SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO SUL E SUDESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
FACULDADE DE QUÍMICA

ODIANE CUNHA BALIEIRO

AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ESPILANTOL NO JAMBU (*Acmella oleraceae*) POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

MARABÁ – PA
2018

ODIANE CUNHA BALIEIRO

AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ESPILANTOL NO JAMBU (*Acmella oleraceae*) POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como requisito parcial, à Faculdade de Química da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, para obtenção do grau de Licenciatura Plena em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Yasue Simote Silva

MARABÁ – PA

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca II da UNIFESSPA. CAMAR, Marabá, PA

Balieiro, Odiane Cunha
Avaliação da concentração de espilantol no jambu (*Acmella oleraceae*) por cromatografia líquida de alta eficiência / Odiane Cunha Balieiro ; orientadora, Simone Yasue Simote Silva. — 2018.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Campus Universitário de Marabá, Instituto de Ciências Exatas, Faculdade de Química, Curso de Licenciatura em Química, Marabá, 2018.

1. Jambú. 2. Jambú – Composição. 3. Jambú – Análise. 4. Jambú - Uso terapêutico. 5. Hortaliças. 6. Química analítica quantitativa. I. Silva, Simone Yasue Simote, orient. II. Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará. III. Título.

CDD: 22. ed.: 635.4

Elaborado por Nádia Lopes Serrão
Bibliotecária-Documentalista CRB2/575

ODIANE CUNHA BALIEIRO

AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE ESPILANTOL NO JAMBU POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (*Acmella oleraceae*)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Química da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará (Unifesspa), em cumprimento às exigências para obtenção do grau de Licenciado em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Yasue Simote Silva

Data de defesa: 09/03/2018

Banca examinadora:

Simone Yasue Simote Silva

Profa. Dra. Simone Yasue Simote Silva (Orientadora)

Faculdade de Química - Unifesspa

João Batista Pereira Junior

Prof. Dr. João Batista Pereira Junior (Membro)

Faculdade de Química - Unifesspa

Danielle Rodrigues Monteiro da Costa

Profa. Dra. Danielle Rodrigues Monteiro da Costa (Membro)

Departamento de Ciências Naturais – UEPA

À memória da minha querida tia

Elizabete Silva Costa.

AGRADECIMENTOS

Desde o primeiro semestre ao último, desde a matrícula ao diploma, agradeço a Deus, por me permitir chegar ao final desta graduação apesar dos momentos de turbulências me fez perseverante, me deu força, segurou minhas mãos e me fez seguir, por ter abençoado essa caminhada, me permitindo viver todas as oportunidades proporcionadas na vida acadêmica. Obrigada Senhor!

Aos meus pais Risionaldo Silva Balieiro e Maria Odete Novaes da Cunha , agradeço por serem meu apoio incondicional nessa caminhada, mesmo à distância foram presentes, por contribuírem pela pessoa que sou hoje, por serem exemplos de seres humanos o qual procuro me espelhar, agradeço por me proporcionarem educação, uma vida digna, por me conduzirem no caminho do bem, pelo amor, por serem meu colo acolhedor, por me deixarem voar mesmo quando instinto de proteção dizia não, pelo incentivo para concluir essa etapa da minha vida a eles dedico essa graduação. Amo vocês!

Sou grata à minhas irmãs Maria Odilene Cunha Balieiro e Odielma Cunha Balieiro, por serem as melhores irmãs, pela grande parceria que formamos, por estarem sempre dispostas a me ajudarem, por estarem comigo em todos os momentos, por me receberem sempre com um sorriso largo no rosto e uma mesa farta de comida, por todo amor a mim dedicado e admiração demonstrada, minha eterna gratidão. Amo vocês!

Aos meus sobrinhos Rayka Beatriz e João Ricardo que me recebem com abraços carinhosos tornando a minha estadia em casa mais agradável e gostosa, servindo de motivação para continuar, obrigada minhas crianças do coração.

Externo gratidão a minha segunda família e precursores da minha vida acadêmica Denilson Silva Costa, Dione Rodrigues da Costa, David Costa, Dalila Costa e Diego Costa, por acreditarem sempre em mim, pelo estímulo para o início dessa caminhada, por estarem ao meu lado o tempo todo dando apoio e suporte para concluir essa etapa, pelo aconchego de sempre, por todas as oportunidades que me proporcionaram nesses anos de excelente convivência, por não medirem esforços para eu ir sempre além e por me incentivarem a acreditar que posso mais. Obrigada por tudo!

A minha orientadora Profa. Dra. Simone Yasue Simote Silva que se destacou em minha vida acadêmica e pessoal num momento difícil da graduação como uma amiga, por ter me ajudado a continuar, me deu oportunidade na universidade, permitindo conhecer coisas novas, me abriu portas acreditando na minha capacidade de ser sempre melhor, agradeço pela

parceria de sucesso que formamos na pesquisa e companhia agradável e divertida, pelo forte vínculo fraternal que criamos, por me ajudar a desenvolver esse trabalho e muitos outros, compartilhando seu conhecimento profissional e pessoal, pela paciência de sempre e pela excelente orientadora que foi durante esse processo à senhora a minha eterna gratidão.

Ao Prof. Dr. Sebastião da Cruz Silva pelo auxílio, gentileza e atenção sempre que solicitado, disponibilizando seu tempo e compartilhando seus conhecimentos sem medir esforços, com aquele sarcasmo saudável, uma pessoa admirável e um profissional exemplar a qual me espelho, muito obrigada.

Aos professores da faculdade de química/FAQUIM: Prof. Dra. Marilene Nunes Oliveira, Dr. Wagner Soares Alencar, Dra. Joana Luiza Pires Siqueira, Dr. Alcy Ribeiro Favacho, Dr. Geiso Rafael Fonseca de Oliveira, Dr. Francisco Adriano de Oliveira, Dra. Kelly Heloizy Freitas, Dr. Thiago Mielle B. F. Oliveira, Dr. Emerson Paulinho Boscheto, Dra. Juliana Pardauil e aos demais professores que tive no curso agradeço pelo conhecimento transmitido contribuindo para minha formação, muito obrigada.

Aos amigos que a FAQUIM me proporcionou conhecer, trabalhar e conviver além dos muros da universidade Adriano de Araújo Gomes, José Licarion Segundo Neto e João Batista Pereira Junior a eles agradeço pela disponibilidade de ajuda sempre que precisei, pelas conversas recheadas de conteúdos e aquelas corriqueiras, que nos rendiam boas gargalhadas, agradeço pelos trabalhos desenvolvidos e pela ótima companhia de viagem, apesar de tão pouco tempo de relação, contribuíram muito com meu crescimento pessoal e profissional, a eles o meu carinho e gratidão, muito obrigada.

As amigas Jhenyffer de Azevedo Florêncio e Larissa de Oliveira Onça, obrigada por terem aliviado a carga desses anos. Ainda bem que tenho vocês, se fizeram muito presente em todos os momentos da minha vida acadêmica, dos mais tensos aos melhores, foram peças fundamentais para a continuidade nessa árdua caminhada, foram as injeções de ânimo, para eu me reerguer e seguir firme, foi maravilhoso compartilhar tudo com vocês, agradeço pela parceria formada, e entre os altos e baixos que uma relação fraternal tem, chegamos até aqui juntas, as levo no meu coração e a vocês o meu muito obrigada por tudo.

Aos meus “amigos da Onça” da turma química 2014, sou grata pela oportunidade de tê-los conhecido, pelo aprendizado e crescimento profissional e pessoal, grata, principalmente, pelos muitos momentos de conversas “toscas’ e gargalhadas à toa, por tantos momentos de desesperos compartilhados, pela ajuda, pelas boas e loucas experiências divididas, grata em

especial as cobras Nayara Haruko, Andressa Santos e Gislene Oliveira, a graduação foi muito maluca com vocês do lado e os vínculos mais fortalecidos, muito obrigada.

Aos meus parceiros da Geologia 2013, iniciamos juntos essa etapa de nossas vidas e juntos estamos encerrando e o elo criado no início do curso permanece firme e forte, agradeço por tornarem essa jornada mais agradável, pelos momentos vividos intensamente, grata, em especial, ao William Nascimento, que se fez presente nos momentos mais marcantes de minha vida, esteve sempre à disposição quando precisei e por ser um grande parceiro para tudo, levo todos no meu coração, muito obrigada "geocats".

Aos meus cunhados Rafael Moraes e Maxland Ferreira que nunca me negaram nada quando precisei e por todo apoio, ainda que involuntariamente, me ajudaram a chegar até aqui, muito obrigada meus cunhados.

À família marabaense, "os malcriados", agradeço por aliviarem esses anos de graduação com muitos momentos de descontração no "calçadão dos malcriados", que sempre renderam divertidas histórias e que fortaleceram esse vínculo amigável, e por nunca se negarem a me ajudar quando precisei, muito obrigada a todos.

Agradeço a família da Jhenyffer Florêncio pela excelente acolhida, conversas regada a muitas gargalhadas, momentos de descontração e pelos almoços deliciosos, muito obrigada.

Aos meus amigos de Oeiras do Pará, que involuntária e indiretamente, me davam um combustível para continuar e chegar até o final deste percurso, as conversas mais loucas e sem noção nos grupos das redes sociais e as constantes marcações nos "memes", aliviavam o peso dos dias tensos, e quando o cansaço batia forte visitá-los se tornava indispensável para renovar as energias, doces e necessários recessos, devo a minha graduação a cada um por estarem sempre comigo, obrigada por tudo.

A equipe de segurança e limpeza da UNIFESSPA, por estarem sempre dispostos a ajudar, agradeço pela acessibilidade, simpatia e educação que me atenderam, muito obrigada.

Ao PIBID pela bolsa concedida que contribuiu para a minha formação.

A Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, pelo auxílio financeiro, pelas oportunidades e pela formação acadêmica.

Enfim, a todos que passaram pela minha vida e contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste ciclo, o meu muito obrigada.

“De absoluto, só a relatividade”

(Albert Einstein)

RESUMO

O jambu (*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen) é uma hortaliça nativa da região amazônica, mas atualmente cultivada em várias regiões do mundo e muito utilizada como condimento em pratos típicos da região Norte e na medicina popular. Atualmente tem despertado o interesse econômico por empresas nacionais e de outros países, na área de cosméticos, devido seu princípio ativo, o espilantol. Considerando sua importância econômica do princípio ativo do Jambu, este estudo teve como objetivo, realizar a análise quantitativa da concentração do espilantol presente em diferentes partes da planta (raiz, parte aérea e inflorescência), no decorrer do seu crescimento plantado tanto em bandejas como em canteiros. Foi realizado um planejamento experimental para verificar qual melhor solvente ou mistura de solventes ideais para melhor rendimento na extração do espilantol. O espilantol foi isolado através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Para a obtenção do extrato das matrizes, foi realizado extração por soxhlet, utilizando a mistura de solvente Etanol/Água (7:3v/v), sob refluxo por 4h. Realizou-se uma curva de calibração nas concentrações de 0,05 mg/mL a 10,0 mg/mL de espilantol obtendo-se uma curva de calibração com 15 pontos obtidas no CLAE realizado no modo isocrático, tendo como fase móvel Acetonitrila/Água (7:3) v/v, fase estacionária coluna C18 e absorbância UV de 230 nm. Foram injetados extratos obtidos na extração por soxhlet na concentração de 100ppm no CLAE nas mesmas condições utilizadas para obtenção da curva de calibração. Nos resultados das análises foi possível observar que as inflorescências do jambu cultivado no canteiro, no período de 60 dias foi o que apresentou a maior concentração de espilantol.

PALAVRAS-CHAVE: espilantol, análise quantitativa, cromatográfica líquida de alta eficiência

Sumário

1 INTRODUÇÃO 15

2 OBJETIVOS 16

2.1 OBJETIVO GERAL 16

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 16

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17

3.1 JAMBU (*ACMELLA OLERACEAE*) 17

3.1.1 Descrição botânica 18
3.1.2 Composição química 19
3.1.3 Espilantol 20
3.1.4 Atividades biológicas 22
3.1.5 Importância socioeconômica 23

3.2 EXTRAÇÃO POR SOXHLET 24

3.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) 26

4 METODOLOGIA 28

4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS 28

4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL 28

4.2.1 Material botânico 28
4.2.2 Preparo do material para extração 29
4.2.3 Planejamento para extração 30
4.2.4 Extração do jambu por Soxhlet 31
4.2.5 Isolamento do espilantol por CLAE preparativo 33
4.2.6 Análise analítica para curva de calibração 33
4.2.7 Análise em CLAE dos extratos brutos 35

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 36

5.1 PLANEJAMENTO PARA EXTRAÇÃO 36

5.3 ISOLAMENTO DO ESPILANTOL 39

5.4 ANÁLISE EM CLAE DOS EXTRATOS BRUTOS 42

6 CONCLUSÃO 44

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Jambu (*Acmella oleraceae*) 17
Figura 2 - Inflorescência do Jambu (Acmella oleraceae) 19
Figura 3 - Estrutura de algumas substâncias encontradas em *A.oleraceae* 20
Figura 4 - Estrutura química do espilantol 21
Figura 5 - Equipamento Soxhlet convencional 26
Figura 6 - Diagrama de um processo de análise por CLAE 27
Figura 7 - Aparelho de soxhlet com material a ser extraído 32
Figura 8 - Evaporador rotativo 32
Figura 9 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC-20AP 33
Figura 10 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência – DIONEX Ultimate 3000 34
Figura 11 - Superfícies de resposta e contornos para misturas de três solventes 37
Figura 12 – (a) - Cromatogramas sobrepostos registrados a 230 nm do extrato de inflorescencia do jambu com etanol (▬), água (▬), acetonitrila: água (▬) e proporção de acetonitrila: metanol: etanol (▬). (b) Expansão do pico do espilantol 38
Figura 13 - Cromatograma do extrato CI60, obtido no CLAE Shimadzu Preparativo 40
Figura 14 - (a) Cromatograma do espilantol na concentração de 0,75 mg/mL; (b) Dados do pico do espilantol e Espectro de Ultra violeta em 230nm. 41
Figura 15 - Curva de calibração do espilantol 42
Figura 16 - Cromatograma do extrato CI60 obtido por CLAE, 230nm. 42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Propriedades físicas do espilantol 22
Tabela 2 - Materiais, solventes e equipamentos 28
Tabela 3 - Dados da coleta do jambu 29
Tabela 4 - Dados do planejamento de extração utilizando acetonitrila, etanol, metanol e água 31
Tabela 5 - Coeficiente estimado para os termos significativos do modelo de compilação de rede simples. 37
Tabela 6 - Dados da coleta do jambu 39
Tabela 7 - Concentração de espilantol 30, 60 e 90 dias em diferentes partes de A. oleraceae 43

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

μm	Micrometros
%	Porcento – uma parte em cem partes
®	Marca registrada
μL	Microlitros
cm	Centímetro
g	Grama
g/mol	Gramas por mol
L	Litros
m/z	Razão massa carga
mg	Miligramas
λ	Comprimento de onda
T	Temperatura
v/v	Relação volume/volume (fracção volumétrica)
nm	Nanometros
°C	Graus Celsius
P	Pressão
μl	microlitro
m	massa
min	minutos
V	volume
mAb	miliabsorbância
ppm	parte por milhão

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

SLD - Simplex Lattice Design

UV - Ultra Violet

SNC - Sistema Nervoso Central

ANOVA - Análise de Variância

CG-EM- Cromatografia gasosa acoplado em espectrômetro de massa

BR30 - Bandeja Raiz 30 dias

BF30 - Bandeja Folha 30 dias

BR60 - Bandeja Raiz 60 dias

BF60 - Bandeja Folha 60 dias

BI60 - Bandeja Inflorescência 60 dias

BR90 - Bandeja Raiz 90 dias

BF90 - Bandeja Folha 90 dias

BI90 - Bandeja Inflorescência 90 dias

CR60 - Canteiro Raiz 60 dias

CR60 - Canteiro Folha 60 dias

CI60 - Canteiro Inflorescência 60 dias

CR90 - Canteiro Raiz 90 dias

CF90 - Canteiro Folha 90 dias

CI90 - Canteiro Inflorescência 90 dias

1 INTRODUÇÃO

Acmella oleracea (L), popularmente conhecida como jambu ou agrião bravo, pertence à família Asteraceae c. Jansen, é uma planta nativa do Brasil. Na região Norte é amplamente utilizado na medicina popular e na culinária, é altamente apreciado nos principais pratos típicos da região, tendo como característica a dormência e formigamento na boca, causado pelo seu constituinte químico, o espilantol (COSTA, 2014).

Atualmente, o jambu tem sido alvo de pesquisas devido às propriedades promissoras do seu extrato (COSTA, 2014). Nos últimos anos a planta vem sendo cultivada também nas regiões Centro Oeste e Sudeste do Brasil. Em São Paulo ocorre a produção comercial da espécie (com sementes adquiridas de produtores do Estado do Pará) com fins para indústria de cosméticos, e para restaurantes (CAVALCANTI, 2008).

Várias empresas nacionais e internacionais estão investindo em pesquisas e na produção da espécie, uma vez que, o seu uso em produtos tem se intensificado nos últimos anos. Empresas Brasileiras já estão utilizando em suas linhas de mercadorias, o espilantol, principalmente as empresas de cosméticos, aonde o jambu vem sendo fonte de novos produtos com grande destaque no mercado (HOLLANDA, 2012).

Apesar de ser alvo de muito interesse, não há muitos estudos na literatura relacionados à caracterização e quantificação dos compostos bioativos presentes no jambu, especificamente ao espilantol. Ainda são escassas as pesquisas voltadas para esta espécie no que se refere também aos processos de extração. Diante do exposto, considerando a grande importância do princípio ativo do jambu, o espilantol, um estudo detalhado da espécie foi necessário afim de esclarecer características peculiares da planta.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar a concentração de espilantol nas partes aéreas, raízes e inflorescência do jambu (*Acmella oleraceae*) por cromatografia líquida de alta eficiência.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar a colheita do material vegetal em diferentes períodos;
- ✓ Realizar e executar um planejamento de extração de espilantol;
- ✓ Obter os extratos da parte aérea, raiz e inflorescência do jambu;
- ✓ Isolar o espilantol;
- ✓ Construir uma curva de calibração do espilantol;
- ✓ Avaliar a concentração do espilantol presente em diferentes partes do jambu.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 JAMBU (*Acmella oleraceae*)

Acmella oleracea (*Spilanthes oleracea; Spilanthes acmella var.oleracea*) popularmente conhecida no Brasil como jambu (Figura 1) é uma representante da família Asteracea, distribuído em regiões tropicais e subtropicais e contém propriedades químicas importantes. É uma planta muito apreciada na região norte do Brasil, principalmente no Pará, fazendo parte da culinária e medicina popular local. Possui muitos sinônimos populares, como o agrião do Pará (PIMENTEL, 1985), agrião de Brasil, agrião do Norte, jambuaçu, abecedária (CARDOSO & GARCIA, 1997), planta louca, jamburana, erva maluca, botão de ouro e planta da dor de dente (COUTINHO et al., 2006).

Figura 1 - Jambu (*Acmella oleraceae*)

Fonte: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Spilanthes-groundcover-large.jpg

A planta desenvolve-se bem em climas quentes e úmidos, com temperaturas médias de 25,9° C, não tolera secas e baixas temperaturas, tendo seu crescimento prejudicado abaixo de 20º C (BRASIL, 2010), precipitação anual de 2.761 mm ao ano, evapotranspiração potencial de 1.455 mm, umidade relativa do ar 86% e 2.389 horas anuais de luz solar (VILLACHICA et al., 1996).

De acordo com Cardoso & Garcia (1997), é autóctone da América do Sul e mais precisamente da Amazônia (PIMENTEL, 1985), podendo ser encontrada, cultivada ou subespontânea no Brasil, Guianas, Venezuela e Colômbia (CARDOSO & GARCIA, 1997).

As sinoníminas de Acmella oleracea (L.) R.K. Jansen são: Spilanthes oleracea L., Cotula pyretharia L., Pyrethrum spilanthus Medik., Spilanthes acmella var oleracea (L.), Spilanthes fusca MART (LORENZI e MATOS, 2002), Bidens Lan, Bidens fusca Lan, Isocarpa pyrethraria (L.) Cass, Spilanthes radicans Schrad. Ex D. C., Spilanthes oleracea b fusca (Lam.) D. C. (HIND e BIGGS, 2003).

Pode se multiplicar tanto por sementes como por hastes enraizadas. Há relatos do cultivo de jambu na Índia, na América Central, em alguns países da Europa e, sobretudo, na Ásia, onde ele já é plantado para o consumo como alimento (CARDOSO, 1997).

3.1.1 Descrição botânica

Acmella oleracea (L.) R.K. Jansen, é considerada como Angiospema da classe dicotiledônea, caracteriza-se por ser uma planta de clima tropical, herbácea anual, de 30 a 60 cm de altura, de hastes tenras, semi-ereta ou quase rasteira, com caule cilíndrico, carnoso e de ramos decumbentes (FAVORETO e GILBERT, 2010). Possui raiz principal pivotante, com abundantes ramificações laterais e raízes adventícias no caule e nos ramos que estão em contato com o solo (CARDOSO, 1997). Suas folhas são simples, com folhas opostas, espessas, pecioladas, dentadas, cordiformes, dando capítulos terminais, cônicos, pedunculados, com o involucro em duas series (RODRIGUES, 1894), com lâmina amplamente ovada, apresentando pêlos esparsos em ambas as superfícies (HIND e BIGGS, 2003).

As inflorescências são pequenas e amareladas, dispostas em capítulos globosos terminal que medem cerca de 1 cm de diâmetro, com flores hermafroditas (Figura 2, pág.19). As sementes encontram-se localizadas na inflorescência sendo pequenas achatadas e acinzentadas, sua propagação pode ser por semente ou estaquia (CAVALCANTI, 2008; RATNASOORIYA, 2004). O fruto é um aquênio de tamanho reduzido, com pericarpo de cor cinza escuro, parcialmente envolvido por páleas membranosas (CARDOSO,1997).

Figura 2 - Inflorescência do Jambu (Acmella oleraceae)

Fonte: http://www.hibrasil.com.br/jambu/

A cultura do jambu tem o ciclo de 45-70 dias, exige pouca tecnologia para o seu manuseio e é muito cultivado entre os pequenos agricultores. Sua germinação ocorre entre 5-7 dias aproximadamente. A colheita, na Região Norte, é realizada entre 35 a 50 dias após o transplantio (CARDOSO; GARCIA, 1997). No Pará o ciclo da espécie, normalmente é de 90 dias.

3.1.2 Composição química

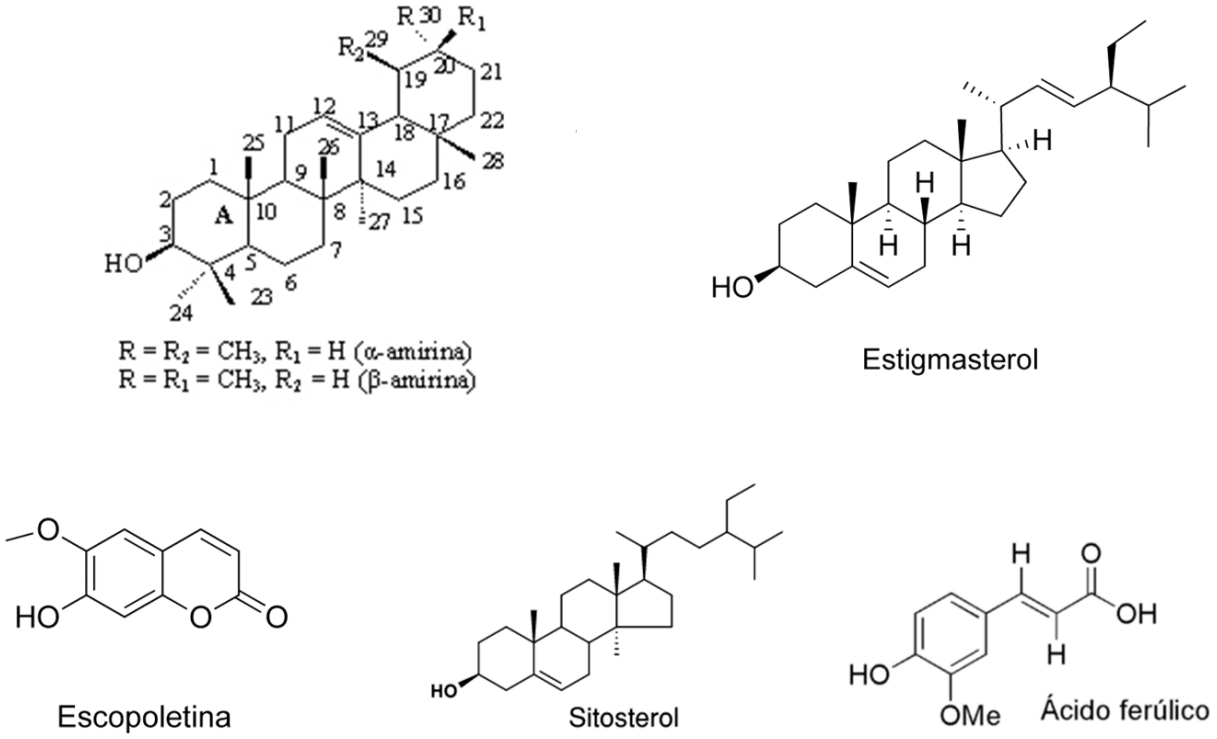
O jambu possui em torno de 0,7 % de óleo essencial e parece conter também flavonóides (LORENZI; MATOS, 2002). O óleo essencial contém um elevado índice de espilantol, e tem despertado grande interesse no mercado (SCIFINDER SCHOLAR, 2006).

O jambu possui bom valor nutritivo. Para cada 100 g de folhas, contém 89,0 g de água, valor energético de aproximadamente 32,0 calorias, 1,9 g proteína, 0,3 g de lipídio, 7,2 g de carboidratos, 1,3 g de fibra, 1,6 g de cinza, 162,0 mg de cálcio, 41,0 mg de fósforo, 4,0 mg de ferro, 0,03 mg de vitamina B1, 0,21 mg de vitamina B2, 1,0 mg de niacina e 20,0 mg de vitamina C (BORGES, 2009).

Em análises realizadas com óleos de jambu, foi possível identificar através da técnica por CG-EM, que o mesmo possui em sua composição, um ácido graxo ômega-6 insaturados (ácido linoleico), na proporção de 56,37%, indicando que a espécie pode ser uma rica fonte de ácidos graxos essenciais (PHRUTIVORAPONGKUL et al., 2008).

A composição química descrita na literatura de substâncias já isoladas de A.oleraceae destaca-se, além do espilantol, a alfa e beta-amirina, estigmasterol, glicosídeos, sitosterol, saponinas, triterpenos, cumarina (escopoletina) e ácido felúrico (LEMOS 2012; PRACHAYASITTIKUL, 2009), Figura 3.

Figura 3 - Estrutura de algumas substâncias encontradas em *A.oleraceae*



O efeito farmacológico da espécie se deve as substâncias químicas, dentre as quais, transcariofileno, germacreno D, L-dodeceno, espatulenol e espilantol (BORGES et al., 2012). Segundo Carvalho e Muller (1996), esta hortaliça é rica em elementos nutritivos como ferro, e ainda possui as vitaminas B1, B2, niacina, vitamina C, vitamina A e cálcio.

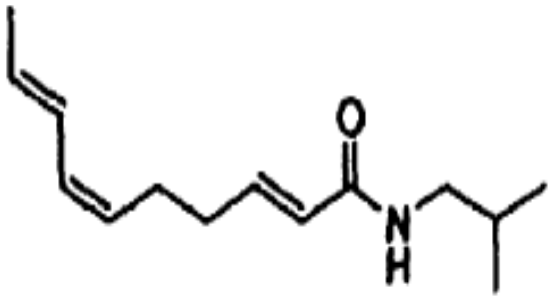
As flores e as folhas de *Spilanthes acmella* contém aminoácidos (MONDAL et al., 1998; PEIRIS et al., 2001), alcalóides (PEIRIS et al., 2001) e Nisobutilamidas (espilantol) (RAMSEWAK et al., 1999), possui em torno de 0,7 % de óleo essencial, além de flavonóides (LORENZI; MATOS, 2002).

3.1.3 Espilantol

O espilantol, substância abundantemente encontrada na espécie *Acmella oleracea*, é uma amida alifática (N-isobutilamidas) de fórmula molecular $C_{14}H_{23}NO$ (Figura 4, pág. 21)

também abundante em outras espécies do gênero *Spilanthes*, descrita como um óleo viscoso ardente, de coloração amarelo claro. Sua composição química, incluindo o espilantol, tem potencial para uso industrial, sendo citado como indicativo para diversas doenças (GUSMÃO et al., 2005), produz um efeito anestésico e de formigamento sobre a língua, daí sua utilização nas afecções da boca e garganta e como tratamento para dores de dentes (BOONEN, 2010).

Figura 4 - Estrutura química do espilantol



Fonte: https://patentados.com/patente/e2-e4-z8-acido-undecatrienico-ester-carboxamida/

O espilantol é um metabólito secundário com alto potencial industrial bem como várias propriedades biológicas e efeitos sanitários (BARBOSA et al., 2016). Nas estruturas químicas contêm um grupo de Amida central (-C (O) NH-), que está ligado a uma cadeia poliinsaturado alifáticos no lado carbonila e um alquilo mais curto corrente no lado da amina. A grande variedade de substituinte possíveis as cadeias/grupos de ambos os lados do grupo Amida levaram ao desenvolvimento de um sistema específico de classificação da alquilamida − Alcamida (DIAS et al., 2017).

A natureza dos resíduos ácidos (comprimento da cadeia carbônica, grau de instauração, estereoquímica etc) e das aminas são características de cada gênero e servem como critério quimiotaxonômico. Tais substâncias são chamadas protoalcaloides porque o átomo de nitrogênio não faz parte de um anel heterocíclico (RIOS, 2012).

Espilantol (ou afim) pode ser encontrado em não apenas *Acmella oleracea*, mas também a. ciliate, a. oppositifolia, a. radicans, a. brachyglossa, A. ciliate, a. oleracea, a. paniculata, a. uliginosa, Welelia parviceps e Heliopsis longipes (CHUNG et al., 2008; PRACHAYASITTUKAL et al., 2013). Muitos dos artigos que descrevem sua presença em H. longipes chamam de afinidade em vez de espilantol (JOHNS et al., 1982; RIOS et al., 2007). As plantas em que é encontrado são muitas vezes chamadas de plantas de dor de dente, devido

ao efeito analgésico de espilantol (HIND E BIGGS, 2003; SHARMA et al., 2012; PRACHAYASITTUKAL et al., 2013; RIOS E OLIVO, 2014). Pode ser extraído das plantas utilizando metanol, etanol, CO_2 supercrítico ou hexano (NAGASHIMA E NAKATANI, 1992; SHARMA et al., 2011; DIAS et al., 2012), além de seu efeito analgésico oral, ele também tem efeitos antibacterianos (DUBEY et al., 2013). As propriedades físicas do espilantol estão apresentadas na tabela 1.

Tabela 1 - Propriedades físicas do espilantol

Fórmula Molecular	$C_{14}H_{23}NO$
Massa Molecular	221 (g/mol)
Ponto de Fusão	23 ºC
Ponto de Ebulição	165 ºC
Índice de Refração (25ºC)	1,5135
Absorção máxima	228,5 nm

Jacobson, (1957)

3.1.4 Atividades biológicas

O espilantol tem bioatividade expressivas a partir dos resultados da análise do mesmo, por conta dos sítios ativos encontrados no vegetal como alcamidas e alquilamidas que ajuda a proteger as plantas a ser um antagonista antibacterianas, antifúngicas, analgésicas e endocanabinoide (VERYSER et al., 2014).

É possível que o espilantol, como outros alquilamidas, pode ter efeitos importantes sobre o sistema nervoso central (SNC) e sistema imunitário (GERTSCH, 2008). No entanto, o seu maior potencial para salvar vidas e melhorar a saúde humana pode ser a sua capacidade de matar os mosquitos que causam a propagação de doenças tropicais como a malária e dengue (PANDEY et al., 2011; HERNÁNDEZ-MORALES et al., 2015). Além disso, tem atividade anticancerosa (SOARES et al., 2014; MISHRA et al., 2015).

Há relatos sobre suas atividades como anticonvulsivante, antioxidante, afrodisíaco, inibidor de lipase pancreática, agente antimicrobiano, agente antinocepitivo, diurético, vasorelaxante, vírus da imunodeficiência anti-humana, alívio da dor de dente e como um

agente antiinflamatório (DUBEY et al., 2013). Ele pode ser absorvido pela pele, intestino endoteliais, mucosa oral e sangue-barreira do cérebro (BOONEN et al., 2010; VERYSER et al., 2014). Pode melhorar a capacidade de cafeína, fortestosterone e cinco micotoxinas para penetrar a pele (DE SPIEGELEER et al., 2013).

Também melhorou o desempenho sexual em ratos macho como indicado pela ereção peniana, frequência de montagem, frequência intromissão, frequência de ejaculação que durou até 14 dias após a interrupção da sua administração (SHARMA et al., 2011). Por conta disso, há o interesse pelo jambu no mercado de sexy shop, pelo estimulo que o mesmo provoca.

Extratos contendo espilantol foram usados para tratar dores de dente, estomatite e doenças cutâneas como o nadador Eczema (BOONEN et al., 2010). Os extratos de espilantol puro são usados em prevenções de mucosa bucal que são indicadas como uma dor na boca e úlceras de boca menor. Várias preparações contendo espilantol para uso bucal estão disponíveis comercialmente (BOONEN et al., 2010). Além disso, o espilantol foi incorporada em pastas de dentes e enxaguamentos bucais. O objetivo é fornecer um sabor mentolado fresco durável; também aumenta a salivação, o que melhora o apetite. O espilantol presente também tem um leve efeito anestésico, permitindo que as pessoas com dor de dente para escovar confortavelmente (HATASA e IIOKA, 1973).

Além disso, espilantol em *A. oleracea* extrai as contrações inibidas em os músculos subcutâneos, nomeadamente os da face, e podem ser utilizados como um produto anti-rugas (DEMARNE E PASSARO, 2009). Como resultado, muitos produtos antienvelhecimento contendo espilantol estão disponíveis.

3.1.5 Importância socioeconômica

O Jambu, por apresentar propriedades previamente descritas, vem despertando o interesse de pesquisadores e empresas, nacionais e multinacionais, farmacêuticas, cosméticas e de alimentos, que vem utilizando essa espécie como matéria prima para os seus produtos (SILVA BORGES et al., 2014), e sendo, atualmente, expandida ao mercado de bebidas.

A partir dos estudos feitos sobre o jambu e seus componentes químicos, ele vem sendo muito utilizado por conta da sua aplicabilidade e relevância em algumas áreas. O consumo da espécie no estado do Pará é bastante difundido, na culinária, as folhas são usadas como tempero compondo diversos pratos típicos, como: pato no tucupi, tacacá, vatapá, assim como sua utilização em novos pratos como o arroz com jambu (arroz paraense), pizza paraense,

bem como outros, isso se deve as suas características peculiares o que lhe acresce alto valor no mercado, elevando a economia da culinária local. Assim como seu alto consumo no mercado de bebida que vem ganhando destaque comercial, sendo considerado a “bola da vez” (HOMA et al., 2011).

O consumo do jambu combinado com o tucupi nos pratos típicos da cultura paraense é frequente o ano todo, no entanto, em datas festivas como: festas juninas, e por ocasião das festividades do Círio de Nazaré em Belém, que é realizado em outubro, esse consumo aumenta, por conta dos muitos turistas que o evento atrai de todos os lugares, elevando sua produção e seu valor, beneficiando a mão-de-obra local desde do seu plantio até sua venda para o consumo.

Essa hortaliça apresenta-se como importante fonte de renda para pequenos produtores dos municípios do Pará, uma vez que é planta de múltiplo uso (condimentar, medicinal e ornamental), reunindo elementos essenciais para formação de um sistema sustentável (GUSMÃO et al., 2003).

Em levantamento realizado com feirantes regionais do Pará, foi registrado o consumo médio de 15 kg/dia. de jambu. O maior produtor da região metropolitana de Belém produz cerca de 3.600 kg/mês (AMAZÔNIA HOJE, 2006). O que gera mão de obra local, haja visto que é consumido o ano todo.

A hortaliça vem ganhando cada vez mais espaço no mundo todo. Na China, os ramos, as folhas e as inflorescências são comercializadas secas e existem diversos pratos considerados iguarias que incluem a erva, eventualmente usada, também, para suavizar pimentas muito ardidas (JOHN, 2011).

3.2 EXTRAÇÃO POR SOXHLET

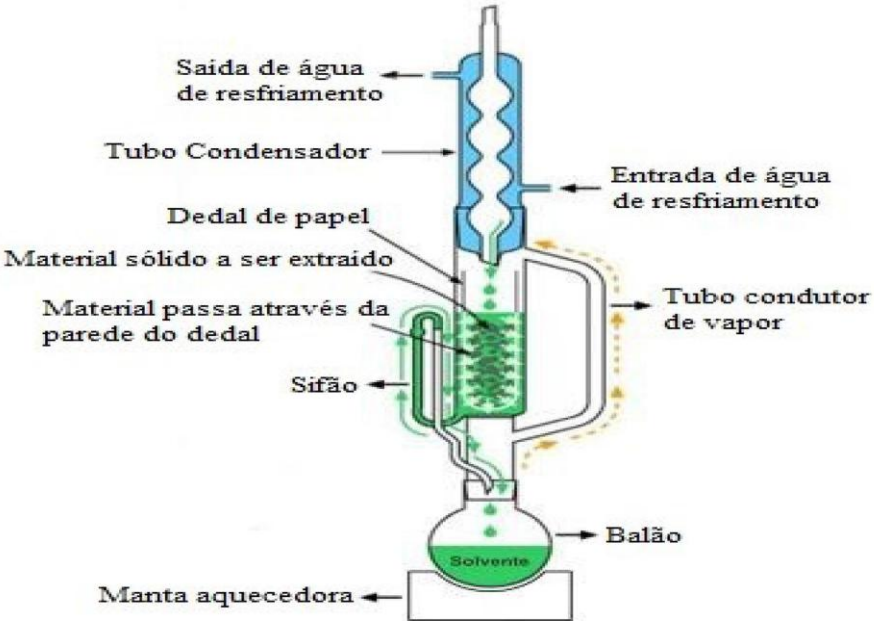
No contexto do estudo de produtos naturais, o termo extração significa retirar, da forma mais seletiva e completa possível, as substâncias ou a fração ativa contida no material vegetal (SONAGLIO et al., 2007). A extração é o primeiro passo para obtenção de produtos naturais a partir de matérias-primas vegetais, sendo influenciada pela natureza química destes, pelo método de extração empregado, pelo solvente, pelo tamanho de partícula do material vegetal, pelo pH do meio extrator, pelo tempo de extração e temperaturas utilizados, pelo emprego de agitação, assim como pela presença de substâncias interferentes (STALIKAS, 2007).

O primeiro aparelho para extração dos lipídios em matrizes graxas foi desenvolvido por Franz von Soxhlet em 1879 que ressaltou a importância do grau de trituração da amostra quanto à duração e eficácia do processo. No processo de liberação extrativa, levam-se em conta três etapas principais: a penetração do solvente no tecido; a formação de uma micela intracelular e, a difusão do extrato na micela externa. Consiste no tratamento sucessivo e intermitente da amostra imersa em um solvente puro (éter de petróleo, éter dietílico ou n-hexano), graças à sifonagem e subsequente condensação do solvente aquecido dentro do balão que está na base do aparelho (BRUM, ARRUDA e REGITANO-D´ARCE, 2009).

A extração por soxhlet consiste praticamente em três divisões: câmara de extração (extrator ou soxhlet), câmara de vaporização (balão de ebulição) e o condensador. A extração ocorre de modo que a amostra está sempre em contato com o solvente, garantindo a renovação efetiva, e efetuada com o solvente em ebulição ou perto a temperatura de ebulição, usando solventes orgânicos voláteis, como: hexano, éter de petróleo, acetona, etanol, dentre outros. O extrator está conectado com o balão através de dois tubos laterais, onde um funciona como sifão.

O extrator de Soxhlet funciona da seguinte maneira: na câmara central do Soxhlet é colocado o substrato a ser extraído, embrulhado em material poroso como papel de filtro ou algodão. No balão abaixo é colocado o solvente extrator. O sistema é levado à ebulição, o solvente evapora e sobe pelo braço lateral, encontra o condensador resfriado e se condensa, gotejando sobre o material a ser extraído. O solvente em contato com o substrato vai extraindo o soluto de interesse, enquanto a câmara central vai se enchendo de solvente. Ao atingir a altura do sifão, todo o solvente desce de volta para o balão por sifonação, juntamente com o soluto extraído, reiniciando o processo. Quando o solvente volta a evaporar, o soluto fica concentrado no balão e apenas solvente puro goteja no substrato (Figura 5, pág. 26). Dessa forma, podem-se realizar inúmeras extrações com um volume reduzido de solvente, sempre concentrando o soluto no balão. Ao final o sistema é removido do aquecimento e o balão é recolhido com o extrato. O substrato é descartado. O solvente pode ser removido do extrato por destilação

Figura 5 - Equipamento Soxhlet convencional



Fonte: Costa et al. (2017).

3.3 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE)

Os métodos analíticos empregados na identificação, separação e representação estrutural de compostos químicos presentes em vegetais são realizadas por várias técnicas cromatográficas. Para obtenção de melhores resultados a partir dessas técnicas a combinação de uma ou mais técnicas cromatográficas se mostra eficaz. Dentre elas está a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

A utilização de perfis cromatográficos para análises de extratos vegetais possibilita obter representatividade dos múltiplos compostos químicos presentes na amostra em uma única análise estabelecendo semelhanças e diferenças entre extratos obtidos sob as mesmas condições de análises (ALAERTS et al., 2007).

A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) consiste em uma técnica analítica de separação, identificação e quantificação de várias substâncias químicas presentes numa amostra. Trata-se de um equipamento considerado indispensável em laboratórios de pesquisa atualmente, devido a sua eficiência e elevado potencial para fins qualitativos e quantitativos (COLLINS et al., 1997).

A CLAE é um tipo de cromatografia líquida que emprega pequenas colunas recheadas de material especialmente preparados em uma fase móvel que é eluida sobre altas pressões. Tem capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de

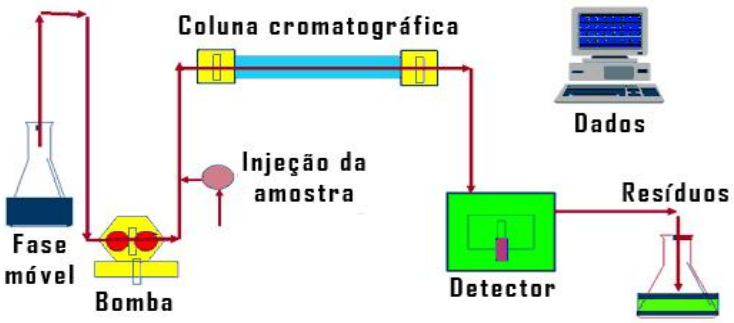
compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos com alta resolução, eficiência e sensibilidade (COLLINS et al., 1997).

Essa técnica consiste em um método físico-químico de separação, que ocorre através de diferentes interações entre as substâncias presentes em uma mistura e na interface entre dois ambientes químicos imiscíveis: a fase estacionária e a fase móvel. Durante a passagem da fase móvel sobre a fase estacionária, os componentes da mistura são distribuídos entre as duas fases, de tal forma que cada um dos componentes é seletivamente retido pela fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes (COLLINS et al., 1997).

Em cromatografia líquida moderna o uso de detectores como Índice de Refração, Ultravioleta, Espalhamento de luz, Fluorescência e outros, aliados a softwares dedicados, permitem a análise quantitativa dos componentes das misturas em concentrações extremamente baixas.

A Figura 6 apresenta uma descrição dos principais componentes da cromatografia líquida, que são: a bomba, que movimenta a fase móvel e a amostra a ser injetada através da coluna; uma coluna, que contém a fase estacionária, geralmente formada por partículas de sílica, porosas, esféricas e diâmetro em torno de 35µm; e um detector, que mostra os tempos de retenção das moléculas, o qual varia de acordo com as interações da amostra como as fases estacionária e móvel e o método empregado. Um recipiente onde é feito o descarte e, o computador onde são processados os dados analíticos (MAVIYA et al., 2010).

Figura 6 - Diagrama de um processo de análise por CLAE



Fonte: http://www.biomedicinabrasil.com/2012/10/metodos-cromatograficos.html

4 METODOLOGIA

4.1 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

Na Tabela 2 estão listados os materiais de uso geral empregados neste estudo, bem como os reagentes/solventes e equipamentos utilizados.

Tabela 2 - Materiais, solventes e equipamentos

Materiais de uso geral		
✓ Balão volumétrico	✓ Proveta	✓ Vial
✓ Balão de fundo redondo	✓ Soxhlet	✓ Papel alumínio
✓ Condensador	✓ Suporte universal	✓ Microfiltros Chromafil ®
✓ Erlenmeyers	✓ Becker	✓ Frasco de vidro
✓ Espátula	✓ Papel filtro	✓ Papel toalha
✓ Garra	✓ Algodão	✓ Tesoura
✓ Pipetas de pasteur	✓ Pêra	
Solventes		
✓ Acetato de etila ($C_4H_8O_2$)	✓ Diclorometano (CH_2Cl_2)	
✓ Água destilada (H_2O)	✓ Etanol (CH_3CH_2OH)	
✓ Acetonitrila (CH_2CN)		
Equipamentos		
✓ Banho Ultrassom (Quimis®)	✓ Balança Analítica (Celtac®)	
✓ Câmara Ultravioleta (Quimis®)	✓ Liquidificador (Mondial power 2i, 400W)	
✓ Estufa de secagem (Quimis®)	✓ Manta aquecedora	
✓ Evaporador rotativo (Quimis®)	✓ Incubadora *shaker* refrigerada (SQ Lab Mod. SL 223)	

4.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.2.1 Material botânico

As amostras de jambu (*Acmella oleraceae*) foram obtidas na horta de um pequeno produtor, localizada no bairro da Liberdade no município de Marabá-PA, a cada dia 1° de cada mês, sendo a primeira colheita em 1º de junho de 2017 e a última no dia 1 de agosto de 2017, resultando assim, as três colheitas estipuladas para o estudo do material. A produção da

hortaliça foi cultivada de forma convencional, ou seja, com uso de fertilizantes. Na produção das mudas utiliza-se a técnica hidropônica com substrato em bandejas. A partir do transplantio das plantas para o canteiro, em torno de 25 a 30, dias foi realizada a adubação química comum até o período da colheita.

4.2.2 Preparo do material para extração

A coleta do jambu foi realizada em 30, 60 e 90 dias, sendo coletadas de bandejas e de canteiros e acondicionadas em sacos plásticos e transportadas até o Laboratório de Ensino I da Faculdade de Química da Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará. O material foi lavado com água corrente para total limpeza e higienização do material, garantindo que todo o resíduo do solo fosse retirado e, em seguida, separado a raiz da folha (para as plantas com 30 dias, bandeja), e raiz, folha e inflorescência (para as plantas de 60 e 90 dias, tanto da bandeja quanto do canteiro). Os dados de coleta estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3 - Dados da coleta do jambu

Local de coleta	Tempo (dias)	Massa material seco (g)	Parte da planta	Código
Bandeja	30	4,414	Raíz	BR30
Bandeja	30	22,682	Folha	BF30
Bandeja	60	3,609	Raíz	BR60
Bandeja	60	25,875	Folha	BF60
Bandeja	60	0,669	Inflorescência	BI60
Bandeja	90	7,420	Raíz	BR90
Bandeja	90	26,371	Folha	BF90
Bandeja	90	2,867	Inflorescência	BI90
Canteiro	*	*	*	-
Canteiro	*	*	*	-
Canteiro	60	3,613	Raíz	CR60
Canteiro	60	50,509	Folha	CF60
Canteiro	60	2,106	Inflorescência	CI60
Canteiro	90	3,689	Raíz	CR90
Canteiro	90	49,875	Folha	CF90
Canteiro	90	29,588	Inflorescência	CI90

* No canteiro, a coleta foi realizada a partir de 60 dias.

O material foi plantado por sementes em bandeja e, após 30 dias de plantio, uma parte foi transplantada para canteiros para que possa se desenvolver adequadamente, e outra parte continuou nas bandejas. O plantio se assemelha aos usados para alface, por conta disso não há material do canteiro disponível para análise no período de 30 dias.

Primeiramente as partes vegetais (raízes, folhas e inflorescências) foram colocadas para secar em temperatura ambiente por 7 dias. Após esse período, o material foi levado separadamente à estufa de secagem por 1 h à uma temperatura de 100 ºC para cada parte do material, para sua completa secagem. Após a secagem, o material foi moído, utilizando-se um liquidificador, pesado em um uma balança analítica e, posteriormente, armazenados em sacos de Kraft à temperatura ambiente para posterior extração.

4.2.3 Planejamento para extração

Através do software *STATGRAPHICS Centurion* foi realizado um planejamento experimental com o objetivo de se verificar qual o melhor solvente para a extração do espilantol do jambu. Os solventes utilizados foram acetonitrila (grau HPLC), etanol (grau HPLC), metanol (grau HPLC) e água ultrapura, variando a concentração dos solventes em cada análise, sendo que o ponto central foi feito em triplicata. A mistura dos solventes foi preparada seguindo um modelo experimental denominado *Simplex Lattice Design* (SLD).

Utilizou-se 27 erlenmeyers contendo em cada um 20mg da inflorescência previamente moída e 25 ml de solvente, variando a proporção em cada experimento, conforme Tabela 4, pág. 31. Os erlenmeyers foram levados a uma incubadora shaker refrigerada SQ Lab Modelo SL 223, com temperatura de 50ºC e agitação constante de 200 rpm por 1 hora. Após este período de 1 hora, o material foi filtrado utilizando uma peneira e transferidos para vials de 1,5 mL utilizando-se microfiltros Chromafil ® Xtra 20/25 0,20 µm. As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência – DIONEX. As eluições foram realizadas utilizando uma coluna analítica DIONEX (150mm x4,6mm de diâmetro interno, tamanho das partículas de 5 µm) com uma coluna de guarda C18 (20mmx4,6mm de diâmetro interno e partículas de 5 µm). O volume de amostra injetado foi de 50 µL. Foi desenvolvido um método com uma eluição isocrática com 35% de água ultra pura (solvente A) e 65% de acetonitrila (solvente B). A temperatura da coluna foi fixada a 30 ° C, a temperatura do amostrador automático foi fixada a 5° C e foi utilizada uma taxa de fluxo de 1,0 mL min^{-1}. Os dados foram coletados usando o software Chromeleon (Versão 6.80) com uma freqüência de aquisição de espectro de 10 Hz.

Tabela 4 - Dados do planejamento de extração utilizando acetonitrila, etanol, metanol e água

Experimento	Metanol (ml)	Etanol (ml)	Acetonitrila (ml)	Água (ml)
1	25.000	0.000	0.000	0.000
2	16.667	8.333	0.000	0.000
3	16.667	0.000	8.333	0.000
4	16.667	0.000	0.000	8.333
5	8.333	16.667	0.000	0.000
6	8.333	8.333	8.333	0.000
7	8.333	8.333	0.000	8.333
8	8.333	0.000	16.667	0.000
9	8.333	0.000	8.333	8.333
10	8.333	0.000	0.000	16.667
11	0.000	25.000	0.000	0.000
12	0.000	16.667	8.333	0.000
13	0.000	16.667	0.000	8.333
14	0.000	8.333	16.667	0.000
15	0.000	8.333	8.333	8.333
16	0.000	8.333	0.000	16.667
17	0.000	0.000	25.000	0.000
18	0.000	0.000	16.667	8.333
19	0.000	0.000	8.333	16.667
20	0.000	0.000	0.000	25.000
21	6.250	6.250	6.250	6.250
22	6.250	6.250	6.250	6.250
23	6.250	6.250	6.250	6.250
24	15.625	3.125	3.125	3.125
25	3.125	15.625	3.125	3.125
26	3.125	3.125	15.625	3.125
27	3.125	3.125	3.125	15.625

4.2.4 Extração do jambu por Soxhlet

A extração das partes da planta: raiz, folha e inflorescência do jambu (30,60 e 90 dias) foi baseado em um processo de extração realizado por Soxhlet, onde foi utilizado uma solução de etanol/água, com proporção 7:3 (mL) como solvente. O sistema de extração (Figura 7, pág. 32) é constituído por um extrator, condensador, manta de aquecimento, banho de refrigeração e um balão de um fundo redondo de 500 mL. O sistema foi deixado em refluxo por 4 h.

Figura 7 - Aparelho de soxhlet com material a ser extraído

Fonte: própria autora

Após a extração, o solvente foi evaporado utilizando-se um evaporador rotativo (Figura 8) a uma temperatura de 80°C, até total evaporação do solvente. O material resultante do balão foi colocado em frascos de vidros previamente pesados. Ao final, obteve-se 14 extratos.

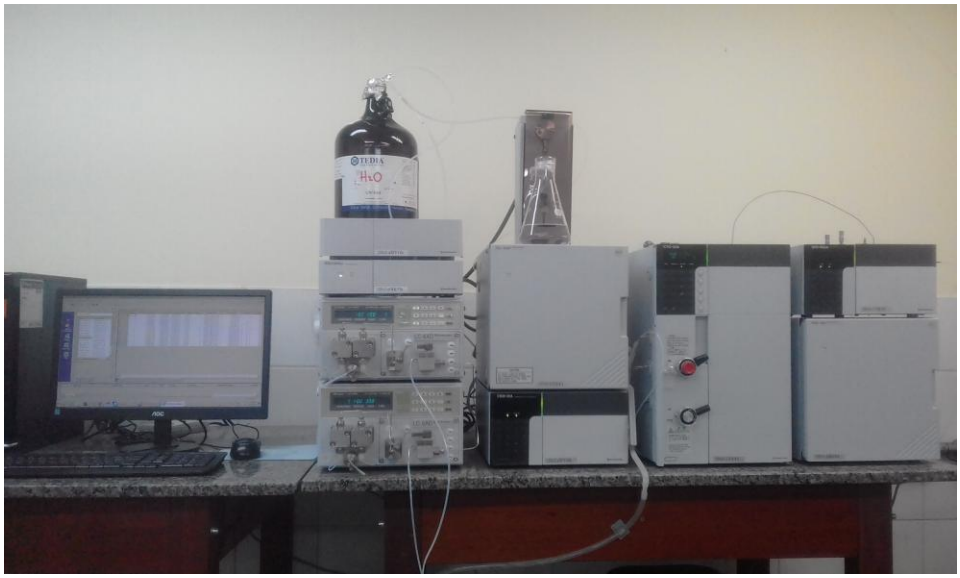
Figura 8 - Evaporador rotativo

Fonte: própria autora

4.2.5 Isolamento do espilantol por CLAE preparativo

Para isolamento do espilantol foi utilizado os extratos da inflorescência obtidos no planejamento e concentrou-o em um rotaevaporador. Foram injetados em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Prominência Shimadzu LC-20AP (Figura 9), composto por duas bonbas de solvente binário (BSM), um compartimento de coluna, um amostrador automático e um detector de matriz de diodos visíveis UV. Foi utilizada uma coluna preparativa C18 de 250 mm x 20,0 mm. Uma eluição gradiente foi realizada com água ultra pura Milli-Q (solvente A) e acetonitrila (solvente B), como se segue: 0-2 min: 40% B, de 2-9 min: gradiente linear de 40 a 95% B, mantida em 95% de B por 2 minutos e, finalmente, aumentou para 40% de B a 11-15 min. A temperatura foi fixada a 30 ° C, a injeção em volume foi de 2000 µL e foi utilizada um fluxo de 10,0 $mL.min^{-1}$. Os dados foram coletados usando o software LC-Solution. Essas condições foram usadas para obter uma melhor resolução para o pico do espilantol.

Figura 9 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência Shimadzu LC-20AP



Fonte: própria autora

4.2.6 Análise analítica para curva de calibração

Primeiramente foi preparada uma solução estoque na concentração de 100ppm utilizando-se metanol (Grau HPLC) como solvente e espilantol puro obtido no item 4.2.5. Foram realizadas diluições sucessivas em triplicata, obtendo-se ao final 15 concentrações: 0,05 mg/mL; 0,10 mg/mL; 0,25 mg/mL; 0,50 mg/mL; 0,75 mg/mL; 1,00 mg/mL; 2,00 mg/mL; 3,00 mg/mL; 4,00 mg/mL; 5,00 mg/mL; 6,00 mg/mL; 7,00 mg/mL; 8,00 mg/mL;

9,00 mg/mL e 10,0 mg/mL que foram injetadas no cromatógrafo líquido de alta eficiência DIONEX, como mostra na Figura 10.

As eluições foram realizadas utilizando uma coluna analítica DIONEX (150mm x4,6mm de diâmetro interno, tamanho das partículas de 5 µm) com uma coluna de guarda C18 (20mmx4,6mm de diâmetro interno e partículas de 5 µm). O volume de amostra injetado foi de 50µL. No entanto, em vez de uma eluição gradiente, utilizou-se uma eluição isocrática com 35% de água ultra pura (solvente A) e 65% de acetonitrila (solvente B). A temperatura da coluna foi fixada a 30 ° C, a temperatura do amostrador automático foi fixada a 5° C e foi utilizada uma taxa de fluxo de 1,0 mL min^{-1}. Os dados foram coletados usando o software Chromeleon (Versão 6.80) com uma freqüência de aquisição de espectro de 10 Hz. Essas condições foram utilizadas para alcançar uma melhor resolução, assimetria e fator de retenção do pico.

Figura 10 - Cromatógrafo líquido de alta eficiência – DIONEX Ultimate 3000

Fonte: própria autora

4.2.7 Análise em CLAE dos extratos brutos

Foram preparadas soluções dos 14 extratos brutos obtidos através do extrator Soxhlet (item 4.2.4), na concentração de 100 mg/mL utilizando uma solução de acetonitrila:água (1:1) e transferidos para vials de 1,5mL utilizando microfiltros Chromafil ® Xtra 20/25 0,20 µm. As amostras foram analisadas nas mesmas condições cromatográficas utilizadas para obtenção da curva de calibração descrito no item 4.2.6.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PLANEJAMENTO PARA EXTRAÇÃO

O modelo SLD visou encontrar a composição de solvente que fornecesse a extração máxima de espilantol medida pela área do pico cromatográfico, usando o procedimento de eluição descrito no item 4.2.3. Os coeficientes do modelo foram validados pela análise de variância (ANOVA) e os coeficientes não significativos foram removidos da equação do modelo antes da construção da superfície de resposta.

Um modelo cúbico foi considerado satisfatório para explicar os dados experimentais, resultando em uma variação de 91,28% e valores adequados de F e p. O modelo de construção apresenta valor F maior do que o valor tabulado e *p* inferior a 0,05.

A Figura 11 (pág. 37) mostra as quatro superfícies de resposta e as construções de contornos para as misturas de três solventes, com os coeficientes estimados do modelo (Tabela 5) que apresentam valor *p* inferior a 0,05. A resposta pode ser prevista multiplicando os coeficientes estimados pela proporção de solvente, onde a proporção máxima é 1.

O valor ideal, onde a área de pico é máxima, corresponde a 100% do etanol, resultando em uma área estimada de 3,328 mAu/min, que é realmente próximo ao valor experimental que é 3,1087 mAu/ min, apresentando um erro relativo de 2,44%. Como se pode ver na Figura 11 (pág. 37), o solvente com uma proporção de 14, 7 ml de acetonitrila e 10,93 ml de água resulta numa área prevista de 2,872 mAu/min, que é ligeiramente inferior àquela obtida com etanol puro. Outra proporção solvente com alta área prevista do espilantol é a mistura de acetonitrila, metanol e etanol em proporções iguais, resultando em uma área de 2,7907 mAu/ min. Para validar este modelo experimental, a extração foi realizada com solvente contendo acetonitrila e proporção de água.

Figura 11 - Superfícies de resposta e contornos para misturas de três solventes

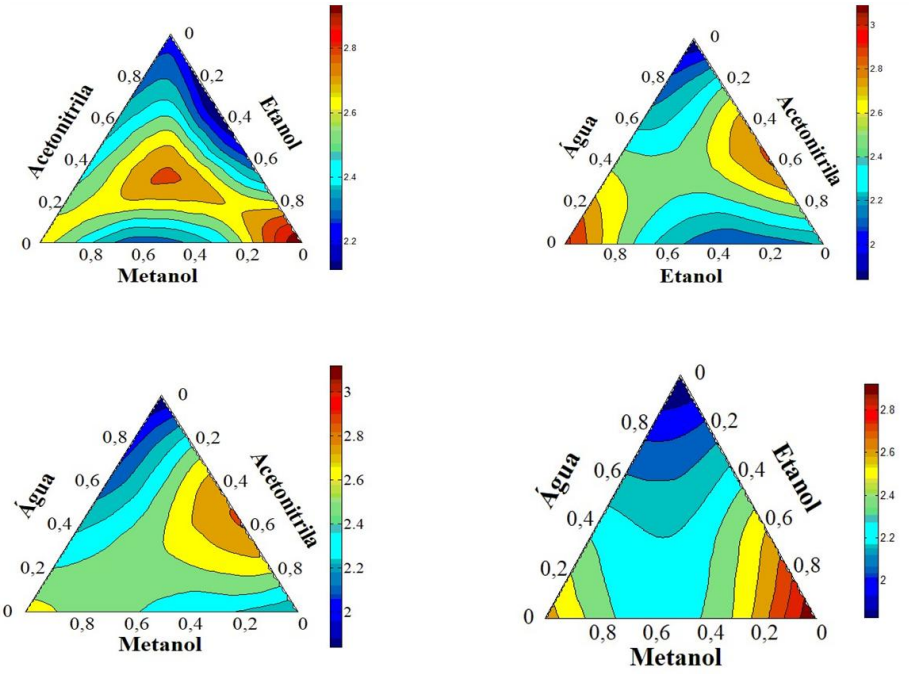


Tabela 5 - Coeficiente estimado para os termos significativos do modelo de compilação de rede simples.

Solvente	Coeficiente estimado*
Metanol	2.65 (± 0.15)
Etanol	3.03 (± 0.17)
Acetonitrila	2.24 (± 0.17)
Água	1.82 (± 0.15)
Metanol e etanol	-2.01 (± 0.84)
Etanol e acetonitrila	-1.78 (± 0.84)
Acetonitrila e água	3.31 (± 0.80)
Metanol, acetonitrila e etanol	15.46 (± 5.60)

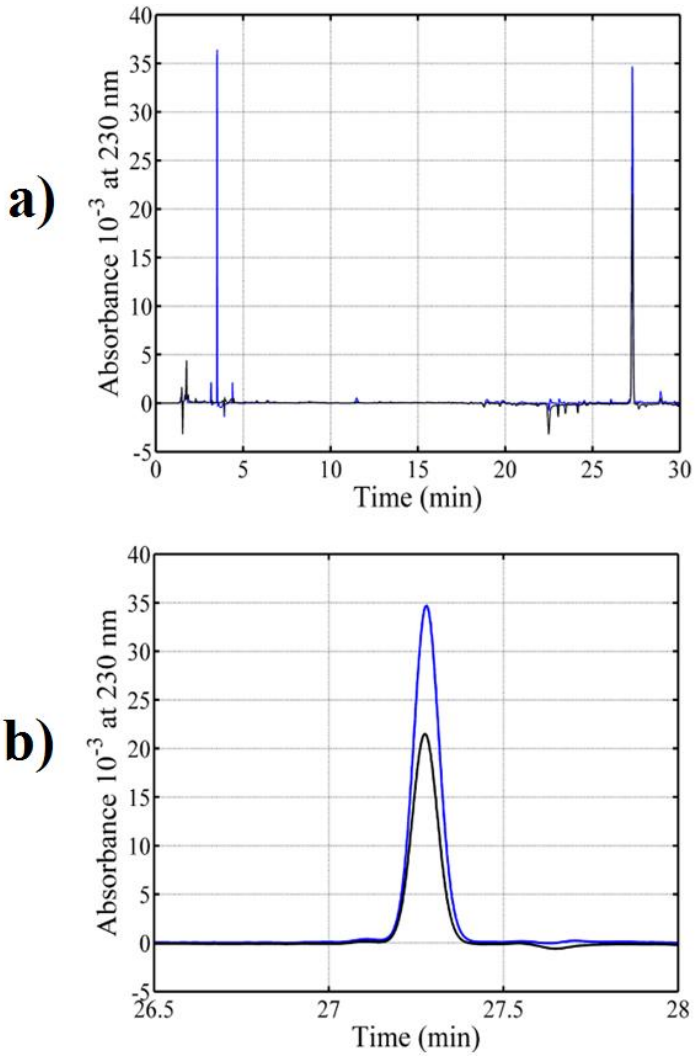
*desvio padrão descrito entre parenteses

A Figura 12 (a) (pág. 38) mostra os cromatogramas do extrato de inflorescência obtido de 20 mg de material. A linha azul representa o cromatograma obtido com extração utilizando 100% etanol; a linha preta utilizando 100% de água; a linha vermelha: proporção de 56,3: 43,7% v/v de acetonitrila:água e a linha verde em proporções iguais de acetonitrila: metanol: etanol. Pode-se observar que o pico de espilantol para o solvente com etanol puro, resulta em

uma área de pico mais alta que as demais e que sua absorção máxima no ultravioleta é de 230nm, Figura 12 (b).

Apesar de outras proporções de solvente apresentarem uma boa extração de espilantol, para uma extração de rotina, o etanol é preferível como um solvente de extração devido à sua menor toxicidade.

Figura 12 – (a) - Cromatogramas sobrepostos registrados a 230 nm do extrato de inflorescencia do jambu com etanol (—), água (—), acetonitrila: água (—) e proporção de acetonitrila: metanol: etanol (—). (b) Expansão do pico do espilantol



5.2 Obtenção dos extratos

Optou-se por realizar a extração por soxhlet utilizando etanol:água (7:3) devido alta volatilidade do etanol. Tabela 6 (pág. 39) mostra o rendimento dos extratos obtidos a partir do seu respectivo material seco.

Tabela 6 - Dados da coleta do jambu

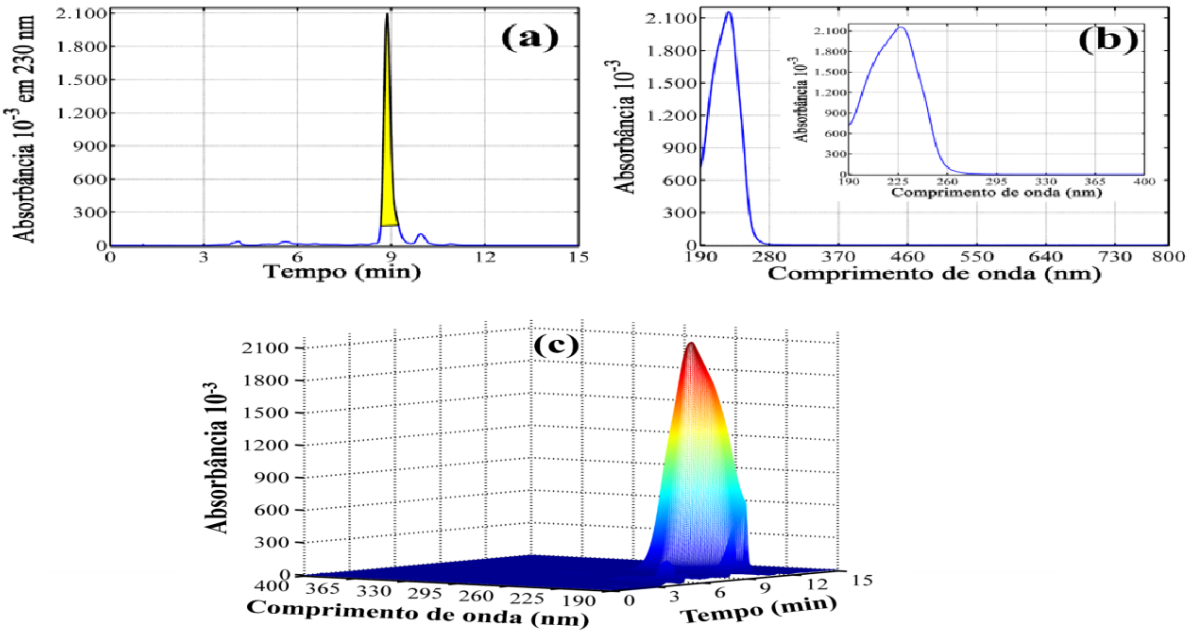
Código	Massa material seco (g)	Massa Extrato (g)	Rendimento (%)
BR30	4,414	0,400	9,06
BF30	22,682	3,073	13,55
BR60	3,609	0,107	2,96
BF60	25,875	3,290	12,71
BI60	0,669	0,051	7,40
BR90	7,420	0,545	7,35
BF90	26,371	4,745	17,99
BI90	2,867	0,480	16,74
CR60	3,613	0,095	2,63
CR60	50,509	8,901	17,62
CI60	2,106	0,289	13,72
CR90	3,689	0,857	23,24
CF90	49,875	9,758	19,56
CI90	29,588	7,127	24,09

Cavalcanti (2008) relata que alguns processos adotados como a extração supercrítica e Soxhlet (não relatando a proporção de solvente utilizada), levam a rendimento bem elevados (25,7%-65,4%), no entanto, relata que após a extração são utilizadas etapas de recuperação do componente na operação. Pode-se observar que o rendimento de extração máximo obtido foi para o CI90 onde foi de 24,09%, de acordo com Furlan (1999), os métodos extrativos e os solventes utilizados também influenciam na seletividade de sua extração. Pode-se supor que, como a finalidade era de se extrair a maior quantidade possível de espilantol, o solvente foi adequado, porém, o rendimento não foi alto devido não ter extraído demais compostos do material vegetal.

5.3 ISOLAMENTO DO ESPILANTOL

Pode-se observar através do cromatograma obtido do extrato das inflorescências do jambu CI60, que o espilantol é o composto majoritário Figura 13 (a) (pág. 40), onde o mesmo apresenta absorção máxima no ultravioleta no comprimento de onda de 230nm Figura 13 (b) (pág. 40), condizendo com o observado no item 5.2. Na Figura 13 (c) (pág. 40) pode-se observar o cromatograma tridimensional do extrato, onde a área vermelha representa o λ máximo. A área em amarelo representado na Figura 13 (a) (pág. 40) é a fração coletada do espilantol puro.

Figura 13 - Cromatograma do extrato CI60, obtido no CLAE Shimadzu Preparativo



5.4 Obtenção da curva de calibração

Utilizando eluição no modo isocrático, no item 4.2.6, foi possível obter uma boa separação da banda do analito de interesse dos outros compostos presentes na matriz e um perfil cromatográfico satisfatório para todos os extratos para assim comparar, qualificar e quantificar o espilantol em todas as amostras de *A. Oleracae*. Esses cromatogramas foram monitorados em quatro comprimentos de onda: 200, 228, 230 e 240 nm, sendo o melhor comprimento para o espilantol o de 230nm (figura 14 (b), pág.41), conforme já tinha se verificado no item 5.4.

A Figura 14 (a) (pág. 41) representa um dos cromatogramas adquiridos para construção da curva de calibração. O tempo de retenção não apresenta mudanças significativas, a assimetria de pico é de 1,03 com largura inferior a 0,19 min, não há mudanças na forma de pico presentes entre eluições e a pureza do pico é superior a 99,8% (Figura 14 (b), pág. 41), mesmo para o nível de concentração mais baixo.

Todos esses parâmetros indicam a boa qualidade do método isocrático desenvolvido, onde o pico de espilantol é eluido em menos de 8 min. A ANOVA foi utilizada para avaliar a construção do modelo com os valores médios da área do pico do espilantol das três injeções de cada um dos 15 níveis de concentração preparados em triplicata. Inicialmente, realizou-se um teste de hipóteses na intercepção e inclinação. A intercepção estimada é estatisticamente

igual a zero, conforme confirmado pelo valor p superior a 0,05, e o intervalo confiante contendo o valor nulo. Por outro lado, o mesmo parâmetro indica que a inclinação tem um valor significativo. A curva de calibração obtida está representada na Figura 15 (pág. 42). Assim, o teste ANOVA foi realizado com a interceptação do modelo forçada a ser igual a zero, resultando em uma inclinação de 5.1832 mAu /min * mg / L^{-1}. A ANOVA realizada para as amostras de calibração apresenta valores de F e p, que indicam que o modelo possui uma regressão significativa e variância superior a 99%.

Figura 14 - (a) Cromatograma do espilantol na concentração de 0,75 mg/mL; (b) Dados do pico do espilantol e Espectro de Ultra violeta em 230nm.

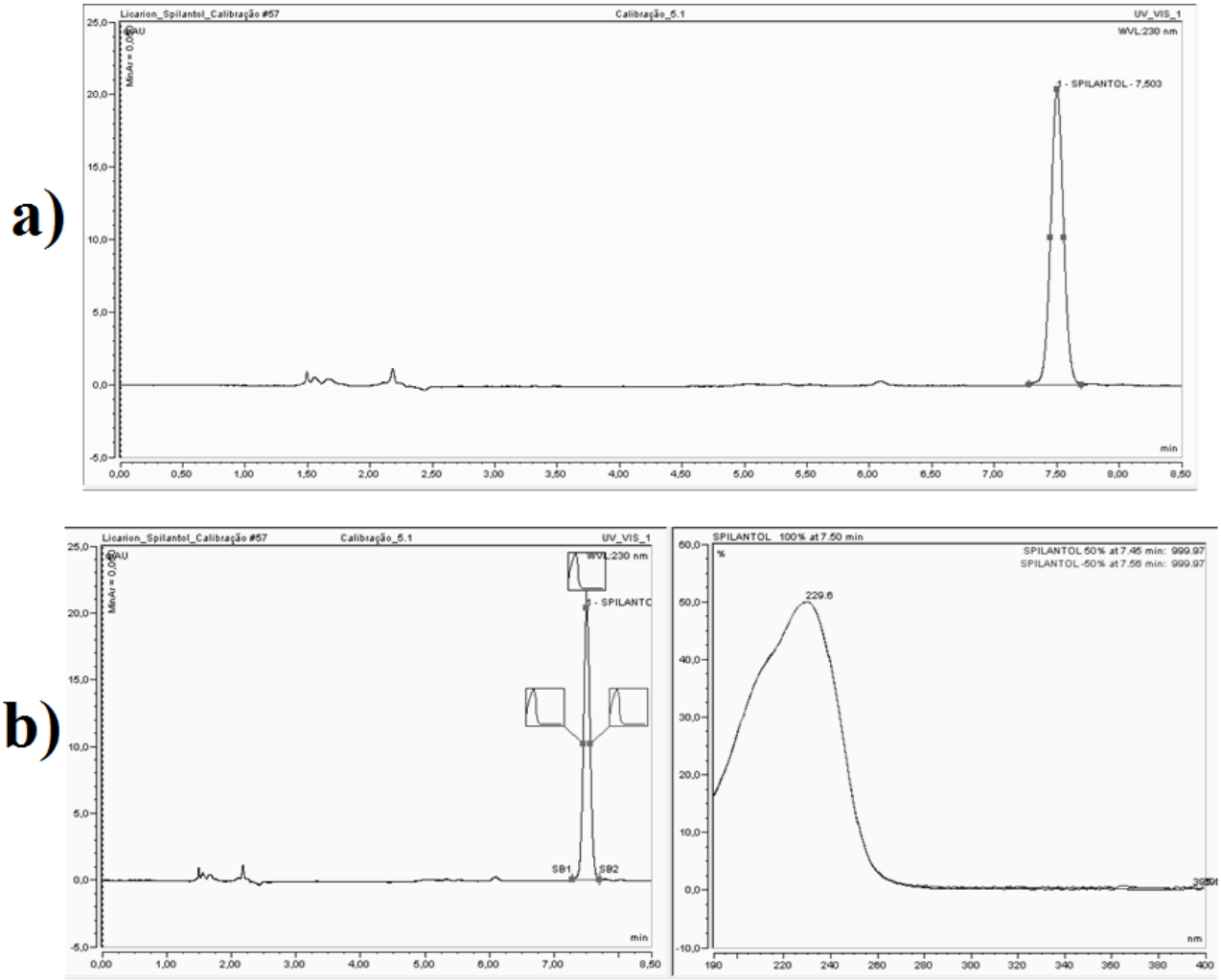
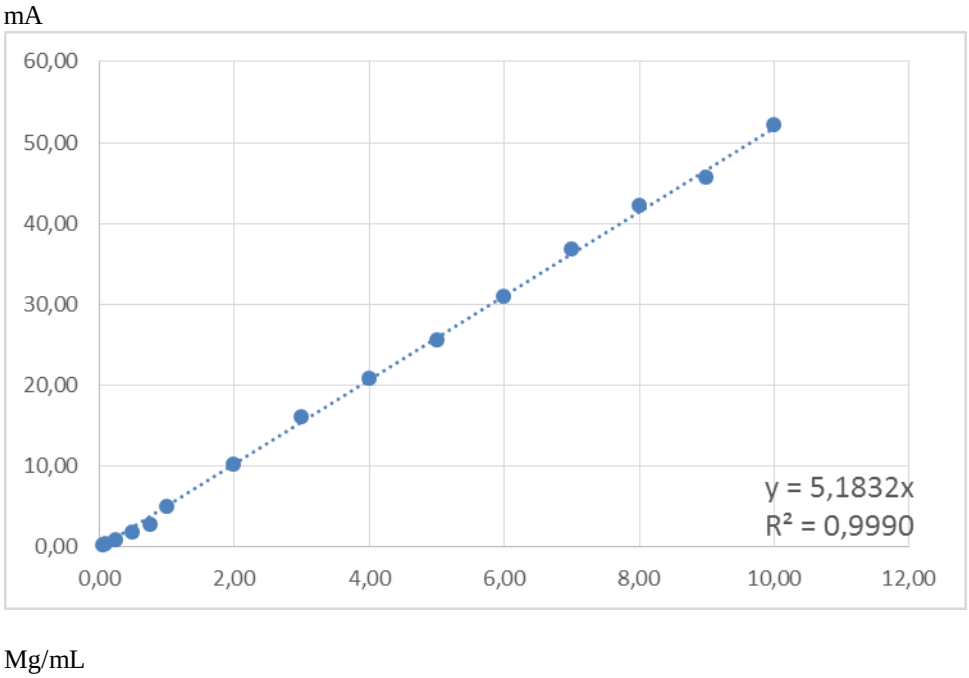


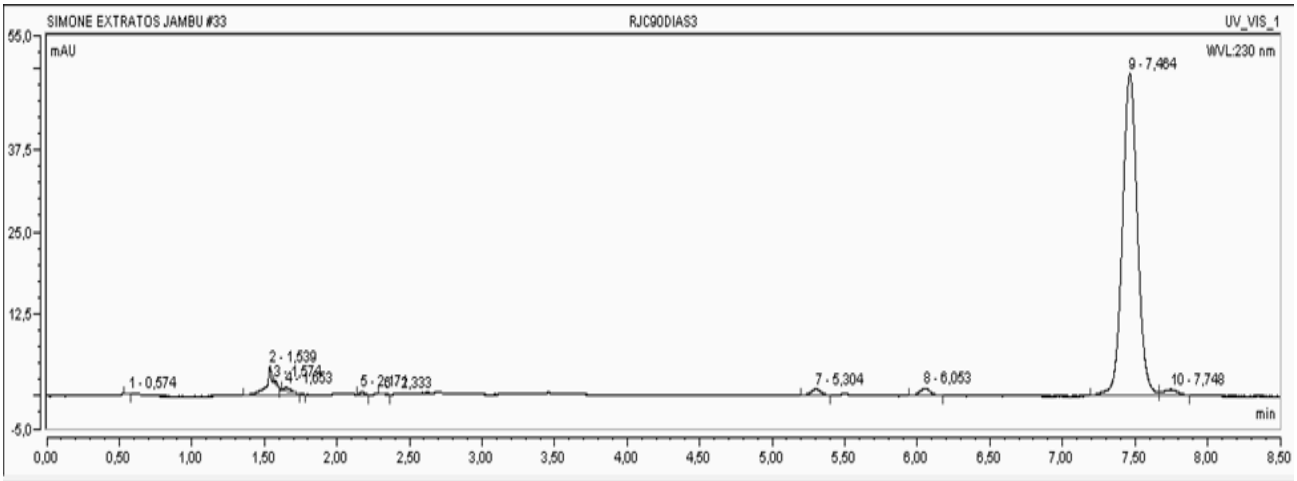
Figura 15 - Curva de calibração do espilantol



5.4 ANÁLISE EM CLAE DOS EXTRATOS BRUTOS

A Figura 16 representa o cromatograma CI60 do extrato do jambu, com o pico referente ao espilantol (T_R=7,47 min), todos os extratos analisados apresentaram seus cromatogramas similares, ou seja, tiveram o mesmo perfil cromatográfico, variando somente a intensidade dos sinais obtidos. Optou-se pelo cromatograma do CI60, pela banda cromatográfica do espilantol aparecer mais intensa. Observa-se através da Figura 16, que o extrato apresenta como composto majoritário o espilantol, no comprimento de onda selecionado (230nm).

Figura 16 - Cromatograma do extrato CI60 obtido por CLAE, 230nm.



Na tabela 7 estão representadas as concentrações de espilantol obtidas para cada um dos extratos analisados na concentração de 100 ppm.

Tabela 7 - Concentração de espilantol 30, 60 e 90 dias em diferentes partes de *A. oleraceae*

Código	INFLORESCÊNCIA		Código	FOLHAS		Código	RAIZ	
			BF30	30 bandeja	4,1ppm	BR30	30 bandeja	0,01ppm
CI60	60 canteiro	6,4ppm	CF60	60 canteiro	10,1ppm	CR60	60 canteiro	1,5ppm
BI60	60 bandeja	5,1ppm	BF60	60 bandeja	9,5ppm	BR60	60 bandeja	0,9ppm
CI90	90 canteiro	8,4ppm	CF90	90 canteiro	3,7ppm	CR90	90 canteiro	1,0ppm
BI90	90 bandeja	7,9ppm	BF90	90 bandeja	2,1ppm	BR90	90 bandeja	0,94ppm

Na tabela 7 encontra-se representado o tempo de cultivo, a local de cultivo, as diferentes partes do jambu e a concentração de espilantol obtido em 100 ppm de extrato bruto. Pode-se observar que a espécie, quando cultivada em canteiros, produz uma maior quantidade de espilantol, quando se comparada a espécie quando cultivada em bandejas, em qualquer período.

A maior concentração do espilantol no jambu cultivado no canteiro pode ser explicado pelos nutrientes que a planta absorve do solo além dos nutrientes adicionado durante seu cultivo, enquanto que a planta que é cultivada apenas em bandeja está absorvendo somente esses nutrientes que foram colocados durante o cultivo, o que pode está influenciando diretamente na baixa concentração do espilantol no jambu cultivado em bandejas.

Infere-se também que, a melhor época para colheita do jambu, para se obter uma maior quantidade de espilantol é aos 60 dias, pois nesse período, há uma maior concentração de espilantol em suas folhas, parte essa mais utilizada para consumo. Após 60 dias observa-se que há uma “translocação” do espilantol das folhas para as inflorescências, diminuindo assim, sua concentração nas folhas e aumentando a concentração do composto nas inflorescências.

Os resultados obtidos estão em concordância com Dias e colaboradores (2012) onde nos estudos realizados com a espécie *Acmella spilanthus*, os autores também observaram que o espilantol se concentrava nas partes aéreas da espécie.

6 CONCLUSÃO

O estudo realizado permitiu conhecimento de solvente adequado para extração do espilantol de *A.oleraceae*, além da investigação da melhor época e local de colheita do jambu baseado na concentração do espilantol em diferentes partes estudadas.

Para isso, o desenvolvimento de um planejamento experimental para escolher o solvente ideal para uma melhor extração da amostra foi fundamental. A partir desse planejamento foi comprovado que o melhor solvente para extração do material foi o etanol e acetonitrila o que corrobora com a literatura. No entanto, o acetonitrila não é usado por conta do seu alto custo e por ser nocivo à saúde quando em contato contínuo, sendo o etanol utilizado como melhor solvente para extração.

O emprego da CLAE possibilitou a separação de bandas cromatográficas utilizando uma coluna C18, com ajuda do detector com espectrômetro de diodo e tendo como fase móvel acetonitrila e água, sendo possível considerar como um método econômico, rápido e livre de interferentes capazes de caracterizar e diferenciar as amostras de *A. Oleracea* analisadas.

O método quantitativo aplicado nos extratos de *A. Oleracea* demonstrou que há variações na concentração de espilantol nas diferentes partes estudadas, onde é encontrado uma maior quantidade nas folhas do jambu.

Ainda não há padrão puro do espilantol vendido comercialmente, para análises de alimentos, bebidas, cosméticos e demais finalidades onde atualmente esse composto vem sendo muito utilizado. Dessa forma, o procedimento estudado para o isolamento do espilantol pode contribuir para as análises do espilantol nesses materiais.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALAERTS, G.; MATTHIJS, N.; VERBEKE, J.; HEYDEN Y. Cromatographic fingerprint development for herbal extracts: A screening and optimization methodology on monolithi columns. Journal Chromatographya. v. 1172, n. 1-8, 2007.

AMAZÔNIA hoje. Disponível em: <http:/googlescholar.amazoniahoje.com.br>. Acesso em:30 jan. 2018.

BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASO. C.L.F.; GUIMARÃES, E.F.; LIMA, H.C. **Sistemática de Angiosperma do Brasil.** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. V.3. p. 237-315. 1991.

BOONEN, J.; BAERT, B.; BURVENICH, C.; BLONDEEL, P.; DE SAEGET, S.; DE SPIEGELEER, B., 2010. **Perfil de LC-MS de N-alquilamidas no extrato de Spilanthes acmella e comportamento transmucosal é o principal spilanthol bioativo.** J. Pharm. Biomed. Anal. 53, 243-249.

BORGES, L.S. **Biomassa, teores de nutrientes, espilantol e atividade antioxidante em plantas de Jambu (Acmella ciliata kunth) sob adubação mineral e orgânica.** Dissertação (Mestrado em agronomia/Horticultura). Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu-SP, P.108, 2009.

BRASIL, Ministério da saúde. **Alimentos Regionais Brasileiros**. 1ª ed. Brasília: Secretaria de políticas de Saúde, Coordenação-Geral de Políticas de Alimentação e Nutrição, p. 140, 2002.

BRUM, AELSON A. S.; ARRUDA, Lia F.; REGITANO-D'ARCE, Marisa A. B. **Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal**. **Química Nova**, v.32, n.4, p. 849-854, 2009.

CARDOSO, M.O.; GARCIA, L.C. 1997. Jambu (*Spilanthes oleracea* L.). In: Cardoso, M.O. (Coord.) **Hortaliças não-convencionais da Amazônia**. Embrapa-SPI, Brasília; EmbrapaCPAA, Manaus, Brasil. p. 133-140.

CAVALCANTI, V. M.S. **Extração de espilantol de Spilanthes acmella var oleraceae com dióxido de carbono supercrítico.** Tese (Doutorado em Química)- Universidade Estadual de Campinas, p. 144, 2008.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L. e BONATO, P.S. **Introdução a métodos cromatográficos.** 7ª ed. Campinas: Editora da Unicamp, p. 262, 1993.

COSTA, F.A.; DINIZ, M.B.; FARIA, A.M.M; SANTOS, J.N.A. COSTA, J.A. **O Círio de Najaré de Belém do Pará: economia e fé.** Amazônia: Ciências & Desenvolvimento, Belém, v. 3 n. 6 p 93-125, 2008.

COSTA, S. S. **Extração de espilantol assistida por micro-ondas a partir de flores, folhas e caules de jambu (*Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen).** Tese (Doutorado em Química) - Campinas, SP, p.100, 2014.

COSTA, K.A.; GUIMARÃES, A.C.R.; REIS, M.M.; SANTANA, C.S.A. **Study of controlled leaching process of steel slag in soxhlet extractor aiming employment in pavements.** Matéria (Rio J.), vol.22 nº 2, Rio de Janeiro, 2017.

CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**, Columbia University Press, New York. 2. Ed. p. 555, 1988.

COUTINHO, L.N.; Aparecido, C.C.; Figueiredo, M.B. 2006**. Galhas e deformação em jambu (*Spilanthes oleraceae*) causadas por *Tecaphora spilanthes* (Ustilaginales). *Summa Phytopathologica*** 32: 283- 285.

CHUNG, K.-F., KONO, Y., WANG, C.-M., PENG, C.I., 2008. **Notas sobre Acmella (Asteraceae: Heliantheae) em Taiwan**. Robô. Viga. 49, 73-82.

DEMARNE, F., PASSARO, G., 2009**. Utilização de um extracto de Acmella oleracea para o efeito de toxina botulínica em uma composição cosmética anti-rugas.** Patente US No. 7,531,193 B2.

DE SPIEGELEER, B., BOONEN, J., MALYSHEVA, SV, DI MAVUNGU, JD, DE SAEGER, S., ROCHE, N., BLONDEEL, P., TAEVERNIER, L., VERYSER, L., 2013. **Penetração da pele potenciando as propriedades do spilanthol da planta N-alquilamida.** J. Ethnopharmacol. 148, 117-125.

DIAS, A.M.A.; SANTOS, P.; SEABRA, I.J.; JÚNIOR, R.N.C.; BRAGA, M.E.M.; SOUSA, H.C. **Espilanthol from Espilanthes acmella flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction.** The Journal of Supercritical Fluids, v. 61, p. 62-70, 2012.

DUBEY, S., MAITY, S., SINGH, M., SARAF, S.A., SAHA, S., 2013. **Fitoquímica, farmacologia e toxicologia de Spilanthes acmella:** uma revisão. Adv. Pharmacol. Sci., ID do artigo 423750.

FAVORETO, R.; GILBERT, B. ***Acmella oleracea* (L) R.K. Jansen (Asteracea)-Jambu**. Revista fitos, v. 5, n. 1, p. 83-90, 2010.

FURLAN, E. Old Pne on the southern hemisphere interacting with the ISM. 1999. Thesis (Master)-University Innsbruck, Austria, 1999.

GERTSCH, J., 2008. **Lipídios imunomoduladores em plantas: amidos de ácidos gordurosos vegetais e sistema endocannabinoide humano.** Planta Med. 74, 638-650.

GUSMÃO, M.T.A.; GUSMÃO, S.A.L. **Jambu da Amazônia (*acmella oleraceae* (L.) R. K. Jansen): características gerais, cultivo convencional, organânico e hidropônico.** Belém: Universidade Federal Rural da Amazônia, 1ª ed, p. 135 p, 2013.

GUSMÃO, S.A.L., GUSMÃO, M.T.A., VELASCO, W. SILVESTRE, D., LOPES, P.R.A. **Característica do cultivo de jambu nas áreas produtoras que abastecem a grande Belém.** Associação Brasileira de Horticultura. Congresso Brasileiro de Olericultura, p. 1-4, 2006.

HATASA, S., IIOKA, I., 1973. **Composições que contêm spilantol para uso oral**. Patente U.S. N ° 3 720 762.

HERNÁNDEZ-MORALES, A., ARVIZU-GÓMEZ, JL, CARRANZA-ÁLVAREZ, C., GÓMEZ-LUNA, BE, ALVARDO-SÁNCHEZ, B., RAMIREZ-CHÁVEZ, E., MOLINA-TORRES, J., 2015. **Larvicida atividade de affinin e suas amidas derivadas de Heliopsis longipes A. Gray Blake contra Anopheles albimanus e Aedes aegypti**. J. Asia-Pacific Entomol. 18, 227-231.

HIND, N.; BIGGS, N. ***Acmella oleracea*: compositae. Curtis´s Botancial Magazine**, v. 20, n.1, p. 31-39, 2003.

HOLLANDA, E. **O efeito anestésico do jambu na coleção da Natura**. Disponível em: http://g1.globo.com/pa/para/noticia/2013/12/jambu-e-estudado-pela-industria-farmaceutica-para-ser-anestesico.html Acesso em: 20 de fevereiro de 2018.

HOMA, A.K.O.; SANCHERS, R.S.; MENEZES, A.J.E.A.; GUSMÃO, S.A.L. **Etnocultivo do Jambu para abastecimento da cidade de Belém, estado do Pará.** Amazônia: Ciências & Desenvolvimento , Belém, v. 6, n. 12, p. 125-141, 2011.

JACOBSON, M. **The structure of spilanthol. Chwmistry and Industry**, n.2, p. 50-51. 1957.

JOHNS, T.; GRAHAM, K.; TOWERS, G.H.N., 1982. **Atividade moluscicida de afina e outras isobutilamidas das Asteraceae. Fitoquímica.** 21, 2737-2738.

LEMOS, T.L.G.; PESSOA, O.D.L.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A. **O óleo essencial de Spilanthes acmella Murr**. J Essent Oil Res. 1991; 3 (5): 369-370.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas exótivcas cultivadas.** Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum. P. 396, 2002.

MALVIYA, R.; BANSAL, V.; PAL, O. P.; SHARMA, P.K. **High performance liquid chromatography: a short review.** Journal of Global Pharma Tchnology, v. 2, p. 2226, 2010.

MISHRA, A., ROY, S., MAIDADE, S., YADAV, R.K., KESHARI, A.K., SAHA, S., 2015. **Efeito antiproliferativo de extratos de flores de Spilanthes paniculata em células de carcinoma hepático.** Int. J. Pharm. Sci. 7, 130-134.

MONDAL, A. K.; PARUI, S.; MANDAL, S. **Analysis of the free amino acid content in pollen of nine Asteraceae species of known allergenic activity.** Annual Agriculture and Environment Medicine, v. 5, p. 17–20, 1998.

NAGASHIMA, M.; NAKATANI, N. **LC-MS and structure determination of pugent alkamides from Spilanthes acmella L flowers**. Food Science Technology, v. 25, p. 417-421, 1992.

NICÉSIO, R.G. **Conheça os métodos cromatográficos**. Disponível em: <http://www.biomedicinabrasil.com/2012/10/metodos-cromatograficos.html>. Acessado em: 18/02/2018.

PANDEY, V., CHOPRA, M., AGRAWAL, V., 2011. **Isolamento in vitro e caracterização de compostos biolarvicida de plantas micropropogadas de Spilanthes acmela**. Parasitol. Res. 108, 297-304.

PEIRIS, K. P. P.; SILVA, G. K. J.; RATNASOORIYA, W. D. **Analgesic activity of water extract of Spilanthes acmella flowers on rats**. Journal of Tropical Medicinal Plants, v. 2, p. 201-204, 2001.

PHRUTIVORAPONGKUL, A.; CHAIWON, A.; VEJABHIKUL, S.; NETISINGHA, W.; CHANSAKAOW, S. **An anesthesic slkamide ande fixed oil from Acmella Oleraceae.** J. Health Res. V. 22, p. 97-99, 2008.

PIMENTEL, A. A.M.P **Olericultura no trópico úmido: hortaliças na Amazônia**. São Paulo: Agronômia Ceres, p. 322, 1985.

PRACHAYASITTUKAL, V., PRACHAYASITTUKAL, S., RUCHIWARAT, S., PRACHAYASITTUKAL, V., 2013. **Alto potencial terapêutico da Spilanthes acmella: uma revisão.** EXCLI J. 12, 291-312.

RAMSEWAK, R. S.; ERICKSON, A. J.; NAIR, M. G. **Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of Spilanthes acmella. Phytochemistry.** v. 51, p. 729–732, 1999.

RIOS, M.Y., AGUILAR-GUADARRAMA, A.B., GUTIERREZ, M.D., 2007. **Atividade analgésica da afinina, uma alcalamida de Heliopsis longipes (Compositae).** J. Ethnopharmacol. 110, 364-367.

RIOS, M.R., OLIVO, H.F., 2014. **Aminas de alquilamina naturais e sintéticas: aplicações na terapia da dor. Em: Atta-Ur-Rahman (Ed.), Estudos em Química de Produtos Naturais**. Else-vier, Nova York, pp. 79-118.

RODRIGUES, J.B. **Hortus fluminensis ou breve notícia sobre as plantas cultivadas no Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Rio de Janeiro: Typ. Leuzinger, p. 348, 1894.

SCIFINDER Scholar. Disponível em: <http://www.google scholar.com.br /scholar >. Acesso em: 30 de jan. 2018.

VILACHICA, H.; CARVALHO, J.E.U.; MULLER, C.H.; DIAZ, S.C.; ALMANZA, M. **Frutales y hortalizas promissórios de Amazônia**. Lima: TCA; Secretaria Protempore, p. 322-327, 1996.

SHARMA, V., BOONEN, J., CHAUHAN, NS, THAKUR, M., DE SPIEGELEER, B., DIXIT, VK, 2011. **Spilanthes acmella extracto de flor etanólica: perfilamento de alquilamida LC-MS e seus efeitos sobre o comportamento sexual em homens ratos. Phytomedicina**. 18, 1161-1168.

SHARMA, A., KUMAR, V., RATTAN, R.S., KUMAR, N., SINGH, B., 2012. **Toxicidade insecticida do spilanthol de Spilanthes acmella Murr.** Contra Plutella xylostella L. Am. J. Plant Sci. 3, 1568-1572,

SOARES, C.P., LEMOS, V.R., DA SILVA, A.G., CAMPOY, R.M., DA SILVA, C.A.P., MENEGON, R.F., ROJAHN, I., JOAQUIM, W.M., 2015. **Efeito da atividade de extrato**

hidroetanólico de Spilanthes acmella no citoesqueleto de actina de células tumorais. Cell Biol. Int. 38, 131-135.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. **Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos.** In: Simões, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Org). ***Farmacognosia: da planta ao medicamento***, 6. Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC p. 289-326.

STALIKAS, C.D. **Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids.** Journal of Separation Science, v. 30, p. 3268-3295, 2007.

VERYSER, L., WYNENDAELE, E., TAEVERNIER, L., VERBEKE, F., JOSHI, T., TATKE, P., DE SPIEGELEER, B., 2014. **N-alquilamidas: de planta a cérebro.** Func. Foods Health Dis. 4, 264-275.

CAUSON, R. **Validation of chromatographic methods in biomedical analysis; viewpoint and discution.** *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.,* Amsterdam, v. 689, n.1, p.175-180, 1997.