/5-OCH ₃	55,58	δ_{H} 3,83(s)	55,40
4	100,23	6,40(t, $J=2,1$ Hz)	100,00
7	128,89	7,03 (d, $J=15,75$ Hz)	128,70
8	129,44	7,10 (d, $J= 16,20$ Hz)	129,20
9	137,36	-	137,10
10/14	126,78	7,51 (d, $J= 7,26$ Hz)	126,60
12	127,93	7,25 (t, $J=8,31$ Hz)	127,70
11/13	128,89	7,35 (t, $J= 7,5$ Hz)	128,70

Figura 3: Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) de DHD1.

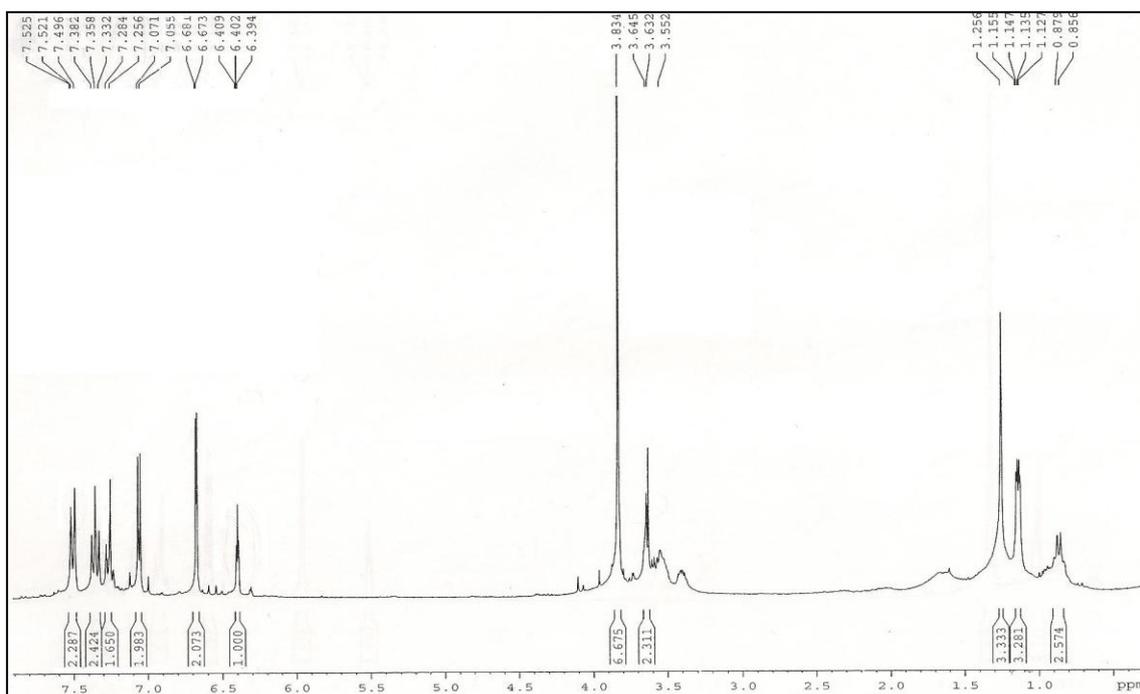


Figura 4: Espectro de RMN ^{13}C -BB (75MHz, CDCl_3) de DHD1.

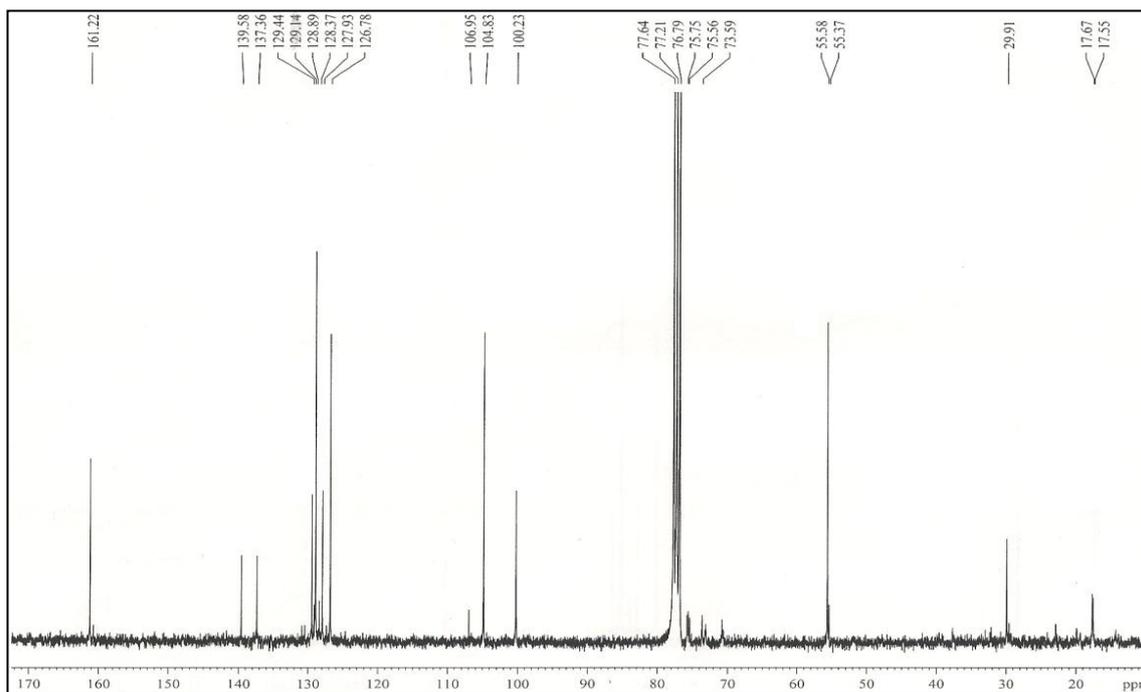


Figura 5: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (75MHz, CDCl_3) de DHD1.

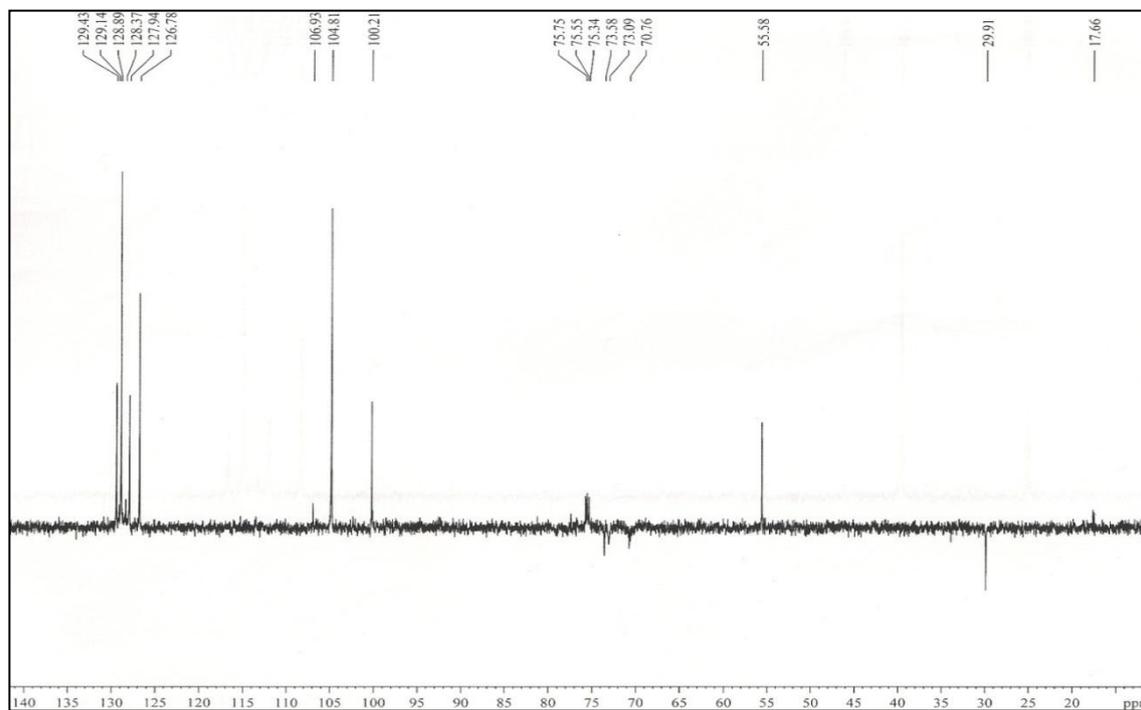


Figura 6: Espectro bidimensional HSQC (300, 75 MHz, CDCl_3) de DHD1.

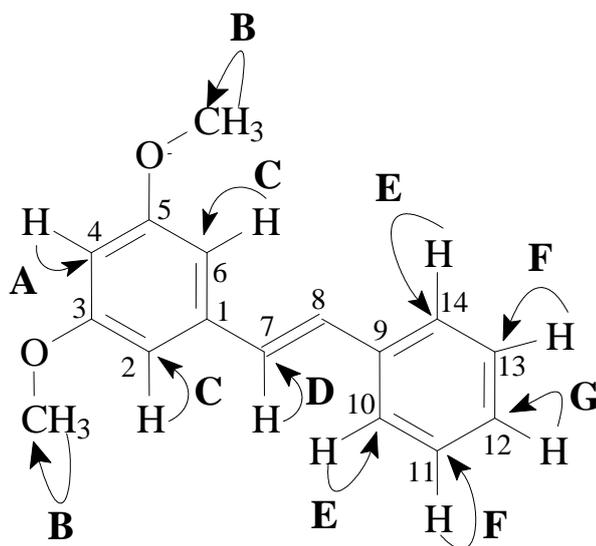
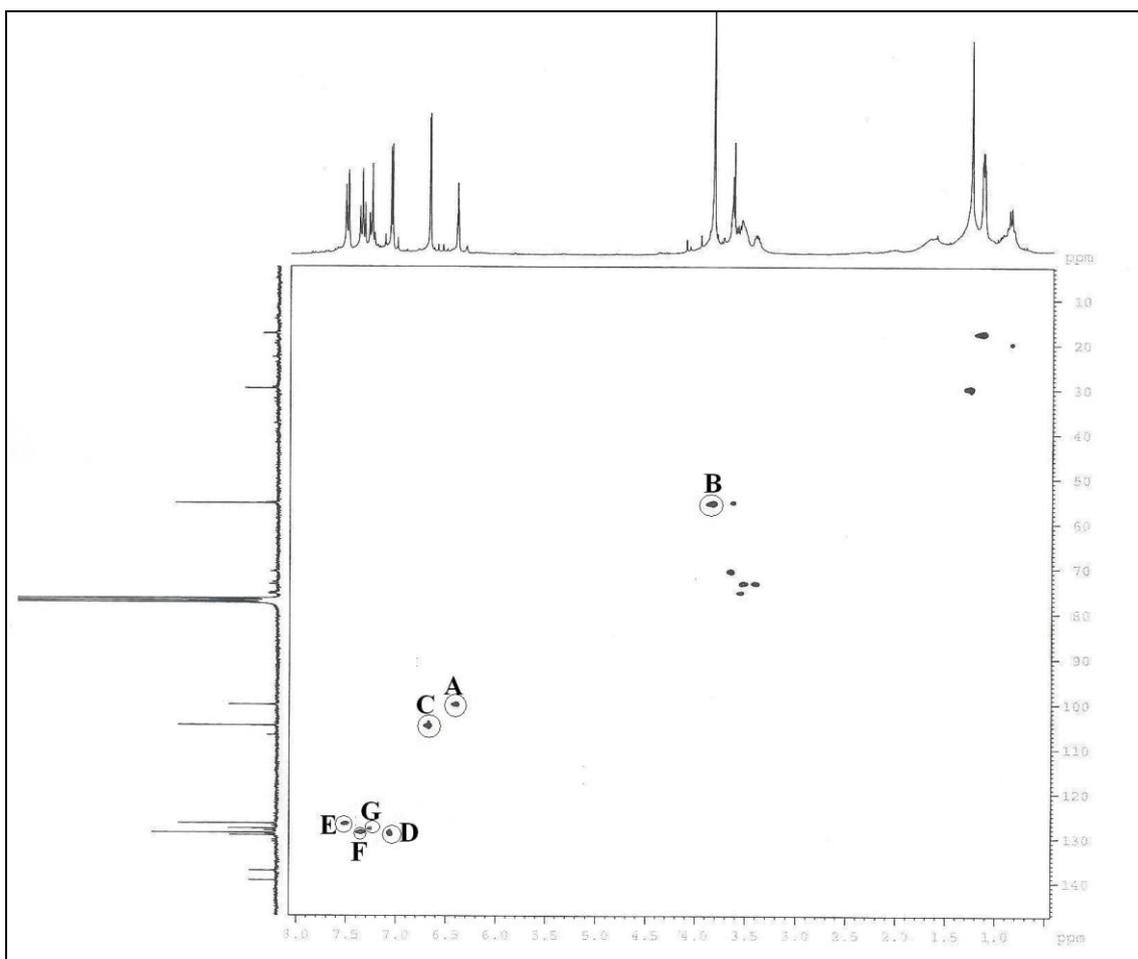
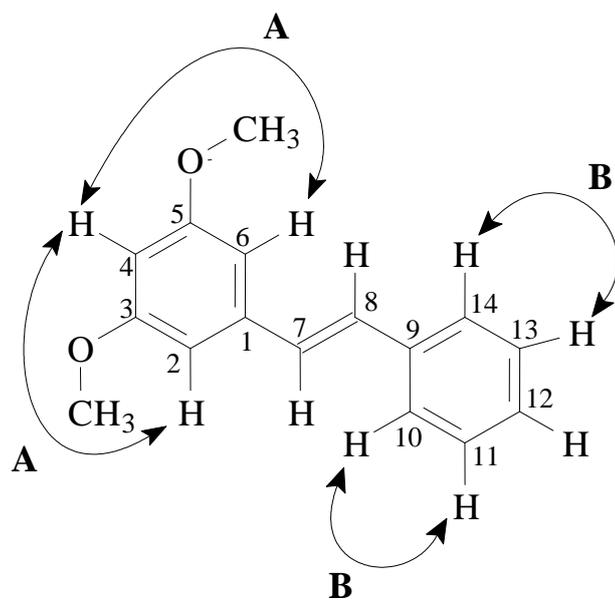
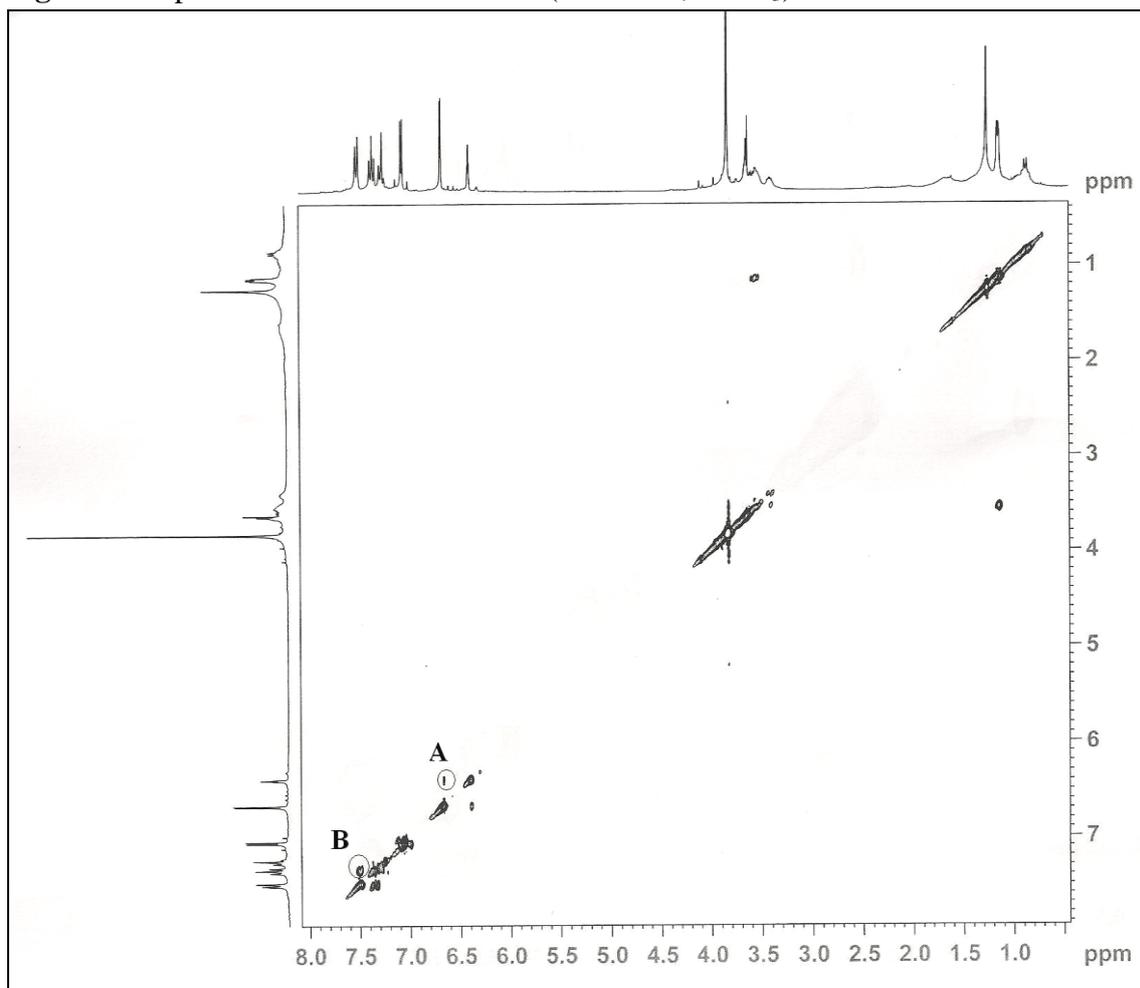


Figura 7: Espectro bidimensional COSY (300 MHz, CDCl_3) de DHD1.



A substância DHD2 é sóluvel em clorofórmio e possui ponto de fusão na faixa de 145,6-148,2 °C. No espectro de RMN ^1H (Figura 9, p.27) foi possível identificar sinais a δ_{H} 6,87 (1H, dd, $J = 15,84 \text{ Hz} / J = 10,23 \text{ Hz}$), 6,10 (1H, d, $J = 15,84 \text{ Hz}$), 4,80 (1H, d, $J = 1,62 \text{ Hz}$), 4,41 (1H, d, $J = 1,59 \text{ Hz}$) que devido aos valores de J e deslocamentos químicos característicos são correspondentes a hidrogênio ligado a carbono olefinico; três sinais a δ_{H} 0,90(s), 0,88 (s), 0,85 (s), que com base nas integrações e deslocamentos químicos característicos, são correspondentes a hidrogênios metílicos e um sinal em δ_{H} 2,27(s) relativo a um grupamento acetila (-COCH₃).

Através do espectro de RMN ^{13}C -BB (Figura 10, p. 28) foram observadas 18 linhas espectrais. A comparação do espectro de RMN ^{13}C -BB com o espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figura 11, p.28) possibilitou a identificação de quatro carbonos não hidrogenados (C), quatro carbonos metínicos (CH), seis carbonos metilênicos (CH₂) e quatro carbonos metílicos (CH₃) (Tabela 3, p. 22). Baseado nesses dados e nos valores de deslocamentos químicos, foi possível concluir que o sinal em δ_{C} 198,28(C) é referente à carbonila de cetona conjugada, os sinais em δ_{C} 146,82(CH) e 133,81(CH) são referentes à dupla que está conjugada com essa carbonila, os sinais em δ_{C} 108,82(CH₂) e 148,82(C) são referentes a uma ligação dupla dissubstituída e terminal e os sinais em δ_{C} 33,75, 27,41, 22,14 e 15,33 são referentes a grupamentos metilas. Com base nesses dados, pôde-se deduzir as subestruturas 1 e 2;

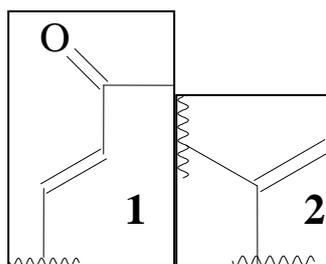


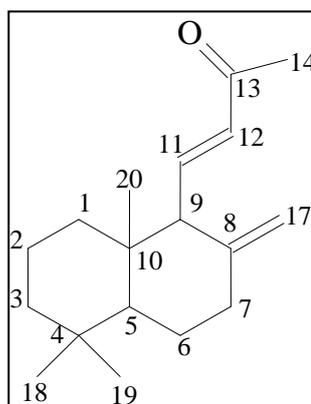
Tabela 3: Deslocamentos químicos de RMN ¹³C de DHD2 por padrão de hidrogenação.

C	CH	CH ₂	CH ₃	Total
198,28	146,83	108,82	33,75	
148,82	133,80	42,33	27,41	
39,55	61,02	41,09	22,14	
33,79	54,70	36,84	15,33	
		23,46		
		19,21		
C ₄	C ₄ H ₄	C ₆ H ₁₂	C ₄ H ₁₂	
-COCH ₃				C ₁₈ H ₂₈ O

A partir dos dados obtidos na Tabela 3, pôde-se propor para DHD2 a fórmula molecular C₁₈H₂₈O.

Após análise dos dados espectrais, além da comparação com os dados da literatura (Tabela 4, p.26), foi possível sugerir para DHD2 a estrutura de um diterpeno do tipo labdano denominado (E)15,16-bisnorlabda-8,11-dieno-13-ona (Figura 8). Para confirmação desta suposição, os espectros de HSQC, HMBC e COSY foram analisados. A análise do espectro NOESY foi utilizada para mostrar o arranjo espacial dos hidrogênios e dos grupos metila na estrutur

Figura 8: Representação estrutural de (E)15,16-bisnorlabda-8,11-dieno-13-ona.



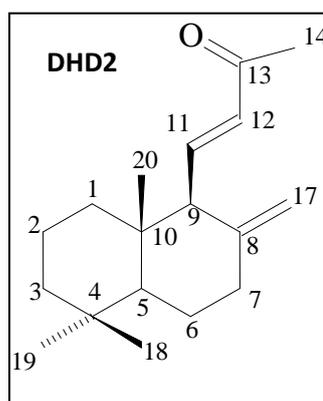
O espectro de HSQC de DHD2 (Figura 12, p.29) possibilitou a observação das seguintes correlações: o sinal de hidrogênio em δ_H 2,50 com o sinal de carbono em δ_C 61,03 (C-9) e os sinais dos hidrogênios em δ_H 2,50 e 2,09 com o sinal de carbono em δ_C 36,85 (C-7), além de outras correlações apresentadas na tabela 4.

O experimento HMBC fornece os acoplamentos $^1H \times ^{13}C$ a longa distância, isto é, a duas ($^2J_{CH}$) ou três ($^3J_{CH}$) ligações. O espectro HMBC de DHD2 (Figura 13, p. 30) foi essencial para a confirmação da posição das subestruturas 1 e 2 no esqueleto da estrutura sugerida, pois foi observada a correlação entre o hidrogênio H-9 (δ_H 2,50) com os carbonos C-11($^2J_{CH}$), C-12($^3J_{CH}$) e C-17($^3J_{CH}$). Também foi possível observar a correlação entre o hidrogênio H-9 com os carbonos C-8 ($^2J_{CH}$), C-10 ($^2J_{CH}$), C-5 ($^3J_{CH}$) e C-20 ($^3J_{CH}$). Além dessas correlações, outras estão expostas na tabela 4.

Com a análise do espectro de RMN bidimensional COSY $^1H \times ^1H$ (Figura 14, p. 31), foi possível observar a correlação entre o hidrogênio H-11 com os hidrogênios H-12 e H-9. Também foi possível observar a correlação entre o hidrogênio H-7(δ_H 2,50) com o outro hidrogênio H-7 (δ_H 2,09), assim como a correlação entre o hidrogênio H-17 (δ_H 4,80) com o outro hidrogênio H-17 (δ_H 4,41), que é característico dos hidrogênios diasterotópicos. Além disso, foi observada a correlação entre os hidrogênios diasterotópicos do carbono C-7(δ_H 2,50 e 2,09) com os hidrogênios diasterotópicos do carbono C-17(δ_H 4,41 e 4,80), que é característico de acoplamento a longa distância do tipo homossilíco.

Através do experimento NOESY (Figura 15, p 32) observou-se a correlação espacial entre o hidrogênio H-11 com os hidrogênios H-14, H-17 e H-20, assim como a correlação entre o hidrogênio H-12 com o hidrogênio H-9.

Diante de todos os dados espectrais, pôde-se concluir que DHD2 trata-se do diterpeno do tipo labdano denominado (E)15,16-bisnorlabda-8,11-dieno-13-ona.



Essa substância já foi isolada das sementes de *Alpinia zerumbet* (XU *et al.*, 1995) e dos rizomas de *Alpinia formosana* (ITOKAWA *et al.*, 1987), bem como de espécies de plantas de outros gêneros, como das sementes de *Amomum xanthioides* (KIM *et al.*, 2010) e *Curcuma mangga* (MALEK *et al.*, 2011).

Tabela 4: Deslocamento químico de RMN ^{13}C e seus respectivos hidrogênios mostrados pelo espectro de HSQC, correlações a longa distância (HMBC) e dados comparativos de RMN ^{13}C -BB de DHD2 (75 MHz, CDCl_3) com os descritos na literatura para (E)-15,16-bisnorlabda-8,11-dieno-13-ona (ITOKAWA *et al.*, 1987).

C	HSQC		HMBC		Literatura
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	δ_{C}
1	41,10				36,6
2	19,22				19,0
3	42,34				42,0
4	33,79	-			33,6
5	54,71			2,50; 0,90(s)	54,4
6	23,46				23,2
7	36,85	2,09; 2,50		4,80(d); 4,41(d)	40,9
8	148,82	-	2,09; 2,50		148,5
9	61,03	2,50		4,80(d);4,41(d);6,10(d) 2,50; 0,90(s)	60,8
10	39,55	-	2,50		39,3
11	146,82	6,87(dd, $J=15,84$ $J=10,23$ Hz)	2,50		146,5
12	133,81	6,10(d, $J=15,84$ Hz)		2,50; 2,27(s)	133,5
13	198,28	-	6,10(d)	6,87(dd)	197,9
14	27,41	2,27(s)			27,2
17	108,82	4,80(d, $J=1,62$ Hz) 4,41(d, $J=1,59$ Hz)		2,09; 2,50	108,6
18	33,75	0,88(s)			33,6
19	22,14	0,85(s)			21,9
20	15,33	0,90(s)		2,50	15,1

Figura 9: Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) de DHD2.

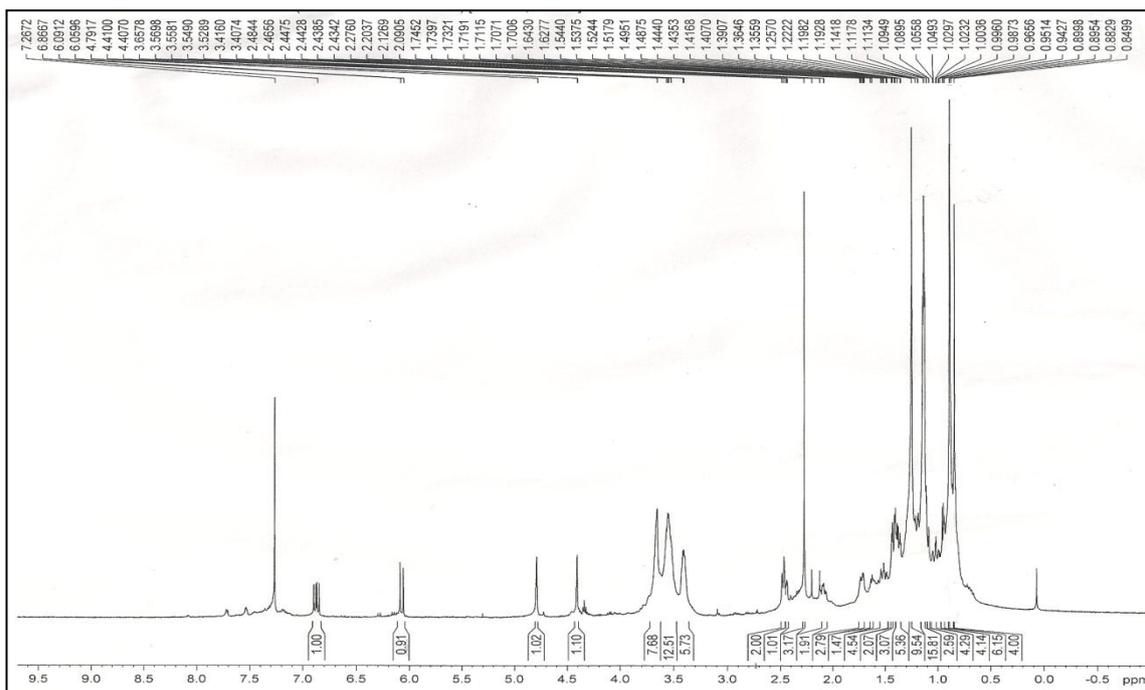


Figura 10: Espectro de RMN ^{13}C -BB (75 MHz, CDCl_3) de DHD2.

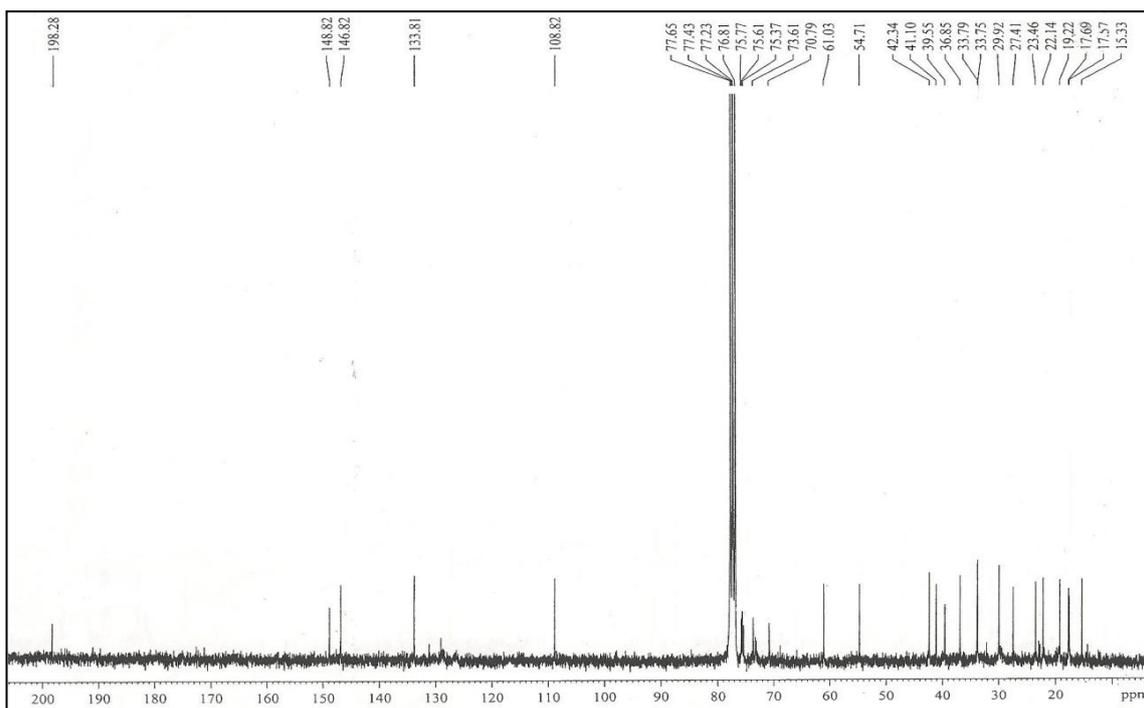


Figura 11: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (75MHz, CDCl_3) de DHD2.

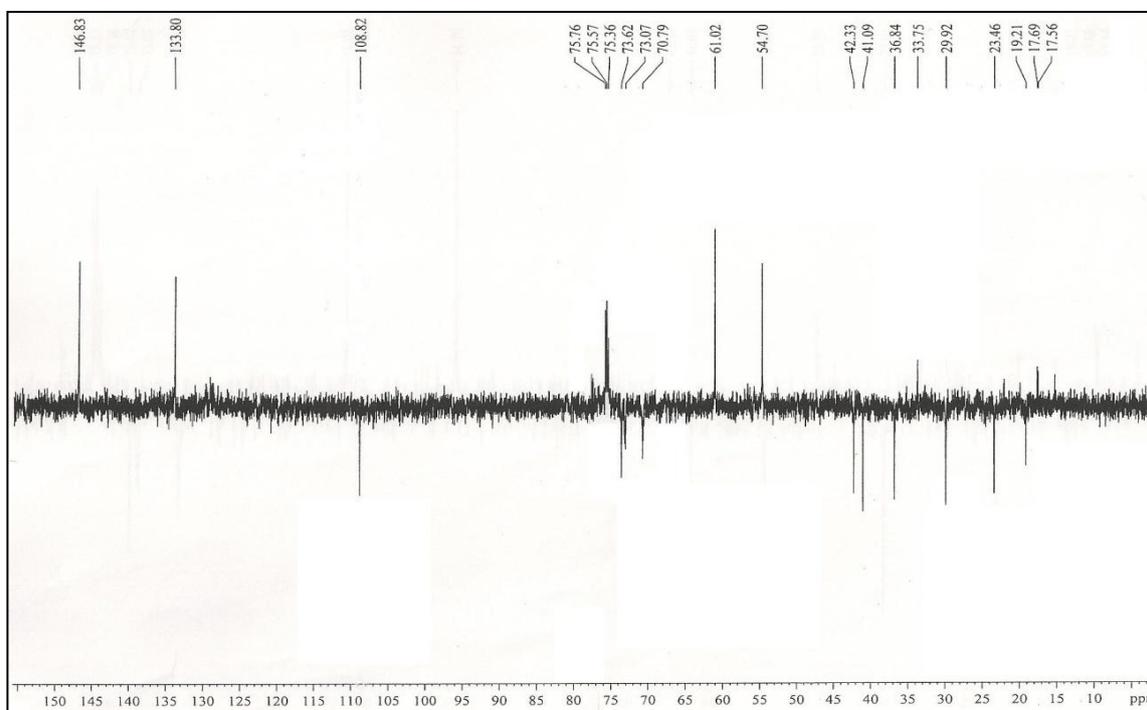


Figura 12: Espectro bidimensional HSQC (300, 75 MHz, CDCl_3) de DHD2.

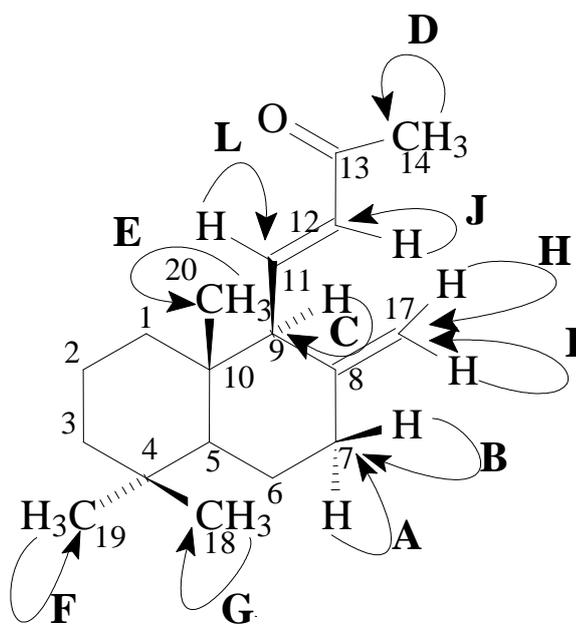
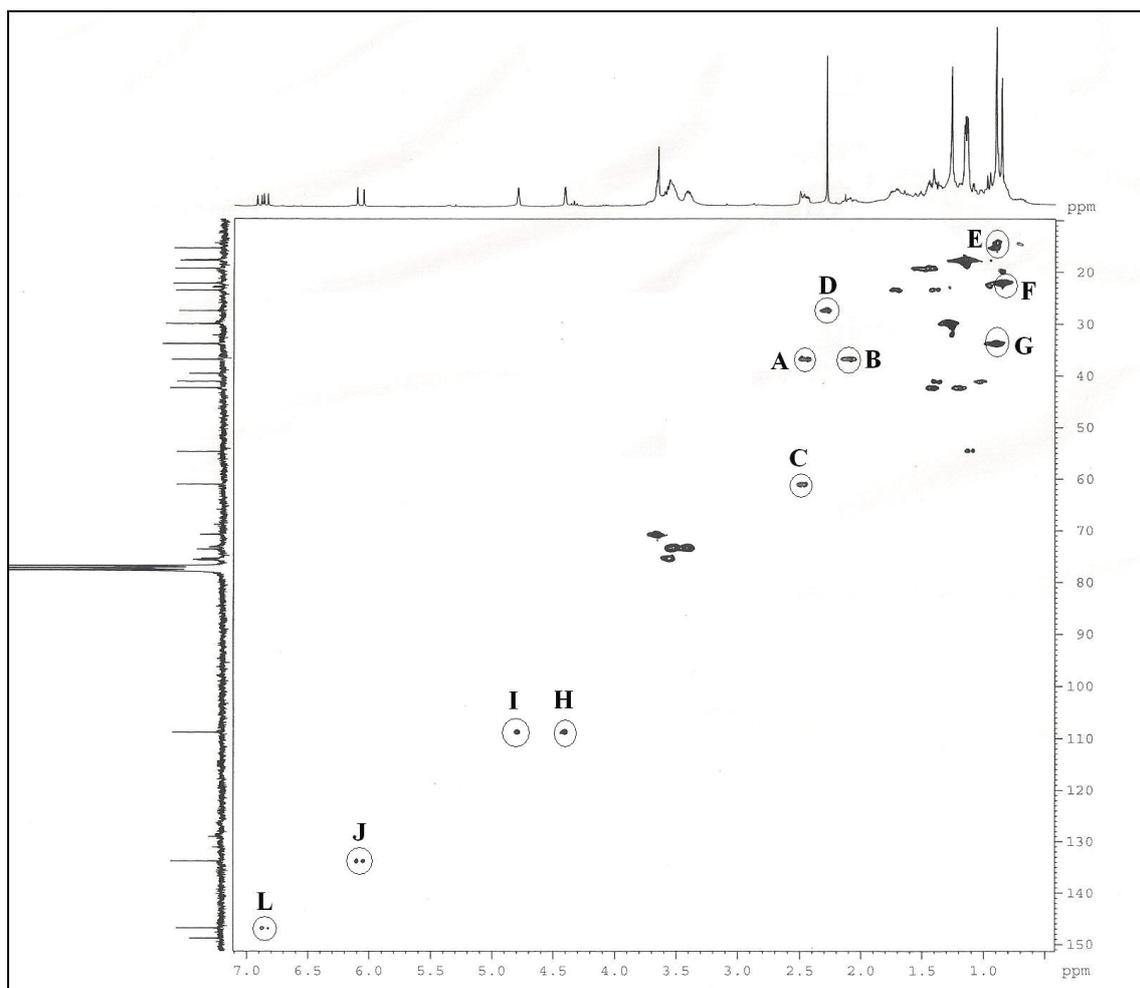


Figura 13: Espectro bidimensional HMBC (300, 75 MHz, CDCl_3) de DHD2.

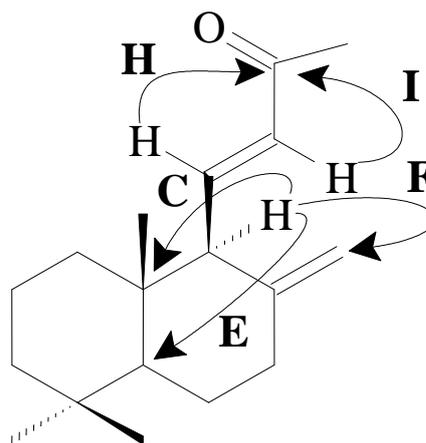
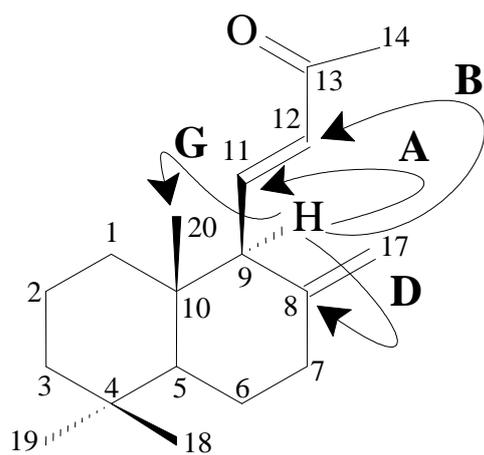
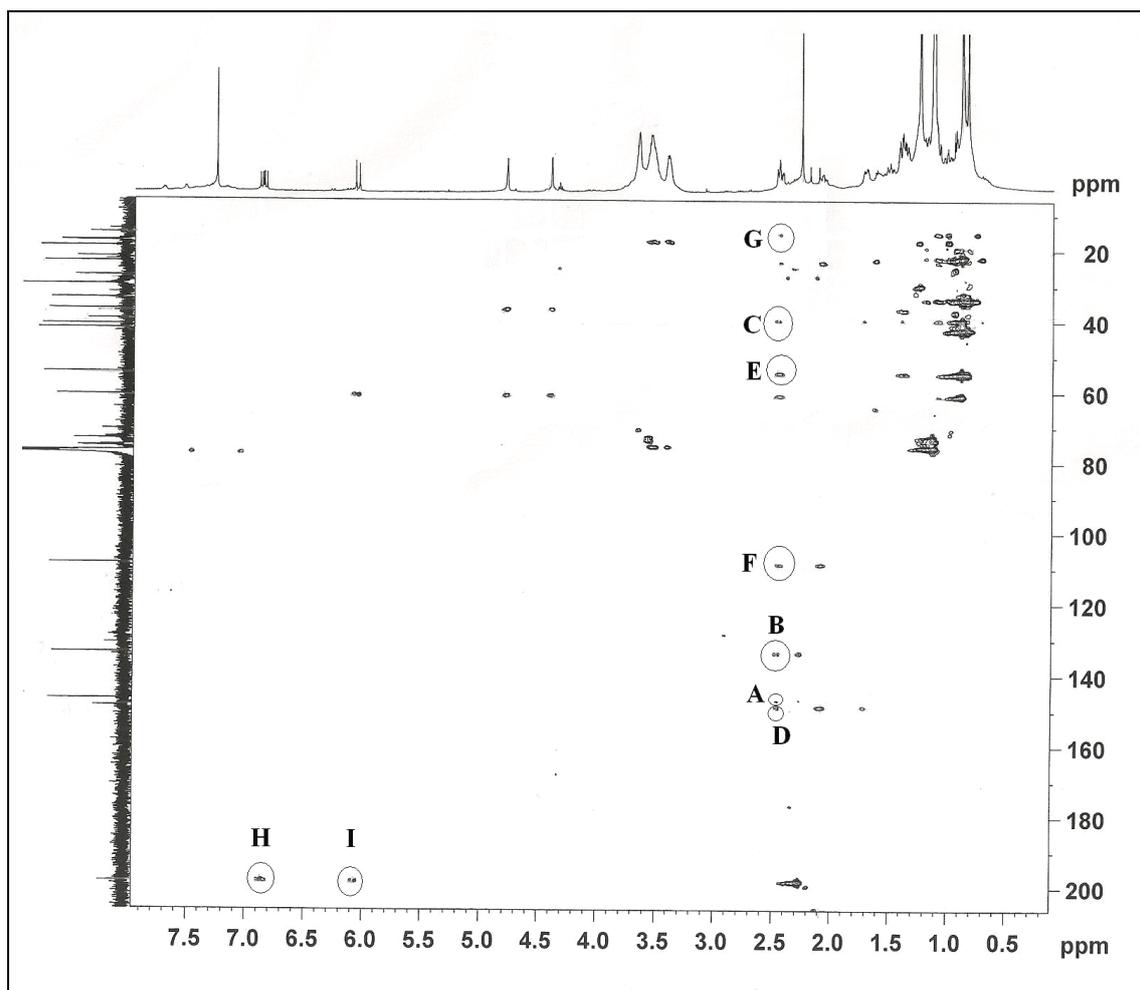


Figura 14: Espectro bidimensional COSY (300 MHz, CDCl₃) de DHD2.

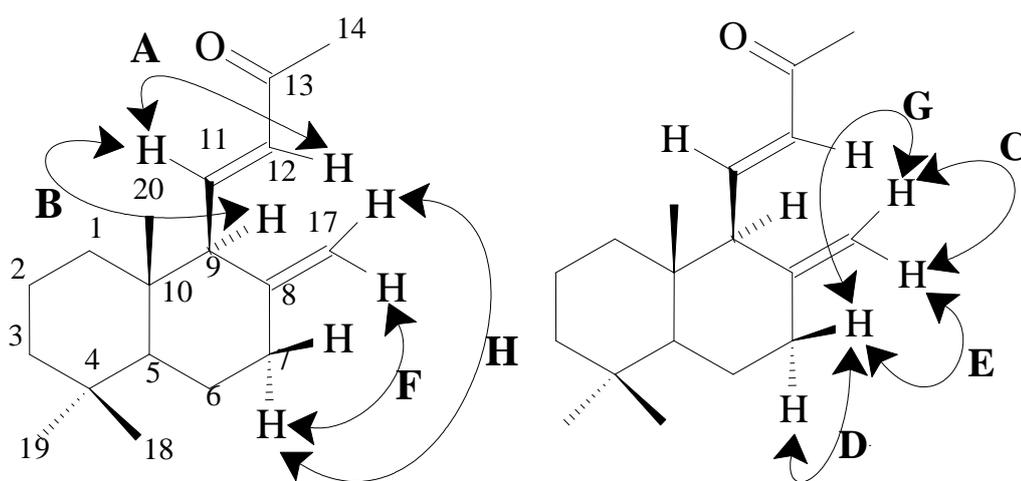
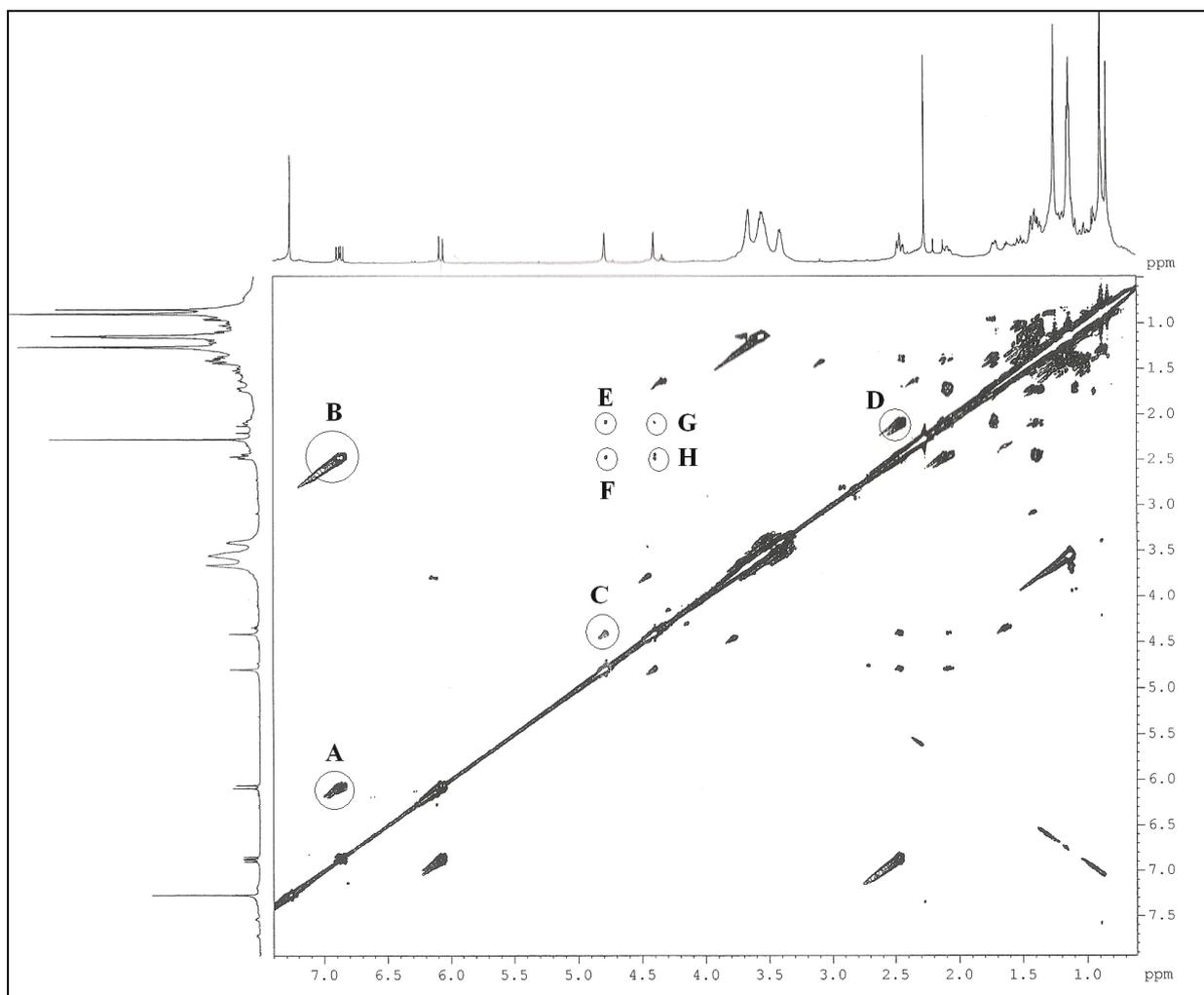
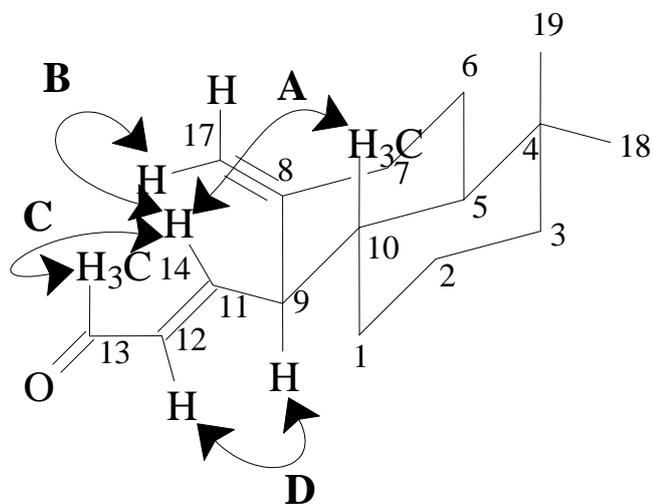
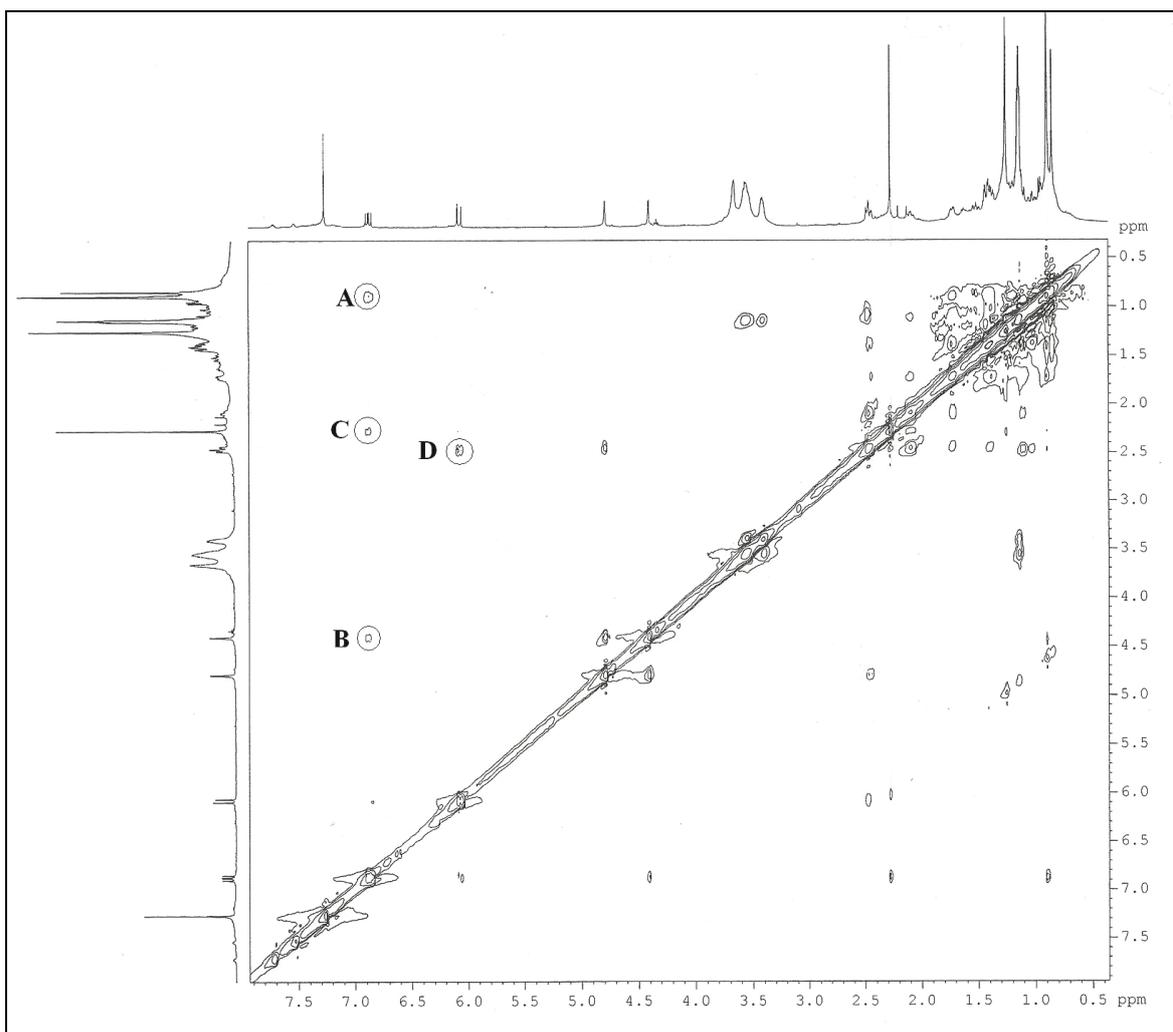


Figura 15: Espectro bidimensional NOESY (300 MHz, CDCl₃) de DHD2.



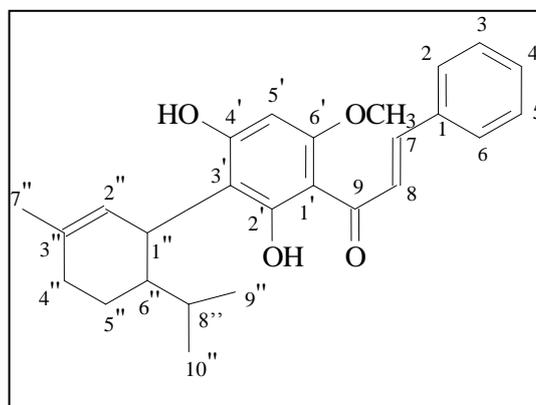
A substância DHD3 é solúvel em clorofórmio. O espectro de RMN ^1H (Figura 17, p. 36) apresentou um sinal em δ_{H} 14,55 (1H, s) que é característico de hidrogênio de hidroxila quelada; dois sinais em δ_{H} 7,75 (1H, d, $J = 15,6$ Hz) e 7,89 (1H, d, $J = 15,6$ Hz) que devido aos valores de J característicos, são correspondentes a hidrogênio ligado a carbono olefínico; três sinais, todos na faixa de δ_{H} 7,40-7,60, os quais foram associados à hidrogênios de sistemas aromáticos; um sinal em δ_{H} 3,91 (1H, s) referente a um grupamento metóxico.

A comparação do espectro de RMN ^{13}C -BB (Fig. 18, p.37) com o espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Fig. 19, p.37), possibilitou a identificação de oito carbonos não hidrogenados (C), doze carbonos metínicos (CH), dois carbonos metilênicos (CH_2) e quatro carbonos metílicos (CH_3).

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Figura 18, p.37) apresentou 26 linhas espectrais, entretanto as intensidades relativamente altas de duas linhas (δ_{C} 129,05; 128,50) sugeriram que cada uma delas represente dois átomos de carbono.

Após análise dos dados espectrais, além da comparação com os dados da literatura (Tabela 5, p.35), foi possível sugerir para DHD3 a estrutura de uma substância pertencente à classe Chalcona, denominada 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-3'-(3''-metil-6''-metil-etil-2''-ciclohexenil)chalcona (Figura 16). Para confirmação desta suposição, os espectros de HSQC, HMBC e COSY foram analisados.

Figura 16. Representação estrutural de 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-3'-(3''-metil-6''-metil-etil-2''-ciclohexenil)chalcona.

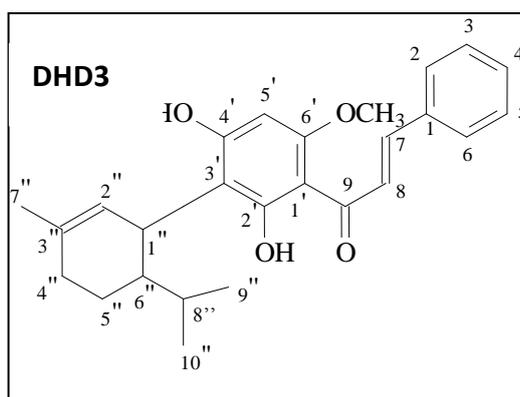


O espectro de HSQC de DHD3 (Figura 20, p.38) possibilitou correlacionar os sinais de carbono e hidrogênios diretamente ligados, assim como distinguir que o sinal de hidrogênio em δ_H 6,88 (s) trata-se de uma hidroxila fenólica por não apresentar correlação a sinais de carbono.

Através do experimento HMBC (Figura 21, p.39) foi possível posicionar de forma inequívoca a metóxila H-6' ao carbono em δ_c 161,5 (C-6'); bem como posicionar a hidroxila fenólica 4'-OH (δ_H 6,88; s) ao carbono C-4', através das correlações a duas e três ligações desta com os respectivos carbonos em δ_c 162,9 (C-4'), δ_c 110,2 (C-3') e δ_c 92,1 (C-5'). O hidrogênio H-5' apresentou correlações a duas ligações com os carbonos em δ_c 162,9 (C-4') e δ_c 161,5 (C-6') e a três ligações com os carbonos δ_c 110,2 (C-3') e δ_c 105,9 (C-1'), permitindo confirmar com plena certeza a posição da hidroxila fenólica e da metoxila. O experimento HMBC também foi essencial para confirmar a posição da unidade monoterpênica, através das correlações entre os hidrogênios fenólicos em 4'-OH e H-5' com o carbono em δ_c 110,2 (C-3').

Através do espectro COSY (Figura 22, p.40) observou-se acoplamentos vicinais entre os hidrogênios H-8 com H-7 característico de um sistema trans. Observou-se ainda correlação entre H-2'' com o hidrogênio metínico H-1'' e deste com hidrogênio metínico em H-6'', que se correlaciona ao hidrogênio metínico H-8'' e este com as metilas em H-9'' e H-10''.

Diante de todos os dados espectrais, pôde-se confirmar que DHD3 trata-se da chalcona denominada 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-3'-(3''-metil-6''-metil-etil-2''-ciclohexenil)chalcona.



Esse composto já foi isolado das cascas de *Lindera umbellata* (SHIMOMURA, *et al.*, 1988), mas é inédito na espécie em estudo, segundo consulta feita nos sites acadêmicos <https://scifinder.cas.org> e <http://www.sciencedirect.com> (acesso em 19/10/2012).

Tabela 5: Deslocamento químico de RMN ^{13}C e seus respectivos hidrogênios mostrados pelo espectro de HSQC, correlações a longa distância (HMBC) e dados comparativos de RMN ^{13}C -BB de DHD3 (75 MHz, CDCl_3) com os descritos na literatura para 2',6'-dihidroxi-4'-metoxi-3'-(3''-metil-6''-metil-etil-2''-ciclohexenil)chalcona. (SHIMOMURA *et al.*, 1988).

C	HSQC		HMBC		Literatura
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	δ_{C}
1	135,9	-	H-7 α	H-8 β	136,5
2	128,5	7,60 (d, $J=7,0$ Hz)			129,1
3	129,0	7,40 (m)			129,7
4	130,1	7,40 (m)			130,8
5	129,0	7,40 (m)			129,7
6	128,5	7,60 (d, $J=7,0$ Hz)			129,1
7	142,0	7,75 (d, $J=15,60$ Hz)	H-8 β		128,8
8	128,3	7,89 (d, $J=15,60$ Hz)	H-7 α		142,6
9	193,0	-	H-8 β	H-7 α	193,8
1'	105,9	-		H-5'	106,3
2'	165,1	-			165,6
3'	110,2	-		4'-OH	111,8
4'	162,9	-	H-5'; 4'-OH	H-5'	164,3
5'	92,1	5,93 (s)		4'-OH	92,1
6'	161,5	-	H-5'	6'-OCH ₃	162,1
2'-OH	-	14,55 (s)			-
6'-OH	-	6,88 (s)			55,9
4'-OCH ₃	55,9	3,91 (s)			-
1''	34,7	3,96 (m)			36,0
2''	125,1	5,52 (s)		3H-7''	126,7
3''	140,7	-	3H-7''		129,7
4''	30,8	2,13 (m)		3H-7''	31,5
5''	22,3	1,79 e 1,44(m)			23,8
6''	44,4	1,52 (m)		H-9''; H-10''	42,7
7''	23,8	1,79 (s)			23,6
8''	28,0	1,60 (m)	H-9''; H-10''		29,2
9''	16,7	0,88 (d, $J=7,20$ Hz)		H-10''	16,7
10''	21,9	0,86 (d, $J=7,20$ Hz)		H-9''	21,9

Figura 17: Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) de DHD3.

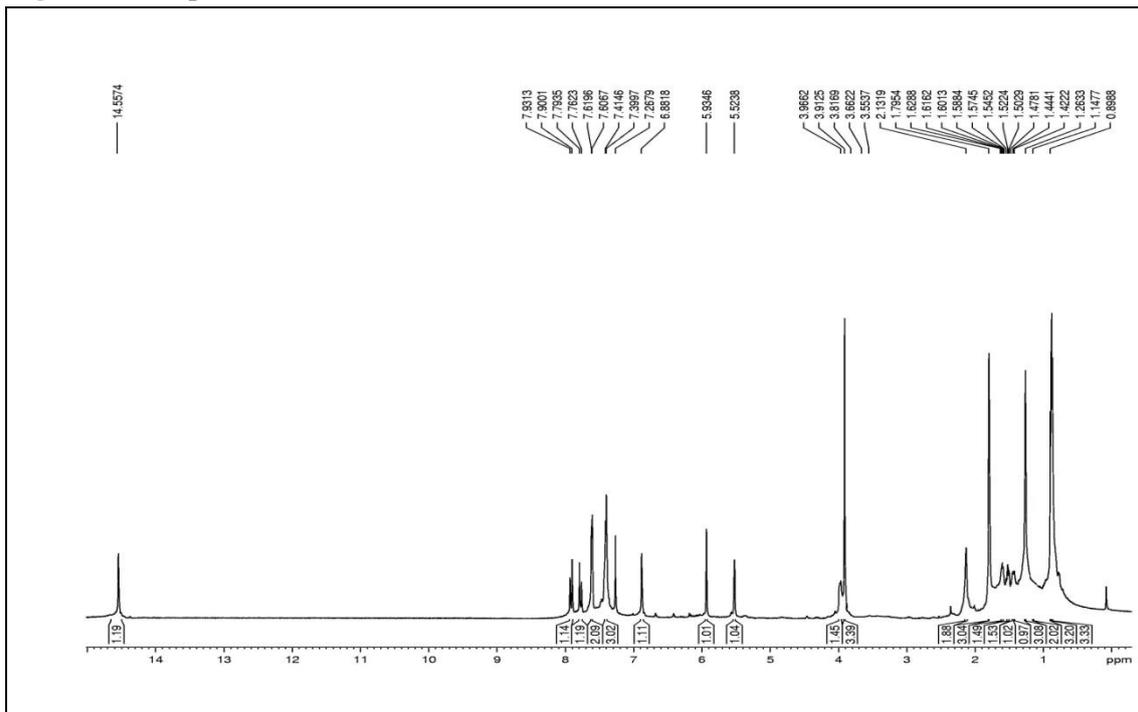


Figura 18: Espectro de RMN ^{13}C -BB (75MHz, CDCl_3) de DHD3.

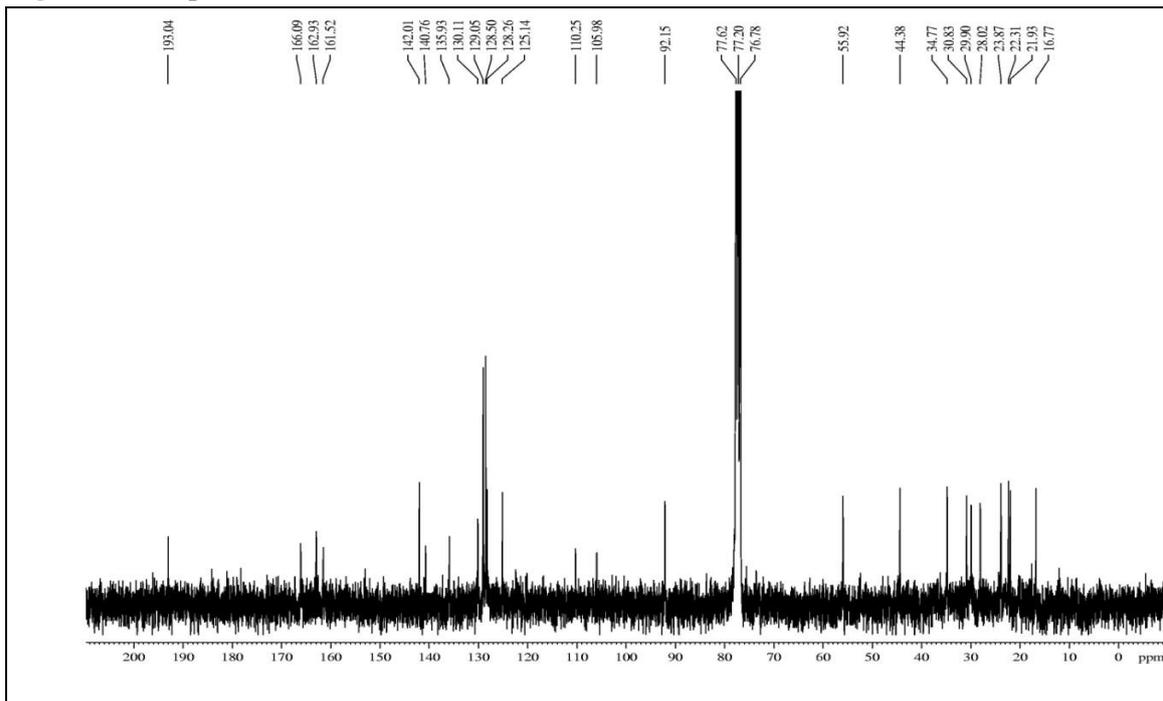


Figura 19: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (75MHz, CDCl_3) de DHD3.

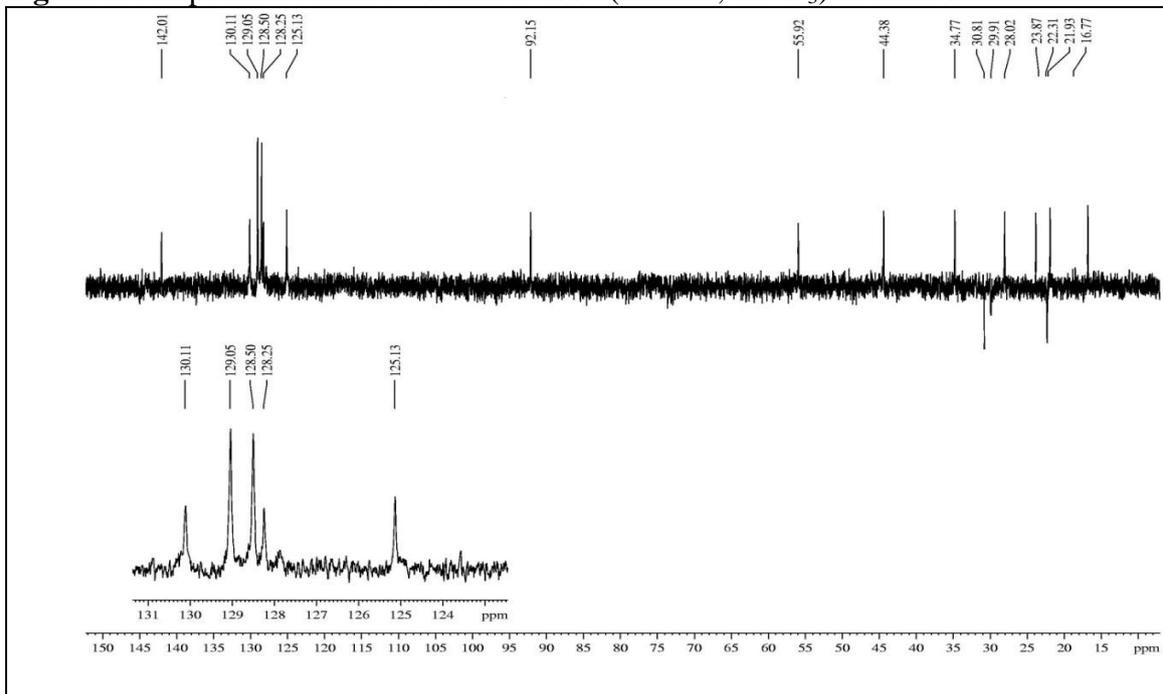


Figura 20: Espectro bidimensional HSQC (300, 75 MHz, CDCl_3) de DHD3.

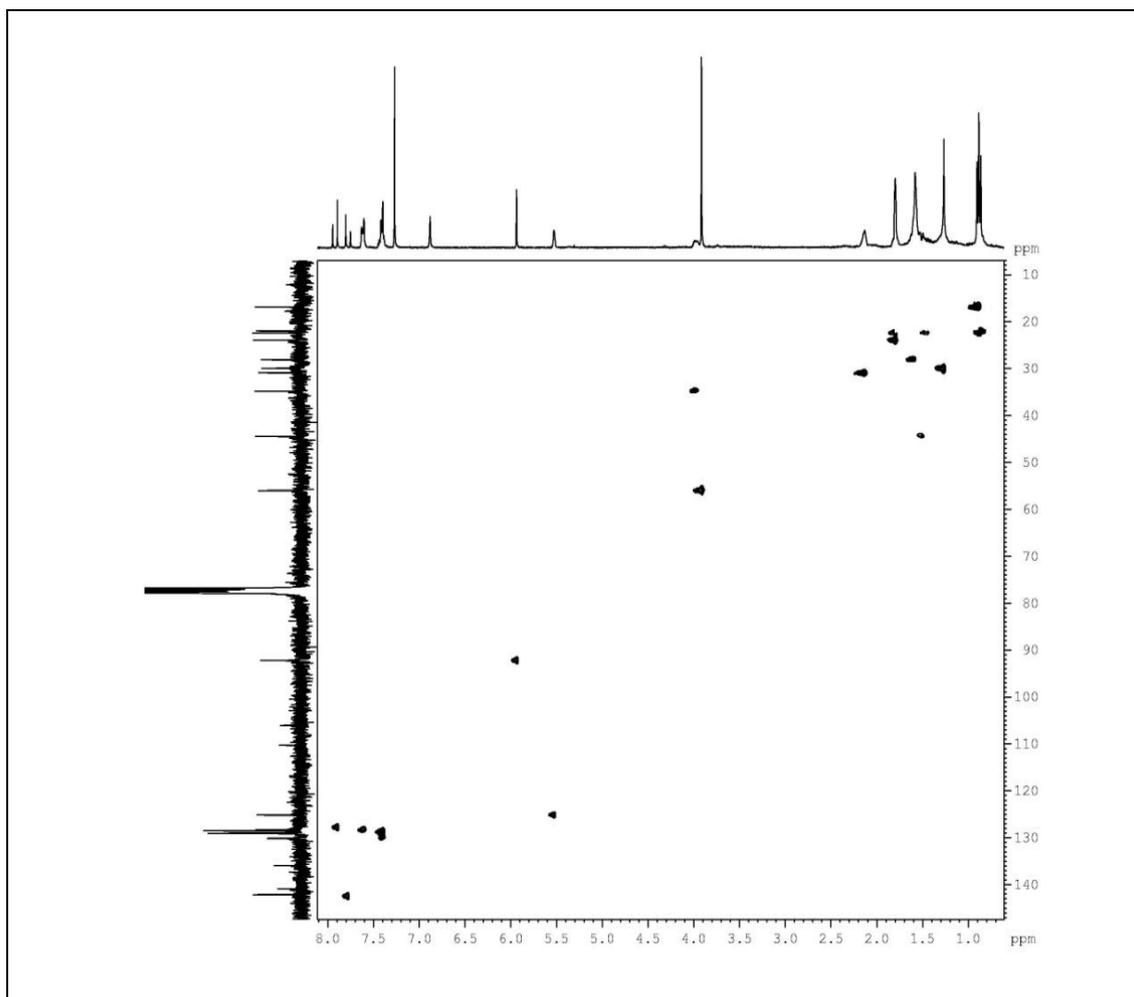


Figura 21: Espectro bidimensional HMBC (300, 75 MHz, CDCl₃) de DHD3.

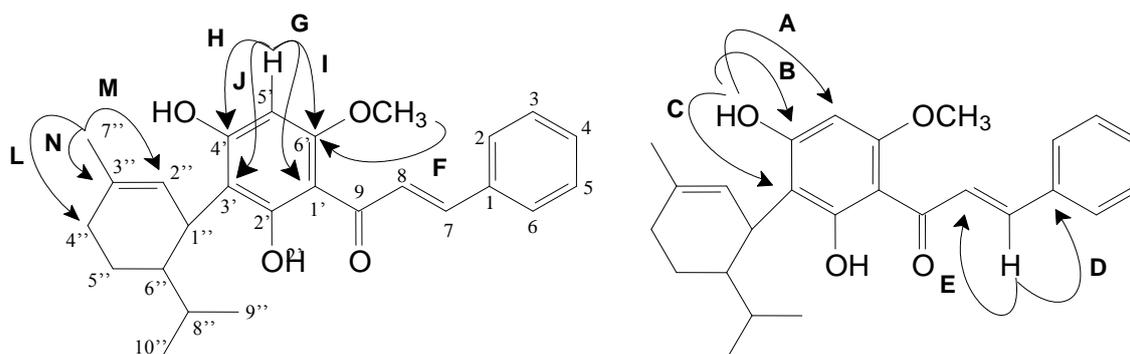
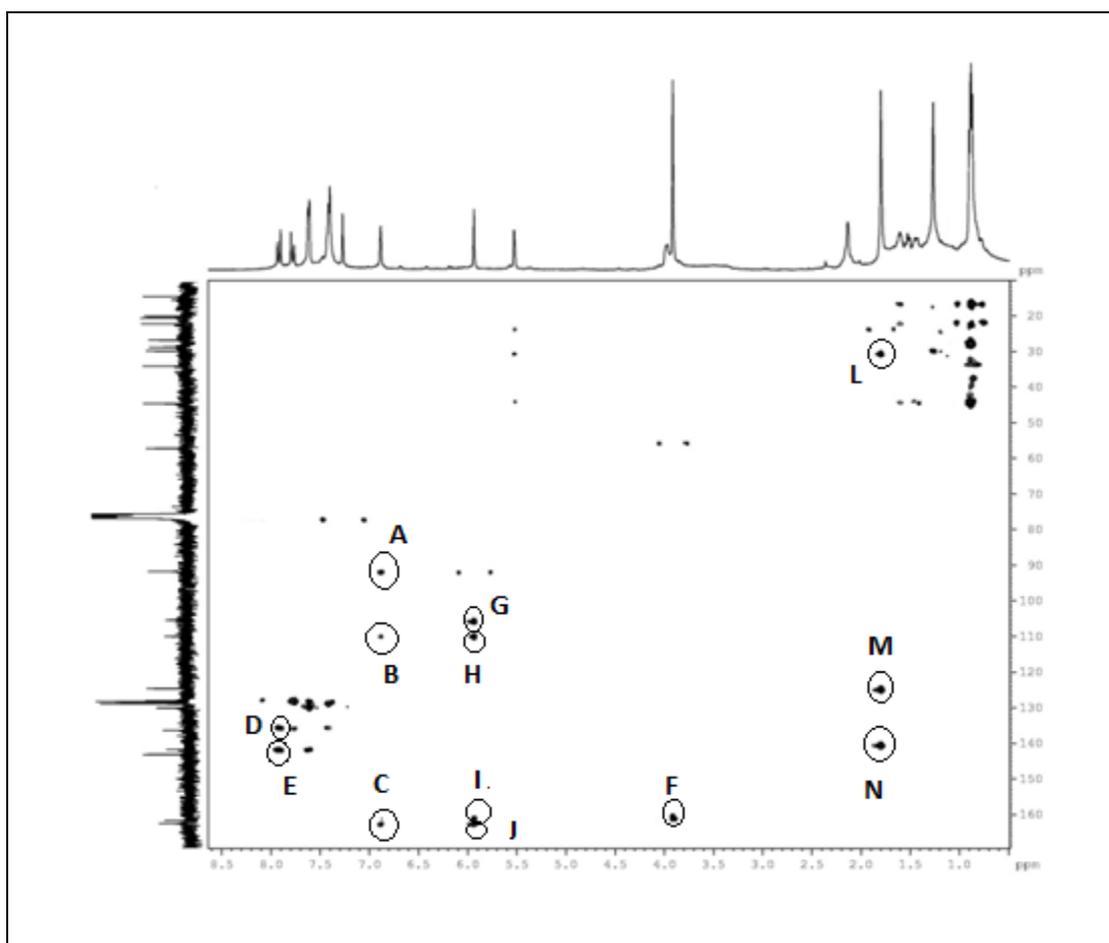
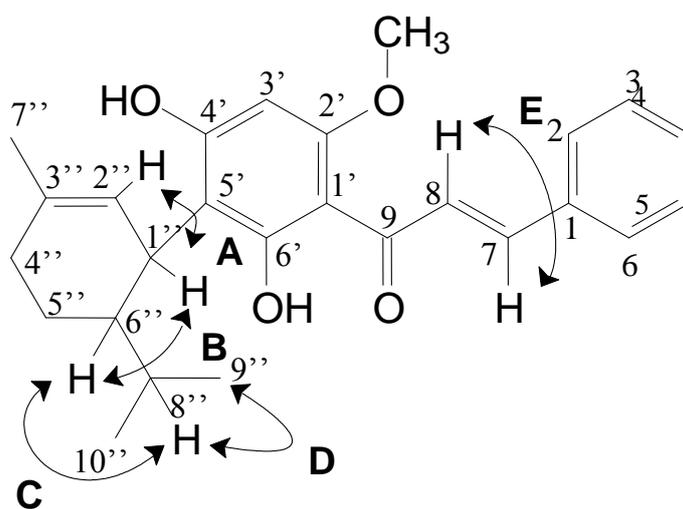
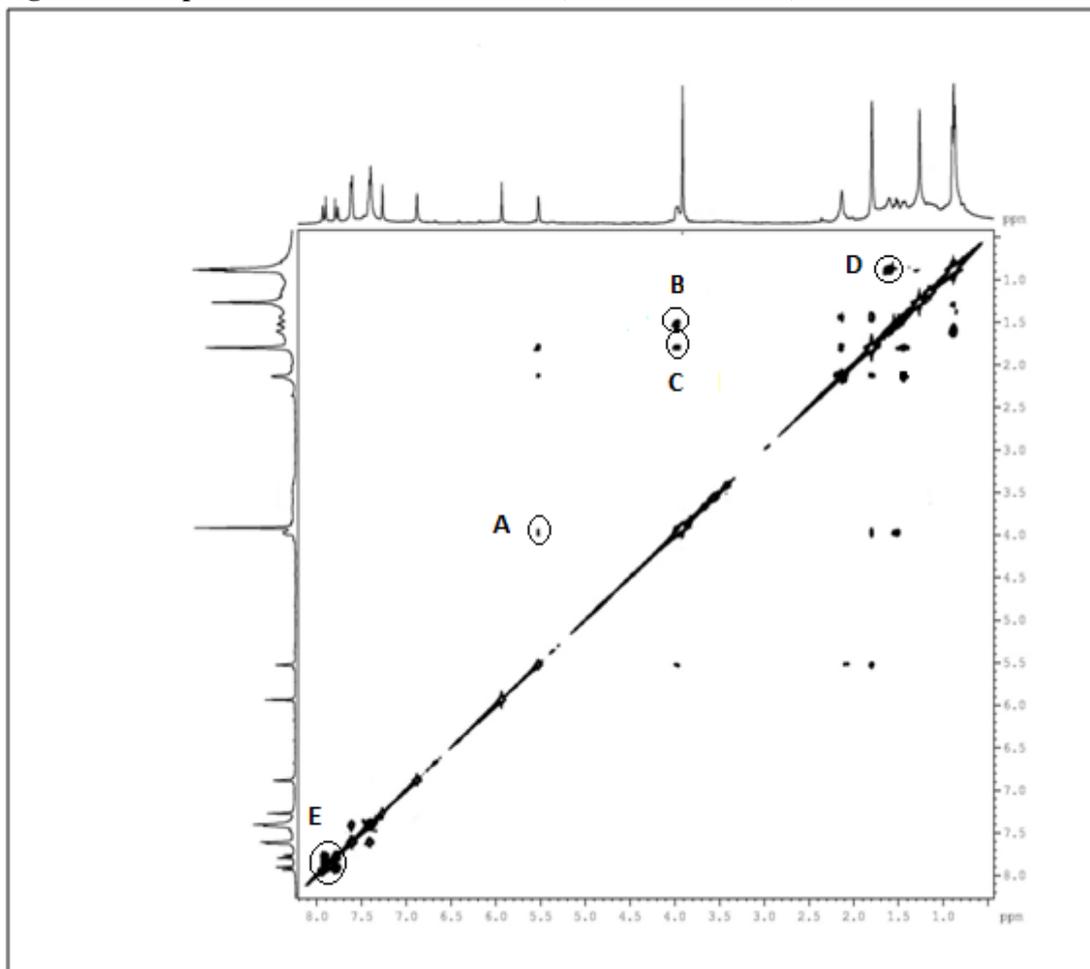


Figura 22: Espectro bidimensional COSY (300 MHz, CDCl₃) de DHD3.



4.2 - Determinação estrutural de DD4 e DD5

O fracionamento de EHAZ-DD resultou no isolamento de duas substâncias: cristais em forma de agulhas (DD4) e o um sólido amarelado amorfo (DD5).

A substância DD4 é solúvel em clorofórmio e possui ponto de fusão na faixa de 118-121 °C. O espectro de RMN ^1H (Figura 24, p. 43), expansão na região de δ_{H} 0,5 a 2,45, (Figura 25, p.43) apresentou um sinal em δ_{H} 5,36 (1H, d, $J = 7,1$ Hz) que devido ao valor característico de J é correspondente a um hidrogênio ligado a carbono olefínico, um multipletto em δ_{H} 3,53 correspondente a um átomo de hidrogênio ligado a carbono carbinólico; multipletos em δ_{H} 2,27; 2,04; 1,86; 1,52 e 1,12 relativos a hidrogênios de carbonos metilênicos; hidrogênios de grupos metilas em δ_{H} 1,05 (s); 0,93(d, $J = 6,39$ Hz), na faixa de 0,87 a 0,83 e em δ_{H} 0,68 (s).

A comparação do espectro de RMN ^{13}C -BB (Fig. 26, p.44) com o espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Fig. 27, p.44), possibilitou a identificação de dois carbonos não hidrogenados (C), nove carbonos metínicos (CH), dez carbonos metilênicos (CH_2) e seis carbonos metílicos (CH_3).

A análise do espectro de RMN ^{13}C -BB apresentou 28 linhas espectrais, onde duas delas são atribuídas a carbonos olefínico [δ_{C} 141,02 (C) e 121,95 (CH)], uma referente a carbono sp^3 oxigenado (δ_{C} 72,0) e as demais referentes a carbonos alifáticos compatíveis a esqueletos oriundos do encadeamento do isopreno.

Com a comparação dos dados de RMN ^{13}C -BB da substância DD4 com os dados da literatura (Tabela 6, p.42), pode-se concluir que a substância em questão trata-se do β -sitosterol (Figura 23), um esteróide muito comum em plantas.

Figura 23: Representação estrutural do β -sitosterol.

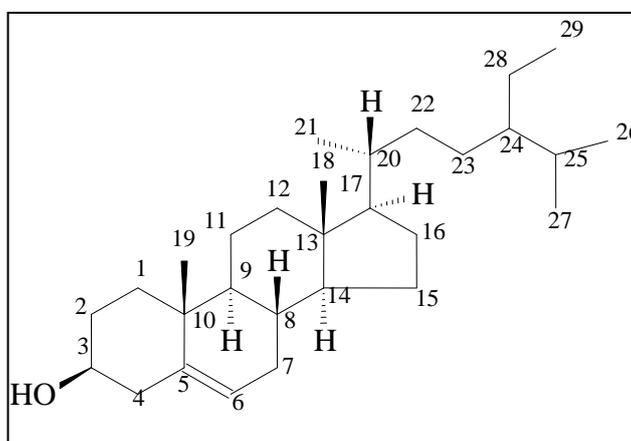


Tabela 6: Dados comparativos de RMN ^{13}C -BB de DD4 (75 MHz, CDCl_3) com os descritos na literatura para β -sitosterol (MACARI, 1990).

C	δ_{C} DD3	δ_{C} β -sitosterol
1	37,51	37,2
2	29,90	31,6
3	72,0	71,7
4	42,56	42,3
5	141,0	140,7
6	121,9	121,6
7	31,92	31,8
8	32,17	31,8
9	50,41	50,1
10	36,76	36,4
11	21,34	21,1
12	40,04	39,7
13	46,12	42,3
14	57,03	56,7
15	24,54	24,2
16	28,48	28,1
17	56,34	56,1
18	12,20	11,9
19	19,63	19,3
20	36,39	36,0
21	19,03	18,7
22	34,21	33,9
23	26,38	26,1
24	46,1	45,8
25	29,44	29,1
26	20,05	19,6
27	19,29	18,9
28	23,34	23,0
29	12,10	11,9

Figura 24: Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) de DD4.

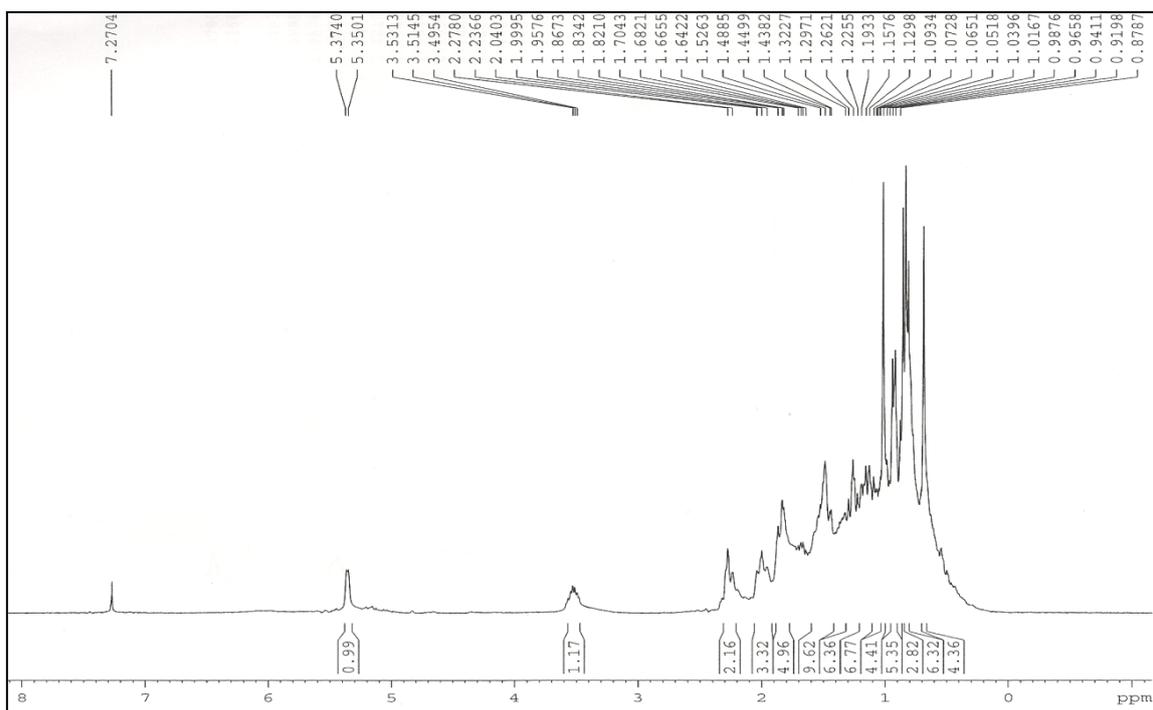


Figura 25: Expansão do espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) de DD4 na região de δ_{H} 0,2 a 2,45.

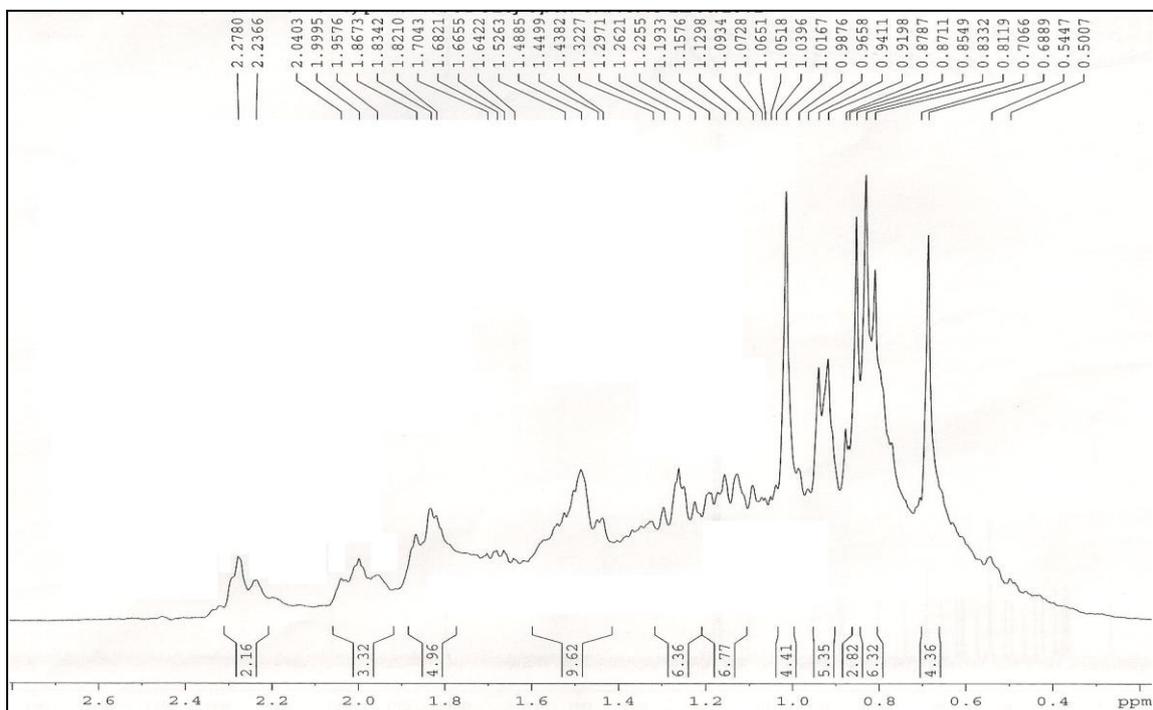


Figura 26: Espectro de RMN ^{13}C -BB (75MHz, CDCl_3) de DD4.

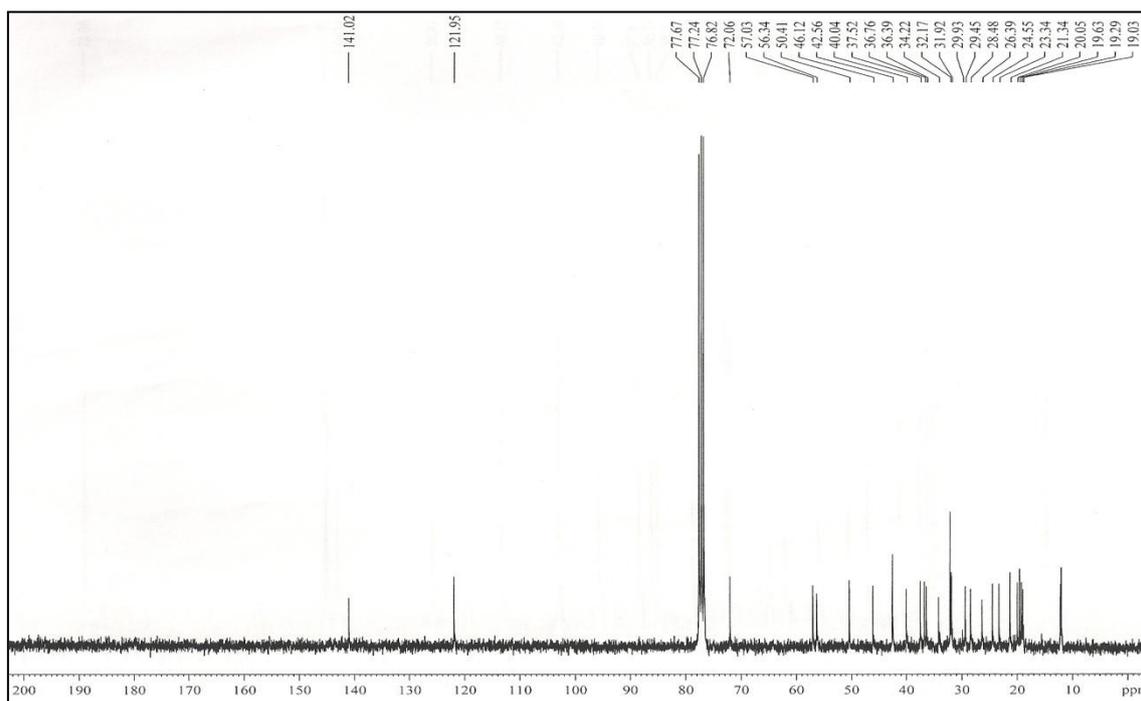
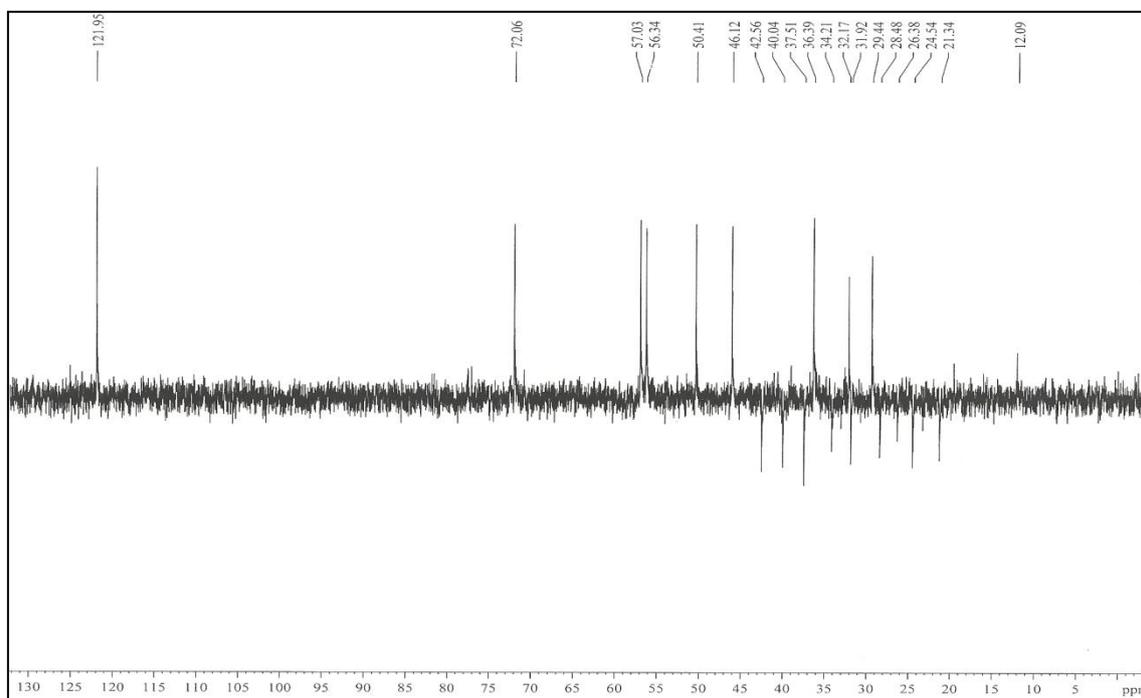


Figura 27: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (75MHz, CDCl_3) de DD4.



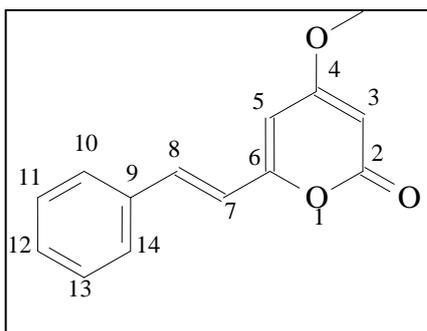
A substância DD5 é solúvel em clorofórmio e possui ponto de fusão na faixa de 137-139 °C. No espectro de RMN ^1H (Figura 28, p. 48) foi possível identificar sinais a δ_{H} 5,50(1H, d, $J=2,07$ Hz), 5,96 (1H, d, $J= 2,01$ Hz) e na faixa de 7,31 a 7,53 (5H, m) que devido aos valores de J e deslocamento químico característico são referentes a hidrogênios ligados a carbono aromático; um sinal a δ_{H} 6,58 (1H, d, $J= 16,02\text{Hz}$) que devido ao valor de J característico é correspondente a hidrogênio ligado a carbono olefínico; um sinal em 3,83 (3H, s), que com base no deslocamento químico e intensidade do mesmo, é referente a grupamento metoxila ($-\text{OCH}_3$).

O espectro de RMN ^{13}C -BB (Figura 29, p. 49) apresentou 12 linhas espectrais, entretanto as intensidades relativamente altas de duas linhas (δ_{C} 127,66 e 129,65) sugeriram que cada uma delas represente dois átomos de carbono. Desta forma, DD5 possui 14 átomos de carbono em sua composição (Tabela 7, p.47). Para o sinal observado em δ_{C} 56,13, pôde-se constatar a presença do grupo metoxila na estrutura.

A comparação do espectro de RMN ^{13}C -BB com o espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Fig. 30, p.49), possibilitou a identificação de quatro carbonos não hidrogenados (C), nove carbonos metínicos (CH) e um carbono metílico (CH_3).

Após análise dos dados espectrais, além da comparação com os dados da literatura (Tabela 7, p.47), foi possível sugerir para DD5 a estrutura de uma substância pertencente à classe Kavapirona, denominada 5,6-dehidrokawain (Figura 28). Para confirmação desta suposição, os espectros de HSQC, HMBC, COSY foram analisados.

Figura 28: Representação estrutural de 5,6-dehidrokawain.



O espectro de HSQC de DD5 (Figura 31, p.50) possibilitou a observação das seguintes correlações: o sinal de hidrogênio em δ_{H} 3,83 com o sinal de carbono em δ_{C} 56,13 ($-\text{OCH}_3$), o sinal do hidrogênio em δ_{H} 5,50 com o sinal de carbono em δ_{C} 89,08 (C-3), o sinal do hidrogênio em δ_{H} 5,96 com o sinal de carbono em δ_{C} 101,52 (C-5) e o sinal do hidrogênio em δ_{H} 6,58 com o sinal de carbono em δ_{C} 118,87 (C-7).

Através do espectro de HMBC de DD5 (Figura 32, p.51) foi possível confirmar a posição do grupamento metoxila, pois foi observada a correlação à longa distância entre o hidrogênio da metoxila (δ_H 3,83) com o carbono C-4 ($^3J_{CH}$). Além dessa correlação, outras estão expostas na tabela 7.

Com a análise do espectro de RMN bidimensional COSY $^1H \times ^1H$ (Figura 33, p. 52), foi possível observar a correlação entre o hidrogênio H-3 com o hidrogênio H-5, assim como a correlação entre o hidrogênio H-7 com o hidrogênio e H-8.

Diante de todos os dados espectrais, pôde-se confirmar que DD5 trata-se da kavalactona 5,6-dehidrokawain. Essa substância já foi isolada anteriormente dos rizomas de *Alpinia zerumbet* (ITOWAKA *et al.*, 1981) e *Alpinia nutans* (HABSAH *et al.*, 2003), assim como de espécies de outros gêneros, como das folhas de *Piper methysticum* (LI *et al.*, 2011) e *Lindera uhhellata* (ICHINO *et al.*, 1987). Essa substância é relatada na literatura apresentando atividade antiúlcera, antiplaquetária e antifúngica (TAWATA *et al.*, 1996). Upadhyay *et al.* (2011), investigando substâncias com atividade inibitória contra as enzimas HIV-integrase e neuraminidase (substâncias estas isoladas dos rizomas de *Alpinia zerumbet*), revelaram que a substância 5,6-dihidrokwain apresentava forte inibição contra a enzima integrase e significativa inibição contra a enzima neuraminidase, existindo possibilidade na concepção de drogas contra esse vírus.

Tabela 7: Deslocamento químico de RMN ^{13}C e seus respectivos hidrogênios mostrados pelo espectro de HSQC, correlações a longa distância (HMBC) e dados comparativos de RMN ^{13}C -BB de DD5 (75 MHz, CDCl_3) com os descritos na literatura para 5,6-dehidrokawain (DHARMARATNE *et al.*, 2002).

C	HSQC		HMBC		Literatura
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$	δ_{C}
2	164,19	-	5,35(d)		164,20
3	89,08	5,50(d, $J=2,07$ Hz)		5,96(d)	89,20
4	171,29	-	5,50(d);5,96(d)	3,83(s)	171,40
5	101,52	5,96(d, $J=2,01$ Hz)		5,50(d) 6,58(d)	101,80
4 -OCH ₃	56,13	3,83(s)			56,30
6	158,87	-	5,96(d);6,58(d)		158,90
7	118,87	6,58(d, $J=16,02$ Hz)		5,96(d)	119,10
8	135,46		6,58(d)		135,80
9	136,03	-			135,60
10/14	127,66				127,80
12	129,65				129,80
13/11	129,11				129,20

Figura 28: Espectro de RMN ^1H (300MHz, CDCl_3) de DD5.

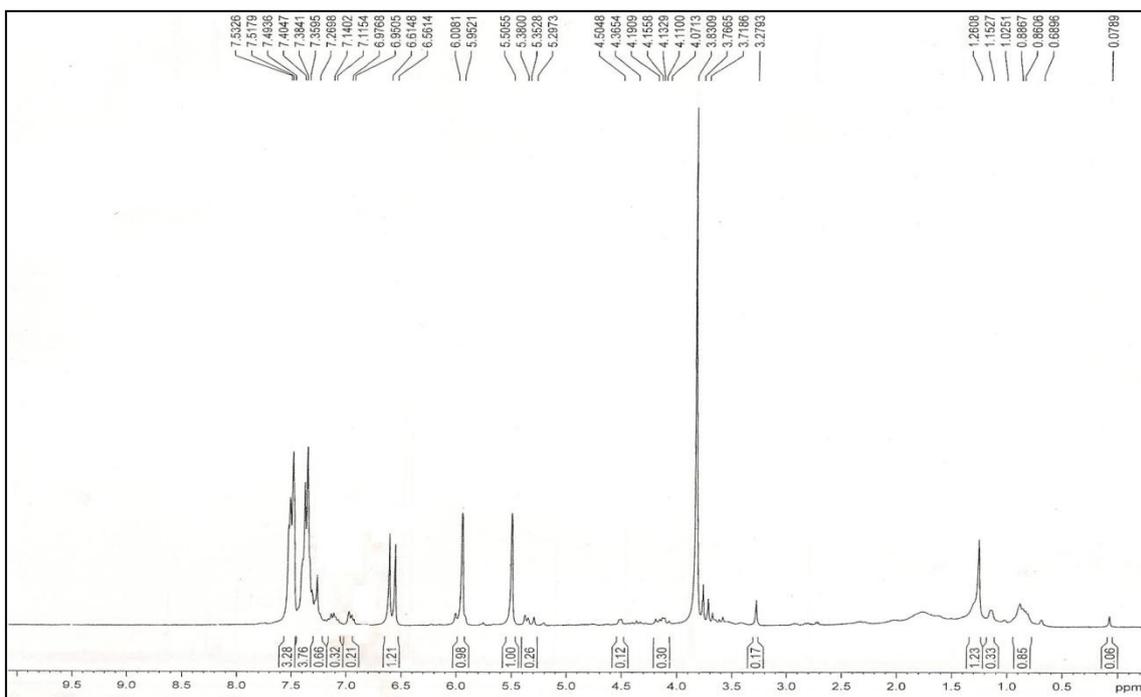


Figura 29: Espectro de RMN ^{13}C -BB (75MHz, CDCl_3) de DD5.

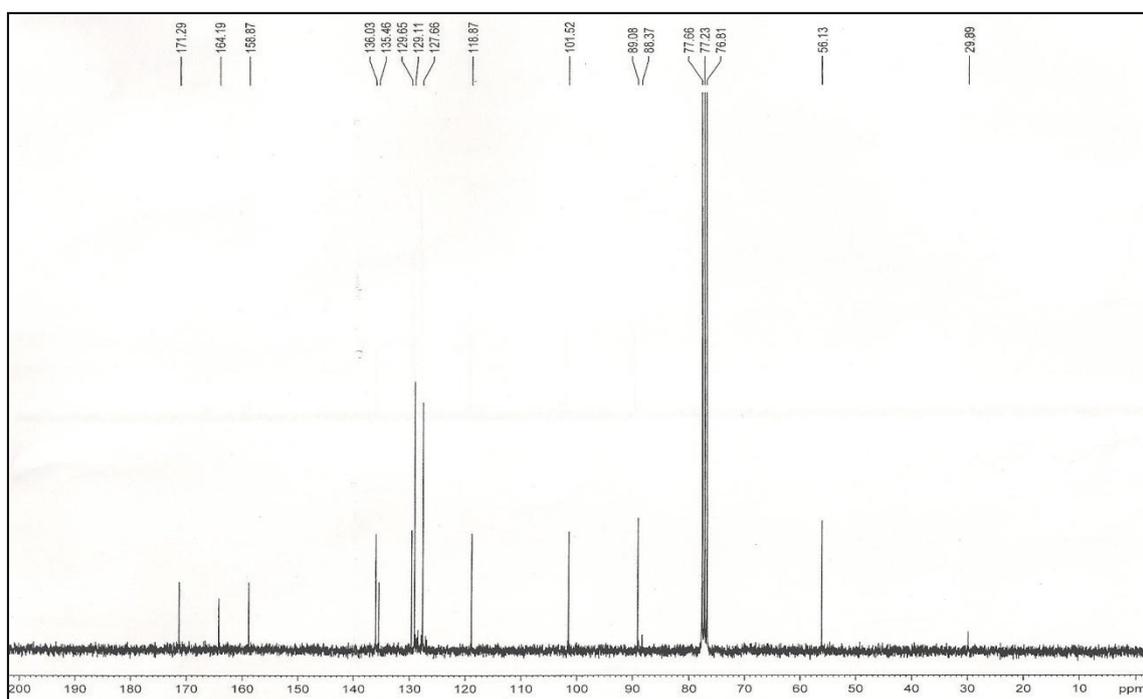


Figura 30: Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (75MHz, CDCl_3) de DD5.

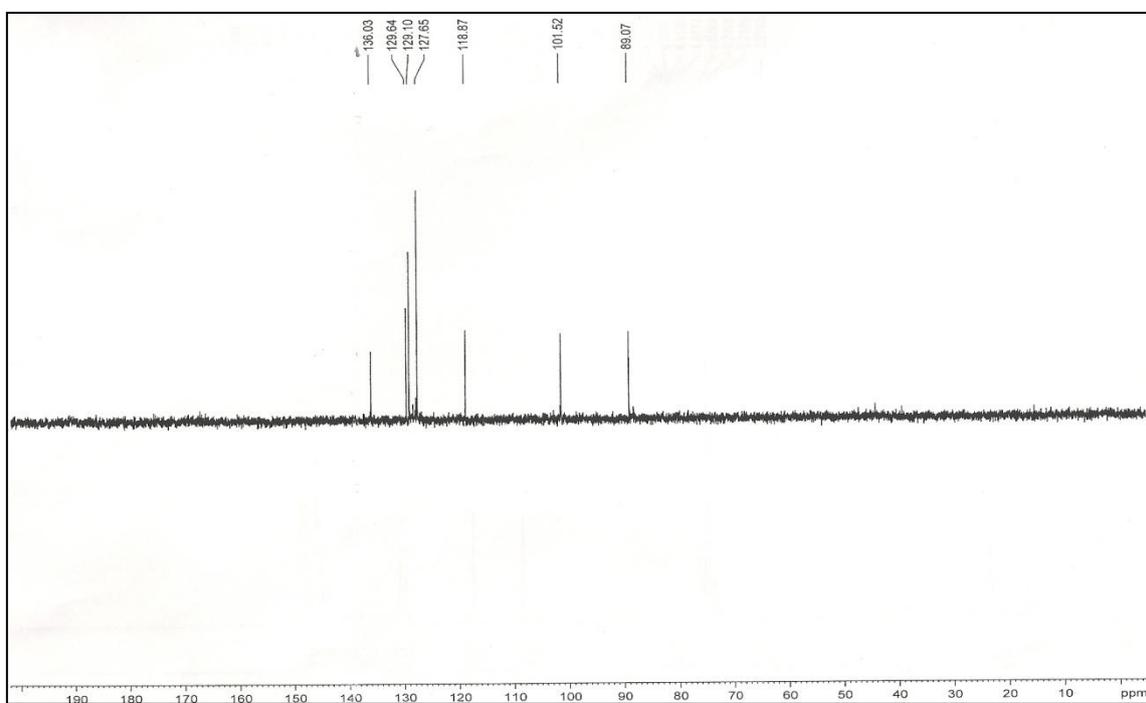


Figura 31: Espectro bidimensional HSQC (300, 75 MHz, CDCl_3) de DD5.

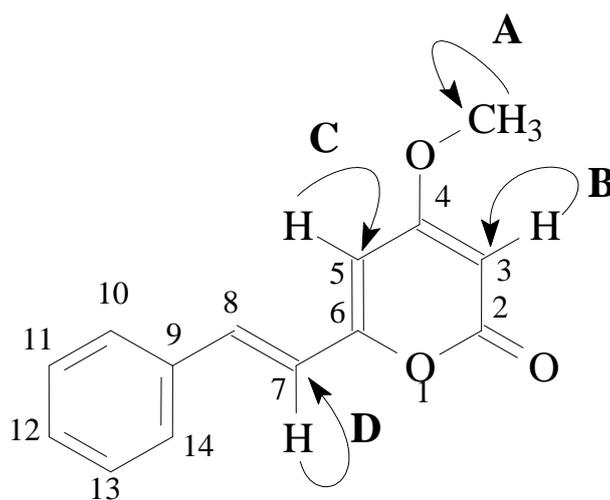
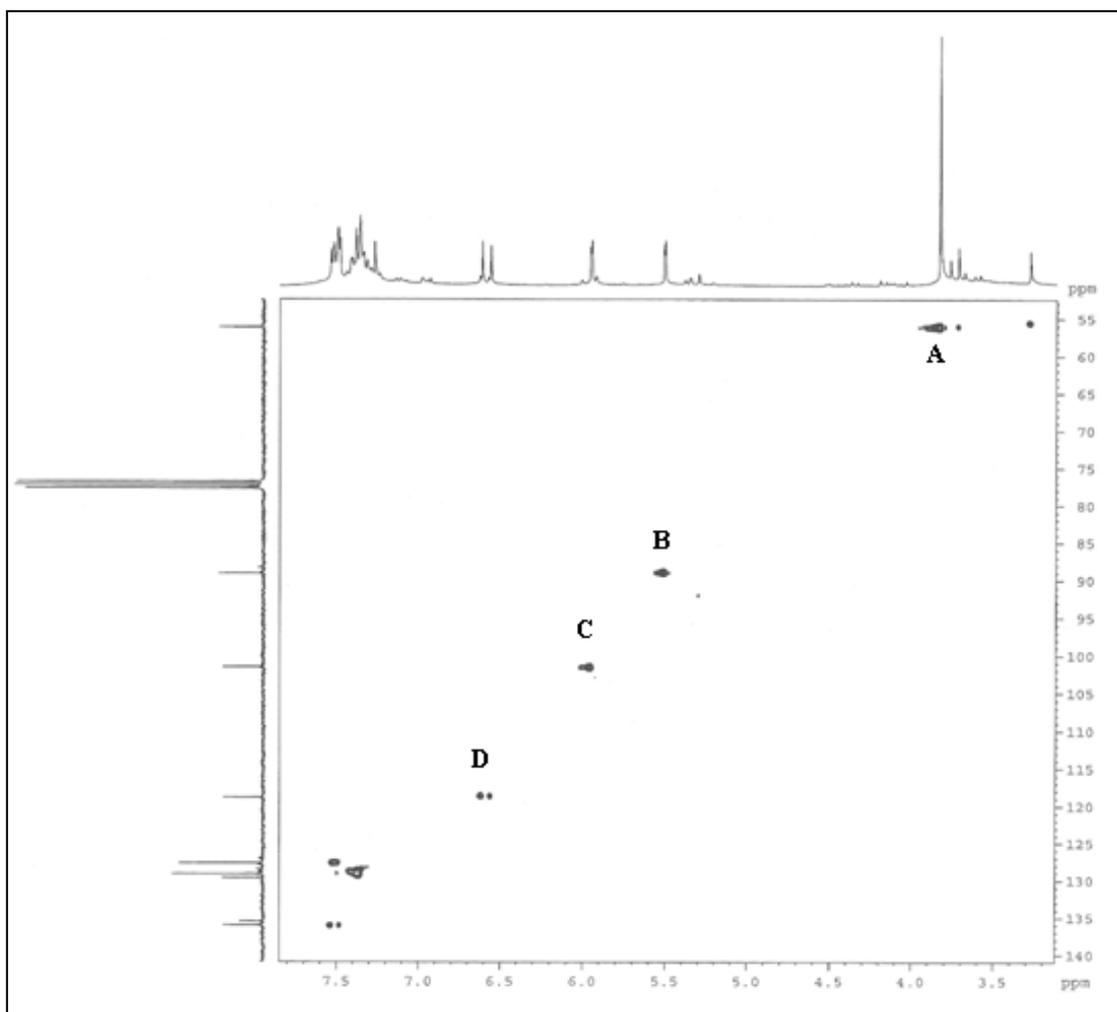


Figura 32: Espectro bidimensional HMBC (300, 75 MHz, CDCl₃) de DD5.

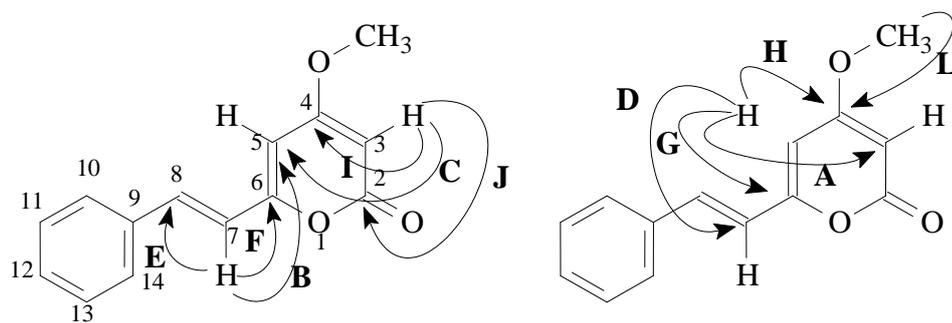
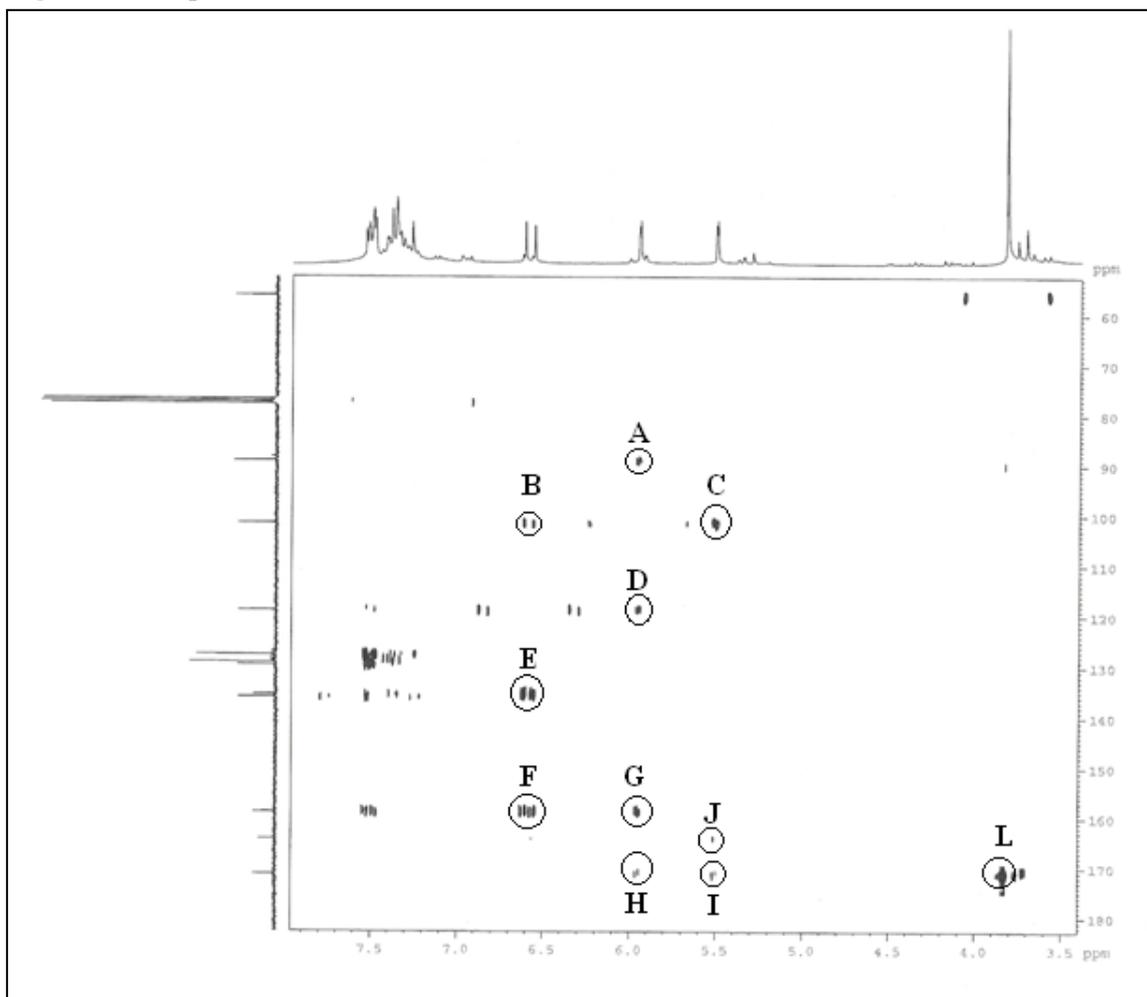
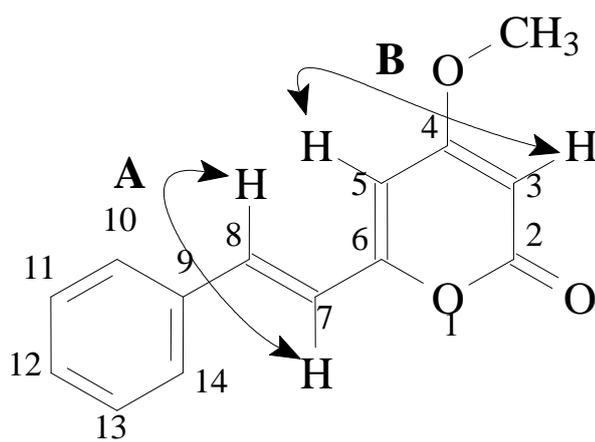
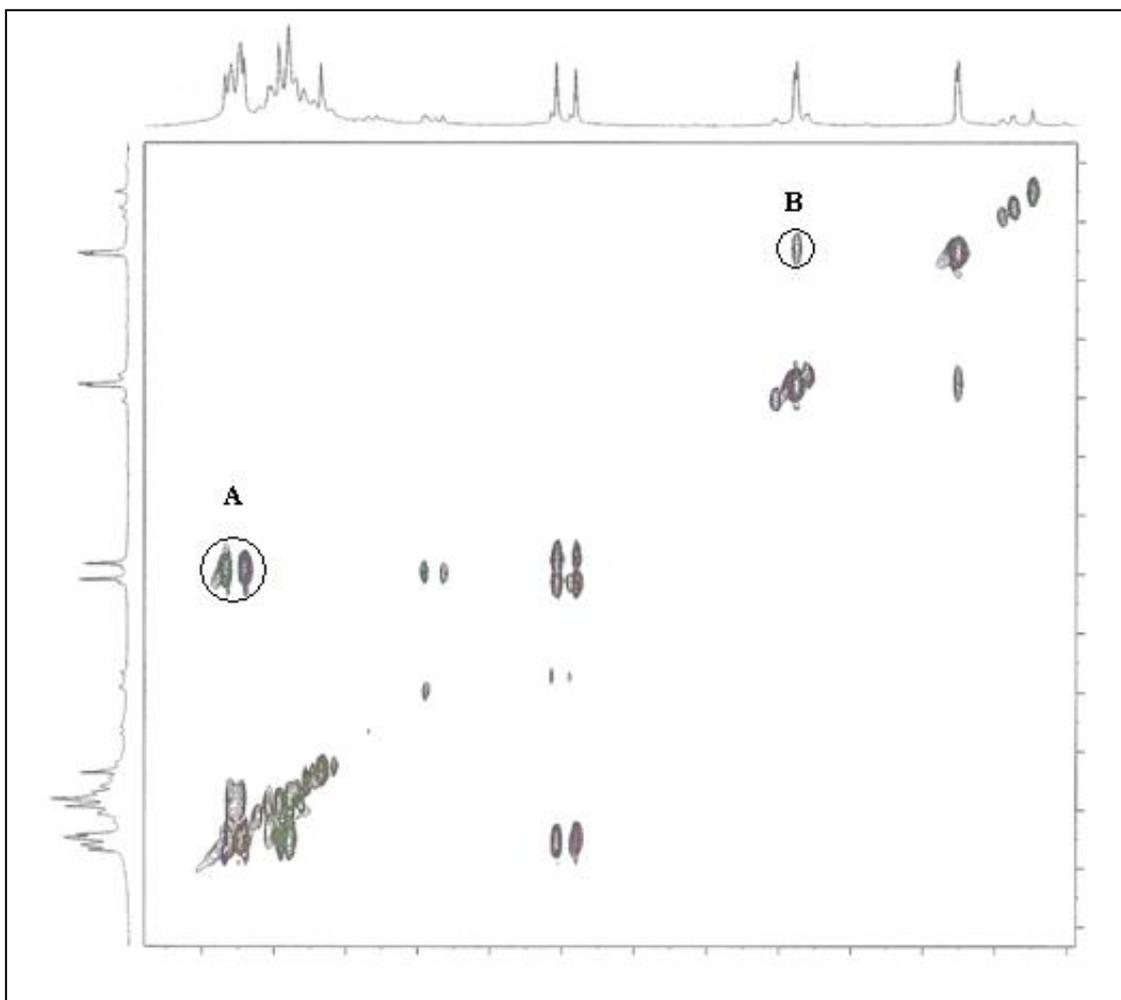


Figura33: Espectro bidimensional COSY (300 MHz, CDCl₃) de DD5.



4.3 Ensaio para inibição da enzima conversora de angiotensina

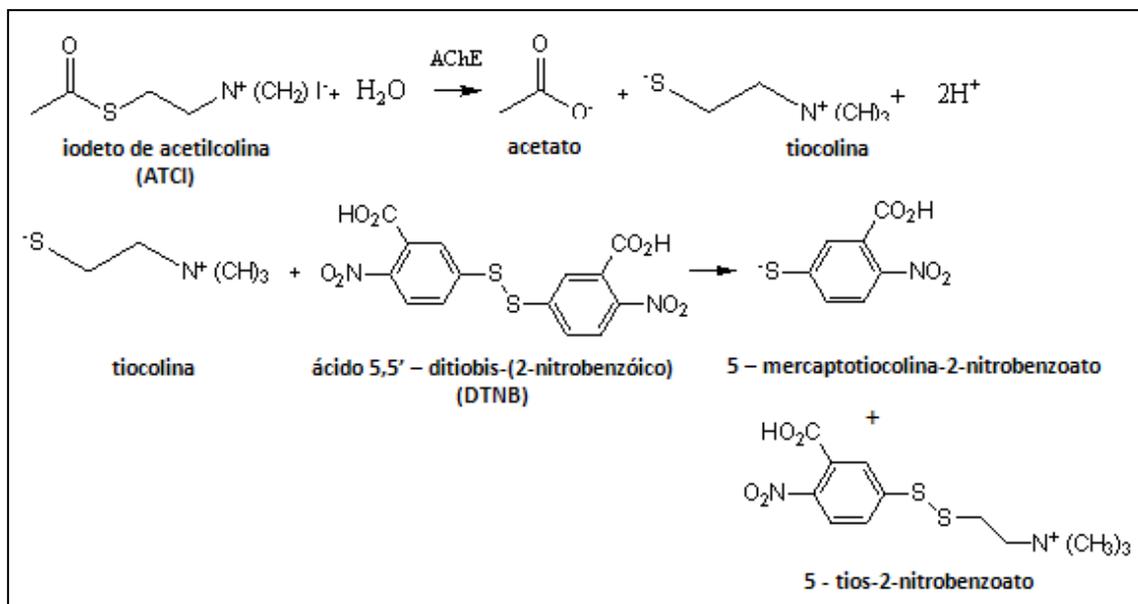
O teste de inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) foi realizado com os extratos hexânico e etanólico dos rizomas de *Alpinia zerumbet*. De acordo com os resultados obtidos, ambos os extratos apresentaram potencial de inibição da enzima.

4.4 Atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase

O objetivo desse ensaio é encontrar substâncias que apresentam a propriedade de inibir a enzima acetilcolinesterase, inibição que está diretamente ligada ao tratamento da doença Mal de Alzheimer (RHEE, 2001). É baseado em procedimento descrito por Ellman *et al.*, (1961).

O teste de inibição da enzima acetilcolinesterase foi realizado com os extratos hexânico e etanólico dos rizomas de *Alpinia zerumbet*. As reações que estão envolvidas nesse método estão apresentadas na Figura 34.

Figura 34: Mecanismo para a reação enzimática do teste de Ellman.



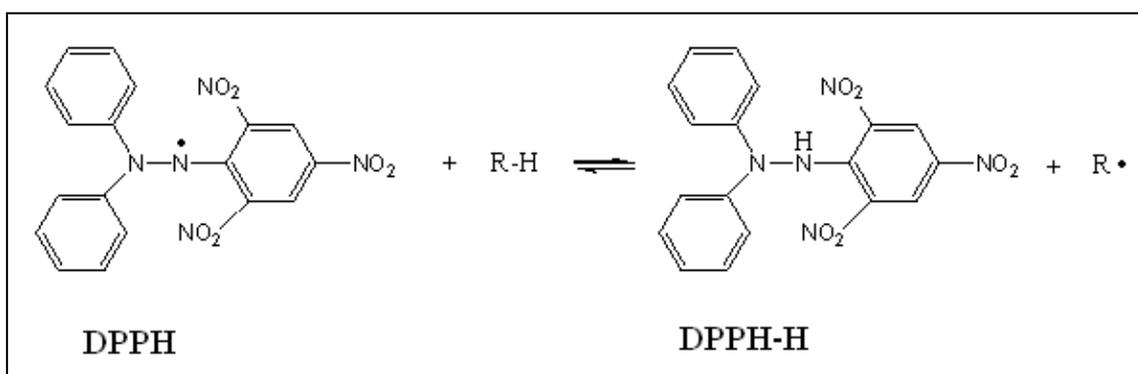
De acordo com os resultados obtidos, ambos os extratos apresentaram-se inativos contra a enzima.

4.5 Avaliação qualitativa da capacidade sequestradora de radicais livres (DPPH)

O ensaio DPPH tem sido amplamente utilizado para prever atividades antioxidantes por causa do curto tempo para análise.

O teste se baseia na diminuição na absorbância do radical 1,1-difenil-2-picrihidrazina causada pela sua redução por uma substância antioxidante. Devido à presença ímpar de elétron, a solução contendo o radical DPPH tem uma cor violeta característica com absorção a 517nm. Após sua reação com o antioxidante, a cor violeta passa a ser amarela, diminuindo gradualmente a absorvidade a 517nm (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 2007). As reações que estão envolvidas nesse método estão apresentadas na figura 35.

Figura 35: Reações envolvidas na avaliação qualitativa da capacidade sequestradora de radicais livres.



O ensaio qualitativo para captura de radicais livres foi realizado com os extratos hexânico e metanólico dos rizomas de *Alpinia zerumbet*, onde se obteve resultado positivo para ambos os extratos.

4.5 Teste Larvicida frente ao *Aedes aegypti*

Os resultados de atividade larvicida foram analisados no programa EXCEL e interpretados em valores de CL₅₀ (Concentração Letal para 50% da população em estudo).

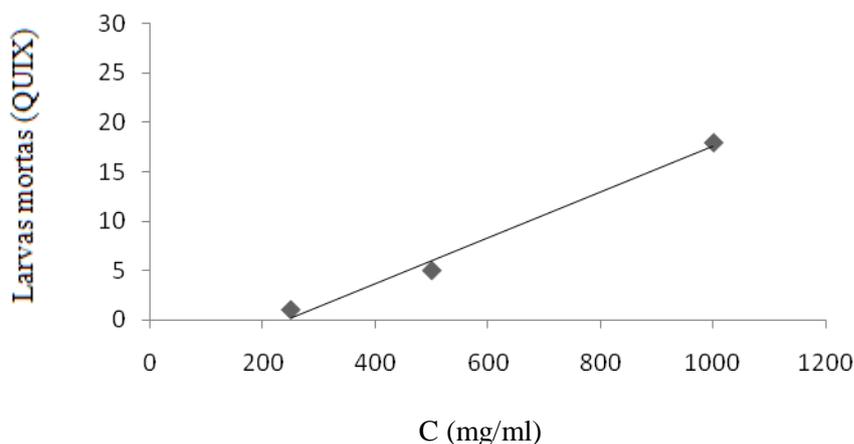
Tabela 8. Valores de CL₅₀ para extratos de *Alpinia Zerumbet*.

EXTRATO	Rockfeller (CL ₅₀)	QUIX (CL ₅₀)
Hexânico	SA*	823,1 ppm
Etanólico	SA	SA

S.A- Sem atividade

Os resultados mostraram que apenas o extrato hexânico do rizoma de *Alpinia zerumbet* obteve atividade contra apenas um tipo de larva (QUIX), com CL₅₀ de 823,1 ppm como mostrado na Figura 36.

Figura 36. Análise da atividade larvicida do extrato hexânico de *Alpinia Zerumbet*.



Cavalcanti *et al.* (2004), propõe que extratos com CL₅₀ abaixo de 100 ppm são considerados importantes para a atividade larvicida. Entretanto, Silva *et al.* (2004) propõe que os testes sejam feitos com as frações do extrato, pois estes apresentam melhores resultados que os extratos brutos. Sendo assim, pode-se pensar em avaliar a atividade larvicida das frações do extrato hexânico, já que o mesmo apresentou CL₅₀ de 823,1 ppm.

5. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 Material Botânico

Este trabalho foi baseado no estudo químico dos rizomas de *Alpina zerumbet*.

Os rizomas de *Alpina zerumbet* foram coletados no Horto de plantas medicinais “Professor Francisco José de Abreu Matos” da Universidade Federal do Ceará pelo servidor Francisco de Sales Lima, em Junho de 2011. O Horto tem como responsável a Professora Mary Anne Medeiros Bandeira.

A certificação botânica da espécie de planta em estudo foi realizada pelos Doutores Edson Paula Nunes e Martins Peres do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará. A exsicata referente à coleta da espécie encontra-se depositada no Herbário “Prisco Bezerra” do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Ceará, registrada com número 10858.

5.2 Métodos Cromatográficos

5.2.1 Cromatografia de Adsorção

Para fracionamento dos extratos brutos e purificação das substâncias, foram utilizadas cromatografias de adsorção em coluna aberta (CC) e adsorção em sistema de filtração a vácuo, utilizando gel de sílica 60 (63-200 μm) da marca Vetec. O comprimento e diâmetro de cada coluna variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser cromatografada e, conseqüentemente, a quantidade de sílica a ser utilizada.

As frações obtidas em CC foram purificadas em cromatografia de camada delgada preparativa (CCDP), utilizando placas de gel de sílica 60 (5-40 μm), em suporte de vidro (20x20 cm) com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm, da marca Merk.

As amostras, depois de cromatografadas, foram analisadas em cromatografia de camada delgada (CCD), utilizando cromatoplas de gel de sílica 60 (5-40 μm) em suporte de alumínio da marca Merck. As placas cromatográficas foram reveladas em solução de Vanilina [5g de vanilina em solução de etanol puro /ácido perclórico 10% (1:1)], seguida de aquecimento em chapa aquecedora.

O eluentes utilizados foram: hexano, dicloreto de metano, acetato de etila e metanol, puros ou combinados em proporções de modo a obter uma gradiente crescente de polaridade.

5.3 Métodos Físicos

5.3.1 Ponto de Fusão

As substâncias isoladas tiveram seus pontos de fusão determinados em equipamento MQAPF-301 da Microquímica, a uma taxa de aquecimento de 5°C/min.

5.3.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros uni- e bidimensionais de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e carbono 13 (RMN ^{13}C) foram obtidos em espectrômetro da Bruker, modelo DPX-300, pertencente ao Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), operando na frequência de 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C .

Foi utilizado clorofórmio deutereado (CDCl_3) na dissolução das amostras para obtenção dos espectros.

Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados nos espectros RMN ^1H pelo pico do hidrogênio pertencente a fração não deuturada do solvente clorofórmio ($\delta_{\text{H}} 7,27$) e para os espectros de RMN ^{13}C pelos picos de carbonos -13 do solvente clorofórmio ($\delta 77,00$).

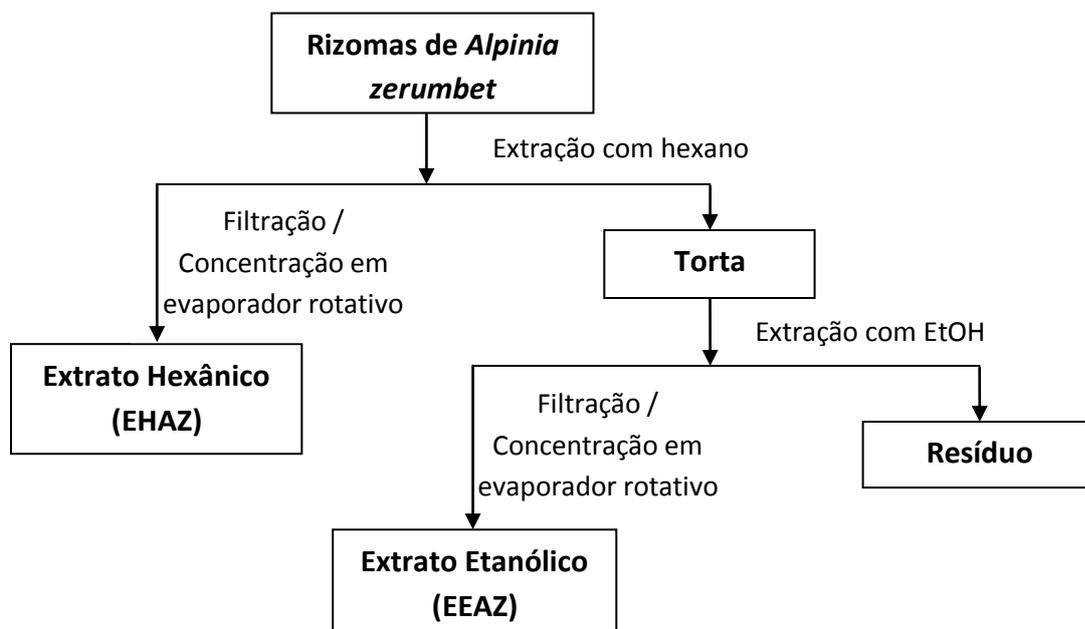
5.4 Estudo dos constituintes químicos não voláteis dos rizomas de *Alpinia zerumbet*

5.4.1 Preparação dos extratos de *Alpinia zerumbet*

Depois de totalmente secos, 5,5 kg dos rizomas de *Alpinia zerumbet* foram triturados, divididos em dois marfotes e submetidos à extração a frio com hexano (3x 9 L) e em seguida com etanol (3 x 9 L). As soluções obtidas foram filtradas e em seguida

concentradas em evaporador rotativo. O extrato obtido pela extração com hexano foi nomeado EHAZ (171,17 g) e o obtido pela extração com etanol EEAZ(150,46 g).

Fluxograma 1 – Obtenção dos extratos hexânico e etanólicos dos rizomas de *Alpinia zerumbet*.



5.4.2 Fracionamento cromatográfico de EHAZ

Parte do extrato EHAZ (50,1289 g) foi adsorvido em 50 g de gel de sílica com o auxílio de um gral de porcelana e em seguida, acondicionados em 100 g de gel de sílica em um sistema de filtração a vácuo. Após eluições com hexano, diclorometano, acetado de etila e metanol, foram obtidas 4 frações (Tabela 9).

Tabela 9: Massa das frações obtidas com o fracionamento do extrato hexânico de *Alpinia. zerumbet*.

Solvente	Fração	Massa(g)	Rendimento (%)
Hexano	EHAZ-H	16,7673	33,52
CH ₂ Cl ₂	EHAZ-D	14,4341	28,86
AcOEt	EHAZ-A	7,6898	15,36
MeOH	EHAZ-M	1,0840	2,16
Total		39,95	79,90

5.4.3 Fracionamento cromatográfico de EHAZ-D

Parte da fração EHAZ-D (7,0508g) foi adsorvida em 14 g de gel de sílica com o auxílio de um gral de porcelana e em seguida, com o auxílio de um funil, acondicionados em 100 g de gel de sílica em uma coluna de vidro. Após eluições com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, em combinações variadas, foram obtidos sete frações (Tabela 10)

Tabela 10: Massa das frações obtidas com o fracionamento de EHAZ-D.

Solvente	Fração	Massa(g)	Rendimento (%)
Hexano	EHAZ-DH	0,1231	1,71
Hexano/CH ₂ Cl ₂ (1:1)	EHAZ-DHD	2,1119	30,14
CH ₂ Cl ₂	EHAZ-DD	0,7890	11,14
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (1:1)	EHAZ-DDA	2,8361	40,42
AcOEt	EHAZ-DA	0,2264	3,14
AcOEt/MeOH (1:1)	EHAZ-DAM	0,2709	3,85
MeOH	EHAZ-DM	0,0230	0,32
Total		6,35	90,70

Após análise das frações obtidas em CCD, as frações EHAZ-DHD e EHAZ-DD foram escolhidas para serem fracionadas em CC.

5.4.4 Fracionamento cromatográfico de EHAZ-DHD e isolamento de DHD1, DHD2 e DHD3

A fração EHAZ-DHD (2,1119 g) foi adsorvida em 2g de gel de sílica com o auxílio de um gral de porcelana e em seguida, com o auxílio de um funil, acondicionados em 40 g de gel de sílica em uma coluna de vidro. Após eluições com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, em combinações variadas, obteve-se 515 frações (coletadas em frascos de 10 ml), que foram reunidas e pesadas conforme mostra a Tabela 11 (pagina 60).

Tabela 11: Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EHAZ-DHD.

Solvente	Fração	Fr. Reunidas	Massa(g)
Hexano	1-5	H1(40-75)	0,0472
Hexano/ CH ₂ Cl ₂ (5%)	6-10	H2(76-95)	0,0310
Hexano/ CH ₂ Cl ₂ (10%)	11-16	H3(96-120)	0,1234
Hexano/ CH ₂ Cl ₂ (20%)	17-53	H4(121-165)	0,0380
Hexano/ CH ₂ Cl ₂ (25%)	54-74	H5(166-175)	0,0330
Hexano/ CH ₂ Cl ₂ (30%)	75-136	H6(176-255)	0,1162
Hexano/ CH ₂ Cl ₂ (35%)	137-155	H7(256-275)	0,1157
Hexano/ CH ₂ Cl ₂ (40%)	156-237	H8(276-295)	0,1397
Hexano/ CH ₂ Cl ₂ (50%)	238-258	H9(296-360)	0,3451
Hexano/ CH ₂ Cl ₂ (60%)	259-331	H10(361-410)	0,0902
Hexano/ CH ₂ Cl ₂ (65%)	332-347	H11(411-455)	0,0920
Hexano/ CH ₂ Cl ₂ (75%)	348-379	H12(455-515)	0,1085
Hexano/ CH ₂ Cl ₂ (85%)	380-411		
CH ₂ Cl ₂	412-439		
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt(10%)	440-481		
CH ₂ Cl ₂ / AcOEt (30%)	482-492		
CH ₂ Cl ₂ / AcOEt (50%)	493-515		

Após análise das frações obtidas em CCD, a fração H3(96-120) foi submetida a uma cromatografia de adsorção em CCDP, onde foi possível isolar um sólido amarelado (DHD1-6 mg). A fração H6(176-255) também foi submetida a uma cromatografia de adsorção em CCDP, onde foi possível isolar cristais incolores (DHD2-8 mg). De forma análoga, da fração H4 foi possível isolar um sólido de cor amarelo intenso (DHD3- 5 mg).

5.4.5 Fracionamento cromatográfico de EHAZ-DD e isolamento de DD4 e DD5

A fração EHAZ-DD (0,7790 g) foi adsorvida em 1g de gel de sílica com o auxílio de um gral de porcelana e em seguida, com o auxílio de um funil, acondicionados em 20 g de gel de sílica em uma coluna de vidro. Após eluições com hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e MeOH em concentrações variadas, obtiveram-se 342 frações

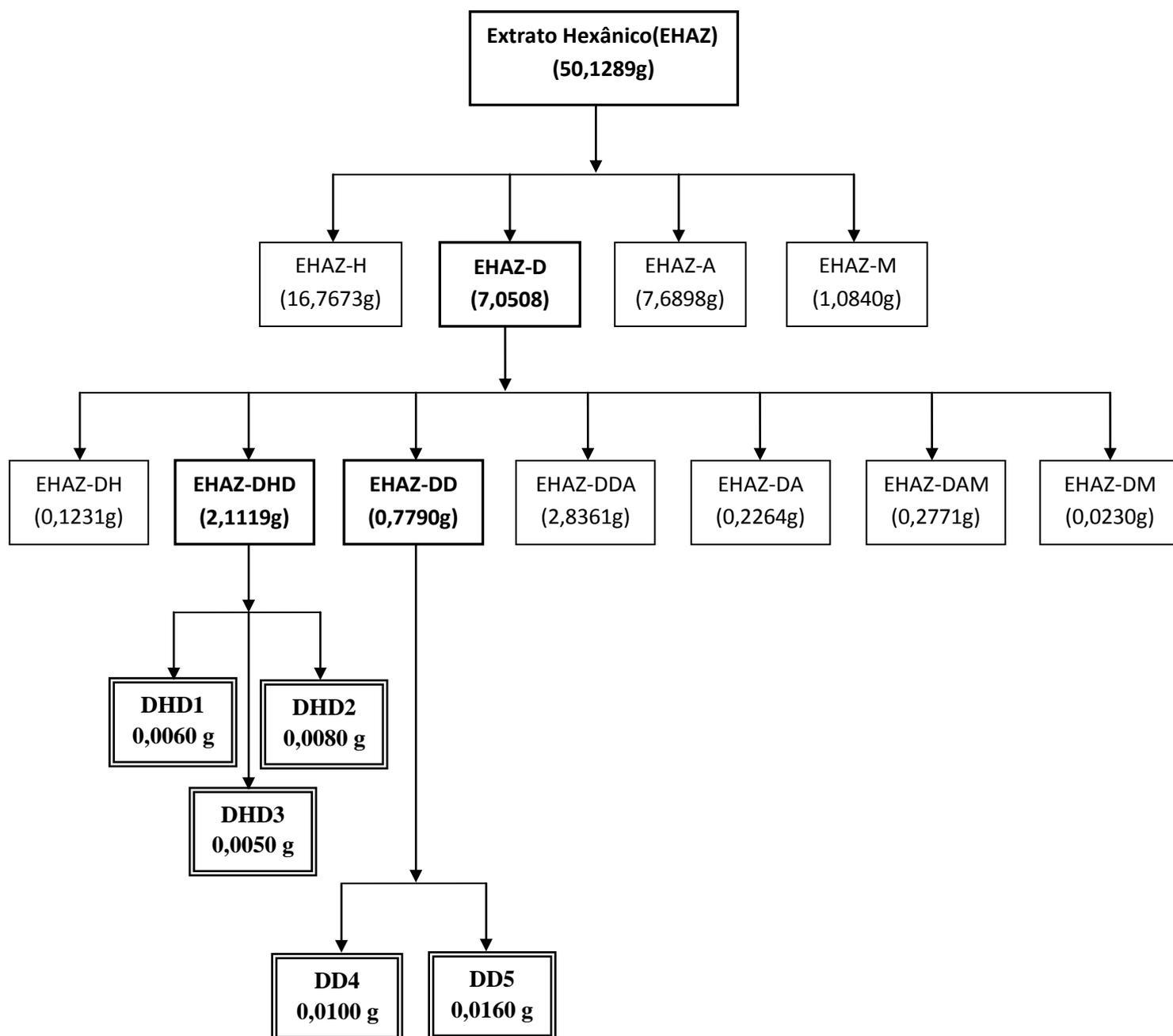
(coletadas em frascos de 10 ml), que foram reunidas e pesadas conforme mostra a Tabela 12.

Tabela 12: Dados referentes ao fracionamento cromatográfico de EHAZ-DD.

Solvente	Fração	Fr. Reunidas	Massa(g)
Hexano/CH ₂ Cl ₂ (10%)	1-13	D1(150-185)	0,0536
Hexano/CH ₂ Cl ₂ (15%)	14-23	D2(186-204)	0,0582
Hexano/CH ₂ Cl ₂ (20%)	24-35	D3(205-240)	0,1200
Hexano/CH ₂ Cl ₂ (25%)	36-46	D4(241-342)	0,2156
Hexano/ CH ₂ Cl ₂ (30%)	47-77		
Hexano/ CH ₂ Cl ₂ (40%)	78-100		
Hexano/ CH ₂ Cl ₂ (50%)	110-119		
Hexano/ CH ₂ Cl ₂ (55%)	120-128		
Hexano/ CH ₂ Cl ₂ (60%)	129-138		
Hexano/ CH ₂ Cl ₂ (65%)	139-166		
Hexano/ CH ₂ Cl ₂ (70%)	167-176		
Hexano/ CH ₂ Cl ₂ (75%)	177-193		
Hexano/ CH ₂ Cl ₂ (85%)	194-213		
Hexano/ CH ₂ Cl ₂ (90%)	214-223		
Hexano/ CH ₂ Cl ₂ (95%)	224-262		
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (5%)	264-283		
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (10%)	284-300		
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (15%)	301-318		
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (25%)	319-392		
CH ₂ Cl ₂ /AcOEt (45%)	320-329		
AcOEt (100%)	330-342		

A fração D1 (180-185) apresentou cristais em forma de agulhas. Esse material foi purificado com hexano (DD4-10 mg). Já a fração D2(186-204) apresentou um sólido amarelado amorfo. Essa fração também foi purificada com hexano (DD5-16 mg).

Fluxograma 2- Esquema de isolamento dos constituintes químicos DHD1, DHD2, DHD3, DD4 e DD5, partindo do extrato hexânico dos rizomas de *Alpinia zerumbet*.



5.5 Ensaio para inibição da enzima conversora de angiotensina

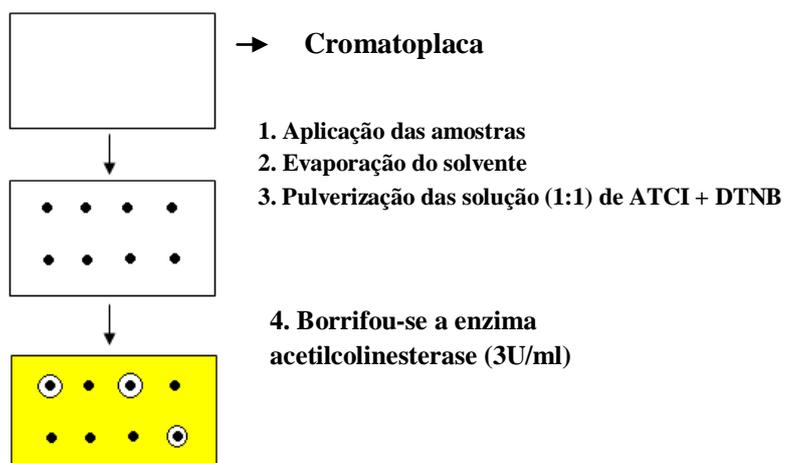
O ensaio da inibição da enzima de conversão da angiotensina foi realizado de acordo com a metodologia desenvolvida por LAHOGUE et al., 2010. Este experimento foi realizado no Centro Alemão de Pesquisa do Câncer (DKFZ- Heidelberg, Alemanha) pela professora Maria Teresa Salles Trevisan.

5.6 Ensaio para inibição da enzima acetilcolinesterase dos extratos

Este ensaio é baseado em procedimento descrito por Ellman *et al.* (1961), adaptado para CCD por Rhee *et al.* (2001). É considerado um método colorimétrico e que pode ser utilizado de forma qualitativa e quantitativa, mas nesse trabalho foi utilizada somente a forma qualitativa. É um método rápido e sensível para a seleção de amostras com ação anticolinesterásica.

A metodologia consiste em retirar uma alíquota de 5µl dos extratos na concentração 10 mg/ml e aplicar em uma cromatoplaca. Após a evaporação do solvente, foi borrifado uma mistura (1:1) de iodeto de acetilcolina (ATCI) 1mmol.L⁻¹ com o reagente de Ellman (ácido 5,5' – Ditiobis- (2 –nitrobenzóico, DTNB, 1 mmol.L⁻¹), deixando em repouso por 3 minutos para a secagem da placa. Em seguida foi borrifado a enzima acetilcolinesterase (3U/ml). Após 10 minutos, ocorre o surgimento de uma coloração amarela, porém, onde há inibição da enzima, observa-se um halo branco em torno dos “spots” onde foram aplicadas as amostras. Em 20-30 minutos a coloração desaparece. Como controle positivo, foi utilizado solução do padrão sal de Eserina (2mg/ml) e como controle negativo, foram utilizados solventes. Na Figura 37 estão apresentadas as etapas desse método.

Figura 37: Etapas do ensaio da metodologia modificada por Rhee.

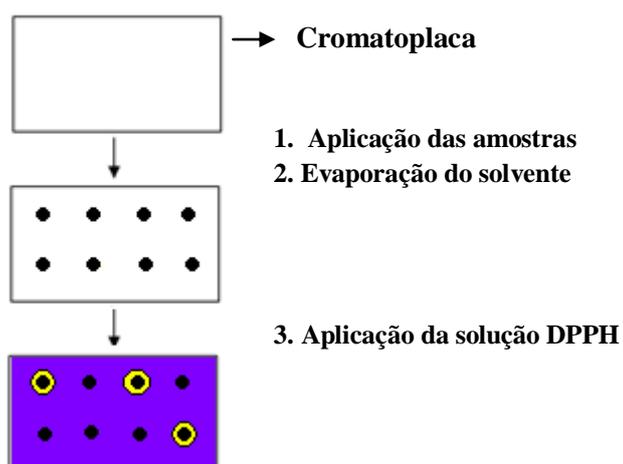


5.7 Avaliação qualitativa da capacidade seqüestradora de radicais livres (DPPH)

Os ensaios para avaliação qualitativa da capacidade seqüestradora de radicais livres frente ao radical sintético 1,1-difenil-2-picril-hidrazina (DPPH) foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Soler-Rivas e cols.(2000). Após preparação dos extratos (10mg/ml), 2 µl de cada amostra foram aplicados em cromatoplaca. Após evaporação do solvente, foi borrifado solução metanolica a 0,4 mM do radical sintético DPPH, em seguida secada a temperatura ambiente.

O surgimento de manchas amareladas, sob um fundo roxo nos spots da amostras indicou resultado positivo. Como controle positivo, foi utilizado ácido ascórbico 2 µl, 2mg/ml em MeOH. Na Figura 38 estão apresentadas as etapas desse método

Figura 38: Etapas do ensaio da metodologia descrita por Soler-Rivas



5.8 Teste Larvicida (utilizando as larvas de *Aedes aegypti*)

Neste teste, foi avaliado o potencial larvicida dos extratos hexânicos e etanólicos dos rizomas de *Alpinia zerumbet*. Para isto, foram utilizados dois tipos de larvas: as denominadas Rockfeller, que funcionaram como grupo controle, por se tratar de uma população de larvas que não são contaminadas e as denominadas QUIX, que são larvas mais resistentes, coletadas em Quixeramobim-Ce. Essas larvas foram cedidas pelo Núcleo de Vetores da Secretaria de Saúde do Estado do Ceará (NUVET).

O ensaio para avaliação do potencial larvicida dos extratos foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Cavalcanti *et al.* (2004). Foram preparadas soluções de 100, 250, 500 e 1000 ppm dos extratos com água e DMSO. Essas amostras foram colocadas em frascos de vidro (50mL) e logo após, foram colocadas 25 larvas de *Aedes aegypti* (3º estágio) dos dois grupos em contato com as soluções por 24h. Logo após esse período foram feitas as contagens das larvas que morreram. Os testes foram feitos em triplicata.

6. CONCLUSÃO

O estudo cromatográfico do extrato hexânico dos rizomas de *Alpinia zerumbet* possibilitou o isolamento de cinco substâncias:

Um estilbeno denominado (E)-3,5-dimetoxiestilbeno, inédito na espécie em estudo; um diterpeno de esqueleto labdano denominado (E)-15,16-bisnorlabda-8,11-dieno-13-ona; uma chalcona denominada 2',4'-dihidroxi-6'-metoxi-3'-(3''-metil-6''-metil-etil-2''-ciclohexenil)chalcona ???; um esteróide denominado β -sitosterol, comumente encontrado em plantas; e um hidrocarboneto aromático da classe kavapirona denominado 5,6-dehidrokawain.

Foi possível avaliar o potencial de inibição de ECA, de inibição da enzima acetilcolinesterase, antioxidante e larvicida dos extratos hexânicos e metanólicos dos rizomas de *Alpinia zerumbet*.

Os dois extratos (hexânico e etanólico) apresentaram potencial de inibição da enzima conversora de angiotensina e antioxidante.

Somente o extrato hexânico apresentou atividade larvicida, com CL_{50} 823,1 ppm.

Nenhum dos extratos em estudo apresentou potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, E.S.B.; NEVES, L.J. Anatomia foliar de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burtt & Smith. **Acta Botânica Brasilica**, v. 18, n.1, p. 109-121. 2004
- BROWN, N. J.; VAUGHAN, D. E. Angiotensin-converting enzyme inhibitors. **Circulation**, v. 97, p.1411–1420, 1998.
- CAVALCANTI, E. S. B.; MORAIS, S. M.; LIMA, A. A. L.; SANTANA, E. W. P. Larvicidal Activity of Essential Oils from Brazilian Plants against *Aedes aegypti* L., **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, p.541-544, 2004.
- CHANG, N.W.; WU, C.t.; WANG, S.Y.; PEI, R.J.; LIN, C.F. *Alpinia pricei* Hayata rhizome extracts have suppressive and preventive potencies against hypercholesterolemia. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 9, p. 2350–2356, 2010.
- CHOMPOO, J.; UPADHYAY, A.; KISHIMOTO, W.; MAKISE, T.; TAWATA, S. Advanced glycation end products inhibitors from *Alpinia zerumbet* rhizomes. **Food Chemistry**, v. 129, p. 709–715, 2011.
- DHARMARATNE, H. R W.; NANAYAKKARA, N. P. D.; KHAN, I. A. Kavalactones from Piper methysticum, and their ¹³C NMR spectroscopic analyses. **Phytochemistry**. v. 59, p. 429-433, 2002.
- DOOLEY, M.; LAMB, H.M. Donepezil: a review of its use Alzheimer's disease. **Drugs & Aging**, v. 16, n. 3, p. 199-226, 2000.
- EGAN, B. M.; BASILE, J. N.; LACKLAND, D. T. **Hypertension: Hot topics**. Philadelphia: Hanley & Belfus, p.296, 2004.
- ELZAAWELY, A.A.; TAWAKA, S. Effect of extraction and drying methods on the contents of kava pyrones and phenolic compounds in *Alpinia zerumbet* leaves. **Asian Journal of Plant Sciences**, v.10, n. 8, p. 414-418, 2011.

GANTEN, D.; UNGER, T., & LANG, R. E. Pharmacological interferences with the renin-angiotensin system. **Arzneimittel-Forschung**, v. 34, p. 1391–1398, 1984.

GIACOSA, A.; HULL, W.E.; HAUBNER, R.; SPIEGELHALDER, B.; BARTSH, H. The antioxidant/anticancer potential of phenolic compounds isolated from olive oil. **European Journal of Cancer**, v. 36, p. 1235-1247, 2000.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of medical physiology, 11th ed.** Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006.

HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine, 4th ed.** Oxford University Press, 2007.

HARAGUCHI, H.; KUWATA, Y.; INADA, K.; SHINGU, K.; MIYAHARA, K.; NAGAO, M.; YAGI, A. Antifungal activity from *Alpinia galanga* and the competition for incorporation of unsaturated fatty acids in cell growth . **Planta Médica** , v. 62, n. 4, p. 308-313.

HEMA, P.S.; NAIR, M.S. Flavonoids and other constituents from the rhizomes of *Alpinia calcarata*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, p. 52-54, 2009.

HANSEN, K.; NYMAN, U.; SMITT U.W.; ADSERSEN A.; GUDIENSEN L.; RAJASEKHARAN S. *In vitro* screening of traditional medicines for anti hypertensive effect based on inhibition of the angiotensin converting enzyme (ACE). **Journal of Ethnopharmacology**, 48 pp. 43–51, 1995.

HSEU, Y.C.; LEE, M.S.; WU, C.R.; CHO, H.J.; LIN, K.Y.; LAI, G.H.; WANG, S.Y.; KUO, Y.H.; KUMAR, K.J.S.; YANG, H.L. The Chalcone Flavokawain B Induces G2/M Cell-Cycle Arrest and Apoptosis in Human Oral Carcinoma HSC-3 Cells through the Intracellular ROS Generation and Downregulation of the Akt/p38 MAPK Signaling Pathway. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 2385-2397, 2012.

HUA, S.Z.; LUO, J.G.; WANG, X.B.; WANG, J.S.; KONG, L.Y. Two novel monoterpene–chalcone conjugates isolated from the seeds of *Alpinia katsumadai*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.19, p. 2728–2730, 2009.

HUA, S.Z.; WANG, X.B.; LUO, J.G.; WANG, J.S.; KONG, L.Y. A pair of unique sesquiterpene–chalcone conjugates isolated from the seeds of *Alpinia katsumadai*. **Tetrahedron Letters**, v. 49, p. 5658–566, 2008

ICHINO, K.; TANAKA, H.; ITO, K. Two novel flavonoids from the leaves of *Lindera uhhbellata* var. *larcea* and *L. uhhbellata*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 11, p. 3251-3260, 1987.

IOSET, J.R.; MARSTON, A.; GUPTA, M.P.; HOSTETTMANN, K. Five New Prenylated Stilbenes from the Root Bark of *Lonchocarpus chiricanus*. **Jounal of Natural Products**, v. 64, n. 6, p. 710-715, 2001.

ISRAF, D.A.; KHAIZURIN, T.A.; SYAHIDA, A.; LAJIS, N.H.; KHOZIRAH, S. Cardamonin inhibits COX and iNOS expression via inhibition of p65NF- κ B nuclear translocation and I κ B phosphorylation in RAW 264.7 macrophage cells. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 673–679, 2007.

ITOKAWA, H.; YOSHIMTO, S.; MORITA, H. Diterperpenes from the rizhomes of *Alpinia formosana*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 2, p. 435-438, 1987.

ITOWAKA, H.; MORITA, M.; MIHASHI, S. Phenolic compounds from the rhizomes of *Alpinia speciosa*. **Phytochemistry**, v. 20, n. 11. p. 2503-2506, 1981.

KADOTA, S.; PRASAIN, J.K.; LI, J.X.; BASNET, P.; DONG, H.; TANI, T.; NAMBA, T. Blepharocalyxins A and B, Novel Diarylheptanoids from *Alpinia blepharocalyx*, and their Inhibitory Effect on NO Formation in Murine Macrophages. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 40, p. 7283-7286,1996.

KADOTA, S.; PRASAIN, J.K.; LI, J.X.; BASNET, P.; DONG, H.; TANI, T.; NAMBA, T. Blepharocalyxins A and B, Novel Diarylheptanoids from *Alpinia blepharocalyx*, and their Inhibitory Effect on NO Formation in Murine Macrophages. **Tetrahedron Letters**, v. 37, n. 40, p. 7283-7286,1996.

KAPEL, R.; RAHOU, E.; LECOUTURIER, D.; GUILLOCHON, D.; DHULSTER, P. Characterization of an antihypertensive peptide from an Alfalfa white protein hydrolysate produced by a continuous enzymatic membrane reactor. **Process Biochemistry**, v. 41, p.1961–1966, 2006.

KELLOFF, G.J.; BOONE, C.W.; STEELE, V.E.; CROWELL, J.A.; LUBET, R.; SIGMAN, C.C. Progress in cancer chemoprevention: perspectives on agent selection and short-term clinical intervention trials. **Cancer Research**, v. 54, p. 2015-2024, 1994.

KIM, K.H.; CHOI, J.K.; CHOI, S.U.; SEO, E.K.; LEE, K.R. Amoxantin A: A New Bisnorlabdane Diterpenoid from *Amomum xanthioides*. **Bulletin of the Korean Chemical Society**, v. 31, n. 4, p.1035-1037, 2010.

KONG, L. Y.; QIN, M.J.; NIWA, M. Diterpenoids from the Rhizomes of *Alpinia calcarata*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 939-942, 2000.

KONG, L.; QIN, M.; NIWA. Two new bislabdanic diterpenoids from *Alpinia calcarata*. **Acta Botanica Sinica**, v. 46, n.2, p. 159-164, 2004.

KRESS, W. J.; PRINCE, L. M.; WILLIAMS, K. J. The phylogeny and a new classification of the gingers (Zingiberaceae): evidence from molecular data. **American Journal of Botany**, v.89, n.10, p. 1682-1696. 2002.

KUO, Y.F.; SU, Y.Z.; TSENG, Y.H.; WANG, S.Y.; WANG, H.M.;CHUEH, P.J. Flavokawain B, a novel chalcone from *Alpinia pricei* Hayata with potent apoptotic activity: Involvement of ROS and GADD153 upstream of mitochondria-dependent apoptosis in HCT116 cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 214–226, 2010.

KUO, Y.J.; HSIAO, P.C.; ZHANG, L.J.; WU, M.D.; LIANG, Y.H.; HO, H.O.; KUO, Y.H. Labdane Diterpenoid Glycosides from *Alpinia densespicata* and Their Nitric Oxide Inhibitory. **Journal of Natural Products**, v.72, p. 1097-1101, 2009.

KUSTER, R.M.; MPALANTINOSA, M.A.; HOLANDA, M.C.; BRAND, E.T.; PARENTE, J.P. GC-MS Determination of Kava-Pyrone in *Alpinia zerumbet* Leaves. **Journal of High Resolution Chromatography**, v.22, n.22, p.129-130,1999.

LAHLOU, S.; GALINDO, C.A.B.; LEAL-CARDOSO, J.H.; FONTELES, M.C.; PINTO DUARTE, G. Cardiovascular effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* leaves and its main constituent, terpinen-4-ol, in normotensive rats: role of the autonomic nervous system. **Planta Medica**, v. 68, n. 12, p. 1097–1102, 2002.

- LAHLOU, S.; INTERAMINENSE, L.F.; LEAL-CARDOSO, J.H.; DUARTE, G.P. Antihypertensive effects of the essential oil of *Alpinia zerumbet* and its main constituent, terpinen-4-ol, in DOCA-salt hypertensive conscious rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 17, n.13, p. 323-330, 2003.
- LAHOGUE, V.; RÉHEL, K.; TAUPIN, L.; HARAS, D.; ALLAUME, P. A HPLC-UV method for the determination of angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 870-875, 2010
- LARANJA, S.M.; BERGAMASCHI, C.M.; SCHOR, N. Evaluation of acute administration of natural products with potential diuretic effects, in humans. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 86, p. 237-240, 1991.
- LI, Y.Y.; CHOU, G.X.; WANG, Z.T. New Diarylheptanoids and Kavalactone from *Alpinia katsumadai* Hayata. **Helvetica 382 Chimica Acta**, v. 93 ,p.382-388, 2010.
- MACARI, P.A.T; EMERENCIANO, V.P; FERREIRA, Z.M.G.S. Identificação de triterpenos de *Miconia albicans* Triana através de análise por microcomputador. **Química Nova**, v. 13, p. 260-262, 1990.
- Machado, L. D. Alpinia. **Revista Natureza**, v.101, n. 5, p. 39-42, 1996.
- MALEK, S.N.A.; PHANG, C.W.; IBRAHIM, H.; WAHAB, N.A.; SIM, K.S. Phytochemical and Cytotoxic Investigations of *Alpinia mutica* Rhizomes. **Molecules** v. 16, p. 583-589, 2011.
- MALEK, S.N.M.; LEE, G.S.; HONG, S.L.; YAACOB, H.;WAHAB, N.A; WEBER, J.F.F.; SHAH, S.A.A. Phytochemical and Cytotoxic Investigations of *Curcuma mangga* Rhizomes. **Molecules**, v. 16, n. 6, p. 4539-4548, 2011.
- MATOS, F.J.A.; VIANA, G.S.B.; BANDEIRA, M.A.M. **Guia fitoterápico**. Fortaleza. 2001.
- MORITA, H.; ITOKAWA, H.; New Diterpenes from *Alpinia galanga* WILD., **Chemistry Letters**, p. 1205-1208, 1986
- NGO, K.S.; BROWN, G. Stilbenes, Monoterpenes, Diarylheptanoids, Labdanes and chalcones from *Alpinia katsumadai*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 6, p. 1111-1123, 1998.

NUNTAWONG, N.; SUKSAMRAM, A. Chemical constituents of the rhizomes of *Alpinia malaccensis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.36, p. 661–664, 2008.

NYMAN, U.; JOSHI, P.; MADSEN, L.B.; PEDERSEN, T.B.; PINSTRUP, M.; RAJASEKHARAN, S.; GEORGE, V.; PUSHANGADANA, P. Ethnomedical information and *in vitro* screening for angiotensin-converting enzyme inhibition of plants utilized as traditional medicines in Gujarat, Rajasthan and Kerala (India). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, p. 247-263, 1998.

OWEN, R.W. SKEGGS, L.T.; KAHN, J.E.; SHUMWAY, N.P. The preparation and function of the angiotensin I-converting enzyme. **Journal of Experimental Medicine**, v. 103, p. 295–299, 1956.

PARROT, J.L.; KOHLI, J.; SHERRY, J.P.; HEWITT, L.M. In Vivo and In Vitro Mixed-Function Oxygenase Activity and Vitellogenin Induction in Fish and in Fish and Rat Liver Cells by Stilbenes Isolated from Scotch Pine. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 60, n. 1 p. 116–123, 2011.

PHAN, M.G.; OUTSUKA, H.; PHAN, T.S. A furanolabdane diterpene alcohol from *Alpinia tonkinensis* Gagnep. **Tap Chi Hoc**, v. 43, n.3, p. 375-378.

PRASAIN, J.K.; LI, J.X.; TEZUKA, Y.; TANAKA, K.; BASNET, P.; DONG, H.; NAMBA, T.; KADOTA, S. Calyxin H, Epicalyxin H, and Blepharocalyxins A and B, Novel Diarylheptanoids from the Seeds of *Alpinia blepharocalyx*. **Journal of Natural Products**, v.61, p. 212-216, 1998.

PRASAIN, J.K.; TEZUKA, Y.; HASE, K.; BASNET P.; DONG, H.; NAMBA, T.; KADOTA, S. Inhibitory effect of diarylheptanoids on nitric oxide production in activated murine macrophages. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.21, n. 4, p. 371-374, 1998.

PRASAIN, J.K.; TEZUKA, Y.; LI, J.X. TANAKA, K.; BASNET, P.; DONG, H.; NAMBA, T.; KADOTA, S. Novel Diarylheptanoids from the Seeds of *Alpinia blepharocalyx*: Revised Structure of Calyxin A. **Journal of Chemical Research**, v. 22, p. 265-279, 1998.

PRASAIN, J.K.; TEZUKA, Y.; LI, J.X.; TANAKA, K.; BASNET, P.; DONG, H.; NAMBA, T.; KADOKA, S.; Novel Diarylheptanoids Bearing Chalcone or Flavanone from the Seeds of *Alpinia blepharocalyx*. **Tetrahedron**, v. 53, n. 23, p. 7833-7842, 1997.

SHIMOMURA, H.; SASHIDA, Y.; MIMAKI, Y.; OOHARA, M.; FUKAI, Y. A chalcone derivative from the bark of *Lindera umbellata*. **Phytochemistry**, v. 27, n. 12, pp. 3937-3939, 1988.

SILVA, H. H. G.; SILVA, I. G.; SANTOS, R. M. G.; FILHO, E. R.; ELIAS, C. N. Larvicidal activity of tannins isolated of *Magonia pubescens* St. Hil. (*Sapindaceae*) against *Aedes aegypti* (*Diptera, Culicidae*), **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, p.396-399, 2004.

SILVESTEIN, R.M.; BASSLER, G.C.; MORRIL, T.C. Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 6ª Ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A, 2000.

SIRAT, H.M.; MA, D.; RAHMAN, A.A. The Distribution of Labdane Diterpenes in the Zingiberaceae of Malaysia. **Phymkmiifry**, v. 36, n. 3, p. 699-701, 1994.

SY, L.K.; BROWN, G.D. Labdane Diterpenoids from *Alpinia chinensis*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 904-908, 1997.

TAKAHASHI, K.; SHIBATA, S.; YANO, S.; HARADA, M.; SAITO, H., TAMURA, Y.; KUMAGAI, A. Labdane and Bisnorlabdane type Diterpenes from *Alpinia speciosa* K. Schum. **Chem. Pharm. Bull**, v. 28, n.11, p. 3452-3454, 1980.

TAWATA S, TAIRA S.; KOBAMOTO N.; ISHIHARA M.; TOYAMA, S. Syntheses and biological activities of dihydro-5,6-dehydrokawain derivatives. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 60, n.10, p. 1643-1645, 1996.

TREVISAN, M.T.S.; MACEDO, F.V.V.; VAN DE MEENT, M.; RHEE, I.K.; VERPOORTE, R. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 301-304; 2003.

UPADHYAY, A.; CHOMPOO, J.; KISHIMOTO, W.; MAKISE, T.; TAWAKA, S. HIV-1 Integrase and Neuraminidase Inhibitors from *Alpinia zerumbet*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n.7, p. 2857–2862, 2011.

WEN, Y.; CHEN, Y.; XIE, X. A New diterpenoid from *Alpinia zerumbet*. **Xihu Xuebao**, v.39, n. 10, p. 983-984, 1997.

XIAO, X.; SI, X.; TONG, X.; LI, G. Preparation of flavonoids and diarylheptanoid from *Alpinia katsumadai* Hayata by microwave-assisted extraction and high-speed counter-current chromatography. **Separation and Purification Technology**, v. 81, p.265–269, 2011.

XU, H.X.; HUI, D.; SIM, K.Y. The isolation of a new labdane diterpene from the seeds of *Alpinia zerumbet*. **Natural Product Letters**, v. 7, n. 1, p.29-34, 1995.

XU, H.X.; HUI, D.; SIMS, K.Y. Labdane Diterpenes from *Alpinia Zerumbet*. **Phytochemistry**, v. 42, n. 1, p. 149-151, 1996.

YANG, C.S.; WANG, X.B.; WANG, J.S.; LUO, J.G.; LUO, J.; KONG, L.Y. A [2 + 2] Cycloaddition dimer and a diels-alder adduct from *Alpinia Katsumadai*. **Organic Letters**, v. 13, n. 13, p. 3380-3383, 2011.

ZHANG, J.; KONG, L.Y. Chemical Constituents From *Alpinia Tonkinensis*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 6, n. 3, p. 199-204, 2004.