

OTIMIZAÇÃO DA EXTRAÇÃO DE CAVAÍNAS DE *Alpinia zerumbet* (Pers.) B. L. Burt & R. M. Sm

Maria E. P. Costa ¹; Sidnei de Oliveira Souza ²; James A. da Silva ²

¹ Departamento de Química, Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, SE, Brasil;

² Departamento de Farmácia, Universidade Federal de Sergipe, Lagarto, SE, Brasil.

Palavras-Chave: colônia; 5,6-dehidrocavaína; di-hidro-5,6- dehidrocavaína.

Introdução

Alpinia zerumbet (Pers.) B. L. Burt & R. M. Sm (Zingiberaceae), planta herbácea de origem asiática conhecida popularmente como colônia, é uma espécie que tem desempenhado um papel significativo nas práticas tradicionais de medicina em várias partes do mundo, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, onde têm sido utilizadas empiricamente ao longo dos séculos. No Brasil, encontrada principalmente na região nordeste é utilizada popularmente na forma de chás, como calmante e diurético (BARACUHY *et al.*, 2016). Estudos comprovaram diversas propriedades farmacológicas, dentre elas: ansiolítica, analgésica, anti-inflamatória e antineoplásicas, além de potenciais benefícios para a saúde cardiovascular (SATOUE *et al.*, 2011; BEVILAQUA *et al.*, 2015; BARCELOS *et al.*, 2010; XIAO *et al.*, 2017; ZAHRA *et al.*, 2019). Devido ao seu uso pela medicina tradicional e comprovações científicas de seus efeitos biológicos, foi inserida na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS - RENISUS (BRASIL, 2014).

A espécie *A. zerumbet* é rica em compostos bioativos fenólicos, como os flavonoides, taninos condensados, monoterpênicos e sesquiterpênicos (presentes no óleo essencial). De forma predominante, apresenta metabólitos secundários denominados kavalactonas, como a 5,6-dehidrocavaína (DK) e dihidro-5,6-dehidrocavaína (DDK) (TESCHKE, 2018), geralmente encontradas em todas as partes da planta, porém, em maior quantidade nas folhas e rizomas (XUAN, 2015). As cavaínas encontradas na espécie vegetal *Piper methysticum* (kava-kava), planta utilizada por algumas culturas no tratamento de ansiedade e depressão, tiveram seu efeito ansiolítico comprovado (JUSTO *et al.*, 2018), portanto, as cavaínas DK e DDK podem possuir potencial ansiolítico, por apresentarem estruturas químicas semelhantes às cavaínas presentes em kava-kava. Desse modo, estudos que envolvem a extração e isolamento dessas cavaínas são extremamente importantes para que a avaliação ansiolítica dessas substâncias seja realizada.

Para auxiliar na otimização da extração de substâncias bioativas, podem ser aplicados planejamentos experimentais fatoriais, que consistem em avaliar quais variáveis são significativas para o processo a ser estudado. Dentre os planejamentos que podem ser aplicados, há os fatoriais de dois níveis, completos ou fracionários, que servem para verificar se as variáveis são significativas ou não para o sistema e assim obter um método de extração mais eficiente (NOVAES *et al.*, 2016).

O uso tradicional desta espécie para tratar a ansiedade, e os efeitos ansiolíticos de metabólitos secundários da classe das cavaínas estimulam a otimização da extração de substâncias dessa classe, como o DK e DDK, presentes em *Alpinia zerumbet*. Dessa forma, uma

investigação mais profunda destes potenciais candidatos a fármacos ansiolíticos pode fortalecer o seu uso, contribuindo para aumentar a eficiência farmacológica e segurança desta planta medicinal. Em vista disso, a presente pesquisa teve como objetivo otimizar a extração das cavaínas, 5,6-dehidrocavaína (DK) e dihidro-5,6- dehidrocavaína (DDK), das folhas de *Alpinia zerumbet*.

Material e Métodos

As folhas de *Alpinia zerumbet* foram coletadas no antigo Horto de Plantas Medicinais de Lagarto, localizado no Povoado Moita Redonda, município de Lagarto/SE (10°56'48"S 37°38'21"W). O material vegetal foi lavado em água corrente, selecionado e armazenado sob temperatura de -80 °C até a preparação dos extratos.

Preparo dos extratos

Para extração por decocção, água purificada foi adicionada a matéria-prima em uma proporção 1/5 (m/v). Após o intumescimento do material vegetal (20 min) foi realizada a extração por decocção por 20 min. Para a extração assistida por micro-ondas, após o intumescimento do material vegetal (20 min), os frascos foram introduzidos no micro-ondas e mantidos por 3 min em potência mínima (250 W).

Após a extração de ambos os métodos, os extratos foram filtrados, congelados a -80 °C, e posteriormente, liofilizados. Subsequentemente, após a reconstituição do liofilizado, com 10% do valor inicial da água purificada, realizou-se uma partição líquido-líquido com hexano, diclorometano ou acetato de etila. A fração orgânica foi rotaevaporada sob vácuo, a temperatura de 40 ± 5 °C para a obtenção do extrato seco rico em cavaínas (EHRC) (TU, 2014). Todas as extrações foram realizadas em triplicata.

Planejamento fatorial experimental

Para otimizar o método de extração das cavaínas da *A. zerumbet*, foi utilizado o planejamento fatorial de dois níveis (2^3) com três pontos centrais, sendo realizado com as variáveis: tempo de extração, razão (massa/volume) e potência. O planejamento foi aplicado ao método de extração que obteve maior rendimento dos metabólitos DK e DDK. Nestes experimentos, as áreas das bandas cromatográficas das cavaínas extraídas dos cromatogramas analíticos (CLAE-DAD) foram utilizadas como resposta nos planejamentos. Os dados foram tratados por meio do software Statistica® 6.0.

Análises cromatográficas das cavaínas DK e DDK

Através do sistema de cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas (CG-EM, Shimadzu® GCMS-QP 2020 Plus), foi realizada a identificação das cavaínas. Uma alíquota de 1 µL da solução de EHRC a 500 ppm foi injetada no CG-EM sob as seguintes condições: temperatura do forno, 50 °C mantido por 6 min, aumentado a uma taxa de 5 °C/min até atingir a temperatura de 280 °C, que foi mantido por 5 min; temperatura do injetor e do detector, 250 °C e 280 °C, respectivamente (ELZAAWELY, 2007). O experimento foi realizado em triplicata.

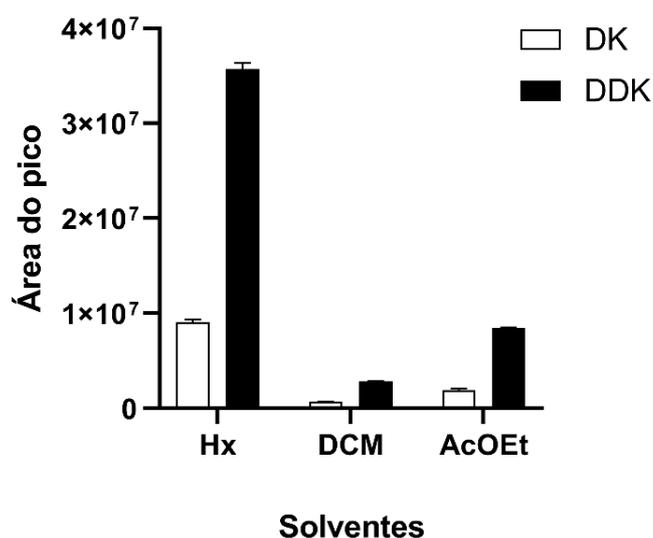
Os EHRC foram analisados por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado ao Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD, Shimadzu®), usando uma coluna C18 Eclipse Plus Agilent (150 mm x 4,6 mm, id 5 μ m). A eluição foi realizada no modo gradiente usando como fase móvel ácido acético 0,1%/metanol com aumento da concentração de metanol de 50 a 100%, por 20 min. As corridas foram precedidas por equilíbrio da coluna cromatográfica por 10 min utilizando metanol 50%. O volume de injeção foi de 20 μ L e a vazão de 0,8 mL/min (TU, 2014).

Resultados e Discussão

Inicialmente, as frações hexano, diclorometano e acetato de etila, obtidas através da partição líquido-líquido de um extrato aquoso obtido por decocção, foram analisadas por CG-EM, com o intuito de identificar qual solvente extraiu com maior rendimento, as cavaínas DK e DDK.

O hexano que foi o solvente que resultou no maior rendimento para DDK e DK quando comparado com as outras frações, enquanto a fração diclorometano produziu o menor rendimento. Logo, o hexano foi selecionado como solvente orgânico para realizar as partições líquido-líquido (Figura 1).

Figura 1. Áreas das bandas cromatográficas (CLAE-DAD) das cavaínas 5,6-dehidrocavaína (DK) e dihidro-5,6-dehidrocavaína (DDK), após extração líquido-líquido com Hexano (Hx), Diclorometano (DCM) e Acetato de etila (AcOEt).



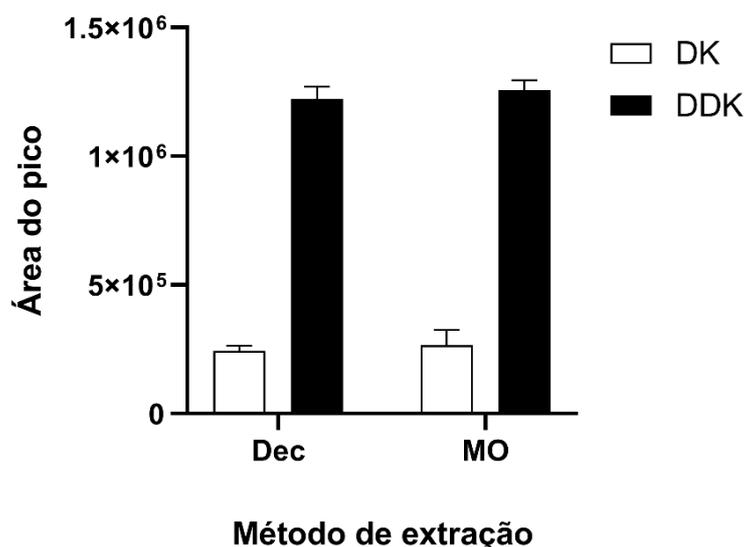
Fonte: Autoria própria.

Extração por decocção e micro-ondas

Após a escolha do solvente para a realização da partição líquido-líquido, foram aplicados dois métodos de extração: decocção e extração assistida por micro-ondas, com o objetivo de determinar qual método seria o mais eficiente. Aplicando os valores de Teste-t, com

os resultados obtidos, observou-se que não houve diferença estatística entre as duas técnicas de extração. Logo, o método selecionado foi a extração assistida por micro-ondas (3 min), pois, quando comparado ao método de decocção (20 min), possui um tempo de processo bem menor, e assim é mais vantajoso (Figura 2).

Figura 2: Áreas das bandas cromatográficas (CLAE-DAD) de DK e DDK extraído pelos métodos de extração Decocção (Dec) e Micro-ondas (MO).

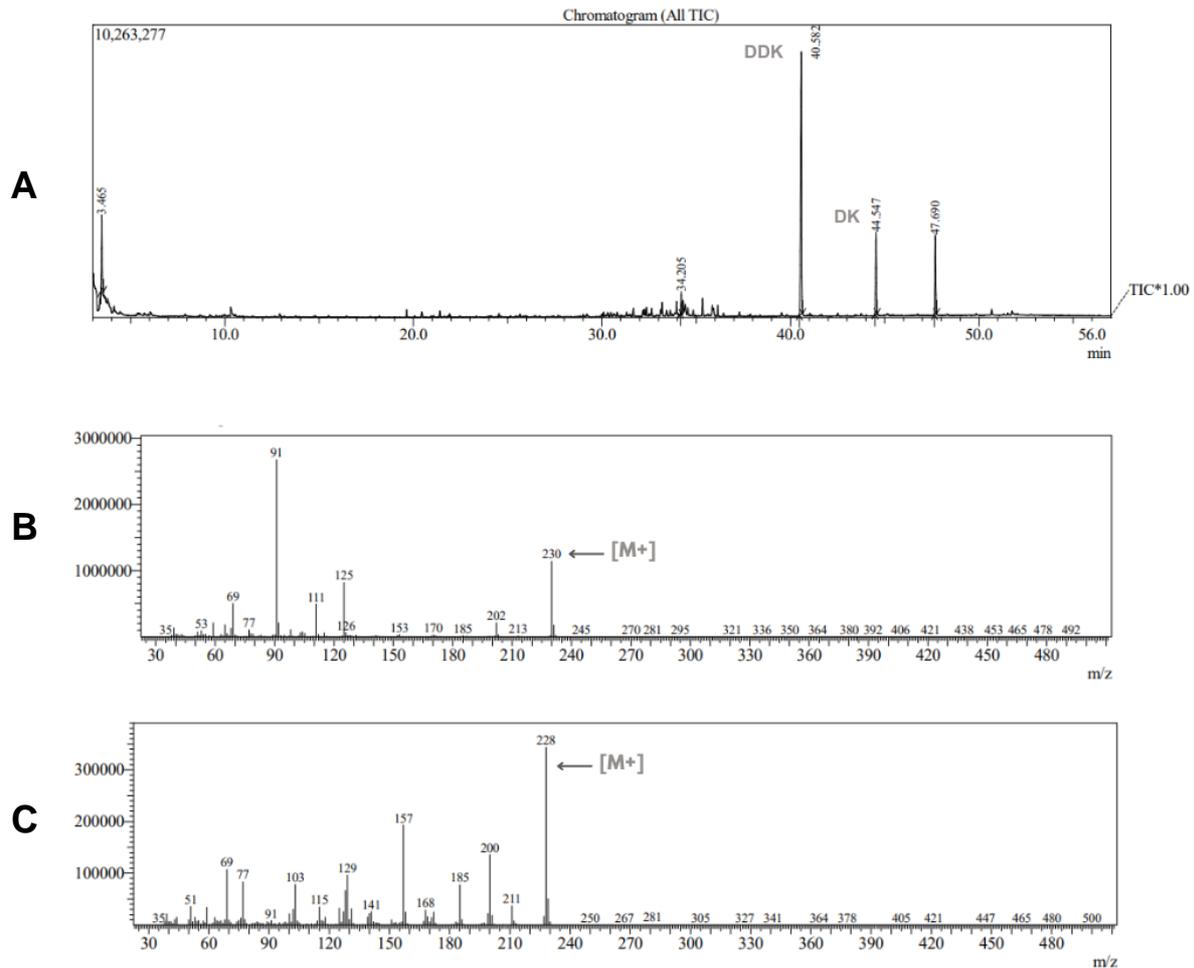


Fonte: Autoria própria.

Análises cromatográficas das cavaínas DK e DDK

Através do sistema de cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massas (CG-EM), foi realizada a identificação das cavaínas. Na Figura 3 pode-se observar a corrida cromatográfica completa (Figura 3A) com destaque dos picos DDK (40,583 min.) e DK (44,544 min). Na Figura 3B pode ser observado o espectro de massas de DDK, que possui massa monoisotópica teórica de 230,09 Da ($C_{14}H_{14}O_3$). O pico de alta intensidade de razão massa/carga (m/z) em 230, refere-se ao seu íon molecular $[M^+]$. Os fragmentos com m/z 230, 202, 125, 91 e 69 apresentam intensidades semelhantes às encontradas no estudo de Cruz *et al* (2020), para o DDK. Já na Figura 3C pode ser observado o espectro de massas de DK, que possui massa monoisotópica teórica de 228,07 Da ($C_{14}H_{12}O_3$). O pico com razão massa/carga (m/z) 228, refere-se ao seu íon molecular $[M^+]$. Os fragmentos com m/z 228, 211, 200, 185, 157, 115, 10, 80 e 69 apresentam intensidades semelhantes às encontradas no estudo de He, Lin e Lian (1996), para DK. Confirma-se, portanto, a identificação das cavaínas DDK e DK, utilizando a literatura, e as bases de dados do CG-EM, Shimadzu® GCMS-QP 2020 Plus.

Figura 3. Análise da fração hexano obtida das folhas de *Alpinia zerumbet*, por CG-EM. (A) cromatograma completo, (B) espectro de massas de DDK e (C) espectro de massas de DK.

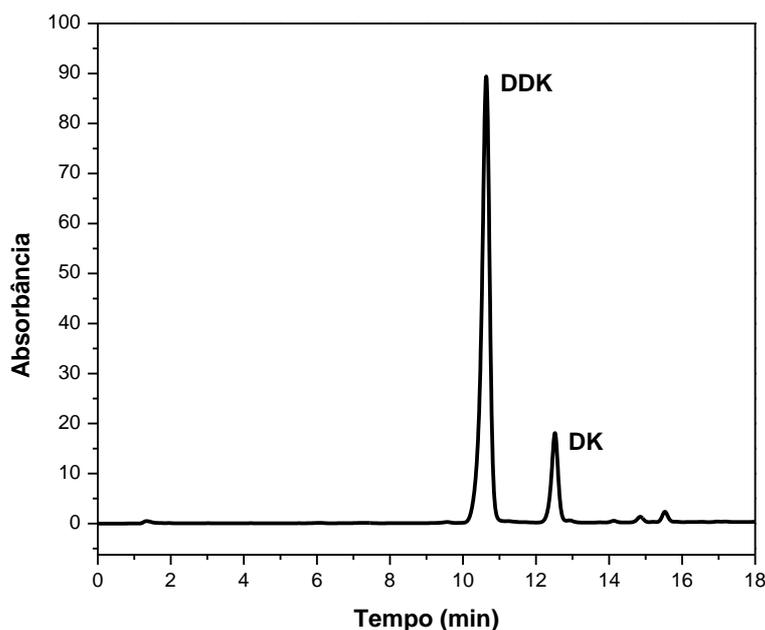


Fonte: Autoria própria.

Após identificação por CG-EM, as amostras foram injetadas no CLAE-DAD para determinar as quantidades relativas de DK e DDK de cada extrato obtido após o planejamento fatorial. As cavaínas DDK e DK foram identificados com tempo de retenção (A) 10.7 min e (B) 12.6 min (Figura 4), tempos de retenção semelhantes dos obtidos por Tu e Tawata (2014), com a mesmas condições cromatográficas.

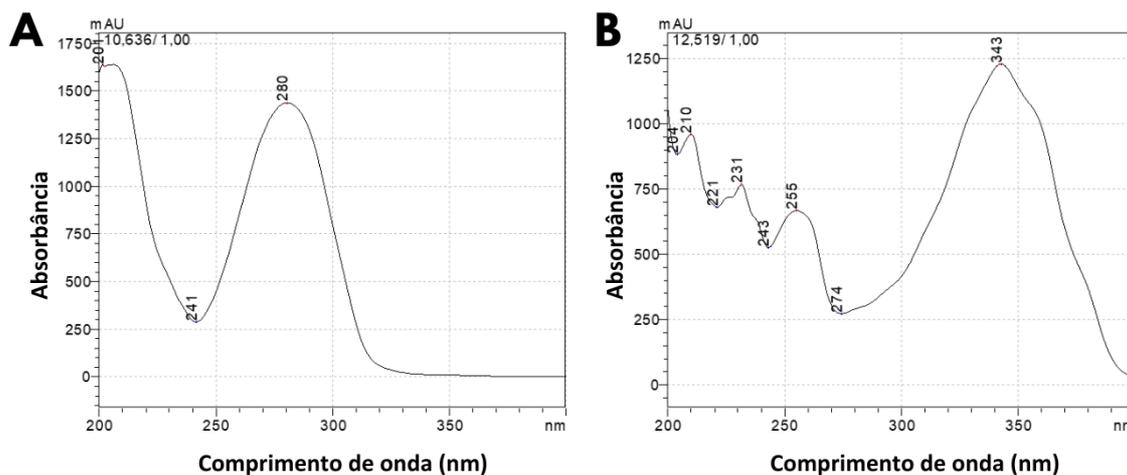
Na Figura 4 pode-se observar um cromatograma representativo das análises realizadas por CLAE-DAD, enquanto na Figura 5 estão representados os espectros de UV de cada cavaína. Pode-se observar, após análise dos espectros UV da DDK (Figura 5A), uma banda de absorção no comprimento de onda de 280 nm, e da DK (Figura 5B) bandas de absorção nos comprimentos de ondas de 210, 231, 255 e 343 nm, característicos dessas cavaínas, respectivamente (He, Lin e Lian, 1996).

Figura 4. Cromatograma analítico obtido por cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao detector com arranjo de diodos (CLAE-DAD) do extrato das folhas de *A. zerumbet*. DDK ($t_R=10,7$ min.) e DK ($t_R = 12,6$ min.).



Fonte: Autoria própria.

Figura 5. Espectros de absorção UV obtidos por CLAE-DAD. (A) DDK e (B) DK.



Fonte: Autoria própria.

Planejamento fatorial

Considerando o melhor método de extração (extração assistida por micro-ondas), foi aplicado um planejamento fatorial de dois níveis (2^3) com três pontos centrais, utilizando as variáveis: tempo (1 e 3 min), razão massa/volume (1/5 e 1/10, m/v) e potência do micro-ondas (mínima e máxima). A resposta utilizada no planejamento foi a área dos picos de DK e DDK, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Valor da média das áreas dos picos do DDK e DK do planejamento fatorial de dois níveis (2³).

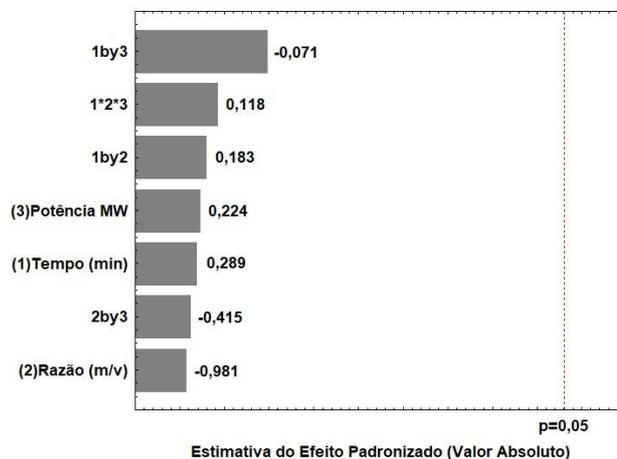
EXP.	TEMPO (min)	RAZÃO (massa/volume)	POTÊNCIA	Área da banda de DDK	Área da banda de DK
1	1	1/5	Mínima	993993,5	259511,5
2	1	1/10	Mínima	1488182	424145
3	3	1/5	Mínima	2027471,5	317306
4	3	1/10	Mínima	1742509,5	353005,5
5	1	1/5	Máxima	1955390,5	524437
6	1	1/10	Máxima	1860206	511200
7	3	1/5	Máxima	1444250	191322
8	3	1/10	Máxima	1488069	489819
9 (PC)	2	1/7,5	Média	2996613	490046,5
10 (PC)	2	1/7,5	Média	1628602	191412,5
11 (PC)	2	1/7,5	Média	1655840,5	236298,5

PC: Ponto Central.

Fonte: Autoria Própria.

Após a realização dos experimentos, os dados obtidos foram analisados pela Análise de variância – ANOVA (Tabela 2) utilizando o software Statistica® 6.0, sendo gerado o gráfico de Pareto (Figura 6). Esse planejamento mostrou que nenhuma das variáveis foram significativas, bem como suas interações, pois os valores de p foram menores que 0,05. Logo, como não houve diferenças significativas das variáveis, observando os dados experimentais, o experimento 5 foi escolhido para realizar a extração das cavaínas da *Alpinia zerumbet*, visto que, apresentou o segundo maior rendimento médio para o DDK e o maior rendimento médio para o DK. Além disso, as extrações foram realizadas em menor tempo e menor proporção de planta/solvente, o que consequentemente gera menor custo.

Figura 6. Gráfico de Pareto do planejamento fatorial 2³.



Fonte: Statistica ® 6.0.

Tabela 2. Análise de variância (ANOVA) obtida para o planejamento fatorial (2³).

Fator	Soma dos quadrados	Grau de liberdade	Média dos quadrados	Valor de F	Valor de p
(1) Tempo (min)	2,04 x 10 ¹⁰	1	2,04 x 10 ¹⁰	0,033	0,872
(2) Razão (m/v)	3,11 x 10 ⁹	1	3,11 x 10 ⁹	0,005	0,950
(3) Potência MO	3,07 x 10 ¹⁰	1	3,07 x 10 ¹⁰	0,050	0,843
1 x 2	5,12 x 10 ¹⁰	1	5,12 x 10 ¹⁰	0,084	0,799
1 x 3	5,89 x 10 ¹¹	1	5,89 x 10 ¹¹	0,963	0,430
2 x 3	8,49 x 10 ⁹	1	8,49 x 10 ⁹	0,014	0,917
1 x 2 x 3	1,05 x 10 ¹¹	1	1,05 x 10 ¹¹	0,172	0,718
Falta de ajuste	4,79 x 10 ¹¹	1	4,79 x 10 ¹¹	0,783	0,469
Erro puro	1,22 x 10 ¹²	2	6,12 x 10 ¹¹		
Somatório total	2,51 x 10 ¹²	10			

Fonte: Autoria Própria.

Conclusões

A metodologia foi implementada para otimização das condições de extração das cavaínas DDK e DK das folhas da *Alpinia zerumbet*. Diante das análises, foi possível concluir que o melhor método foi extração assistida por micro-ondas e após o planejamento experimental, o experimento com menor tempo, menor proporção planta/solvente e máxima potência foi selecionado, sendo o experimento 5 o mais vantajoso.

Devido à variedade de efeitos terapêuticos atribuídos a 5,6-dehidrocavaína (DK) e dihidro-5,6-dehidrocavaína (DDK), a otimização do seu processo de extração é um passo importante para pesquisa à base destes metabólitos. Como perspectiva futura, é importante uma avaliação da atividade ansiolítica de DK e DDK já que não há muitos estudos relacionados ao tema.

Agradecimentos

Ao Laboratório de Produtos Naturais Bioativos (LPNBio) da Universidade Federal de Sergipe, Campus Lagarto.

Referências

- AMORIM, J. A. et al.. Ação anti-inflamatória da própolis. In: FREITAS, G. B. L. **Bioética e Saúde Pública**. Editora Pasteur. p. 208-221, 2011.
- AZEVEDO, M. V. DE M. P. DA S.; LINS, S. R. DE O. Therapeutic applications of the *Alpinia zerumbet* (colônia) based on traditional medicine: a narrative review (2010-2020). **Brazilian Journal of Development**. 6 (11), p. 84222–84242, 2020.
- BARACUHY, J. G. V. et al. *Plantas Medicinais de uso comum no Nordeste do Brasil*. 2. ed. Campina Grande, EDUEFCG, 2016.



BARCELOS, F. F. et al. Estudo químico e da atividade biológica cardiovascular do óleo essencial de folhas de *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L.Burt & R.M.Sm. em ratos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 12 (1), p. 48–56, 2010.

BEVILAQUA, F. et al. Involvement of the catecholaminergic system on the antidepressant-like effects of *Alpinia zerumbet* in mice. **Pharmaceutical Biology**, 54, (1), p.151–156, 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde, Monografia das Espécies *Alpinia speciosa* e *Alpinia Zerumbet* (Galanga), Brasília 2014. Disponível em: <https://.gov.br/saude/ptbr/composicao/sctie/daf/pnpmf/ppnpmf/arquivos/2016/VersocpAlpinia.pdf>. Acesso em 06 de setembro de 2023.

CRUZ, J. F. et al. Chemical standardization, antioxidant activity and phenolic contents of cultivated *Alpinia zerumbet* preparations. **Elsevier**, 151. 2020.

ELZAAWELY, A. A.; XUAN, T. D.; TAWATA, S. Essential oils, kava pyrones and phenolic compounds from leaves and rhizomes of *Alpinia zerumbet* (Pers.) B.L. Burt. & R.M. Sm. and their antioxidant activity. **Food Chemistry**, 103, (2), 486–494, 2007.

JUSTO, Seilin Cardoso et al. PIPER METHYSTICUM G. FORSTER (KAVA-KAVA): uma abordagem geral. **Revista Eletrônica de Farmácia**, [S.L.], 5, (1), 1-20, 2008.

NOVAES, C. G. et al. A review of multivariate designs applied to the optimization of methods based on inductively coupled plasma optical emission spectrometry (ICP OES). **Microchemical Journal**, 128, 331–346, 2016.

SATOU, T. et al. Anxiolytic effect and tissue distribution of inhaled *Alpinia zerumbet* essential oil in mice. **Natural product communications**, 5, (1), p. 193-196, 2010.

SATOU, T, et al. Relationship between duration of exposure and anxiolytic-like effects of essential oil from *Alpinia zerumbet*. **Flavour and fragrance journal**, 26, (3), 180-185, 2011.

TESCHKE, R.; XUAN, T. D. Viewpoint: A Contributory Role of Shell Ginger (*Alpinia zerumbet*) for Human Longevity in Okinawa, Japan? **Nutrients**, 10, (2), p. 166, 2018.

TU, P.; TAWATA, S. Anti-Obesity Effects of Hispidin and *Alpinia zerumbet* Bioactives in 3T3-L1 Adipocytes. **Molecules**, 19, (10), 16656–16671, 2014.

UPADHYAY, A. et al. HIV-1 Integrase and Neuraminidase Inhibitors from *Alpinia zerumbet*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 59, (7), p. 2857–2862, 2011.

XIAO, R.-Y. et al. Screening of analgesic and anti-inflammatory active component in *Fructus Alpinia zerumbet* based on spectrum-effect relationship and GC-MS. **Biomedical Chromatography**, 32, (3), p. 4112, 2017.

XUAN, T.; TESCHKE, R. Dihydro-5,6-dehydrokavain (DDK) from *Alpinia zerumbet*: Its Isolation, Synthesis, and Characterization. **Molecules**, 20, (9), p. 16306–16319, 2015.

ZAHRA, M. H. et al. *Alpinia zerumbet* (Pers.): Food and Medicinal Plant with Potential In Vitro and In Vivo Anti-Cancer Activities. **Molecules**, 24, (13), p. 2495, 2019.