

POTENCIAL DO ÓLEO ESSENCIAL DE ALPINIA ZERUMBET (PERS.) B.L. BURTT & R. M. SM. (COLONIA) CONTRA A DOENÇA DE ALZHEIMER, POR MEIO DE ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTICOLINESTERASE IN VITRO E IN SILICO



<https://doi.org/10.56238/arev7n1-153>

Data de submissão: 20/12/2024

Data de publicação: 20/01/2025

Selene M. de Moraes

Universidade Estadual do Ceará, Av. Dr. Silas Munguba 1700, Itaperi, Fortaleza Ceará, Brasil
Autor correspondente
E-mail: selenemaiademorais@gmail.com

Felipe W. V. Paulino

Universidade Estadual do Ceará, Av. Dr. Silas Munguba 1700, Itaperi, Fortaleza Ceará, Brasil

Daniel P. de Oliveira

Universidade Estadual do Ceará, Av. Dr. Silas Munguba 1700, Itaperi, Fortaleza Ceará, Brasil

Rita de C. A. Pereira

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Campus Pici, Rua Pernambuco, nº 1674, Planalto do Pici, Fortaleza, Ceará, Brasil

Wildson Max B. da Silva

Universidade Estadual do Ceará, Av. Dr. Silas Munguba 1700, Itaperi, Fortaleza Ceará, Brasil

Daniela R. Alves

Universidade Estadual do Ceará, Av. Dr. Silas Munguba 1700, Itaperi, Fortaleza Ceará, Brasil

Jacilene Silva

Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Universidade Regional do Cariri, Rua Cel. Antônio Luiz, 1161, Pimenta, Crato, Ceará, Brasil

Emmanuel S. Marinho

Universidade Estadual do Ceará, Av. Dr. Silas Munguba 1700, Itaperi, Fortaleza Ceará, Brasil

RESUMO

A planta *Alpinia zerumbet*, comumente conhecida como "Colônia", é amplamente utilizada na medicina tradicional para tratar a ansiedade e a hipertensão, ambas associadas a danos oxidativos no cérebro. Este estudo teve como objetivo explorar as propriedades antioxidantes e anticolinesterásicas do óleo essencial extraído de suas folhas. Além disso, foi realizada uma investigação *in silico* em vários constituintes do óleo essencial relativos à enzima acetilcolinesterase. A análise GC/MS identificou dezenove compostos voláteis, principalmente monoterpenóides (98,41%), particularmente terpinen-4-ol, eucaliptol, γ -terpineno e sabineno, destacando-se como os componentes majoritários. As atividades anticolinesterásicas e sequestradoras de radicais exibidas pelo óleo essencial de *A. zerumbet* mostraram-se dignas de nota quando comparadas às drogas padrão. Na análise de docking molecular, os compostos α -terpineno, β -pineno, eucaliptol e terpinoleno se ligaram à mesma região que o local de ligação padrão da galantamina, sugerindo sua ação semelhante. Por outro lado, o ocimeno se liga a

uma região distinta do local de ligação da galantamina, sugerindo um potencial efeito sinérgico com o inibidor cocristalizado na AChE. Portanto, o óleo essencial de *A. zerumbet*, dadas suas propriedades farmacológicas estabelecidas no sistema nervoso central (SNC) e a presença de substâncias antioxidantes e inibidores da acetilcolinesterase, surge como um candidato promissor para investigações farmacológicas mais direcionadas relacionadas à doença de Alzheimer.

Palavras-chave: Hipótese Colinérgica. Radicais livres. Acoplamento Molecular.

1 INTRODUÇÃO

A planta *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt. et Smith pertence à família Zingiberaceae e é originária da Ásia, mas ganhou destaque em várias partes da América do Sul como planta ornamental. No Nordeste do Brasil, é popularmente conhecida como "Colônia" e é frequentemente usada na medicina tradicional para tratar condições como hipertensão e ansiedade (Da Cunha et al., 2013). Estudos mostram que as propriedades anti-hipertensivas e ansiolíticas da planta podem ser atribuídas em parte à presença de flavonóides, como (+)-catequina, (-)-epicatequina e alpinetina (Costa et al. 1998).

Os flavonóides identificados no extrato aquoso de *A. zerumbet* como rutina, kaempferol-3-O-rutinosídeo, kaempferol-3-O-glucuronídeo, catequina e epicatequina são substâncias bem conhecidas que contribuem para a atividade hipotensora, diurética e antiulcerogênica da planta e os compostos diidro-5,6-desidrocavaína e 5,6-desidrocavaína atuam como agentes antiulcerogênicos e antitrombóticos (Mpalantinos et al. 1998).

Os estudos de Zoghbi et al. (1999) identificaram os principais componentes do óleo essencial das folhas e flores de *A. zerumbet*, dentre os quais o terpinen-4-ol, presente tanto nas folhas quanto nas flores, tem ação anti-hipertensiva. Além do terpinen-4-ol, que responde por 22,7% dos compostos, as folhas também contêm limoneno (25,1%) e γ -terpineno (17,4%), enquanto as flores contêm 1,8-cineol (23,1%) e sabineno (14,5%).

Terpinen-4-ol é o principal constituinte do *óleo essencial de A. zerumbet*. As atividades psicofarmacológicas e eletrofisiológicas deste composto foram investigadas em camundongos Swiss machos e ratos Wistar. O composto foi administrado por via intraperitoneal e intracerebroventricular. *Para experimentos in vitro*, o terpinen-4-ol inibiu as convulsões induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ), indicando efeitos anticonvulsivantes. Os registros eletroencefalográficos mostraram que o terpinen-4-ol protegeu contra convulsões induzidas por PTZ, corroborando os resultados comportamentais. O terpinen-4-ol exerce efeitos anticonvulsivantes por meio da regulação da neurotransmissão GABAérgica (Nóbrega et al. 2014).

A ansiedade é mais comum em pacientes com hipertensão, e essas duas condições frequentemente coexistem. Mais ênfase tem sido dada à determinação da etiologia em pacientes com hipertensão e ansiedade comórbidas. O aumento da interleucina IL-6, IL-17 e ROS acelera o desenvolvimento de hipertensão e ansiedade (Qiu et al, 2023).

A acetilcolina tem um papel crucial nos sistemas nervoso periférico e central. Os neurônios colinérgicos localizados no prosencéfalo basal, incluindo os neurônios que formam o núcleo basal de Meynert, são severamente perdidos na doença de Alzheimer (DA). A perda sináptica é o principal correlato da progressão da doença e a perda de neurônios colinérgicos contribui para déficits de

memória e atenção. Assim, drogas que atuam no sistema colinérgico representam uma opção promissora para tratar pacientes com DA (Ferreira-Vieira et al. 2016).

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa causada pela formação de placas beta-amilóide (A β) e emaranhados neurofibrilares. A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima crucial na hidrólise de um dos neurotransmissores mais amplamente conhecidos, a acetilcolina (ACh), que tem sido associada à fisiopatologia da DA. Então, a inibição enzimática da atividade da AChE tem sido uma estratégia de tratamento interessante para a DA. Vários produtos naturais têm sido investigados em todo o mundo com o objetivo de descobrir novos agentes anticolinesterásicos que possam ser usados como opção terapêutica para o tratamento da DA (Taqui et al. 2022)

Os inibidores da acetilcolinesterase (AChE) são uma importante estratégia terapêutica na doença de Alzheimer, e esforços estão sendo feitos na busca de novas moléculas com atividade anti-AChE. A maioria dos medicamentos atualmente disponíveis para o tratamento da DA são inibidores da AChE: tacrina, donepezil, rivastigmina e galantamina, todos com eficácia limitada e apresentando algum tipo de efeito colateral. Os dois últimos compostos são obtidos de plantas, que são fontes potenciais de novos inibidores da AChE. Esses inibidores, de acordo com a hipótese colinérgica, aumentam os níveis do neurotransmissor acetilcolina no cérebro, melhorando assim as funções colinérgicas em pacientes com doença de Alzheimer e aliviando os sintomas desse distúrbio neurológico (Murray et al. 2013).

Esta planta mostra potencial em problemas cardiovasculares e de saúde mental e, portanto, é de interesse no contexto da doença de Alzheimer (DA). Essa condição neurodegenerativa afeta principalmente a população idosa, destacando a importância dos inibidores da AChE como alvo terapêutico. No caso de *A. zerumbet*, o estudo busca explorar suas atividades antioxidantes e anticolinesterases, posicionando-a como uma possível fonte de princípios bioativos no tratamento da DA (Volpe et al. 2018).

Os radicais livres, caracterizados por sua alta reatividade, têm o potencial de influenciar uma variedade de processos celulares, tanto fisiológicos quanto fisiopatológicos nos organismos. Altas concentrações desses radicais livres podem desencadear várias doenças neurodegenerativas, incluindo Alzheimer e Parkinson (Bugger et al. 2020; Zhu et al. 2023).

Assim, *a Alpinia zerumbet* surge não apenas como uma planta ornamental, mas também como um recurso valioso, proporcionando uma sinergia entre seus constituintes flavonoides bioativos, propriedades farmacológicas e potenciais benefícios à saúde, especialmente na abordagem da doença de Alzheimer, na qual a composição química e suas atividades antioxidante e anticolinesterase serão avaliadas *in vitro* e *in silico*.

2 EXPERIMENTAL

2.1 COLETA E PROCESSAMENTO DE MATERIAL

A planta foi coletada no jardim da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Agroindústria Tropical), localizado no Bairro do Pici, na cidade de Fortaleza, no estado do Ceará, em abril de 2022 com as coordenadas lat: -3.7527757, log: -38.5756348. A exsicata da planta foi depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará (UFC) sob o código (EAC 65331). O óleo essencial foi extraído utilizando cerca de 600 g de folhas frescas, utilizando-se a técnica de hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger.

2.2 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (GC/MS)

A análise do óleo foi realizada no equipamento Shimadzu QP-2010, nas seguintes condições: coluna cromatográfica Rxt-5MS (Crossbond 5%, difenil/95% dimetilpolissiloxano), capilar (30m x 0,25mm x 0,25 µm) revestida com sílica fundida; Hélio como gás de arraste (24,2 mL/min), a uma velocidade linear constante; temperatura do injetor a 250°C (modo split 1:100); temperatura do detector a 250°C. Além disso, a rampa de aquecimento foi programada, inicialmente de 35°C a 180°C, com aumento de 4°C/min até 180°C e depois de 17°C/min até 280°C, permanecendo nessa temperatura pelos 10 minutos finais. Assim, foi gerado o cromatograma, que relaciona o tempo de retenção aos picos da amostra. O espectro de massa foi obtido por impacto de elétrons com uma energia de feixe de 70 eV. Desta forma, espectros de massa foram gerados, e o equipamento sugere alguns compostos através de uma comparação com uma biblioteca NIST existente. Para identificar efetivamente os componentes do petróleo, os espectros de massa e os índices de retenção (KI) foram comparados com os da literatura - de acordo com as bases de dados NIST e Adams (2017). O cálculo do Índice de Kovat experimental foi realizado por regressão linear com interpolação dos compostos principais KI e seus respectivos tempos de retenção do cromatograma.

2.3 AVALIAÇÃO IN VITRO DA INIBIÇÃO DA ACETILCOLINESTERASE

A atividade da anticolinesterase (AChE) foi medida em placas de fundo plano de 96 poços usando o leitor Elisa BIOTEK, modelo ELX 800, software "Gen5 V2.04.11" (ELLMAN et al., 1961). Nas placas de 96 poços, foram utilizadas as seguintes soluções por poço: 25 µL de iodeto de acetiltiocolina (15 mM), 125 µL de 5,5'-ditiobis-[ácido 2-nitrobenzóico] em solução de Tris/HCL (50 nM, pH=8, com NaCl 0,1 M e MgCL2.6H2O 0,02 M (3 mM, DTNB ou reagente de Ellman)), 50 µL de solução de Tris/HCL (50 nM, pH=8, com albumina de soro bovino (BSA) a 0,1%), 25 µL da amostra de óleo dissolvido em metanol e diluído 10 vezes em solução de Tris/HCL (50 mM, pH=8)

para obter uma concentração final de $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$ (Rhee et al., 2001) (Trevisan et al., 2003). As diluições das amostras e padrões positivos utilizados nas avaliações quantitativas na microplaca partiram de uma solução estoque com concentração de 2 mg mL^{-1} , e foram: 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 e $0,78 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. Valores relacionados às colorações naturais do óleo foram excluídos da análise.

2.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH

O potencial antioxidante foi medido em placas de fundo plano de 96 poços usando um leitor Elisa BioTek, modelo ELX 800, software "Gen5 V2.04.11" (Becker et al. 2019) com algumas modificações. Nas placas de 96 poços, foram utilizadas as seguintes soluções por poço: $180 \text{ } \mu\text{L}$ de solução metanólica de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), $20 \text{ } \mu\text{L}$ da amostra de óleo essencial dissolvido em metanol e diluído 10 vezes para obter um resultado final de concentração de $0,2 \text{ mg mL}^{-1}$. As concentrações de óleo foram produzidas usando a solução de concentração inicial de 2 mg mL^{-1} , 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56 e $0,78 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$. As absorvâncias foram lidas a 490 nm por um total de 60 minutos de incubação. O padrão utilizado para comparação foi o BHT. Todas as amostras foram analisadas em triplicata.

2.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS+

A solução ABTS+• (7 mM , 5 ml) foi misturada com $88 \text{ } \mu\text{L}$ de persulfato de potássio (140 mM). A mistura foi agitada e armazenada no escuro em temperatura ambiente por 16 horas. Posteriormente, 1 mL dessa solução foi adicionado a 99 mL de etanol. A absorvância é lida a 734 nm . Várias soluções de concentrações decrescentes de óleo essencial de *A. zerumbet* foram preparadas, e $3,0 \text{ ml}$ de solução ABTS+• foram adicionados a $30 \text{ } \mu\text{L}$ dessas soluções após 6 minutos; as leituras foram feitas a 734 nm (Re et al. 1999). A IC₅₀ (concentração inibitória semi-máxima) foi calculada por regressão linear.

2.6 ACOPLAMENTO MOLECULAR

2.6.1 Preparação de ligante e receptor para simulações de docking

A estrutura química dos compostos α -terpineno, α -tujeno, β -pineno, limoneno, 1,8-cineol, γ -terpineno, o-cimeno, sabineno, terpinoleno e terpineno-4-ol foi desenhada usando o código MarvinSketch. Os conformadores de menor energia foram salvos e posteriormente otimizados utilizando o código Avogadro (Hanwell et al. 2012), configurado para utilizar o algoritmo de descida mais íngreme com 50 ciclos de iterações, aplicando o campo de força MMFF94 (Merck Molecular Force Field) (HALGREN, 1996) (Silva et al. 2020).

O mecanismo de ação dos compostos contra a acetilcolinesterase (AChE) foi avaliado *in silico* por meio de simulações de docking molecular, onde a estrutura alvo foi obtida a partir do Protein Data Bank (<https://www.rcsb.org/>), PDB ID: 4EY6 (CHEUNG et al., 2012). Na etapa de preparação do alvo, os resíduos foram removidos, hidrogênios polares foram adicionados e as cargas de Gasteiger foram calculadas (Yan et al. 2014) usando o código Autodocktools™ (Huey et al. 2012).

2.6.2 Simulações de acoplamento molecular e saída de dados

Cinquenta simulações de docking molecular foram realizadas contra AChE com parâmetros de grade centralizados para abranger toda a estrutura enzimática usando os seguintes eixos: -0,412 (x), -51,388 (y) e 4,1 (z), com parâmetros de tamanho de 84Å (x), 92Å (y) e 126Å (z) usando o código AutoDockVina (Trott; Olson 2010), Algoritmo Genético Lamarkiano (LGA) e uma exaustividade de 64 (Marinho et al., 2020). O parâmetro estatístico RMSD (Root Mean Square Deviation) com valores de até 2,0 Å (Yusuf et al. 2008) e uma energia de afinidade de contorno de -6,0 kcal/mol (Shityakov; Förster, 2014) foram usados para selecionar a melhor pose para cada ligante contra AChE.

2.7 VALIDAÇÃO DO MÉTODO

O inibidor Galantamina (GNT), co-cristalizado no alvo AChE (Cheung et al. 2012), foi submetido à técnica de redocking para validar as simulações de docking molecular realizadas. O complexo gerado foi comparado ao complexo nativo por meio da superposição de estrutura para confirmar a confiabilidade do docking molecular e o software usado como ferramenta para simular com precisão as interações receptor-ligante (Antopoulou et al. 2022).

2.8 VISUALIZAÇÃO DE MODOS DE LIGAÇÃO E INTERAÇÕES AChE-LIGANTE

Os modos de ligação e as interações AChE-ligante foram visualizados usando UCSF Chimera™ (Pettersen et al. 2004). Os complexos foram salvos no formato PDB usando PyMOL (Delano 2004). As interações moleculares relatadas e as ligações de hidrogênio foram calculadas usando o visualizador Discovery Studio Visualizer™ (Biovia 2016).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição do óleo essencial foliar de *A. zerumbet* do Rio de Janeiro apresentou variações no teor e composição entre abril e agosto de 2005. Em abril, os principais constituintes identificados no óleo de *A. zerumbet* foram terpinen-7-al (40,5%) e hidrato de sabineno (15,4%); em agosto, os principais componentes identificados foram terpinen-4-ol (29,4%) e 1,8-cineol (23,1%) (Victório et al.

2010). A presença de terpinen-7-al não foi encontrada em plantas do Estado do Ceará (Nordeste do Brasil) e diferenças nas concentrações de compostos principais e compostos menores são comuns em plantas cultivadas em diferentes condições ambientais.

3.1 CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (GC/MS) DO ÓLEO ESSENCIAL DE *A. ZERUMBET*

A análise revelou a presença de 19 compostos voláteis (Tabela 1), destacando-se a predominância de monoterpenos (98,41%) na composição do *óleo essencial* de *A. zerumbet*.

Os principais constituintes apresentados na Tabela 1 são terpinen-4-ol (23,92%), 1,8-cineol (19,01%), γ -terpineno (16,63%) e sabineno (10,14%). Uma composição semelhante foi mostrada para o óleo essencial de *A. zerumbet* em outro estudo do Estado do Ceará, onde foram feitas 6 coletas durante o dia e composição semelhante foi observada, apenas alterando o rendimento entre os constituintes e o sabineno foi o constituinte majoritário (25,4% a 21,48%) (Canuto et al. 2015).

Esses resultados contribuem para um melhor entendimento da composição química da planta, abrindo possibilidades para investigações adicionais sobre as propriedades terapêuticas e potenciais aplicações do óleo essencial de *A. zerumbet*, especialmente considerando a diversidade e sinergismo dos compostos presentes.

Tabela 1. Composição percentual relativa do óleo essencial das folhas de *Alpinia zerumbet* por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (GC/MS).

Constituinte	IK lit	Cálculo de cinemática inversa	Rendimento (%)
α -Thujene	911	919	4.06
α -Pineno	932	925	1.59
Sabinene	961	964	10.14
β -Pineno	976	967	2.68
β -mirceno	981	983	1.26
α -Terpineno	1017	1008	5.67
o-Cymene	1022	1017	4.26
D-Limoneno	1029	1021	2.21
Eucaliptol	1030	1023	19.01
γ -Terpineno	1060	1053	16.63
Terpinoleno	1078	1084	2.55
hidrato de cis-sabineno	1096	1095	0.59
β -Linalol	1100	1098	0.98
hidrato de trans-Sabineno	1101	1120	0.88
(E)-p-Menth-2-en-1-ol	1124	1139	0.58
(-)-Terpinen-4-ol	1177	1180	23.92
α -Terpineol	1188	1194	1.39
β -cariofileno	1421	1423	0.99
Óxido de cariofileno	1583	1572	0.60

Os índices de Kovats (KI) foram estimados por regressão linear dos tempos de retenção dos principais compostos nos cromatogramas e seus respectivos índices de Kovats da literatura (Adams 2017).

3.2 AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

O estresse oxidativo em relação à doença de Alzheimer tem sido objeto de extensa pesquisa. Embora a causa exata da doença de Alzheimer não seja totalmente compreendida, há evidências crescentes sugerindo que o estresse oxidativo desempenha um papel significativo em seu desenvolvimento e progressão (Bakari et al. 2015).

Essas interações entre o estresse oxidativo e a doença de Alzheimer sugerem que estratégias destinadas a reduzir o estresse oxidativo podem desempenhar um papel na prevenção ou tratamento da doença. Estudos têm explorado o potencial dos antioxidantes, tanto por meio da dieta quanto de medicamentos, como possíveis abordagens terapêuticas. Quando a produção de espécies reativas de oxigênio prevalece sobre os sistemas de defesa cerebral, a constituição rica em lipídios do cérebro pode favorecer a peroxidação lipídica em conjunto com defesas antioxidantes defeituosas, constituindo uma reação em cadeia de radicais livres que pode alterar as atividades cerebrais gerais (Bouayed et al. 2009). No entanto, é importante notar que a compreensão da doença de Alzheimer é complexa, envolvendo fatores genéticos, ambientais e outros, e ainda há muito a ser descoberto sobre as causas e tratamentos eficazes (Briyal et al. 2023).

Ngameni et al. (2013) propuseram que os óleos essenciais com $IC_{50} < 50 \mu\text{g mL}^{-1}$ na avaliação da atividade de sequestro de radicais livres demonstram alta atividade, aqueles com $IC_{50} < 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ exibem atividade moderada e aqueles com $IC_{50} > 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentam baixa atividade antioxidante. O óleo essencial de *A. zerumbet* apresentou atividade relevante na eliminação de radicais livres, levando à diminuição ou mesmo à inibição desses processos oxidativos (Alves et al. 2010).

Estudos científicos têm se concentrado na atividade antioxidante do eucaliptol, destacando suas propriedades benéficas em diferentes contextos, incluindo a capacidade de neutralizar espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteger contra o estresse oxidativo (Yin et al. 2020).

Estudos de Picollo et al. (2008) destacaram a alta atividade de inibição da enzima AChE (acetilcolinesterase) pelo eucaliptol em experimentos *in vivo* conduzidos em cérebros de piolhos. O óleo essencial de *Eucalyptus globulus*, composto principalmente por eucaliptol (49,07–83,59%) e α -pineno (1,27–26,35%), apresenta propriedades anticolinesterase e anti-inflamatórias, melhora a memória e alivia os sintomas da doença de Alzheimer (Soares et al. 2022).

A influência da terpine-4-ol na regulação de genes e vias de sinalização celular relacionadas à resposta antioxidante e inflamatória destaca seu papel como modulador multifacetado. Sua capacidade de interferir nos processos de oxidação e, ao mesmo tempo, inibir vias inflamatórias sugere que a terpine-4-ol pode desempenhar um papel importante na manutenção do equilíbrio redox e na redução

da inflamação associada ao estresse oxidativo (Mendes et al. 2022). Além disso, a terpinina-4-ol demonstra a capacidade de ativar enzimas antioxidantes endógenas, como superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Essa modulação positiva das enzimas antioxidantes reforça a defesa celular contra o estresse oxidativo, aumentando a capacidade do organismo de enfrentar e neutralizar espécies reativas (Rocha 2012).

Estudos do óleo essencial de *Croton nepetaefolius* e constituintes como agentes anticolinesterásicos revelaram, com base em simulações de docking molecular, que várias moléculas analisadas possuem alto potencial de interação com o alvo da AChE, destacando-se os sesquiterpenos germacreno B, seguidos pelo β -cariofileno com ação próxima à fisostigmina; no entanto, sua ação está em um local diferente da estrutura da AChE, sendo provavelmente inibidores não competitivos (Passos et al. 2023).

Então, produtos naturais que apresentam atividades antioxidantes e anticolinesterásicas são alvos interessantes para uso no tratamento da DA. O óleo essencial de *A. zerumbet* apresenta ambas as atividades (Tabela 2), sendo uma fonte útil de moléculas com potencial para o tratamento da DA.

Tabela 2. Atividade antioxidante (DPPH e ABTS) e atividade anticolinesterásica do óleo essencial de *Alpinia zerumbet* (OEAz).

Amostra	CI50 DPPH ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CI50 ABTS ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CI50 AChE ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
OEAz	15,84 \pm 0,08	11,27 \pm 0,01	15,28 \pm 0,01
Quercetina (padrão)	1,63 \pm 0,03	1,83 \pm 0,02	-
BHT (padrão)	4,75 \pm 0,05	4,31 \pm 0,02	-
Fisostigmina (Padrão)	-	-	1,15 \pm 0,05

O óleo essencial da folha de *A. zerumbet* apresenta principalmente monoterpenos, que são ótimos candidatos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de diversos processos patológicos, ligados ao SNC, incluindo condições dolorosas. Como outro exemplo, o gama-terpineno (γ -TPN) é um monoterpeno presente em espécies vegetais que possuem múltiplas propriedades farmacológicas e tem semelhança estrutural com os monoterpenos antinociceptivos, como o limoneno e o alfa-felandreno. γ -TPN produziu efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção química por meio do envolvimento dos sistemas colinérgico e opioide (Passos et al. 2015). Então, drogas que atuam no sistema colinérgico representam uma opção promissora para tratar pacientes com DA (Ferreira-Vieira et al. 2016).

3.3 AVALIAÇÃO IN SILICO

A presença marcante de terpinina-4-ol, eucaliptol, γ -terpineno e sabineno está de acordo com dados da literatura para amostras do Estado do Ceará, revelou a consistência desses compostos como

os principais constituintes do *óleo essencial* de *A. zerumbet* (Canuto et al. 2015). É importante ressaltar que mesmo compostos presentes em quantidades reduzidas na planta, eles podem realizar atividades biológicas, dependendo de seu potencial de ação e possíveis sinergias com outros componentes presentes no óleo. Em seguida, na avaliação do potencial do óleo essencial de *A. zerumbet* para AD, os constituintes principais e outros em menor concentração completando 10 compostos, foram examinados *in silico* contra a estrutura tridimensional da AChE.

Os complexos receptor-ligante formados apresentaram valores de RMSD variando de 0,088 a 1,410 Å e energia de afinidade variando de -5,8 a -6,8 kcal/mol (Tabela 3). O redocking do inibidor GNT co-cristalizado em AChE apresentou um RMSD de 1,932 Å e energia de afinidade na ordem de -7,9 kcal/mol. Analisando os padrões de interação com AChE, foi possível identificar que os complexos formados exibiram predominantemente interações hidrofóbicas, bem como duas ligações H doadoras de Pi e duas interações empilhadas de Pi-Pi (Tabela 3).

Tabela 3. Tipos de interações e distâncias (Å) entre os ligantes e os resíduos de aminoácidos da AChE

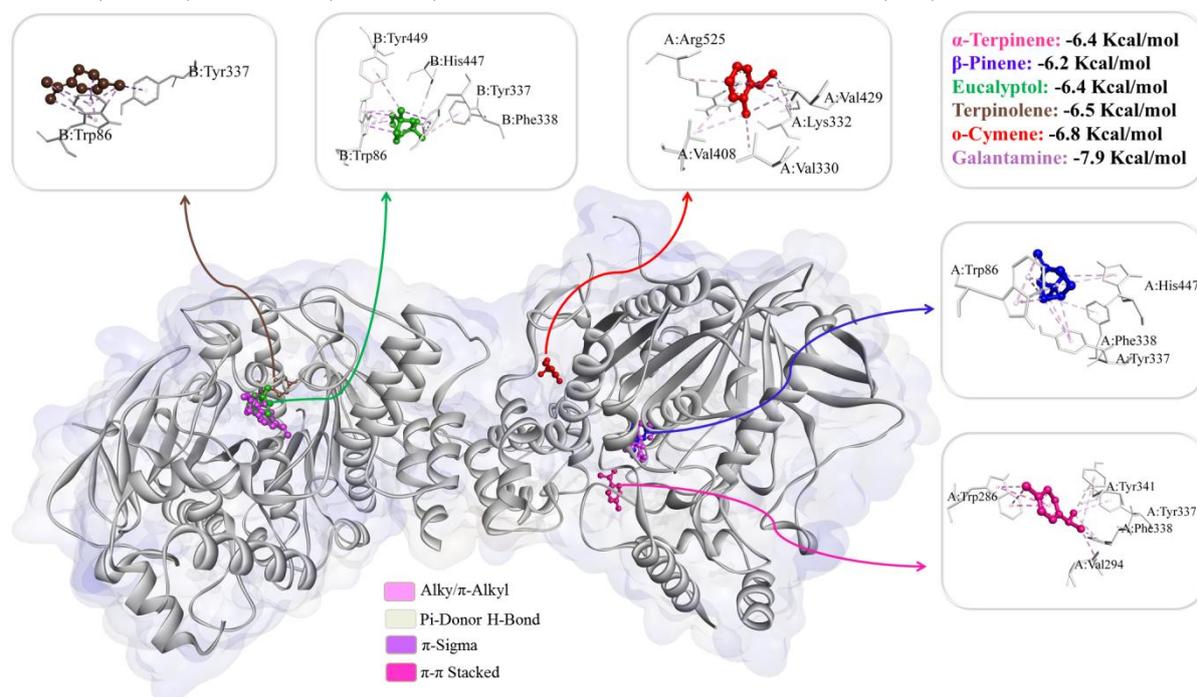
Ligands	Afinidade (kcal/mol)	RMSD (Å)	Resíduo	Interação	Distância (Å)
α -Terpineno	-6.4	1.410	Trp 286A	Hidrofóbico	3.81
			Trp 286A	Hidrofóbico	4.02
			Val 294A	Hidrofóbico	4.16
			Tyr 337A	Hidrofóbico	5.48
			Phe 338A	Hidrofóbico	4.87
			Phe 338A	Hidrofóbico	4.92
			Tyr 341A	Hidrofóbico	4.27
			Tyr 341A	Hidrofóbico	5.39
			Trp 286A	Pi-Pi empilhado	4.05
			Trp 286A	Pi-Pi empilhado	5.39
α -Thujene	-6.2	0.992	Val 330A	Hidrofóbico	4.47
			Lys 332A	Hidrofóbico	5.08
			Val 408A	Hidrofóbico	4.23
			Val 429A	Hidrofóbico	4.24
			Val 429A	Hidrofóbico	4.51
			Val 429A	Hidrofóbico	4.56
			Val 429A	Hidrofóbico	4.57
			Tyr 510A	Hidrofóbico	4.43
			Leu 524A	Hidrofóbico	4.76
			Leu 524A	Hidrofóbico	5.29
β -Pinene	-6.2	1.121	Arg 525A	Hidrofóbico	4.45
			Arg 525A	Hidrofóbico	4.46
			TRP 86A	Hidrofóbico	3.55
			TRP 86A	Hidrofóbico	4.18
			TRP 86A	Hidrofóbico	4.25
			TRP 86A	Hidrofóbico	4.51
			TRP 86A	Hidrofóbico	4.63
			TRP 86A	Hidrofóbico	5.07
			Tyr 337A	Hidrofóbico	4.58
			Tyr 337A	Hidrofóbico	4.79
Tyr 337A	Hidrofóbico	5.18			

			Phe 338A	Hidrofóbico	5.47
			Seu 447A	Hidrofóbico	4.74
			Seu 447A	Hidrofóbico	5.31
D-Limoneno	-6.5	0.150	Val 330A	Hidrofóbico	4.33
			Val 408A	Hidrofóbico	4.20
			Val 429A	Hidrofóbico	3.83
			Arg 525A	Hidrofóbico	3.85
			Arg 525A	Hidrofóbico	4.85
			Arg 525A	Hidrofóbico	4.85
Eucaliptol	-6.4	1.195	Trp 86B	Hidrofóbico	3.50
			Trp 86B	Hidrofóbico	3.55
			Trp 86B	Hidrofóbico	4.03
			Trp 86B	Hidrofóbico	4.25
			Trp 86B	Hidrofóbico	4.40
			Trp 86B	Hidrofóbico	4.81
			Tyr 337B	Hidrofóbico	3.84
			Tyr 337B	Hidrofóbico	4.94
			Tyr 337B	Hidrofóbico	5.14
			Phe 338B	Hidrofóbico	5.22
			Seu 447B	Hidrofóbico	4.70
			Tyr 449B	Hidrofóbico	5.45
γ -Terpineno	-6.3	0.088	Val 330A	Hidrofóbico	4.44
			Lys 332A	Hidrofóbico	4.55
			Val 408A	Hidrofóbico	3.95
			Val 429A	Hidrofóbico	3.89
			Val 429A	Hidrofóbico	3.96
			Val 429A	Hidrofóbico	4.71
			Leu 524A	Hidrofóbico	4.11
			Arg 525A	Hidrofóbico	4.21
			Arg 525A	Hidrofóbico	4.96
			Arg 525A	Pi-Doador H-Bond	2.74
o-Cymene	-6.8	1.088	Val 330A	Hidrofóbico	4.57
			Lys 332A	Hidrofóbico	4.63
			Lys 332A	Hidrofóbico	4.94
			Val 408A	Hidrofóbico	4.77
			Val 408A	Hidrofóbico	5.42
			Val 429A	Hidrofóbico	3.58
			Val 429A	Hidrofóbico	4.14
			Val 429A	Hidrofóbico	4.54
			Arg 525A	Hidrofóbico	4.47
			Arg 525A	Pi-Doador H-Bond	2.99
Sabinene	-5.8	1.403	Val 330A	Hidrofóbico	4.72
			Lys 332A	Hidrofóbico	5.07
			Val 429A	Hidrofóbico	3.93
			Val 429A	Hidrofóbico	4.18
			Val 429A	Hidrofóbico	4.24
			Tyr 510A	Hidrofóbico	5.41
			Arg 525A	Hidrofóbico	4.53
			Arg 525A	Hidrofóbico	4.59
Terpinen-4-ol	-6.5	1.175	Val 330A	Hidrofóbico	4.65
			Val 408A	Hidrofóbico	4.21
			Val 429A	Hidrofóbico	4.11
			Val 429A	Hidrofóbico	4.53
			Leu 524A	Hidrofóbico	4.34
			Arg 525A	Hidrofóbico	4.18
			Arg 525A	Hidrofóbico	4.53
Terpinoleno	-6.5	1.137	Trp 86B	Hidrofóbico	3.46

			Trp 86B	Hidrofóbico	3.88
			Trp 86B	Hidrofóbico	4.56
			Trp 86B	Hidrofóbico	4.82
			Trp 86B	Hidrofóbico	5.21
			Tyr 337B	Hidrofóbico	3.85

O sítio de ligação do inibidor de galantamina cocrystalizado nas cadeias A e B do receptor AChE é formado pelos resíduos Trp 86, Gly 120, Gly 121, Gly 122, Glu 202, Ser 203, Phe 295, Phe 297, Tyr 337 e His 447 (CHEUNG et al., 2012). Observou-se que o α -terpineno, o β -pineno, o 1,8-cineol e o terpinoleno se ligaram à mesma região do sítio de ligação da galantamina, compartilhando interações com os resíduos Tyr 337A (α -terpineno); Trp 86A, Tyr 337A, His 447A (β -pineno); Trp 86B, Tyr 337B, His 447B (eucaliptol); e Trp 86B, Tyr 337B (terpinoleno), indicando que esses compostos têm ação semelhante à galantamina (Fig. 1). O composto o-cimeno liga-se a uma região diferente do local de ligação da galantamina, indicando um possível efeito sinérgico com o inibidor cocrystalizado na AChE.

Fig. 1. Complexo de interação entre acetilcolinesterase (branco), α -Terpineno (rosa), β -Pineno (azul), Eucaliptol (verde), Terpinoleno (marrom), o-Cimeno (vermelho) e o inibidor cocrystalizado Galantamina (lilás).



4 CONCLUSÕES

Por meio de estudos de docking molecular, é possível inferir que os compostos α -terpineno, β -pineno, eucaliptol e terpinoleno são promissores no planejamento e desenvolvimento de novos

fármacos anti-Alzheimer, pois apresentaram interações significativas com a AchE, enquadrando-se na mesma região do sítio de ligação da galantamina, indicando ação semelhante.

Os dados também mostram que *o o-cimeno apresentou uma energia de afinidade mais favorável em relação à AChE (-6,8 kcal/mol) e se encaixou em uma região diferente do sítio de ligação da galantamina, indicando um possível efeito sinérgico com os demais constituintes do óleo essencial na inibição da AChE.*

Em seguida, este estudo demonstrou que *o óleo essencial de Alpinia zerumbet* apresentou resultados satisfatórios para a presença de substâncias antioxidantes, e para a inibição da enzima acetilcolinesterase, indicando assim a necessidade de realização de outros estudos a fim de confirmar seus efeitos farmacológicos promissores contra a Doença de Alzheimer.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem às Agências Brasileiras: Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP). Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Ensino Superior (CAPES) para bolsas de estudo e apoios financeiros a estudantes.

CONTRIBUIÇÃO DOS AUTORES

Todos os autores contribuíram para este trabalho de forma adequada.

DECLARAÇÕES

Conflito de interesse: Os autores declaram não ter conflito de interesse.

Aprovação ética não aplicável. Os conjuntos de dados e o trabalho não contêm informações pessoais ou sensíveis; nenhuma questão ética está em causa.

Não há estudo humano neste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ARMAREGO, W. L. F.; PERRIN, D. D. Purification of laboratory chemicals. 4. ed. Oxford: Butterworth-Heinemann, 1996.
- MORETTI, E. et al. Stepwise dansyl grafting on the kaolinite interlayer surface. *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 375, p. 112–117, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.02.033>.
- POULSEN, P. B.; BUCHHOLZ, K. History of enzymology with emphasis on food production. In: WHITACKER, J. R.; VORAGEN, A. G.; WONG, D. W. S. (Eds.). *Handbook of food enzymology*. New York: Marcel Dekker, 2003. p. 11–20.
- ADAMS, R. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 2017.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*, v. 33, p. 2202–2210, 2010.
- ANTONOPOULOU, I. et al. The inhibitory potential of ferulic acid derivatives against the SARS-CoV-2 main protease: Molecular docking, molecular dynamics, and ADMET evaluation. *Biomedicines*, v. 10, p. 1787, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biomedicines10081787>.
- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase - AChE: Uma enzima de interesse farmacológico. *Revista Virtual de Química*, v. 8, p. 1818–1834, 2016.
- ANDRADE NETO, J. B. et al. Anti-MRSA activity of curcumin in planktonic cells and biofilms and determination of possible action mechanisms. *Microbial Pathogenesis*, v. 155, p. 104892, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2021.104892>.
- BECKER, M. et al. Determination of the antioxidant capacity of red fruits by miniaturized spectrophotometry assays. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 30, p. 223–227, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190003>.
- BIOVIA DASSAULT SYSTÈMES. Discovery Studio Visualizer. 16.1.0. San Diego: Accelrys Software Inc., 2016.
- BOUAYED, J.; RAMMAL, H.; SOULIMANI, R. Oxidative stress and anxiety: Relationship and cellular pathways. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2, p. 63–67, 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.4161/oxim.2.2.7944>.
- BUGGER, H.; PFIEL, C. Mitochondrial ROS in myocardial ischemia reperfusion and remodeling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, v. 1866, n. 7, p. 165768, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.16576>.
- CANUTO, K. M. et al. Influência do horário de colheita das folhas na composição química do óleo essencial de colônia (*Alpinia zerumbet*). *Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento/Embrapa Agroindústria Tropical*, 2015.

CASTRO, K. N. de C. et al. Composição química e eficácia do óleo essencial e do extrato etanólico de *Alpinia zerumbet* sobre *Staphylococcus aureus*. *Arquivos do Instituto Biológico*, v. 83, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1808-1657000192014>.

CHEUNG, J. et al. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 55, n. 22, p. 10282–10286, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/jm300871x>.

CORREA, A. J. C.; LIMA, C. E.; COSTA, M. C. C. D. *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burtt & R. M. Sm. (Zingiberaceae): Levantamento de publicações nas áreas farmacológica e química para o período de 1987 a 2008. *Revista Brasileira de Plantas Medicináveis*, v. 12, n. 1, p. 113–119, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-05722010000100016>.

CSIZMADIA, P. MarvinSketch and MarvinView: Molecule applets for the World Wide Web. *Proceedings of the 3rd International Electronic Conference on Synthetic Organic Chemistry*, p. 1775, 1999.

DA COSTA, L. A. M. et al. Flavonóides com atividade hipotensora de *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt et Smith (colônia). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 79, p. 96–98, 1998.

DA CUNHA, G. H. et al. Vasorelaxant and antihypertensive effects of methanolic fraction of the essential oil of *Alpinia zerumbet*. *Vascular Pharmacology*, v. 58, n. 5–6, p. 337–345, 2013.

DELANO, W. L. *The PyMOL Molecular Graphics System*. 2.3. Schrödinger LLC, 2004.

ELLMAN, G. L. et al. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, p. 88–95, 1961. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9).

FERREIRA-VIEIRA, T. H. et al. Alzheimer's disease: Targeting the cholinergic system. *Current Neuropharmacology*, v. 14, n. 1, p. 101–115, 2016.

HALGREN, T. A. Merck molecular force field. I. Basis, form, scope, parameterization, and performance of MMFF94. *Journal of Computational Chemistry*, v. 17, n. 5–6, p. 490–519, 1996.

HANWELL, M. D. et al. Avogadro: An advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *Journal of Cheminformatics*, v. 4, p. 17, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1758-2946-4-17>.

HUEY, R. et al. Using AutoDock 4 and AutoDock Vina with AutoDockTools: A tutorial. The Scripps Research Institute Molecular Graphics Laboratory, 2012. Disponível em: <https://dasher.wustl.edu/chem478/software/autodock-tutorial.pdf>.

MATOS, F. J. A. *Farmácias Vivas*. 5. ed. Fortaleza: Editora UFC, 2024.

MA, X.-N. et al. An overview of chemical constituents from *Alpinia* species in the last six decades. *RSC Advances*, v. 7, n. 23, p. 14114–14144, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1039/c6ra27830b>.

MPALANTINOS, M. et al. Biologically active flavonoids and kava pyrones from the aqueous extract of *Alpinia zerumbet*. *Phytotherapy Research*, v. 12, n. 6, p. 442–444, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1573\(199809\)12:6<442::AID-PTR320>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1573(199809)12:6<442::AID-PTR320>3.0.CO;2-Y).

NÓBREGA, F. F. et al. Monoterpenoid terpinen-4-ol exhibits anticonvulsant activity in behavioural and electrophysiological studies. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2014, p. 703848, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2014/703848>.

NGAMENI, B. et al. Flavonoids and related compounds from the medicinal plants of Africa. In: KUTE, V. (Ed.). *Medicinal Plant Research in Africa*. p. 301–350, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405927-6.00009-6>.

OLIVEIRA, F. A. G. M. et al. Efeitos da extração verde assistida por ultrassom como pré-tratamento na obtenção do óleo essencial e hidrolato de Aroeira Vermelha (*Schinus terebinthifolius* RADDI). *Revista Gestão Sustentável Ambiental*, v. 11, p. 159–174, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.19177/rgsa.v11e02022159-174>.

PASSOS, C. C. O. et al. Studies of the *Croton nepetaefolius* Bail. essential oil and constituents as anticholinesterase agents against Alzheimer's disease. *Chemical Papers*, v. 77, p. 2077–2088, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11696-022-02611-4>.

PASSOS, F. F. B. et al. Involvement of cholinergic and opioid systems in γ -terpinene-mediated antinociception. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, p. 829414, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2015/829414>.

PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.

PICOLLO, M. I. et al. Anticholinesterase and pediculicidal activities of monoterpenoids. *Fitoterapia*, v. 79, n. 4, p. 271–278, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2008.01.005>.

PINHEIRO, L. N. et al. Análise farmacocinética e farmacodinâmica in silico do eucaliptol. *Revista Foco*, v. 16, n. 6, e2402, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.54751/revistafoco.v16n6-158>.

QIU, T. et al. Comorbidity of anxiety and hypertension: Common risk factors and potential mechanisms. *International Journal of Hypertension*, v. 25, p. 9619388, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2023/9619388>.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3).

RHEE, I. K. et al. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. *Journal of Chromatography A*, v. 915, n. 1–2, p. 217–223, 2001. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(01\)00624-0](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(01)00624-0).

SHITYAKOV, S.; FÖRSTER, C. In silico predictive model to determine vector-mediated transport properties for the blood-brain barrier choline transporter. *Advances in Applied Bioinformatics and Chemistry*, v. 7, p. 23–36, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.2147/AABC.S63749>.

SILVA, J. et al. Evaluation of the ADME, toxicological analysis and molecular docking studies of the anacardic acid derivatives with potential antibacterial effects against *Staphylococcus aureus*. *Journal of Analytical Pharmaceutical Research*, v. 10, n. 5, p. 177–194, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.15406/japlr.2021.10.00384>.

SIMÕES, C. M. O. et al. *Farmacognosia: Do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre: Artmed, 2017. ISBN 9788582713594.

SOARES, G. A. B. E. et al. Exploring pharmacological mechanisms of essential oils on the central nervous system. *Plants*, v. 11, n. 1, p. 21, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/plants11010021>.

TAQUI, R. et al. Advances on plant extracts and phytochemicals with acetylcholinesterase inhibition activity for possible treatment of Alzheimer's disease. *Phytomedicine Plus*, v. 2, n. 1, p. 100184, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2021.100184>.

VICTÓRIO, C. P.; LEITÃO, S. G.; LAGE, C. L. S. Chemical composition of the leaf oils of *Alpinia zerumbet* (Pers.) Burt et Smith and *A. purpurata* (Vieill.) K. Schum. from Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, v. 22, p. 52–54, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/10412905.2010.9700264>.

VOLPE, C. M. O. et al. Cellular death, reactive oxygen species (ROS) and diabetic complications. *Cell Death & Disease*, v. 9, n. 2, p. 119, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0135-z>.

SILVA, A. A. da; GONÇALVES, R. C. Espécies reativas do oxigênio e as doenças respiratórias em grandes animais. *Ciência Rural*, v. 40, n. 4, p. 994–1002, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010005000037>.

ZHU, L. et al. Free radical as a double-edged sword in disease: Deriving strategic opportunities for nanotherapeutics. *Coordination Chemistry Reviews*, v. 475, p. 214875, 2023. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2022.214875>.

ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Volatile constituents from leaves and flowers of *Alpinia speciosa* K. Schum. and *A. pupurata* (Viell.) Schum. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 14, n. 6, p. 411–414, 1999. Disponível em: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1026\(199911/12\)14:6<411::AID-FFJ854>3.0.CO;2-U](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1026(199911/12)14:6<411::AID-FFJ854>3.0.CO;2-U).