

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
CURSO DE FARMÁCIA

GABRIELA SALIM GOMES MOREIRA

**Extrato bruto de *Acmella oleracea* obtido por aparato de Soxhlet: caracterização química por CLUE-EM e isolamento de alcaloides por CPC**

Florianópolis

2022

Gabriela Salim Gomes Moreira

**Extrato bruto de *Acmella oleracea* obtido por aparato de Soxhlet: caracterização química por CLUE-EM e isolamento de alcaloides por CPC**

Trabalho Conclusão do Curso de Graduação em Farmácia do Centro de Ciências da Saúde – Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia  
Orientador: Prof. Dr. Maique Weber Biavatti  
Coorientador: Dr. Layson Antonio L. da Silva

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Moreira, Gabriela

Extrato bruto de *Acmella oleracea* obtido por aparato de Soxhlet: caracterização química por CLUE-EM e isolamento de alcaloides por CPC / Gabriela Moreira ; orientador, Maíque Weber Biavatti, coorientador, Layson Antonio Lemos da Silva, 2022.

45 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Alcaloides. 3. *Acmella oleracea*. 4. Caracterização. 5. Farmácia. I. Weber Biavatti, Maíque. II. Antonio Lemos da Silva, Layson. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Farmácia. IV. Título.

Gabriela Salim Gomes Moreira

**Extrato bruto de *Acmella oleracea* obtido por aparato de Soxhlet: caracterização química por CLUE-EM e isolamento de alcaloides por CPC**

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de Farmacêutica e aprovado em sua forma final pelo Curso de Farmácia.

Florianópolis, 3 de agosto de 2022

---

Prof<sup>a</sup> Dra Liliete Canes Souza Cordeiro  
Coordenadora do Curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof<sup>a</sup> Dra Maique Weber Biavatti  
Orientadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Flávio Henrique Reginatto  
Avaliador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Farm. Amanda Ellen de Athayde  
Avaliadora  
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 2022

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora, Profa. Dra. Maique Weber Biavatti, que não só abriu, no ano de 2018, as portas do laboratório para mim, como também me inspirou, direcionou e despertou em mim genuíno interesse pela área da pesquisa. Agradeço toda a atenção, acolhimento, aprendizado e suporte nos últimos anos.

Ao meu coorientador, Dr. Layzon Antonio Lemos da Silva, por ter aceitado o desafio e me guiado cuidadosamente a cada etapa deste trabalho, com paciência, sabedoria e muita generosidade. Você é uma grande inspiração para mim.

Aos membros da Banca Avaliadora, por toda a doação de tempo e conhecimento, os quais foram essenciais para a produção dessa pesquisa, servindo-me de verdadeiro guia.

À Larissa Faqueti, por ter me dado a primeira oportunidade em um laboratório, que além de mudar o rumo da minha graduação, preparou-me para realizar esse trabalho.

À UFSC por ter sido solo fértil para o plantil dos meus sonhos e pela generosidade ao permitir-me colhe-los. Aos meus professores por compartilharem, com esmero, os conhecimentos necessários para que eu pudesse concluir minha graduação preparada para os desafios que se avizinham.

À minha mãe, Mariana Salim Gomes, agradeço por todo amor, pelo apoio às minhas escolhas e incentivo aos meus sonhos. Você é e sempre será meu ídolo.

À minha família, em especial meus tios e avós, pelo constante entusiasmo em cada pequeno passo que eu dei na minha jornada acadêmica inicial, por todo amor, compreensão e por acreditarem em mim quando nem eu mesma acreditava que era capaz.

Às minhas amigas, Fernanda, Heloisa, Iara, Luisa e Tainee, agradeço por estarem comigo em todos os momentos, bons ou ruins, pelas risadas, pelos abraços e por me fazerem acreditar que a promessa “na alegria e na tristeza, na saúde e na doença” não se limita apenas aos contos de fadas. Obrigada por tornarem a minha caminhada mais prazerosa e por terem escolhido permanecer nela mesmo após a conclusão dessa graduação.

Aos mestrandos e doutorandos da Central Analítica, agradeço por terem me dado a oportunidade de amadurecer ao experienciar, diariamente, suas caminhadas rumo aos seus sonhos. Muito obrigada por todos os ensinamentos, amizade e companheirismo.

## RESUMO

A *Acmella oleracea* apresenta propriedade antinociceptiva, antioxidante, anti-inflamatória, antibacteriana, além dos efeitos sensoriais de pungência, formigamento, entorpecimento e salivação. Entre as substâncias de interesse presentes na espécie estão as alcanidas. Diante do interesse nessas estruturas, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de extrato bruto de *A. oleracea* por meio do aparato Soxhlet e a purificação das alcanidas por meio da técnica inovadora de cromatografia de partição centrífuga (CPC). A caracterização dos compostos por Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM) possibilitou a identificação de 13 compostos no extrato bruto (sendo 12 alcanidas), incluído um composto novo. A otimização do processo de isolamento das alcanidas por CPC permitiu a validação de sua aplicação, buscando manter/otimizar a eficiência do fracionamento do extrato e purificação das alcanidas em uma única etapa, sendo purificadas três substâncias, incluído o componente majoritário espilantol (**8**). Um método complementar de CPC foi desenvolvido, mostrando-se eficaz para a purificação da substância nova *N*-isobutildeca-2,8-dien-6-inamida (**1**), cujo isolamento está sendo descrita aqui pela primeira vez na literatura. A investigação da atividade biológica das alcanidas isoladas a partir desse projeto permitirá uma melhor compreensão do potencial terapêutico, além de representar um progresso na busca de alternativas para o tratamento da doença tropical negligenciada tracoma, causada a partir da infecção por *Chlamydia trachomatis*.

**Palavras-chave:** *Acmella oleracea*. Alcanidas. Soxhlet. Cromatografia de partição centrífuga.

## ABSTRACT

*Acmella oleracea* has antinociceptive, antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial properties, in addition to the sensory effects of pungency, tingling, numbness and salivation. Among the substances of interest present in the species are the alkamides. Given the interest in these structures, this work aimed to develop a crude extract of *A. oleracea* using the Soxhlet apparatus and the purification of alkamides using the innovative technique of centrifugal partition chromatography (CPC). The characterization of the compounds by ultra-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UPLC-MS) enabled the identification of 13 compounds in the crude extract (12 of which were alkamides), including a new compound. The optimization of the alkamide isolation process by CPC allowed the validation of its application, seeking to maintain/optimize the efficiency of extract fractionation and alkamide purification in a single step, with three substances being purified, including the major component spilanthol (**8**). A complementary method of CPC was developed, proving to be effective for the purification of the new substance N-isobutyldeca-2,8-dien-6-inamide (**1**), whose isolation is being described here for the first time in the literature. The investigation of the biological activity of alkamides isolated from this project will allow a better understanding of the therapeutic potential, in addition to representing progress in the search for alternatives for the treatment of the neglected tropical disease trachoma, caused by *Chlamydia trachomatis* infection.

**Keywords:** *Acmella oleracea*. Alkamides. Soxhlet. Centrifugal partition chromatography.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** – Núcleo fundamental das alcamidas.

**Figura 2** – Estrutura química do espilantol.

**Figura 3** – Cromatogramas de íon de pico base (BPI) por CLUE-EM em modo positivo do extrato bruto de *A. oleracea* (superior) e branco (inferior).

**Figura 4** – Alcamidas desreplcados no bruto por Soxhlet de *A. oleracea*.

**Figura 5** – Fracionamento cromatográfico do extrato bruto de *Acmella oleracea* monitorado em 230 nm.

**Figura 6** – Cromatogramas de íon de pico de base (BPI) por CLUE-EM em modo positivo das frações isoladas por CPC de *A. oleracea* (**B–H**) e branco.

**Figura 7** – Cromatogramas de íon de pico de base (BPI) por CLUE-EM em modo positivo das frações isoladas por CPC de *A. oleracea* (**I–N**).

**Figura 8** – Cromatograma de íon de pico de base (BPI) por CLUE-EM em modo positivo da Fração C.

**Figura 9** – Cromatogramas de íon de pico de base (BPI) por CLUE-EM em modo positivo das amostras de “shake-flask” para avaliação do sistema HEMWat **A-D**.

**Figura 10** – Cromatogramas de íon de pico de base (BPI) por CLUE-EM em modo positivo das amostras de “shake-flask” para avaliação do sistema HEMWat **F-H**.

**Figura 11** – Cromatogramas de íon de pico de base (BPI) por CLUE-EM em modo positivo das amostras de “shake-flask” para avaliação do sistema HEMWat **J-L**.

**Figura 12** – Fracionamento cromatográfico da Fração C monitorado em 230 nm.

**Figura 13** – Cromatogramas de íon de pico de base (BPI) por CLUE-EM em modo positivo das alcamidas isoladas da Fração C por CPC.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Composição dos sistemas HEMWat testados para o fracionamento da fração C de CPC do extrato bruto de *Acmella oleracea*.

**Tabela 2** – Compostos caracterizados no extrato bruto por Soxhlet de *A. oleracea* por CLUE-EM.

**Tabela 3** – Compostos caracterizados na Fração C por CLUE-EM.

**Tabela A1** - Valores de coeficiente de partição ( $K_D$ ) obtidos para os compostos identificados na Fração C.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS, FÓRMULAS E UNIDADES

ASC	<i>Ascendente</i>
BPI	<i>Intensidade de pico de base (do inglês, base peak ion)</i>
CC	<i>Cromatografia em coluna</i>
CCD	<i>Cromatografia em camada delgada</i>
CLAE	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>
CPC	<i>Cromatografia de Partição Centrífuga</i>
CLUE-EM	<i>Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas</i>
Da	<i>Dalton</i>
DSC	<i>Descendente</i>
EM	<i>Espectrometria de massas</i>
EM/EM	<i>Espectrometria de massas em tandem (do inglês, Tandem mass spectrometry)</i>
EMAR	<i>Espectrometria de massas de alta resolução</i>
FE	<i>Fase estacionária</i>
FI	<i>Fase inferior</i>
FS	<i>Fase superior</i>
FM	<i>Fase móvel</i>
FSC	<i>Fluido supercrítico</i>
g	<i>Gramas</i>
HEMWat	<i>Sistema de solventes formada pela mistura de n-hexano/acetato de etila/metanol/água (do inglês, n-hexane/ethyl acetate/methanol/water)</i>
IC <sub>50</sub>	<i>Concentração que inibe 50% dos parasitos (do inglês, Inhibitory concentration)</i>
K <sub>D</sub>	<i>Coefficiente de partição</i>
kV	<i>Quilovolt</i>
L	<i>Litro</i>
mg	<i>Miligramas</i>
min	<i>Minutos</i>
mL	<i>Mililitro</i>
mm	<i>Milímetro</i>

<i>m/z</i>	<i>Razão massa carga</i>
<i>RMN</i>	<i>Ressonância magnética nuclear de hidrogênio</i>
<i>TRP</i>	<i>Transient Receptor Potencial</i>
<i>UPLC</i>	<i>Cromatografia líquida de ultra eficiência (do inglês, ultra performance liquid chromatography)</i>
<i>V</i>	<i>Volt</i>
<i>μL</i>	<i>Microlitro</i>
<i>μM</i>	<i>Micromol</i>
<i>°C</i>	<i>Grau Celsius</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1 JUSTIFICATIVA .....	16
1.2 OBJETIVOS .....	18
<b>1.2.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>18</b>
<b>1.2.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>18</b>
<b>2 METODOLOGIA</b> .....	<b>19</b>
2.1 PREPARAÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DE <i>Acmella oleracea</i> .....	19
<b>2.1.1 Obtenção do extrato bruto de <i>A. oleracea</i> pelo método de extração por aparato de Soxhlet</b> .....	<b>19</b>
2.2 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE <i>A. oleracea</i> POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLUE-EM).....	19
2.3 ISOLAMENTO DAS ALCAMIDAS DO EXTRATO BRUTO DE <i>A. oleracea</i> POR CROMATOGRAFIA DE PARTIÇÃO CENTRÍFUGA (CPC).....	20
2.4 PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO C POR CROMATOGRAFIA DE PARTIÇÃO CENTRÍFUGA (CPC).....	21
<b>2.4.1 Seleção do sistema bifásico pela análise de coeficiente de partição (<math>K_D</math>)</b> .....	<b>21</b>
<b>2.4.2 Isolamento do composto proposto da Fração C por CPC</b> .....	<b>22</b>
2.5 MONITORAMENTO CROMATOGRÁFICO.....	23
<b>2.5.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)</b> .....	<b>23</b>
<b>2.5.2 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM)</b> .....	<b>23</b>
2.6 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS ALCAMIDAS ISOLADAS.....	24
<b>3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>25</b>
3.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO POR CLUE-EM DO EXTRATO BRUTO.....	25
3.2 FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO POR CPC .....	29
3.3 PURIFICAÇÃO DA ALCAMIDA <i>N</i> -ISOBUTILDECA-2,8-DIEN-6-INAMIDA A PARTIR DA FRAÇÃO C.....	32

<b>3.3.1 Seleção do sistema bifásico de solventes pela análise do coeficiente de partição (<math>K_D</math>) pelo método “Shake-flask” .....</b>	<b>33</b>
<b>3.3.2 Fracionamento da Fração C por CPC: sistema de HEMWat C (ASC).....</b>	<b>36</b>
<b>4. CONCLUSÕES.....</b>	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>



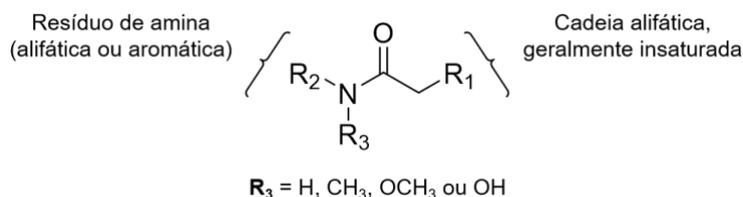
## 1 INTRODUÇÃO

Pertencente à família Asteraceae, a espécie *Acmella oleracea* (L) R.K. Jansen, conhecida popularmente no Brasil por “jambu”, “agrião-do-brasil” e “agrião-do-pará”, é uma erva utilizada na medicina tradicional para o alívio de dor de dente, dor de garganta, estomatite e malária (CHENG et al., 2015, RONDANELLI et al., 2019). No Brasil, a *A. oleracea* apresenta também grande importância na culinária, especialmente na região Norte do país, por ser rica em nutrientes como cálcio e ferro, e estando presente em pratos locais como tacacá e pato no tucupi (NASCIMENTO et al., 2013, SANTOS et al., 2019).

Em estudo *in vivo* com o extrato aquoso das flores de *A. oleracea* em ratos foi observado o efeito antinociceptivo por meio da inibição da síntese de prostaglandinas, interrompendo a transmissão nociceptiva e exercendo uma atividade anti-histamínica (RATNASOORIYA; PIERIS, 2005). Ainda, como descrito por Nomura e colaboradores (2013), o extrato etanólico da *A. oleracea* rico em alcanidas, também apresentou ação antinociceptiva em aplicação orofacial tópica em animais, promovendo o bloqueio dos canais Transient Receptor Potencial - TRP, levando ao alívio das dores de dente. Além destes, os compostos presentes na espécie também são estudados quanto a ação antimalárica *in vitro*, como demonstrado por Mbeunkui e colaboradores (2011), que concluíram haver um possível efeito antiplasmodial nos compostos presentes nas flores da *A. oleracea*.

Diferentes propriedades biológicas vêm sendo descritas para os compostos obtidos a partir da espécie *A. oleracea*, com destaque para as alcanidas, sendo atribuídos principalmente os efeitos analgésico, antioxidante, anti-inflamatório (RONDANELLI et al., 2019; DALLAZEN et al., 2020), antibacteriano (FABRY; OKEMO; ANSORG, 1998; BARBOSA et al., 2016), além dos efeitos sensoriais de pungência, formigamento, entorpecimento e salivação (SILVEIRA; SANDJO; BIAVATTI, 2018).

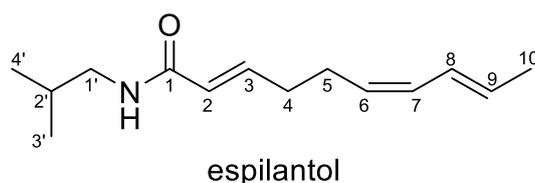
As alcanidas compreendem um grupo de amidas naturais bioativas, pertencentes a classe dos alcaloides, caracterizadas pela presença de um resíduo de ácido graxo insaturado (aromático ou alifático) ligado a um resíduo de amina alifática ou aromática (BOONEN et al. 2012), conforme núcleo fundamental na Figura 1.

**Figura 1** – Núcleo fundamental das alcanidas.

Fundamentado em Boonen e colaboradores (2012).

Enquanto a porção amina é derivada do processo de descarboxilação de aminoácidos, a cadeia alifática é produto da síntese de ácidos graxos e apresenta diferentes padrões de ligações duplas e triplas (acetilenos), além de distintos comprimentos de cadeia. No gênero *Acmella*, a porção base das alcanidas contém principalmente isobutilamina, *sec*-butilamina e fenetilamina, derivadas da biossíntese de valina, isoleucina e fenilalanina, respectivamente. Já os resíduos de ácidos graxos possuem usualmente cadeias de 8 a 12 carbonos de extensão (GREGER, 2016; RIOS, 2012).

Presente na *A. oleracea*, a alcanida conhecida como espilantol (Figura 2) é relatada como componente majoritário em variadas preparações da espécie e apresenta diversas atividades biológicas promissoras, incluindo analgésica, antinociceptiva, antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênica, antirugas, antifúngica, bacteriostática, entre outras (BARBOSA et al., 2016; GREGER, 2016).

**Figura 2** – Estrutura química do espilantol.

Considerando a obtenção dessa classe de metabólitos secundários, a extração de alcanidas a partir de matérias-primas vegetais pode ser realizada por diversos métodos extrativos convencionais, tais como maceração, percolação ou com auxílio de aparelho de Soxhlet (DIAS et al., 2017). Além dessas, a técnica de extração por fluido supercrítico utilizando  $CO_2$  vem sendo mais recentemente empregada na obtenção desses compostos bioativos já tendo sido demonstrada para extração de alcanidas a partir da *A. oleracea* (DIAS et al., 2012; BLANCO et al., 2018).

Para o isolamento das alcamidas, diversos métodos convencionais veem sendo utilizados, porém expondo limitações especialmente quanto ao baixo rendimento na obtenção desses compostos isolados. Entre os métodos mais usuais destacam-se a cromatografia de camada delgada (CCD) – tendo como principal limitação o isolamento para pequenas quantidades de amostra; e a cromatografia em coluna clássica (CC) – necessitando de grandes quantidades de solvente e fase estacionária; além da cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) – com restrição de quantidade de amostra a ser aplicada por coluna em função de sua complexidade, exigindo muito tempo e recursos para a purificação de proporções maiores de amostra (HOSTETTMANN, MARSTON, HOSTETTMANN, 1986; COSTA et al., 2013; CHENG et al., 2015; COSKUN, 2016; GUETCHUENG et al., 2018; APAZA et al., 2019).

Como alternativa, a cromatografia de partição centrífuga (CPC) desponta como uma ferramenta vantajosa para a obtenção de compostos isolados com alto rendimento e pureza e em uma ou poucas etapas, permitindo a recuperação da amostra via etapa de extrusão e conciliando economia de tempo, recursos e consumo de solventes orgânicos (oferendo um caráter de tecnologia verde) (LI, CHEN, 2005; BOJCZUK, ŻYŻELEWICZ, HODUREK, 2017). Contudo, essa técnica que se baseia na separação líquido-líquido dos componentes da mistura em função de seus respectivos coeficientes de partição ( $K_D$ ) a partir da utilização de um sistema bifásico de solventes (BOJCZUK, ŻYŻELEWICZ, HODUREK, 2017) ainda é pouco explorada no que tange o isolamento de alcamidas de *Acmella* (MBEUNKUI et. al, 2011), evidenciando a necessidade do desenvolvimento de um método otimizado que permita o isolamento de um maior número de alcamidas de *A. oleracea*, em altos rendimentos e em única etapa.

No que se refere à caracterização e quantificação das alcamidas em matrizes complexas de origem natural, a cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM), vem sendo amplamente utilizada tem mostrado vantagens em relação às demais técnicas cromatográficas (RAJENDRAN et al., 2017; RANI et al., 2019; JOSHI et al., 2020).

## 1.1 JUSTIFICATIVA

Este projeto de Trabalho de Conclusão de Curso está atrelado a um projeto em andamento junto ao grupo de pesquisa sob supervisão da professora orientadora,

objetivando a produção e avaliação da atividade antimicrobiana de derivados semissintéticos do espilantol frente à forma intracelular de *Chlamydia trachomatis*. Resultados preliminares demonstraram uma promissora atividade anticlamídia *in vitro* para o espilantol ( $IC_{50}=41.6 \mu M$ ) e seu derivado endoperóxido, dioxiacmellamida ( $IC_{50}=13.6 \mu M$ ), cujo mecanismo de ação parece envolver a inibição de enzimas peroxirredoxinas – em especial a nível mitocondrial (peroxirredoxina 3) (DUSHIME et al., 2020). Nesse sentido, assim como demonstrado para o espilantol e seu derivado, as alcanidas a serem isoladas neste projeto também serão submetidas aos testes *in vitro* para avaliação do efeito anticlamídia, de forma a explorar química e biologicamente esse grupo de metabólitos obtidos a partir da *A. oleracea*, servindo também de subsídio para guiar as etapas de modificação química do espilantol, tendo por base a relação estrutura atividade das alcanidas naturais objetos de estudo do presente projeto.

Ainda neste contexto, etapas preliminares (*dados não publicados*) permitiram o cultivo hidropônico de espécimes de *Acmella oleracea* e a produção de um extrato supercrítico bruto, o qual foi caracterizado por CLUE-EM, sendo desreplcadas 14 diferentes alcanidas. A partir deste, um método isocrático de CPC empregando o sistema quaternário de solventes ARIZONA Q modificado foi desenvolvido para o isolamento concomitante do maior número de alcanidas em única etapa.

Diferentes métodos de extração, utilizando variados solventes, condições experimentais e partes da planta já foram desenvolvidos para obter extratos e alcanidas purificadas a partir de espécies de jambu (DIAS et al., 2017). Embora utilizado para a obtenção de alcanidas a partir das flores de *Spilanthus acmella* (SHARMA et al., 2011; DIAS et al., 2012), a técnica extrativa por aparto de Soxhlet ainda é pouco explorada para extração de alcanidas a partir das partes aéreas de *A. oleracea*.

Portanto, diante das promissoras atividades apresentadas pelas alcanidas, é primordial estabelecer uma forma eficiente e otimizada para a extração e obtenção das alcanidas de *A. oleracea*, permitindo explorar de maneira mais aprofundada as suas propriedades biológicas.

Este trabalho permitirá, a partir do desenvolvimento de extrato de *A. oleracea* por meio do uso do aparelho Soxhlet, a comparação com aqueles produzidos previamente por extração supercrítica. Além disso, a utilização do método desenvolvido para isolamento das alcanidas pela técnica inovadora de CPC permitirá a validação sua aplicação em diferentes matrizes vegetais, buscando manter/otimizar a eficiência de isolamento de

alcamidas em uma única etapa, em grandes rendimentos e com economia de tempo e solventes.

Além disso, a futura investigação da atividade biológica das alcamidas isoladas a partir desse projeto trará um progresso relevante no futuro dos Produtos Naturais perante a busca de alternativas para o tratamento da doença tropical negligenciada tracoma, causada a partir da infecção por *Chlamydia trachomatis*.

Ainda, a realização deste projeto contribuirá para a formação de recurso humano capacitado para a pesquisa científica em produtos naturais e fitoquímica, altamente instrumentalizado e habilitado ao processamento de matéria-prima vegetal, extração, isolamento e caracterização de compostos de origem natural.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo Geral

- Obter extrato de *Acmella oleracea* com auxílio de aparato de Soxhlet para caracterização por CLUE-EM e isolamento de alcamidas por CPC.

### 1.2.2 Objetivos Específicos

- Preparar extrato a partir das partes aéreas de *A. oleracea* com auxílio de aparelho Soxhlet;
- Caracterizar o extrato de Soxhlet de *A. oleracea* por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM);
- Isolar as alcamidas a partir do extrato de Soxhlet de *A. oleracea* por meio de cromatografia de partição centrífuga (CPC);
- Caracterizar as alcamidas isoladas por meio da técnica espectroscópica de espectrometria de massas de alta resolução (EMAR).

## 2 METODOLOGIA

### 2.1 PREPARAÇÃO E FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO DE *Acmella oleracea*

O material vegetal utilizado nesse trabalho, ou seja, as partes aéreas de *Acmella oleracea* (IAN 196473 – Herbário EMBRAPA Amazônia Oriental, Pará), foram cultivadas por hidroponia e coletadas no município de Florianópolis em fevereiro de 2020, sendo posteriormente secas à temperatura ambiente e ao abrigo de luz solar, revolvidas duas vezes ao dia, durante 15 dias. O material vegetal seco foi triturado usando um moinho de facas para redução do tamanho de partícula.

#### 2.1.1 Obtenção do extrato bruto de *A. oleracea* pelo método de extração por aparato de Soxhlet

O material vegetal seco e triturado foi introduzido no extrator de Soxhlet e extraído utilizando etanol absoluto por duas horas até completa exaustão (DIAS et al., 2012). O extrato bruto obtido foi posteriormente levado à secura sob pressão reduzida utilizando o evaporador rotatório, e o solvente recuperado foi reutilizado no processo de extração.

### 2.2 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO BRUTO DE *A. oleracea* POR CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ULTRA EFICIÊNCIA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CLUE-EM)

O extrato bruto de *A. oleracea* obtido por aparato de Soxhlet foi caracterizado por desrepliação com auxílio de um cromatógrafo UPLC Waters *Acquity H-Class* equipado com gerenciador de solvente quaternário, forno de coluna, amostrador automático e detector de arranjo de fotodiodos acoplado à um espectrômetro de massas híbrido Waters® modelo *Xevo G2-S QToF*, equipado com fonte de ESI Zpray™ e analisadores do tipo quadrupolo-tempo de voo (QToF).

As separações foram realizadas em uma coluna C<sub>18</sub> *Thermo Scientific® Hypersil GOLD* (100×3 mm, 1,9 μm) mantida a 40 °C com volume de injeção de amostra de 1,0 μL. A fase móvel gradiente de 5,5 min combinou solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (A) e acetonitrila (B), mantido a uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min: 0-0,5 min, 90-35% de A; 0,5-4,0 min, 35% de A; 4,0-4,5 min, 35-2% de A; 4,5-5,0 min, 2% de A; 5,0-5,5 min, 2-90% de A; e mais 2,5 minutos a 80% de A para acondicionamento da coluna. Os dados

espectrométricos foram medidos em modo positivo de ionização no intervalo de massas de aquisição entre 100-1000 Da e um com tempo de varredura de 0,3 s. As configurações do instrumento incluíram a voltagem do capilar de 3,0 kV, voltagem do cone 40 V, voltagem offset da fonte de 80 V, temperatura da fonte de 80 °C, temperatura de dessolvatação de 200 °C, fluxo de gás do cone de 50 L/h e fluxo de gás de dessolvatação de 600 L/h. O nitrogênio foi usado como gás nebulizador e argônio como gás de colisão. A *Leucine Enkephalin* foi usada como amostra de referência (Lockmass  $m/z$  556,2771) para a medição precisa de massas. Os íons precursores selecionados para cada composto a partir da varredura geral do espectro EM foram submetidos aos experimentos de EM/EM, adquiridos também em modo centroide, empregando-se energia de colisão de 30 eV. Os dados foram processados com o software *MassLynx v. 4.1* (Waters®).

Os compostos foram caracterizados considerando o tempo de retenção ( $t_R$ ), razão massa-carga ( $m/z$ ) experimental, respectivas fórmulas moleculares teóricas, e perfis de fragmentação, os quais foram comparados com dados descritos na literatura em base de dados de compostos naturais.

### 2.3 ISOLAMENTO DAS ALCAMIDAS DO EXTRATO BRUTO DE *A. oleracea* POR CROMATOGRAFIA DE PARTIÇÃO CENTRÍFUGA (CPC)

Visando a obtenção e isolamento de um maior número de alcamidas, em grandes quantidades e em uma única etapa, o extrato bruto foi submetido ao fracionamento por CPC. As análises de CPC foram realizadas em cromatógrafo de partição centrífuga Armen® modelo *SCPC-250-L* equipado com rotor de 250 mL de capacidade acoplado a um sistema Spot Prep II (equipado com uma bomba quaternária, detector de arranjo de diodos e um coletor automático). Os dados foram processados em software *Armen Glider CPC v.5.0* (Armen®).

As condições analíticas empregadas, como fluxo, frequência de rotação da coluna, e modo de eluição (ascendente ou descendente) foram previamente estabelecidas com o desenvolvimento do método (*dados não publicados*), empregando sistema quaternário de solventes ARIZONA Q modificado (composto da combinação de *n*-hexano/acetato de etila/metanol/água – HEMWat).

Uma alíquota da amostra (0,7980 g) foi submetida à análise de CPC, desenvolvida em modo de eluição descendente (DSC) usando o sistema de solvente bifásico de solventes *n*-hexano-acetato de etila-etanol-água (9:2:3:2), previamente preparado em

funil de separação para a obtenção das fases superior (FS) e fase inferior (FI). A amostra foi dissolvida em 10 mL de mistura das fases 1:1 e injetada no sistema em uma seringa de vidro. Foi realizado o preenchimento do sistema com a FS, utilizada como fase estacionária, a uma taxa de fluxo de 30 mL/min, com velocidade de rotação de 500 rpm, durante 10 minutos. Após este período, a FI, utilizada como fase móvel, foi bombeada através da fase estacionária durante 8 minutos, com fluxo de 8 mL/min, na rotação de 2000 rpm, até o equilíbrio do sistema com 81,5% de retenção da fase estacionária e 68 bar de pressão de equilíbrio. Em seguida, deu-se início ao processo cromatográfico com a injeção da amostra e bombeamento da fase móvel durante 80 min, com coleta de 7 mL/fração. Para a extrusão, a FS foi bombeada a uma taxa de 30 mL/min, a 2000 rpm, durante 10 minutos, com a coleta de 15 mL/fração, totalizando 90 minutos de análise.

O monitoramento das frações eluídas do CPC foi realizado em 230, 254 e 330 nm, sendo avaliadas de acordo com o perfil cromatográfico por CPC-UV e CCD e reunidas em quinze subfrações.

## 2.4 PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO C POR CROMATOGRAFIA DE PARTIÇÃO CENTRÍFUGA (CPC)

Com o intuito de isolar o composto novo e de confirmar sua proposta estrutural, a fração C derivada da primeira etapa de purificação do extrato de Soxhlet por CPC foi submetida a um novo processo de fracionamento por CPC.

### 2.4.1 Seleção do sistema bifásico pela análise de coeficiente de partição ( $K_D$ )

Para compor o sistema bifásico mais apropriado para a purificação do (2E,7E)-*N*-isobutil-6,9-diidroxí-2,7-Decadienamida (**2**) por CPC, foram testadas dez combinações dos solventes mais frequentemente utilizadas (Tabela 1), compostas por *n*-hexano/acetato de etila/metanol/água, denominado de sistema HEMWat.

A escolha do sistema de solventes baseou-se no coeficiente de partição ( $K_D$ ) do composto de interesse nos diferentes sistemas bifásicos, determinados por meio do método de *shake-flask*. Neste método, uma alíquota da amostra C (cerca de 1 mg) foi particionada em um tubo de ensaio contendo as duas fases líquidas (1 mL de cada fase) da mistura de solventes do sistema eluente a ser testado. Após o equilíbrio, as fases inferior e superior foram separadas e o perfil cromatográfico de cada uma foi avaliado por CLUE-EM (*conforme condição analítica descrita no item 2.2*).

**Tabela 1** – Composição dos sistemas HEMWat testados para o fracionamento da fração C de CPC do extrato bruto de *Acmella oleracea*.

HEMWat	Proporção v/v/v/v			
	<i>n</i> -hexano	Acetato de Etila	Etanol	Água
<b>A</b>	0	1	0	1
<b>B</b>	1	19	1	19
<b>C</b>	1	9	1	9
<b>D</b>	1	6	1	6
<b>F</b>	1	5	1	5
<b>G</b>	1	4	1	4
<b>H</b>	1	3	1	3
<b>J</b>	2	5	2	5
<b>K</b>	1	2	1	2
<b>L</b>	2	3	2	3

Os valores de  $K_D$  de cada um dos compostos presentes nas frações foram estabelecidos em função da razão entre a área de pico do composto nos cromatogramas das fases estacionária (FE) e móvel (FM) (equação 1). Para o modo ascendente de eluição, a fase superior corresponde à FM enquanto que a fase inferior representa a FE. Já no modo descendente, esta designação é inversa.

$$K_D = \text{área do pico}_{FE} / \text{área do pico}_{FM} \quad (\text{Equação 1})$$

Ainda, para prever um provável tempo de eluição dos compostos presentes na fração C durante a análise de CPC e definição do início da etapa de extrusão, o volume teórico e o tempo de retenção dos constituintes foram calculados com base nos seus valores de  $K_D$  e na taxa de fluxo de fase móvel ( $F$ ) nas condições analíticas correspondentes, seguindo as equações 2 e 3.

$$V_r = V_C + (K_D - 1) V_S \quad (\text{Equação 2})$$

$$t_R = V_r / F \quad (\text{Equação 3})$$

#### 2.4.2 Isolamento do composto proposto da Fração C por CPC

Uma alíquota da fração C (0,308 g) foi submetida à análise de CPC, desenvolvida em modo de eluição ascendente (ASC) usando o sistema bifásico de solventes *n*-hexano-acetato de etila-etanol-água (1:9:1:9), previamente preparado em funil de separação para

a obtenção das fases superior (FS) e fase inferior (FI). A amostra foi dissolvida em 10 mL de mistura das fases 1:1 e injetada no sistema em uma seringa de vidro. Foi realizado o preenchimento do sistema com a FI, utilizada como fase estacionária, a uma taxa de fluxo de 30 mL/min, com velocidade de rotação de 500 rpm, durante 10 minutos. Após este período, a FS, utilizada como fase móvel, foi bombeada através da fase estacionária durante 9 minutos, com fluxo de 8 mL/min, na rotação de 2000 rpm, até o equilíbrio do sistema com 79,2% de retenção da fase estacionária e 35 bar de pressão de equilíbrio. Em seguida, deu-se início ao processo cromatográfico com a injeção da amostra e bombeamento da fase móvel durante 80 min, com coleta de 7 mL/fração. Para a extrusão, a FI foi bombeada a uma taxa de 30 mL/min, a 2000 rpm, durante 10 minutos, com a coleta de 15 mL/fração, totalizando 90 minutos de análise.

O monitoramento das frações eluídas do CPC foi realizado em 230, 254 e 330 nm, sendo avaliadas de acordo com o perfil cromatográfico por CPC-UV e CCD e reunidas em dez subfrações.

## 2.5 MONITORAMENTO CROMATOGRÁFICO

### 2.5.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para acompanhar e monitorar o fracionamento cromatográfico de purificação das alcamidas foram empregadas análises por CCD, sendo utilizadas cromatoplasmas de sílica gel 60 com indicador de fluorescência (F<sub>254</sub>) em suporte de alumínio. O perfil cromatográfico das frações foi estabelecido após análise sob luz visível e nos comprimentos de onda de 254 (extinção) e 366 nm (fluorescência) de luz UV, antes e após revelação com anisaldeído sulfúrico (WAGNER; BLADT, 2001).

### 2.5.2 Cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM)

Para auxiliar no monitoramento do processo de extração, fracionamento cromatográfico, purificação e análise de pureza dos compostos isolados para comparação dos processos de extração, foram realizadas análises de CLUE-EM em cromatógrafo Waters® modelo *Acquity H-Class UPLC* equipado com sistema quaternário de distribuição de solventes, amostrador automático e forno de coluna, acoplado a um espectrômetro de massas híbrido Xevo® G2-S QToF equipado com fonte de ionização por eletronebulização (ESI) Zpray™ e analisadores do tipo quadrupolo acoplado a tempo de

voo (QTof). As análises foram realizadas em coluna C18 *Teruo Scientific*<sup>®</sup> *Hypersil GOLD* (100x3 mm, 1,9 µm) mantida a 40 °C com volume de injeção de amostra (500 µm/mL em acetonitrila) de 1,0 µL. A fase móvel gradiente de 5,5 min foi uma combinação de solução aquosa de ácido fórmico a 0,1% (1) e acetonitrila (2), mantida a uma taxa de fluxo de 0,4 mL/min: 0-0,5 min, 90-35% de 1; 0,5-4,0 min, 35% de 1; 4,0-4,5 min, 35-2% de 1; 4,5-5,0 min, 2% de 1; 5,0-5,5 min, 2-90% de 1; e mais 2,5 min a 80% de 1 para recondicionamento da coluna. Os dados espectrométricos foram medidos em intervalo de massas de aquisição entre 100-1000 Da e tempo de varredura de 0,3 s. A configuração do instrumento incluiu a voltagem do capilar de 3,0 kV, voltagem do cone de 40 V, voltagem offset da fonte de 80 V, temperatura da fonte 80 °C, temperatura de dessolvatação de 200 °C, fluxo de gás do cone de 50L/h e fluxo de gás de dessolvatação de 600 L/h. A *Leucine Enkephalin* foi usada como amostra de referência (Lockmass *m/z* 556,2771) para medição precisa de massas. A aquisição e tratamento dos dados foram realizados com auxílio do software *MassLynx 4.1* (Waters<sup>®</sup>).

## 2.6 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS ALCAMIDAS ISOLADAS

As amostras derivadas do fracionamento cromatográfico para purificação das alcamidas por CPC, ao apresentarem apenas uma mancha em CCD e/ou cristalização espontânea, foram submetidas a análises espectroscópicas de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas de alta resolução para a elucidação estrutural e caracterização das alcamidas.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO POR CLUE-EM DO EXTRATO BRUTO

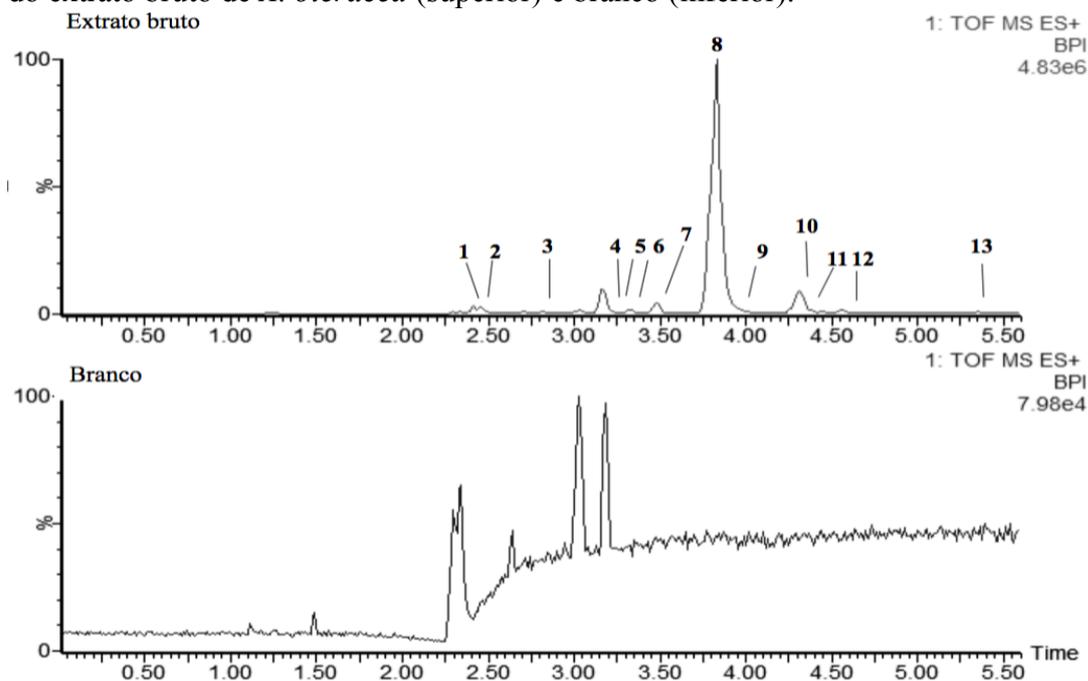
O material vegetal seco e triturado (453,43 g) foi extraído por meio do aparato Soxhlet, permitindo a obtenção de 24,18 g (5,33%) de extrato etanólico de *Acmella oleracea*, cujo rendimento está de acordo com trabalhos anteriores na literatura para a obtenção de extratos de jambu (NOMURA, et. al., 2013; SHARMA, et. al., 2011).

O etanol foi proposto como o solvente de extração por facilitar a obtenção do composto majoritário espilantol em maiores concentrações do que outros solventes convencionais já descritos na literatura (BOONEN, et al., 2010; FRANCA, et al., 2016). Além disso, trata-se de um solvente orgânico menos tóxico, seguindo assim os princípios da química verde.

Diversas metodologias têm sido propostas para a extração de alcanidas da *A. oleracea*, sendo uma das principais a extração com dióxido de carbono supercrítico (FSC). Alguns rendimentos de extrato bruto FSC utilizando as partes aéreas da planta encontrados na literatura são de 3,5% e 4,53% (BLANCO et al., 2018, CAVALCANTI, 2008), variando com a temperatura e pressão do método. Ao comparar com rendimento do extrato etanólico obtido neste presente trabalho, a extração por Soxhlet prevaleceu sobre as propriedades do fluido supercrítico. Após a obtenção do extrato bruto, este foi caracterizado quanto a sua complexidade química por meio da desrepliação por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada a espectrometria de massas (CLUE-EM). As análises foram realizadas em modo positivo de ionização e o perfil cromatográfico da preparação está representado na Figura 3.

O método analítico possibilitou a caracterização de 13 compostos, sendo 12 alcanidas (Figura 4) que foram identificados considerando o tempo de retenção, razão massa-carga ( $m/z$ ) experimental e respectivas fórmulas moleculares teóricas (Tabela 2), os quais foram comparados com dados descritos na literatura em bases de dados de compostos naturais. Ainda, os compostos identificados foram comparados com um estudo publicado recentemente descrevendo a caracterização química de extratos etanólicos de *A. oleracea* cultivada por hidroponia no LabHidro UFSC (NASCIMENTO et al., 2020), desenvolvido em colaboração com os supervisores deste projeto.

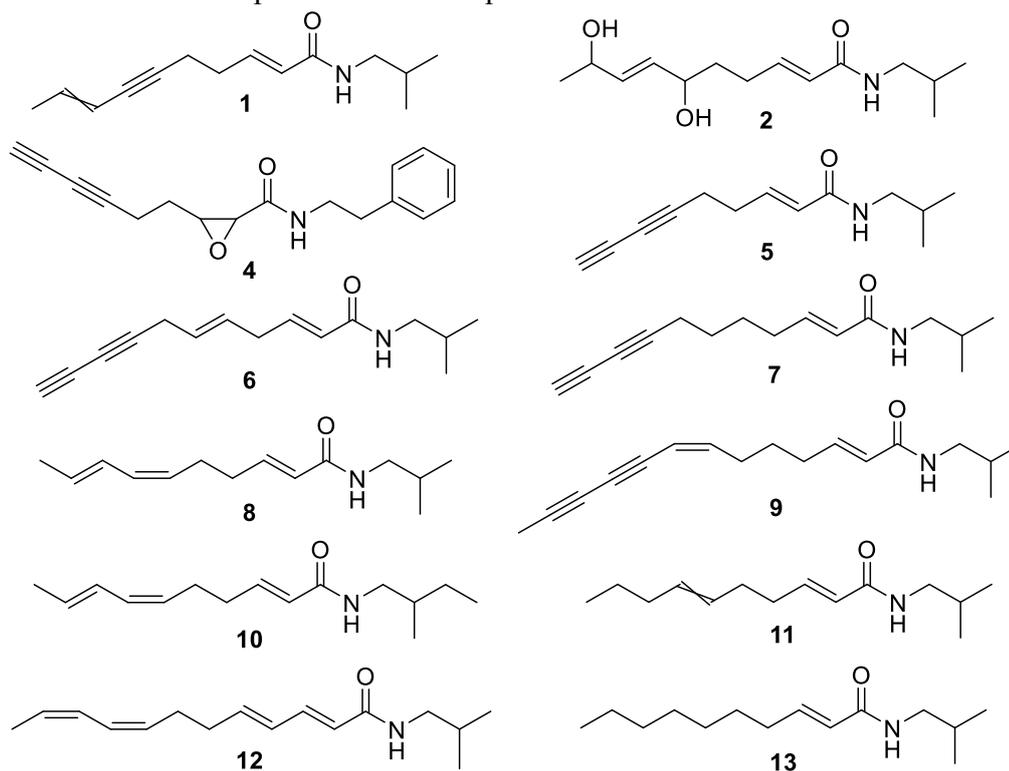
**Figura 3** – Cromatogramas de íon de pico base (BPI) por CLUE-EM em modo positivo do extrato bruto de *A. oleracea* (superior) e branco (inferior).



**Tabela 2** – Compostos caracterizados no extrato bruto por Soxhlet de *A. oleracea* por CLUE-EM.

Nº pico	Proposta de identificação	t <sub>R</sub> (min)	Fórmula molecular	m/z [M+H] <sup>+</sup> (erro, ppm)	Íons fragmento de MS/MS (m/z)
1	<i>N</i> -isobutildeca-2,8-dien-6-inamida	2,41	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> NO	220,1703 (0,9)	192; 176; 164; 147; 141; 126; 121; 119; 105; 93; 91; 79
2	(2 <i>E</i> ,7 <i>E</i> )- <i>N</i> -isobutil-6,9-diidroxi-2,7-decadienamida (longipenamida B)	2,45	C <sub>14</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>	238,1809 (0,8)	277; 256; 147; 137; 123; 119; 107; 97; 95; 91; 79
3	Composto não identificado	2,82	C <sub>28</sub> H <sub>49</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub>	509,3591 (-0,2)	-
4	<i>N</i> -fenetil-2,3-epoxi-6,8-nonadiinamida	3,20	C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>2</sub>	268,1335 (-1,1)	250; 226; 148; 130; 121; 119; 105; 103; 91; 77
5	<i>N</i> -isobutil-2-nonene-6,8-diinamida	3,23	C <sub>13</sub> H <sub>17</sub> NO	204,1388 (0,5)	176; 148; 131; 120; 105; 103; 93; 79
6	(2 <i>E</i> ,5 <i>Z</i> )- <i>N</i> -isobutilundeca-2,5-diene-8,10-diinamida	3,33	C <sub>15</sub> H <sub>19</sub> NO	230,1545 (0,0)	174; 167; 152; 131; 129; 128; 116; 110; 105; 91
7	(2 <i>E</i> )- <i>N</i> -isobutilundeca-2-ene-8,10-diinamida	3,48	C <sub>15</sub> H <sub>21</sub> NO	232,1706 (2,2)	176; 159; 133, 131; 117; 105; 91; 79
8	Espilantol	3,84	C <sub>14</sub> H <sub>23</sub> NO	222,1862 (0,9)	168; 154; 141; 126; 123; 107; 98; 81
9	(2 <i>E</i> ,7 <i>Z</i> )- <i>N</i> -isobutiltrideca-2,7-diene-10,12-diinamida	3,91	C <sub>17</sub> H <sub>23</sub> NO	258,1859 (0,4)	202; 185; 157; 142; 131; 129; 117; 115; 105; 91; 79
10	(2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> )- <i>N</i> -(2-metilbutil)-deca-2,6,8-trienamida	4,31	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> NO	236,2016 (0,8)	182; 168; 155; 140; 126; 123; 121; 112; 107; 98; 93; 81
11	Dihidroespilantol	4,37	C <sub>14</sub> H <sub>25</sub> NO	224,2015 (0,4)	196; 168; 154; 151; 141; 126; 123; 109; 98; 83; 81; 69
12	(2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> ,10 <i>Z</i> )- <i>N</i> -isobutildodeca-2,4,8,10-tetraenamida	4,59	C <sub>16</sub> H <sub>25</sub> NO	248,2017 (0,3)	167; 152; 133; 124; 107; 105; 93; 81; 68
13	<i>N</i> -isobutil-2-decenamida	5,33	C <sub>14</sub> H <sub>27</sub> NO	226,2175 (1,8)	170; 153; 128; 107; 97; 93; 86; 83; 72; 69

**Figura 4.** Alcamidas desreplacados no bruto por Soxhlet de *A. oleracea*.



O pico **1** com  $t_R$ : 2,41 minutos ( $m/z$  220,1703 [ $C_{14}H_{21}NO$ ]) apresenta dois átomos de hidrogênio a menos quando comparado ao espilantol. O espectro MS/MS desta substância apresentou os íons 164, 147 e 119, formados a partir de perdas neutras de 2-propinol (56 Da), um grupo isobutilamina (73 Da) e isobutilamina mais CO (101 Da), respectivamente. Ainda, foram detectados os íons do fragmento do radical distônico ( $m/z$  141) e o cátion de ciclopropeno ( $m/z$  126). Com isso, foi possível identificar o pico **1** como a alcamida *N*-isobutildeca-2,8-dien-6-inamida (CROMBIE et al., 1963).

O pico **2** com  $t_R$ : 2,45 minutos ( $m/z$  238,1809 [ $C_{14}H_{25}NO_3$ ]) com base nos picos e fragmentos de íons obtidos em  $m/z$  277, 256, 123, foi identificado como (*2E,7E*)-*N*-isobutil-6,9-diidroxí-2,7-decadienamida (longipenamida B), que provavelmente se trata de um derivado oxidado do espilantol (SAVIC et al., 2021; SIMAS et al., 2013).

O pico **4** com  $t_R$ : 3,20 minutos ( $m/z$  268,1335 [ $C_{17}H_{17}NO_2$ ]) foi caracterizado como *N*-fenetil-2,3-epoxi-6,8-nonadiinamida. A presença do fragmento  $m/z$  105 no espectro de MS/MS corresponde ao 2-feniletan-1-ílio, sugerindo um grupo *N*-feniletilamina. Estes dados estão de acordo com os relatados na literatura descritos para a espécie *A. oleracea* (BOONEN et al., 2010).

O pico **5** com  $t_R$ : 3,23 minutos ( $m/z$  204,1388 [ $C_{13}H_{17}NO$ ]) foi identificado como *N*-isobutil-2-nonene-6,8-diinamida a partir dos fragmentos  $m/z$  148, 131 e 103, formados a partir de perdas de 2-metilpropenona (56 Da), grupo isobutilamina (73 Da) e isobutilamina mais CO (101 Da) (GREGGER et al., 1985).

Os picos **6** ( $t_R$ : 3,33 min,  $m/z$  230,1545 [ $C_{15}H_{19}NO$ ]), **7** ( $t_R$ : 3,48 min,  $m/z$  232,1706 [ $C_{15}H_{21}NO$ ]), **9** ( $t_R$ : 3,91 min,  $m/z$  258,1859 [ $C_{17}H_{23}NO$ ]) e **10** ( $t_R$ : 4,31 min,  $m/z$  236,2016 [ $C_{15}H_{25}NO$ ]) foram identificados como (*2E,5Z*)-*N*-isobutilundeca-2,5-diene-8,10-diinamida, (*2E*)-*N*-isobutilundeca-2-ene-8,10-diinamida, (*2E,7Z*)-*N*-isobutiltrideca-2,7-diene-10,12-diinamida e (*2E,6Z,8E*)-*N*-(2-metilbutil)-deca-2,6,8-trienamida, respectivamente. A caracterização destes foi realizada com base nos dados presentes na literatura, pois todos os quatro compostos foram previamente isolados na espécie *A. oleracea* (BOONEN et al., 2010; CHENG et al., 2015).

O pico **8** com  $t_R$ : 3,84 minutos ( $m/z$  222,1862 [ $C_{14}H_{23}NO$ ]) foi o pico mais intenso do cromatograma de BPI em modo positivo do extrato obtido por Soxhlet e corresponde ao componente majoritário espilantol, como esperado com base na literatura (BOONEN et al., 2010). O espectro MS/MS apresentou os íons de fragmento  $m/z$  141 e 126, que correspondem respectivamente ao radical distônico e ao cátion ciclopropeno. Ainda, há uma perda de penta-1,3-dieno (68Da), do íon  $m/z$  222,11862, formando o  $m/z$  154. Estas características observadas no espectro de massas em tandem estão de acordo com os dados presentes na literatura referentes a identificação do espilantol (BAE et al., 2010; BOONEN et al., 2010).

O pico **11** com  $t_R$ : 4,37 minutos ( $m/z$  224,2015 [ $C_{14}H_{25}NO$ ]) difere do espilantol por 2 Da, indicando a falta de uma ligação dupla equivalente na sua estrutura. O espectro de MS/MS produziu os fragmentos  $m/z$  141 e 126, que correspondem aos radicais distônicos e cátions ciclopropeno. Apesar dessas características sugerirem uma ligação dupla entre  $C_2-C_3$ , o composto **11** trata-se provavelmente do derivado di-hidroespilantol (BAE et al., 2010; BOONEN et al., 2010).

Os picos **12** ( $t_R$ : 4,59 minutos) e **13** ( $t_R$ : 5,33 minutos) apresentam os íons precursores  $m/z$  248,2017 [ $C_{16}H_{25}NO$ ] e  $m/z$  226,2175 [ $C_{14}H_{27}NO$ ] e foram identificados como isobutilamida do ácido dodeca-2,4,8,10-tetraenoico (MONROE et al., 2016) e isobutilamina do ácido decen-2-oico (MARTIN; BECKER, 1985), respectivamente.

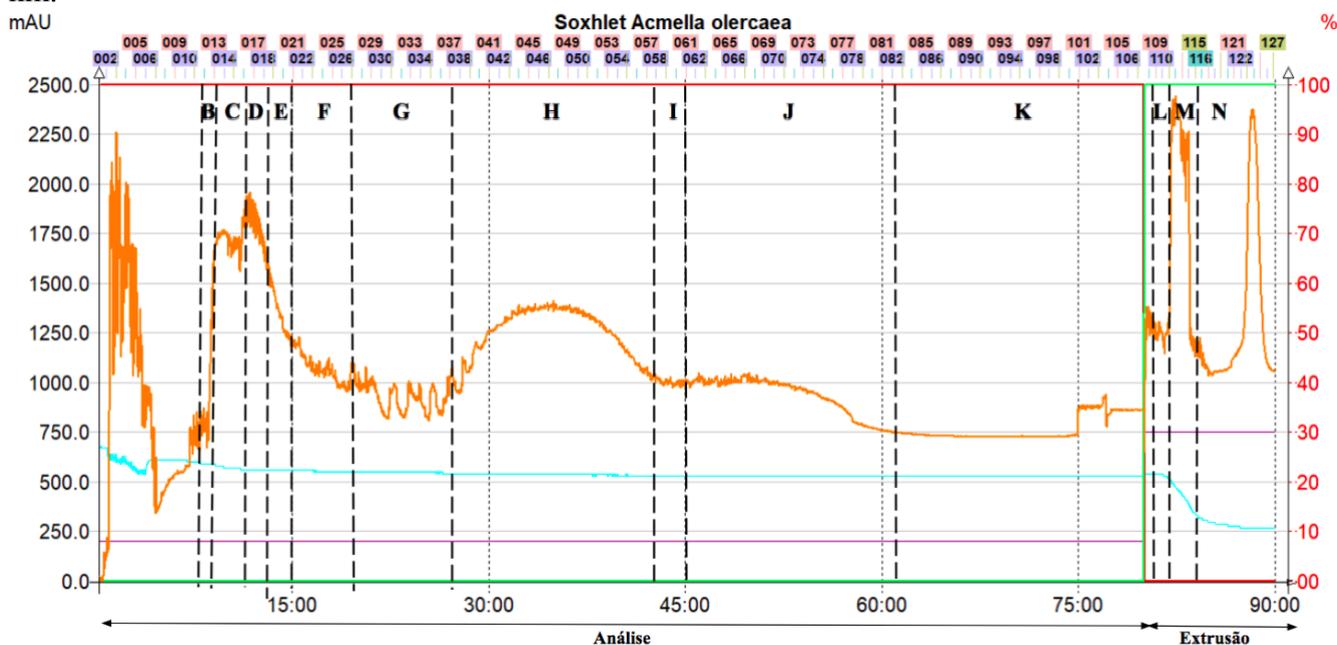
### 3.2 FRACIONAMENTO DO EXTRATO BRUTO POR CPC

Com o intuito de alcançar uma resolução eficiente entre as substâncias de interesse as quais deseja-se separar no processo cromatográfico, o método bifásico de solventes hexano-acetato de etila-etanol-água (9:2:3:2) foi previamente estabelecido (*dados não publicados*) no modo descendente para o fracionamento do extrato de *Acmella oleracea*. Uma alíquota (0,7980 g) foi submetida ao fracionamento cromatográfico no sistema de CPC, conforme ilustrado na Figura 5.

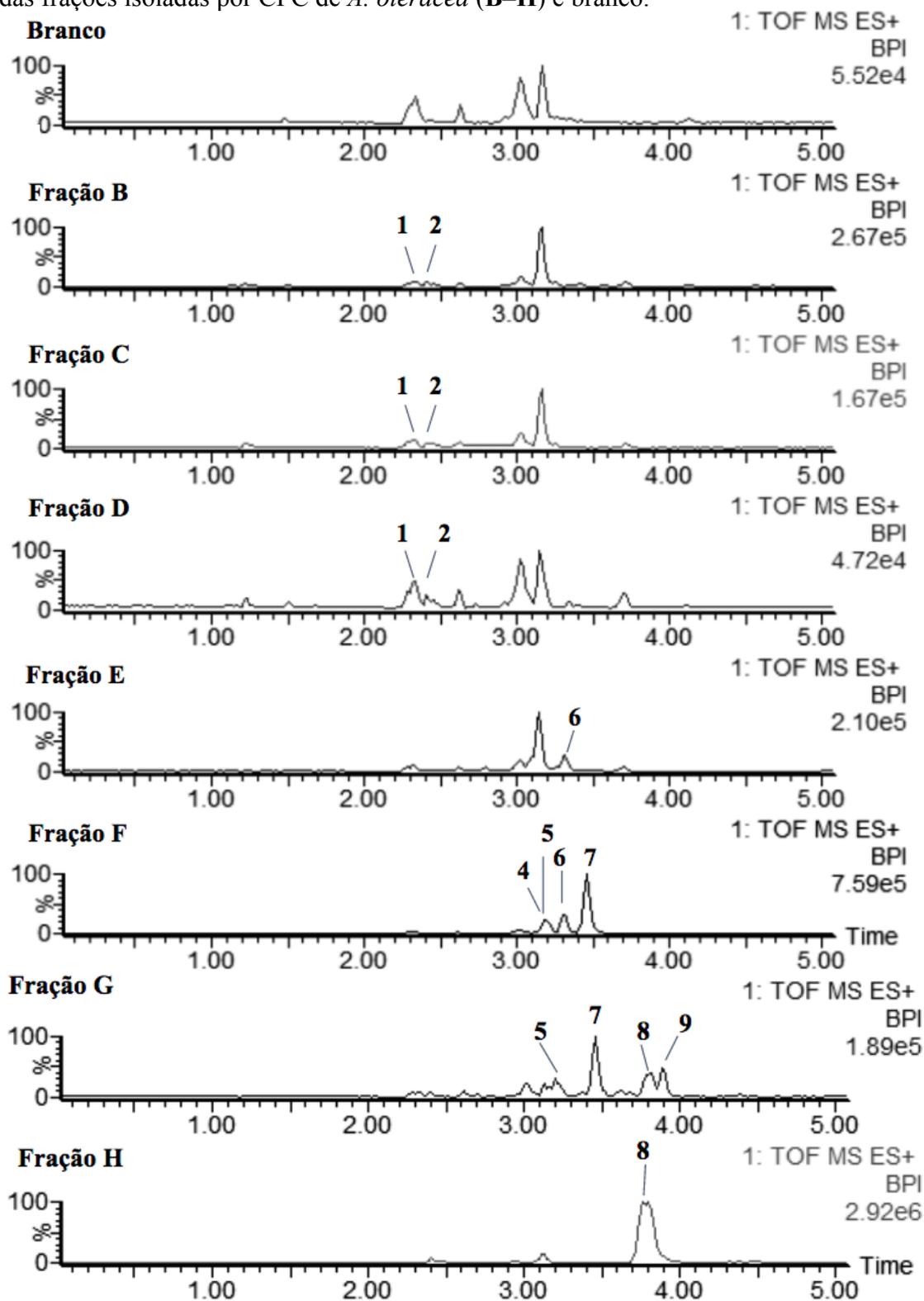
Por meio do cromatograma do extrato bruto submetido ao processo de fracionamento por CPC e pelo monitoramento por CCD, foi possível identificar a presença de 13 frações principais nomeadas de **B-N**, focando no isolamento das alcamidas de interesse, cujos perfis em CLUE-EM estão ilustrados nas Figuras 6 e 7.

A fração **H** proporcionou o isolamento de 59,5 mg do marcador espilantol com pureza de 93%, o que corresponde a 7,46% do extrato bruto. Comparando com dados da literatura de extração apenas das flores da *A. oleracea* por método Soxhlet, o rendimento de espilantol foi apenas de 0,20%, indicando maior rendimento desta alcamida em extratos a partir das diferentes partes da espécie (SHARMA et al., 2011). Ainda, a título de comparação, o isolamento das alcamidas pelo mesmo método de CPC a partir do extrato por fluido supercrítico, o espilantol correspondeu 14,5% do extrato bruto de partida com 99% de pureza (*dados não publicados*).

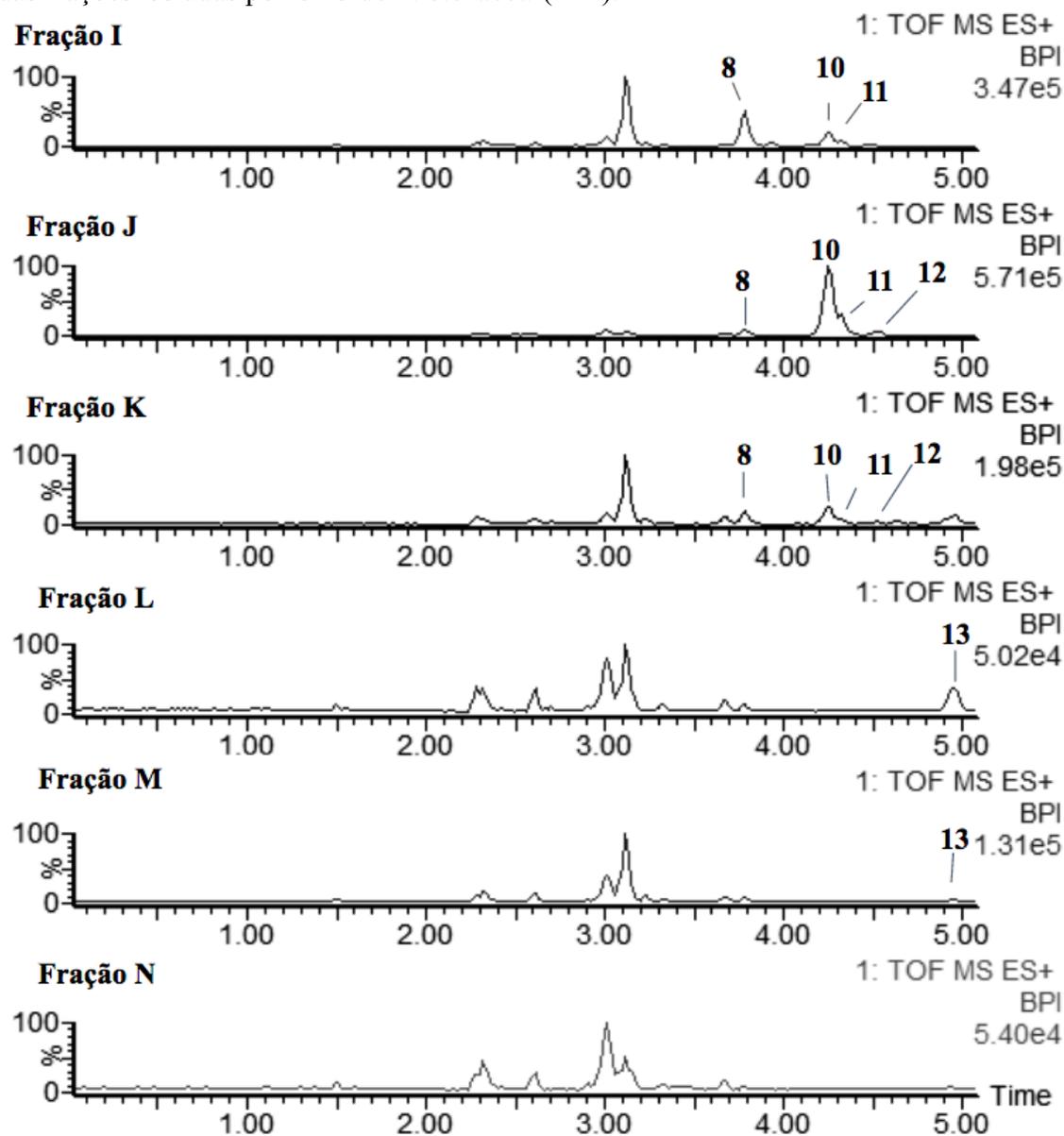
**Figura 5** – Fracionamento cromatográfico do extrato bruto de *Acmella oleracea* monitorado em 230 nm.



**Figura 6** – Cromatogramas de íon de pico de base (BPI) por CLUE-EM em modo positivo das frações isoladas por CPC de *A. oleracea* (B–H) e branco.



**Figura 7** – Cromatogramas de íon de pico de base (BPI) por CLUE-EM em modo positivo das frações isoladas por CPC de *A. oleracea* (I–N).



A fração **E** (32 mg) apresentou o composto (*2E,5Z*)-*N*-isobutilundeca-2,5-diene-8,10-diinamida (**6**) isolado com 94% de pureza, enquanto as subfrações **L** (5,1 mg) e **M** (10,1 mg) apresentaram a alcamida *N*-isobutil-2-decenamida (**13**) isolada com 87% e 72% de pureza, respectivamente.

O fracionamento do extrato bruto em sistema de CPC, utilizando as condições cromatográficas descritas no item 2.3 com o sistema bifásico de solventes *n*-hexano-acetato de etila-etanol-água (9:2:3:2), demonstrou ser eficiente para o isolamento do espilantol. Porém, o mesmo não foi possível para as alcamidas *N*-isobutildeca-2,8-dien-6-inamida (**1**) e (*2E,7E*)-*N*-isobutil-6,9-diidroxi-2,7-decadienamida (**2**), que coeluíram

juntas no começo da análise, sendo detectadas próximo ao tempo de retenção de 2,4 minutos. Diante do exposto, fez-se necessária uma etapa adicional para o isolamento dos compostos **1** e **2**, com ênfase à substância *N*-isobutildeca-2,8-dien-6-inamida, por se tratar possivelmente de um composto novo, sendo necessária sua purificação para permitir a completa caracterização estrutural deste.

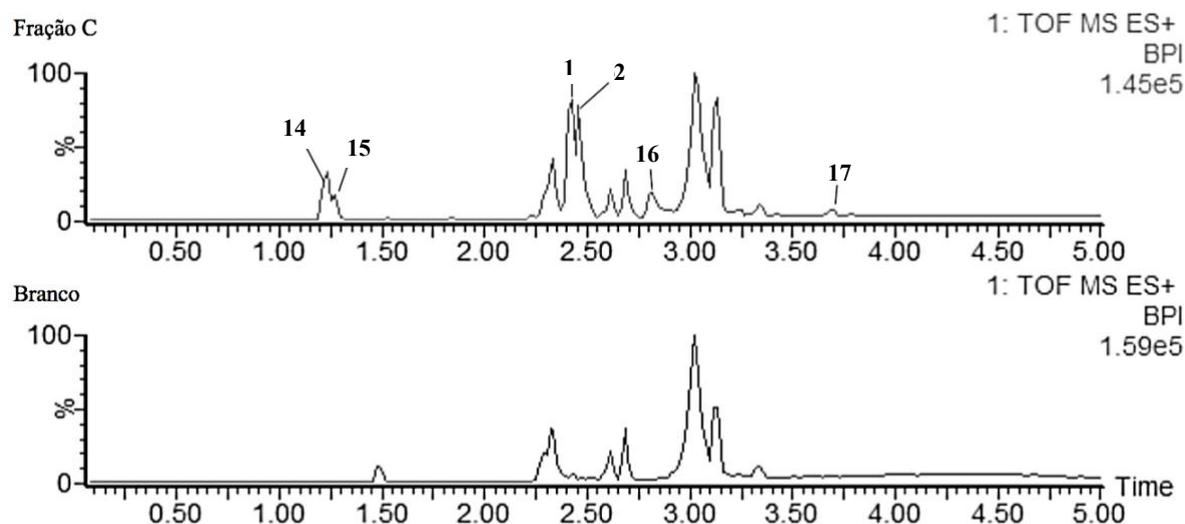
### 3.3 PURIFICAÇÃO DA ALCAMIDA *N*-ISOBUTILDECA-2,8-DIEN-6-INAMIDA A PARTIR DA FRAÇÃO C

O pico **1** identificado a partir da análise do extrato bruto por CLUE-EM foi atribuído ao *N*-isobutildeca-2,8-dien-6-inamida com base no seu perfil EM/EM (NASCIMENTO et al., 2020), cuja estrutura parece corresponder a um composto novo, tornando o isolamento e sua elucidação estrutural necessários para confirmar essa proposta. Esta nova substância que foi obtida em mistura com o (*2E,7E*)-*N*-isobutil-6,9-diidroxí-2,7-decadienamida (longipenamida B, **2**) na fração C da purificação por CPC do extrato bruto - composto este que já foi descrito na espécie *A. oleracea* (SAVIC et al., 2021; SIMAS et al., 2013) podendo ser considerado um derivado oxidado do espilantol, provavelmente produzido em situações de estresse oxidativo da planta. Diante disso, para isolar o composto *N*-isobutildeca-2,8-dien-6-inamida (**1**) a partir da fração C, de modo eficiente e em poucas etapas, um novo método de CPC foi desenvolvido, sendo necessário buscar um novo sistema bifásico de solventes. A desreplicação da Fração C (Tabela 3) permitiu observar a presença de outros quatro compostos não identificados além dos compostos **1** e **2**. O perfil CLUE-EM da Fração C está ilustrado na Figura 8.

**Tabela 3** – Compostos caracterizados na Fração C por CLUE-EM.

Nº pico	Proposta de identificação	t <sub>R</sub> (min)	Fórmula molecular	m/z [M+H] <sup>+</sup> (erro, ppm)	Íons fragmento de MS/MS (m/z)
14	Composto não identificado	1,23	C <sub>5</sub> H <sub>14</sub> NO	104,1080 (4,8)	-
15	Composto não identificado	1,27	C <sub>5</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub>	118,0872 (3,4)	-
1	<i>N</i> -isobutildeca-2,8-dien-6-inamida	2,42	C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> NO	220,1709 (0,9)	192; 176; 164; 147; 141; 126; 121; 119; 105; 93; 91; 79
2	( <i>2E,7E</i> )- <i>N</i> -isobutil-6,9-diidroxí-2,7-decadienamida (longipenamida B)	2,46	C <sub>14</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>3</sub>	238,1809 (0,8)	277; 256; 147; 137; 123; 119; 107; 97; 95; 91; 79
16	Composto não identificado	2,82	C <sub>33</sub> H <sub>49</sub> O <sub>4</sub>	509,3610 (-4,3)	-
17	Composto não identificado	3,70	C <sub>29</sub> H <sub>25</sub> O <sub>5</sub>	453,1664 (-8,4)	-

**Figura 8** - Cromatograma de íon de pico de base (BPI) por CLUE-EM em modo positivo da Fração C.



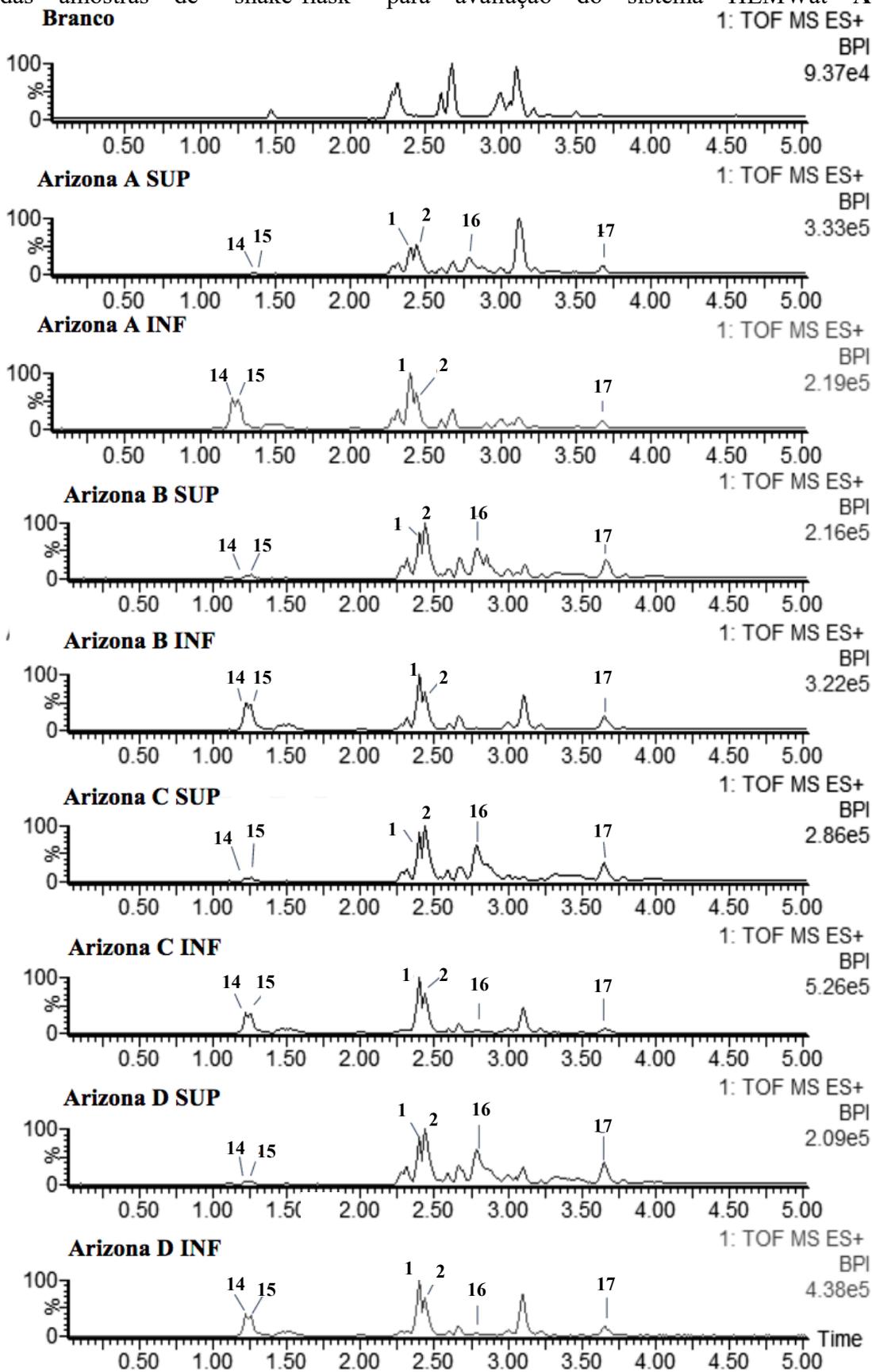
### 3.3.1 Seleção do sistema bifásico de solventes pela análise do coeficiente de partição ( $K_D$ ) pelo método “Shake-flask”

Alíquotas de cerca de 1 mg da fração C foram submetidas ao teste de “*shake-flask*” para a determinação do coeficiente de partição ( $K_D$ ) dos compostos presentes na fração nos mesmos sistemas bifásicos descritos no *item 2.4.1*, com o intuito de isolar a alcamida *N*-isobutildeca-2,8-dien-6-inamida (**1**). Os valores de  $K_D$  obtidos nos onze sistemas de eluição testados estão listados na Tabela A1, presente no Anexo.

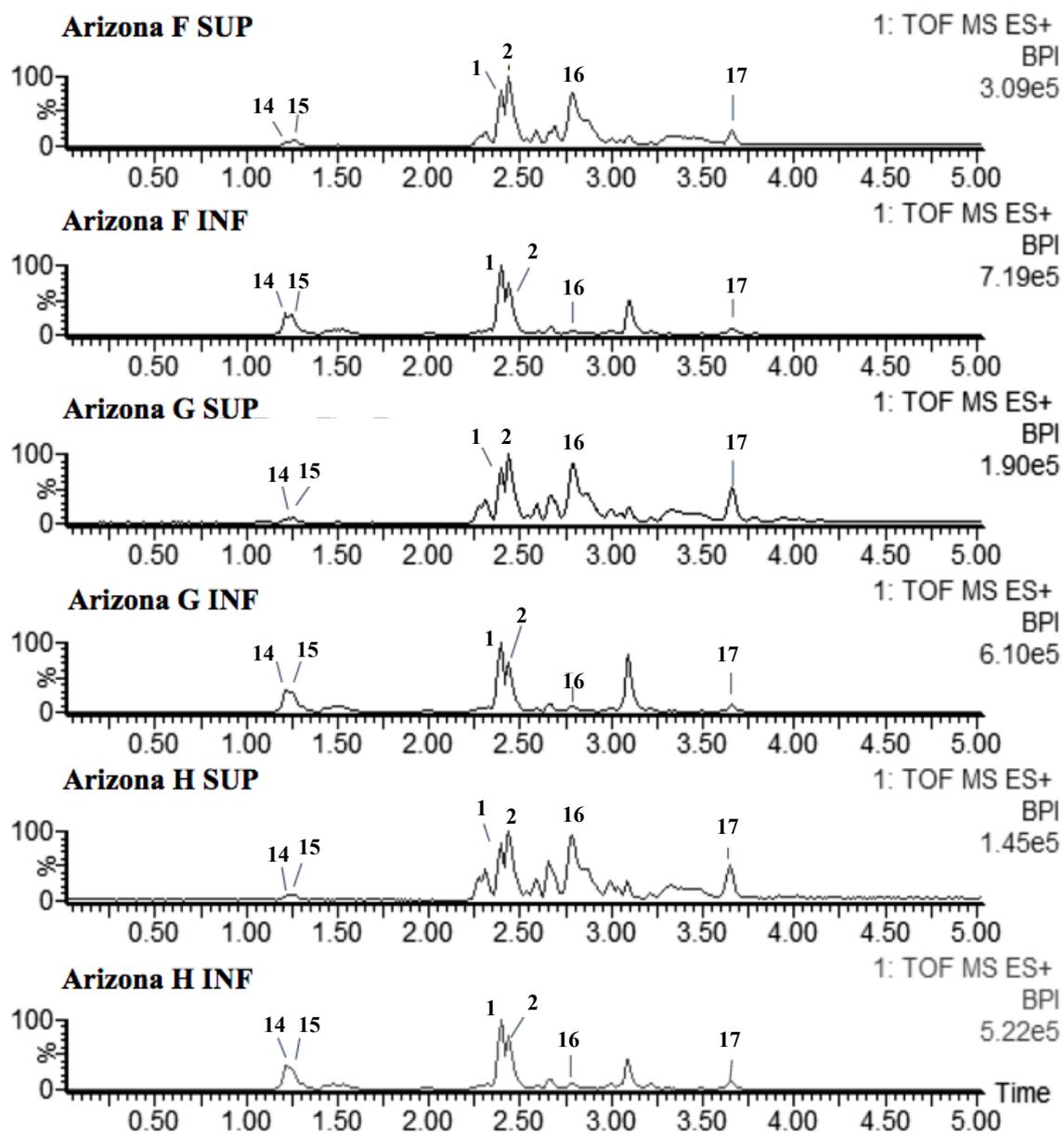
O cálculo de  $K_D$  possui extrema importância para a definição de um sistema bifásico adequado para a separação das substâncias desejadas, pois expressa a concentração do soluto na fase estacionária dividido pela concentração na fase móvel, informando a taxa de transferência dos compostos nas duas fases, permitindo assim prever valores como o tempo de retenção das substâncias no sistema. O coeficiente de partição deve estar aproximadamente na faixa de 0,5 a 2,0. Valores de  $K_D$  menores que esta faixa apresenta perda de resolução de pico, enquanto que valores mais altos promovem o alargamento dos picos cromatográficos (SKALICKA-WOŹNIAK; GARRARD, 2014).

Diante do exposto e dos valores de  $K_D$  calculados apresentados na Tabela A1, o sistema bifásico sistema de *n*-hexano-acetato de etila-etanol-água na proporção 1:9:1:9 (HEMWat C) no modo ascendente foi definido para o fracionamento cromatográfico da fração C, uma vez que os valores de  $K_D$  determinados estão dentro da faixa de equilíbrio apropriada.

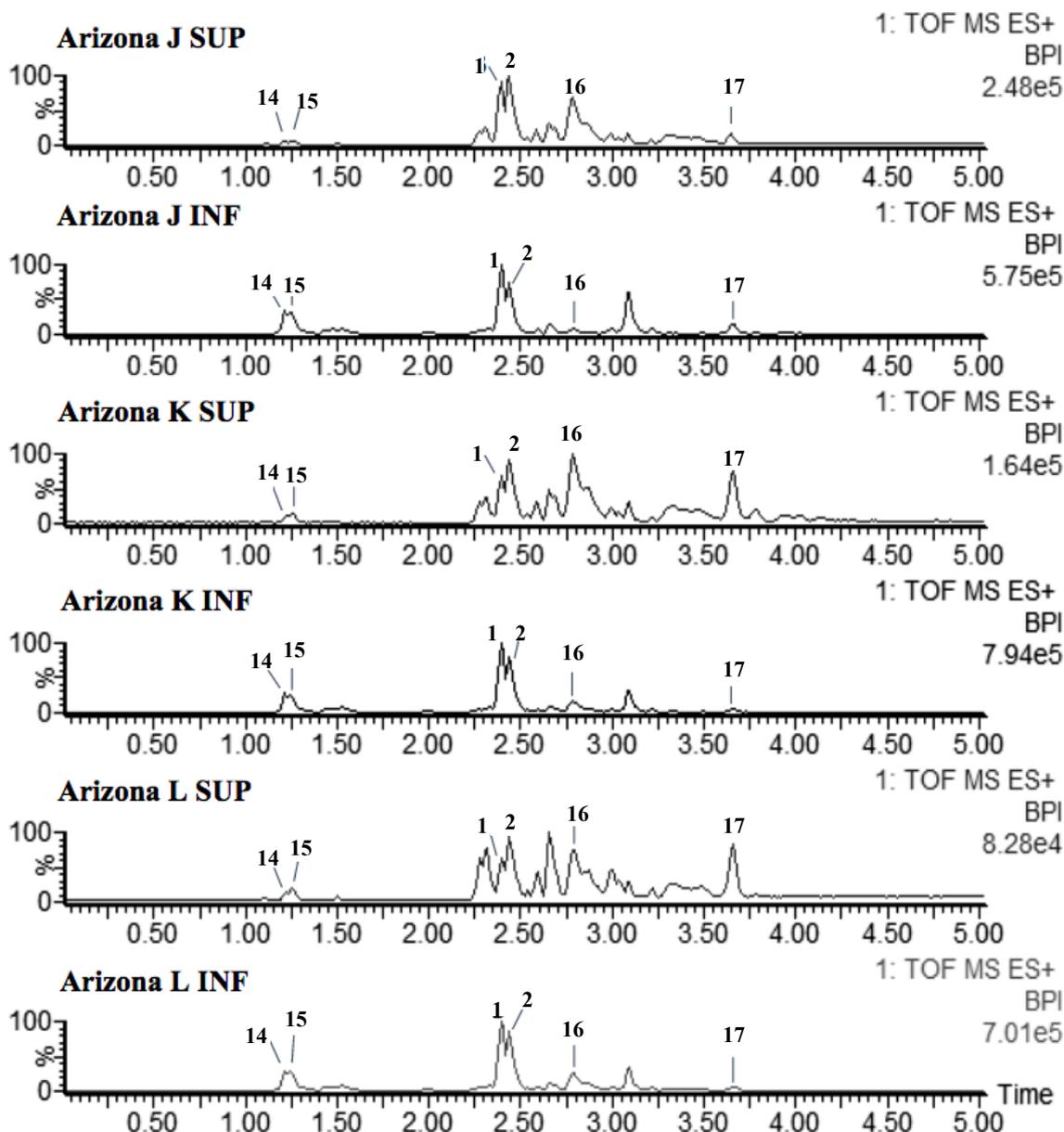
**Figura 9** – Cromatogramas de íon de pico de base (BPI) por CLUE-EM em modo positivo das amostras de “shake-flask” para avaliação do sistema HEMWat A-D.



**Figura 10** – Cromatogramas de íon de pico de base (BPI) por CLUE-EM em modo positivo das amostras de “shake-flask” para avaliação do sistema HEMWat F-H.



**Figura 11** – Cromatogramas de íon de pico de base (BPI) por CLUE-EM em modo positivo das amostras de “shake-flask” para avaliação do sistema HEMWat J-L.



As Figuras 9-11 ilustram os perfis de CLUE-EM das fases superiores e inferiores obtidas a partir do ensaio de “shake-flask” com a Fração C frente aos diferentes sistemas bifásicos HEMWat testados.

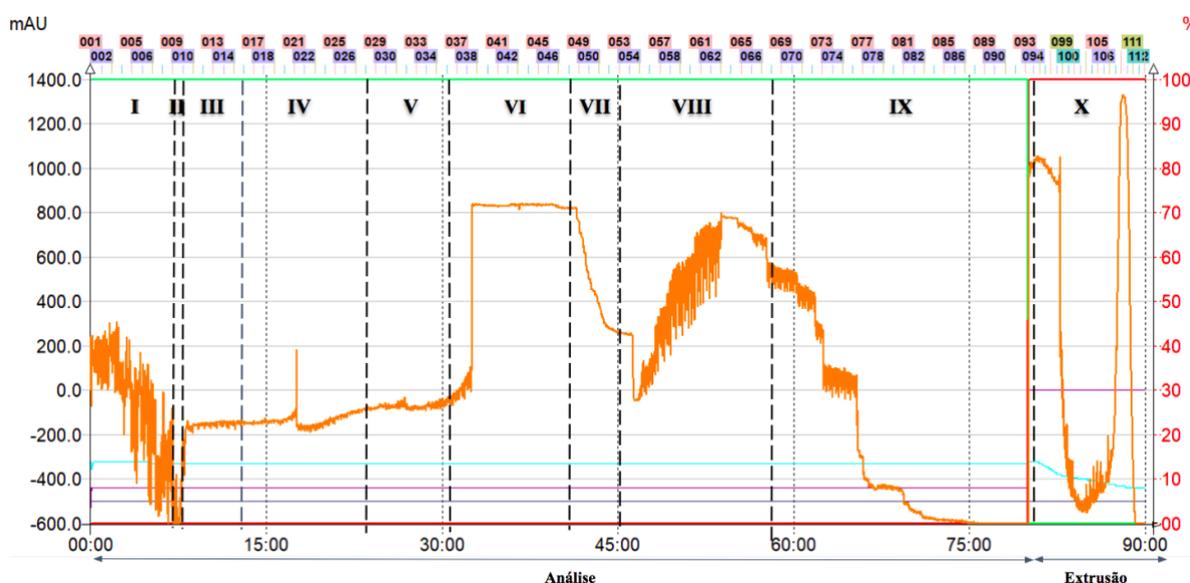
### 3.3.2 Fracionamento da Fração C por CPC: sistema de HEMWat C (ASC)

Após a escolha do sistema bifásico HEMWat C, em modo de eluição ascendente, como o mais apropriado para o isolamento das alcamidas presentes na Fração C, uma

alíquota da fração (308,0 mg) foi submetida ao fracionamento cromatográfico no sistema de CPC, conforme ilustrado na Figura 13.

No cromatograma preparativo de CPC (Figura 12) foi possível identificar a presença de dez frações principais, nomeadas de **I-X** e reunidas segundo o perfil cromatográfico avaliado por CCD. A fração **VI** contendo a substância (*2E,7E*)-*N*-isobutil-6,9-diidroxi-2,7-decadienamida (**2**), sendo obtidos 7,2 mg da substância isolada, com rendimento de 2,34%. Por outro lado, a fração **VIII** correspondeu à substância de interesse *N*-isobutildeca-2,8-dien-6-inamida (**1**), sendo purificados 5 mg (rendimento de 1,68%).

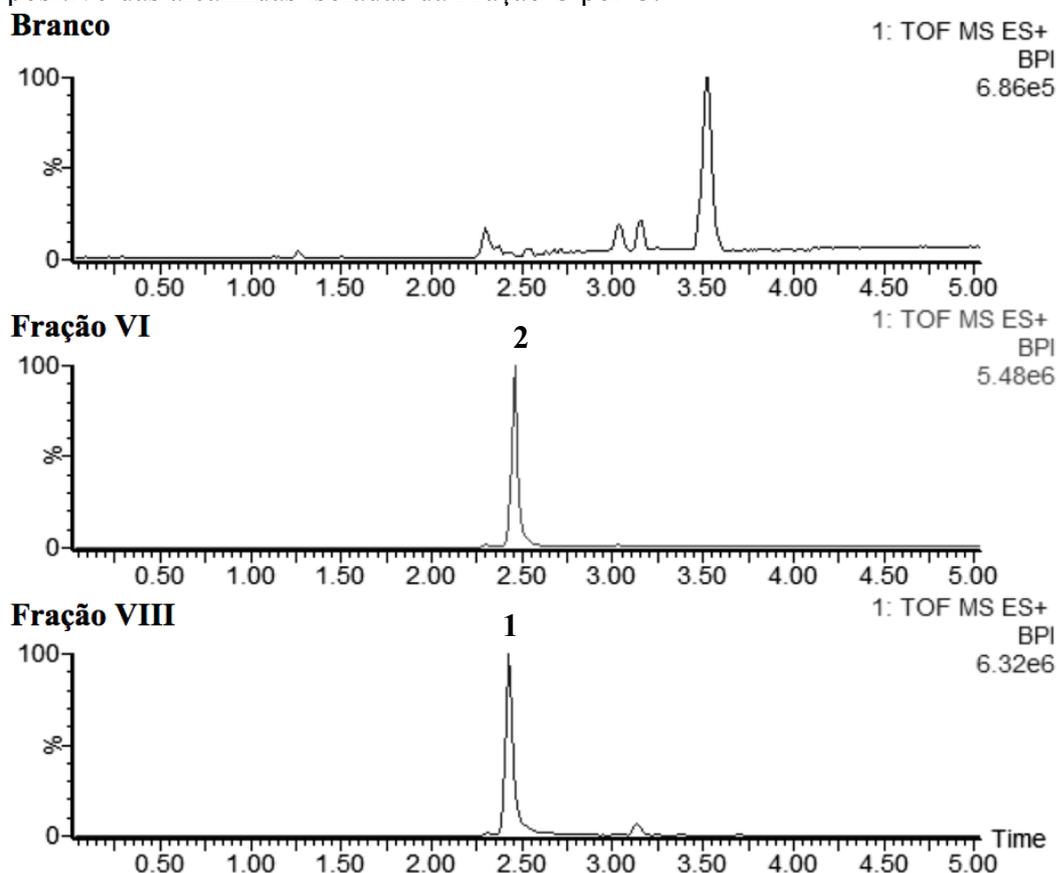
**Figura 12** – Fracionamento cromatográfico da Fração C monitorado em 230 nm.



O fracionamento da Fração C em sistema CPC, utilizando as condições cromatográficas descritas no *item 2.4.2*, demonstrou ser eficiente para o isolamento do composto proposto, a nova alcanida *N*-isobutildeca-2,8-dien-6-inamida (**1**), visto que o cromatograma apresentou boa resolução entre os picos referentes a substância de interesse e a alcanida e mistura (fator de separação de 2,21). Observou-se que o composto **1** apresentou tempo de retenção próximo a 55 minutos, condizente com os valores de  $K_D$  de 2,48 calculado com as fórmulas apresentadas no método de *shake-flask*, enquanto os outros compostos presentes na fração foram eluídos no sistema logo no início da análise ou na etapa de extrusão.

Em relação às análises de CLUE-EM dos compostos isolados, no cromatograma BPI obtido da fração VIII observa-se a presença de um único sinal cromatográfico, com tempo de retenção equivalente a 2,43 minutos, conforme demonstrado na Figura 13. No espectro de massa obtido por ESI(+) é possível observar o valor de íon de  $m/z$  220,1701, confirmando que a fração VIII se trata da substância *N*-isobutildeca-2,8-dien-6-inamida (**1**). A determinação de pureza da substância por CLUE-EM demonstrou uma pureza superior a 98%. Além dessa, a fração VI com único sinal em 2,46 minutos, cujo íon molecular em ESI(+) de  $m/z$  238,1809 confirma que se trata da substância (*2E,7E*)-*N*-isobutil-6,9-diidroxí-2,7-decadienamida (**2**), com pureza superior a 99%.

**Figura 13** - Cromatogramas de íon de pico de base (BPI) por CLUE-EM em modo positivo das alcanidas isoladas da Fração C por C.



A amostra contendo *N*-isobutildeca-2,8-dien-6-inamida isolada foi encaminhada para análise de RMN 1D e 2D para completa caracterização dos dados e já se encontram em vias de conclusão. As análises estão sendo realizadas em parceria com o professor Dr. Guilherme Lanzi Sasaki da Universidade Federal do Paraná.

É importante ressaltar que todas as alcanidas isoladas de *A. oleracea* já foram encaminhadas para a investigação do seu potencial anticlamídia em parceria com o Laboratório de Medicina Molecular da Universidade de Wake Forest (NC/USA), sob supervisão do professor Dr. Allen Tsang.

#### 4 CONCLUSÕES

- A técnica de extração por meio do aparato Soxhlet nas condições estabelecidas, utilizando o etanol como solvente extrator durante duas horas até completa exaustão, mostrou-se um método eficaz para a obtenção das alcanidas presentes nas partes aéreas de *Acmella oleracea*. Comparando com o método de extração por fluido supercrítico, o extrato etanólico apresentou um rendimento de extrato bruto maior, porém, demonstrando menor seletividade para os compostos de interesse tendo em vistas que o teor de espilantol em extratos supercríticos prevalecem ao etanólico. Ainda assim, esses resultados permitiram validar o método de purificação por CPC de alcanidas em única etapa e para matrizes vegetais preparadas de diferentes maneiras
- A caracterização por CLUE-EM possibilitou a identificação de doze alcanidas no extrato bruto, das quais o espilantol aparece como composto majoritário.
- O método de fracionamento do extrato bruto obtido por cromatografia de partição centrífuga demonstrou ser um método simples, rápido e efetivo para a purificação das alcanidas presentes na *A. oleracea*, principalmente para o espilantol.
- Uma vez não tendo sido obtidos em mistura os compostos *N*-isobutildeca-2,8-dien-6-inamida (**1**) e (2*E*,7*E*)-*N*-isobutil-6,9-diidroxi-2,7-decadienamida (**2**) necessitaram de uma nova etapa de purificação, onde o método desenvolvido por CPC, demonstrou ser eficiente para o isolamento da substância nova *N*-isobutildeca-2,8-dien-6-inamida (**1**), cuja purificação está sendo descrita aqui pela primeira vez na literatura.

## REFERÊNCIAS

- APAZA, L.; PÉREZ, V. T.; SERBAN, A. M.; NAVARRO, M.J.A.; RUMBERO, A. Alkamides from *Tropaeolum tuberosum* inhibit inflammatory response induced by TNF- $\alpha$  and NF- $\kappa$ B. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 235, p. 199-205, 2019.
- BAE, Stacy S.; EHRMANN, Brandie M.; ETTEFAGH, Keivan A.; CECH, Nadja B.. A validated liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry method for quantification of spilanthol in *Spilanthes acmella* (L.) Murr. **Phytochemical Analysis**, [S.L.], v. 21, n. 5, p. 438-443, 2010.
- BARBOSA, A.F.; DE CARVALHO, M.G.; SMITH, R.E.; SABAA-SRUR, A.U.O. Spilanthol: occurrence, extraction, chemistry and biological activities. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26, n. 1, p. 128-133, 2016.
- BLANCO, V.S.D.F.; MICHALAK, B.; ZELIOLI, Í.A.M.; DE OLIVEIRA, A.D.S.S.; RODRIGUES, M.V.N.; FERREIRA, A.G.; GARCIA, V.L.; CABRAL, F.A.; KISS, A.K.; RODRIGUES, R.A.F. Isolation of spilanthol from *Acmella oleracea* based on green chemistry and evaluation of its *in vitro* anti-inflammatory activity. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 140, n., p. 372- 379, 2018.
- BERTHOD, A. Separation and purification with a liquid stationary phase. **Separations**, v. 4, n. 4, p. 30-35, 2017.
- BERTHOD, A.; CARDA-BROCH, S. Determination of liquid–liquid partition coefficients by separation methods. **Journal of Chromatography A**, v. 1037, n. 1, p. 3-14, 2004.
- BOJCZUK, M.; ŻYŻELEWICZ, D.; HODUREK, P. Centrifugal partition chromatography – a review of recent applications and some classic references. **Journal of Separation Science**, v. 40, n. 7, p. 1429–1630, 2017.
- BOONEN, J.; BAERT, B.; ROCHE, N.; et al. Transdermal behaviour of the *N*-alkylamide spilanthol (affinin) from *Spilanthes acmella* (Compositae) extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 1, p. 77–84, 2010.
- BOONEN, J.; BRONSELAER, A.; NIELANDT, J.; VERYSER, L.; DE TRE, G.; DE SPIEGELEER, B. Alkamid database: chemistry, occurrence and functionality of plant *N*-alkylamides. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 3, p. 563-590, 2012.
- CAVALCANTI, V.M.S, Extração de espilantol de *Spilanthes var oleraceae* com dióxido de carbono supercrítico, State University of Campinas, 2008.
- CHENG, Y.-B.; LIU, R.H.; HO, M.-C.; WU, T.-Y.; CHEN, C.-Y.; LO, I.-W.; HOU, M.-F.; YUAN, S.-S.; WU, Y.-C.; CHANG, F.-R. Alkylamides of *Acmella oleracea*. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6970-6977, 2015.
- COSKUN, O. Separation techniques: chromatography. **Northern Clinics of Istanbul**, v. 3, n. 2, p. 156, 2016.
- CROMBIE, L., KRASINSKI, A., MANZOOR-I-KHUDA, M. Amides of vegetable origin. Part X. The stereochemistry and synthesis of affinin. **Journal of the Chemical Society**, p. 4970-4976, 1963.
- DALLAZEN, J.L.; MARIA-FERREIRA, D.; DA LUZ, B.B.; NASCIMENTO, A.M.; CIPRIANI, T.R.; DE SOUZA, L.M.; FELIPE, L.P.G.; SILVA, B.J.G.; NASSINI, R.; DE PAULA WERNER, M.F. Pharmacological potential of alkylamides from *Acmella oleracea* flowers and synthetic isobutylalkyl amide to treat inflammatory pain. **Inflammopharmacology**, v. 28, n. 1, p. 175-186, 2020.
- DIAS, A.; DA SILVA, A.; BOTELHO, J.; JÚNIOR, R.; DE SOUSA, H.; BRAGA, M. Temperature and density effects of the scCO<sub>2</sub> extraction of spilanthol from *Spilanthes acmella* flowers. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 121, p. 32-40, 2017.

- DIAS, A.M.A.; SANTOS, P.; SEABRA, I.J.; JÚNIOR, R.N.C.; BRAGA, M.E.M.; DE SOUSA, H.C. Spilanthol from *Spilanthes acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 61, n., p. 62-70, 2012.
- DUSHIME, R.; ZHU, Y.; WU, H.; SAEZ, D.; SHUKLA, K.; BROWN-HARDING, H.; BIAVATTI, M.W.; NELSON, K.J.; POOLE, L.B.; LOWTHER, W.T. Discovery of spilanthol endoperoxide as a redox natural compound active against mammalian Prx3 and *Chlamydia trachomatis* infection. **Antioxidants**, v. 9, n. 12, p. 1220, 2020.
- FABRY, W.; OKEMO, P.O.; ANSORG, R. Antibacterial activity of East African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, n. 1, p. 79-84, 1998.
- FRANCA, J.V.; QUEIROZ, M.S.R.; DO AMARAL, B.P.; et al. Distinct growth and extractive methods of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen rising different concentrations of spilanthol: An important bioactive compound in human dietary. **Food Research International**, v. 89, p. 781–789, 2016.
- GREGER, Harald; HOFER, Otmar; WERNER, Andreas. New amides from *Spilanthes oleracea*. **Monatshefte FR Chemie Chemical Monthly**, [S.L.], v. 116, n. 2, p. 273-277, 1985. Springer Science and Business Media LLC.
- GREGER, H. Alkamides: a critical reconsideration of a multifunctional class of unsaturated fatty acid amides. **Phytochemistry Reviews**, v. 15, n. 5, p. 729-770, 2016.
- GUETCHUENG, S.T.; NAHAR, L.; RITCHIE, K.J.; ISMAIL, F.M.; EVANS, A. R.; SARKER, S.D. Zanthoamides GI: Three new alkamides from *Zanthoxylum zanthoxyloides*. **Phytochemistry Letters**, v. 26, p. 125-129, 2018.
- HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, M.. **Preparative chromatography techniques: applications in natural product isolation**. Berlin: Springer, 1986.
- JOSHI, V.; SHARMA, G.; JADHAV, S. Alkamides: multifunctional bioactive agents in *Spilanthes* spp. **Journal of Scientific Research**, v. 64, n. 1, p. 198-206, 2020.
- LI, H.; CHEN, F.. Simultaneous separation and purification of five bioactive coumarins from the Chinese medicinal plant *Cnidium monnieri* by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 28, n. 3, p. 268-272, 2005.
- LUTZ, D.L.; MUDGE, E.; IPPOLITO, R.; BROWN, P.; SCHIEBER, A. Purification of alkylamides from *Echinacea angustifolia* (DC.) Hell. roots by high-speed countercurrent chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 491-494, 2011.
- MARTIN, R., BECKER, H. Amides and other constituents from *Acmella ciliata*. **Phytochemistry**, v. 24, p. 2295-2300, 1985.
- MBEUNKUI, F.; GRACE, M.H.; LATEGAN, C.; SMITH, P.J.; RASKIN, I.; LILA, M.A. Isolation and identification of antiplasmodial *N*-alkylamides from *Spilanthes acmella* flowers using centrifugal partition chromatography and ESI-IT-TOF-MS. **Journal of Chromatography B**, v. 879, n. 21, p. 1886-1892, 2011.
- NASCIMENTO, A.M.; SOUZA, L.M. de; BAGGIO, C.H.; WERNER, M.F.P.; MARIA-FERREIRA, D.; SILVA, L.M. da; SASSAKI, G.L.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T.R.. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. **Phytochemistry**, v. 85, p. 137-142, 2013.
- NASCIMENTO, L.E.S.; ARRIOLA, N.D.A.; DA SILVA, L.A.L.; FAQUETI, L.G.; SANDJO, L.P.; DE ARAÚJO, C.E.S.; BIAVATTI, M.W.; BARCELOS-OLIVEIRA, J.L.; AMBONI, R.D.D.M.C. Phytochemical profile of different anatomical parts of jambu (*Acmella oleracea* (L.) RK Jansen): a comparison between hydroponic and conventional cultivation using PCA and cluster analysis. **Food Chemistry**, v. 332, n. 127393, p. 1-12, 2020.
- NOMURA, E.C.O.; RODRIGUES, M.R.A.; SILVA, C.F.; HAMM, L.A.; NASCIMENTO, A.M.; SOUZA, L.M.; CIPRIANI, T.R.; BAGGIO, C.H.; WERNER,

- M.F.P. Antinociceptive effects of ethanolic extract from the flowers of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 583-589, 2013.
- RAJENDRAN, R.; NARASHIMMAN, B.S.; TRIVEDI, V.; CHATURVEDI, R. Isolation and quantification of antimalarial *N*-alkylamides from flower-head derived in vitro callus cultures of *Spilanthes paniculata*. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 124, n. 1, p. 99-107, 2017.
- RANI, A.S.; SANA, H.; SULAKSHANA, G.; PURI, E.S.; KEERTI, M. *Spilanthes acmella* - an important medicinal plant. **International Journal of Minor Fruits, Medicinal and Aromatic Plants**, v. 5, n. 2, p. 15-26, 2019.
- RATNASOORIYA, W.D.; PIERIS, K.P.P. Attenuation of Persistent Pain and Hyperalgesia by *Spilanthus acmella*. Flowers in Rats. **Pharmaceutical Biology**. v. 43, p. 614-619, 2005.
- RONDANELLI, M.; FOSSARI, F.; VECCHIO, V.; BRASCHI, V.; RIVA, A.; ALLEGRINI, P.; PETRANGOLINI, G.; IANNELLO, G.; FALIVA, M. A.; PERONI, *Acmella oleracea* for pain management. **Fitoterapia**, v. 140, n. 104419, p. 1-8, 2019.
- RIOS, M.Y. Natural alkamides: pharmacology, chemistry and distribution. *in* VALLISUTA, O. **Drug Discovery Research in Pharmacognosy**: InTech, p. 107-144, 2012.
- SANTOS, C.P.; NINA, M.M., ROCHA, S.F.; LIMA, R.A. A importância da utilização da espécie *Acmella oleracea* L. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 7, n. 4, p. 481-485, 2019.
- SAVIC, S.; PETROVIC, S.; SAVIC, S.; CEKIC, N. Identification and photostability of *N*-alkylamides from *Acmella oleracea* extract. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 195, n., p.113819, 2021.
- SHARMA, V., BOONEN, J., CHAUHAN, N. S., THAKUR, M., DE SPIEGELEER, B., & DIXIT, V. K. *Spilanthes acmella* ethanolic flower extract: LC-MS alkylamide profiling and its effects on sexual behavior in male rats. **Phytomedicine**, v. 18, n. 13, p. 1161-1169, 2011.
- SILVEIRA, N.; SANDJO, L.P.; BIAVATTI, M.W. Spilanthol-containing products: a patent review (1996-2016). **Trends in Food Science & Technology**, v. 74, n., p. 107-111, 2018.
- SIMAS, N.K.; DELLAMORA, E.D.C.L.; SCHRIPSEMA, J.; LAGE, C.L.S.; DE OLIVEIRA FILHO, A.M.; WESSJOHANN, L.; PORZEL, A.; KUSTER, R.M. Acetylenic 2-phenylethylamides and new isobutylamides from *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen, a Brazilian spice with larvicidal activity on *Aedes aegypti*. **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 1, p. 67-72, 2013.
- SKALICKA-WOŹNIAK, K.; GARRARD, I. Counter-current chromatography for the separation of terpenoids: a comprehensive review with respect to the solvent systems employed. **Phytochemistry Reviews**, v. 13, n. 2, p. 547-572, 2014.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis**: a thin layer chromatography atlas, 2<sup>a</sup> ed, Springer Verlag, 2001.

## ANEXO

**Tabela A1** – Valores de coeficiente de partição ( $K_D$ ) obtidos para os compostos identificados na Fração C.

Composto	Sistemas bifásicos de solventes ( <i>n</i> -hexano/acetato de etila/metanol/água)																					
	HEMWat A		HEMWat B		HEMWat C		HEMWat D		HEMWat F		HEMWat G		HEMWat H		HEMWat J		HEMWat K		HEMWat L			
	ASC	DSC	ASC	DSC	ASC	DSC	ASC	DSC	ASC	DSC	ASC	DSC	ASC	DSC	ASC	DSC	ASC	DSC	ASC	DSC		
<b>14</b>	24,66	0,04	11,45	0,09	<b>10,85</b>	0,09	11,57	0,08	13,85	0,07	14,11	0,07	15,07	0,07	12,05	0,08	19,69	0,05	23,13	0,04		
<b>15</b>	31,59	0,03	11,20	0,09	<b>9,85</b>	0,10	10,66	0,09	10,22	0,09	12,77	0,08	14,43	0,07	13,53	0,07	9,83	0,10	16,13	0,06		
<b>1</b>	1,70	0,59	2,13	0,47	<b>2,48</b>	0,40	2,93	0,34	3,56	0,28	4,69	0,21	5,47	0,18	3,01	0,33	8,66	0,11	16,44	0,06		
<b>2</b>	0,63	1,58	0,85	1,17	<b>1,12</b>	0,90	1,18	0,85	1,35	0,74	1,79	0,56	2,03	0,49	1,33	0,75	2,82	0,35	5,07	0,19		
<b>16</b>	0,03	34,73	0,09	10,50	<b>1,14</b>	7,10	0,17	5,93	0,16	6,37	0,26	3,82	0,28	3,53	0,24	4,15	0,70	1,42	2,40	0,42		
<b>17</b>	0,84	1,19	1,18	0,85	<b>0,79</b>	1,26	1,05	0,95	1,48	0,68	0,92	1,08	1,12	0,89	2,23	0,45	0,69	1,45	0,80	1,24		

**14** – composto não identificado; **15** – composto não identificado; **1** – *N*-isobutildeca-2,8-dien-6-inamida; **2** – *2E,7E*-*N*-isobutil-6,9-diidroxi-2,7-decadienamida (longipenamida B); **16** – composto não identificado; **17** – composto não identificado.