

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

**Investigação fitoquímica e farmacológica
das alcanidas de *Acmella ciliata* (H. B. K.) Cassini
(ASTERACEAE)**

Narjara Silveira

Florianópolis
2017

Narjara Silveira

**Investigação fitoquímica e farmacológica
das alcanidas de *Acmella ciliata* (H. B. K.) Cassini
(ASTERACEAE)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Farmácia.

Orientadora: Profa. Dra. Maique Weber Biavatti

Coorientador: Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo

Florianópolis
2017

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

Silveira, Narjara

Investigação fitoquímica e farmacológica das
alcamidas de *Acmella ciliata* (H. B. K.) Cassini
(ASTERACEAE) / Narjara Silveira ; orientador,
Maique Weber Biavatti, coorientador, Louis Pergaud
Sandjo, 2017.

208 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de
Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. *Acmella ciliata*. 3. jambu. 4.
alcamidas. 5. epilantol. I. Biavatti, Maique
Weber. II. Sandjo, Louis Pergaud. III. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação
em Farmácia. IV. Título.

Narjara Silveira


**Investigação fitoquímica e farmacológica
das alcamidas de *Acmella ciliata* (H. B. K.) Cassini
(ASTERACEAE)**


Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor em
Farmácia e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas


Florianópolis, 23 de agosto de 2017



Prof(a). Dra. Tânia Beatriz Creczynski Pasa
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da
UFSC

Banca Examinadora:


Prof(a). Dr(a). Cláudia Maria Oliveira Simões (UFSC – Membro
Titular)


Prof(a). Dr(a). Thiago Caon (UFSC – Membro Titular)


Prof(a). Dr(a). Suzana Guimarães Leitão (UFRJ – Membro Titular)


Prof(a). Dr(a). Maique Weber Biavatti (UFSC – Orientador)

Este trabalho é dedicado aos meus pais Dora e Kadinho, a minha madrinha e segunda mãe Lídia e ao meu grande amigo e companheiro André, fundamentais nesta jornada e por sempre me lembrarem de que o maior objetivo da vida é viver.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho:

A Deus, por mais esta oportunidade de viver, aprender e evoluir.

À minha família, especialmente meus pais e o André, por todo amor incondicional, suporte e incentivo.

À professora Maique Weber Biavatti, que mesmo à distância, aceitou ser minha orientadora, proporcionou a oportunidade para a realização deste trabalho e meu aprimoramento profissional. Muito obrigada por todo apoio e paciência ao longo desses quatro anos.

Ao professor Louis Pergaud Sandjo, por toda disponibilidade e atenção em me ajudar com as análises e realização deste trabalho.

A todos os professores, técnicos e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Farmácia da UFSC.

A todos os colegas que fiz ao longo do doutorado, em especial aos da Central Analítica, que me receberam de braços abertos e se mostram solícitos em me auxiliar nas minhas dificuldades.

Ao César Simionato, ao Horto de Plantas Medicinais, a Édina, Daiane e ao Centro Ambiental da Associação dos Fiscais da Fazenda de Santa Catarina (AFFESC) pela disponibilidade do material vegetal.

Ao professor Marcos Sobral da UFJS, pela identificação do material vegetal.

Ao professor Mario Steindel, Dra Milene Moraes e a todos do Laboratório de Protozoologia pela parceria na realização dos ensaios leishmanicida e tripanocida.

Ao professor Rui Prediger, suas alunas Katiane Roversi e Marissa Schamne e a todos do Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas pela realização dos ensaios de avaliação canabimimética.

Ao professor Thomas Schmidt, da Universidade de Münster (Alemanha), pela parceria em realizar os ensaios de atividade antiplasmódica.

Ao professor Andersson Barisson e ao Dr. Alan Diego da Conceição Santos da UFPR, por gentilmente realizarem algumas das análises de RMN.

Ao Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação, UFSC, CAPES e CNPq pelo apoio financeiro e disponibilidade estrutural, essenciais para a realização deste trabalho.

*Não importa o quanto você sabe. O
que importa mesmo é o que você é
capaz de fazer com aquilo que sabe.*
(Autor desconhecido)

Narjara Silveira. Investigação fitoquímica e farmacológica das alcanidas de *Acmella ciliata* (H.B.K.) Cassini (ASTERACEAE) [Tese de Doutorado]. Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina. Orientadora: Dra. Maique Weber Biavatti, 2017.

RESUMO

Acmella ciliata (H.B.K.) Cassini é uma das espécies popularmente conhecidas como jambu, por apresentar as mesmas características organolépticas de *A. oleracea*. Ambas ocorrem na região tropical da América do Sul e a segunda é bastante utilizada na culinária do Norte e Nordeste do Brasil, bem como na medicina popular no tratamento de dores de dente, devido ao efeito anestésico causado quando as suas partes aéreas são mastigadas. A alcanida espilantol é a principal responsável por esse efeito. Algumas atividades farmacológicas vêm sendo descritas para as alcanidas, tais como anti-inflamatória, antiparasitária e analgésica. O presente trabalho teve como objetivos isolar, caracterizar e investigar a estabilidade das alcanidas de *A. ciliata*, bem como avaliar as suas atividades leishmanicida, tripanocida e antiplasmódica *in vitro* e atividades canabimimética e neuroprotetora *in vivo*, além de realizar o mapeamento tecnológico do espilantol. A partir do extrato etanólico das partes aéreas frescas foram identificadas 10 alcanidas, que tiveram as suas estruturas elucidadas por meio das técnicas espectroscópicas de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C e/ou por Espectrometria de Massas de Alta Resolução em comparação com os dados da literatura. Foram identificadas três isobutilamidas olefínicas [espilantol, dioxiacmellamida (alcanida inédita) e (2*E*,4*E*-6*Z*-8*E*)-*N*-isobutil-2,4,6,8-dodecatetraenamida], uma metilbutilamida olefínica [(2*E*,6*Z*,8*E*)-*N*-(2-metilbutil)-2,6,8-decatrienamida], duas feniletilamidas acetilênicas [(2,3-epoxi-*N*-feniletilamida-6,8-nonodiinamida e (2*Z*)-*N*-feniletil-6,8-nonadiinamida)] e quatro isobutilamidas acetilênicas [(2*E*,4*E*)-*N*-isobutil-2,4-undecadien-8,10-diinamida, (2*E*)-*N*-isobutil-2-undecaen-8,10-diinamida, (2*E*,7*Z*)-*N*-isobutil-2,7-tridecadien-10,12-diinamida e (7*Z*)-*N*-(isobutil)-7-tridecaen-10,12-diinamida)], sendo a última identificada pela primeira vez para o gênero. O ensaio preliminar de termodegradação mostrou que o espilantol degradou parcialmente a partir de 80 °C, temperatura inferior à maioria das preparações quentes em que o jambu é utilizado. Os estudos de fotodegradação mostraram que o espilantol permaneceu estável, quando em contato com luz e oxigênio, quando solubilizado em

metanol; havendo conversão total à dioxiacmellamida quando o solvente foi removido. Nos ensaios de atividade frente a protozoários, apenas as alcanidas espilantol e dioxiacmellamida mostraram-se ativas contra *Plasmodium falciparum* cepa NF54 (sensível à cloroquina), com valores de CI_{50} de 0,99 e 1,29 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. A dioxiacmellamida também apresentou atividade ($CI_{50} = 0,54 \mu\text{g/mL}$) frente a cepa multirresistente K1 de *P. falciparum*. O espilantol não desencadeou os sintomas da tétrede canabinoide, indicando não ter afinidade pelos receptores CB_1 . Com o objetivo de analisar o panorama mundial do uso industrial do espilantol, fez-se o mapeamento tecnológico por meio de pesquisas por patentes nas bases de dados patentários internacionais Espacenet® e Patentscope®. Nesse monitoramento foram encontrados 462 documentos (336 depósitos e 126 concessões) entre 1996 – 2016, sendo a grande maioria relacionada às propriedades sensoriais do espilantol.

Palavras-chave: Asteraceae, *Acmella*, *Acmella ciliata*, alcanidas, espilantol, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Plasmodium*, canabinoide, patentes.

Narjara Silveira. Investigação fitoquímica e farmacológica das alcanidas de *Acmella ciliata* (H.B.K.) Cassini (ASTERACEAE) [Tese de Doutorado]. Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina. Orientadora: Dra. Maique Weber Biavatti, 2017.

ABSTRACT

Acmella ciliata (H.B.K.) Cassini, one of the species popularly known as jambu, because of the same organoleptic characteristics of *A. oleracea*. Both are native to the tropical region of South America and are widely used in the cuisine of North and Northeast of Brazil, both are also used in popular medicine for the treatment of toothaches, due to the anesthetic effect caused when its aerial parts are chewed. The alkamide spilanthol is primarily responsible for this effect. Some pharmacological activities have been reported for the alkamides, such as anti-inflammatory, antiparasitic and analgesic. The objective of this work was to isolate, characterize and investigate the stability of *A. ciliata* alkamides. This study also aimed to evaluate the metabolites leishmanicidal, trypanocidal and antiplasmic activities *in vitro* and cannabimimetic and neuroprotective activities *in vivo*. In addition, we aimed to perform the technological mapping of spilanthol. From the ethanol extract of fresh aerial parts, 10 alkamides were identified, and their structures were elucidated by spectroscopic techniques of ^1H and ^{13}C Nuclear Magnetic Resonance and/or by High Resolution Mass Spectrometry. The recorded data were compared to those reported in the literature. Thus, three olefinic isobutylamides (spilanthol, dioxyacmellamide (new alkamide) and (2*E*-4*E*-6*Z*-8*E*)-*N*-isobutyl-2,4,6,8-dodecatetraenamide), an olefinic methylbutylamide (2*E*-6*Z*-8*E*)-*N*-(2-methylbutyl-2,6,8-decatrienamide), two acetylenic phenylethylamides (2,3-epoxy-*N*-phenylethylamide-6,8-nonodiinamide and (2*Z*)-*N*-phenylethyl-6,8-nonadiyininamide) and four acetylenic isobutylamides (2*E*-4*E*)-*N*-isobutyl-2,4-undecadien-8,10-diinamide, (2*E*)-*N*-isobutyl-2-undeca-8,10-diinamide, (2*E*,7*Z*)-*N*-isobutyl-2,7-tridecadien-10,12-diaminamide and (7*Z*)-*N*- isobutyl-7-trideca-10,12-diinamide were identified for the first time in *Acmella*.

The preliminary thermodegradation test showed that spilanthol partially degrades when exposed to 80 ° C, which is a temperature lower than most of hot preparations in which jambu is used. The photodegradation studies showed that spilanthol remained stable, in a methanolic solution

when exposed to light and oxygen or solubilized in methanol. However, the conversion to dioxalacellamide was observed when the solvent was removed. In the protozoa activity assays, only the spilanthol and dioxyacmellamide were active against *Plasmodium falciparum* strain NF54 (sensitive to chloroquine), with IC₅₀ of 0.99 and 1.29 µg/mL, respectively. Dioxyacmellamide also showed good activity (IC₅₀ = 0.54 µg/mL) against *P. falciparum* K1 multiresistant strain. Spilanthol did not trigger the symptoms of cannabinoid tetrad, indicating no affinity for CB₁ receptors. Regarding the industrial use of spilanthol, the technological mapping was done through patent searches in the international databases Espacenet® and Patentscope®. In this monitoring 462 documents (336 applications and 126 concessions) were found between 1996 - 2016, most of them related to the sensory properties of espilantol.

Keywords: Asteraceae, *Acmella*, *Acmella ciliata*, alkamides, spilanthol, *Leishmania*, *Trypanosoma*, *Plasmodium*, cannabinoid, patents.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– Distribuição geográfica do gênero <i>Acmella</i> no Brasil.....	41
Figura 2. <i>Acmella ciliata</i> (jambu)	45
Figura 3 – Porções aminas das alcanidas	52
Figura 4 - Alcanidas características de diferentes famílias de plantas	53
Figura 5 – Estrutura da alcanida α - <i>sanshool</i>	53
Figura 6 – Alcanidas olefinicas normalmente encontradas na tribo Heliantheae	54
Figura 7 – Rota biossintética proposta para o espilantol. Adaptado de Greger (1974) e Martin; Becker (1985).	67
Figura 8 – Estrutura do endocanabinoide anandamida.....	70
Figura 9 – Alcanidas de <i>Echinacea</i>	71
Figura 10 – Exsicata representativa de <i>Acmella ciliata</i>	78
Figura 11 - Extração líquido-líquido do extrato bruto hidroetanólico EA1 de <i>Acmella ciliata</i>	80
Figura 12 - Extração líquido-líquido do extrato hidroetanólico EA2 de <i>Acmella ciliata</i>	81
Figura 13 – Fotografia ilustrativa do ensaio de termodegradação.....	89
Figura 14 – Esquema da câmara em que foi realizado o ensaio de fotodegradação do espilantol.....	90
Figura 15 - Representação dos testes comportamentais constituintes do teste de atividade canabimimética	95
Figura 16 - Perfil observado por CCD das sub-frações obtidas por CLV de EA1	97
Figura 17 – Perfil observado por CCD das sub-frações obtidas por CLV de EA2.	98
Figura 18 – Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) do extrato bruto de <i>Acmella ciliata</i> obtido a partir da análise por CLUP-IES-EMAR no modo de ionização positivo.....	100
Figura 19 – Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) da fração hexano de <i>Acmella ciliata</i> obtido a partir da análise por CLUP-IES-EMAR no modo de ionização positivo.....	101
Figura 20 – Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) do extrato em hexano de <i>Acmella ciliata</i> obtido a partir da análise por CLUP-IES-EMAR no modo de ionização positivo.	102
Figura 21 – (a) Mecanismo de formação do cátion radicalar distônico. (b) Mecanismo de formação do cátion ciclopropeno. Espilantol utilizado como modelo. Adaptado de (HISERODT et al., 2004).	103
Figura 22 – Proposta de mecanismos de fragmentação do espilantol.	105
Figura 23 – Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) e espectro IES-EM/EM de AC1 (espilantol) no modo de ionização positivo	106

Figura 24 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, TMS, acetona- d_6) da substância AC1 (espilantol).....	106
Figura 25 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância AC1 (espilantol) ampliado na região entre δ_{H} 6,03 e δ_{H} 6,80. .	107
Figura 26 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância AC1 de ampliado na região entre δ_{H} 5,20 e δ_{H} 6,35.....	107
Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância AC1 de ampliado na região entre δ_{H} 0,88 e δ_{H} 3,15.....	108
Figura 28 - Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para a substância AC1 (espilantol).	109
Figura 29 - Mapa de correlação HMBC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para a substância AC1 (espilantol).	109
Figura 30 – Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) e espectro IES-EM/EM de AC2 no modo de ionização positivo.	111
Figura 31 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, TMS, CDCl_3) da substância AC2.	112
Figura 32 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, TMS, CDCl_3) da substância AC2 ampliado na região entre δ_{H} 7,15 e δ_{H} 7,37 (anel aromático).....	112
Figura 33 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, TMS, CDCl_3) da substância AC2 ampliado na região entre δ_{H} 2,80 e δ_{H} 3,80.....	113
Figura 34 - Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, CDCl_3) para a substância AC2.	114
Figura 35 - Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, CDCl_3) para a substância AC2 ampliado na região entre δ_{H} 2,80 e δ_{H} 3,80.	114
Figura 36 - Mapa de correlação HMBC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, CDCl_3) para a substância AC2.	114
Figura 37 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, TMS, CDCl_3) da substância AC2 ampliado na região entre δ_{H} 1,40 e δ_{H} 2,40.....	116
Figura 38 - Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, CDCl_3) para a substância AC2 ampliado na região entre δ_{H} 1,40 e δ_{H} 1,70.	116
Figura 39 - Mapa de correlação HMBC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, CDCl_3) para a substância AC2 ampliado na região entre δ_{H} 1,40 e δ_{H} 1,70.	117
Figura 40 - Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 125 MHz ^{13}C , TMS, CDCl_3) para a substância AC2 ampliado na região entre δ_{H} 2,00 e δ_{H} 2,35.	117
Figura 41 - Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) e espectro IES-EM/EM de AC3 no modo de ionização positivo.	119
Figura 42 – Proposta de mecanismos de fragmentação de AC3.....	119
Figura 43 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância AC3.....	120

Figura 44 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância AC3 ampliado na região entre δ_H 3,2 e δ_H 0,85.....	120
Figura 45 - Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, CDCl_3) para a substância AC3.....	121
Figura 46 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância AC3 ampliado na região entre δ_H 6,90 e δ_H 5,75.....	121
Figura 47 - Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, CDCl_3) para a substância AC3.....	122
Figura 48 – Simulação do espectro RMN de ^1H para os hidrogênios olefínicos que ressonam em 5,82 (H-2); 5,83 (H-7) e 5,86 ppm (H-8).	123
Figura 49 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância AC3 ampliado na região entre δ_H 4,72 e δ_H 1,20.....	123
Figura 50 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância AC3 ampliado na região entre δ_H 2,40 e δ_H 1,60.....	124
Figura 51 - Correlações HMBC da substância AC3	125
Figura 52 - Rota biogenética proposta para a formação da dioxiacmellamida a partir do epilantol.....	126
Figura 53 – Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) obtido a partir da análise por UPLC-ESI-MS/MS e espectro ESI-MS/MS de AC4 no modo de ionização positivo.....	127
Figura 54 – Mecanismos de fragmentação de AC4.	127
Figura 55 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, TMS, CDCl_3) de AC4... ..	128
Figura 56 - Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) obtido a partir da análise por UPLC-ESI-MS/MS e espectro ESI-MS/MS de AC5 no modo de ionização positivo.....	130
Figura 57 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, TMS, CDCl_3) de AC5... ..	131
Figura 58 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, TMS, CDCl_3) de AC5, ampliado na região δ_H 3,20 e δ_H 0,90.....	131
Figura 59 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, TMS, CDCl_3) de AC5, ampliado na região δ_H 7,25 e δ_H 5,20.....	132
Figura 60 - Simulação do espectro RMN de ^1H para os hidrogênios olefínicos que ressonam em 6,14 (H-4), 6,10 (H-5) e 5,97 ppm (H-8).	132
Figura 61 - Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) obtido a partir da análise por UPLC-ESI-MS/MS e espectro ESI-MS/MS de AC6 no modo de ionização positivo.....	134
Figura 62 - Mecanismos de fragmentação de AC6.	135
Figura 63 - Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) obtido a partir da análise por UPLC-ESI-MS/MS e espectro ESI-MS/MS de AC7 no modo de ionização positivo.....	136
Figura 64 – Mecanismos de fragmentação de AC7.	136
Figura 65 - Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) obtido a partir da análise por UPLC-ESI-MS/MS e espectro ESI-MS/MS de AC8 no modo de ionização positivo.....	137

Figura 66 – Proposta dos mecanismos de fragmentação de AC8.....	138
Figura 67 - Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) obtido a partir da análise por UPLC-ESI-MS/MS e espectro ESI-MS/MS de AC9 no modo de ionização positivo.	139
Figura 68 – Propostas dos mecanismos de fragmentação de AC9.	140
Figura 69 - Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) obtido a partir da análise por UPLC-ESI-MS/MS e espectro ESI-MS/MS de AC10 no modo de ionização positivo.....	141
Figura 70 – Propostas de mecanismos de fragmentação para AC10.....	141
Figura 71 – Expansão dos cromatogramas de íon de pico base (BPI) obtidos no modo de ionização positivo. Extrato bruto em solução (500 µg/mL) no tempo zero (a) e extração do íon <i>m/z</i> 222,1858 (b).	144
Figura 72 – Gráficos do Log da área do espilantol <i>versus</i> tempo nas temperaturas: 40 °C (a); 80 °C (b); 100 °C (c) e 120 °C (d).	144
Figura 73 – Expansão do cromatograma de íon de pico base (BPI) obtidos no modo de ionização positivo. Solução de espilantol em MeOH (100 µg/mL) no tempo zero (a), extração do íon <i>m/z</i> 222,1858 (b) e extração do íon <i>m/z</i> 254,1739 (c).....	145
Figura 74 - Expansão dos cromatogramas de íon de pico base (BPI) obtidos a no modo de ionização positivo. Solução de espilantol em MeOH (100 µg/mL) exposto a luz e oxigênio, nos tempos 48 (a), 105 (b), 190 (c) e 300 h (d).	146
Figura 75 - Expansão dos cromatogramas de íon de pico base (BPI) no modo de ionização positivo. Solução de espilantol em MeOH (100 µg/mL) exposto a oxigênio e na ausência de luz, nos tempos 8 (a), 22 (b), 42 (c) e 72 dias (d).....	146
Figura 76 - Expansão dos cromatogramas de íon de pico base (BPI) obtidos no modo de ionização positivo. Amostras do grupo C1 nos tempos 0 (a), 2 (b), 5 (c), 7 (d) e 9 dias (e).....	147
Figura 77 - Expansão dos cromatogramas de íon de pico base (BPI) obtidos no modo de ionização positivo. Amostras do grupo C2, nos tempos 0 (a), 2 (b), 5 (c), 7 (d) e 9 dias (e).....	148
Figura 78 - Expansão dos cromatogramas de íon de pico base (BPI) obtidos no modo de ionização positivo. Amostras do grupo D1, nos tempos 0 (a), 2 (b), 5 (c), 7 (d) e 9 dias (e).....	148
Figura 79 - Expansão dos cromatogramas de íon de pico base (BPI) obtidos no modo de ionização positivo. Amostras do grupo D2, nos tempos 0 (a), 2 (b), 5 (c), 7 (d) e 9 dias (e).....	149
Figura 80 - Gráficos da área <i>versus</i> tempo obtidos a partir da extração dos íons: <i>m/z</i> 222 do grupo C2 (a); <i>m/z</i> 254 do grupo C2 (b); <i>m/z</i> 222 do grupo D2 (c) e <i>m/z</i> 254 do grupo D2 (d).	149

Figura 81 – Efeito do espilantol no teste da téttrade de efeitos canabinoides. O espilantol (4, 8 e 16 mg/kg, i.p.) ou controle (WIN 55-212, 3 mg/kg, i.p) e solução salina foram injetados nos camundongos 5 min antes do teste do campo aberto, catalepsia, temperatura corporal e placa quente. * $p < 0,05$ vs. Controle negativo salina (post-hoc de Newman-keuls). (n = 6).....	155
Figura 82 - Efeito do espilantol no teste da téttrade de efeitos canabinoides. O espilantol (1, 30 e 100 pmol, i.c.v., 2 μ L) e solução salina (2 μ L) foram injetados nos camundongos 5 min antes do teste do campo aberto, catalepsia, temperatura corporal e placa quente. * $p < 0,05$ vs. Controle negativo salina (post-hoc de Newman-keuls). (n = 6).....	156
Figura 83 – Gráfico com as patentes, contendo o espilantol, depositadas (cinza escuro) e concedidas (cinza claro), entre 1996 – 2016.....	158

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Classificação das subfamílias e tribos de Asteraceae, segundo Panero e Funk (2008).....	39
Quadro 2 – Atividades biológicas e farmacológicas reportadas para as diferentes espécies do gênero <i>Acmella</i>	42
Quadro 3 – Substâncias isoladas de <i>Acmella ciliata</i>	46
Quadro 4 - Atividades farmacológicas das alcanidas isoladas do gênero <i>Acmella</i>	55
Quadro 5 – Patentes publicadas ou concedidas em que o espilantol foi utilizado por sua atividade farmacológica, obtidas na base de dados Patentscope, entre 1996 – 2016.....	159
Quadro 6 - Patentes publicadas ou concedidas em que o espilantol foi utilizado em cosméticos, obtidas na base de dados Patentscope, entre 1996 – 2016.....	161
Quadro 7 – Patentes publicadas ou concedidas em que o espilantol foi utilizado por suas propriedades sensoriais, obtidas na base de dados Patentscope, entre 1996 – 2016.....	163
Quadro 8 - Patentes publicadas ou concedidas sobre as formas de obtenção do espilantol, obtidas na base de dados Patentscope, entre 1996 – 2016.....	174

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Rendimento dos três extratos das partes aéreas de <i>A. ciliata</i>	79
Tabela 2 - Fracionamento por CLV da fração hexano do EA1.	83
Tabela 3 - Fracionamento por CLV da fração hexano do EA2.	84
Tabela 4 – Sistema de solventes para eluição da subfração 5 da CLV do EA1	85
Tabela 5 – Sistema de solventes para eluição da subfração 8 da CLV do EA1	86
Tabela 6 – Sistema de solventes para eluição das frações 16/18 subfração 8 da CLV do EA1	86
Tabela 7 – Sistema de solventes para eluição da subfração 4 da CLV do EA2	87
Tabela 8 – Sistema de solventes para eluição das frações 18/27 subfração 4 da CLV do EA2.....	87
Tabela 9 – Sistema de solventes para eluição da subfração 6 da CLV do EA2	88
Tabela 10 - Dados de RMN ¹ H e ¹³ C para a substância AC1 (espilantol) e dados comparativos da literatura.	110
Tabela 11 - Dados de ¹ H RMN e ¹³ C RMN para a substância AC2 e dados comparativos da literatura.	118
Tabela 12 - Dados de ¹ H RMN, ¹³ C RMN e HMBC para a substância AC3.	124
Tabela 13 - Dados de ¹ H RMN e ¹³ C RMN para a substância AC4 e dados comparativos da literatura.	129
Tabela 14 – Dados de ¹ H RMN e ¹³ C RMN para a substância AC5 e dados comparativos da literatura.	131
Tabela 15 – Alcamidas identificadas nas partes aéreas de <i>Acmella ciliata</i>	142
Tabela 16 – Triagem das amostras contra as formas intracelulares de <i>Leishmania amazonensis</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>	151
Tabela 17 - Valores de CI ₅₀ em µg/mL da atividade tripanocida <i>in vitro</i> frente a forma sanguínea de <i>Trypanosoma brucei rhodesiense</i>	152
Tabela 18 – Valores de CI ₅₀ em µg/mL da atividade antiplasmódica <i>in vitro</i> e citotoxicidade (mioblastos esqueléticos de ratos L6) de AC1, AC2, AC3 e AC4.	153

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RMN de ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RMN de ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Correlation*
COSY – *Correlation Spectroscopy*
NOE – *Nuclear Overhauser Effect*
FID – *Free Induction Decay*
 CDCl_3 – Clorofórmio deuterado
Acetona-*d*6 – Acetona deuterada
Hz – Hertz
J – Constante de acoplamento
s – Simpleto
sl – Simpleto largo
d – Duplete
dd – Duplo duplete
ddd – Duplo duplo duplete
dddd – Duplo duplo duplo duplete
qdd – Quádruplo duplo duplete
t – Tripleto
m – Multiplete
 δ – Deslocamento químico em ppm
ppm – Partes por milhão
HRMS – *High Resolution Mass Spectrometry*
BPI – Íon de pico base
EM – Espectrometria de Massas
ESI – *Electrospray ionization*
PDA – Detector de arranjo de diodos
ASAP – *Atmospheric Solid Analysis Probe*
HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*
UPLC – *Ultra Performance Liquid Chromatography*
CLUE – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência
CC – Cromatografia em Coluna
CLV – Cromatografia Líquida a Vácuo
CCD – Cromatografia em Camada Delgada
 R_f – Fator de retenção
UV – Ultravioleta
OMS – Organização Mundial de Saúde
PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

SUS – Sistema Único de Saúde
DTN – Doenças Tropicais Neglegenciadas
SBF – Soro fetal bovino
PBS – Tampão Salino Fosfato
CI₅₀ – Concentração capaz de inibir 50% do crescimento dos parasitas
ED₅₀ – Dose capaz de produzir 50% do efeito farmacológico
IS – Índice de seletividade
Ki – Constante de inibição
EROs - Espécies Reativas de Oxigênio
CB₁ – Receptor Canabinoide tipo 1
CB₂ – Receptor Canabinoide tipo 2
SNC – Sistema Nervoso Central
ACh – Acetilcolina
AChE – Enzima acetilcolinesterase
TPH-1 – Linhagem celular de leucemia humana aguda monocítica
INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial
WIPO – *World Intellectual Property Organization*
EPO – *European Patent Office*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	31
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	34
2.1 Plantas medicinais	34
2.2 Família Asteraceae	37
2.3 Considerações sobre o gênero <i>Acmella</i> Rich. ex Pers.....	40
2.3.1 <i>A. ciliata</i> (H. B. K.) Cassini	44
2.4 Alcamidas.....	50
2.4.1 Espilantol.....	65
2.5 Relação entre as alcamidas e os receptores canabinoides	69
2.6. Doenças neurodegenerativas	72
2.7. Doenças tropicais negligenciadas.....	74
2.8. Importância das patentes como fonte de informação tecnológica..	75
3 OBJETIVOS	77
3.1 Objetivo geral.....	77
3.2. Objetivos específicos.....	77
4 MATERIAIS E MÉTODOS	78
4.1 Material vegetal.....	78
4.2 Obtenção dos extratos	79
4.2.1 Extração líquido-líquido dos extratos EA1 e EA2	80
4.3 Estudo de desreplicação do extrato bruto etanólico e hexano por CLUP/ESI-EM/EM.....	81
4.4 Fracionamento e monitoramento cromatográfico dos extratos	82
4.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	82
4.4.2 Cromatografia líquida a vácuo (CLV) dos extratos EA1 e EA2 ..	83
4.4.3 Cromatografia por adsorção em coluna (CC).....	84
4.4.4 Cromatografia de exclusão por tamanho.....	84
4.4.5 Fracionamento das subfrações da CLV do EA1.....	85

4.4.5.1 Fracionamento da subfração 5	85
4.4.5.2 Fracionamento da subfração 8	85
4.4.6 Fracionamento das subfrações da CLV do EA2	86
4.4.6.1 Fracionamento da subfração 4	86
4.4.6.2 Fracionamento da subfração 6	87
4.5 Elucidação estrutural.....	88
4.5.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	88
4.5.2 Espectrometria de Massas (EM)	89
4.6 Ensaio de degradação	89
4.6.1 Termodegradação do espilantol	89
4.6.2 Fotodegradação do espilantol.....	90
4.7 Ensaio de atividade farmacológica	91
4.7.1 Avaliação das atividades leishmanicida e tripanocida	91
4.7.2 Avaliação da atividade antiplasmódica	93
4.7.3 Ensaio preditivo para a atividade canabimimética <i>in vivo</i>	94
4.8 Levantamento de patentes existentes para o espilantol	96
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
5.1 Isolamento e purificação das alcamidas	97
5.2 Estudos de desreplicação por CLUP-IES-EM/EM e de elucidação estrutural das alcamidas de <i>A. ciliata</i>	99
5.2.1 (2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i>)- <i>N</i> -isobutil-2,6,8-decatrienamida (AC1) (espilantol)	104
5.2.2 2,3-epoxi- <i>N</i> -feniletilamida-6,8-nonodiinamida (AC2)	110
5.3.3 (2 <i>E</i>)- <i>N</i> -isobutil-5-(6-metil-3,6-diidro-1,2-dioxin-3-il)2-pentenamida (dioxiacmellamida) (AC3).....	118
5.3.4 (2 <i>Z</i>)- <i>N</i> -feniletil-6,8-nonadiinamida (AC4)	127
5.3.5 (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> -6 <i>Z</i> -8 <i>E</i>)- <i>N</i> -isobutil-2,4,6,8-dodecatetraenamida (AC5)..	129
5.3.6 (2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i>)- <i>N</i> -(2-meillbutil)-2,6,8-decatrienamida (AC6).....	133
5.3.7 (2 <i>E</i> ,4 <i>E</i>)- <i>N</i> -isobutil-2,4-undecadien-8,10-diinamida (AC7)	135
5.3.8 (2 <i>E</i>)- <i>N</i> -isobutil-2-undecaen-8,10-diinamida (AC8).....	137

5.3.9 (2 <i>E</i> ,7 <i>Z</i>)- <i>N</i> -isobutil-2,7-tridecadien-10,12-diinamida.	139
5.3.10 (7 <i>Z</i>)- <i>N</i> -(isobutil)-7-tridecaen-10,12-diinamida (AC10).....	140
5.4 Ensaios preliminares de degradação	143
5.4.1 Ensaios preliminares de termodegradação	143
5.4.2 Ensaios preliminares de fotodegradação	145
5.5 Avaliação das atividades leishmanicida e tripanocida	150
5.6 Avaliação da atividade antiplasmódica	153
5.7 Ensaio preditivo para atividade canabimimética do espilantol	154
5.8 Mapeamento tecnológico do espilantol.....	157
6 CONCLUSÕES	177
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	179
APÊNDICE 1 – Artigo publicado no periódico <i>Molecules</i> , no ano de 2016.	208

1 INTRODUÇÃO

A humanidade sempre fez uso das plantas para a sua sobrevivência (NEWMAN; CRAGG, 2012; BRUSOTTI et al., 2014; KHAN, 2014; GEORGE et al., 2016). Nas últimas décadas, o interesse mundial pelos produtos de procedência natural tem aumentado em todo, assim como o uso de plantas medicinais e medicamentos derivados desses organismos. Este fato é observado especialmente nos países desenvolvidos, como os Estados Unidos da América (EUA) e alguns países do Continente Europeu. Estima-se que o mercado mundial para esta classe de medicamentos gira em torno de 20 bilhões de dólares anualmente (DUTRA et al., 2016).

O uso medicamentoso das plantas é bastante tradicional no Brasil, onde o conhecimento acerca das espécies medicinais representa, em muitas vezes, o único recurso terapêutico de algumas comunidades. Isso tem chamado a atenção de pesquisadores e empresas de todo o mundo e, com isso, muitas classes de substâncias têm sido isoladas a partir de plantas medicinais brasileiras, por exemplo, alcaloides, flavonoides, derivados do ácido benzoico entre outros (VALLI et al., 2013).

Os metabólitos secundários produzidos por espécies da família Asteraceae têm sido considerados como protótipos ou como novas moléculas com elevado interesse para a indústria farmacêutica, por apresentarem acentuada bioatividade (BESSADA et al., 2015). Em levantamento feito em 2011, a família Asteraceae, juntamente com as famílias Fabaceae, Rubiaceae e Apocynaceae, constavam entre as quatro famílias de plantas mais promissoras farmacologicamente, tendo em vista o fato de terem delas sido isolados o maior número de fármacos aprovados para comercialização (ZHU et al., 2011).

Alguns estudos com plantas do gênero *Acmella*, pertencente à família Asteraceae, demonstraram atividades farmacológicas dentre as quais: analgésica (CHAKRABORTY et al., 2004), antioxidante (ABEYSIRI et al., 2013), gastroprotetora (NASCIMENTO et al., 2013), antinociceptiva (NOMURA et al., 2013) e larvicida (SIMAS et al., 2013). Estudos químicos também foram conduzidos com algumas espécies deste gênero, tendo sido encontradas principalmente alcaloides (MARTIN; BECKER, 1985; MOLINA-TORRES et al., 1996; MOLINA-TORRES; CHAVES, 2001; RIOS-CHAVEZ et al., 2003; MORENO et al., 2012; SIMAS et al., 2013), grupo de substâncias que

vem sendo utilizadas medicinalmente (BOONEN et al., 2012), como flavorizantes (LANGER et al., 2014), inseticidas (HERNÁNDEZ-MORALES et al., 2015) e em cosméticos (ARTARIA et al., 2011), o que explica o crescente interesse dos pesquisadores e da indústria nesta classe de metabólitos secundários.

A. ciliata é uma das espécies conhecida popularmente como jambu, por proporcionar os mesmos efeitos sensoriais da *A. oleracea*. Além do uso medicinal, *A. oleracea* é comumente utilizado na culinária típica do Norte do Brasil, devido às propriedades organolépticas da alcamida espilantol, tais como formigamento e dormência. As suas folhas são utilizadas cruas nas saladas e sucos e, principalmente, utilizando-se processamento térmico, como os famosos pratos Paco no Tucupi e Tacacá, além de serem adicionados a caldos, sopas, pizzas, guisados e cozidos junto com arroz.

Além das propriedades nutricionais, os produtos naturais provenientes das plantas muitas vezes também são utilizados no tratamento de doenças, como as Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs), por exemplo. As DTNs são um grande problema de saúde pública para a maioria dos países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. Elas compõem um grupo de 17 doenças crônicas e debilitantes, causadas por infecções virais, fúngicas, parasitárias e bacterianas, acometendo especialmente pessoas de baixa renda. Entre estas doenças, as leishmanioses e as tripanossomíases exigem grande atenção devido à sua incidência, distribuição e acometimento da população. As leishmanioses constituem um complexo de doenças causadas por protozoários parasitas do gênero *Leishmania*. Já a tripanossomíase americana, ou doença de Chagas, é causada pelo protozoário parasita flagelado, *Trypanosoma cruzi* (WHO, 2015a). Outra doença causada por protozoários e que já foi considerada uma doença tropical negligenciada, a malária, é causada por diferentes espécies de *Plasmodium*, representando também um problema de saúde pública, causando centenas de milhares de mortes por ano, especialmente para as pessoas que vivem sob extrema pobreza e em comunidades vulneráveis, principalmente em países tropicais (WHO, 2015b). A Organização Mundial de Saúde (OMS) recomenda a terapia combinada à base de artemisinina, fármaco cujo desenvolvimento foi consagrado com o Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina 2015, como a primeira linha de tratamento de malária causada por *P. falciparum*. Entretanto, desde 2006, após o primeiro caso de resistência à artemisinina reportado no Camboja, a busca por novos medicamentos para o tratamento desta doença tem aumentado (KONG & TAN, 2015).

Ao contrário das DTNs, as doenças neurodegenerativas são focos de pesquisa das grandes indústrias farmacêuticas. Essas doenças, como a Doença de Alzheimer e a Doença de Parkinson, são caracterizadas pela perda funcional progressiva da massa neuronal, em uma ou mais regiões do Sistema Nervoso Central (SNC), levando a déficits específicos que se agravam com a progressão da doença. Essas duas patologias apresentam algumas semelhanças, como a deposição intra e extracelular de emaranhados proteicos no tecido cerebral (MIGLIORINI et al., 2012). Outra semelhança observada é a grande resposta neuroinflamatória e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que fazem parte do processo de morte celular por apoptose. Alguns estudos trazem evidências de que o sistema canabinoide está relacionado com a proteção do SNC contra a neurodegeneração (ALEXANDROS et al., 2006; KOPPEL & DAVIES, 2008; MARCHALANT et al., 2008; CAMPILLO & PAEZ, 2009). A semelhança estrutural entre as alcanidas alifáticas e a anandamida, neurotransmissor endógeno dos receptores canabinoides, vêm despertando o interesse de alguns grupos de pesquisa acerca da afinidade desses metabólitos secundários por esses receptores e, conseqüentemente, atividade no SNC.

Os dados gerados pelos estudos e pesquisas geralmente são publicados como artigos, em jornais e revistas, ou na forma de teses e dissertações, sendo compilados em bases de dados de periódicos, que são amplamente utilizadas pela comunidade científica para buscar informações. As patentes são importantes ferramentas ainda pouco exploradas pela academia, por apresentam dados mais recentes em determinados setores tecnológicos, importantes para a atualização de conhecimentos sobre seu estado-da-arte. A análise de patentes permite estabelecer o panorama industrial de determinadas tecnologias, uma vez que o pedido de patente deve ser bastante completo, demonstrando o que preexistia e o que está sendo reivindicado como novidade. Este fato é justificado pela grande distância entre os estudos realizados, principalmente nas universidades, e o que é desenvolvido pelas empresas.

Assim, o presente trabalho visou à investigação química e farmacológica das alcanidas de *A. ciliata*, além de analisar as patentes relacionadas ao uso tecnológico do espilantol.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Plantas medicinais

Desde os tempos mais remotos, a humanidade faz uso dos recursos da natureza para as necessidades do dia-a-dia, como alimentação, abrigo, vestimentas, objetos de adorno, uso cosmético, e medicinalmente para as enfermidades a que é acometida (NEWMAN; CRAGG, 2012; BRUSOTTI et al., 2014; KHAN, 2014; GEORGE et al., 2016; YUAN et al., 2016). De acordo com registros fósseis, o uso medicinal das plantas acontece há pelo menos 60 mil anos e continua desempenhando um importante papel na terapêutica (YUAN et al., 2016).

Muitas civilizações antigas, como a mesopotâmica, chinesa, grega, egípcia, romana, tibetana e indígena, dentre outras, desenvolveram conhecimentos acerca da utilização das plantas no tratamento das enfermidades e, com isso, na construção da medicina popular, que é uma das bases da terapia atual (MCRAE et al., 2007; KHAN, 2014). Jardins reais contendo espécimes com valor medicinal apareceram no Antigo Egito, Mesopotâmia, Creta, México e China, e textos escritos transmitiram os conhecimentos através das gerações (GEORGE et al., 2016). Os registros mais antigos vêm da Mesopotâmia, por volta de 2600 a. C.. Um exemplo é o uso da papoula (*Papaver somniferum*), que vem sendo descrito há mais de 4000 anos (PETROVSKA, 2012; KHAN, 2014; DUTRA et al., 2016).

Os produtos naturais, muitas vezes referidos como “metabólitos secundários” (produtos finais da expressão gênica), são considerados as fontes mais bem sucedidas em diversidade química nas descobertas farmacêuticas ao longo do século passado (MISHRA; TIWARI, 2011; HARVEY et al., 2015; DUTRA et al., 2016). Eles apresentam uma grande complexidade estrutural, além de serem capazes de modificar funções biológicas (KATZ; BALTZ, 2016; YUAN et al., 2016). Certamente, eles são o resultado de milhões de anos de evolução dos organismos terrestres e marinhos ao se adaptarem ao estresse do meio em que vivem (DAVID et al., 2015).

Apesar das plantas medicinais serem utilizadas empiricamente há milhares de anos, a busca por substâncias ativas só começou no século XIX, quando o aprendiz de farmácia alemão Friedrich Sertüner, de 21 anos, isolou a primeira substância pura farmacologicamente ativa a

partir de uma planta. Da espécie *Papaver somniferum* (papoula) foi isolada uma substância analgésica e indutora do sono, nomeada *morphium* (morfina), em homenagem ao deus grego do sono Morpheus (ATANASOV et al., 2015; DUTRA et al., 2016). O marco histórico do desenvolvimento da indústria farmacêutica mundial aconteceu com a síntese total do primeiro composto natural, o ácido salicílico, em 1860 pelo químico alemão Kolbe. Em 1829 o farmacêutico francês Leroux isolou a substância salicilina, a partir de *Salix alba*, e, em 1838, o químico italiano Raffaele Piria, submeteu essa substância a hidrólise seguida de oxidação, obtendo o ácido livre (MAHDI, 2010). Outro exemplo marcante para a indústria farmacêutica foi o isolamento do antimalárico artemisinina a partir da *Artemisia annua*, pela chinesa Youyou Tu, em 1972, premiada em 2015 com o Premio Nobel em Fisiologia ou Medicina (KONG; TAN, 2015; SHEN, 2015; TU, 2016). A partir desse importante histórico, inúmeras substâncias ativas vêm sendo isoladas a partir de produtos naturais, algumas seguindo os seus usos tradicionais. No entanto, a descoberta de novos fármacos a partir das fontes da natureza está associada a algumas dificuldades intrínsecas (por exemplo, identificação botânica, sazonalidade, e local de cultivo/coleta e quantidade de material), o que motivou a mudança do foco da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de técnicas sintéticas. Os resultados obtidos, entretanto, não atingiram a expectativa, o que renovou o interesse na busca de novos fármacos a partir de produtos naturais (ATANASOV et al., 2015).

Em 2014, Butler e colaboradores demonstraram a importância dos produtos naturais como fonte para o desenvolvimento de novos fármacos. Entre janeiro de 2000 e dezembro de 2013, 375 novos fármacos foram aprovados, sendo 54 (17%) derivados de produtos naturais. Desses, 14 são classificados como produtos naturais, 24 como semissintéticos e 16 como derivados de produtos naturais (BUTLER et al., 2014). Entre eles estão inclusos os compostos de origem vegetal, evidenciando a importância das plantas medicinais na descoberta de novas entidades químicas para o desenvolvimento de fármacos com finalidades terapêuticas. Estima-se que o mercado mundial para estas classes de medicamentos gira em torno de 20 bilhões de dólares ao ano. Este interesse é observado especialmente nos países desenvolvidos, como os EUA e alguns países da Europa (DUTRA et al., 2016).

Nas últimas décadas, além das pesquisas na indústria farmacêutica, a procura por produtos de origem vegetal tem envolvido outros setores, como a engenharia de alimentos, nutrição agroquímica,

entre outros (VEIGA JUNIOR et al., 2005; DUTRA et al., 2016). Entre os produtos de origem vegetal, destacam-se as plantas medicinais, que além do uso como remédios, também são utilizadas na culinária, principalmente como temperos, nas saladas ou consumidas na forma de suco, muitas vezes chamadas de alimentos funcionais (ABUJAH et al., 2015; KIMONDO et al., 2015; KAR et al., 2017).

Além disso, indivíduos que não têm a disponibilidade de utilizar tratamentos convencionais, ou em casos em que a doença não responde aos medicamentos disponíveis, muitas vezes recorrem à medicina tradicional (MT), também conhecida como medicina popular. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a MT é a soma de conhecimentos, habilidades, práticas baseadas em teorias, crenças e experiências de diferentes culturas, que sejam comprovados cientificamente ou não, utilizadas na manutenção da saúde, bem como na prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças físicas e mentais (OMS, 2013).

Muitos países empregam sua própria MT, de acordo com a sua cultura e história. No final da década de 70, a OMS criou o Programa de Medicina Tradicional, com a intenção de facilitar a integração da medicina tradicional e da medicina complementar alternativa nos sistemas nacionais de atenção à saúde. No Brasil, a legitimação e a institucionalização dessas abordagens de atenção à saúde iniciaram-se a partir da década de 80, principalmente após a criação do SUS (BRASIL, 2006). Em 2006 duas políticas foram aprovadas, uma através da Portaria n° 971, que sancionou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS (BRASIL, 2006) e outra através do Decreto n° 5.813, que instituiu a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006). Em 2014, a OMS publicou o Plano de Estratégias em Medicina Tradicional 2014 – 2023, com o objetivo de auxiliar as agências sanitárias a desenvolver soluções para uma visão ampliada a respeito da melhora da saúde e autonomia dos pacientes (OMS, 2014).

Embora o Brasil possua a maior diversidade vegetal do mundo, poucos exemplares foram avaliados fitoquimicamente. Das cerca de 55.000 espécies de plantas estima-se que apenas 0,4% tenham relatos de estudos (GURIB-FAKIM, 2006). Uma abordagem multidisciplinar, envolvendo os conhecimentos etnofarmacológicos e fitoquímicos, mostra-se necessária no que diz respeito à descoberta e desenvolvimento de medicamentos a partir de fontes naturais.

2.2 Família Asteraceae

Comumente conhecidas como as plantas que têm flores, as angiospermas (do grego *angion*, receptáculo) são as mais diversas e difundidas do reino Plantae, com cerca de 300.000 espécies (cerca de 90% de todas as plantas existentes) (SOLTIS; SOLTIS, 2014; THE ANGIOSPERM PHYLOGENY, 2016). O Brasil abriga mais de 30 mil espécies nativas, distribuídas em quase três gêneros com mais de 200 famílias (ZAPPI et al., 2015).

A família Asteraceae, anteriormente denominada Compositae, é conhecida como a família dos girassóis e está entre as três maiores em número de espécies das angiospermas. Esta família possui cerca de 1.600 gêneros e 24.000 espécies, amplamente distribuídas pelo mundo, com exceção da Antártida e, especialmente, diversificadas nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (DEWOLF, 1995; GUIMARÃES et al., 2012). Além dos usos medicinais e alimentícios, mais de 260 espécies de Asteraceae são cultivadas para fins ornamentais (JEFFREY, 2007). No Brasil, existem aproximadamente 300 gêneros e 2.000 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005; JUDD, 2008).

As espécies desta família têm sido bastante utilizadas na medicina tradicional brasileira e mundial para diversas finalidades terapêuticas (GUENNE et al., 2016). Na Farmacopeia Europeia, algumas preparações de Asteraceae são consideradas oficiais, utilizadas como anti-inflamatória (*Silybum marianum*), espasmolíticas (*Achillea millefolium*, *Arnica montana*, *Calendula officinalis*, *Matricaria recutita* e *Solidago gigantea*), coleréticas (*Artemisia absinthium*, *Cynara scolymus* e *Taraxacum officinale*), imunomodulatória (*Echinacea purpurea*), diuréticas (*Solidago virgaurea*, *Solidago gigantea* e *Silybum marianum*) e no tratamento da enxaqueca (*Tanacetum parthenium*, *Echinacea palida*, *Echinacea angustifolia* e *Carthamus tinctorius*). Já no Brasil, têm-se como exemplo as espécies do gênero *Lychnophora*, popularmente conhecidas como arnicas, amplamente utilizadas na medicina tradicional brasileira como anti-inflamatórias, para o tratamento de contusões, para o alívio da dor, reumatismo e para picadas de insetos (FERRARI et al., 2012). Espécies do gênero *Mikania*, conhecidas por guaco, também são bastante utilizadas pela população do Brasil, principalmente na composição de xaropes, visando tratar doenças do trato respiratório (GUIMARÃES et al., 2012).

Os indivíduos de Asteraceae são característicos por apresentar uma grande variedade de metabólitos secundários, que têm sido enfoque

de pesquisas nas esferas químicas e farmacologias das plantas medicinais, sendo considerados como protótipos ou como novas moléculas com elevado interesse para a indústria farmacêutica, por apresentarem acentuada bioatividade. Os terpenoides, principalmente sesqui, di e triterpenos e as lactonas sesquiterpênicas (YAOITA et al., 2012), além de compostos fenólicos, como flavonoides e derivados do ácido cinâmico (SEITZ et al., 2006; MOTAWA et al., 2015), são as classes de compostos mais representativas desta família, muitas delas sendo consideradas importantes marcadores quimiotaxonômicos, devido a grande variedade estrutural (LUSA et al., 2016). Ademais, as lactonas sesquiterpênicas (SALAPOVIC et al., 2013; IVANESCU et al., 2015) e os poliacetilenos (POLLO et al., 2013; KONOVALOV, 2014) são consideradas classes estruturais únicas que caracterizam a família Asteraceae, embora poucos representantes ocorram em outras famílias de plantas. Outras classes também são encontradas, como as cumarinas (MIYAZAKI et al., 2013), alcaloides (BOSI et al., 2013; AVULA et al., 2015; BOPPRÉ; COLEGATE, 2015) e alcanidas (ALTHAUS et al., 2014; CRUZ et al., 2014; SILVEIRA et al., 2016). Além disso, esta miscelânea de metabólitos torna as plantas mais resistentes à herbivoria, que tem um importante papel ecológico, sendo considerada uma prova da importância da diversidade química para a manutenção da diversidade biológica (SCHUMAN et al., 2016).

A classificação da família Asteraceae começou a ser elaborada em 1819, pelo botânico francês Henri Cassini, com a publicação de um diagrama que mostrava as inter-relações de 19 tribos de Asteraceae. Após, em 1873, Benth revisou o arranjo de Cassini, reduzindo o número de tribos para 13 (HEYWOOD et al., 1977; CALABRIA et al., 2007). Posteriormente, as 13 tribos da família foram agrupadas por Carlquist (1966) e Wagenitz (1976), que definiram duas subfamílias (Cicorioideae e Asteroideae). Essas classificações foram baseadas, principalmente, nas estruturas florais (TURNER, 1977). Com base nas informações filogenéticas e quimiotaxonômicas, Bremer (1994) reconheceu 17 tribos e definiu uma nova subfamília, a Barnadesioideae, como um pequeno grupo monotribal com apenas 91 espécies, endêmicas da América do Sul (CALABRIA et al., 2007). Em 2007, Jeffrey aceitou os grupos tribais propostos por Panero e Funk (2002), reconhecendo 24 tribos agrupados em cinco subfamílias (JEFFREY, 2007). No entanto, uma análise filogenética mais recente reconhece 12 subfamílias e 24 tribos (Quadro 1) (PANERO; FUNK, 2008).

Quadro 1 – Classificação das subfamílias e tribos de Asteraceae, segundo Panero e Funk (2008).

Subfamília	Tribo
Asteroideae	Anthemideae
	Astereae
	Calenduleae
	Gnaphalieae
	Heliantheae
	Senecioneae
Barnadesioideae	Barnadesieae
Carduoideae	Cynareae
	Dicomeae
	Tarhchonanthaeae
Cichorioideae	Arctotideae
	Cichorieae
	Liabeae
	Vernonieae
Corymbioideae	Corymbieae
Gochnatioideae	Gochnatieae
Gymnarrhenioideae	Gymnarrheneae
Hecastocleidoideae	Hecastocleideae
Mutisioideae	Mutisieae
	Nassauvieae
	Onoserideae
Stifftioideae	Stifftieae
Wunderlichioideae	Hyalideae
	Wunderlichieae

A maioria dos indivíduos de Asteraceae encontra-se classificada em Asteroideae, que é considerada a maior subfamília, formada por seis tribos, mais de 1.000 gêneros e compreende cerca de 16.000 espécies (SILVA; SANTOS, 2010). Heliantheae é a tribo mais numerosa e representativa, compreendendo aproximadamente 190 gêneros e 2.500 espécies. No Brasil, essa tribo também é a de maior representatividade, apresentando cerca de 60 gêneros e 75 espécies (JULIO; OLIVEIRA, 2009).

2.3 Considerações sobre o gênero *Acmella* Rich. ex Pers.

O gênero *Acmella* Rich. ex Pers. pertence à família Asteraceae, subfamília Asteroideae e tribo Heliantheae (THE ANGIOSPERM PHYLOGENY, 2016).

Inicialmente, este gênero era considerado parte do gênero *Spilanthes* Jacquin, entretanto, estudos realizados por Jansen, em 1981, forneceram evidências morfológicas e cromossômicas para afirmar que *Acmella* e *Spilanthes* são, na verdade, gêneros distintos. Os parâmetros para essa separação foram: tipo de papus (designação que se dá ao cálice modificado e persistente, encontrado em flor de ovário ínfero), morfologia e anatomia dos aquênios, natureza da cabeça da flor, e cor das pétalas (JANSEN, 1985). Devido a essa mudança taxonômica relativamente recente, há certa confusão na organização e nomenclatura das espécies, o que dificulta o correto registro das informações geradas.

Acmella é um gênero de ervas anuais e perenes, amplamente distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais ao redor do mundo, dividido em três seções (*Annuae*, *Acmella* e *Megaglottis*), sendo atualmente conhecidas 30 espécies e nove variedades (var.). Elas são: *Acmella radicans* var. *radicans*, *A. radicans* var. *debilis*, *A. darwinii*, *A. sodiroi*, *A. leucantha*, *A. alba* var. *ecuadorensis*, *A. alba* var. *alba*, *A. calva*, *A. pusilla*, *A. paniculata*, *A. uliginosa*, *A. oleracea*, *A. bellidioides*, *A. grandiflora* var. *discoidea*, *A. grandiflora* var. *brachyglossa*, *A. grandiflora* var. *grandiflora*, *A. caulirhiza*, *A. oppositifolia* var. *oppositifolia*, *A. oppositifolia* var. *repens*, *A. ciliata*, *A. iodiscaea*, *A. brachyglossa*, *A. glaberrima*, *A. filipes* var. *cayensis*, *A. filipes* var. *parvifolia*, *A. filipes* var. *filipes*, *A. alpestris*, *A. psilocarpa*, *A. pilosa*, *A. poliolepidica*, *A. grisea*, *A. papposa* var. *papposa*, *A. papposa* var. *macrophylla*, *A. decumbens* var. *decumbens*, *A. decumbens* var. *affinis*, *A. ramosa*, *A. lundellii*, *A. leptophylla*, *A.*

do sistema respiratório, estomatites, dores de dente, cáries e dispepsia (AGRA et al., 2007; RIOS et al., 2007; ONG et al., 2011; OLOWA et al., 2012; NASCIMENTO et al., 2013; SIMAS et al., 2013). O quadro 2 resume os estudos de atividades biológicas e farmacológicas já realizados com espécies de *Acmella*, com destaque para a espécie *Acmella oleracea* (anteriormente conhecida como *Spilanthes oleracea*) por apresentar o maior número de registros na literatura.

A espécie *A. oleracea* é amplamente utilizada na culinária amazonense no preparo do molho tucupi e em saladas, por exemplo, e na medicina popular, para o tratamento da tuberculose (STOREY; SALEM, 1997), afecções na boca e garganta, estimulante do apetite e para tratar dores de dente, pois proporciona uma sensação anestésica local, quando suas inflorescências e folhas são mastigadas (LORENZI & MATOS, 2002). Esta espécie é uma das três plantas do “Malarial-5”, formulação tradicional utilizada no Mali para o tratamento da malária (GASQUET et al., 1993; WILLCOX & BODEKER, 2004). O Malarial-5 foi inicialmente formulado pelo Professor Mamadou Koumaré, inspirado em uma fórmula utilizada pela sua família e, nos dias atuais, é produzido como um medicamento padronizado pelo Département de Médecine Traditionnelle (DMT) do Institut National de Recherche em Santé Publique (INRSP) do Mali. Esta formulação é vendida na forma de pó, em sachês de 10 g, que deve ser aquecido em água para a obtenção de uma decocção (WILLCOX; BODEKER, 2004).

Quadro 2 – Atividades biológicas e farmacológicas reportadas para as diferentes espécies do gênero *Acmella*.

Atividade	Espécie	Parte da planta	Referência
Antibacteriana e citotóxica Anticariogênica	<i>A. calva</i>	Folhas	(SEKENDAR et al., 2011)
		Planta inteira	(SHANTHI; AMUDHA, 2010)
Antifúngica		Folhas	(RAI et al., 2004)
Anti-helmíntica		Partes aéreas	(JAYARAJ et al., 2014)
Antimicrobiana		Planta inteira	(MOIN et al., 2012)
Inibição da amilase salivar		Raízes	(SAPRA et al., 2013)
Inseticida		Planta inteira	(DOLUI; DEBNATH, 2010)
Larvicida (<i>Anopheles</i> e <i>Culex</i>)		Flores	(PANDEY et al., 2007a)

Quadro 2 – (continuação)

Atividade	Espécie	Parte da planta	Referência
Antimicrobiana Anti-plasmódica	<i>A. caulirhiza</i>	Partes aéreas Planta inteira	(SINEI et al., 2013) (OWUOR et al., 2012)
Antimicrobiana Antimicrobiana Anti-hepatotóxica Anti-plasmódica	<i>A. ciliata</i>	Folhas Flores Planta inteira Partes aéreas	(DAISY et al., 2013) (MEJÍA et al., 2015) (SUJA et al., 2003) (SILVEIRA et al., 2016)
Antiespasmódica e gastroprotetora	<i>A. decumbens</i>	Partes aéreas	(TOSO et al., 2007)
Acaricida	<i>A. oleracea</i>	Partes aéreas	(CASTRO et al., 2014; CRUZ et al., 2016)
Anestésica tópica		Flores	(ANDRADE et al., 2013; FREITAS-BLANCO et al., 2016)
Anti-inflamatória		Flores	(AMIT et al., 2010)
Anti-inflamatória		Partes aéreas	(SUSMITHA et al., 2015)
Antimicrobiana		Planta inteira	(THOMPSON et al., 2012)
Antimicrobiana		Flores	(ALCANTARA et al., 2015)
Antinociceptiva		Flores	(NOMURA et al., 2013)
Antioxidante e citotóxica		Folhas	(PINHEIRO et al., 2015)
Anti-plasmódica		Planta inteira	(GASQUET et al., 1993; CHENNIAPPAN; KADARKARAI, 2010)
Citotóxica		Planta inteira	(ABEYSIRI et al., 2013)
Diurética		Folhas	(RATNASOORIYA et al., 2004)
Gastroprotetora		Partes aéreas	(NASCIMENTO et al., 2013)
Inibição da tirosinase		Planta inteira	(BARBOSA et al., 2016)
Inseticida (<i>Tuta absoluta</i>)	Folhas	(MORENO et al., 2012)	
Larvicida (<i>Aedes aegypti</i>)	Folhas	(SIMAS et al., 2013)	

Quadro 2 – (continuação)

Atividade	Espécie	Parte da planta	Referência
Antidiabética Antifúngica	<i>A. paniculata</i>	Folhas	(AKTER et al., 2015)
Anti-helmíntica		Folhas	(CHAKRABARTY et al., 2014)
Antimicrobiana		Planta inteira	(RAJESHWAR; LALITHA, 2013)
Antimicrobiana		Partes aéreas	(TALEY et al., 2012)
Antimicrobiana		Planta inteira	(ZHU et al., 2012)
Antinociceptiva		Folhas	(MAMIDALA; GUJJETI, 2013)
Antioxidante		Planta inteira	(HOSSAIN et al., 2014)
Antiproliferativa (células Huh-7)		Partes aéreas	(DAS et al., 2014)
Diurética		Flores	(KRISHNA et al., 2014; MISHRA et al., 2015)
Hepatoprotetora Larvicida (<i>Anopheles</i> e <i>Culex</i>)		Flores	(ALI et al., 2012; HAQUE et al., 2015)
	Flores	(ALI et al., 2015)	
	Flores	(PANDEY et al., 2007a)	
Hepatoprotetora	<i>A. radicans</i>	Folhas e raízes	(JOSHI et al., 2015)
Antimicrobiana e antioxidante	<i>A. uliginosa</i>	Flores	(LAGNIKA et al., 2016)
Anti-inflamatória		Flores	(PAUL et al., 2016)
Antinociceptiva		Flores	(ONG et al., 2011)
Toxicidade (<i>Artemia salina</i>)		Flores	(ARCANJO et al., 2012)

2.3.1 *A. ciliata* (H. B. K.) Cassini

A espécie *A. ciliata* (Humboldt, Bonpland & Kunth) Cassini (Figura 2) é uma erva perene, com caule ascendente, de 0,8 a 4,3 mm de diâmetro, radicante nos nós, verde a roxo, glabro a pouco piloso. Possui pecíolo com 7 – 40 mm de comprimento, glabro a moderadamente piloso e estreitamente alado. As folhas são simples com comprimento variando de 23 a 75 mm e largura de 10 a 59 mm, ovais a amplamente

ovais. As flores são pequenas e amarelas reunidas em capítulos cônicos, que medem cerca de 1 cm de diâmetro. Antes da separação dos gêneros *Acmella* e *Spilanthes*, a espécie era chamada *Spilanthes ciliata* Kunth. De acordo com a sua atual classificação taxonômica, esta espécie pertence ao Reino Plantae, Ordem Asterales, Família Asteraceae, Subfamília Asteroideae, Tribo Heliantheae, Subtribo Ecliptinae e ao Gênero *Acmella*.

A planta é uma das espécies popularmente conhecidas como jambu, agrião-do-pará, *paracress* e *electric daisy*, por apresentar as mesmas características organolépticas da espécie *A. oleraceae*, que é cultivada largamente nos estados amazônicos.

Figura 2. *Acmella ciliata* (jambu)



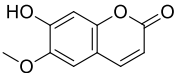
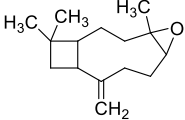
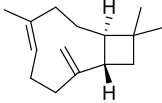
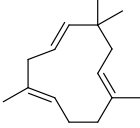
Fonte: fotos da autora

A. ciliata é uma planta nativa do Brasil, encontrada nas cinco regiões, com ocorrência confirmada nos Estados do Acre, Amazonas, Pará, Tocantins, Bahia, Paraíba, Piauí, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (MONDIN et al., 2015). Além do território brasileiro, esta espécie também está presente na Bolívia, Colômbia, Equador, Peru, Venezuela, Argentina, Panamá, Índia e no sudeste asiático (Tailândia, Laos, Malásia, Indonésia, Taiwan e Japão). Por ser de clima tropical, o jambu desenvolve-se bem em climas quentes e úmidos.

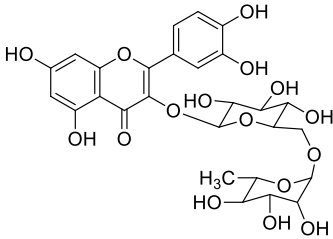
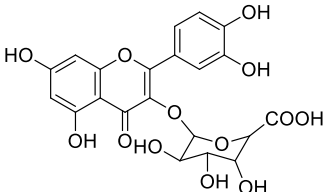
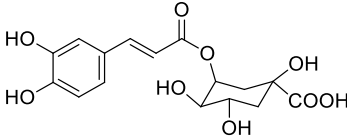
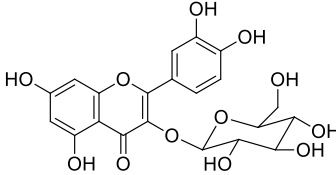
Em relação aos estudos fitoquímicos, até o presente momento, poucos trabalhos foram realizados com esta espécie. Nos trabalhos publicados em 1984 e 1985, os pesquisadores Martin e Becker mostraram que *A. ciliata* é particularmente rica em alcaloides de cadeia longa (MARTIN; BECKER, 1984; MARTIN; BECKER, 1985). Além desses metabólitos (ver *Item 2.4 Alcaloides*) outras classes de

substâncias também foram isoladas de raízes e partes aéreas (Quadro 3), tais como a hidroxycumarina escopoletina (1), os sesquiterpenos epoxicariofileno (2), cariofileno (3) e humuleno (4) (MARTIN; BECKER, 1985) e compostos fenólicos rutina (5), miquelianina (6), ácido neoclorogênico (7), isoquercitrina (8), ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico (9), ácido 3,4-di-*O*-cafeoilquínico (10), ácido 4,5-di-*O*-cafeoilquínico (11), ácido 1,5-di-*O*-cafeoilquínico (12), ácido 2-*O*-cafeoil-3-*O*-feruloil-tartárico (13), ácido 1,3-dicafeoil-epicatequínico (14), quercitina-3-*O*-(2,6-*O*- β -raminopiranosil)- β -glicopiranosídeo (15), quercitina-3-*O*-(2-*O*- β -xilopiranosil-6-*O*- β -raminopiranosil)- β -glicopiranosídeo (16), quercitina-3-*O*-(3-*O*-acetil-glicopiranosídeo) (17), quercetina-3-*O*-(2-*O*-acetil- β -L-raminopiranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosídeo) (18), e a clovamida (19), que é análogo do ácido rosmarínico (KASPER et al., 2010).

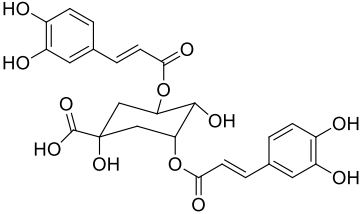
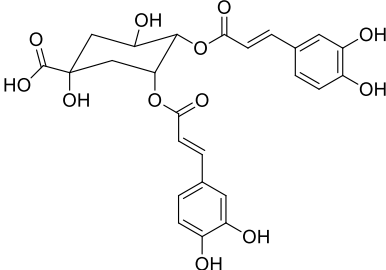
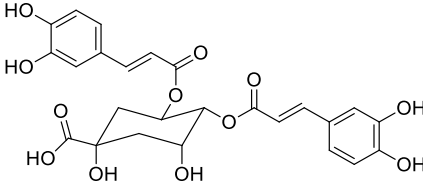
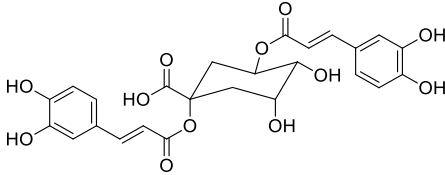
Quadro 3 – Substâncias isoladas de *Acmella ciliata*

Substância	Órgão vegetal	Referência
 <p>Escopoletina (1)</p>	Raízes	(MARTIN; BECKER, 1985)
 <p>Epoxicariofileno (2)</p>	Partes aéreas	(MARTIN; BECKER, 1985)
 <p>Cariofileno (3)</p>		
 <p>Humuleno (4)</p>		

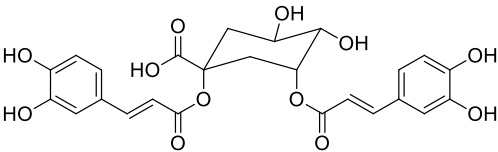
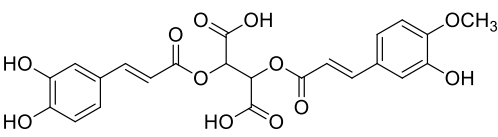
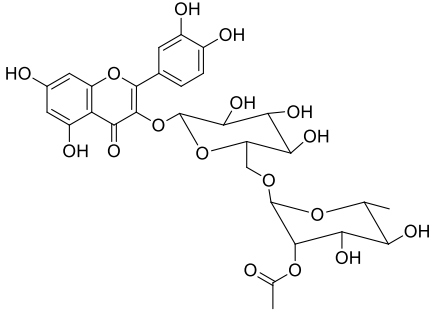
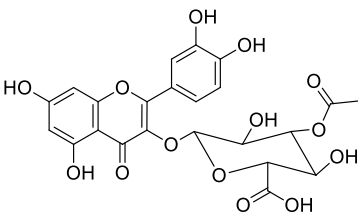
Quadro 3 – (continuação)

Substância	Órgão vegetal	Referência
 <p>Rutina (5)</p>	Partes aéreas	(KASPER et al., 2010)
 <p>Miquelianina (6)</p>		
 <p>Ácido neoclorogênico (7)</p>		
 <p>Isoquercitrina (8)</p>		

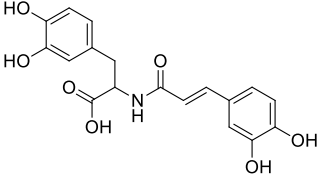
Quadro 3 – (continuação)

Substância	Órgão vegetal	Referência
 <p>Ácido-3,5-di-O-E-cafeoilquínico (9)</p>		
 <p>Ácido-3,4-di-O-E-cafeoilquínico (10)</p>		
 <p>Ácido-4,5-di-O-E-cafeoilquínico (11)</p>	Partes aéreas	(KASPER et al., 2010)
 <p>Ácido-1,5-di-O-E-cafeoilquínico (12)</p>		

Quadro 3 – (continuação)

Substância	Órgão vegetal	Referência
 <p>Ácido 1,3-di-O-E-cafeoilquínico (13)</p>		
 <p>Ácido 2-O-E-cafeoil-3-O-E-feruloiltartárico (14)</p>		
 <p>Quercitina-3-O-(2,6-O-α-raminopiranosil)-β-glicopiranosídeo (15)</p>	Partes aéreas	(KASPER et al., 2010)
 <p>Quercitina-3-O-(3-O-acetil-glucuronopiranosídeo) (16)</p>		

Quadro 3 – (continuação)

Substância	Órgão vegetal	Referência
 <p data-bbox="303 475 430 496">Clovamida (17)</p>	Partes aéreas	(KASPER et al., 2010)

2.4 Alcamidas

O interesse pelo estudo do que essas substâncias provocam vem dos efeitos de formigamento e pungência únicos, e são geralmente acompanhados por salvação e anestesia. Nas plantas, acredita-se que elas atuem como hormônios, regulando o crescimento e formação das raízes (CAMPOS-CUEVAS et al., 2008).

As alcamidas são um grupo de metabólitos secundários encontrados frequentemente nas famílias Asteraceae, Rutaceae, Piperaceae e alguns poucos representantes nas famílias Aristolochiaceae, Euphorbiaceae e Solanaceae (MARTIN; BECKER, 1985; MOLINA-TORRES et al., 1996; SITTE et al., 1998; MOLINA-TORRES; CHAVES, 2001; RIOS-CHAVEZ et al., 2003; KANADA et al., 2012; MORENO et al., 2012). Essas substâncias formam uma classe distinta de produtos naturais, nos quais diferentes aminoácidos são combinados com ácidos graxos insaturados, através de ligação peptídica.

As partes ácidas das alcamidas são consideradas produtos das enzimas ácido graxo sintases, que acrescentam unidades de malonila aumentando a cadeia acila. Além dos diferentes tamanhos de cadeias carbônicas, que varia de quatro a 28 carbonos, a parte ácida das alcamidas é caracterizada por apresentar ligações duplas ou triplas, respectivamente formadas por sucessivas atividades enzimáticas das desnaturases e acetilenases, acompanhadas de isomerização (MINTO; BLACKLOCK, 2008). Poucas alcamidas apresentam a porção ácida totalmente saturada. Normalmente, as duplas ligações são formadas em conjugação com o grupo carboxila, apresentando, na maioria das vezes,

a configuração *E*. Também há outros padrões de instauração ao longo da cadeia carbônica, que são separados por uma ponte metilênica. A inserção de oxigênio em outras posições da cadeia carbônica resulta na formação de cetoácidos, normalmente encontrados nas alcamidas olefinicas saturadas contendo 18 átomos de carbono (alcamidas da série C₁₈) na parte ácida. A oxigenação pode levar a várias hidroxilações, principalmente nas alcamidas olefinicas contendo 12 (série C₁₂) e 10 (série C₁₀) carbonos na porção ácida, podendo também surgir produtos de ciclização e anéis endoperóxidos (MARTIN; BECKER, 1985; DEVKOTA et al., 2013).

As porções aminas das alcamidas (Figura 3) são derivadas de variados aminoácidos através de reações de descarboxilação (CORTEZ-ESPINOSA et al., 2011). O grupamento isobutilamina (**a**) é a porção amina mais generalizada, seguido do grupo piperidina (**b**), pirrolidina (**c**) e, menos frequentemente, os grupamentos feniletilamina (**d**), hidroxí-isobutilamina (**e**) e 2-metilbutilamina (**f**).

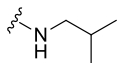
Biossinteticamente, o aminoácido valina é considerado o precursor da porção isobutilamina (**a**), enquanto que a formação da porção piperidina (**b**) é derivada do aminoácido lisina e a ornitina é considerada o precursor da porção pirrolidina (**c**). A porção 2-metilbutilamina (**f**) é derivada dos aminoácidos leucina e isoleucina e a porção feniletilamina (**d**) provem do aminoácido fenilalanina (CORTEZ-ESPINOSA et al., 2011; GREGER, 2015).

A grande diversidade das diferentes porções aminas é observada nas famílias Asteraceae e Piperaceae, formadas, principalmente, pela presença de anéis de seis (**b**) e cinco membros (**c**). Além disso, ambas as famílias apresentam porções aminas aromáticas com estruturas fenilpropanoídicas (**d**).

A partir das considerações biossintéticas, mais de 300 estruturas de alcamidas já foram relatadas, consistindo de várias combinações de quais 200 porções ácidas e das 23 porções aminas (**a – w**) (Figura 3) (GREGER, 2015).

Dependendo do tipo de insaturação apresentada, as alcamidas são divididas em dois grupos principais: alcamidas olefinicas, contendo apenas ligações duplas e alcamidas acetilênicas, com pelo menos duas ligações triplas. A natureza, o tamanho da cadeia carbônica e a porção amina são característicos de cada gênero (Figura 4).

Figura 3 – Porções aminas das alcaloides



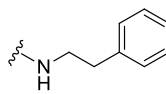
(a) isobutilamina



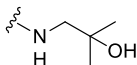
(b) piperidina



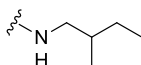
(c) pirrolidina



(d) feniletilamina



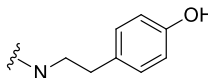
(e) hidroxí-isobutilamina



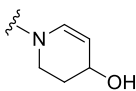
(f) 2-metilbutilamina



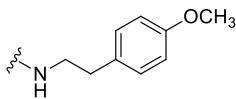
(g) piperideína



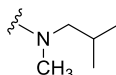
(h) tiramina



(i) hidroxipiperideína



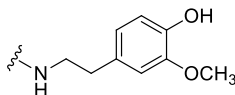
(j) 4-metoxifeniletilamina



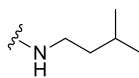
(k) N-metilisobutilamina



(l) pirrolina



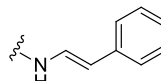
(m) 4-hidroxí-5-metoxifeniletilamina



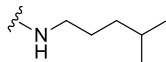
(n) isopentilamina



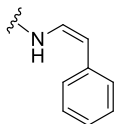
(o) pirrolideína



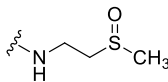
(p) *E*-estirilamina



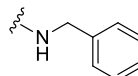
(q) isoexilamina



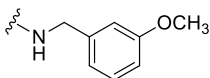
(r) *Z*-estirilamina



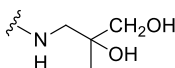
(s) 2-(sulfínímetil)-etilamina



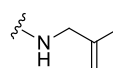
(t) benzilamina



(u) 3-metoxibenzilamina



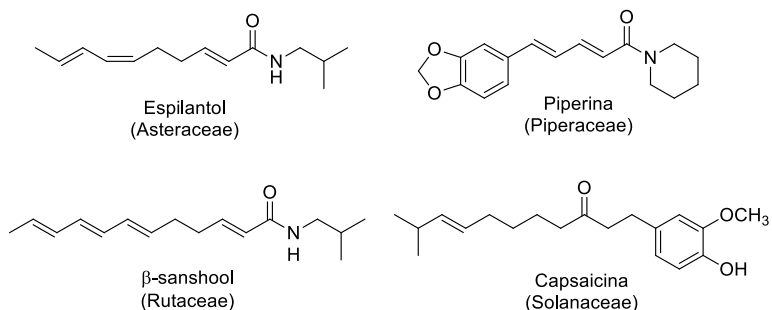
(v) dihidroxíisobutilamina



(w) dehidroxíisobutilamina

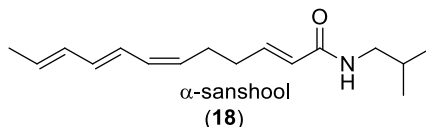
Fonte: adaptado de (GREGER, 2015).

Figura 4 - Alcamidas características de diferentes famílias de plantas



As alcamidas alifáticas (de cadeia aberta) têm se mostrado bastante eficazes como compostos medicinais, flavorizantes e inseticida, o que explica o crescente interesse dos pesquisadores e da indústria nesta classe de metabólitos secundários (MOLINA-TORRES & CHAVES, 2001). Elas também têm apresentado a capacidade de excitar neurônios sensoriais diferentes dos excitados pela capsaicina e outros condimentos pungentes semelhantes (BAUTISTA et al., 2008). Com o objetivo de obter mais informações sobre a relação estrutura-atividade das alcamidas pungentes, derivados da alcamidas α -sanshool (**18**) (Figura 5) foram sintetizados. Esses resultados mostram que uma ligação dupla com configuração *Z* na cadeia ácida é elemento chave para a propriedade sensorial. O tamanho da cadeia carbônica e certo padrão nas insaturações também são importantes para a sensação de pungência (GALOPIN et al., 2003).

Figura 5 – Estrutura da alcamida α -sanshool

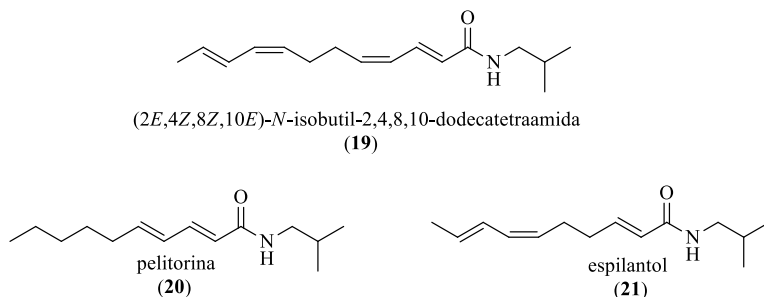


No caso da família Asteraceae, apenas as tribos Heliantheae e Anthemideae produzem alcamidas, sugerindo que um ou mais elementos da biossíntese dessas substâncias está ausente nas outras tribos. A presença da porção 2-metilbutilamina (**f**) é um dos fatores que

diferenciam a tribo Heliantheae da Anthemideae. A segunda é caracterizada pela formação frequente de porções piperidina (**b**) e pirrolidina (**c**), que não são encontradas na primeira (CHRISTENSEN; LAM, 1991; CHRISTENSEN, 1992).

Na família Asteraceae também são encontradas alcanidas olefinicas com 8 a 18 átomos de carbono na porção ácida (alcanidas das séries C₈ e C₁₈) (RIOS, 2012). As alcanidas olefinicas da série C₁₂ são uma grande tendência biossintética de espécies da tribo Heliantheae (WOELKART & BAUER, 2007). A substância ácido (2*E*,4*Z*,8*Z*,10*E*)-*N*-isobutil-2,4,8,10-dodecatetraenamida (**19**) foi reportada para *A. ciliata* (MARTIN & BECKER, 1985) e *A. radicans* (RIOS-CHAVEZ et al., 2003). A conhecida isobutilamida da série C₁₀, a alcanida olefinica pelitorina (**20**), está presente apenas na tribo Anthemideae, enquanto que a isobutilamida espilantol (**21**) é a representante da série C₁₀ na tribo Heliantheae. Derivados oxigenados em *A. ciliata* (MARTIN; BECKER, 1985; SILVEIRA et al., 2016) e *A. oleracea* (SIMAS et al., 2013) podem ser considerados como produtos de oxidação do espilantol.

Figura 6 – Alcanidas olefinicas normalmente encontradas na tribo Heliantheae



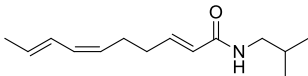
No que diz respeito ao gênero *Acmella*, as suas alcanidas podem conter uma porção isobutilamina (**a**), 2-metilbutilamina (**f**), feniletilamina (**d**), (*E*)-estirilamina (**p**) e (*Z*)-estirilamina (**r**) e um resíduo ácido com 8 a 14 carbonos. A isobutilamida espilantol (**21**) foi relatada em quatro (*A. ciliata*, *A. oleracea*, *A. oppositifolia* e *A. radicans*) das sete espécies (*A. alba*, *A. ciliata*, *A. decumbens*, *A. mauritiana*, *A. oleracea*, *A. oppositifolia* e *A. radicans*) de *Acmella* já estudadas fitoquimicamente, e alguns dos seus análogos já foram encontrados

nessas sete espécies, fato que provavelmente contribui para a pungência induzida por essas plantas.

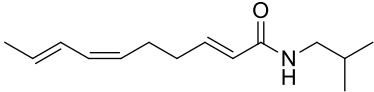
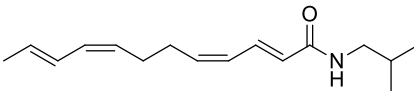
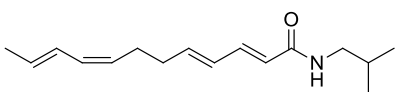
Algumas atividades farmacológicas vêm sendo reportadas para estes metabólitos secundários, tais como anti-inflamatória (KRAUS et al., 2006; LALONE et al., 2007; WOELKART; BAUER, 2007; WU et al., 2008; HERNÁNDEZ et al., 2009), bactericida e antifúngica (MOLINA-TORRES et al., 1999; CRUZ et al., 2014), antiprotozoária (SPELMAN et al., 2011), inseticida (JONDIKO, 1986; MOLINA-TORRES et al., 1996; RAMSEWAK et al., 1999; MORENO et al., 2012; SIMAS et al., 2013), diurética (RATNASOORIYA et al., 2004), analgésica (RIOS et al., 2007; GERTSCH et al., 2008), imunomodulatória e canabimimética (WOELKART et al., 2005; RADUNER et al., 2006; SASAGAWA et al., 2006; MATOVIC et al., 2007; WOELKART et al., 2008; HOHMANN et al., 2011; HAJDU et al., 2014).

As alcanidas isoladas a partir do gênero *Acmella*, bem como suas atividades farmacológicas, estão apresentadas no quadro 4.

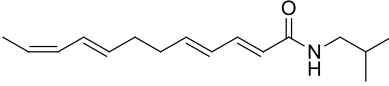
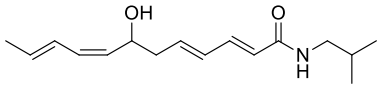
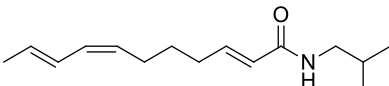
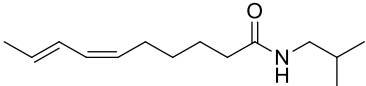
Quadro 4 - Atividades farmacológicas das alcanidas isoladas do gênero *Acmella*.

Alcanida	Espécie (Referência)	Atividade (Referência)
 <p>(2E,6Z,8E)-N-isobutyl-2,6,8-decatrienamida (espilantol) (21)</p>	<p><i>A. ciliata</i> (MARTIN; BECKER, 1984)</p> <p><i>A. oleracea</i> (CHENG et al., 2015)</p> <p><i>A. oppositifolia</i> (MOLINA-TORRES et al., 1996)</p>	<p>Analgésica (MOLINA-TORRES et al., 1996)</p> <p>Antifúngica e antibacteriana (MOLINA-TORRES et al., 2004)</p> <p>Anti-inflamatória (WU et al., 2008)</p> <p>Antimutagênciã (ARRIAGA-ALBA et al., 2013)</p>

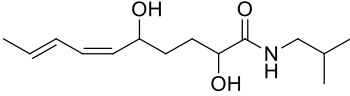
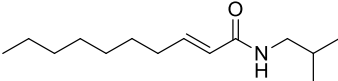
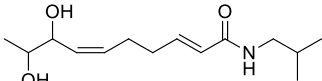
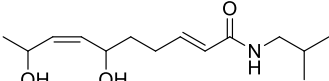
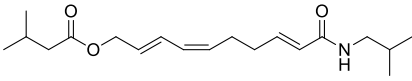
Quadro 4 – (continuação)

Alcâmida	Espécie (Referência)	Atividade (Referência)
 <p>(2E,6Z,8E)-N-isobutil-2,6,8-decatrienamida (espilantol) (21)</p>	<p><i>A. radicans</i> (RIOS-CHAVEZ et al., 2003)</p>	<p>Antinociceptiva (RIOS et al., 2007)</p> <p>Antiplasmódica (SPELMAN et al., 2011)</p> <p>Diurética (DUBEY et al., 2013)</p> <p>Inseticida (RAMSEWAK et al., 1999)</p>
 <p>(2E,4Z,8Z,10E)-N-isobutil-2,4,8,10-dodecatetraenamida (19)</p>	<p><i>A. ciliata</i> (MARTIN; BECKER, 1985)</p> <p><i>A. radicans</i> (RIOS-CHAVEZ et al., 2003)</p>	<p>Anti-inflamatória (QUANG et al., 2012)</p>
 <p>(2E,4E,8Z,10E)-N-isobutil-2,4,8,10-dodecatetraenamida (22)</p>	<p><i>A. alba</i> (BOHLMAN N et al., 1980)</p> <p><i>A. ciliata</i> (MARTIN; BECKER, 1985)</p> <p><i>A. oppositifolia</i> (MOLINA-TORRES et al., 1996)</p>	<p>Anti-inflamatória e citotóxica (CHEN et al., 2005)</p> <p>Antifúngica (CRUZ et al., 2014)</p> <p>Canabimimética (CB₂) (MATOVIC et al., 2007)</p> <p>Inibição da COX-2 (HINZ et al., 2007) e da 5-lipoxigenase (MÜLLER-JAKIC et al., 1994)</p>

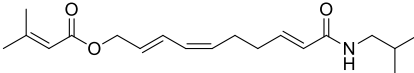
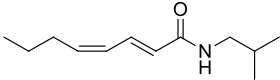
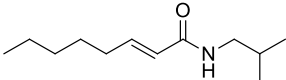
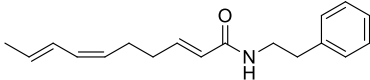
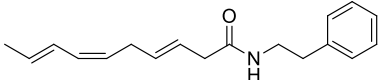
Quadro 4 – (continuação)

Alcamida	Espécie (Referência)	Atividade (Referência)
 <p>(2E,4E,8E,10Z)-N-isobutil-2,4,8,10-dodecatetraenamida (23)</p>	<p><i>A. mauritiana</i> (JONDIK, 1986)</p>	<p>Anti-inflamatória e citotóxica (CHEN et al., 2005)</p> <p>Antifúngica (CRUZ et al., 2014)</p> <p>Canabimimética CB₂ (MATOVIC et al., 2007)</p> <p>Imunomoduladora (MATTHIAS et al., 2008)</p> <p>Larvicida (JONDIKO, 1986)</p>
 <p>(2E,4E,8Z,10E)-N-isobutil-7-hydroxy-2,4,8,10-dodecatetraenamida (24)</p>	<p><i>A. ciliata</i> (KEIPERT; MELZIG, 2009)</p>	<p>-</p>
 <p>(2E,7Z,9E)-N-isobutil-2,7,9-undecatrienamida (25)</p>	<p><i>A. ciliata</i> (KEIPERT; MELZIG, 2009)</p>	<p>Larvicida (RAMSEWAK et al., 1999)</p>
 <p>(6Z,8E)-N-isobutil-6,8-decadienamida (26)</p>	<p><i>A. ciliata</i> (MARTIN; BECKER, 1984)</p>	<p>-</p>

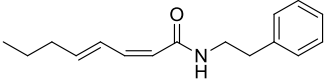
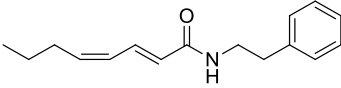
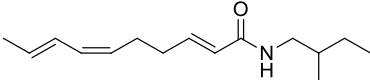
Quadro 4 – (continuação)

Alcamida	Espécie (Referência)	Atividade (Referência)
 <p>(6Z,8E)-N-isobutil-2,5-dihidroxi-6,8-decadienamida (27)</p>	<p><i>A. ciliata</i> (KEIPERT; MELZIG, 2009)</p>	<p>-</p>
 <p>(2E)-N-isobutil-2-decaenamida (28)</p>	<p><i>A. radicans</i> (RIOS- CHAVEZ et al., 2003)</p>	<p>Antibacteriana e antifúngica (MOLINA- TORRES et al., 2004)</p>
 <p>(2E,6Z)-N-isobutil-8,9-dihidroxi-2,6-decadienamida (29)</p>	<p><i>A. oleracea</i> (SIMAS et al., 2013)</p>	<p>-</p>
 <p>(2E,7Z)-N-isobutil-6,9-dihidroxi-2,7-decadienamida (30)</p>	<p><i>A. oleracea</i> (SIMAS et al., 2013)</p>	<p>-</p>
 <p>(2E,6Z,8E)-N-isobutil-10-metilbutanoato-2,6,8-decatrienamida (31)</p>	<p><i>A. ciliata</i> (MARTIN; BECKER, 1984)</p>	<p>-</p>

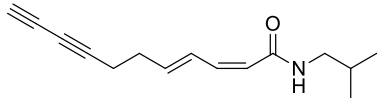
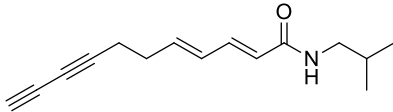
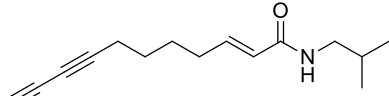
Quadro 4 – (continuação)

Alcamida	Espécie (Referência)	Atividade (Referência)
 <p>(2E,6Z,8E)-N-isobutil-10-metil-2-butanoato-2,6,8-decatrienamida (32)</p>	<i>A. ciliata</i> (MARTIN; BECKER, 1984)	-
 <p>(2E,4Z)-N-isobutil-2,4-octadienamida (33)</p>	<i>A. ciliata</i> (MARTIN; BECKER, 1985)	-
 <p>(2E)-N-isobutil-2-octenamida (34)</p>	<i>A. radicans</i> (RIOS- CHAVEZ et al., 2003)	-
 <p>(2E-6Z-8E)-N-fenilet-2,6,8-decatrienamida (35)</p>	<i>A. ciliata</i> (MARTIN;B ECKER, 1984) <i>A. radicans</i> (RIOS- CHAVEZ et al., 2003)	-
 <p>(3E,6Z,8E)-N-fenilet-3,6,8-decatrienamida (36)</p>	<i>A. ciliata</i> (MARTIN; BECKER, 1985)	-

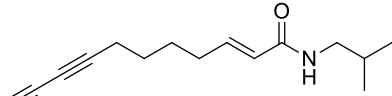
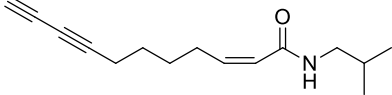
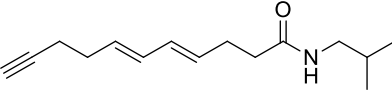
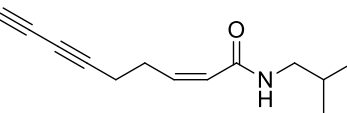
Quadro 4 – (continuação)

Alcămida	Espécie (Referência)	Atividade (Referência)
 <p>(2Z,4E)-N-feniletil-2,4-octadienamida (37)</p>	<p><i>A. ciliata</i> (MARTIN; BECKER, 1985)</p> <p><i>A. radicans</i> (RIOS- CHAVEZ et al., 2003)</p>	<p>-</p>
 <p>(2E,4Z)-N-feniletil-2,4-octadienamida (38)</p>	<p><i>A. radicans</i> (RIOS- CHAVEZ et al., 2003)</p>	<p>-</p>
 <p>(2E,4Z,8E)-2-metilbutil-2,4,8- decatrienamida (39)</p>	<p><i>A. ciliata</i> (MARTIN; BECKER, 1984)</p> <p><i>A. oleracea</i> (CHENG et al., 2015)</p> <p><i>A. oppositifolia</i> (MOLINA- TORRES et al., 1996)</p> <p><i>A. radicans</i> (RIOS- CHAVEZ et al., 2003)</p>	<p>-</p>

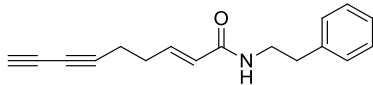
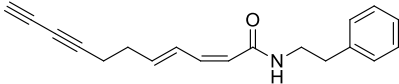
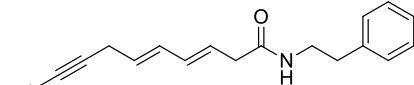
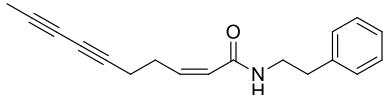
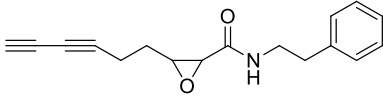
Quadro 4 – (continuação)

Alcamida	Espécie (Referência)	Atividade (Referência)
 <p>(2Z,4E)-N-isobutil-2,4-dien-8,10-undecadiinamida (40)</p>	<p><i>A. alba</i> (BOHLMANN et al., 1980)</p>	<p>Antifúngica (CRUZ et al., 2014)</p> <p>Anti-inflamatória e citotóxica (CHEN et al., 2005)</p> <p>Inibição da atividade da CYP2E1</p>
 <p>(2E,4E)-N-isobutil-2,4-dien-8,10-undecadiinamida (41)</p>	<p><i>A. ciliata</i> (MARTIN; BECKER, 1985)</p> <p><i>A. radicans</i> (RIOS-CHAVEZ et al., 2003)</p>	<p>Inibição da biossíntese de melanina (YAMADA et al., 2011)</p> <p>Inibição das atividades da CYP3A4 e CYP1A2 (BRAHMI et al., 2012)</p>
 <p>(2E)-N-isobutil-2-en-8,10-undecadiinamida (42)</p>	<p><i>A. ciliata</i> (MARTIN; BECKER, 1985)</p> <p><i>A. oleracea</i> (CHENG et al., 2015)</p> <p><i>A. ciliata</i> (MARTIN; BECKER, 1985)</p>	<p>Antifúngica (CRUZ et al., 2014)</p> <p>Anti-inflamatória e citotóxica (LALONE et al., 2007)</p> <p>Antiplasmódica (SPELMAN et al., 2011)</p> <p>Imunomoduladora (MATTHIAS et al., 2008)</p>

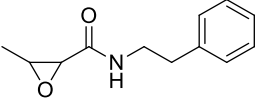
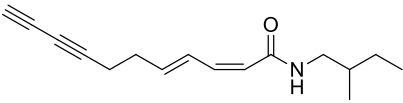
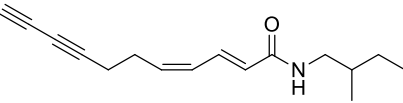
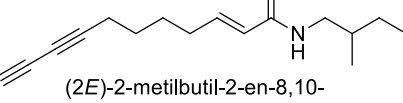
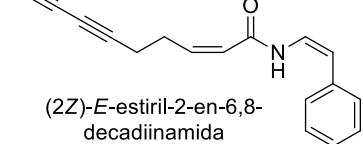
Quadro 4 – (continuação)

Alcamida	Espécie (Referência)	Atividade (Referência)
 <p>(2E)-N-isobutil-2-en-8,10-undecadiinamida (42)</p>		<p>Inseticida (RAMSEWAK et al., 1999)</p>
 <p>(2Z)-N-isobutil-2-en-8,10-decadiinamida (43)</p>	<p><i>A. oleracea</i> (CHENG et al., 2015)</p>	<p>Anti-inflamatória e citotóxica (LALONE et al., 2007)</p>
 <p>(4E,6E)-N-isobutil-4,6-dien-10-undecainamida (44)</p>	<p><i>A. decumbens</i> (CASADO et al., 2009)</p>	<p>-</p>
 <p>(2Z)-N-isobutil-2-en-6,8-nonadiinamida (45)</p>	<p><i>A. alba</i> (BOHLMANN et al., 1980)</p> <p><i>A. ciliata</i> (KEIPERT & MELZIG, 2009)</p> <p><i>A. decumbens</i> (CASADO et al., 2009)</p> <p><i>A. oleracea</i> (GREGER et al., 1985)</p>	<p>-</p>

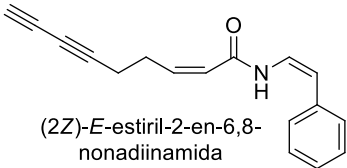
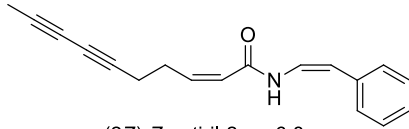
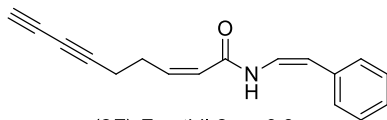
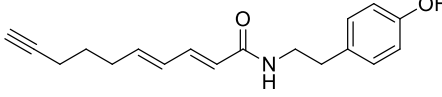
Quadro 4 – (continuação)

Alcamida	Espécie (Referência)	Atividade (Referência)
 <p>(2E)-N-feniletil-2-en-6,8-nondiinamida (46)</p>	<p><i>A. ciliata</i> (MARTIN; BECKER, 1985)</p> <p><i>A. radicans</i> (RIOS- CHAVEZ et al., 2003)</p>	-
 <p>(2Z,4E)-N-feniletil-2,4-dien-8,10-undecadiinamida (47)</p>	<p><i>A. ciliata</i> (MARTIN; BECKER, 1985)</p>	-
 <p>(3E,5E)-N-feniletil-3,5-dien-8,10-undecadiinamida (48)</p>	<p><i>A. ciliata</i> (MARTIN; BECKER, 1985)</p>	-
 <p>(2Z)-N-feniletil-2-en-6,8-decadiinamida (49)</p>	<p><i>A. alba</i> (BOHLMANN et al., 1980)</p>	-
 <p>N-feniletil-<i>cis</i>-2,3-epoxi-6,8-nondiinamida (50)</p>	<p><i>A. ciliata</i> (MARTIN; BECKER, 1985)</p>	-

Quadro 4 – (continuação)

Alcamida	Espécie (Referência)	Atividade (Referência)
 <p data-bbox="224 437 461 510"><i>N</i>-feniletil-<i>cis</i>-2,3-epoxi- tetramida (51)</p>	<p data-bbox="604 341 719 453"><i>A. ciliata</i> (MARTIN; BECKER, 1985)</p>	<p data-bbox="835 405 846 421">-</p>
 <p data-bbox="168 667 483 740">(2<i>Z</i>,4<i>E</i>)-2-metilbutil-2,4-dien-8,10- undecadiinamida (52)</p>	<p data-bbox="604 580 719 692"><i>A. ciliata</i> (MARTIN; BECKER, 1985)</p>	<p data-bbox="835 612 846 628">-</p>
 <p data-bbox="168 896 483 970">(2<i>E</i>,4<i>Z</i>)-2-metilbutil-2,4-dien-8,10- undecadiinamida (53)</p>	<p data-bbox="604 810 719 922"><i>A. ciliata</i> (MARTIN; BECKER, 1985)</p>	<p data-bbox="835 842 846 858">-</p>
 <p data-bbox="168 1088 483 1161">(2<i>E</i>)-2-metilbutil-2-en-8,10- undecadiinamida (54)</p>	<p data-bbox="582 1040 741 1120"><i>A. oleracea</i> (CHENG et al., 2015)</p>	<p data-bbox="835 1072 846 1088">-</p>
 <p data-bbox="199 1295 416 1369">(2<i>Z</i>)-<i>E</i>-estiril-2-en-6,8- decadiinamida (55)</p>	<p data-bbox="582 1232 741 1311"><i>A. alba</i> (BOHLMANN et al., 1980)</p>	<p data-bbox="835 1264 846 1279">-</p>

Quadro 4 – (continuação)

Alcamida	Espécie (Referência)	Atividade (Referência)
 <p>(2Z)-E-estiril-2-en-6,8-nonadiinamida (56)</p>	<p><i>A. alba</i> (BOHLMANN et al., 1980)</p>	-
 <p>(2Z)-Z-estiril-2-en-6,8-decadiinamida (57)</p>	<p><i>A. alba</i> (BOHLMANN et al., 1980)</p>	-
 <p>(2Z)-Z-estiril-2-en-6,8-nonadiinamida (58)</p>	<p><i>A. alba</i> (BOHLMANN et al., 1980)</p>	-
 <p>(2Z,4E)-N-(p-hidroxifeniletil)- 2,4-dien-9-nonainamida (59)</p>	<p><i>A. decumbens</i> (CASADO et al., 2009)</p>	-

2.4.1 Espilantol

A isobutilamida (2E,6Z,8E)-N-isobutil-2,6,8-decatrienamida, usualmente chamada espilantol (*spilanthol*) (**21**) foi obtida pela primeira vez, a partir das flores de *A. oleraceae*, por Gerber em 1903 (GERBER, 1903; *apud* GREGER, 2015). Em 1945, Acree et al. isolaram e

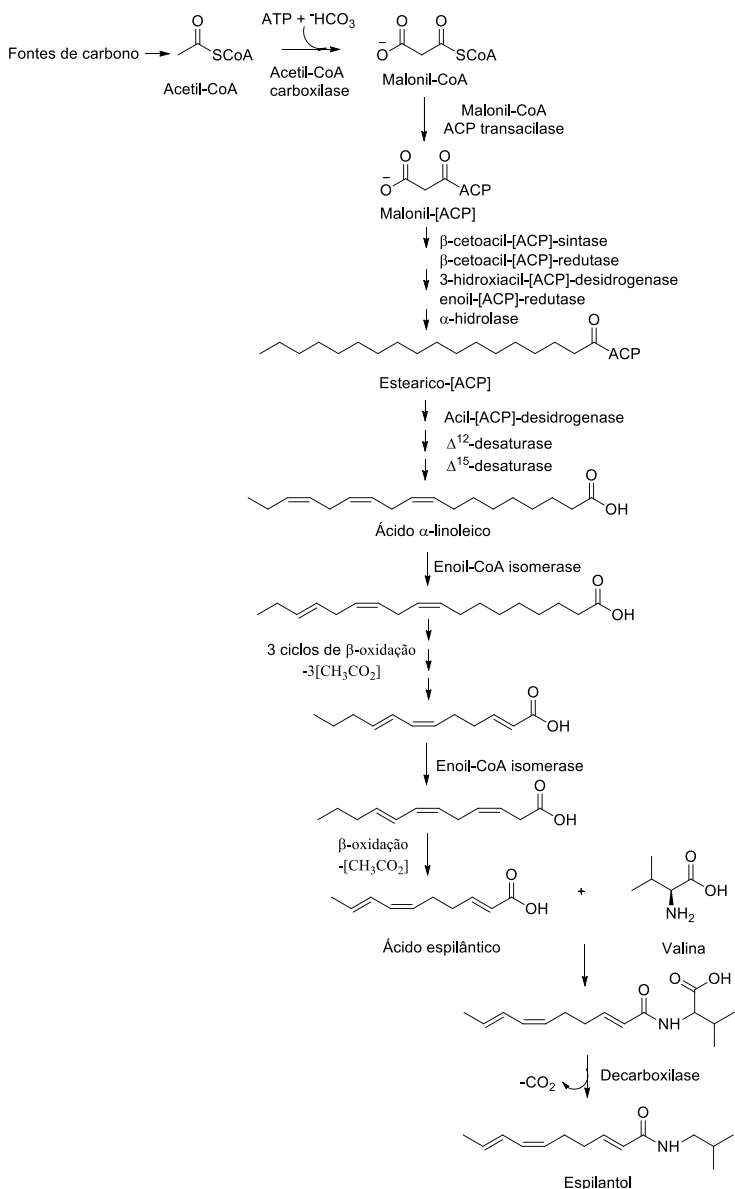
sugeriram a correta estrutura do espilantol, a partir de extratos das raízes de *Heliopsis longipes* (ACREE et al., 1945; *apud* GREGER, 2015). Como inicialmente essa planta foi erroneamente identificada como *Erigeron afins*, a substância foi nomeada afinina (*affinin*), que foi confirmada ser idêntica ao espilantol por Jacobson e colaboradores em 1957 (JACOBSON, 1957; *apud* GREGER, 2015). Biossinteticamente, o espilantol é formado a partir do ácido α -linolênico e do aminoácido valina, conforme apresentado na Figura 7.

Várias atividades farmacológicas já foram atribuídas ao espilantol. A atividade analgésica foi estudada para avaliar a inibição das contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos. Para tanto, o espilantol foi administrado por via oral em soluções aquosas em doses variando entre 2,5 e 10,0 mg/kg, apresentando uma dose efetiva (DE₅₀) de 6,98 mg/kg. A atividade analgésica foi atribuída ao aumento da liberação de ácido gama-amino-butírico (GABA) no córtex cerebral temporal (OGURA et al., 1982). Em outro ensaio, foi observado que o espilantol (1 mg/kg, por via intraperitoneal) reduziu em 95% o número de contorções induzidas por ácido acético em camundongos, além disso também foi observado o efeito antinociceptivo no teste de placa quente na mesma dose administrada (CILIA-LÓPEZ et al., 2010).

O efeito antinociceptivo também foi observado por Déciga-Campos e colaboradores (2010), através da administração do espilantol (30 mg/kg, via intraperitoneal). Os autores associaram que a via dos canais de óxido nítrico-K⁺ pode estar envolvida no mecanismo de ação (DÉCIGA-CAMPOS et al., 2010). Em outro estudo, este mesmo grupo descobriu que o espilantol não só teve um efeito antinociceptivo, mas também modificou o comportamento de ansiedade e prolongou o tempo de hipnose induzido por pentobarbital de sódio, além de diminuir o tempo de convulsões tônico-clônicas induzidas pelo pentilenotetrazol (PTZ) (DÉCIGA-CAMPOS et al., 2012).

A atividade anti-inflamatória do espilantol foi demonstrada por WU et al. (2008) utilizando-se o modelo de macrófagos murinos ativados por lipopolissacarídeos (RAW 264.7). Essa linhagem de macrófagos produz óxido nítrico (NO) para mediar a inflamação por meio das enzimas óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e ciclo-oxigenase 2 (COX2). O espilantol inibiu a produção de ambas as enzimas e o RNAm que as codificam (WU et al., 2008). Em um estudo diferente usando o modelo de edema em orelha de camundongos induzido pelo acetato miristato de forbol (PMA), o espilantol mostrou efeito anti-inflamatório dependente da dose com ED₅₀ de 1,3 mg/orelha (HERNÁNDEZ et al., 2009).

Figura 7 – Rota biossintética proposta para o espilantol. Adaptado de Greger (1974) e Martin; Becker (1985).



Arriaga-Alba e colaboradores demonstraram a atividade antimutagênica do espilantol por meio da sua capacidade em reduzir em 40% as mutações induzidas por 2-aminoantraceno (2AA) e reduzir em 50% o dano oxidativo ao DNA causado por norfloxacino, nas cepas TA98 e TA102 de *Salmonella typhimurium* (ARRIAGA-ALBA et al., 2013).

As atividades antifúngica e bacteriostática do espilantol também foram avaliadas. Esta substância inibiu 100% do crescimento dos fungos *Sclerotium rolfisii*, *S. cepivorum*, *Phytophthora infestans* e *Rhizoctonia solani*, além das bactérias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* em concentrações inferiores a 25 µg/mL (MOLINA-TORRES et al., 2004).

O espilantol também se mostrou útil como inseticida. Ele apresentou atividade contra *Plutella xylostella*, que é considerado um dos organismos mais destrutivos que atacam vegetais, como os brócolis (SHARMA & KUMAR, 2013) e contra *Tuta absoluta*, que normalmente ataca plantas da família Solanaceae, como o tomate (MORENO et al., 2012). O espilantol também foi ativo contra larvas de *Aedes aegyptii*, que podem transmitir os vírus causadores da dengue, chikungunya, zika e febre amarela a uma dose de 12,5 mg/mL (RAMSEWAK et al., 1999). Outrossim, o espilantol também se mostrou tóxico aos mosquitos transmissores da malária *Anopheles*. Ainda mais importante, o espilantol mostrou-se ativo contra o parasita causador dessa doença, o *Plasmodium falciparum*, com CI_{50} de 16,5 µg/mL e 16,3 µg/mL frente as cepa PFB e K1 (resistente à cloroquina), respectivamente (SPELMAN et al., 2011).

A atividade sobre as enzimas da CYP₄₅₀ também foi avaliada. O espilantol inibiu as enzimas CYP_{1A1/2}, CYP_{2D6} e CYP_{3A4}, com valores de CI_{50} de 25, 16,1 e 13,5 µg/mL, respectivamente (RODEIRO et al., 2009).

O espilantol demonstrou capacidade de promover a absorção de algumas substâncias como cafeína, testosterona e ibuprofeno, através da derme de maneira dependente da dose, além de ser capaz de permear várias barreiras fisiológicas, como a pele, as mucosas oral e intestinal e a barreira hemato-encefálica (BOONEN; et al., 2010; VERYSER et al., 2014).

Além das atividades já citadas, extratos contendo espilantol também apresentaram atividade inibidora da enzima tirosinase (BARBOSA et al., 2016), vasodilatadora (ORAPIN WONGSAWATKUL, 2008; CASTRO-RUIZ et al., 2017), diurética (RATNASOORIYA et al., 2004; ALI et al., 2015), hepatoprotetora (ALI et al., 2012) e afrodisíaca (SHARMA et al., 2011). Esses extratos

também estão disponíveis comercialmente, na forma de preparações para uso na mucosa oral, visando tratar dores de dente e estomatites (BOONEN, J.; et al., 2010) e em diversas formulações para a estética humana, comercializadas devido ao suposto “efeito botox” ao reduzir as rugas nas áreas aplicadas e sem a necessidade de injeções. Tanto no Brasil quanto no exterior, é possível encontrar formulações que prometem reduzir em até 80% as rugas na face (ARTARIA et al., 2011). A empresa francesa Gattefossé® (GATTEFOSSÉ, 2015) e a brasileira Natura® (NATURA, 2017) comercializam produtos com este mesmo objetivo.

2.5 Relação entre as alcamidas e os receptores canabinoides

Em 1988, Devane et al. descreveram o primeiro receptor canabinoide, dando-lhe, em 1992, o nome de receptor CB₁ (DEVANE et al, 1988; HOWLETT et al., 2002). No ano seguinte, outro receptor dos canabinóides (CB₂) foi descrito, ambos pertencentes à superfamília das proteínas G, com sete domínios transmembranares do tipo rodopsina (MUNRO et al., 1993).

Apesar de serem expressos por algumas células não-neuronais, como as do sistema imune, os receptores CB₁ estão distribuídos principalmente no SNC, de uma maneira que explica por que sua ativação pode mediar a inibição da liberação contínua de diferentes neurotransmissores excitatórios e inibitórios, que incluem acetilcolina, noradrenalina, dopamina, 5-hidroxitriptamina (5-HT), ácido gama-aminobutírico (GABA), glutamato e aspartato, podendo, assim, afetar processos de cognição e memória, alterar o controle da função motora e induzir sinais de analgesia (HOWLETT et al., 2002; SZABO; SCHLICKER, 2005). Já os receptores CB₂ estão predominantemente localizados nas células imunes. Quando ativados, eles estão associados a efeitos imunomoduladores, como a migração das células do sistema imune, a liberação de citocinas e a inibição da expressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (PERTWEE, 2006). Existem evidências que os receptores CB₂ também sejam expressos por alguns neurônios, tanto dentro quanto fora do cérebro (GONG et al., 2006).

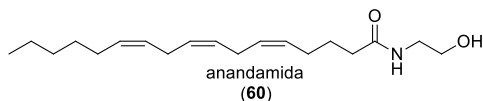
Uma série de aplicações terapêuticas vem sendo relatadas para esses receptores (ALEXANDROS et al., 2006). Alguns estudos mostraram que a ativação do CB₁ está associada à diminuição da ansiedade, estresse e depressão em camundongos (HILL; PATEL,

2013), indução do sono (LU et al., 2008) e diminuição da pressão sanguínea em ratos (GODLEWSKI et al., 2004) e também da inflamação intestinal *in vitro* (ALHAMORUNI et al., 2012).

Já a ativação dos receptores CB₂ é um potencial alvo terapêutico para as doenças inflamatórias do intestino, como doença de Crohn e colite ulcerativa (WRIGHT et al., 2008), além de suprimir os mastócitos, desempenhando um papel importante nas reações inflamatórias (SAMSON et al., 2003). Em pacientes com doença de Alzheimer, as proteínas beta-amiloides formam agregados conhecidos como placas senis, que perturbam o funcionamento neural. A ativação do receptor CB₂ induziu os macrófagos a removerem essas proteínas dos tecidos humanos, o que pode ajudar na melhora da doença. Mais além, a expressão de CB₂ foi relatada em muitas outras doenças, entre elas as cardiovasculares, gastrointestinais, hepáticas, renais, neurodegenerativas, psíquicas, autoimunes e câncer. Dessa maneira, a modulação de CB₂ é potencial alvo para o tratamento dessas doenças (PACHER; MECHOULAM, 2011).

Em 1992, Devane et al. descreveram o primeiro agonista canabinoide endógeno identificado, a anandamida (Figura 8), que é capaz de ativar tanto CB₁ quanto CB₂ (DEVANE et al., 1992). Juntamente com esses receptores, a anandamida e outros endocanabinoides, mais recentemente descobertos, constituem o que agora é referido como o "sistema endocanabinoide" (PERTWEE, 2008).

Figura 8 – Estrutura do endocanabinoide anandamida.



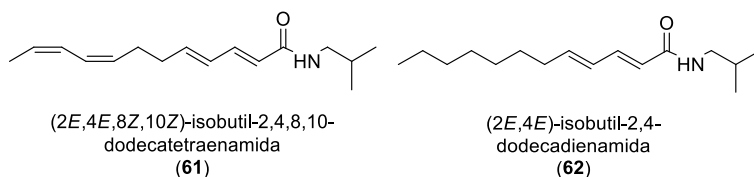
Este sistema parece estar envolvido em vários processos fisiológicos como a modulação de todos os eixos endócrinos mediados pelo hipotálamo, modulação da nocicepção, regulação da atividade motora, o controle de processos cognitivos, a modulação da resposta inflamatória e imunológica, ação antiproliferativa em células tumorais e o controle do sistema cardiovascular (VIVEROS et al., 2008).

Devido à similaridade estrutural das alcamidas alifáticas produzidas pelas plantas com a anandamida, alguns autores

investigaram a afinidade dessas substâncias naturais pelos receptores canabinoides.

A revisão de Gertsch et al. (2006) classificou as alcanidas de *Echinacea* (Asteraceae) como uma nova classe canabimimética, envolvendo principalmente os receptores CB₂ (GERTSCH et al., 2006). Woelkart et al. (2005) investigaram a afinidade de 12 alcanidas de *Echinacea* por ambos receptores canabinoides de roedores e demonstraram que as alcanidas deste gênero ligam-se seletivamente aos receptores CB₂, com valores da constante de inibição (*K_i*) menores que 20 μM, sendo 5 vezes menos ativos que a anandamida (WOELKART et al., 2005; WOELKART; BAUER, 2007; WOELKART et al., 2008). Duas alcanidas de *Echinacea* (Figura 9) apresentaram maior afinidade por CB₂ do que por CB₁ com valores de *K_i* (CB₂ < 60 nM; CB₁ > 1500 nM). Além disso, os estudos de modelagem molecular mostraram que as alcanidas ligam-se na cavidade acessível nos receptores CB₂, ligação direcionada pelas interações π-π e de hidrogênio. Ademais, essas substâncias aumentaram o Ca²⁺ intracelular total nas células HL60 promielocíticas (de leucemia) CB₂-positivas, conforme demonstrado pela anulação dos efeitos causados pelo antagonista CB₂ (SR144528) (RADUNER et al., 2006).

Figura 9 – Alcanidas de *Echinacea*



Além de *Echinacea*, 10 alcanidas isoladas das raízes de *Otanthus maritimus* (Asteraceae), planta que cresce nas areias da costa do Mediterrâneo também foram avaliadas. Entre as alcanidas avaliadas, a (2E,4E,8Z)-tetradecatrienopiperidina, apresentou moderada afinidade por ambos receptores com *K_i* = 5 nM, enquanto que as outras alcanidas desta espécie apresentaram afinidade apenas por CB₂ (RUIU et al., 2013). Em geral, esses estudos mostraram que as alcanidas ligam-se preferencialmente ao CB₂.

A grande maioria dos estudos que avaliaram a afinidade das alcanidas por receptores canabinoides utilizou as metodologias de

modelagem molecular 3D (*in silico*), ensaio de deslocamento de radioligantes (*in vitro*) ou o teste da tétrede canabinoide (*in vivo*) (NICOLUSSI et al., 2014). Os canabinoides possuem diversos efeitos nos testes feitos em animais, mas os mais proeminentes são conhecidos como a tétrede canabinoide: analgesia, catalepsia, hipolocomoção e hipotermia (PAMPLONA et al., 2012). Devido aos efeitos desencadeados, a avaliação da tétrede é considerada preditiva para atividade canabimimética por CB₁.

Em contraste com CB₁, os agonistas que se ligam a CB₂ não causam os efeitos adversos no SNC (por exemplo, psicoatividade, hipoatividade e hipotermia), fato que pode estar relacionado à localização e distribuição desses receptores. Essas considerações sugerem que as substâncias visando CB₂, como as alcanidas, possuem um promissor potencial terapêutico. Um estudo realizado por Guindon e Hohmann (2008) corrobora esta constatação. Os autores demonstraram a eficácia dos agonistas CB₂ seletivos em suprimir a dor inflamatória e neuropática, sem a indução dos efeitos adversos causados pela ativação de CB₁ (GUINDON; HOHMANN, 2008). Além disso, alguns estudos demonstraram que os agonistas específicos de CB₂ atenuam a inflamação associada às doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer (SHARMA et al., 2015; ASO; FERRER, 2016).

2.6. Doenças neurodegenerativas

As doenças neurodegenerativas, como a Doença de Alzheimer e a Doença de Parkinson, são caracterizadas pela perda funcional progressiva da massa neuronal, em uma ou mais regiões do SNC, levando a déficits específicos que agravam com a progressão da doença. Essas duas doenças apresentam algumas semelhanças, como a deposição intra e extracelular de emaranhados proteicos no tecido cerebral (MIGLIORINI et al., 2012). Outra semelhança observada é a grande resposta neuroinflamatória e a produção de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), que levam à neurodegeneração (ZHAO et al., 2013).

Conforme detalhado na *seção 2.5*, alguns estudos trazem evidências de que o Sistema Canabinoide está relacionado com a proteção do SNC contra a neurodegeneração (ALEXANDROS et al., 2006; KOPPEL; DAVIES, 2008; MARCHALANT et al., 2008; CAMPILLO; PAEZ, 2009; JIA et al., 2014). Os mecanismos de neuroproteção envolvem tanto os receptores CB₁ (com a diminuição da liberação de glutamato, produção de mediadores pró-inflamatórios e

estimulação da transmissão GABAérgica), quanto CB₂ (como anti-inflamatório) (CAMPILLO; PAEZ, 2009).

Aparentemente, a microglia é a maior responsável por expressar o receptor CB₂ durante os estágios neuroinflamatórios. Os macrófagos residentes do SNC migram e proliferam-se durante e após a injúria e inflamação, fagocitam e processam os antígenos e, uma vez ativados, produzem fatores pró-inflamatórios, incluindo as citocinas interleucinas IL-1 e IL-6 e TNF- α . Assim, a microglia está associada com a defesa e reparação do tecido no SNC. Estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que os canabinoides podem atuar sobre a glia e os neurônios, por inibir a liberação de citocinas pró-inflamatórias e aumentar a liberação de fatores anti-inflamatórios, com as citocinas IL-4 e IL-10. Isso sugere que os canabinoides têm o potencial de interferir em processos neuropatológicos que estão associados com os estados pró-inflamatórios (CABRAL; GRIFFIN-THOMAS, 2008).

A expressão *in vitro* do receptor CB₂ é regulada positivamente pela microglia e outras células imunes (CARLISLE et al., 2002) e durante estágios de neuroinflamação crônica *in vivo* (MARESZ et al., 2005). Estes resultados sugerem que durante a inflamação um maior número de receptores pode estar disponível. Assim, a utilização de agonistas seletivos CB₂ apresenta potencial terapêutico na diminuição desses processos inflamatórios no cérebro (CABRAL; GRIFFIN-THOMAS, 2008).

Na Doença de Alzheimer a neurodegeneração afeta múltiplos sistemas neurotransmissores, como o colinérgico, noradrenérgico, serotoninérgico, GABAérgico e glutamatérgico. A presença de placas amiloides (agregados do peptídeo β -amiloide) e emaranhados neurofibrilares no cérebro são características que definem dessa doença. Essas placas amiloides muitas vezes estão cercadas por microglia e astrócitos ativados. Conforme a neurodegeneração avança, os processos de formação de emaranhados neurofibrilares, neuroinflamação e perda neuronal também são acelerados (DUMONT; BEAL, 2011). Atualmente os medicamentos utilizados no tratamento desta doença envolvem os inibidores da acetilcolinesterase (AChE), enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina (ACh) na fenda sináptica. Nesta classe destaca-se o alcaloide isolado de *Galanthus nivalis* (galantamina). Outra classe utilizada no tratamento são os agonistas colinérgicos nicotínicos, com a finalidade de aumentar a liberação de ACh.

Alguns grupos vêm pesquisando a ação neuroprotetora das alcamidas. Page et. al (2010) depositaram uma patente que relata que as

alcamidas de *Echinacea* estão relacionadas com o tratamento e prevenção de doenças causadas pelo estresse oxidativo (PAGE et al., 2010). No ano seguinte foi depositada uma patente relatando o uso de alcamidas no tratamento de distúrbios do SNC, como inflamação e doenças neurodegenerativas (KELLY et al., 2011). Um recente estudo publicado por Nunes e colaboradores (NUNES et al., 2015) avaliou a atividade da riparina A, uma *N*-feneietilamida obtida de *Aniba riparia* (Lauraceae), através da análise das mitocôndrias isoladas de ratos. Nesse estudo, a riparina A apresentou atividade neuroprotetora e aumentou as defesas antioxidantes sem produzir efeito sedativo, perda de coordenação ou relaxamento muscular, nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/kg.

2.7. Doenças tropicais negligenciadas

Diferentemente das doenças neurodegenerativas, as doenças tropicais negligenciadas (DTN) não recebem tanta atenção e esforço por parte da indústria farmacêutica (YAMEY, 2002; BEYRER et al., 2007). As DTN são definidas pela OMS como um conjunto de doenças associadas à situação de pobreza, às precárias condições de vida e às inequidades em saúde, sendo incluídas neste contexto as Leishmanioses, a Doença de Chagas e a Malária (BRASIL, 2010). Mais de 1 bilhão de pessoas são afetadas pelas DTN, principalmente em países pobres e em desenvolvimento, nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (WHO, 2010).

A leishmaniose é uma doença parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania* e é transmitida através da picada de fêmeas de mosquitos da subfamília Phlebotominae. Esta doença apresenta-se de duas formas principais: a leishmaniose cutânea e visceral, causadas por *L. amazonensis* e *L. donovani*, respectivamente. Estima-se que 350 milhões de pessoas correm o risco de contraírem a doença, com uma incidência anual de 2 milhões de casos. A Bolívia, o Brasil e o Peru contabilizam 90% dos casos mundiais (WHO, 2010).

A doença de Chagas, descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas, é causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi* (pertencente à família Trypanosomatidae, a mesma dos protozoários do gênero *Leishmania*, causadores das leishmanioses) e é transmitida principalmente por insetos conhecidos como barbeiro. Estima-se que 8

milhões de pessoas estejam infectadas em 21 países (RASSI et al., 2010).

A malária, que já foi considerada uma DTN, é causada por diferentes espécies de *Plasmodium* e representa um problema de saúde pública, causando centenas de milhares de mortes por anos, especialmente para as pessoas que vivem sob extrema pobreza e em comunidades vulneráveis, principalmente em países tropicais (WHO, 2015b). A OMS recomenda a terapia combinada à base de artemisinina (ACT) como a primeira linha de tratamento da malária causada por *P. falciparum* (Prêmio Nobel em Fisiologia ou Medicina 2015). Entretanto, desde 2006, após o primeiro caso de resistência a artemisinina reportado no Camboja (KONG; TAN, 2015), a busca por novos medicamentos para o tratamento desta doença tem recebido atenção crescente, incluindo produtos naturais.

No âmbito da atividade das alcaloides sobre essas doenças, alguns estudos vêm sendo realizados. Em 2011, Spelman e colaboradores avaliaram o espilantol, isolado de *S. acmella*, frente as cepas PFB (parcialmente resistente à cloroquina) e K1 de *P. falciparum*, com valores de CI_{50} iguais a 16,5 $\mu\text{g/mL}$ e 5,8 $\mu\text{g/mL}$. No estudo realizado com *Achillea ptarmica* (Asteraceae), o extrato CH_2Cl_2 das suas partes aéreas e a alcaloide pelitorina (**20**), também mostraram-se ativos contra *P. falciparum*, com CI_{50} de 6,6 $\mu\text{g/mL}$ e 3,3 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (ALTHAUS et al., 2014). Esse mesmo grupo investigou recentemente as atividades das alcaloides de *Anacyclus pyrethrum* (Asteraceae), que também apresentaram moderada atividade *in vitro* contra *P. falciparum* e *L. donovani* (ALTHAUS et al., 2017).

2.8. Importância das patentes como fonte de informação tecnológica

Apesar da produção científica brasileira ter crescido bastante nos últimos anos, cerca de 90% das patentes requisitadas pelo setor farmacêutico são de empresas estrangeiras. Dos processos requeridos pelas instituições nacionais, a grande maioria é indeferida por má redação do pedido de patente. Segundo Ferreira et al., 2009, isso provavelmente deve-se à falta de cultura com relação à pesquisa de tecnologia patentada, pois a exploração das patentes como fonte de informação científica e tecnológica ainda não é um consenso no Brasil.

As patentes apresentam a informação mais recente em dado setor tecnológico, para a atualização de conhecimentos sobre seu estado-

da-arte, uma vez que o pedido de patente deve demonstrar o que preexistia e o que está sendo reivindicado como novidade. A informação de patente é abrangente, cobrindo praticamente todos os setores da técnica humana (FRANÇA, 2007).

Há basicamente três tipos de pesquisa envolvendo fármacos derivados de PNs:

- 1) Validação de dados etnofarmacológicos, aqueles envolvendo o conhecimento tradicional no emprego das plantas medicinais;
- 2) Descobertas de novos compostos-líderes naturais;
- 3) Síntese ou semissíntese de derivados aprimorados de substâncias naturais.

Neste sentido, o mapeamento tecnológico permite verificar se a produção científica, produzida principalmente nas universidades, está se transformando em produtos utilizados no benefício da sociedade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar dos pontos de vista químico e farmacológico as alcaloides presentes nas partes aéreas de *Acmella ciliata*.

3.2. Objetivos específicos

- Isolar e purificar as alcaloides presentes nas partes aéreas de *A. ciliata* por meio de diferentes técnicas cromatográficas;
- Determinar a estrutura química das alcaloides isoladas por meio de técnicas espectroscópicas e espectrométricas, tais como Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massas (EM);
- Realizar o estudo de fragmentação e desreplicação do extrato bruto de *A. ciliata*, por CLUE-EM/EM;
- Investigar a termoestabilidade do extrato bruto e do espilantol;
- Estudar a conversão do espilantol à dioxiacmellamida, induzida por luz e oxigênio;
- Avaliar as atividades leishmanicida, tripanomicida e antiplasmódica *in vitro* das alcaloides frente às formas intracelulares de *Leishmania amazonensis*, *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rhodisiense* e *Plasmodium falciparum*;
- Avaliar a atividade canabimimética *in vivo* do espilantol por meio do teste da tétrede canabinoide em camundongos;
- Fazer o levantamento de patentes existentes para o espilantol.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

As partes aéreas de *A. ciliata* foram coletadas na Associação dos Funcionários Fiscais de Santa Catarina (-27°26'15,70" -48°27'28,40"), Canasvieiras, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil, em novembro de 2013 (primeira coleta) e dezembro de 2014 (segunda coleta). A terceira coleta foi efetuada em dezembro de 2016, no Horto Didático de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Santa Catarina (-27°59'76,27" -48°51'68,77"), Trindade, Florianópolis, Santa Catarina, Brasil. A identificação botânica foi realizada pelo Prof. Dr. Marcos Sobral (Universidade Federal de São João del Rei) e uma exsicata representativa está depositada no Herbário do Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro sob o número RB 612273 (Figura 10).

Figura 10 – Exsicata representativa de *Acmella ciliata*



Fonte: <http://jabot.jbrj.gov.br> – (11/08/2017).

4.2 Obtenção dos extratos

A partir das coletas efetuadas, foram obtidos os extratos EA1 (extrato da primeira coleta), EA2 (extrato da segunda coleta) e o extrato em hexano (terceira coleta). Para EA1, as partes aéreas frescas (2.524,6 g) foram rasuradas e extraídas por maceração com 8 L de etanol 92%, a temperatura ambiente, por 7 dias. O solvente EtOH 92% foi utilizado devido à baixa toxicidade, pequeno risco ambiental e elevada polaridade, o que o capacita a extrair uma grande gama de metabólitos secundários. Este processo repetiu-se por mais duas vezes. Na sequência, o extrato foi filtrado e seco em evaporador rotatório sob pressão reduzida a 40 °C e, posteriormente, em liofilizador, obtendo-se 81,8 g de extrato bruto hidroetanólico. Realizou-se o mesmo procedimento para a obtenção do EA2, a partir dos 1.754,3 g das partes aéreas frescas, resultando em 60,9 g de extrato bruto hidroetanólico.

Para o extrato em hexano, as partes aéreas frescas (651,1 g) também foram rasuradas, mas extraídas por maceração com 2 L de hexano, por 7 dias, a temperatura ambiente e protegido da luz. O extrato foi seco em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, gerando 1,28 g de extrato bruto em hexano.

Os valores dos rendimentos provenientes dos três extratos estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 – Rendimento dos três extratos das partes aéreas de *A. ciliata*

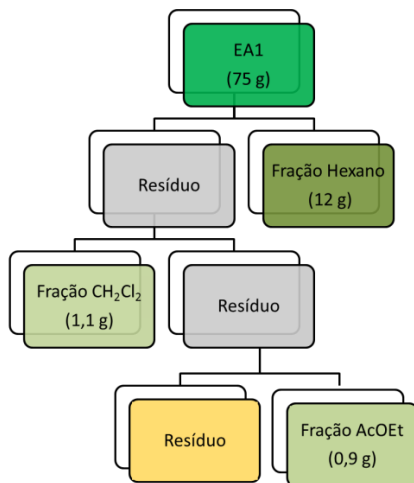
Extrato	Planta fresca (g)	Extrato bruto (g)	Rendimento (%)
EA1	2.524,6	81,8	3,24
EA2	1.754,3	60,9	3,47
Hexano	651,1	1,3	0,2

Alíquotas de 6,8 g do EA1; 2,9 g do EA2 e 813 mg do extrato hexano foram armazenadas para avaliação farmacológica e outras análises. O restante foi submetido aos fracionamentos cromatográficos.

4.2.1 Extração líquido-líquido dos extratos EA1 e EA2

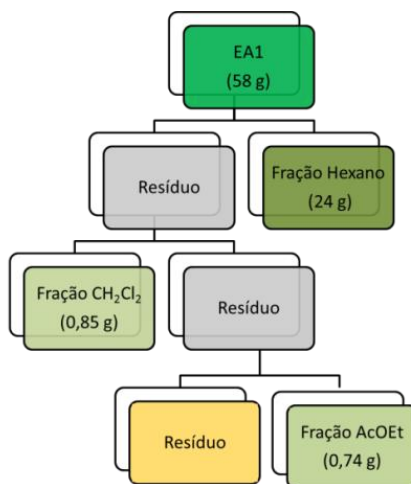
Uma alíquota de 75 g do EA1 seco foi dispersa em 200 mL de solução EtOH-H₂O (5:95, v/v) e submetido à extração líquido-líquido, em funil de separação, sob agitação manual, com os solventes hexano (650 mL), diclorometano (200 mL) e acetato de etila (200 mL), que após os solventes serem removidos, resultou nas respectivas frações: hexano (12,0 g), diclorometano (1,1 g), acetato de etila (0,9 g) e resíduo aquoso (Figura 11).

Figura 11 - Extração líquido-líquido do extrato bruto hidroetanólico EA1 de *Acmella ciliata*.



Este processo repetiu-se para EA2: 58 g do extrato seco foi disperso em 150 mL de solução EtOH-H₂O (5:95, v/v) e submetido à partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente: (700 mL) de hexano, (500 mL) de diclorometano e (350 mL) de acetato de etila. Após a remoção dos solventes obteve-se as correspondentes frações: hexano (24,4 g), diclorometano (0,85 g), acetato de etila (0,74 g) e resíduo aquoso (Figura 12).

Figura 12 - Extração líquido-líquido do extrato hidroetanólico EA2 de *Acmella ciliata*



4.3 Estudo de desreplicação do extrato bruto etanólico e hexano por CLUE/ESI-EM/EM

As análises do extrato hexano, extrato bruto etanólico de *A. ciliata* e suas respectivas frações hexano, diclorometano, acetato de etila e resíduo aquoso foram efetuadas em sistema UPLC *Acquity* equipado com detector de arranjo de diodos (PDA), amostrador automático, sistema quaternário de solventes e uma coluna cromatográfica *Acquity* BEH C18 (50 x 1,0 mm e 1,7 μ m) (Waters), da Central de Cromatografia, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC. A coluna cromatográfica foi mantida a 40 °C, enquanto a bandeja com as amostras permaneceu a temperatura de 20 °C.

O sistema UPLC estava acoplado ao Espectrômetro de Massas MS/MS Xevo G2-S QToF (Waters) com ionização por *electrospray* (ESI) operando nos modos positivo (ESI+) e negativo (ESI-). Os parâmetros do sistema foram: fluxo do gás do cone 60 L/h; fluxo do gás de dessolvatação 900 L/h; voltagem no cone 40 V; voltagem na fonte 80V. O argônio foi utilizado como gás de colisão e o nitrogênio como gás de nebulização, dessolvatação e de cone. A solução de Leucina encefalina foi utilizada como padrão de referência.

Os extratos e as frações foram solubilizados em solvente metanol grau HPLC, na concentração de 0,5 mg/mL e filtrados em membrana filtrante de PTFE com poro de 0,22 µm e diâmetro de 13 mm.

A fase móvel empregada para o extrato bruto, fração acetato de etila e resíduo aquoso foi um sistema gradiente de eluição utilizando os solventes água/ácido fórmico (0,1%) (v/v) na bomba A e acetonitrila na bomba B nas seguintes proporções: 0–5 min, 95% A e 5% B; 5–7 min, 50% A e 50% B; 7–7,2 min, 20% A e 80% B; 7,2–9,7 min, 10% A e 90% B; 9,7–15 min, 95% A e 5% B. O volume de injeção foi 2 µL e o fluxo manteve-se em 0,3 mL/min. Já para o extrato hexano e as frações hexano e diclorometano o sistema de eluição foi: 0–2 min, 95% A e 5% B; 2–7 min, 50% A e 50% B; 7–8 min, 20% A e 80% B; 8–10 min, 10% A e 90% B; 10–15 min, 95% A e 5% B.

Os espectros de massas foram adquiridos nos modos positivo e negativo para o extrato bruto etanólico e resíduo aquoso e apenas no modo positivo para o extrato hexano e para as frações hexano, diclorometano e acetato de etila; na faixa de varredura de 100 – 800 m/z.

Os dados foram processados e armazenados utilizando-se o software MassLynxTM V4.1 Mass Spectrometry (Waters, USA).

4.4 Fracionamento e monitoramento cromatográfico dos extratos

4.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O monitoramento das substâncias obtidas, através das técnicas cromatográficas, foi realizado empregando-se a análise por CCD. A metodologia foi desenvolvida em cromatoplasmas de gel de sílica 60 sobre suporte de alumínio e indicador de fluorescência Silicycle[®] F₂₅₄. Os solventes utilizados para eluição foram de grau P.A.. Após a eluição, as cromatoplasmas foram observadas sob luz ultravioleta (Câmara UV Prodicil[®] VA 50) nos comprimentos de ondas curta (254 nm) e longa (366 nm). Como não existe um reagente específico para as alcaloides, devido à grande diversidade estrutural, utilizou-se a solução de anisaldeído sulfúrico como revelador químico, que é um reagente não seletivo, sendo as colorações alaranjada, roxa e marrom a preta indicativas da presença dessa classe de substâncias (BAUER; REMIGER, 1989; CASTRO-RUIZ et al., 2017).

4.4.2 Cromatografia líquida a vácuo (CLV) dos extratos EA1 e EA2

Buscando-se um fracionamento preliminar, as frações em hexano, obtidas da extração líquido-líquido dos extratos EA1 e EA2, foram submetidas à CLV, separadamente.

Para ambos os extratos, utilizou-se gel de sílica 60 (0,04 – 0,063 mm) Silicycle® como fase estacionária, que foi empacotada a seco em um funil de vidro com placa porosa sinterizada [(h = 35 cm; Ø = 3 cm)], acoplado a um kitasato ligado a uma bomba de vácuo. A fase móvel foi um sistema gradiente de solventes composto por hexano e acetona, com polaridade crescente. As frações hexano foram misturadas com gel de sílica 60 (0,04 – 0,063 mm) Silicycle® (2:1), formando uma pastilha, sendo colocada em cima da fase estacionária.

A cada fração coletada, a fase estacionária foi levada à secura, para que outro sistema de solventes fosse adicionado.

Os perfis cromatográficos das frações coletadas foram observados por CCD.

Uma alíquota de 10 g do EA1 foi submetida a fracionamento preliminar por CLV. A Tabela 2 mostra os detalhes desse fracionamento.

Tabela 2 - Fracionamento por CLV da fração hexano do EA1.

Sistema de solventes	Volume (mL)	Fração	Massa (mg)
Hexano 100%	400	1	3210
Hexano-acetona 95:05	600	2	687
Hexano-acetona 90:10	400	3	722
Hexano-acetona 80:20	400	4	2588
Hexano-acetona 70:30	300	5	555
Hexano-acetona 60:40	300	6	250
Hexano-acetona 50:50	200	7	1080
Hexano-acetona 30:70	200	8	619
Acetona 100%	400	9	123

A fração hexano do extrato EA2 (22 g) também foi submetida a fracionamento preliminar por CLV. A Tabela 3 mostra os detalhes desse fracionamento.

Tabela 3 - Fracionamento por CLV da fração hexano do EA2.

Sistema de solventes	Volume (mL)	Fração	Massa (mg)
Hexano 100%	350	1	6955
Hexano-acetona 90:10	300	2	1120
Hexano-acetona 80:20	300	3	1870
Hexano-acetona 80:20	100	4	4800
Hexano-acetona 70:30	400	5	1024
Hexano-acetona 60:40	200	6	414
Hexano-acetona 60:40	100	7	1880
Hexano-acetona 60:40	100	8	736
Hexano-acetona 60:40	200	9	720
Hexano-acetona 60:40	200	10	690
Hexano-acetona 40:60	300	11	583
Acetona 100%	200	12	630
Metanol 100%	300	13	226

Os apêndices 1 e 2 contêm os fluxogramas resumindo os procedimentos cromatográficos realizados com as frações hexano dos extatos EA1 e EA2 de *A. ciliata*.

4.4.3 Cromatografia por adsorção em coluna (CC)

As colunas cromatográficas foram empacotadas com o adsorvente gel de sílica 60 (40-60 μm) Silicycle[®] como fase estacionária. Para o enchimento (empacotamento) das colunas, a fase estacionária foi agitada em um béquer com hexano (fase móvel) e, então, colocada nas colunas. As amostras foram aplicadas e eluídas com misturas de sistemas gradientes de solventes orgânicos constituídos por hexano e acetona, de acordo com os perfis cromatográficos observados previamente por CCD.

4.4.4 Cromatografia de exclusão por tamanho

Buscando-se a purificação das substâncias isoladas, utilizou-se também a técnica de cromatografia de exclusão por tamanho molecular

(permeação em gel). Utilizou-se como fase estacionária o gel de dextrana Sephadex[®] LH-20, da GE Healthcare[®] e o solvente metanol como fase móvel.

4.4.5 Fracionamento das subfrações da CLV do EA1

4.4.5.1 Fracionamento da subfração 5

A subfração 5 (555 mg) foi submetida a CC em coluna cromatográfica (h=35 cm; Ø=2,0 cm), conforme item 4.4.3. Obteve-se 21 subfrações, onde cerca de 10 mL foram coletados por frasco. A partir da análise do perfil por CCD, dos frascos 5 a 10 obteve-se a substância **AC1** (128,6 mg). O sistema de solventes para eluição está descrito na Tabela 4.

Tabela 4 – Sistema de solventes para eluição da subfração 5 da CLV do EA1

Sistema eluente	Volume (mL)	Frasco
Hexano-AcOEt 90:10	50	-
Hexano-AcOEt 80:20	150	1 – 11
Hexano-AcoEt 70:30	25	12 – 15
Hexano-AcOEt 50:50	30	16 – 17
MeOH 100%	50	18 - 21

4.4.5.2 Fracionamento da subfração 8

A subfração 8 (619 mg) foi submetida a CC em coluna cromatográfica (h=35 cm; Ø=2,0 cm), conforme item 4.4.3. Obteve-se 40 subfrações. O sistema de solventes para eluição está descrito na Tabela 5. A partir da análise do perfil por CCD, as amostras dos frascos 16 a 18 foram reunidas (149 mg) e submetidas a uma outra CC.

Tabela 5 – Sistema de solventes para eluição da subfração 8 da CLV do EA1

Sistema eluente	Volume (mL)	Frasco
Hexano-AcOEt 90:10	100	1 – 3
Hexano-AcoEt 80:20	100	4 – 13
Hexano-AcoEt 70:30	50	14 – 16
Hexano-AcoEt 60:40	50	17 - 19
Hexano-AcoEt 50:50	50	20 - 26
Hexano-AcoEt 40:60	50	27 - 29
Hexano-AcoEt 20:80	50	30 - 33
AcOEt 100%	50	34 – 36
MeOH 100%	50	37 - 40

A partir da CC das frações 16/18 [(h=35 cm; Ø=2,0 cm)], conforme item 4.4.3., dos frascos 9 e 10 obteve-se a substância **AC2** (13,7 mg). O sistema de solventes para eluição está descrito na Tabela 6.

Tabela 6 – Sistema de solventes para eluição das frações 16/18 subfração 8 da CLV do EA1

Sistema eluente	Volume (mL)	Frasco
DM	100	–
DM-MeOH 90:10	200	1 – 15
DM-MeOH 80:20	50	16 - 19
MeOH 100%	50	20 - 21

4.4.6 Fracionamento das subfrações da CLV do EA2

4.4.6.1 Fracionamento da subfração 4

A subfração 4 (4,8 g) foi submetida a CC em coluna cromatográfica (h=54 cm; Ø=1,5 cm), conforme item 4.4.3. Obteve-se 48 subfrações, onde cerca de 30 ml foram coletados por frasco. O sistema de solventes para eluição do procedimento está descrito na Tabela 7.

Tabela 7 – Sistema de solventes para eluição da subfração 4 da CLV do EA2

Sistema eluente	VOLUME (mL)	Frasco
Hexano 100%	200	–
Hexano-AcOEt 98:02	100	–
Hexano-AcOEt 95:05	600	1 – 10
Hexano-AcOEt 92:08	300	11 – 18
Hexano-AcOEt 90:10	100	19 - 20
Hexano-AcOEt 85:15	400	21 - 35
Hexano-AcOEt 80:20	100	36 - 37
Hexano-AcOEt 70:30	200	38 - 42
Hexano-AcOEt 60:40	100	43 – 45
AcOEt 100%	100	46 - 48

A fração 18/27 (1,2 g) foi submetida a outro processo de cromatografia de adsorção em coluna, conforme item 4.4.3, gerando outras 18 frações. O sistema de solventes para eluição do procedimento está descrito na Tabela 8.

Dos frascos 3 e 4 (10,3 mg, óleo esverdeado) foi isolada a substância **AC5**, de 7 e 8 (104,7 mg, óleo esverdeado) a substância **AC1** e dos frascos 11 e 12 (35,5 mg, óleo amarelo) obteve-se a substância **AC3**.

Tabela 8 – Sistema de solventes para eluição das frações 18/27 subfração 4 da CLV do EA2

Sistema eluente	VOLUME (mL)	Frasco
Hexano 100%	50	–
Hexano-AcOEt 95:05	100	–
Hexano-AcOEt 90:10	50	–
Hexano-AcOEt 80:20	50	–
Hexano-AcOEt 75:25	100	1 - 10
Hexano-AcOEt 60:40	100	11 – 13
Hexano-AcOEt 50:50	50	14 – 15
Hexano-AcOEt 40:60	100	16 – 17
AcOEt 100%	50	18

4.4.6.2 Fracionamento da subfração 6

A subfração 6 (414 mg) foi submetida a CC em coluna cromatográfica (h=54 cm; Ø=1,5 cm), conforme item 4.4.3. Obteve-se 25 subfrações, onde cerca de 30 mL foram coletados por frasco. O

sistema de solventes para eluição do procedimento está descrito na Tabela 9.

A fração dos frascos 11-13 (48,4 mg) foi submetida a cromatografia por exclusão, conforme *item 4.4.4.*, e eluída com metanol, obtendo-se outras 16 subfrações, onde cerca de 20 mL foram coletados por frasco. A partir do perfil observado por CCD, do frasco 7 (13,5 mg; óleo amarelo), obteve-se a substância **AC4**.

Tabela 9 – Sistema de solventes para eluição da subfração 6 da CLV do EA2

Sistema eluente	Volume (mL)	Frasco
Hexano-AcOEt 80:20	500	1- 14
Hexano-AcOEt 70:30	200	15 – 23
MeOH 100%	100	24 – 25

4.5 Elucidação estrutural

4.5.1 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As substâncias isoladas foram submetidas a análises de RMN de ^1H , ^{13}C e bidimensionais (HSQC e HMBC).

Os experimentos foram realizados em espectrômetros Bruker modelo AC 200 (200 MHz para ^1H e 50 MHz para ^{13}C) da Central de Análises (Departamento de Química/UFSC), modelo Fourier 300 (300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C) do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC e modelo Ascend 600 (600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C), do Departamento de Química da UFPR, Curitiba/PR, em parceria com o Prof. Dr. Andersson Barison.

As substâncias analisadas foram dissolvidas em aproximadamente 0,6 mL de clorofórmio e/ou acetona deuterados com Tetrametilsilano (TMS), utilizado como padrão interno. Os dados adquiridos (FID) foram processados em software *ACD lab* (SpecManager®) e em software *TopSpin* 3.1 (Bruker®). Os deslocamentos químicos foram medidos em partes por milhão (ppm) da frequência aplicada e as constantes de acoplamento (*J*) medidas em Hertz (Hz) e os resultados foram comparados com dados disponíveis na literatura.

4.5.2 Espectrometria de Massas (EM)

As substâncias isoladas também foram caracterizadas por EM. Os experimentos foram realizados em espectrômetro de massas Xevo G2-S QTOF Waters, da Central de Cromatografia, do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFSC.

4.6 Ensaio de degradação

4.6.1 Termodegradação do epilantol

A partir de 12,5 mg do EA2, preparou-se uma solução com metanol a 500 µg/mL. A alíquota de 1 mL desta solução foi separada para análise do tempo zero e o restante foi distribuído uniformemente em 24 frascos de vidro cilíndrico de 50 mL. Após a remoção do metanol a temperatura ambiente, as amostras foram colocadas em estufa (Figura 13), na presença de oxigênio, por 180 min nas temperaturas: 40, 80, 100 e 120 °C. A cada 30 min, as amostras foram retiradas da estufa, resfriadas a temperatura ambiente, solubilizadas com 1 mL de metanol HPLC, filtradas em membrana PTFE e analisadas por UPLC-MS.

Figura 13 – Fotografia ilustrativa do ensaio de termodegradação.

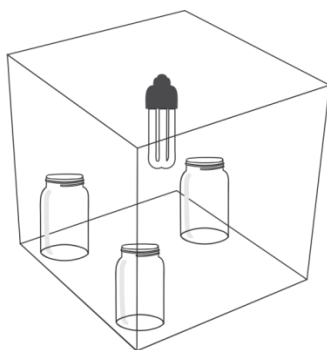


Foto da autora.

4.6.2 Fotodegradação do espilantol

Preparou-se 900 mL de solução de espilantol (100 $\mu\text{g/mL}$), isolado de *A. ciliata*, com metanol. A alíquota de 1 mL desta solução foi separada para análise do tempo zero e o restante foram distribuídos uniformemente em seis frascos de vidro. Três frascos foram vedados e armazenados em uma caixa seca e protegida do contato com a luz e oxigênio; os outros três frascos foram colocados em uma caixa de papelão, aberta na parte de cima para permitir contato com o oxigênio, na presença de uma lâmpada UVA e UVB AvianSun[®] (ZooMed) a 5 cm das amostras. As partes constituintes da câmara podem ser visualizadas conforme esquema da Figura 14.

Figura 14 – Esquema da câmara em que foi realizado o ensaio de fotodegradação do espilantol.



A cada dois dias, o volume da solução dos frascos abertos foi completado, para manter a concentração das amostras.

Em tempos pré-estabelecidos, uma alíquota de 1 mL de cada amostra foi retirada das soluções, filtradas em membrana PTFE e analisadas por UPLC-MS. Para as amostras protegidas da luz e oxigênio (grupo B), as análises foram efetuadas nos seguintes tempos: 8, 42 e 72 dias. Para as amostras que permaneceram na presença de luz e oxigênio: 48, 190 e 300 h (grupo A).

O ensaio de fotodegradação também foi realizado para o espilantol e extrato hexano secos (livres de solvente), para observar a

influência do solvente. Para tanto, amostras contendo 500 µg de espilantol (grupo C) e 1 mg de extrato (grupo D) foram colocadas em frascos de vidro transparentes e expostas a duas situações:

Grupos C1 e D1) presença de ar e ausência de luz;

Grupos C2 e D2) presença de ar e luz;

Nos tempos 2, 5, 7 e 9 dias, as amostras foram solubilizadas com MeOH HPLC, formando soluções de espilantol a 100 µg/mL e de extrato a 500 µg/mL, filtradas em membrana PTFE e analisadas por CLUP-ESI-EM.

4.7 Ensaios de atividade farmacológica

4.7.1 Avaliação das atividades leishmanicida e tripanocida

A avaliação *in vitro* das atividades leishmanicida e tripanocida intracelulares foi realizada junto com a Dr^a Milene Hoehr de Moraes, no Laboratório de Protozoologia, sob a supervisão do Prof. Dr. Mário Steindel, do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC.

Empregou-se a linhagem de células de leucemia monocítica humana aguda (THP-1) cultivada em meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol (Sigma Aldrich, St. Louis), pH 7,4 suplementado com 10% (v/v) de SBF, tampão HEPES (12,5 mM), Glutamax® (2 mM), piruvato de sódio (1mM) penicilina (100 U/mL) (Gibco, BRL) , mantida em uma incubadora a 37 °C e atmosfera umidificada com 5% de CO₂.

Para a triagem leishmanicida das amostras, utilizaram-se formas amastigotas de *L. braziliensis* expressando a enzima β-galactosidase obtidas a partir de promastigotas (MHOM/BR/96/LSC96-H3). Para tanto, após quatro dias de cultivo (em meio Schneider, pH 7,4 suplementado com 5% de SBF, 2% de urina, 10 µg/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina), as promastigotas na fase estacionária foram semeadas e a suspensão celular foi mantida a 34°C por 72 h para diferenciação. Após quatro dias de cultivo, a cultura foi lavada com solução tamponada com fosfato, pH 7,4 (PBS) e incubada em meio RPMI-1640 suplementado com soro humano AB+ (10%) inativado por calor durante 60 min a 34 °C para a opsonização do parasito. As células THP-1 foram infectadas com amastigotas de *L. braziliensis* na

proporção parasitos: célula de 10:1, durante três horas (34 °C; 5% de CO₂).

Para a triagem da atividade tripanocida, tripomastigotas expressando β-galactosidase, derivadas de culturas obtidas a partir de linhagem celular L929 infectadas, foram usadas para infectar células THP-1 diferenciadas (4,0x10⁴ células/cavidade) em microplacas de 96 cavidades, numa proporção de parasito: célula de 3:1 e incubadas durante a noite a 37 °C com 5% de CO₂. O meio contendo parasitos não internalizados foi removido e substituído por 180 µL de meio fresco.

As amostras testadas foram solubilizadas em DMSO e diluídas em meio de cultura (50 µg/mL para os extratos e 50 µM para as substâncias isoladas). As células infectadas foram tratadas, em triplicata, com 20 µL das amostras e foram cultivadas por 48 h (34°C; 5% de CO₂). O sobrenadante foi removido e acrescentado 250 µL de SBF contendo CPRG (100 µM) e NP (v/v). A reação foi desenvolvida durante 16 h a 37°C e as placas foram lidas, em triplicata, a 630 nm, em espectrofotômetro Tecan® modelo *Infinite* M200. Os resultados foram expressos em porcentagens de inibição em relação aos controles não tratados.

A anfotericina B (1 µM) e o benznidazol (15 µM) foram utilizados como controle positivo para as atividades leishmanicida e tripanocida, respectivamente. DMSO 1% foi empregado como controle negativo. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Também foi feita a avaliação da potencial atividade *in vitro* das alcamidas AC1, AC2, AC3 e AC4, frente à *Trypanosoma brucei rodhesiense* (*Tbr*), protozoário causador da Tripanossomíase Africana (doença do Sono). Este ensaio foi realizado no Instituto Suíço de Saúde Pública e Tropical (THP) pelo MSc. Marcel Kaiser, em parceria com o Prof. Dr. Thomas Schmidt, da Universidade de Münster (Alemanha).

Para este ensaio, foi o Meio Essencial Mínimo com sais de Earle (50 µL) suplementado com 0,2 mM de 2-mercapto-etanol, 1 mM de Na-piruvato e 15% de soro de cavalo inativado por calor, foi adicionado a todas 96 cavidades da microplaca de diluição. Diluições seriadas foram preparadas por adição de 25 µL do meio completo contendo 540 µg/mL (6 x a concentração inicial), cobrindo assim uma faixa de 90 a 0,123 µg/mL. Em seguida, foram adicionadas 10⁴ formas sanguíneas de *Tbr* STIB 900 em 50 µL do meio e a microplaca foi incubada a 37 °C, sob atmosfera de CO₂, a 5%, por 72 horas. Na sequência adicionou-se a solução de Alamar blue (10 µL, 12,5 mg dissolvida em 100 mL de água destilada) e a incubação continuou por mais 2 – 4 h.

As microplacas de diluição foram lidas em um fluorômetro de microplacas Spectramax Gemini XS usando um comprimento de onda de excitação de 536 nm e de emissão de 588 nm. O desenvolvimento da fluorescência foi medido e expresso como porcentagem do controle positivo. Os dados foram transferidos para o software gráfico Softmax Pro (Molecular Devices) que calculou os valores de CI_{50} . O melarsoprol, cedido gentilmente pela OMS, foi utilizado como controle positivo. O experimento foi realizado em triplicata.

4.7.2 Avaliação da atividade antiplasmódica

A avaliação *in vitro* da atividade antiplasmódica frente à *Plasmodium falciparum* também foi realizada em parceria com o Prof. Dr. Thomas Schmidt, da Universidade de Münster (Alemanha) e com o MSc. Marcel Kaiser, do THP, Suíça. A atividade foi determinada utilizando a cepa K1 de *P. falciparum* (resistente à cloroquina e pirimetamina). Eritrócitos humanos infectados (parasitemia final e hematócrito estavam em 0,3% e 1,25%, respectivamente), em meio RPMI-1640 com 5% de Albumax, foram expostos a diluições seriadas de amostras em microplacas. Após 48 h de incubação, a 37 °C e em atmosfera reduzida de oxigênio, 0,5 μ Ci de 3H-hipoxantina foi adicionada a cada cavidade. As culturas foram incubadas por mais 24 h antes de serem semeadas em filtros de fibra de vidro e lavadas com água destilada. A radioatividade foi mensurada utilizando-se um cintilador líquido modelo Betaplate[®] (Wallac, Zurique, Suíça). Os resultados foram registrados como contagem por minuto (CPM) por cavidade, para cada concentração de amostra e, a partir das curvas sigmoidais de inibição, os valores de CI_{50} foram calculados.

O ensaio de citotoxicidade foi realizado seguindo-se um protocolo similar, onde mioblastos esqueléticos de ratos (células L6) foram semeados em meio RPMI 1640, suplementado com L-glutamina 2 μ M, HEPES 5,95 g/L, $NaHCO_3$ 2 g/L e 10% de SBF, em microplacas de 96 cavidades (4.000 células/cavidade). Este ensaio foi conduzido para determinar a seletividade das amostras testadas.

Os experimentos foram realizados em triplicata. Utilizou-se a cloroquina (15 μ M) e podofilotoxina (4 μ M) como controles positivos contra a cepa de *P. falciparum* NF54 e ensaio de citotoxicidade, respectivamente.

4.7.3 Ensaio preditivo para a atividade canabimimética *in vivo*

Este ensaio foi realizado no Laboratório Experimental de Doenças Neurodegenerativas (LEXDON), vinculado ao Departamento de Farmacologia da UFSC, junto com as alunas de doutorado Katiane Roversi e Maressa Schamne, sob a orientação do Prof. Dr. Rui Prediger.

Para tanto, foram utilizados camundongos Swiss albino provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina (Florianópolis, Brasil). Os camundongos foram mantidos em caixas coletivas (42 x 34 x 17 cm), contendo 15-20 indivíduos, com condição controlada de temperatura (23 ± 2 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 h, fase clara das 7:00 às 19:00). Água e ração especial para roedores foram providas *ad libitum*. Todos os procedimentos experimentais utilizados no presente estudo foram conduzidos cuidadosamente de acordo com as normas do Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC PP00551-23080.037860/2010-31), que segue normas internacionais de utilização de animais para pesquisa científica.

Foram utilizadas duas vias de administração: intraperitoneal (i.p.) e intracerebroventricular (i.c.v.).

Por i.p., o espilantol foi administrado nas doses 4, 8 e 16 mg/kg e o controle positivo foi a substância WIN55212-2 (agonista dos receptores CB₁/CB₂) a 3 mg/kg, todos solubilizados em solução salina, que foi utilizada como controle negativo. Todas as amostras foram realizadas em seis replicatas.

Devido à lipofilicidade do espilantol e para evitar a atividade metabolizante do fígado, também foi utilizada a via de administração i.c.v., segundo a metodologia *freehand* (PAMPLONA et al., 2012). As doses administradas foram: espilantol (100, 200 e 400 µmol/ 2 µL) e solução salina (2 µL). Neste experimento não foi utilizado o WIN55212-2.

A avaliação da atividade canabimimética, também conhecida por teste da tétrede canabinoide, em camundongos foi realizada através de testes comportamentais: campo aberto; catalepsia; placa quente e temperatura retal (FRIDE et al., 2006), em grupos independentes de animais. Os parâmetros foram avaliados logo após os tratamentos.

Campo aberto: a locomoção foi avaliada em campo aberto (30 x 30 x 15 cm) construído em acrílico transparente, com o assoalho pintado de preto e dividido em 9 quadrantes de 10 x 10 cm, localizado em uma sala isolada, sendo a visualização feita através de vídeo. Os animais foram avaliados por 5 min (movimentação livre) e o número de

cruzamento nas linhas, que demarcam os quadrantes, foi utilizado como parâmetro da atividade locomotora.

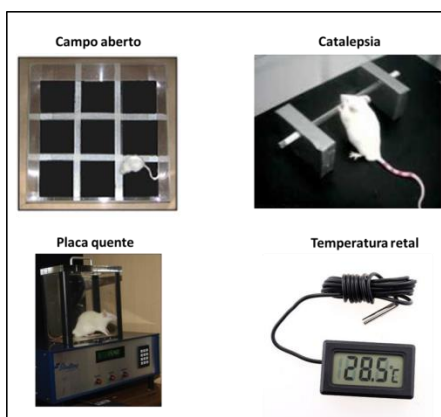
Catalepsia: foi avaliada utilizando-se uma barra de vidro posicionada horizontalmente a 5 cm do chão. Os animais foram posicionados individualmente com as patas dianteiras apoiadas na barra horizontal, de modo a permanecerem em posição vertical ereta, apoiados com a porção distal do corpo e as patas sobre a bancada. Foram realizadas três reconduções a esta posição. A média do tempo de imobilidade das três reconduções foi utilizada como parâmetro de catalepsia.

Placa quente: a nocicepção foi avaliada em placa quente (Insight, Brasil), ajustada para uma temperatura de $56 \pm 0,5$ °C, estabilizada pelo menos 30 min antes dos experimentos. Após essa etapa, os animais foram colocados individualmente na placa quente e a latência para lambida da pata traseira foi utilizada como parâmetro nociceptivo.

Temperatura retal: a temperatura corporal foi avaliada por um termômetro digital (Cole-Parmer, modelo 8402-00) acoplado a uma sonda retal apropriada para uso em camundongos. A sonda foi lubrificada com vaselina e introduzida cerca de 30 mm no reto dos animais. A temperatura foi registrada quando se manteve estável por pelo menos 10 s. O registro da temperatura foi realizado 1 h antes e 15 min após a administração i.p.

Uma ilustração dos testes está representada na figura 15.

Figura 15 - Representação dos testes comportamentais constituintes do teste de atividade canabimimética



4.8 Levantamento de patentes existentes para o espilantol

A pesquisa por patentes contendo a substância espilantol foi realizada nas bases de patentes PATENTSCOPE (*World Intellectual Property Organization – WIPO*) e Espacenet (*European Patent Office – EPO*), selecionadas por serem as bases de dados de patentes mais completas.

Nas bases de dados, a palavra selecionada foi “spilanthol” com o operador truncador (*) – “spilanthol*”. O período da pesquisa foi delimitado aos pedidos de patente apresentados de 31 de dezembro de 1996 a 31 de dezembro de 2016. Na base de dados PATENTSCOPE, a busca aconteceu no título, resumo e texto completo, já para a Espacenet, foi apenas no título e resumo.

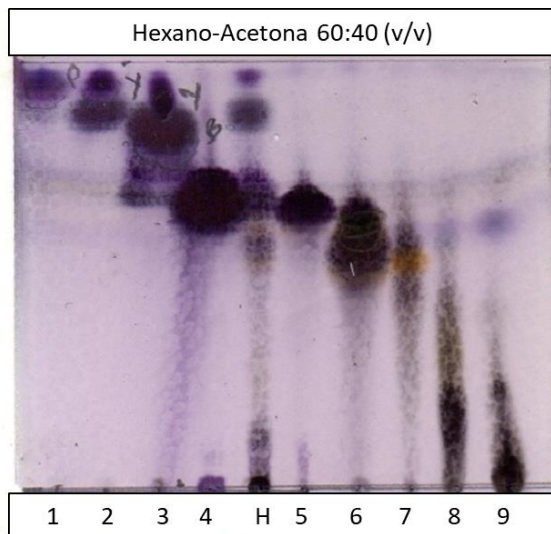
Para todas as patentes foram observados os seguintes aspectos: Número e data do depósito; título; resumo; depositante e foco tecnológico. Após análise, as patentes foram categorizadas de acordo com a utilização tecnológica do espilantol.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Isolamento e purificação das alcanidas

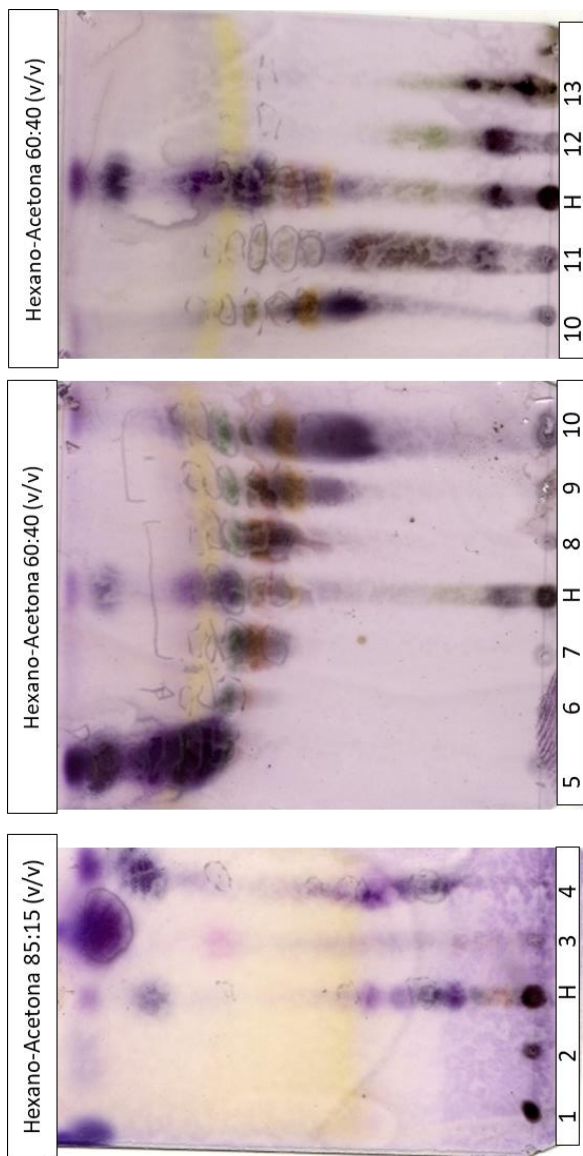
As subfrações derivadas do fracionamento preliminar por CLV das frações hexano dos extratos EA1 e EA2, escolhidas através do perfil cromatográfico por CCD (Figura 16 e Figura 17, respectivamente), foram submetidas a consecutivos processos de fracionamento cromatográficos, conforme descrito nos itens 4.4.5 e 4.4.6 e apresentado nos Apêndices 1 e 2. Através desses procedimentos, foi possível isolar e caracterizar 5 alcanidas. Devido a similaridade observada por CCD, fez-se a junção das subfrações 4 e 5 (4/5), 7 e 8 (7/8) e 9 e 10 (9/10) do EA2.

Figura 16 - Perfil observado por CCD das sub-frações obtidas por CLV de EA1.



H = fração hexano; revelador: sol. de anisaldeído sulfúrico

Figura 17 – Perfil observado por CCD das sub-frações obtidas por CLV de EA2.



H = fração hexano; revelador: sol. de anisaldeído sulfúrico

5.2 Estudos de desreplicação por CLUP-IES-EM/EM e de elucidação estrutural das alcamidas de *A. ciliata*

Desreplicação é uma técnica rápida de identificação simultânea de substâncias orgânicas conhecidas, ou não, em extratos brutos ou frações, antes do isolamento. Este processo visa o uso eficiente dos recursos; geralmente limitados, caros ou tóxicos; pois evita a necessidade do reisolamento para a identificação de substâncias já conhecidas. Mas normalmente este método demanda esforços, porque os metabolitos secundários ocorrem em uma ampla gama de concentração, ao mesmo tempo com enormes variações nas propriedades químicas e físicas. Portanto, são necessários métodos analíticos confiáveis, robustos e seletivos para identificar metabolitos secundários em misturas complexas. As estratégias utilizadas na desreplicação de amostras ativas são muitas e, normalmente incluem informações taxonômicas, bem como dados analíticos obtidos de diversas técnicas cromatográficas e espectroscópicas (YULIANA et al., 2011; TAWFIKE et al., 2013).

A técnica de Espectrometria de Massas de Alta Resolução (EMAR) é uma das ferramentas mais utilizadas, devido à sua velocidade e capacidade de acoplamento com os métodos de separação cromatográfica (CHEN et al., 2007). Além disso, proporciona a identificação de substâncias presentes em baixíssima concentração ou que coeluem com outros compostos, devido à sua grande sensibilidade e habilidade em selecionar os analitos por suas massas, o que não é possível com os detectores de UV (SPELMAN et al., 2009). Dessa maneira, a utilização de um sistema CLUP-IES-EMAR torna-se uma poderosa ferramenta de desreplicação, pois combina a alta eficiência de separação do CLUP com a aquisição de massas com alta resolução a partir do IES-EMAR, permitindo a caracterização individual de substâncias em matrizes complexas, como os extratos brutos (VAN DER HOOFT et al., 2011).

As informações das massas moleculares, bem como as informações estruturais que são deduzidas a partir dos padrões de fragmentação das substâncias, são utilizadas como pontos de partida no processo de desreplicação, acelerando o processo de caracterização do extrato bruto (KONISHI et al., 2007).

Desta maneira, o extrato bruto (EA2) foi submetido à desreplicação por análise de CLUP-IES-EMAR para a identificação das alcamidas presentes em *A. ciliata*. O extrato mostrou-se sensível ao modo de ionização positivo, pois as alcamidas são facilmente

protonáveis, por possuírem nitrogênio. Por se tratar de um sistema combinado, o espectro de massas é obtido em paralelo ao cromatograma. As Figuras 18, 19 e 20 apresentam os cromatogramas íon de pico base (BPI), com variados íons de diferentes razões de m/z , do extrato bruto etanólico, fração hexano e extrato em hexano, respectivamente.

Figura 18 – Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) do extrato bruto de *Acmella ciliata* obtido a partir da análise por CLUE-ESI-EMEM no modo de ionização positivo.

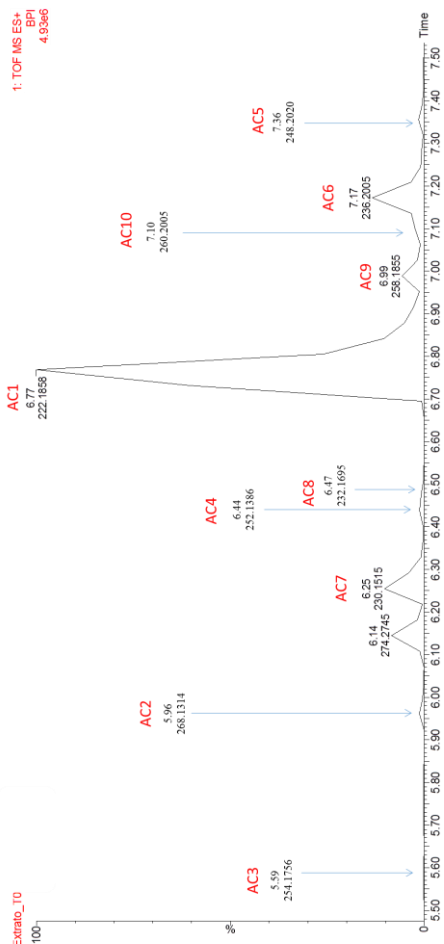


Figura 19 – Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) da fração hexano de *Acmella ciliata* obtido a partir da análise por CLUE-ESI-EMEM no modo de ionização positivo

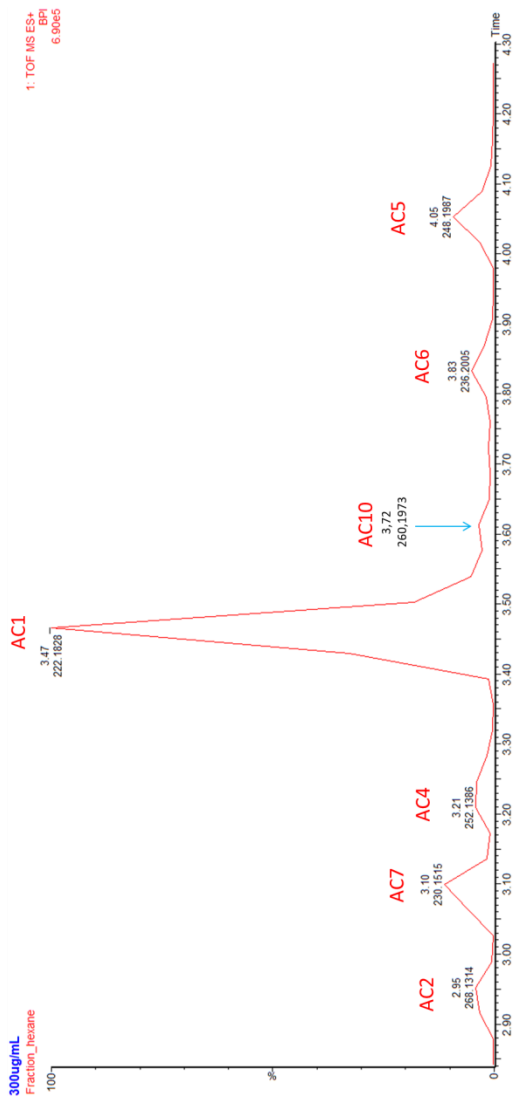
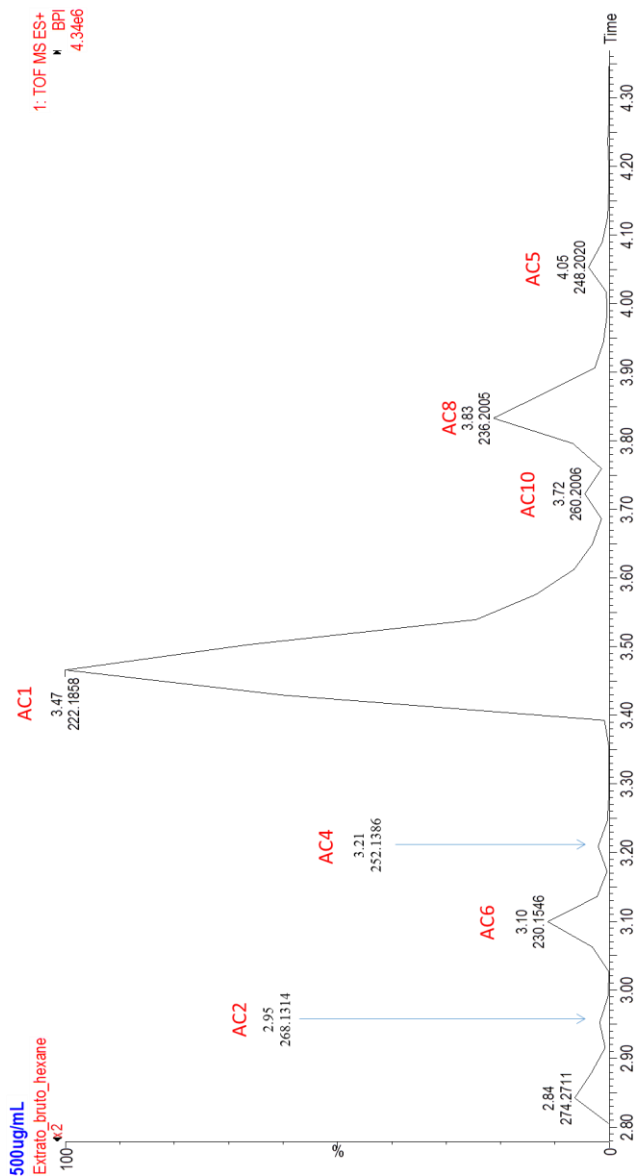
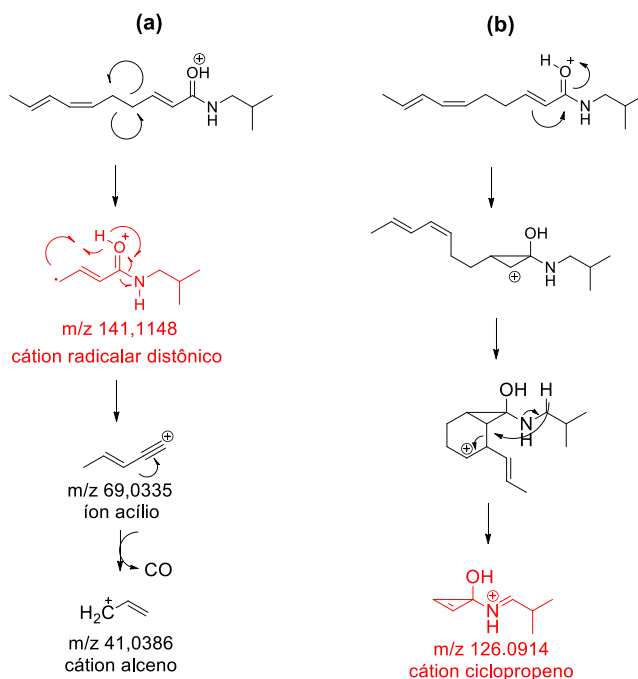


Figura 20 – Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) do extrato em hexano de *Acmella ciliata* obtido a partir da análise por CLUE-ESI-EMEM no modo de ionização positivo.



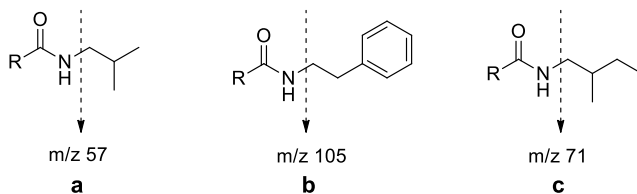
Segundo Hiserodt e colaboradores (2004), as alcanidas (*2E,6Z*) insaturadas fragmentam-se de maneira característica para formar um cátion radicalar distônico, por clivagem homolítica (Figura 21a), e um cátion ciclopropeno, por um mecanismo de carga induzida (Figura 21b). O cátion radicalar distônico sofre fragmentações subsequentes, formando um íon acílio, que posteriormente perde CO para formar um cátion alceno.

Figura 21 – (a) Mecanismo de formação do cátion radicalar distônico. (b) Mecanismo de formação do cátion ciclopropeno. Espilantol utilizado como modelo. Adaptado de (HISERODT et al., 2004).



Além desses dois mecanismos, as alcanidas também apresentam padrões característicos de fragmentação dependendo do grupamento da porção amina: resíduo (a) isobutílica; (b) fenilética e (c) metilbutílica (Figura 22) (BOONEN et al., 2012).

Figura 22 – Fragmentos característicos da porção amina das alcamidas do gênero *Acmella*



A caracterização estrutural das substâncias isoladas também foi realizada através da interpretação dos dados espectrais de RMN de ^1H e de ^{13}C , incluindo experimentos bidimensionais como COSY, HSQC e HMBC, comparando com dados da literatura, principalmente, nos trabalhos desenvolvidos por Martin e Becker (1984 e 1985), que identificaram 19 alcamidas de *A. ciliata* (MARTIN; BECKER, 1984; MARTIN; BECKER, 1985) e em outros trabalhos sobre alcamidas isoladas da família Asteraceae (GREGER et al., 1985; BAUER et al., 1989; GREGER; HOFER, 1989; CHRISTENSEN; LAM, 1991; NAKATANI; NAGASHIMA, 1992; MOLINA-TORRES et al., 1996; RAMSEWAK et al., 1999; SAADALI et al., 2001; CASADO et al., 2009; MARTÍNEZ et al., 2011; DEVKOTA et al., 2013; SIMAS et al., 2013).

Através da comparação dos íons moleculares e padrões de fragmentação EM/EM do extrato bruto etanólico, sua fração hexânica e do extrato em hexano, com valores da literatura, foi possível identificar 10 alcamidas (AC1 – AC10) em *A. ciliata*. Das quais, 5 (AC1 – AC5) foram isoladas e tiveram as suas estruturas estabelecidas pelas por RMN.

5.2.1 (2E,6Z,8E)-N-isobutil-2,6,8-decatrienamida (AC1) (espilantol)

Como esperado, a alcamida mais abundante, no extrato bruto, fração hexano e extrato hexano, tinha 4 insaturações e a massa correspondente ao íon molecular protonado (m/z 222,1858) (AC1), consistente com o valor calculado para a fórmula molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{NO}$, que é referente à conhecida substância (2E,6Z,8E)-N-isobutil-2,6,8-decatrienamida (espilantol).

Através do experimento de EM/EM (Figura 24), no modo positivo, foi possível identificar os fragmentos: 141,1152 (cátion radicalar distônico); 81,0708 (íon formado através da clivagem entre C-4 e C-5); 126,0914 (cátion ciclopenteno) e 98,0608 (formado pela perda do radical isobutil e da clivagem entre C-5 e C-6), consistentes com a estrutura do espilantol. O íon 126,0914 apresentou-se com maior intensidade no espectro EM/EM, sendo considerado o pico base, sugerindo ser a fragmentação mais favorável energeticamente. Os mecanismos de formação desses íons estão apresentados na Figura 23 e são consistentes com aqueles já publicados para o espilantol (BOONEN, et al., 2010b).

Figura 23 – Proposta de mecanismos de fragmentação do espilantol.

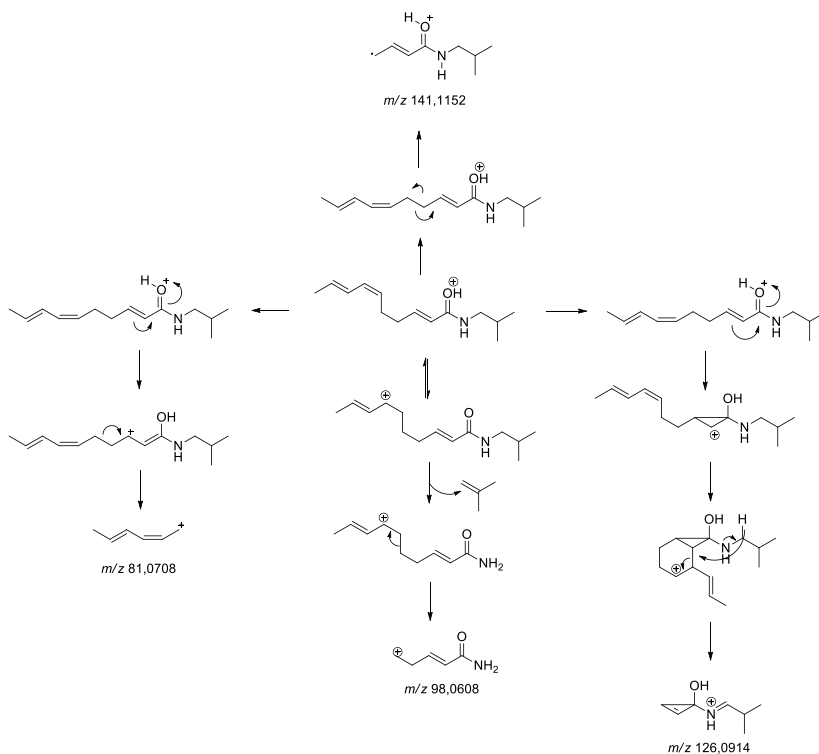
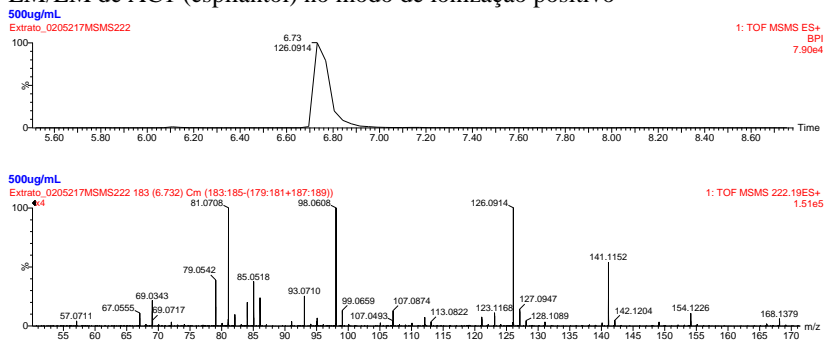


Figura 24 – Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) e espectro ESI-EM/EM de AC1 (espilantol) no modo de ionização positivo



Para a obtenção absoluta da estrutura, **AC1** (233,3 mg) foi isolado a partir da fração hexano (EA1 e EA2) na forma de óleo verde claro. Através da análise por CCD, empregando-se o sistema eluente composto por hexano-acetona 60:40 (v/v) observou-se uma mancha, que ficou roxa a marrom após a reação com o reagente cromogênico solução de anisaldeído sulfúrico, sob aquecimento. Além disso, essa substância apresentou fraca extinção de fluorescência sob luz UV em 254 nm, mas não apresentou fluorescência no comprimento de onda 366 nm.

A análise do espectro de RMN ^1H em acetona- d_6 (Figura 25) mostrou doze sinais, incluindo um sinal duplo-duplo duplete ressonando em δ_H 6,77 (1H, $J = 15,3; 6,9$ e 6,7) e um duplo-triplete em δ_H 6,06 (1H, $J = 15,3$ e 1,5), indicativos de ligação dupla com configuração *E*, sendo atribuídos aos hidrogênios H-3 e H-2, respectivamente (Figura 26).

Figura 25 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, TMS, acetona- d_6) da substância AC1 (espilantol).

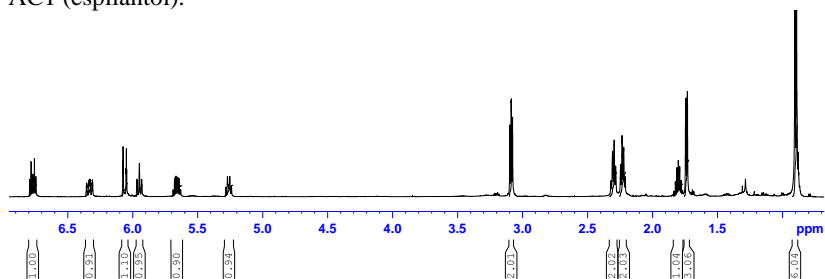
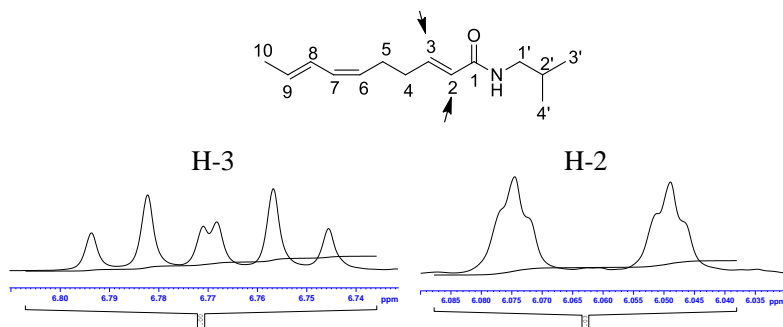
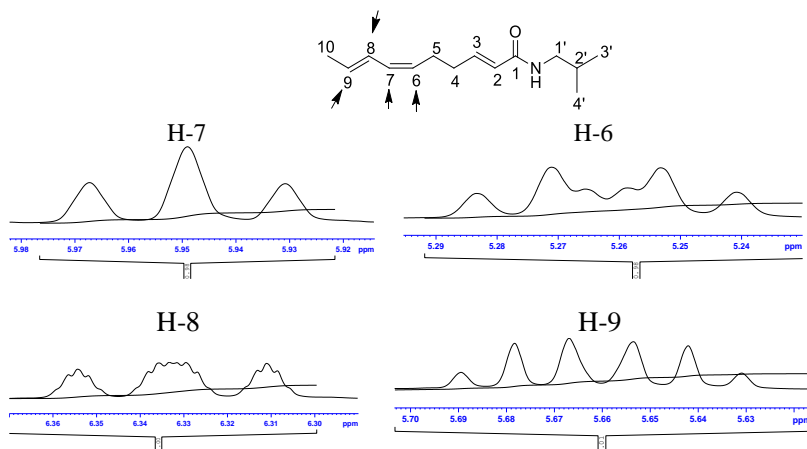


Figura 26 – Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância AC1 (espilantol) ampliado na região entre δ_{H} 6,03 e δ_{H} 6,80.



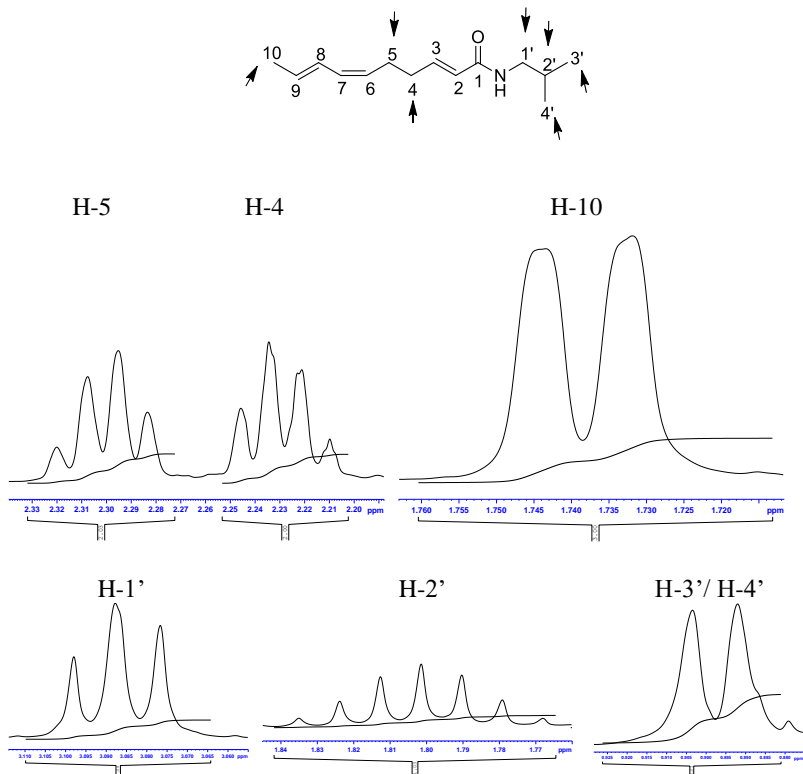
Foram observados outros dois pares de sinais característicos de hidrogênios ligados a carbonos olefínicos, sendo: um duplo-duplo duplete ressonando em δ_{H} 5,26 ($J = 11,0$; 7,4 e 7,4; H-6), um duplo-duplete em δ_{H} 5,95 ($J = 11,0$; 10,9; H-7), formando uma ligação dupla com configuração *Z*, e um duplo-duplete largo em δ_{H} 6,33 ($J = 15,0$ e 10,9; H-8) e um duplo-duplete largo em δ_{H} 5,66 ($J = 15,0$ e 6,8; H-9), indicativos de outra ligação dupla com configuração *E*. O alargamento observado no sinal de H-8 deve-se ao efeito causado pelo acoplamento alílico com H-7 (Figuras 27).

Figura 27 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância AC1 de ampliado na região entre δ_{H} 5,20 e δ_{H} 6,35.



Os multipletos ressonando entre δ_H 2,20 - 2,25 e 2,28 - 2,33 foram atribuídos aos hidrogênios alílicos (H-4 e H-5). O duplete em δ_H 1,74 (3H; H-10; $J = 6,8$) indica a presença de um grupo metila terminal ligado ao carbono 9 e próximo ao carbono olefínico C-8. Os sinais em δ_H 3,14 (2H, H-1'; $dd, J = 6,8$ e 6,1), δ_H 1,77 - 1,84 (1H, H-2', m) e δ_H 0,92 (6H, H-3' e H-4'; $d, J = 6,8$) são característicos do núcleo isobutilamida da porção amina (Figura 28).

Figura 28 - Espectro de RMN de 1H (600 MHz, TMS, acetona- d_6) para a substância AC1 de ampliado na região entre δ_H 0,88 e δ_H 3,15.



As atribuições dos valores de ^{13}C RMN tiveram como base as informações obtidas através dos mapas de correlações HSQC (Figura 29) e HMBC (Figura 30). Esses experimentos mostraram que a estrutura apresenta 14 sinais, incluindo uma carbonila (δ_C 166,0), seis carbonos

olefínicos (δ_C 125,3; 127,3; 128,1; 129,6; 129,9 e 142,3), dois carbonos metilênicos sp^3 (δ_C 26,8 e 32,2) um carbono terciário sp^3 (δ_C 28,9) e três metilas terminais (δ_C 18,0; 20,1 e 20,1).

As correlações a longa distância 1H - ^{13}C apresentadas no mapa de correlação HMBC permitiram estabelecer a conectividade entre os átomos da molécula e demonstraram a presença de um grupo amida α,β -insaturado, consistente com as estruturas das alcamidas do gênero *Acmella*.

Os dados obtidos para a substância AC1 foram comparados com os dados reportados por Nakatani & Nagashima (1992) para o espilantol. Os dados estão descritos na Tabela 10.

Figura 29 - Mapa de correlação HSQC (600 MHz 1H e 150 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para a substância AC1 (espilantol).

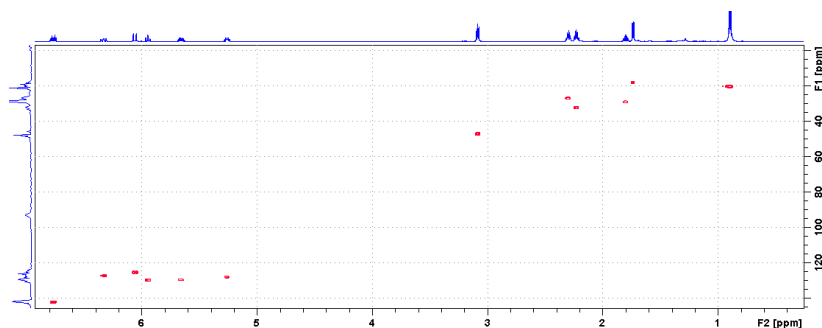


Figura 30 - Mapa de correlação HMBC (600 MHz 1H e 150 MHz ^{13}C , TMS, acetona- d_6) para a substância AC1 (espilantol).

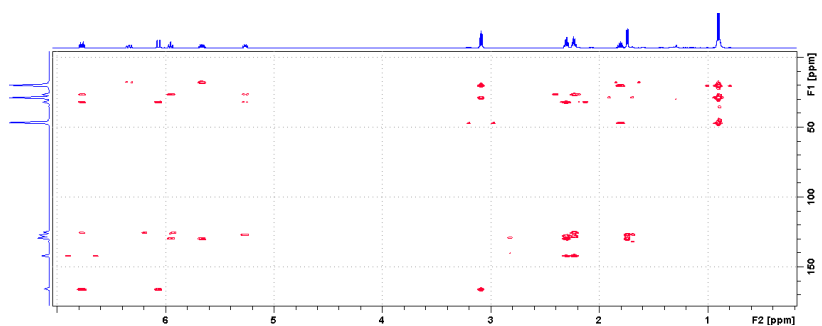


Tabela 10 - Dados de RMN ^1H e ^{13}C para a substância AC1 (espilantol) e dados comparativos da literatura.

Posição	(Nakatani; Nagashima, 1992)			
	AC1 $\delta^1\text{H}$ (mult., J Hz) 600 MHz, acetona-d6	$\delta^{13}\text{C}$ 150 MHz, acetona-d6	$\delta^1\text{H}$ (mult., J Hz) 400 MHz, CDCl_3	$\delta^{13}\text{C}^c$ 100 MHz, CDCl_3
1		166,0		166,0
2	6,06 <i>dt</i> (15,3 e 1,5)	125,3	5,79 <i>br d</i> (15)	124,2
3	6,77 <i>ddd</i> (15,3; 6,9 e 6,7)	142,3	6,83 <i>dt</i> (15, 7)	143,5
4	2,20 – 2,25 <i>m</i>	32,2	2,23 <i>m</i> 2,35 <i>m</i>	32,1
5	2,28 – 2,33 <i>m</i>	26,8	2,23 <i>m</i> 2,35 <i>m</i>	26,4
6	5,26 <i>ddd</i> (11,0; 7,4 e 7,4)	128,1	5,26 <i>dt</i> (11 e 7)	127,7
7	5,95 <i>dd</i> (11,0 e 10,9)	129,9	5,97 <i>dd</i> (11 e 11)	129,7
8	6,33 <i>brdd</i> (15,0 e 10,9)	127,3	6,29 <i>brdd</i> (15 e 11)	126,7
9	5,66 <i>dq</i> (15,0 e 6,8)	129,6	5,70 <i>dq</i> (15 e 7)	130,0
10	1,74 <i>d</i> (6,7)	18,0	1,78 <i>d</i> (7)	18,3
1'	3,14 <i>dd</i> (6,8 e 6,1)	46,9	3,15 <i>dd</i> (7 e 6)	46,9
2'	1,77 – 1,84 <i>m</i>	28,9	1,78 <i>m</i>	28,6
3', 4'	0,92 <i>d</i> (6,8)	20,1	0,93 <i>d</i> (7)	20,1

A isobutilamida espilantol apresenta a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{23}\text{NO}$, de peso molecular calculado 221,1779 g/mol e índice de insaturação de 4 (YASUDA et al., 1980; MARTIN; BECKER, 1984; MARTIN; BECKER, 1985; NAKATANI; NAGASHIMA, 1992; RAMSEWAK et al., 1999). Como já descrito no item 2.4.1, o espilantol é uma das alcaloides mais reportadas na literatura e apresenta grande importância tecnológica e medicinal.

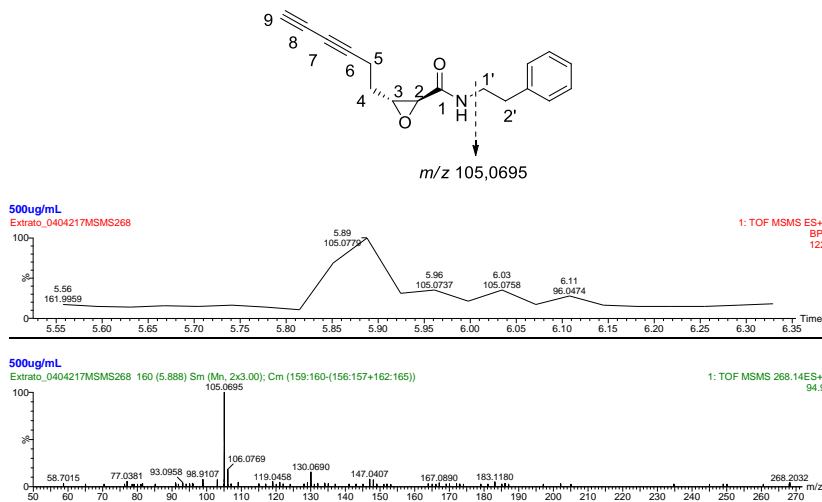
5.2.2 2,3-epoxi-N-feniletilamida-6,8-nonodiinamida (AC2)

O íon pseudomolecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 268,1314 foi detectado tanto no extrato hexanânico, quanto no extrato bruto etanólico e sua fração hexano. Essa massa é consistente ao valor calculado para fórmula

molecular $C_{17}H_{18}NO_2$, feniletilcamida já isolada de *A. ciliata* (MARTIN; BECKER, 1985).

O espectro EM/EM de AC2 apresentou como pico base o fragmento m/z 105,0695, que é referente ao resíduo feniletil (Figura 31).

Figura 31 – Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) e espectro ESI-EM/EM de AC2 no modo de ionização positivo.



A feniletilcamida **AC2** (13,7 mg) foi isolada da fração hexanânica de EA1 na forma de óleo amarelo claro. Através da análise por CCD, empregando-se o sistema eluente composto por hexano-acetona 60:40 (V/V) observou-se uma mancha, que apresentou extinção de fluorescência sob luz UV em 254 nm, mas não apresentou fluorescência no comprimento de onda 366 nm. Além disso, após reação com a solução de anisaldeído sulfúrico, sob aquecimento, a substância desenvolveu coloração alaranjada.

A análise do espectro de RMN 1H em $CDCl_3$ (Figura 32) mostrou sinais característicos de anel aromático ressonando em δ_H 7,29 – 7,34 (*m*) (2H), 7,22 - 7,27 (*m*) (1H) e 7,17 – 7,20 (*m*) (2H) (Figura 33) e de hidrogênios metilênicos ressonando em δ_H 3,51 (*ddd*, $J = 13,5; 6,8$ e $5,5$ Hz; H-1') e 3,68 ppm (*ddd*, $J = 13,5; 7,5$ e $6,8$ Hz; H-1') (Figura 34). Esses hidrogênios apresentaram correlação direta,

observada através do mapa de correlação HSQC (Figura 35 e Figura 36), com o carbono δ_C 39,8 (C-1) e correlação a longa distância, verificada no mapa de correlação HMBC (Figura 37), com o carbono δ_C 166,8 (C-1), típico de carbonila.

Figura 32 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, TMS, CDCl_3) da substância AC2.

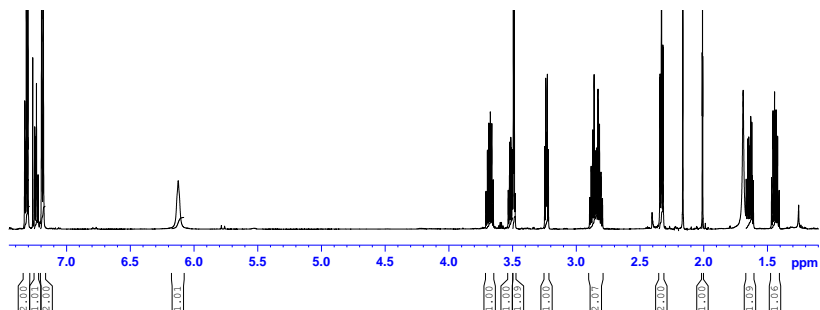


Figura 33 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, TMS, CDCl_3) da substância AC2 ampliado na região entre δ_H 7,15 e δ_H 7,37 (anel aromático).

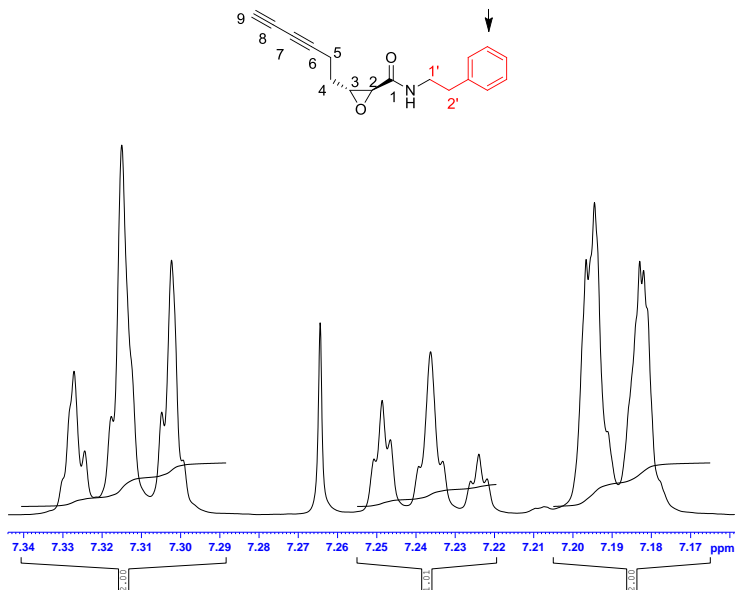


Figura 34 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, TMS, CDCl_3) da substância AC2 ampliado na região entre δ_{H} 2,80 e δ_{H} 3,80.

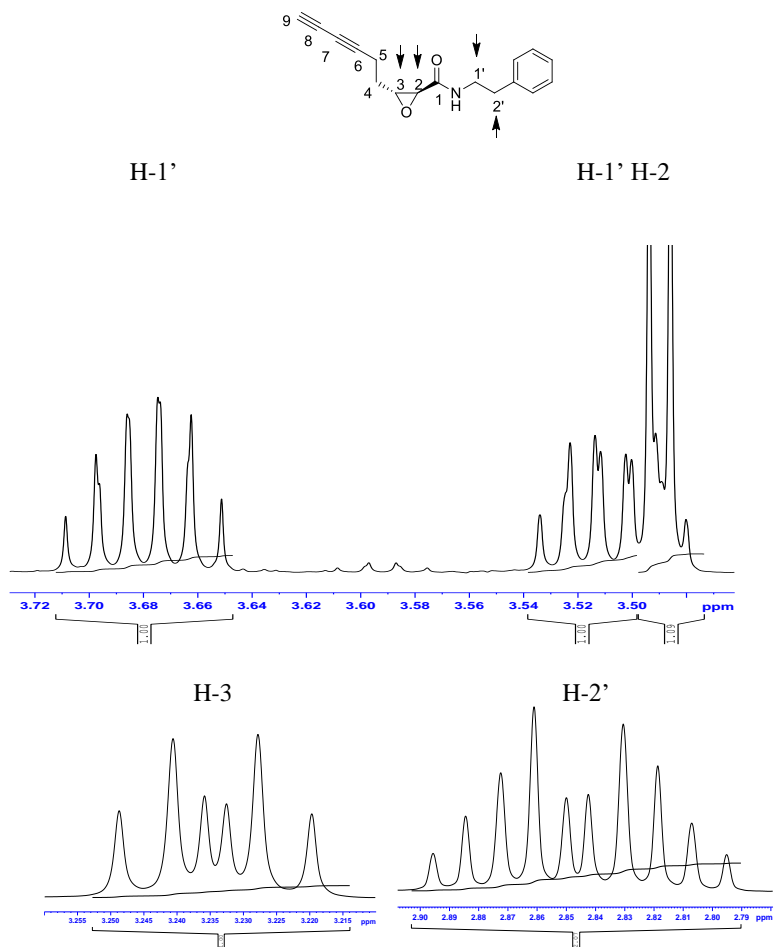


Figura 35 - Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 150 MHz ^{13}C , TMS, CDCl_3) para a substância AC2.

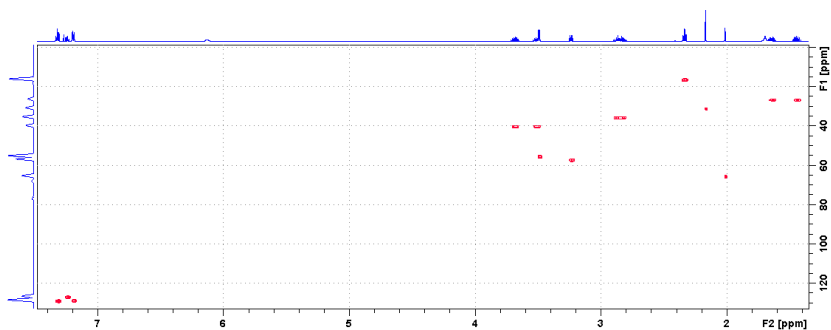


Figura 36 - Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 150 MHz ^{13}C , TMS, CDCl_3) para a substância AC2 ampliado na região entre δ_{H} 2,80 e δ_{H} 3,80.

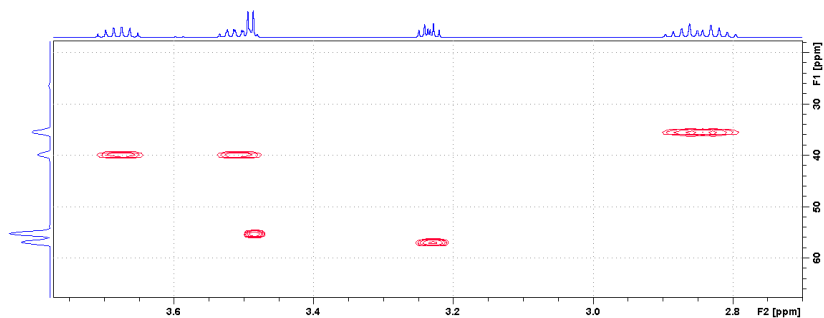
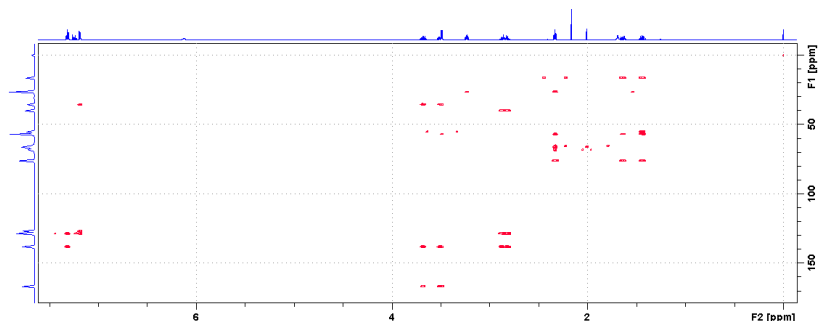


Figura 37 - Mapa de correlação HMBC (600 MHz ^1H e 150 MHz ^{13}C , TMS, CDCl_3) para a substância AC2.



Os hidrogênios metilênicos ressonando entre δ_H 2,79-2,90 ppm (*m*) (H-2') (Figura 34) correlacionaram-se com o carbono 28,6 ppm (C-2) (Figuras 35 e 36) e apresentaram correlações a longa distância com os carbonos δ_C 39,8 (C-1') e 128,8 ppm (anel aromático) (Figura 37). Esse conjunto de sinais é indicativo de grupamento feniletila, característico da porção amina das alcaloides, sendo corroborado através dos valores de ^{13}C , obtidos através da análise dos mapas de correlação HSQC (Figuras 35 e 36) e HMBC (Figura 37) e comparando com os valores de deslocamentos relatados por Martin e Becker (1985).

A ausência de sinais na região mais desblindada do espectro de RMN ^1H , entre 5,0 – 7,0 ppm, indicou que a substância AC2 não apresenta o perfil da cadeia insaturada presente na porção ácida das alcaloides olefinicas.

Os hidrogênios metínicos em δ_H 3,49 (*d*, $J = 4,7$ Hz; H-2) e 3,23 ppm (*ddd*, $J = 7,7$; 4,9 e 4,9; H-3) (Figura 34) apresentam-se desblindados, sugerindo proximidade a átomos eletronegativos, como o oxigênio. Deslocamentos químicos entre 2,5 – 3,5 ppm são indicativos da presença de um grupamento epóxido. Através do mapa de correlação HSQC foi possível verificar a presença de dois carbonos em δ_H 55,1 e 56,9 ppm (Figura 37), que estão respectivamente ligados aos hidrogênios δ_H 3,49 e δ_H 3,23, confirmando a presença de um grupamento epóxido na estrutura.

Os hidrogênios metilênicos na posição H-4, ressonando em δ_H 1,44 (*dtd*, $J = 14,3$; 7,6 e 7,0 Hz) e 1,64 ppm (*dtd*, $J = 14,3$; 7,3 e 5,0 Hz) (Figura 38), apresentam correlação direta com o carbono δ_C 26,3 (C-4) (Figura 39), e correlações a longa distância com os carbonos com deslocamento químico em δ_C 55,1 (C-2), δ_C 56,9 (C-3) e 76,0 ppm C-6) (Figura 39). Os hidrogênios metilênicos em 2,32 ppm (*ddd*, $J = 7,3$; 7,1 e 1,2; H-5) (Figura 37) estão ligados ao carbono com deslocamento em δ_C 16,3 e possuem correlações a longa distância com os carbonos δ_C 56,9 e com os carbonos das triplas ligações δ_C 65,9; δ_C 68,1 e 76,0 ppm (Figura 40). O tripleto em δ_H 2,01 ($J = 1,2$) (Figura 37) foi atribuído ao hidrogênio ligado ao carbono acetilênico (C-9) δ_C 65,5 (Figura 41), indicando a presença de um núcleo acetilênico na parte ácida da molécula.

Figura 38 - Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, TMS, CDCl_3) da substância AC2 ampliado na região entre δ_{H} 1,40 e δ_{H} 2,40.

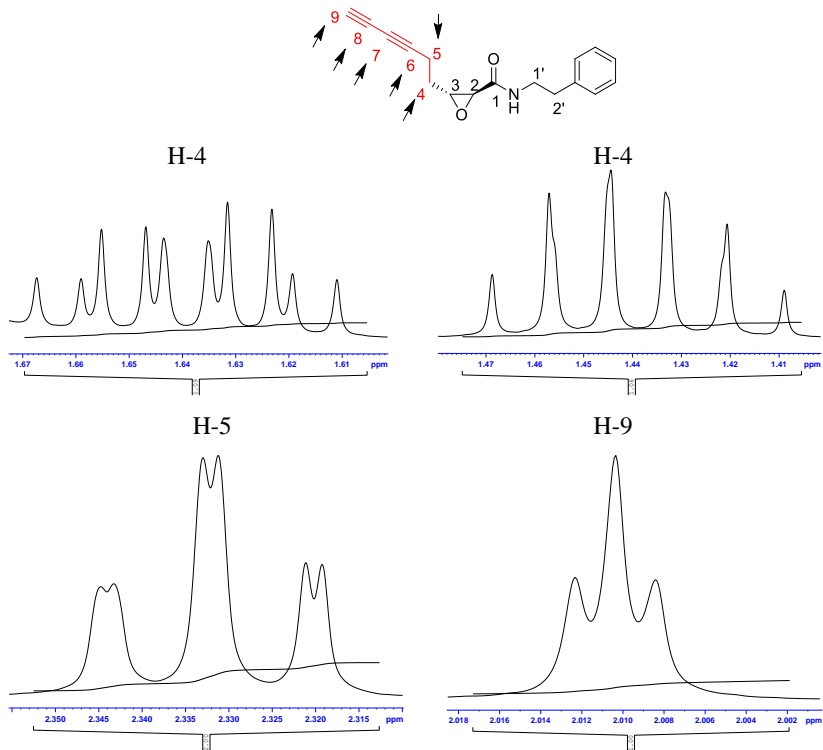


Figura 39 - Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 150 MHz ^{13}C , TMS, CDCl_3) para a substância AC2 ampliado na região entre δ_{H} 1,40 e δ_{H} 1,70.

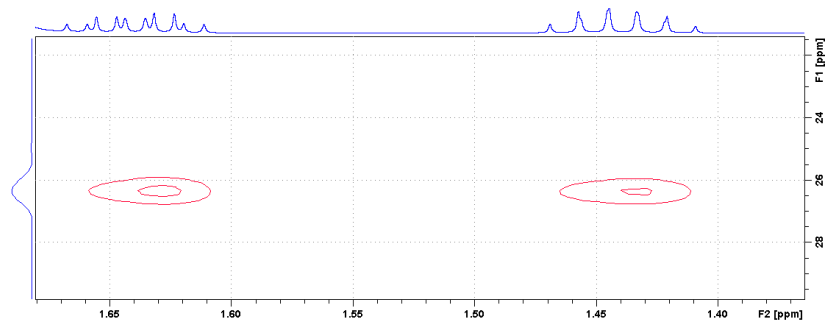


Figura 40 - Mapa de correlação HMBC (600 MHz ^1H e 150 MHz ^{13}C , TMS, CDCl_3) para a substância AC2 ampliado na região entre δ_H 1,40 e δ_H 1,70.

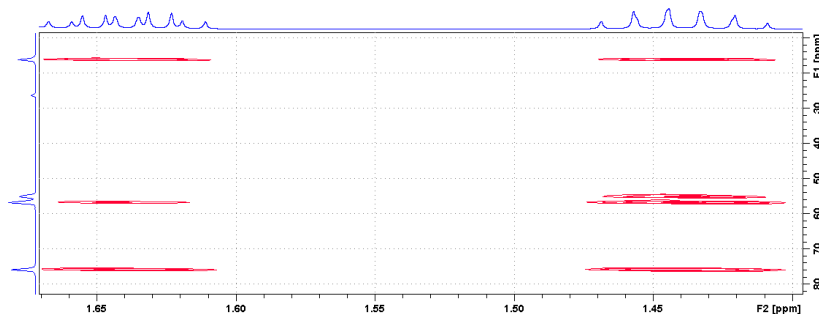
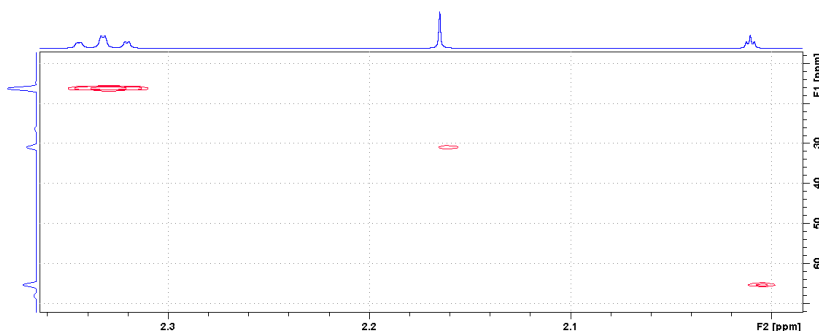


Figura 41 - Mapa de correlação HSQC (600 MHz ^1H e 150 MHz ^{13}C , TMS, CDCl_3) para a substância AC2 ampliado na região entre δ_H 2,00 e δ_H 2,35.



Comparando-se os valores dos deslocamentos químicos com os dados reportados por Martin & Becker (1985) (Tabela 11), foi possível confirmar que a substância **AC2** trata-se da feniletilamida acetilênica 2,3-epoxi-*N*-feniletilamida-6,8-nonodiamida. Esta substância apresenta a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{27}\text{NO}_2$ e peso molecular calculado 267,0 g/mol (MARTIN; BECKER, 1985).

Tabela 11 - Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN para a substância AC2 e dados comparativos da literatura.

Posição	AC2		(Martin; Beker, 1985)
	δ ^1H (mult., J Hz) (600 MHz, CDCl_3)	δ ^{13}C (150 MHz, CDCl_3)	δ ^1H (mult., J Hz) (250 MHz, CDCl_3)
1		166,8	
2	3,49 <i>d</i> (4,7)	55,1	3,51 <i>d</i> (5)
3	3,23 <i>ddd</i> (7,6; 4,9 e 4,7)	56,9	3,25 <i>ddd</i> (7,5, 5, 5)
4	1,44 <i>dtd</i> (14,3, 7,6, 7,0) 1,64 <i>dtd</i> (14,3, 7,3, 5,0)	26,3	1,43 <i>m</i> 1,65 <i>m</i>
5	2,32 <i>ddd</i> (7,3, 7,1, 1,2)	16,3	2,34 <i>ddd</i> (7, 7, 1)
6	-	76,0	-
7	-	65,9	-
8	-	68,1	-
9	2,01 <i>t</i> (1,2)	65,5	2,02 <i>t</i> (1)
1'	3,51 <i>ddd</i> (13,5, 7,1, 7,0) 3,68 <i>ddd</i> (13,5; 7,5 e 6,8)	39,8	3,51 <i>m</i> 3,69 <i>m</i>
2'	2,79-2,90 <i>m</i>	28,6	2,85 <i>m</i>
Ph	7,17 – 7,20 <i>m</i> 7,29 – 7,34 <i>m</i> 7,22 – 7,27 <i>m</i>	128,7 126,7 128,8	

5.3.3 (2E)-N-isobutil-5-(6-metil-3,6-diidro-1,2-dioxin-3-il)2-pentenamida (dioxiacmellamida) (AC3)

A substância AC3 foi detectada em pequena quantidade no extrato bruto, com tempo de retenção de 5,59 min. O íon molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 254,1756 é compatível com o valor calculado para a fórmula molecular $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{NO}_3$, com grau de instauração igual a 4. O experimento de fragmentação EM/EM (Figura 42) apresentou o íon de pico base m/z 95,0491, o íon m/z 126,0898, referente ao cátion

ciclopropeno e m/z 154,1253. Os mecanismos de formação desses fragmentos estão apresentados na Figura 43.

Figura 42 - Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) e espectro ESI-EM/EM de AC3 no modo de ionização positivo.

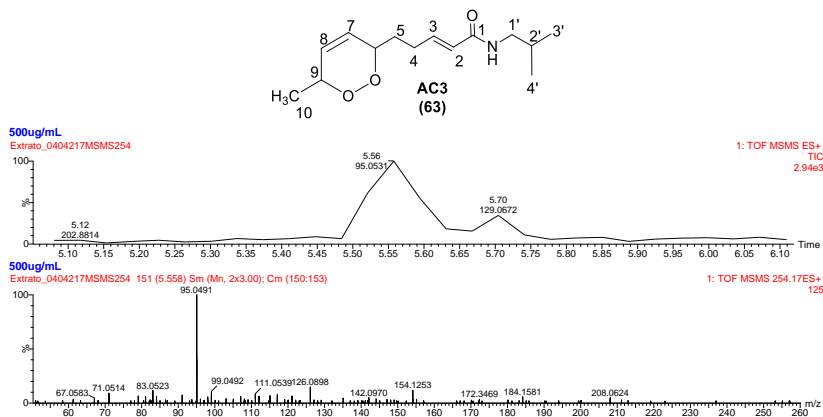
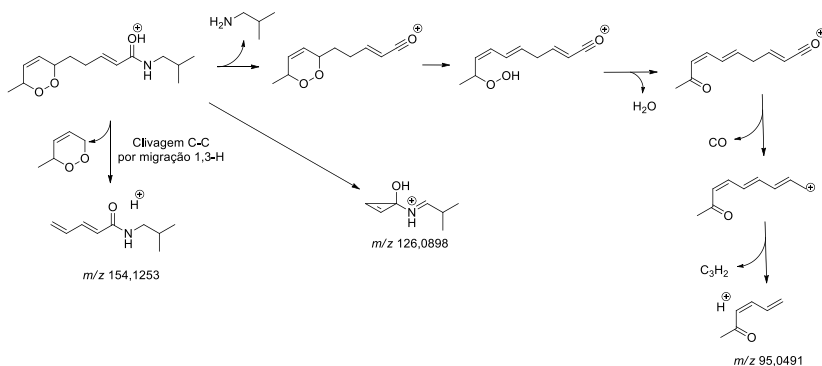


Figura 43 – Proposta de mecanismos de fragmentação de AC3.



Até 2016, não existia registro de qualquer substância de origem natural com esta fórmula molecular, indicando ser um novo composto. Os dados espectroscópicos de RMN também foram adquiridos para confirmação dessa hipótese e melhor caracterização estrutural.

A substância AC3 foi obtida na forma de óleo amarelo (33,5 mg). Através da análise por CCD, empregando-se o sistema eluente composto por hexano-acetona 60:40 (v/v) observou-se uma mancha, que ficou roxa a marrom após reação com a solução de anisaldeído sulfúrico, sob aquecimento.

O espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 (Figura 44) mostrou 13 sinais de hidrogênio, incluindo os sinais δ_H 3.12 (*dd*, $J = 6,8$ e $6,2$ Hz; H-1'), 1,73 - 1,81 ppm (*m*; H-2') e 0,90 ppm (*d*, $J = 6,7$ Hz; H-3' e H-4') (Figura 45), enquanto que o mapa de correlação HSQC (Figura 46) revelou sinais em δ 47,0 (C-1'), 28,6 (C-2') e 20,2 (C-3', C-4'), consistentes aos sinais do grupamento isobutílica encontrado na porção amina nas alcaloides, discutido para a estrutura **AC1** (*ver item 5.2.1*).

Figura 44 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância AC3.

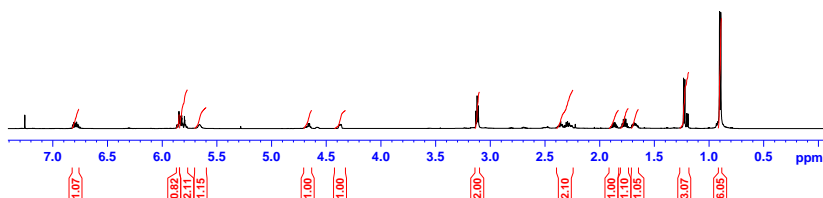


Figura 45 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância AC3 ampliado na região entre δ_H 3,2 e δ_H 0,85.

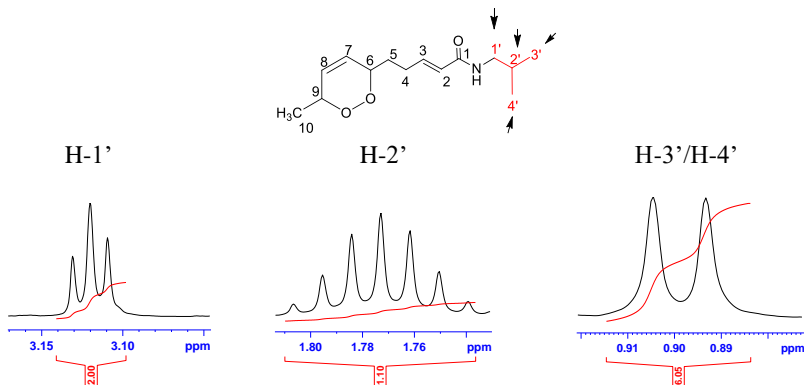
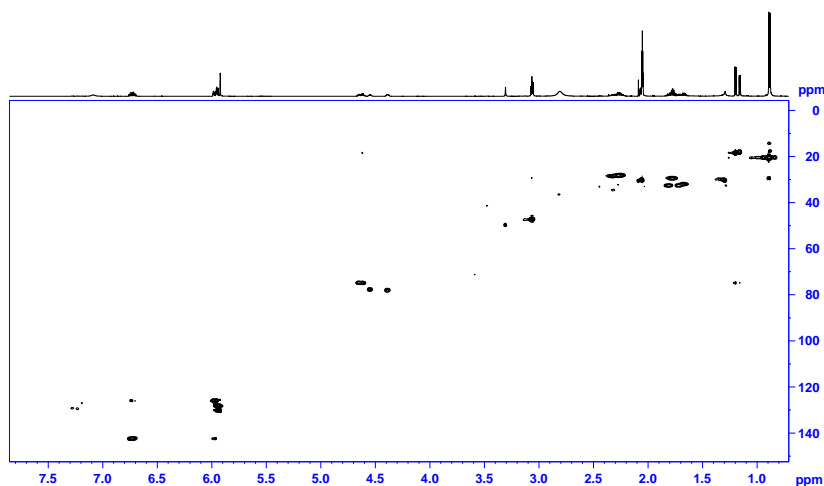
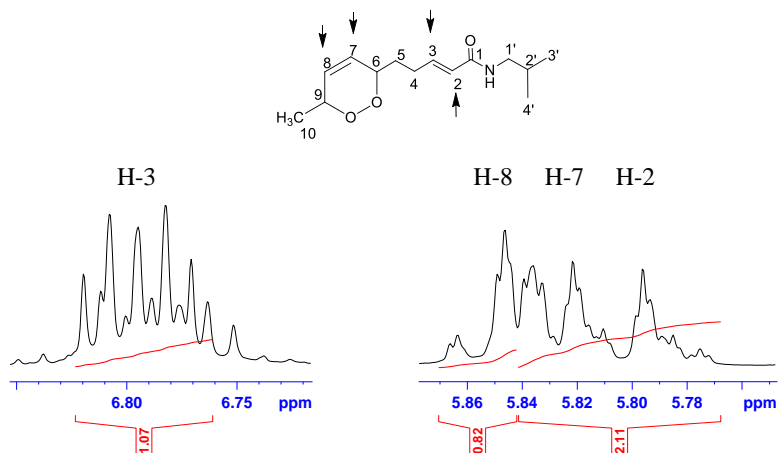


Figura 46 - Mapa de correlação HSQC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, CDCl_3) para a substância AC3.



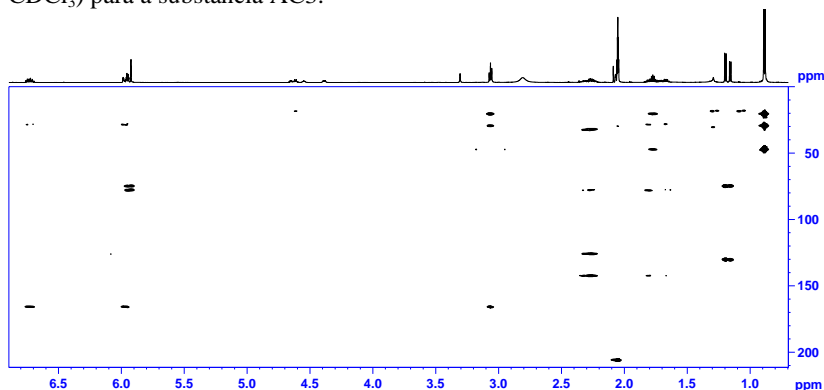
Além disso, o espectro ^1H RMN mostrou sinais de um par de hidrogênios em δ_{H} 5,82 (*ddd*; 15,2; 1,4 e 1,4; H-3) e 6,80 ppm (*ddd*; 15,2; 7,4 e 6,6; H-2) (Figura 47), ligados, respectivamente, aos carbonos *trans*-olefínicos δ_{C} 124,4 (C-2) e 143,3 ppm (C-3).

Figura 47 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância AC3 ampliado na região entre δ_{H} 6,90 e δ_{H} 5,75.



Com base nas informações obtidas através dos mapas de correlação direta HSQC e a longa distância HMBC foi possível concluir que a estrutura apresenta um sistema α,β -insaturado. Além disso, o hidrogênio em δ_H 3,12 mostrou correlação de longo alcance (Figura 48) com a carbonila δ 166,0 (C-1), mostrando que a porção isobutila está ligada ao sistema α,β -insaturado.

Figura 48 - Mapa de correlação HMBC (300 MHz ^1H e 75 MHz ^{13}C , TMS, CDCl_3) para a substância AC3.



Os hidrogênios da ligação *cis*-olefínica, ligados aos carbonos δ_C 127,0 (C-7) e 129,3 (C-8) no anel, ressonam em δ_H 5,83 (*ddd*, $J = 10,3$; 2,4 e 1,5; H-7) e 5,86 ppm (*ddd*, $J = 10,3$; 1,7 e 1,2; H-8) (Figura 46).

Devido à similaridade das interações, os hidrogênios ligados aos carbonos C-2, C-7 e C-8 ressonam muito próximos, por isso os sinais aparecem sobrepostos. Utilizando-se o *software FOMSC3*, foi possível simular as constantes de acoplamento e visualizar melhor esses sinais (Figura 49).

Além dos sinais já mencionados, o espectro de RMN de ^1H apresentou sinais δ_H 4,35 – 4,39 (*m*; H-6) e 4,63 - 4,68 (*m*; H-9) ppm (Figura 50), que correspondem a dois hidrogênios metinos do anel geminais ao peróxido e ligados diretamente aos carbonos em δ 77,3 (C-6) e 74,3 ppm (C-9), de acordo com o mapa de correlação HSQC (Figura 46), claramente indicando a presença de dois carbonos sp^3 oxigenados na estrutura. Finalmente, o duplete em δ 1,23 ($J = 6,7$; H-10) (Figura 50) revelou a presença de hidrogênios de metila ligados diretamente ao carbono δ 18,1 (C-10) e com correlações a longa

distância com os carbonos δ 129,3 (C-8) e 74,3 ppm (C-9), de acordo com o mapa de correlação HMBC (Figura 48).

Figura 49 – Simulação do espectro RMN de ^1H para os hidrogênios olefínicos que ressonam em 5,82 (H-2); 5,83 (H-7) e 5,86 ppm (H-8).

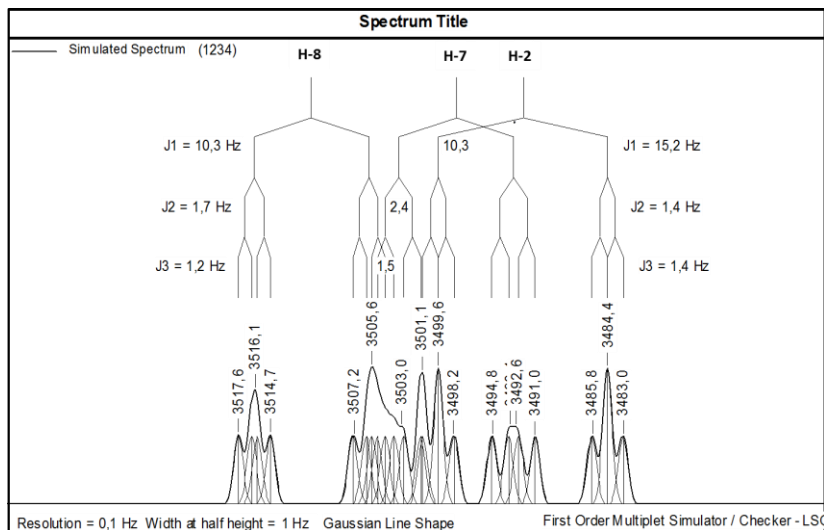
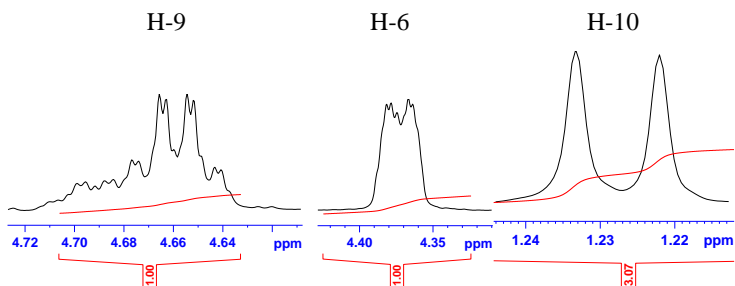


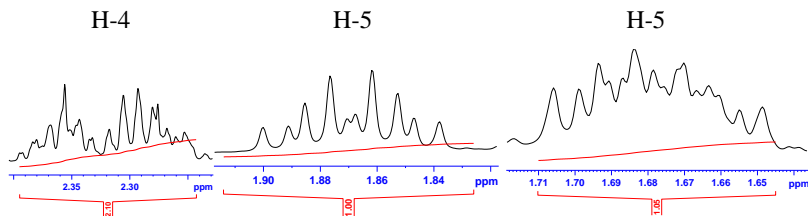
Figura 50 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância AC3 ampliado na região entre δ_H 4,72 e δ_H 1,20.



Os dois metilenos ressonando entre 2,25 - 2,38 (*m*, H-4) (Figura 48) mostraram correlação direta com o carbono 27,9 ppm e correlação de RMN ^1H - ^{13}C de longo alcance com os carbonos δ_C 124,4, δ_C 143,3,

δ_C 31,5 e δ_C 77,2. Já os metilenos em δ_H 1,65 – 1,71 (H-5) e 1,83 - 1,90 ppm (H-5) (Figura 51) mostraram correlação direta com o carbono 31,5 ppm (C-5) e correlação de longo alcance com os carbonos δ_C 143,3 (C-3), δ_C 27,9 (C-4), δ_C 77,3 (C-6) e 127,0 ppm (C-7).

Figura 51 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, TMS, CDCl_3) para a substância AC3 ampliado na região entre δ_H 2,40 e δ_H 1,60.

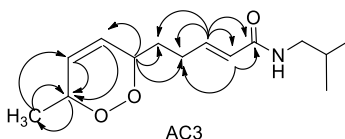


Os dados espectroscópicos de RMN estão apresentados na Tabela 12 e a representação das correlações à longa distância H-C estão apresentadas na figura 52.

Tabela 12 - Dados de ^1H RMN, ^{13}C RMN (CDCl_3 , 300 e 75 MHz) e HMBC para a substância AC3.

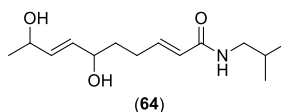
Posição	δ_H , mult. (J in Hz)	δ_C	HMBC
1		166,0	
2	5,82 <i>ddd</i> (15,2, 1,4 e 1,4)	124,4	C-1, C-4
3	6,80 <i>ddd</i> (15,2, 7,4 e 6,6)	143,3	C-1, C-2, C-4, C-5
4	2,25 - 2,38 <i>m</i>	27,9	C-2, C-3, C-5, C-6
5	1,65 – 1,71 <i>m</i>	31,5	C-2, C-3, C-5, C-6
	1,83 - 1,90 <i>m</i>		C-3, C-4, C-6, C-7
6	4,35 – 4,39 <i>m</i>	77,3	C-3, C-4, C-6, C-7
7	5,83 <i>ddd</i> (10,3, 2,4 e 1,5)	127,0	C-4, C-5, C-7, C-8
8	5,86 <i>ddd</i> (10,3, 1,7 e 1,2)	129,3	C-6, C-9
9	4,63 - 4,68 <i>m</i>	74,3	C-6, C-9
10	1,23 <i>d</i> (6,7)	18,1	C-7, C-8, C-10
1'	3,12 <i>dd</i> (6,8 e 6,2)	47,0	C-8, C-9
2'	1,73 – 1,81 <i>m</i>	28,6	C-1, C-2', C-3', C-4'
3'	0,90 <i>d</i> (6,7)	20,2	C-1', C-3', C-4'
4'	0,90 <i>d</i> (6,7)	20,2	C-1', C-2', C-4'

Figura 52 - Correlações HMBC da substância AC3



Esses valores observados nos experimentos de RMN são similares aos descritos para a substância longipenamida B (*2E,7E*)-*N*-isobutil-6,9-diidroxil-2,7-decadienamida (Figura 53) encontrada em *Heliopsis longipes* (MARTÍNEZ et al., 2011), que apresenta a fórmula molecular $C_{14}H_{25}NO_3$, isto é, um grau de insaturação a menos que AC3.

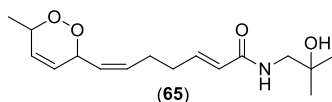
Figura 53 – Estrutura química da substância longipenamida B



A longipenamida B apresenta uma ligação dupla com configuração *E* entre os carbonos C-7 e C-8 e dois grupos hidroxila em C-6 e C-9. Na estrutura de ACN3, a presença de dois oxigênios diretamente conectados foi apoiada pelo experimento HR-MS, que mostrou o íon molecular m/z 254,1756 $[M+H]^+$, valor calculado consistente com a fórmula molecular $C_{14}H_{24}NO_3$.

A falta de duas unidades de hidrogênio em comparação à substância longipenamida B, juntamente com a configuração *Z* da dupla ligação entre os carbonos C-7 e C-8, indicam a presença de uma estrutura cíclica nesta parte da molécula, o que poderia ser um sistema di-idrofurano, sendo assim necessária a presença de uma hidroxila livre, ou um sistema diidro-1,2-dioxino, como acontece em um peróxido cíclico. Com base nessas informações e na ausência de correlações a longa distância (HMBC) entre os hidrogênios e carbonos nas posições 6 e 9, o que seria esperado no caso de um sistema furanoide, a substância AC3 apresenta a formação de uma ponte endoperóxido, estrutura semelhante a uma alcamida (Figura 54) isolada de *Zanthoxylum armatum* (Rutaceae) (DEVKOTA et al., 2013).

Figura 54 - Estrutura química da alcamidas endoperóxido isolada de *Zanthoxylum armantum*

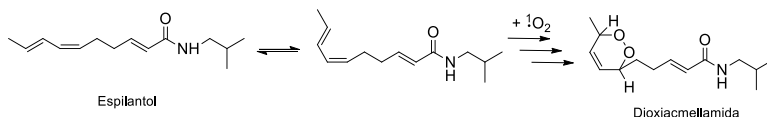


À alcamida AC3 foi atribuída a estrutura de (2*E*)-*N*-isobutil-5-(6-metil-3,6-diidro-1,2-dioxin-3-il)2-pentenamida e o nome comum dioxiacmellamida. Esta substância está sendo descrita pela primeira vez na literatura.

Com o objetivo de avaliar se AC3 é natural ou um artefato formado durante o processo de extrativo, realizou-se duas análises de espectrometria de massa. Estas análises foram realizadas no Departamento de Ciências Farmacêuticas, em colaboração com o Prof. Dr. Louis Pergaud Sandjo. Para tanto, partes aéreas (50 g) de *A. ciliata* foram maceradas com clorofórmio (100 mL) por duas horas em um frasco coberto com folha de alumínio. O extrato foi seco em evaporador rotatório, a 40 °C e protegido da luz. O extrato seco foi solubilizado em acetonitrila e essa solução foi, então, submetida à análise em UPLC-ESI-MS. Além disso, as flores e folhas frescas da planta foram rapidamente trituradas, em gral de porcelana, e o suco foi submetido à análise de EM, utilizando-se a sonda de análise atmosférica sólida (ASAP). Ambos os experimentos apresentaram o íon molecular m/z 254,1759, correspondente à alcamida AC3. Este trabalho foi publicado em 2016 pelo nosso grupo de pesquisa no periódico *Molecules* (Apêndice 1).

A dioxiacmellamida possivelmente é um derivado da oxidação do espilantol, provavelmente produzido na planta em situações de estresse oxidativo, de acordo com a proposta apresentada na figura 55.

Figura 55 - Rota biogenética proposta para a formação da dioxiacmellamida a partir do espilantol.



5.3.4 (2Z)-N-feniletil-6,8-nonadiinamida (AC4)

O íon molecular m/z 252,1386 $[M+H]^+$ foi detectado nas três amostras analisadas e o valor calculado é consistente com a fórmula molecular $C_{17}H_{18}NO$ (grau de insaturação igual a 10), referente a alcamida acetilênica já relatada em *A. ciliata* (MARTIN & BECKER, 1985) e *A. decumbens* (CASADO et al., 2009). Através do experimento de fragmentação MS/MS (Figura 56), foi possível observar o íon de pico base m/z 105,0695, consistente com a porção feniletilamida e o fragmento m/z 131,0515, referente a perda da porção feniletil, que após perder CO originou o íon m/z 103,0542 (Figura 57).

Figura 56 – Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) obtido a partir da análise por CLUE-ESI-EM/EM e espectro ESI-EM/EM de AC4 no modo de ionização positivo.

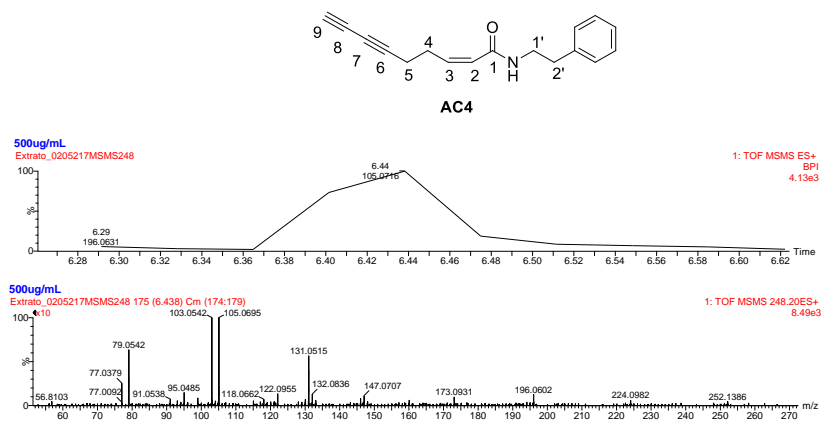
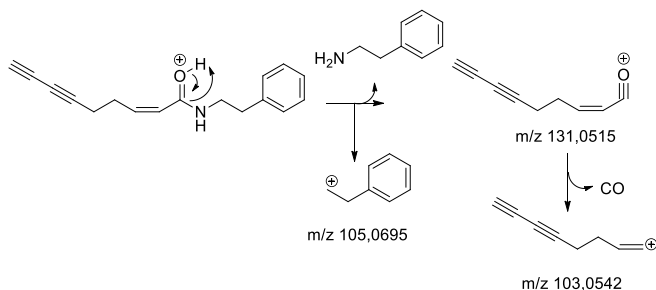


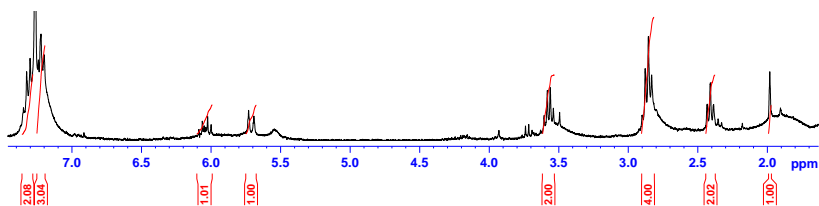
Figura 57 – Mecanismos de fragmentação de AC4.



A confirmação estrutural aconteceu através do experimento de ^1H RMN. Para tanto, **AC4** foi isolada (13,5 mg) a partir do extrato bruto etanólico. Através da análise por CCD, empregando-se o sistema eluente composto por hexano-acetona 60:40 (v/v) observou-se uma mancha, que ficou laranja após reação com a solução de anisaldeído sulfúrico, sob aquecimento.

A análise do espectro de hidrogênio em CDCl_3 (Figura 58) mostrou um par de sinais em δ 5,77 (*dt*, $J = 11,4$ e $1,6$; H-2) e 6,02 ppm (*dt*, $J = 11,4$ e $7,4$; H-3), correspondentes a hidrogênios ligados a carbonos olefínicos, indicativos de ligação dupla *cis*.

Figura 58 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, TMS, CDCl_3) de AC4.



Os sinais de hidrogênio ressonando entre δ 7,29 - 7,35 *m* (2H), δ 7,21 - 7,26 *m* (1H) e 7,17 - 7,20 *m* ppm (2H), δ 3,56 (*ddd*, $J = 7,4$; 7,2 e 6,0; H-1') e 2,75 - 2,90 *m* (H-2') são semelhantes aos observados para a substância AC2, sendo indicativos de um grupo feniletila, característico das feniletilalcamidas.

Os sinais ressonando entre δ 2,75 - 2,90 (*m*) foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos da posição 4 e os sinais entre 2,30 - 2,45 ppm (*m*) foram atribuídos aos hidrogênios da posição 5. O tripleto em δ 1,98 ($J = 1,2$; H-9), semelhante ao observado para a substância AC2, foi atribuído ao hidrogênio acetilênico ligado ao C-9.

Comparando-se os valores dos deslocamentos químicos com os dados da literatura (Tabela 13), foi possível confirmar que **AC4** trata-se da feniletilamida acetilênica ((*2Z*)-*N*-feniletíl-6,8-nonadiinamida) (MARTIN; BECKER, 1985; SIMAS et al., 2013).

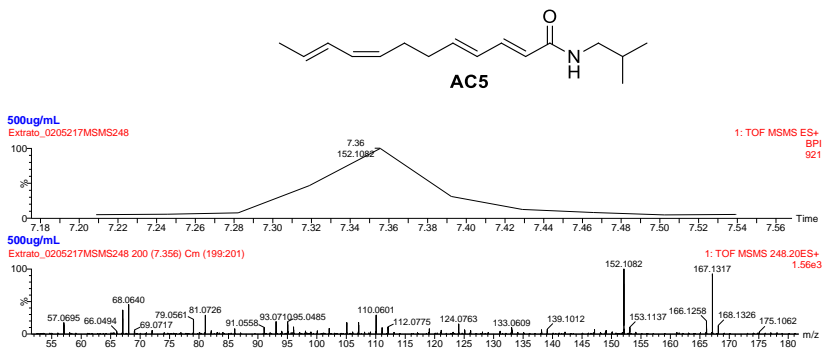
Tabela 13 - Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (CDCl_3 , 300 e 75 MHz) para a substância AC4 e dados comparativos da literatura.

Posição	AC4	(Simas et al, 2013)
	δ ^1H (mult., J Hz) ^a	δ ^1H (mult., J Hz) ^b
1		
2	5,77 <i>dt</i> (11,4 e 1,6)	5,71 <i>dt</i> (11,7 e 1,6)
3	6,02 <i>dt</i> (11,4 e 7,4)	6,03 <i>dt</i> (11,3 e 7,5)
4	2,75 – 2,90 <i>m</i>	2,80 <i>dq</i> (7,0 e 1,5)
5	2,30 - 2,45 <i>m</i>	2,40 <i>dt</i> (7,0 e 1,1)
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	1,98 <i>t</i> (1,2)	1,97 <i>t</i> (1,1)
1'	3,56 <i>ddd</i> (7,4; 7,2 e 6,0)	3,56 <i>q</i> (6,7)
2'	2,75 – 2,90 <i>m</i>	2,84 <i>t</i> (6,7)
Ph	7,17 - 7,20 <i>m</i>	7,20 <i>d</i> (7,0)
	7,29 – 7,35 <i>m</i>	7,31 <i>t</i> (7,0)
	7,21 – 7,26 <i>m</i>	7,23 <i>t</i> (6,0)

5.3.5 (2E,4E-6Z-8E)-N-isobutil-2,4,6,8-dodecatetraenamida (AC5)

Os íon molecular m/z 248,2020 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (AC5) foi encontrado tanto no extrato hexano, quanto no extrato bruto etanólico e sua fração hexano e é indicativo de se tratar de um composto com a fórmula molecular $\text{C}_{16}\text{H}_{25}\text{NO}$. A figura 59 mostra o espectro obtido a partir do experimento de fragmentação MS/MS, que apresentou como pico base o íon m/z 152,1082 ($\text{C}_9\text{H}_{14}\text{NO}$, $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_5\text{H}_{11}]^+$) e os fragmentos: m/z 167,1317 ($\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{NO}$, $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_6\text{H}_9]^+$); m/z 68,0624 (C_5H_8 , $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_9\text{H}_{17}\text{NO}]^+$) e o m/z 57,0695 (C_4H_9 , $[\text{M}+\text{H}-\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{NO}]^+$), referente ao resíduo isobutila.

Figura 59 - Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) obtido a partir da análise por CLUE-ESI-EM/EM e espectro ESI-MS/MS de AC5 no modo de ionização positivo.



A alcamidas AC5 foi isolada na forma de óleo esverdeado (10,3 mg). Assim como para as outras isobutilamidas, a análise por CCD, empregando-se o sistema eluente composto por hexano-acetona 60:40 (V/V), apresentou uma mancha, com fraca extinção de fluorescência sob luz UV à 254 nm e que ficou de roxa a marrom, após reação com o reagente cromogênico anisaldeído sulfúrico, sob aquecimento.

A tabela 14 mostra os valores obtidos através do experimento de RMN de ^1H , em CDCl_3 , comparados aos valores da literatura.

O espectro de hidrogênio em CDCl_3 (Figura 60) mostrou o padrão típico da porção isobutil, com sinais em δ 3,17 *dd* (6,5; 6,5; H-1'); δ 1,80 – 1,85 (*m*, H-2') e um duplete integrando para 6 hidrogênios em 0,93 ppm (6,5; H-3' e H-4') (Figura 61).

Na parte mais desblindada do espectro de ^1H RMN foi possível verificar a presença de quatro pares de sinais (Figura 62), correspondentes a hidrogênios ligados a carbonos olefinicos: δ 7,19 *dd* (15; 10) e 5,76 *d* (15) (H-3 e H-2); 6,14 *dd* (10; 15) e 6,10 *dt* (15; 5,5) (H-4 e H-5); 5,25 *dt* (11; 7) e 5,97 *ddd* (11; 11; 10) (H-8 e H-9); 6,3 *brdd* (11; 15; H-10) e 5,7 *dq* (15; 7; H-11) (H-10 e H-11), indicando tratar-se de uma tetraenalcamida.

Tabela 14 – Dados de ^1H RMN e ^{13}C RMN (CDCl_3 , 300 e 75 MHz) para a substância AC5 e dados comparativos da literatura.

Posição	AC5	(Martin & Becker, 1985)
	δ ^1H (mult., J Hz) ^a	δ ^1H (mult., J Hz) ^b
1	-	-
2	5,76 <i>d</i> (15)	5,77 <i>d</i> (15)
3	7,19 <i>dd</i> (15; 10)	7,19 <i>dd</i> (15; 9,5)
4	6,14 <i>dd</i> (10; 15)	6,17 <i>dd</i> (9,5; 15)
5	6,10 <i>dt</i> (15; 5,5)	6,07 <i>dt</i> (15; 6)
6 e 7	2,22 - 2,31 <i>m</i>	2,27 <i>m</i>
8	5,25 <i>dt</i> (11; 7)	5,26 <i>dt</i> (11; 7)
9	5,97 <i>ddd</i> (11; 11; 10)	5,97 <i>dd</i> (11; 10)
10	6,30 <i>brdd</i> (10; 15)	6,3 <i>br dd</i> (10; 15)
11	5,70 <i>dq</i> (15; 7)	5,7 <i>dq</i> (15; 6,5)
12	1,78 <i>d</i> (7)	1,79 <i>d</i> (6,5)
1'	3,17 <i>dd</i> (6,5; 6,4)	3,17 <i>dd</i> (6,5; 6,5)
2'	1,80 – 1,85 <i>m</i>	1,80 <i>tqq</i> (6,5; 7 e 7)
3' e 4'	0,93 <i>d</i> (6,5)	0,93 <i>d</i> (7)

Figura 60 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, TMS, CDCl_3) de AC5.

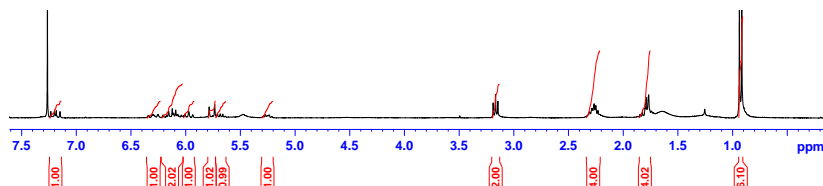


Figura 61 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, TMS, CDCl_3) de AC5, ampliado na região δ_{H} 3,20 e δ_{H} 0,90.

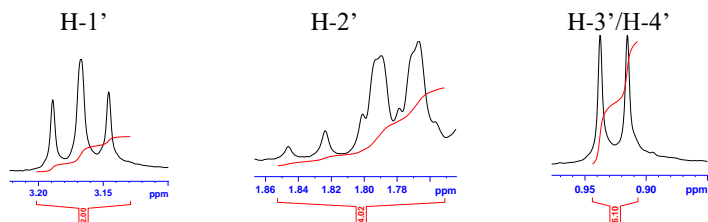
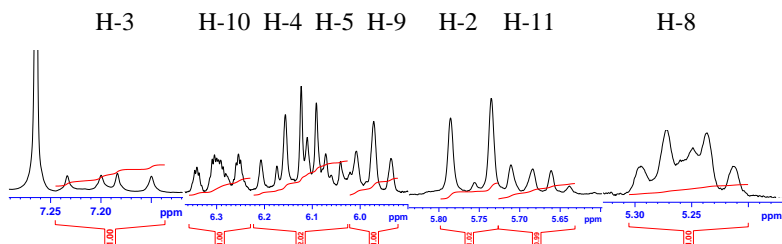
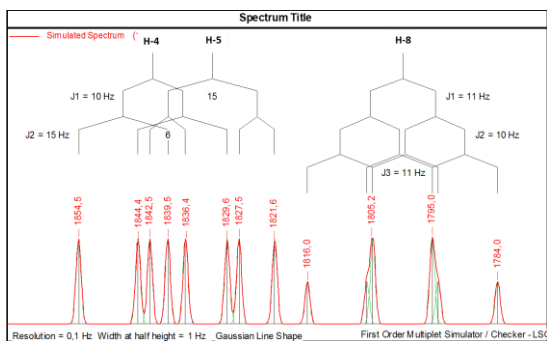


Figura 62 - Espectro de RMN de ^1H (300 MHz, TMS, CDCl_3) de AC5, ampliado na região δ_{H} 7,25 e δ_{H} 5,20.



O H-2 (δ 5,76) tem apenas uma constante de acoplamento com o H-3 (δ 7,19), resultando em um duplete. H-3 está mais fortemente deslocado no espectro, o que é normal para as funções carbonílicas α - β insaturadas. O hidrogênio da posição 3 também apresenta acoplamento com H-4 (δ 6,14), representando um duplo duplete. H-4 acopla-se com H-5 (δ 6,10), formando também um duplo duplete e este também apresenta acoplamento com os dois hidrogênios ligados ao C-6 (δ 2,27), resultando em um sinal duplo tripleto. A constante de acoplamento de 15 Hz é característica de hidrogênios ligados a carbonos olefínicos com configuração *E*. Como os hidrogênios das posições 4, 5 e 8 ressonam muito próximos no espectro, os sinais não ficam muito bem definidos, mas sim sobrepostos. Utilizando-se o *software FOMSC3* para fazer a simulação, foi possível observar com mais clareza as constantes de acoplamento (Figura 63).

Figura 63 - Simulação do espectro RMN de ^1H para os hidrogênios olefínicos que ressonam em 6,14 (H-4), 6,10 (H-5) e 5,97 ppm (H-8).



O padrão de acoplamento de H-8 com H-9 é semelhante ao observado para H-5, formando um duplo-triplete. Entretanto, a constante de acoplamento é de 11 Hz, indicativa de dupla ligação com configuração *Z*. H-10 e H-11 acoplam-se com *J* de 15 Hz, o que caracteriza uma dupla ligação com configuração *E*. O duplete observado em δ 1,79 foi atribuído aos três hidrogênios do grupamento metila terminal da cadeia ácida na posição C-12.

Os hidrogênios (4H) ligados aos carbonos 6 e 7 apresentam diversidade de sinais com padrões de acoplamento de ordem superior, por isso eles aparecem no espectro como multipletos.

A combinação de todos os dados espectroscópicos apresentados e a comparação com os dados disponíveis na literatura (Tabela 14) permitiram a identificação da substância AC5 (C₁₆H₂₆NO) como sendo a (2*E*,4*E*,6*Z*,8*E*)-*N*-isobutil-2,4,6,8-dodecatetraenamida.

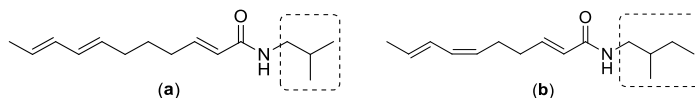
Em contraste ao estudo realizado por Martin e Becker (1985), que também conseguiu detectar o isômero 4*Z* desta substância, apenas (2*E*-4*E*-6*Z*-8*E*)-*N*-isobutil-2,4,6,8-dodecatetraenamida foi detectada.

Em *A. ciliata*, apenas o isômero 10*E* parece estar presente, ao contrário das espécies do gênero *Echinacea*, em que a mistura desses isômeros é quase sempre encontrada.

5.3.6 (2*E*,6*Z*,8*E*)-*N*-(2-meillbutil)-2,6,8-decatrienamida (AC6)

O íon m/z 236,2005 [M+H]⁺ (AC6) foi encontrados tanto no extrato hexano, quanto no extrato bruto etanólico e sua fração hexano e o valor calculado é sugestivo da alcamida com a fórmula molecular C₁₅H₂₆NO.

Na literatura, duas alcamidas já foram descritas com esta estrutura: uma com resíduo isobutila (**a**), isolada de *A. ciliata* e *A. oleracea* (MARTIN & BECKER, 1984; GREGER et al., 1985; CHENG et al., 2015) e outra com radical metilbutila (**b**), obtida de *S. acmella* (RAMSEWAK et al., 1999), indicando que AC6 provavelmente apresenta a primeira proposta.

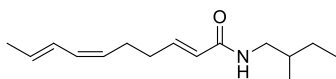


O ensaio de fragmentação MS/MS (figura 64) apresentou o íon pico base m/z 81,0708, formado através da clivagem entre C-4 e C-5,

além dos íons m/z 140,1064 (cátion ciclopenteno) e m/z 98,0608, característicos das alcamidas olefínicas, já discutidos para o espilantol, além dos íons: m/z 126,0937, m/z 114,0914, originado a partir da clivagem entre C-1 e C-2, e o m/z 71,0855, fragmento do resíduo metilbutila (Figura 65).

A combinação desses fragmentos confirmou a hipótese de que AC6 é a substância (2*E*,6*Z*,8*E*)-*N*-(2-meilbutil)-2,6,8-decatrienamida.

Figura 64 - Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) obtido a partir da análise por CLUE-ESI-EM/EM e espectro ESI-EM/EM de AC6 no modo de ionização positivo.



(2*E*,6*Z*,8*E*)-*N*-(2-meilbutil)-2,6,8-decatrienamida
(AC6)

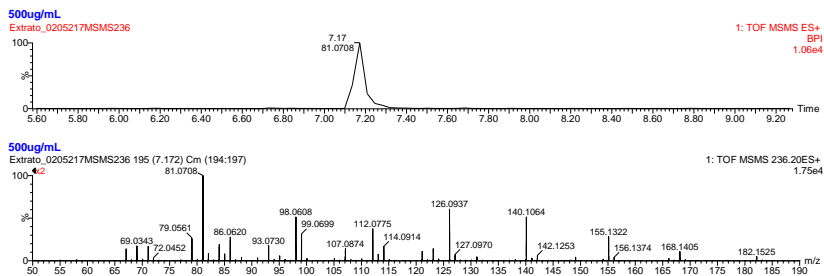
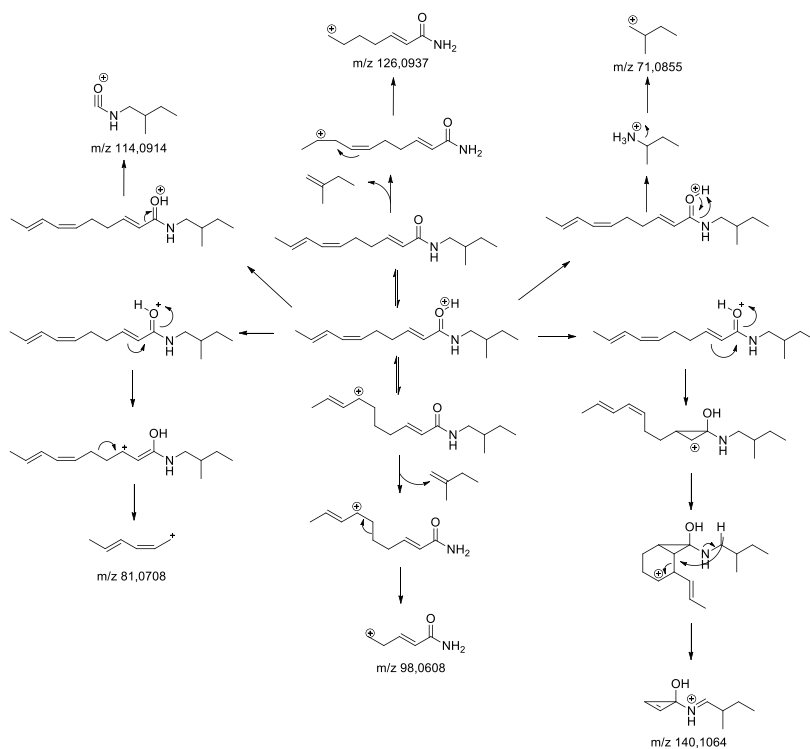


Figura 65 - Mecanismos de fragmentação de AC6.



5.3.7 (2E,4E)-N-isobutil-2,4-undecadien-8,10-diamida (AC7)

O íon molecular com a massa m/z 230,1515 $[M+H]^+$ também foi encontrado nas três amostras analisadas.

O espectro MS/MS de AC7 (Figura 66) apresentou os íons m/z 91,0563 (pico base), típico das alcamidas acetilênicas e o fragmento m/z 57,0722, característico do resíduo isobutil. Além disso, também foi possível observar o fragmento m/z 157,0658, referente ao resíduo ácido resultado após a clivagem da ligação amida, que perde CO, formando os fragmentos m/z 131,0861 e m/z 129,0704 e o íon radicalar m/z 128,0638. Estes mecanismos estão apresentados na figura 67.

Não foi possível fazer o isolamento de AC7, o que seria necessário para se obter a configuração absoluta das insaturações. A

massa do íon molecular sugere que AC7 tem a fórmula molecular ($C_{15}H_{19}NO$, $[M+H]^+$).

Figura 66 - Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) obtido a partir da análise por CLUE-ESI-EM/EM e espectro ESI-EM/EM de AC7 no modo de ionização positivo.

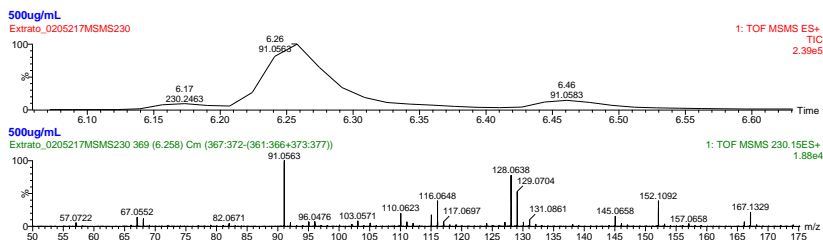
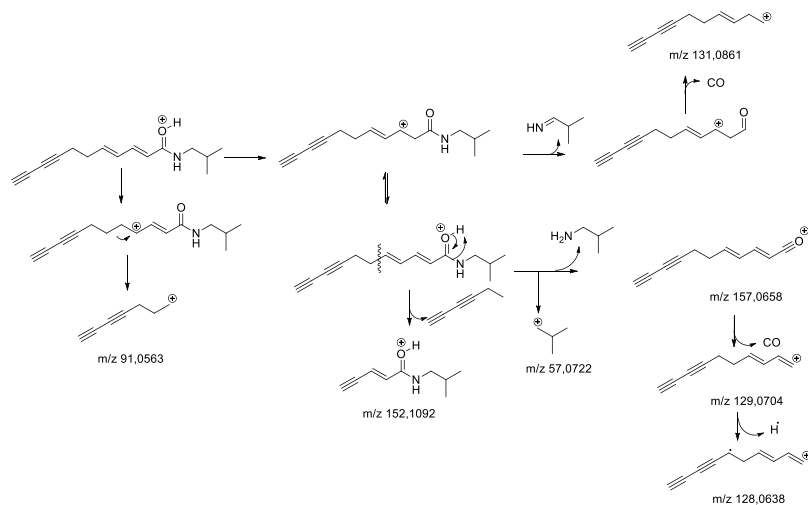


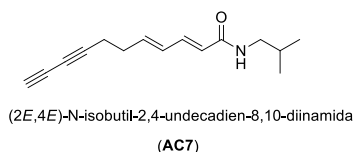
Figura 67 – Mecanismos de fragmentação de AC7.



O isômero (2Z,4E)-N-isobutil-2,4-undeca8,10-diamida já foi isolado de *Echinacea purpurea*, *Echinacea pallida* (CHEN et al., 2005) e *Spilanthes alba* (BOHLMANN et al., 1980), a configuração (2E,4E) de *E. purpurea*, *E. pallida* e *E. angustifolia* (BAUER et al., 1989; BINNS et al., 2000; CHEN et al., 2005) e a (2E,4E)-N-isobutil-2,4-undecadien-8,10-diamida, já foi isolada de diversos gêneros e espécies (BOHLMANN et al., 1974; HOHMANN et al., 2011; BRAHMI et al.,

2012; ALTHAUS et al., 2014), incluindo *A. ciliata* (MARTIN & BECKER, 1985), por isso, é provável que essa última proposta seja a configuração relativa de AC7 (Figura 68).

Figura 68 – Estrutura química da substância AC7



5.3.8 (2E)-N-isobutyl-2-undecaen-8,10-diinamida (AC8)

O íon molecular m/z 232,1695 (AC8) foi observado apenas no extrato bruto no tempo de retenção 6,46 min. Assim como para AC7, o ensaio de fragmentação MS/MS (Figura 69) apresentou o íon de pico base m/z 91,0583 $[C_7H_7]^+$, característico das alcamidas acetilênicas e o fragmento m/z 57,0722 $[C_7H_7]^+$, típico do resíduo isobutila. Além do íon m/z 159,0847 $[C_{11}H_{11}O]^+$, resíduo ácido resultado após a clivagem da ligação amida, que após a perda de CO, originou o fragmento m/z 131,0861 $[C_{10}H_{11}]^+$ houve também a formação do íon m/z 105,0728 $[C_8H_9]^+$, formado a partir da clivagem entre C-3 e C-4, conforme mostrado na figura 70.

Figura 69 - Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) obtido a partir da análise por CLUE-ESI-EM/EM e espectro ESI-EMS/EM de AC8 no modo de ionização positivo.

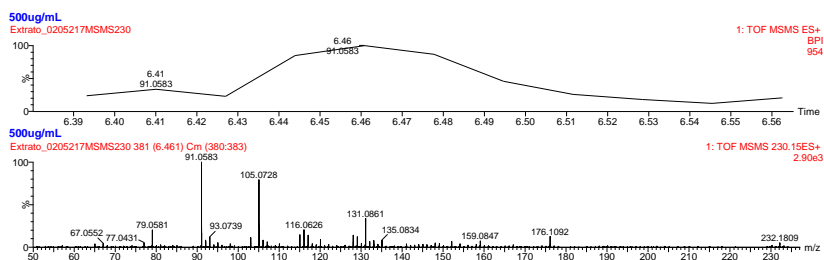
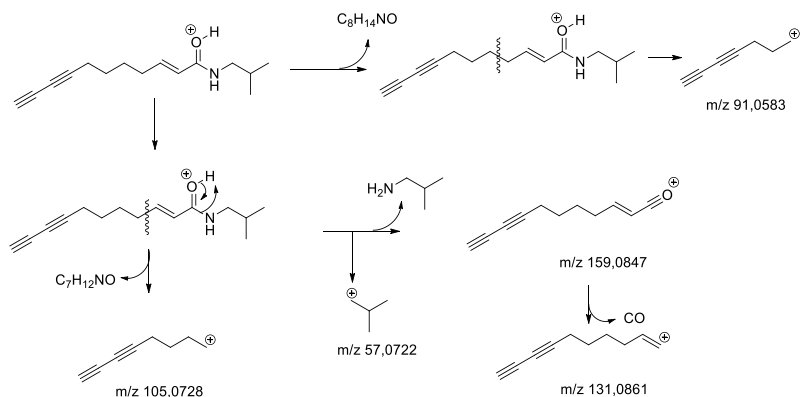


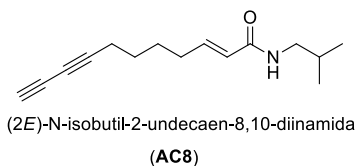
Figura 70 – Proposta dos mecanismos de fragmentação de AC8.



A diferença na massa entre AC7 e AC8 (m/z 230 e 232) e do fragmento formado após a clivagem da ligação amida (m/z 157 e 159), indicam que a primeira apresenta duas unidades de hidrogênio a menos que a segundo, indicando a presença de uma insaturação adicional.

Existem dois possíveis isômeros para a substância AC8 ($C_{15}H_{21}NO$, $[M+H]^+$) e ambos já foram relatados na literatura, mas apenas a (2E)-N-isobutil-2-undecaen-8,10-diinamida (Figura 71) foi reportada para a espécie *A. ciliata* (MARTIN & BECKER, 1985), sendo, então, a configuração mais plausível.

Figura 71 – Estrutura química da substância AC8.



5.3.9 (2E,7Z)-N-isobutil-2,7-tridecadien-10,12-diinamida.

AC9 (m/z 258,1855) foi encontrado no extrato bruto e na fração hexano e o valor calculado é indicativo de ser uma substância com a fórmula molecular $C_{17}H_{24}NO$ $[M+H]^+$.

Duas alcanidas acetilênicas com esta fórmula molecular já foram descritas: uma com resíduo metilbutila, isolada de *Echinacea purpurea* (CHEN et al., 2005) e *E. angustifolia* (WOELKART & BAUER, 2007) e outra com resíduo isobutila, de *A. ciliata* (BHAT et al., 2016), *A. oleracea* (MONROE et al., 2016), *S. acmella* (NAKATANI & NAGASHIMA, 1992), *S. callimorpha* (LI et al., 2007) e espécies de *Echinacea* (BAUER et al., 1989; SLOLEY et al., 2001; CHEN et al., 2005).

O espectro EM/EM de AC9 (Figura 72) apresentou o íon pico base m/z 117,0705 $[C_9H_9]^+$, formado a partir da clivagem entre C-4 e C-5, indicando ser a fragmentação energeticamente mais favorável. Também foi possível observar o íon m/z 91,0558 $[C_7H_7]^+$, típico das alcanidas acetilênicas e o fragmento m/z 57,0726 $[C_4H_9]^+$, característico do resíduo isobutil, conforme apresentado na figura 73.

A combinação desses fragmentos e a não detecção do íon m/z 71 $[C_5H_{11}]^+$, fragmento do característico do resíduo metilbutila, são bastante semelhantes aos valores relatados por Nakatani & Nagashima (1992), sugerindo que AC9 é a alcanida acetilênica (2E,7Z)-N-isobutil-2,7-tridecadien-10,12-diinamida.

Figura 72 - Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) obtido a partir da análise por CLUE-ESI-EM/EM e espectro ESI-EM/EM de AC9 no modo de ionização positivo.

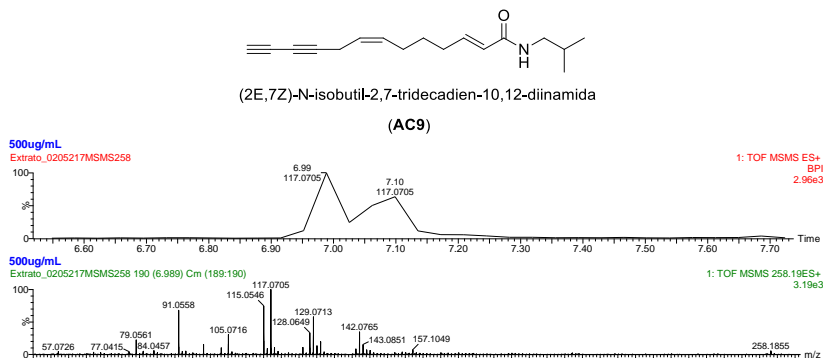
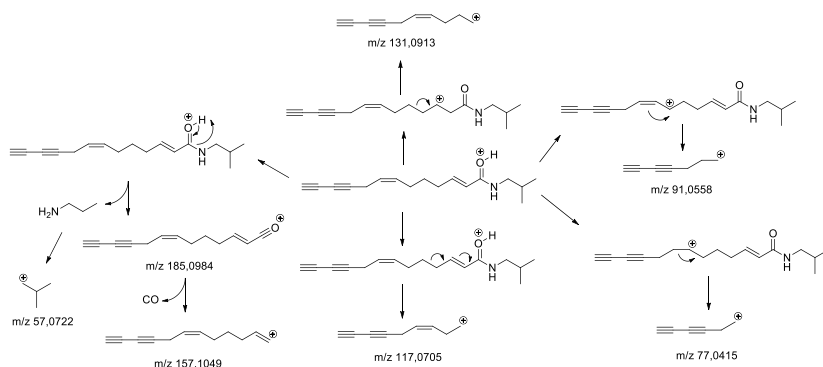


Figura 73 – Propostas dos mecanismos de fragmentação de AC9.



5.3.10 (7Z)-N-(isobutil)-7-tridecaen-10,12-diinamida (AC10)

A fórmula molecular de AC10 foi identificada como $\text{C}_{17}\text{H}_{26}\text{NO}$ $[\text{M}+\text{H}]^+$, com base no íon m/z 260,2006 detectado nas três amostras analisadas (extrato bruto, fração hexano e extrato hexano). Esta fórmula sugere que AC10 apresenta duas unidades de hidrogênio a mais que AC9.

Assim como para AC9, o espectro EM/EM de AC10 (Figura 74) apresentou o íon pico base m/z 117,0697 $[\text{C}_9\text{H}_9]^+$, resultado da clivagem entre C-4 e C-5. Também foi possível observar o íon m/z 145,1003 $[\text{C}_{11}\text{H}_{13}]^+$, originado da clivagem entre C-2 e C-3, o íon m/z 91,0544 $[\text{C}_7\text{H}_7]^+$, típico das alcamidas acetilênicas e o fragmento m/z 57,0691 $[\text{C}_4\text{H}_9]^+$, característico do resíduo isobutílica. A inexistência do fragmento relacionado ao cátion ciclopropeno (m/z 98 $[\text{C}_5\text{H}_8\text{NO}]^+$) no espectro MS/MS de AC10, indica que esta estrutura não apresenta a instauração entre os carbonos C-2 e C-3. Os mecanismos de fragmentação estão apresentados na Figura 75.

AC10 apresenta grande semelhança com a alcamida (7Z)-N-(isobutil)-7-tridecaen-10,12-diinamida, isolada das flores de *S. acmella* por Nakatani & Nagashima (1992).

Esta alcamida está sendo descrita pela primeira vez para o gênero *Acmella*.

Figura 74 - Expansão do cromatograma íon de pico base (BPI) obtido a partir da análise por CLUE-ESI-EM/EM e espectro ESI-EM/EM de AC10 no modo de ionização positivo

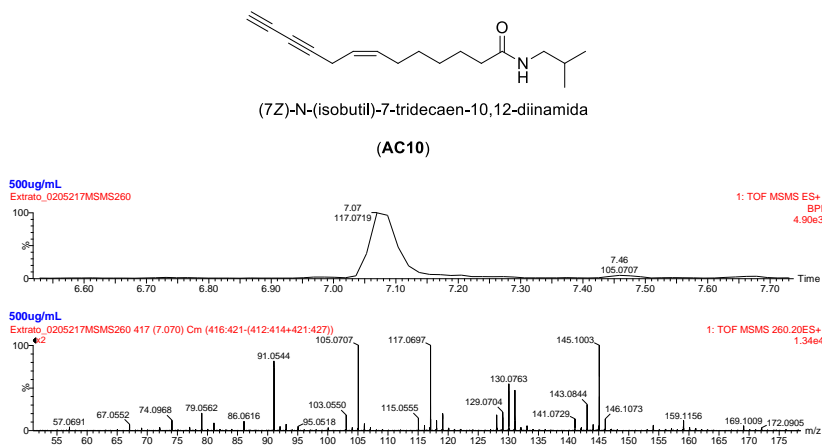
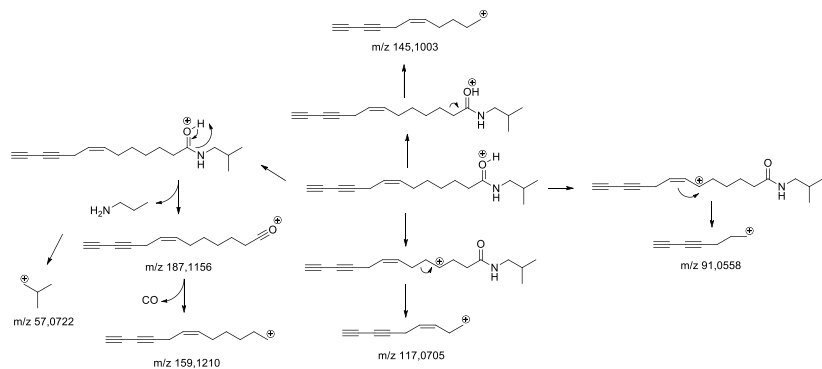


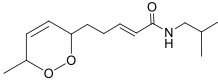
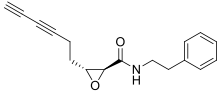
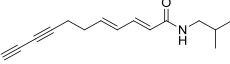
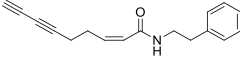
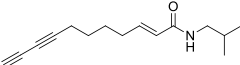
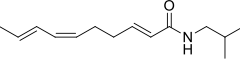
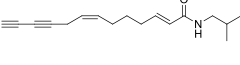
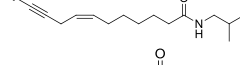
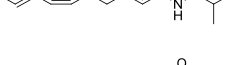
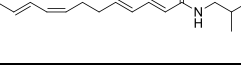
Figura 75 – Propostas de mecanismos de fragmentação para AC10



A tabela 15 apresenta um resumo das 10 alcaloides identificadas nas partes aéreas de *Acmella ciliata*, das quais cinco (AC1 – AC5) tiveram as suas estruturas estabelecidas através dos experimentos de HREM e RMN, enquanto que as outras cinco (AC6 – AC10) apenas por HREM.

AC10 está sendo reportada pela primeira vez para o gênero *Acmella* e a estrutura de AC3 ainda não havia sido descrita como produto natural ou sintético, até 2016, sendo então uma substância nova.

Tabela 15 – Alcamidas identificadas nas partes aéreas de *Acmella ciliata*.

Tempo de retenção (min)	Código da amostra	[M+H] ⁺ (m/z)	Formula molecular	Fórmula estrutural
5,59	AC3	254,1756	C ₁₄ H ₂₄ NO ₃	
5,96	AC2	268,1314	C ₁₇ H ₁₈ NO ₂	
6,25	AC7	230,1515	C ₁₅ H ₂₀ NO	
6,44	AC4	252,1386	C ₁₇ H ₁₈ NO	
6,47	AC8	232,1695	C ₁₅ H ₂₂ NO	
6,77	AC1	222,1858	C ₁₄ H ₂₄ NO	
6,99	AC9	258,1855	C ₁₇ H ₂₄ NO	
7,10	AC10	260,2006	C ₁₇ H ₂₆ NO	
7,17	AC6	236,2005	C ₁₅ H ₂₆ NO	
7,36	AC5	248,2020	C ₁₆ H ₂₆ NO	

5.4 Ensaios preliminares de degradação

Devido ao fato do endoperóxido coexistir em formas diastereoisoméricas, propôs-se a possível oxidação do espilantol à dioxiacmellamida (AC3). Desta maneira, o espilantol foi submetido a dois testes de degradação (luminosa e térmica), com o objetivo de entender a seu comportamento frente a essas condições.

5.4.1 Ensaios preliminares de termodegradação

A partir da descoberta do fogo, o homem passou a transformar o alimento, permitindo a alteração do seu sabor e facilitando o seu consumo. Muitas plantas medicinais são utilizadas na culinária, principalmente na forma de temperos, pois normalmente são aromáticas, mas também pelos efeitos benéficos à saúde relacionados aos seus metabólitos secundários. Por isso, muitas vezes essas plantas também são chamadas alimentos funcionais.

Entretanto, o processamento dos alimentos pode alterar a concentração dos metabólitos secundários, modificando as suas propriedades.

O jambu é comumente utilizado na culinária típica do Norte do Brasil. As suas folhas são utilizadas cruas nas saladas e sucos. Mas as principais preparações são feitas utilizando processamento térmico, como os famosos pratos Paco no Tucupi e Tacacá, além de ser adicionado a caldos, sopas, pizzas, guisados e cozido junto com arroz.

O uso culinário do jambu está relacionado ao efeito sensorial causado pela alcamida espilantol, que também apresenta variadas atividades farmacológicas, como descrito no *item 2.4.1*.

A influência da temperatura na degradação do espilantol foi verificada no extrato bruto etanólico. Os experimentos foram realizados nas condições: temperatura (40, 80, 100 e 120 °C) e tempo (30, 60, 90, 120, 150 e 180 minutos).

As amostras foram analisadas por CLUE-HREM, no tempo zero (antes do início do experimento) e a cada tempo e temperatura testados. A partir dos cromatogramas obtidos fez-se a extração do íon m/z 222,1858 $[M+H]^+$ ou o íon m/z 244,1684 $[M+Na]^+$, referentes ao espilantol, que eluiu no tempo de retenção entre 6,73 e 6,77 min. A partir desses valores, fez-se a construção dos gráficos Log da área do espilantol *versus* tempo, para a obtenção da cinética de degradação.

As figuras 76a e 76b apresentam o cromatograma do extrato bruto no tempo zero e a extração do íon m/z 222,1858, respectivamente.

Figura 76 – Expansão dos cromatogramas de íon de pico base (BPI) obtidos no modo de ionização positiva. Extrato bruto em solução (500 $\mu\text{g/mL}$) no tempo zero (a) e extração do íon m/z 222,1858 (b).

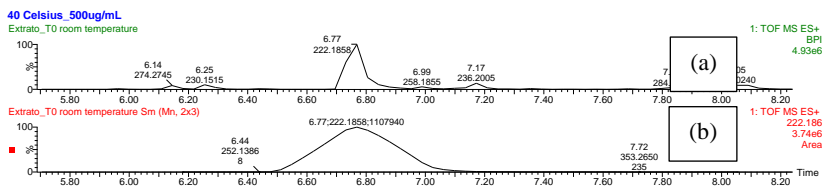
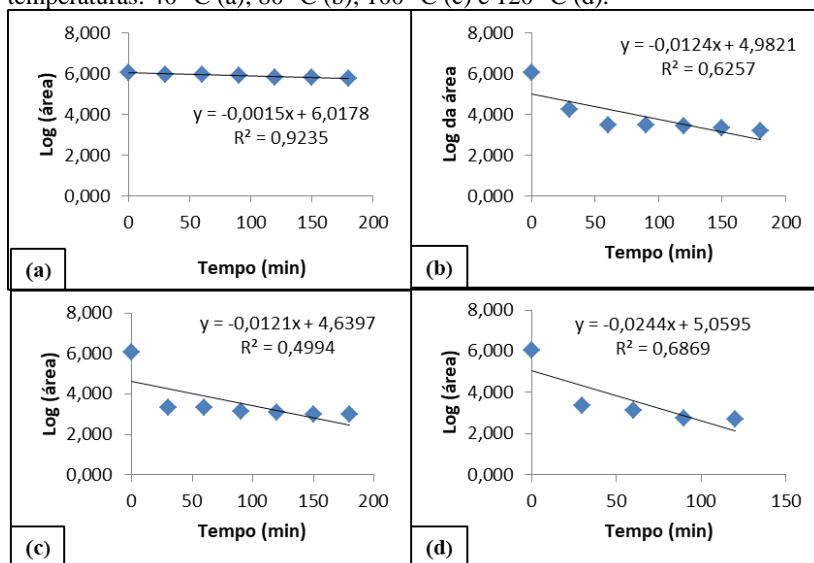


Figura 77 – Gráficos do Log da área do espilantol *versus* tempo nas temperaturas: 40 °C (a); 80 °C (b); 100 °C (c) e 120 °C (d).



Através da construção do gráfico do Log da área *versus* tempo, foi possível observar que a estabilidade do espilantol é influenciada negativamente pela temperatura (Figura 77).

Esses resultados preliminares são indicativos de que o espilantol tende a se degradar com o aumento da temperatura e tempo de

exposição, levantando a hipótese de ocorrer o mesmo durante o processamento térmico do jambu nas preparações culinárias.

5.4.2 Ensaios preliminares de fotodegradação

A formação da dioxiacmellamida (AC3), detectada no extrato bruto e na planta fresca, através da metodologia ASAP, descrita no item 5.3.3, possivelmente resulta da oxidação da fração dieno (6Z,8E) do espilantol, estando de acordo com dados da literatura sobre a peroxidação de ácidos graxos insaturados (DEVKOTA et al., 2013; SIMAS et al., 2013).

Com o objetivo de avaliar se o espilantol converte-se à dioxiacmellamida, fez-se o ensaio de fotodegradação.

Para tanto, o espilantol solubilizado em metanol grau HPLC (100 µg/mL), foi exposto em duas condições: grupo A (na presença de luz e oxigênio) e grupo B (na presença de oxigênio, mas sem luz). Como a lâmpada aquece e o metanol é inflamável, por motivos de segurança, as amostras do grupo A permaneceram nas condições propostas somente ao longo do dia, enquanto havia a presença de alguém no laboratório, totalizando 300 horas de exposição. As análises foram feitas em triplicata.

A área do espilantol foi verificada no tempo zero (Figura 78). O grupo A foi avaliado com 48, 105, 190 e 300 h e o grupo B com 8, 22, 42 e 72 dias.

Ao longo dos ensaios, não foi observada a conversão do espilantol à dioxiacmellamida para todas as amostras analisadas, como mostrado nas figuras 79 e 80.

Figura 78 – Expansão do cromatograma de íon de pico base (BPI) obtidos no modo de ionização positivo. Solução de espilantol em MeOH (100 µg/mL) no tempo zero (a), extração do íon m/z 222,1858 (b) e extração do íon m/z 254,1739 (c).

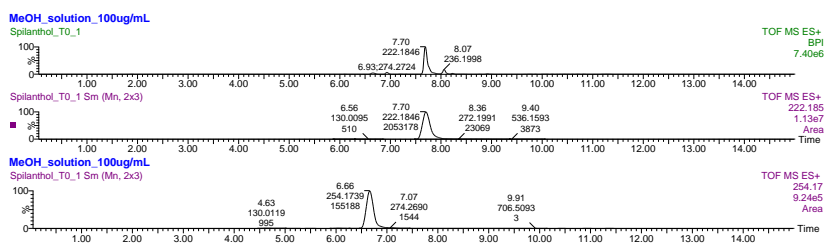


Figura 79 - Expansão dos cromatogramas de íon de pico base (BPI) obtidos a no modo de ionização positivo. Solução de espilantol em MeOH (100 µg/mL) exposto a luz e oxigênio, nos tempos 48 (a), 105 (b), 190 (c) e 300 h (d).

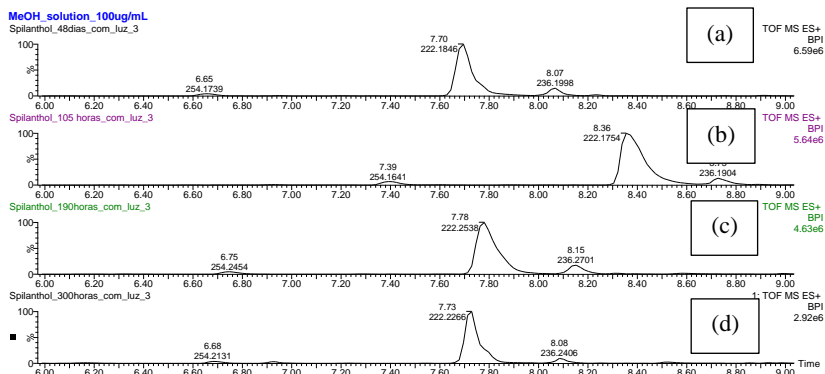
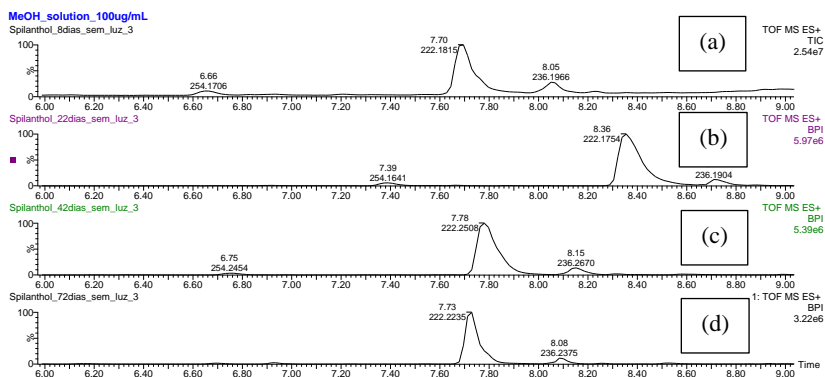


Figura 80 - Expansão dos cromatogramas de íon de pico base (BPI) no modo de ionização positivo. Solução de espilantol em MeOH (100 µg/mL) exposto a oxigênio e na ausência de luz, nos tempos 8 (a), 22 (b), 42 (c) e 72 dias (d).



Com o objetivo de analisar se houve interferência do metanol na conversão de AC1 a AC3, avaliou-se a estabilidade do espilantol seco (sem solvente).

Para este ensaio as amostras foram separadas em 4 grupos: C1: espilantol seco (500 µg) na presença de ar e na ausência de luz; C2: espilantol seco (500 µg) na presença de ar e luz; D1: extrato hexano seco (1 mg) na presença de ar e na ausência de luz; D2: extrato hexano

seco (1 mg) na presença de ar e luz. As amostras foram analisadas nos tempos: 0, 2, 5, 7 e 9 dias e os resultados estão apresentados nas Figuras 81 a 84.

Nas amostras expostas à luz (C2 e D2) foi possível observar que houve aumento dos picos referentes ao íon m/z 254,1741 e diminuição do íon m/z 222,1848, sugestivo de que a conversão tenha acontecido. Com o objetivo de verificar a cinética da reação, fez-se a extração dos íons e os gráficos da área dos íons *versus* tempo foram plotados (Figura 85), indicando que a conversão do espilantol à dioxiacmellamida acontece de acordo com a cinética de ordem zero.

Figura 81 - Expansão dos cromatogramas de íon de pico base (BPI) obtidos no modo de ionização positivo. Amostras do grupo C1 nos tempos 0 (a), 2 (b), 5 (c), 7 (d) e 9 dias (e).

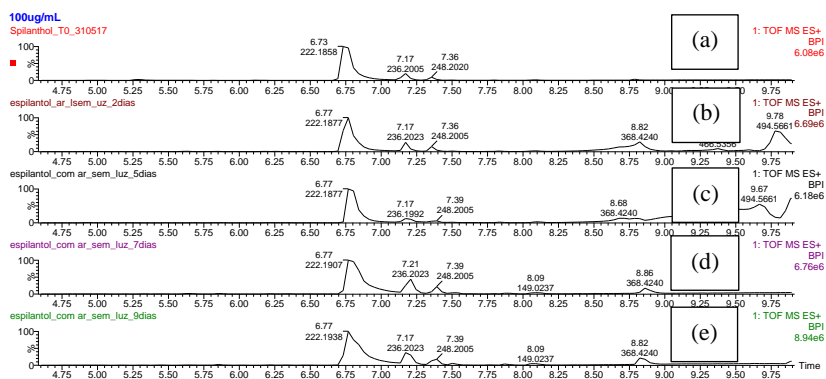


Figura 82 - Expansão dos cromatogramas de íon de pico base (BPI) obtidos no modo de ionização positivo. Amostras do grupo C2, nos tempos 0 (a), 2 (b), 5 (c), 7 (d) e 9 dias (e).

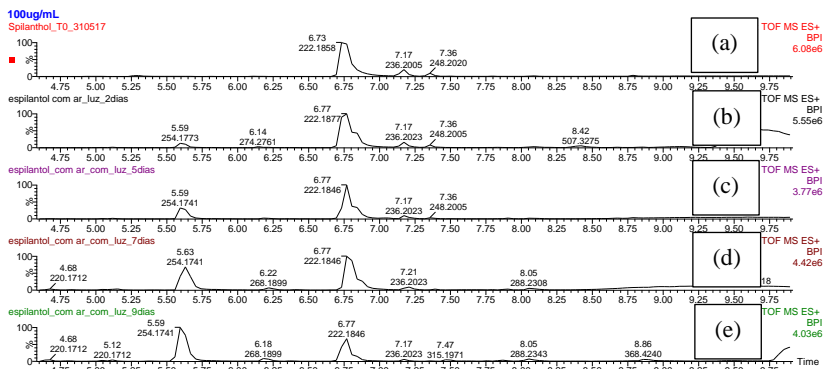


Figura 83 - Expansão dos cromatogramas de íon de pico base (BPI) obtidos no modo de ionização positivo. Amostras do grupo D1, nos tempos 0 (a), 2 (b), 5 (c), 7 (d) e 9 dias (e).

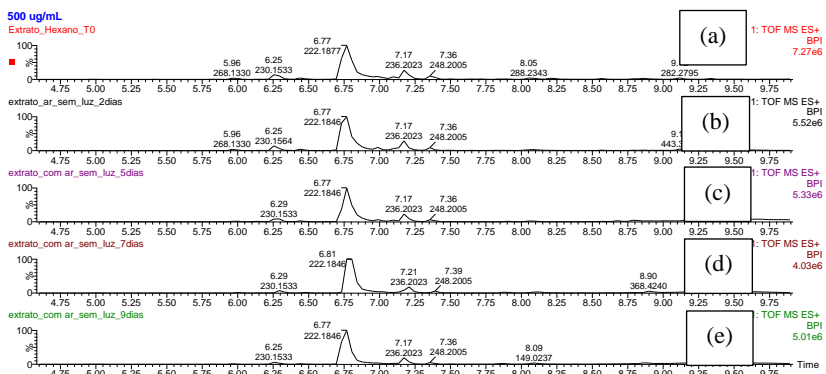


Figura 84 - Expansão dos cromatogramas de íon de pico base (BPI) obtidos no modo de ionização positivo. Amostras do grupo D2, nos tempos 0 (a), 2 (b), 5 (c), 7 (d) e 9 dias (e).

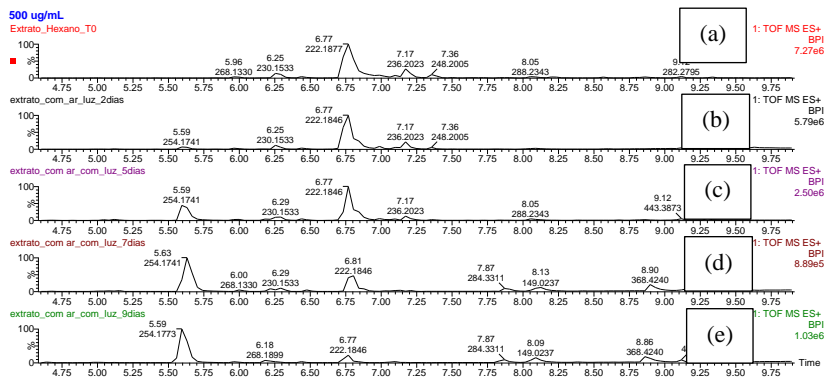
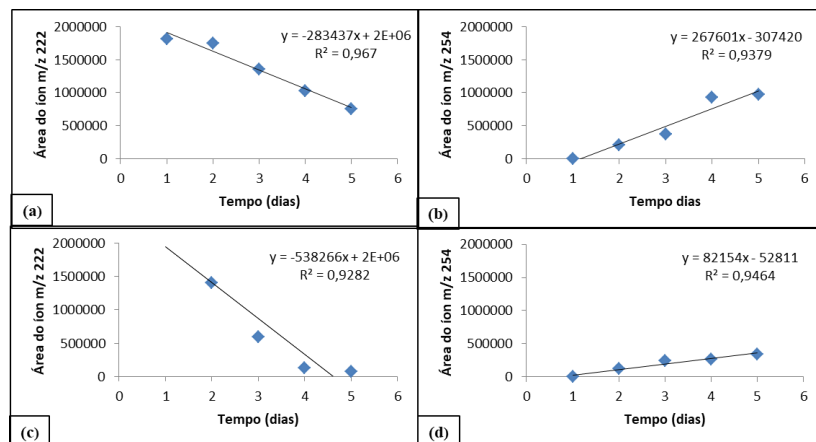


Figura 85 - Gráficos da área versus tempo obtidos a partir da extração dos íons: m/z 222 do grupo C2 (a); m/z 254 do grupo C2 (b); m/z 222 do grupo D2 (c) e m/z 254 do grupo D2 (d).



Os ensaios de fotodegradação mostraram que a presença da luz é fator essencial para que ocorra a conversão do espilantol à dioxiacmellamida. Entretanto, a não conversão quando o espilantol estava em solução, é indicativo de que o solvente cria uma barreira,

impedindo que o oxigênio entre em contato com a substância, evitando, assim, a conversão.

5.5 Avaliação das atividades leishmanicida e tripanocida

Os ensaios farmacológicos para as atividades leishmanicida e tripanocida foram realizados pela Dr^a Milene Hoer Moraes, sob a supervisão do Prof. Dr. Mario Steindel, no Laboratório de Protozoologia da UFSC.

Nestes ensaios foram investigadas as atividades antiprotozoárias *in vitro* do extrato bruto etanólico (EA1), das suas frações (hexano, diclorometano, acetato de etila e resíduo aquoso) e das alcamidas AC1, AC2 e AC4 contra as amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis*, que é o agente causador da doença leishmaniose cutânea e *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas.

Os resultados, apresentados na Tabela 16, foram expressos em porcentagem de inibição de crescimento dos parasitos. A capacidade das amostras em inibir o crescimento dos parasitos foi avaliada na concentração de 50 µg/ml para o extrato e suas frações e na concentração de 50 µM para as alcamidas. O controle negativo empregado foi a solução de DMSO (1%), que não interferiu no crescimento dos parasitos ao longo dos ensaios. Como controle positivo, utilizou-se a Anfotericina B na concentração de 1,0 µM, contra *L. amazonensis* e Benznidazol a 15,0 µM no ensaio contra *T. cruzi*.

Dentre as substâncias avaliadas, apenas a fração hexano do EA1 e a substância AC1 (espilantol) apresentaram atividade leishmanicida, e apenas a fração diclorometano do EA1 apresentou atividade tripanocida.

Como os valores dos ensaios de atividade foram muito baixos, optou-se por não dar continuidade aos testes.

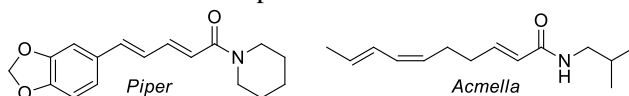
Tabela 16 – Triagem das amostras contra as formas intracelulares de *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*.

Amostra	% Inibição <i>L. amazonensis</i>	% Inibição <i>T. cruzi</i>
<i>A. ciliata</i> extrato bruto (EA1) (50 µg/ml)	NA	NA
Fração hexano (50 µg/ml)	6,20 (±1,72)	NA
Fração diclorometano (50 µg/ml)	NA	12,50 (±5,20)
Fração acetato de etila (50 µg/ml)	NA	NA
Resíduo aquoso (50 µg/ml)	NA	NA
AC1 (50 µM)	2,48 (±1,52)	NA
AC2 (50 µM)	NA	NA
AC4 (50 µM)	NA	NA
Benznidazol 15 µM	-	56,96 (±4,84)
Anfotericina 1 µM	82,82 (±4,24)	-

NA = não ativo

Os valores estão apresentados como a média ± desvio padrão (n = 3).

As alcanidas de Piperaceae também foram avaliadas frente a esses protozoários. A alcanida (*Z*)-piplartina mostrou grande atividade contra *T. cruzi* com um CI50 de 10,5 µM, aproximadamente quatro vezes mais potente que o controle positivo Benznidazol (CI50 = 42,7 µM) (COTINGUIBA et al., 2009). As alcanidas de Piperaceae apresentam um núcleo diferente ao encontrado nas alcanidas de Asteraceae, o que talvez justifique a diferença encontrada entre os estudos de atividade frente a esses protozoários.



Os extratos hidroalcoólicos *Achillea millefolium* e *Spilanthes acmella*, espécies de Asteraceae conhecidas por possuírem alcanidas, mostraram-se inativas contra *L. amazonensis* e *T. cruzi*, a 100 mg/mL (LUIZE et al., 2005). Esses resultados estão em concordância aos observados em nossos ensaios.

Althaus e colaboradores (2014) investigaram o potencial das alcanidas das flores de *Achillea ptarmica* (Asteraceae) contra *T. brucei rhodesiense* (*Tbr*), *T. cruzi* e *L. donovani* e observaram que elas

apresentaram interessante nível de atividade frente à *Tbr*, mas mostraram-se significativamente inativas contra os outros dois.

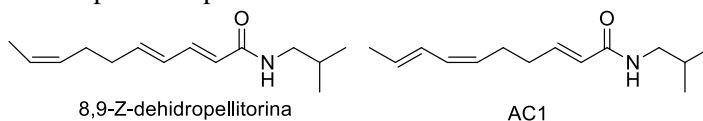
Graças a esse trabalho, fez-se a avaliação da potencial atividade das alcanidas AC1, AC2, AC3 e AC4, contra *Tbr*. Os resultados, resumidos na Tabela 17, foram expressos em CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$), obtido a partir da diluição seriada das amostras ($90 - 0,123 \mu\text{g/mL}$). O melorprosol, fármaco de referência contra *Tbr*, foi utilizado como controle positivo.

Tabela 17 - Valores de CI_{50} em $\mu\text{g/mL}$ da atividade tripanocida *in vitro* frente a forma sanguínea de *Trypanosoma brucei rhodesiense*.

Amostra	<i>Tbr</i> CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
AC1	2,88 ($\pm 0,06$)
AC2	39,05 ($\pm 8,67$)
AC3	5,60 ($\pm 0,67$)
AC4	17,01 ($\pm 2,3$)
Melorprosol	0,004 ($\pm 0,001$)

Os valores estão apresentados como a média \pm desvio padrão ($n = 3$)

As alcanidas acetilênicas AC2 e AC4 não apresentaram atividade, enquanto as alcanidas olefínicas AC1 e AC3 mostraram-se um pouco mais ativas contra as formas sanguíneas de *Tbr*. A atividade de AC1 (CI_{50} 2,88 $\mu\text{g/mL}$) foi semelhante à reportada para a alcanida 8,9-Z-dehidropellitorina (CI_{50} 2,00 $\mu\text{g/mL}$) (ALTHAUS et al., 2014). Ambas as substâncias são alcanidas olefínicas α - β insaturadas, com resíduo isobutil e 10 carbonos na parte ácida. O que as diferenciam são as insaturações: AC1 apresenta uma instauração com configuração *Z* entre C-6 e C-7 e uma instauração com configuração *E* entre C-8 e C-9, contra a instauração *Z* entre C-4 e C-5 e a instauração com configuração *Z* entre C-8 e C-9 da alcanida 8,9-Z-dehidropellitorina. Esses resultados são indicativos de que a conjugação das insaturações C-1, C-2, C-3, C-4 e C-5 são importantes para a atividade frente à *Tbr*.



5.6 Avaliação da atividade antiplasmódica

Os estudos de atividade antiplasmódica foram feitos no Instituto Suíço THP (Suíça) pelo MSc. Marcel Kaiser, em parceria com o Prof. Dr. Thomas Schmidt, da Universidade de Münster (Alemanha).

As alcanidas AC1, AC2, AC3 e AC4 foram avaliadas quanto às suas potenciais atividades frente às cepas NF54 (sensível à cloroquina) e K1 (multirresistente) de *P. falciparum*. O fármaco cloroquina foi utilizado como controle positivo. Avaliou-se também a citotoxicidade frente às células de mioblastos esqueléticos de ratos L6, para determinar a seletividade das amostras testadas, sendo a podofilotoxina utilizada como controle positivo.

A partir da diluição seriada das substâncias, foram obtidos os valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) *in vitro* (Tabela 18).

Tabela 18 – Valores de CI_{50} em $\mu\text{g/mL}$ da atividade antiplasmódica *in vitro* e citotoxicidade (mioblastos esqueléticos de ratos L6) de AC1, AC2, AC3 e AC4.

Amostra	<i>P. falc.</i> NF54 CI_{50}	<i>P. falc.</i> K1 CI_{50}	Citotox. L6 CI_{50}
Cloroquina	0,002 (\pm 0,001)	0,09 (\pm 0,006)	NT
Podofilotoxina	NT	NT	0,004 (\pm 0,001)
AC1	0,99 (\pm 0,12)	NT	39,9 (\pm 1,9)
AC2	19,5 (\pm 2,8)	NT	> 100
AC3	1,29 (\pm 0,20)	0,54 (\pm 0,14)	42,6 (\pm 1,7)
AC4	22,1 (\pm 4,0)	NT	60,1 (\pm 9,4)

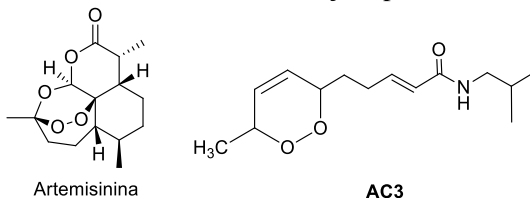
NT = não testado

Os valores estão apresentados como a média \pm desvio padrão (n = 3)

Enquanto as feniletilamidas acetilênicas AC2 e AC4 apresentaram fraca atividade, as isobutilamidas olefínicas AC1 e AC3 apresentaram maior atividade contra *P. falciparum* NF54, sendo candidatas a serem testadas frente à cepa K1.

Assim como observado para o ensaio frente à *Tbr*, a estrutura olefínica α - β insaturada, com resíduo isobutil, mostrou-se mais ativa contra os protozoários de *P. falciparum*. Como Spelman e colaboradores (2011) já haviam avaliado a atividade do espilantol (AC1) frente às cepas PFB (parcialmente resistente à cloroquina) e K1 de *P. falciparum*, com valores de CI_{50} iguais a 16,5 $\mu\text{g/mL}$ e 5,8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, apenas a alcanida AC3 teve a sua atividade avaliada contra a cepa K1.

Além disso, AC3 apresenta a estrutura endoperóxido, que está relacionada ao elemento estrutural mais importante do potente antimalárico artemisinina, tornando-a ainda mais promissora para o teste. AC3 apresentou maior atividade frente à cepa K1 do que contra a cepa NF54, com o valor de CI_{50} de 0,54 $\mu\text{g/mL}$ (2,1 μM) e mostrou considerável seletividade, tendo em vista sua baixa toxicidade frente às células L6 (CI_{50} de 42,6 $\mu\text{g/mL}$ e $IS = 79$), tornando-a um candidato promissor para os ensaios *in vivo* contra infecções plasmodiais.



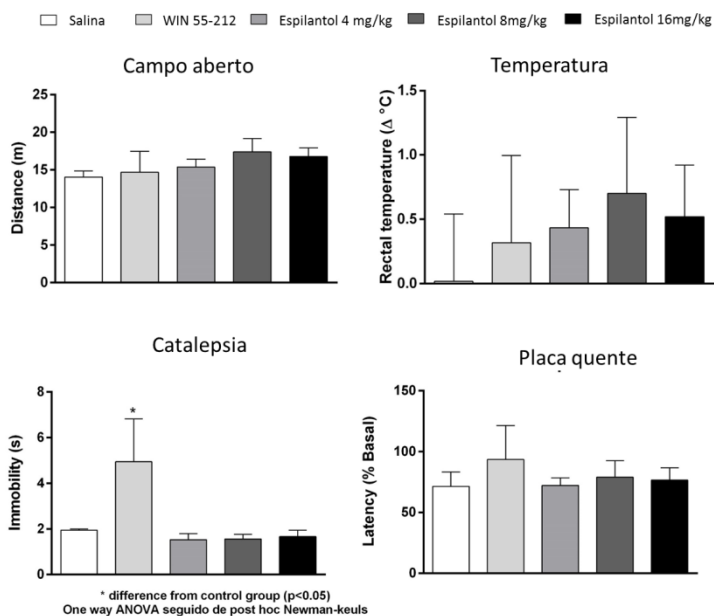
Estes resultados foram publicados em 2016 no periódico *Molecules* (Apêndice 1).

5.7 Ensaio preditivo para atividade canabimimética do espilantol

A escolha das doses teve como base o estudo realizado por Nomura e colaboradores (2013), que avaliaram a capacidade antinociceptiva do extrato aquoso de jambu a 100 mg/kg. Como os autores relataram que o extrato apresentava cerca de 2 % de espilantol, 100 mg/kg de extrato equivaleria a 2 mg/kg de espilantol. Inicialmente fez-se um teste piloto ($n = 3$) nas doses de 1 e 2 mg/kg de espilantol, sem atividade. Por isso, resolveu-se mudar as doses do espilantol para 4, 8 e 16 mg/kg.

A figura 86 abaixo ilustra os efeitos do espilantol administrados por i.p. no teste da tétrede de efeitos canabinoides. Os resultados foram analisados por ANOVA de 1 via (tratamento).

Figura 86 – Efeito do espilantol no teste da tétrede de efeitos canabinoides.

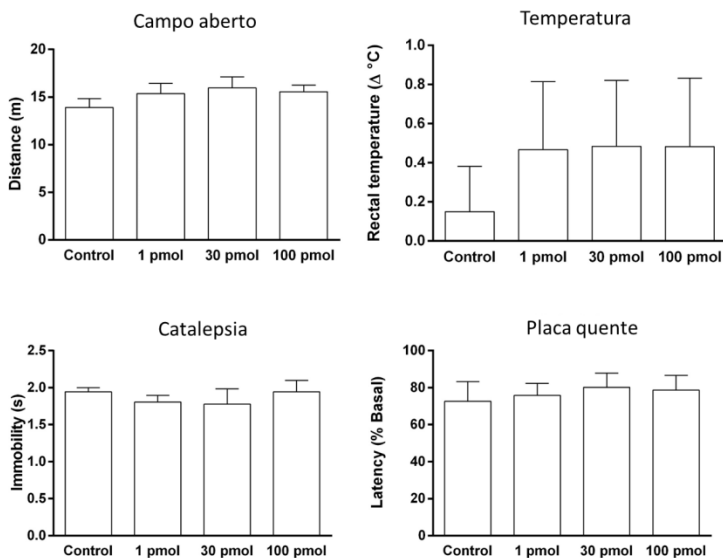


* O espilantol (4, 8 e 16 mg/kg, i.p.) ou controle (WIN 55-212, 3 mg/kg, i.p) e solução salina foram injetados nos camundongos 5 min antes do teste do campo aberto, catalepsia, temperatura corporal e placa quente. * p<0,05 vs. Controle negativo salina (post-hoc de Newman-keuls). (n = 6).

Nos experimentos de campo aberto, temperatura e placa quente nenhuma das amostras apresentou atividade significativas comparadas ao controle. A única diferença ocorreu no teste da catalepsia, sendo observado que o WIN 55-212 aumentou o tempo de imobilidade de 2 para cerca de 5 segundos.

Devido à lipofilicidade do espilantol e para evitar a atividade metabolizante do fígado, foi realizado um segundo teste, administrando-se o espilantol via i.c.v., nas doses de 100, 200 e 400 $\mu\text{mol}/ 2 \mu\text{L}$ e solução salina (2 μL). Esses resultados estão apresentados na Figura 87.

Figura 87 - Efeito do espilantol no teste da tétrade de efeitos canabinoides.



* O espilantol (1, 30 e 100 pmol, i.c.v., 2 μ L) e soluço salina (2 μ L) foram injetados nos camundongos 5 min antes do teste do campo aberto, catalepsia, temperatura corporal e placa quente. * $p < 0,05$ vs. Controle negativo salina (post-hoc de Newman-keuls). (n = 6).

Nos experimentos por administra o i.c.v., o espilantol apresenta a tendência de reduzir a temperatura retal dos camundongos, mas, assim como para os outros três ensaios da tétrade, não apresentou diferenças significativas quando comparadas ao controle.

Por serem estruturalmente semelhantes   anandamida, neurotransmissor endógeno dos receptores canabinoides, as alcanidas alifáticas são classificadas na classe dos fitocannabinoides (WOELKART et al., 2008). Alguns estudos trazem evidências de que o Sistema Canabinoide está relacionado com a prote o do SNC, levantando o interesse de alguns grupos em avaliar a afinidade das alcanidas por esses receptores.

As evidências farmacológicas já relatadas para as alcanidas sobre os receptores canabinoides, descritas no *item 2.5* levantaram a hipótese de que o espilantol também poderia possuir atividade sobre esses receptores, o que não foi observado em nossos ensaios.

Apesar do WIN 55-212-2 ser agonista de CB₁ e CB₂, a tétrede canabinoide é um ensaio preditivo para a atividade apenas sobre os receptores CB₁.

Os receptores CB₂ são expressos principalmente na periferia, em células imunes como os macrófagos. Já no SNC eles são encontrados em pequena quantidade (cerca de 100 vezes menos que CB₁). Alguns estudos mostram que a ativação de CB₂ medeia os efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios em modelos animais de dor e inflamação (KINSEY et al., 2011). Nomura e colaboradores (2013) relataram a atividade antinociceptiva do extrato etanólico das flores de *A. oleracea*, sugerindo que este efeito estava relacionado a presença das alcaloides, principalmente o espilantol.

Desta maneira, o nosso ensaio permitiu concluir que o espilantol não apresenta afinidade por CB₁, por não induzir os efeitos clássicos da tétrede canabinoide. Para a avaliação da atividade em CB₂ outras metodologias, como o Ensaio de deslocamento de radioligantes nos receptores CB₂ podem ser utilizadas (MATOVIC et al., 2007).

5.8 Mapeamento tecnológico do espilantol

Existem diversos trabalhos ressaltando os importantes efeitos farmacológicos e sensoriais causados pelo espilantol. Recentemente, Barbosa e colaboradores (2016) publicaram uma revisão abordando a ocorrência, métodos extrativos, propriedades químicas e biológicas do espilantol. No entanto, até o presente momento, não foram encontrados estudos sobre o mapeamento tecnológico de patentes envolvendo o espilantol.

As análises quantitativas e qualitativas das patentes sobre a alcaloide espilantol (AC1) foram realizadas nas bases de dados internacionais ESPACENET E PATENTSCOPE, no período de 20 anos, entre 1996 – 2016.

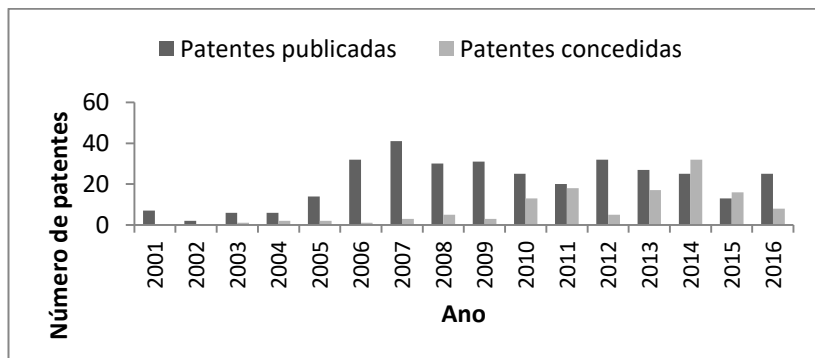
Na base de dados ESPACENET, que faz a busca apenas pelo título e resumo, foram encontradas 35 documentos contendo a palavra-chave “spilanthol*”, no período determinado. Já na PATENTSCOPE, a busca por todos os campos forneceu 1.300 registros, enquanto que na base de dados foram encontrados 78 documentos. É importante destacar que muitas vezes a mesma tecnologia é aplicada em mais de um país, o que faz o número de registros ser maior que o número de tecnologias patenteadas. Os documentos são identificados por duas letras, que

indicam o país onde foi depositado e uma letra no final, mostrando a situação atual (letra A, para depósito e letras B, C ou T para concessão). As patentes iniciadas com “WO” são depósitos provisórios PCT, que é um tratado internacional que oficializa um sistema para o depósito de pedidos de patente e que permite que se obtenham patentes em diversos países a partir de um único pedido, durante 18 meses.

Após a remoção dos dados duplicados, os 462 (336 depósitos e 126 concessões) documentos foram agrupados em quatro categorias, de acordo com a importância tecnológica do espilantol: uso em cosméticos (30); uso farmacológico (30); propriedade sensorial (371) e métodos de obtenção (31), representando um total de 92 tecnologias diferentes. Entre elas a tecnologia intitulada “*Flavor release from multilayer film during brushing*”, depositada pela primeira vez em 2012, pela empresa americana Colgate Palmolive sob o número WO2012002946 (A), é a que tem o maior número de patentes em 12 diferentes países.

A figura 88 apresenta o gráfico com as patentes depositadas e concedidas entre 1996 – 2016. Entre 1996 – 2000, nenhuma patente envolvendo o espilantol foi depositada ou concedida. O número de depósitos começou a aumentar mais ou menos em 2005, chegando ao auge em 2007, diminuindo até 2009 e permanecendo estável até 2016. O ano de 2014 teve o maior número de patentes concedidas.

Figura 88 – Gráfico com as patentes, contendo o espilantol, depositadas (cinza escuro) e concedidas (cinza claro), entre 1996 – 2016.



Dos 30 documentos depositados que envolvem uma propriedade farmacológica do espilantol (Quadro 5), a tecnologia depositada pela empresa da Filipas Phytos e intitulada “*Herbal composition for improving oral hygiene, for providing local anesthesia,*

for use as na oral sensate, flavor enhancer and potentiator, and methods of using same” é referente a uma composição para o tratamento oral de xerostomia (boca seca) contendo *Heliopsis longipes*, tradicional planta mexicana cujas propriedades medicinais estão relacionadas ao espilantol. Além disso, a patente destaca que a padronização do espilantol foi realizada pela primeira vez, possibilitando ensaio quantitativo e padronização da dose de lote para lote.

O documento PCT (WO2010010394 A) intitulado “*Local pharmaceutical compositions*” foi publicado em 2010 por uma empresa do Reino Unido e refere-se a uma composição contendo extrato de *Acmella oleracea* com o objetivo de promover atividade analgésica local.

As outras quatro invenções, que utilizam o espilantol por seu efeito farmacológico, estão relacionadas a sua habilidade de estimular a produção de saliva, também conhecida como propriedade sialagoga.

Apesar da variedade de efeitos farmacológicos já publicados para o espilantol em artigos científicos, incluindo atividades antioxidantes, antimutagênicas, antiinflamatórias, antimicrobianas, larvicidas, inseticidas e neuroprotetoras (Barbosa et al., 2016), são muito recentes considerando a tempo para o desenvolvimento de medicamentos pela indústria farmacêutica, o que mostra que existe espaço para o desenvolvimento de novos medicamentos e formulações com essa substância.

Quadro 5 – Patentes publicadas ou concedidas em que o espilantol foi utilizado por sua atividade farmacológica, obtidas na base de dados Patentscope, entre 1996 – 2016.

Título	Número da patente	Cessionário atual
Local pharmaceutical compositions	WO2010010394 (A)	Neurosolutions Ltd (Reino Unido)
Oral composition for xerostomia	US2016206523 (A)	Chatem, Inc (EUA)

Quadro 5 – (continuação)

Título	Número da patente	Cessionário atual
Herbal composition for improving oral hygiene, for providing local anesthesia, for use as an oral sensate, flavor enhancer and potentiator, and methods of using same	WO03052114 (A); AU2002320057 (A); CA2470464 (A); CA2470464 (C); CN1620509 (A); CN1267079 (C); EP1466003 (A); EP1466003 (B); ES2434126 (T); MXPA04005741 (A); US2002122778 (A); US6746697 (B)	Phytos, Inc (Filipinas)
Palatable solid composition comprising antacid and saliva stimulant	WO2009112156 (A); CN101970008 (A); CN101970008 (B); EP2262534 (A); EP2262534 (B); HK1154201 (A); RU2010141356 (A); RU2497503 (C); ZA201006054 (B)	Bayer consumer care, AG (Suíça)
Sialagogue based oral care products	WO2007092811 (A); CA2641263 (A); GB2448274 (A); JP2009531287 (A); US2007190090 (A)	Whitehill Oral Technologies, Inc. (EUA)
Sialagogue coatings for interproximal devices	WO2007092823 (A); US2006177384 (A)	Whitehill Oral Technologies, Inc. (EUA)

As 32 patentes envolvendo o uso cosmético do espilantol (Quadro 6) estão relacionadas ao apelo anti-idade, devido a sua capacidade em relaxar a musculatura facial, evitando e suavizando as rugas. As patentes da empresa francesa Gattefossé SAS intitulada “Use of spilanthol, e.g. in the form of an *Acmella oleracea* extract, to make a cosmetic antiwrinkle composition” foi publicada em oito diferentes territórios [Áustria (AT401935), Brasil (BRPI0506449), Canadá (CA2549862), Comunidade Europeia (EP1722864), França (FR2865131), Japão (JP2007517842), Espanha (ES2308463) e EUA (US2008069912)]. Essa patente deu origem aos ativos Gatuline® Expression AF e Gatuline® In-tense, que são empregados em diversos produtos cosméticos anti-idade.

A empresa brasileira Natura é responsável pela patente “A process of preparing jambu extract, use of said extract, cosmetic compositions comprising thereof and cosmetic products comprising said cosmetic compositions”, publicada em quatro diferentes territórios [Brasil (BRPI0500886), Canadá (CA2601240), Comunidade Europeia (EP1861486) and EUA (US2008171003)]. Esta tecnologia apresenta o processo de preparação de um extrato de *Acmella oleracea* livre de clorofila e a padronização em conteúdo de espilantol de aproximadamente 20,30% a 28,7%, além de produtos cosméticos com conteúdo de espilantol de 0,001% a 10,00%. Esta invenção originou o ativo Spilol[®], que é utilizado nos produtos anti-idade comercializados pela própria empresa.

Ao contrário das patentes já mencionadas, a invenção “Cosmetic composition for stressed skin under extreme conditions”, publicada pela primeira vez em 2001 pela American FD Management Company, emprega o espilantol como ingrediente botânico para transmitir uma sensação de refrescância, melhorando assim os efeitos das altas temperaturas.

Quadro 6 - Patentes publicadas ou concedidas em que o espilantol foi utilizado em cosméticos, obtidas na base de dados Patentscope, entre 1996 – 2016.

Título	Número da patente	Cessionário atual
A process of preparing jambu extract, use of said extract, cosmetic compositions comprising thereof and cosmetic products comprising said cosmetic compositions	WO2006099707 (A); BRPI0500886 (A); BRPI0500886 (B); CA2601240 (A); CA2601240 (C); EP1861486 (A); US2008171003 (A); US9056089 (B)	Natura Cosméticos SA (Brasil)
Cosmetic composition for stressed skin under extreme conditions	WO0195728 (A); AU6845101 (A); US2002012640 (A); US6649178 (B)	FD Management, INC (EUA)
Cosmetic composition to accelerate repair of functional wrinkles	WO2008020954 (A); GB2454623 (A); US2007048245 (A); US7566464 (B); US2009280078 (A); US8025907 (B)	Belfer William A (EUA)

Quadro 6 – (continuação)

Título	Número da patente	Cessionário atual
Use of spilanthol, e.g. in the form of an <i>Acmella oleracea</i> extract, to make a cosmetic antiwrinkle composition	WO2005072698 (A); AT401935 (T); BRPI0506449 (A); CA2549862 (A); EP1722864 (A); EP1722864 (B); ES2308463 (T); FR2865131 (A); FR2865131 (B); JP2007517842 (A); US2008069912 (A); US7531193 (B)	Gattefossé SAS (França)

O maior número de patentes envolve o uso do espilantol graças a sua propriedade sensorial, com 79 diferentes tecnologias publicadas (Quadro 7). O espilantol é amplamente utilizado em composições de cuidado oral, produtos pessoais, produtos de limpeza, bebidas e alimentos, devido a sua propriedade espilantol, como sialagoga, pungete, formigamento, aquecimento e sensação de refrescância.

Para ilustrar, pode ser citada a tecnologia EP1121927 depositada na Europa em 2001, pela empresa japonesa Takasago Perfumery, e intitulada "*A composition causing different skin sensations*". Esta patente refere-se a uma composição contendo o espilantol combinado com outras substância com propriedades sensoriais, que causa uma sensação inicial imediata de refrescância e formigamento, dirigida a um produto alimentício, farmacêutico ou pessoal. O espilantol também é empregado pela sua propriedade de formigamento na patente intitulada "*Flavor release from multilayer film during brush*", que está relacionada a composições de cuidado oral que compreendem uma película com múltiplas camadas, em que o espilantol é liberado durante a escovação.

Outro exemplo é a invenção "*Additive for carbonated beverage*", publicada pela empresa japonesa Ogawa & CO, na qual uma pequena quantidade de espilantol é utilizada como um aditivo para bebidas carbonatadas com o objetivo de aumentar a estimulação desejável de carbonatação produzida pelo dióxido de carbono, aumentando e mantendo a sensação dessas bebidas.

O espilantol também é utilizado como um melhorador de sabor. Esta habilidade é descrita, por exemplo nas patentes "*Food or drink flavor-reinforcing agent*", "*Food products containing a fruit componente*", "*Taste-improving agent for sweetener having high*

sweetness” e “*Taste-improving agent for potassium salto or potassium salt-containing food or drink*”.

A invenção intitulada “*Oral compositions*”, publicada pela empresa alemã Symrise GMBH & CO. KG na Comunidade Europeia e EUA, está no campo dos alimentos e suplementos alimentares e está relacionada a uma composição contendo pelo menos uma alcamida (o espilantol está na lista) para diminuir o excesso de peso e os seus efeitos negativos associados. De acordo com essa patente, os efeitos sensoriais das alcamidas são utilizados para diminuir o apetite e/ou criar uma sensação de saciedade.

Quadro 7 – Patentes publicadas ou concedidas em que o espilantol foi utilizado por suas propriedades sensoriais, obtidas na base de dados Patentscope, entre 1996 – 2016.

Título	Número da patente	Concessionário atual
(3R)-L-menthyl 3-hydroxybutyrate, process for producing the same, and sensate composition comprising the same	WO2010123111 (A); CN102414290 (A); CN102414290 (B); EP2423291 (A); EP2423291 (B); JP2010254622 (A); US20100280110 (A); US8476472 (B)	Takasago Perfumery CO LTD (Japão)
1H-pyrrole-2,4-dicarbonyl-derivatives and their use as flavoring agents	WO2015014609 (A); CA2921483 (A); CN105473002 (A); EP2832233 (A); EP3041370 (A); US2016198747 (A)	IMAX Discovery GMBH (Alemanha)
A composition causing different skin sensations	AT490759 (T); BR0100254 (A); BR0100254 (B); EP1121927 (A); EP1121927 (B); ID29168 (A); JP2001279227 (A); US2003215532 (A); US2004052735 (A); US6780443 (B); US6890567 (B); US6899901 (B)	Takasago Perfumery CO LTD (Japão)

Quadro 7 – (continuação)

Título	Número da patente	Concessionário atual
Additive for orally administered composition	WO2016031292 (A) TW201625140 (A)	San-Ei Gen FFI INC (Japão)
Additive for carbonated beverage	WO2006068065 (A); JP2006166870 (A); JP4679132 (B) KR20070098852 (A); TW200633653 (A); TWI380782 (B); US2008050500 (A); US2014193561 (A)	Ogawa & CO LTD (Japão)
Anti-dandruff and anti-itch compositions containing a cooling sensate material and a cooling sensate enhancer	BR0204271 (A); CN1436520 (A); EP1332772 (A); US2003161802 (A); US2004086476 (A)	International Flavors & Fragrances INC (EUA)
Aroma composition for reducing or suppressing unwanted bitter and astringent impressions	EP2008530 (A); EP2008530 (B); US2008317923 (A)	Symrise GMBH & CO. KG (Alemanha)
Aroma compositions of alkamides with hesperetin and/or 4-hydroxydihydrochalcones and their salts for reinforcing sweet sensory impressions	EP1977655 (A); EP1977655 (B); US2008242740 (A)	Symrise GMBH & CO. KG (Alemanha)
Aroma substances included in cellulose	DE102008044126 (A); EP2196098 (A); EP2196098 (B) US2010129516 (A); US9034409 (B)	Symrise GMBH & CO. KG (Alemanha)
Brightening and/or colouring agent with improved product sensation	DE102006016580 (A); EP1842573 (A)	Henkel AG & CO KGAA (Alemanha)
Brightening and/or colouring composition with improved product sensation	DE102006031409 (A); EP1880705 (A)	Henkel AG & CO KGAA (Alemanha)

Quadro 7 – (continuação)

Título	Número da patente	Concessionário atual
Caramel pigment-containing beverage	JP2016144435 (A)	Suntory Holdings LTD (Japão)
Carbonation enhancer	WO2015033964 (A); CN105491893 (A); JP2015047148 (A); JP5500664 (B); US2016213047 (A)	T Hasegawa CO LTD (Japão)
Chewing gum composition moistening mouth cavity (versions) and products containing it	RU2013111808 (A);RU2539636 (C)	Kraft Foods Global Brands LLC (EUA)
Chewing gum containing a trigeminal stimulant	DE102005042782 (A) GB2423914 (A); US2005202118 (A)	WM. Wrigley Jr. Company (EUA)
Clean perception oral care products	WO2008048910 (A); WO2008048910 (B); US2007107747 (A)	Whitehill Oral Technologies, Inc. (EUA)
Compositions comprising a pungent agent	WO2015134829 (A); CN106062164 (A); MX2016011553 (A); US2015252306 (A)	Procter & Gamble (EUA)
Compositions comprising perhydrolases and alkylene glycol diacetates	WO2009015951 (A); DE102007036392 (A); EP2171048 (A); US2010196287 (A)	Henkel AG & CO KGAA (Alemanha)
Confectioneries providing mouth-moistening refreshment	WO2010096542 (A); AU2010216002 (A); AU2010216002 (B); BRPI1008454 (A); CN102448317 (A); CN102448317 (B); JP2012521192 (A); JP2014204732 (A) JP5639085 (B); MX2011008736 (A); RU2011138233 (A); RU2488277 (C); US2012040057 (A)	Kraft Foods Global Brands LLC (EUA)

Quadro 7 – (continuação)

Título	Número da patente	Concessionário atual
Dental preparations comprising 21 enzymes	EP1806126 (A); EP1806126 (B); DE102006001148 (A); DE102006001148 (B)	Henkel AG & CO KGAA (Alemanha)
Dental treatment composition with increased bleaching effect	WO2007147815 (A); DE102006029344 (A)	Henkel AG & CO KGAA (Alemanha)
Dentifrice composition	JP2010037318 (A); JP5251350 (B)	Lion Corp (Japão)
Device, use of the device and method for producing a liquid flavor additive condensate	EP2113771 (A); DE102008022347 (A); US2009274812 (A)	Symrise GMBH & CO. KG (Alemanha)
Dried bilberries for influencing intestinal conditions	EP2135616 (A); EP2135616 (B)	Symrise GMBH & CO. KG (Alemanha)
Encapsulated vaccinium extracts with balanced gastrointestinal release	EP2022503 (A); EP2022503 (B); US2009041872 (A); US7914825 (B)	Symrise GMBH & CO. KG (Alemanha)
Enhanced perfume compositions	WO2016138186 (A)	Takasago Perfumery CO LTD (Japão)
Enhanced release of lipophilic ingredients from chewing gum with hydrocolloids	WO2011163152 (A); AU2011271161 (A); AU2011271161 (B); BR112012032882 (A); CA2801213 (A); CA2801213 (C); CN103228151 (A); EP2584911 (A); JP2013529468 (A); JP5684906 (B); MX2012014392 (A); RU2013103351 (A); RU2530513 (C); US2013316042 (A)	Kraft Foods Global Brands LLC (EUA)

Quadro 7 – (continuação)

Título	Número da patente	Concessionário atual
Flavor and fragrance composition	WO2006137556 (A); CA2611733 (A); CN101238203 (A); CN101238203 (B); EP1896557 (A); EP1896557 (B); JP2007002005 (A); JP4799921 (B); KR20080016884 (A); KR101231546 (B); US2009275669 (A); US8071531 (B)	Takasago Perfumery CO LTD (Japão)
Flavor enhancer, food or beverage containing the flavor enhancer, and method of flavor enhancement	WO2005004635 (A); AT472256 (T) EP1649759 (A); EP1649759 (B); ES2347656 (T); JP4611203 (B); RU2006103868 (A); RU2363259 (C); US2006159818 (A)	Takasago Perfumery CO LTD (Japão)
Flavor release from multilayer film during brushing	WO2012002946 (A); AU2010356342 (A); AU2010356342 (B); BR112012030192 (A); CA2802649 (A); CA2802649 (C); CN102958495 (A); EP2588063 (A); JP2013529682 (A); MX2012013635 (A); RU2013103787 (A); RU2552316 (C); SG185629 (A); TW201215411 (A); TWI436785 (B); US2013095159 (A); ZA201209002 (B)	Colgate Palmolive CO (EUA)
Food or drink flavor-reinforcing agent	JP2006296356 (A); JP4530906 (B)	Ogawa & CO LTD (Japão)
Food products containing a fruit component	WO2005048743 (A); AT517559 (T); CN1874693 (A); CN1874693 (B); EP1689256 (A); EP1689256 (B); JP2005143461 (A); JP4435544 (B); US2007092623 (A)	Takasago Perfumery CO LTD (Japão)

Quadro 7 – (continuação)

Título	Número da patente	Concessionário atual
Gelatinous food and drink product	JP2016136858 (A)	San-Ei Gen FFI INC (Japão)
Grain processed food	JP2016136857 (A)	San-Ei Gen FFI INC (Japão)
Imidazo[1,2-a]pyridine-ylmethyl-derivatives and their use as flavoring agents	WO2015014607 (A); EP2832234 (A)	IMAX Discovery GMBH (GER)
Menthol derivative and cooling agent composition comprising the same	WO2005115325 (A); CN1950057 (A); CN1950057 (B); EP1761238 (A); EP1761238 (B); ES2393397 (T); JP2005343915 (A); JP4563079 (B); KR20070023707 (A); KR101084875 (B); US2007225378 (A); US7923585 (B)	Takasago Perfumery CO LTD (Japão)
Methods for coating dental devices with sialagogue emulsions	WO2007127673 (A); US20060201531 (A)	Whitehill Oral Technologies, INC (USA)
Mouth and dental care cleaning agents, useful as mouth and tooth-powders, -pastes, -creams and -gels, comprise flowable carrier containing water, and flowable carrier	DE102008033105 (A)	Henkel AG & CO KGAA (Alemanha)
Mouth and dental care, and cleaning agent, useful e.g. to treat the surface defectiveness of the tooth, gingivitis, periodontitis and/or halitosis, comprises egg yolk and/or its extract	DE102006060947 (A)	Henkel AG & CO KGAA (Alemanha)
Mouth and tooth care and cleansing agent comprising enzymes	WO2007085428 (A); DE102006004079 (A); EP1979052 (A)	Henkel AG & CO KGAA (Alemanha)

Quadro 7 – (continuação)

Título	Número da patente	Concessionário atual
Mouth-moistening gum compositions and products containing the same	WO2012024410 (A); WO2012024469 (A); AU2011291960 (A); AU2011292170 (A); AU2011291960 (B); AU2011292170 (B); BR112013003698 (A); CA2806731 (A); CA2806959 (A); CN103153080 (A); CN103153081 (A); CN103153080 (B); CN103153081 (B); EP2605665 (A); JP2013534145 (A); JP2013534146 (A); MX2013001943 (A); RU2013111779 (A); RU2536137 (C); US20130216649 (A); US2014004223 (A)	Kraft Foods Global Brands LLC (EUA)
Mouthwash and dentifrice and cleansing composition	DE102005049972 (A); DE102005049973 (A); EP1774954 (A); EP1774956 (A); EP1774954 (B)	Henkel AG & CO KGAA (Alemanha)
Mouthwash concentrate	DE102005049974 (A); EP1774953 (A)	Henkel AG & CO KGAA (Alemanha)
Non-fermented beer-like effervescent drink	WO2016063822 (A); JP2016082898 (A); TW201621038 (A)	Asahi Breweries LTD (Japão)
Numbing oral and tooth care and cleaning agents	DE102007038259 (A); EP2025319 (A); EP2025319 (B)	Henkel AG & CO KGAA (Alemanha)
Oleanene-type triterpene glycosides as masking agents	WO2013023891 (A); EP2559346 (A); EP2559346 (B)	Symrise GMBH & CO. KG (Alemanha)
Oral and dental hygiene and cleaning products with improved fluoride deposition	WO2008074625 (A); DE102006060946 (A); EP2104485 (A)	Henkel AG & CO KGAA (Alemanha)

Quadro 7 – (continuação)

Título	Número da patente	Concessionário atual
Oral and tooth care and cleaning agents for combating halitosis	DE102006060911 (A); EP1935397 (A); EP1935397 (B)	Henkel AG & CO KGAA (Alemanha)
Oral and tooth care and cleaning agents with pomegranate extract	DE102008020696 (A); EP2111853 (A)	Henkel AG & CO KGAA (Alemanha)
Oral compositions	EP2767174 (A); EP2767174 (B); US2014234412 (A); US9468225 (B)	Symrise GMBH & CO. KG (Alemanha)
Performance-enhanced cosmetic compositions with purine and/or purine derivatives	WO2008049651 (A); DE102006050984 (A)	Henkel AG & CO KGAA (Alemanha)
P-menthane-3,8-diol isomer mixture, composition comprising the same, and products comprising the mixture or composition	JP2013112634 (A); US20130136704 (A)	Takasago Perfumery CO LTD (Japão)
Process for producing (3s)-i-menthyl 3-hydroxybutyrate and sensate composition	WO2010123110 (A); BRPI1015101 (A); CN102414291 (A); CN102414291 (B); EP2423290 (A); JP2010254621 (A); JP5546788 (B); KR20120003462 (A); MX2011011244 (A); SG10201401711S (A); SG175326 (A); US2010303740 (A); US2012321773 (A); US2014037559 (A); US8309062 (B); US8586009 (B); US8986660 (B)	Takasago Perfumery CO LTD (Japão)
Psychic energizer agent and psychic energizer composition	WO2012165406 (A); CN103582495 (A); EP2716303 (A); JP2012246278 (A); US2014205688 (A)	Takasago Perfumery CO LTD (Japão)

Quadro 7 – (continuação)

Título	Número da patente	Concessionário atual
Ready-to-use mouthwash	EP1774955 (A); DE102005049981 (A)	Henkel AG & CO KGAA (Alemanha)
Remineralizing products	WO2007068403 (A); DE102006009782 (A)	Henkel AG & CO KGAA (Alemanha)
Saltiness enhancer	WO2016088638 (A); JP2016106547 (A)	Ogawa & CO LTD (Japão)
Sensation masking composition	WO2007022056 (A); EP1912516 (A); EP1912516 (B) EP2810564 (A); JP2009504675 (A); US2007036733 (A); US2010093869 (A); US2015327583 (A); US8920864 (B)	Takasago Perfumery CO LTD (Japão)
Sensory stimulation for cessation of eating	WO2014182791 (A); CN105377278 (A); EP2994151 (A); US2016067237 (A)	Willpower Labs INC (EUA)
Shampoo or body detergent composition	WO2004112735 (A); CN1805728 (A); CN1805728 (B); EP1639993 (A); JP2005008535 (A); JP4018032 (B); US2006160713 (A); US2010234260 (A)	Takasago Perfumery CO LTD (Japão)
Sparkling-prickling mouthwash preparations	EP2138152 (A); DE102008029665 (A)	Henkel AG & CO KGAA (Alemanha)
Suspension of composite material, useful e.g. as biomineralization component to treat teeth/bone, comprises water, water-soluble surfactant and/or water- soluble polymeric protective colloid and calcium salt, and salt of organic acid	DE102008017721 (A)	Sustech GMBH & CO KG (Alemanha)

Quadro 7 – (continuação)

Título	Número da patente	Concessionário atual
Suspensions of composite materials	WO2008074626 (A); DE102006060910 (A)	Henkel AG & CO KGAA (Alemanha)
Synergistic salivation agents	WO2006112961 (A); EP1863466 (A); US2006204551 (A); US2014099391 (A); US8435542 (B)	Takasago Perfumery CO LTD (Japão)
Taste improver for high intensity sweetener	WO2011024471 (A); EP2471383 (A); AU2010287928 (A); AU2010287928 (B); CN102481004 (A); CN102481004 (B); JP2011045305 (A); JP5525210 (B); US2012156351 (A)	Ogawa & CO LTD (Japão)
Taste-improving agent for potassium salt or potassium salt-containing food or drink	WO2009157419 (A); EP2305048 (A); EP2305048 (B); JP2010004767 (A); JP5452893 (B); JP2011130669 (A); JP5639758 (B); TW201000026 (A); TWI511674 (B); US2011104361 (A); US2013224361 (A)	Ogawa & CO LTD (Japão)
Taste-improving agent for sweetener having high sweetness	WO2006087991 (A); JP2006223104 (A); JP4688517 (B); TW200640377 (A)	Ogawa & CO LTD (Japão)
Taste-reinforcing agent and spice containing the taste-reinforcing agent and food or drink containing the spice	JP2006296357 (A); JP4508932 (B)	Ogawa & CO LTD (Japão)
Tingling and salivating compositions	WO2007144800 (A); AR061342 (A); BRPI0712006 (A); CN101466272 (A); EP2031977 (A); JP2009539397 (A); JP5039134 (B); US2009155445 (A)	Firmenich & CIE (Suíça)

Quadro 7 – (continuação)

Título	Número da patente	Concessionário atual
Tooth-cleaning agent composition	JP2008115115 (A)	Lion CORP (Japão)
Toothpaste suitable for diabetes patients	CN102113986 (A); CN102113986 (B)	Liuzhou LMZ CO LTD (China)
Topical warming composition	WO2006130710 (A); BRPI0613324 (A); EP1885275 (A); JP2008542387 (A); US20060269500 (A)	Takasago Perfumery CO LTD (Japão)
Use of a liquid cooling sensate to provide a pungent, warming or tingling sensate composition	US2008038386 (A)	Moza Ashok K (EUA)
Use of alkamides for masking an unpleasant flavor	EP2058297 (A); EP2058297 (B); US2009124701 (A); US8828469 (B)	Symrise GMBH & CO. KG (Alemanha)
Use of alkene carboxylic acid n alkylamides as flavouring agents	WO2005044778 (A); CN1878745 (A); DE10351422 (A); EP1682489 (A); JP2007510634 (A); US2007202188 (A)	Symrise GMBH & CO. KG (Alemanha)
Use of mixtures of calcium salts and salivation promoters in products that are introduced into the oral cavity or for remineralizing or neomineralizing the teeth	DE102005060182 (A)	Henkel AG & CO KGAA (Alemanha)
Use of rubusoside for reducing or suppressing certain unpleasant taste impressions	EP2386211 (A); EP2386211 (B); RU2011118615 (A); RU2567175 (C); US2011293538 (A); US2014287122 (A)	Symrise GMBH & CO. KG (Alemanha)
Xylitol-containing composition	JP2001178395 (A); JP3939478 (B)	Lion CORP (Japão)

O Quadro 8 apresenta as patentes relacionadas à obtenção do espilantol. Três diferentes tecnologias já foram publicadas com essa finalidade. Em 2009, a empresa japonesa Takasago Perfumery CO depositou um PCT intitulado “*Synthetic spilanthol and use thereof*” (WO2009091040). Essa tecnologia, patenteada na China, Comunidade Europeia, EUA e Japão, descreve um método para produzir espilantol em larga escala sem a necessidade de usar reagentes caros. Essa empresa japonesa também desenvolveu uma patente que descreve uma amida esterificada como intermediário para a reação de produção do espilantol. Por fim, a empresa francesa Robertet AS publicou a tecnologia “*Novel process for concentrating spilanthol and/or isomers and/or homologues thereof*” na Austrália, Canadá, Comunidade Europeia, EUA, França e México. Essa patente está relacionada a um novo processo para concentrar o espilantol a partir dos extratos de *Acmella* e *Spilanthes*.

Quadro 8 - Patentes publicadas ou concedidas sobre as formas de obtenção do espilantol, obtidas na base de dados Patentscope, entre 1996 – 2016.

Título	Número da patente	Concessionário atual
Method for manufacturing spilanthol and intermediate manufacturing product therefor	WO2011007807 (A); CN102471238 (A); CN102471238 (B); EP2455363 (A); EP2455363 (B); ES2512240 (T); IN361DEN2012 (A); US2012116116 (A); US9029593 (B)	Takasago Perfumery CO LTD (Japão)
Novel process for concentrating spilanthol and/or isomers and/or homologues thereof	WO2013110883 (A); AU2013213467 (A); CA2863147 (A); EP2807144 (A); FR2986001 (A); FR2986001 (B); MX2014009012 (A); US2014371321 (A)	Robertet SA (França)
Synthetic spilanthol and use thereof	WO2009091040 (A); CN101910116 (A); CN101910116 (B); EP2236489 (A); JPWO2009091040 (A); JP5401708 (B); US2010184863 (A); US2011105773 (A); US2014227200 (A); US8217192 (B); US8741958 (B); US9486395 (B)	Takasago Perfumery CO LTD (Japão)

De maneira geral, este mapeamento permitiu verificar a importância do uso tecnológico do espilantol nas áreas cosmética e alimentícia e constatar que as propriedades farmacológicas publicadas nos periódicos científicos não vêm se refletindo em produtos tecnológicos.

Apesar de estarmos vivendo em um mercado globalizado, competitivo e repleto de inovações tecnológicas, a exploração das patentes como fonte de informação científica e tecnológica ainda não é uma prática disseminada no Brasil. Segundo Ferreira et al. (2009), isso se deve à falta de cultura com relação a pesquisas de tecnologias patenteadas.

O Catálogo de Teses e Dissertações da Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoa de Nível Superior (CAPES) disponibiliza os trabalhos desenvolvidos pelas Instituições de Nível Superior do nosso país. Já o *website* (www.inpi.gov.br) do Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), órgão federal responsável pelo sistema de Propriedade Industrial no Brasil, é possível pesquisar as tecnologias depositadas/patenteadas.

Segundo essas bases de dados, 22 trabalhos (cinco teses e 16 dissertações) envolvendo o espilantol foram desenvolvidos no Brasil, de 2007 a 2016, sendo dois patenteados. A tese da Dra. Vanessa Mendes Santos Cavalcanti, realizada em 2008 na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), resultou no pedido de patente PI0802052-3 A2 intitulado “Processo de extração de compostos ativos de material vegetal”. Mais recentemente, o pedido de patente BR1020140224866 A2 (Processo de purificação de extrato de jambu, extrato purificado assim obtido, composição anestésica e bioadesivo contendo extrato purificado de jambu; e usos) foi originado a partir da dissertação da Msc. Verônica Santana de Freitas Blanco (UNICAMP).

No Brasil, os grandes desenvolvedores de tecnologia encontram-se nas universidades; porém, a tecnologia desenvolvida nem sempre se reflete em produtos para a sociedade. As universidades têm o papel tradicional de disseminar o conhecimento livremente através da educação e pesquisa. Mais além, nos dias de hoje elas também têm o papel de realizar o desenvolvimento tecnológico por meio da inovação e empreendedorismo científico.

Um estudo feito por De Carli e colaboradores (2017) mostrou que, no período de 2004 a 2011, houve uma evolução nos números de depósitos de patentes pelas Universidades brasileiras. O levantamento

dos depósitos de patentes pelas dez universidades do Brasil que mais patentearam no período estudado indica alguns aspectos em relação ao desenvolvimento tecnológico: a universidade que mais deposita patentes é a UNICAMP, com um total de 771, a segunda é a USP, com 637 e a UFSC está em sexto lugar, com 205 no período. A maior quantidade de depósitos de patentes aconteceu em parceria das universidades com outros institutos de pesquisa, órgãos de fomento e empresas privadas. Os autores argumentam que quanto maiores os esforços para a produção e desenvolvimentos conjuntos de patentes, maiores serão os benefícios angariados aos seus agentes: pelo lado das universidades, por exemplo, para a aplicação prática dos conhecimentos desenvolvidos, pela conquista até mesmo de retornos financeiros, que podem vir a melhorar o desenvolvimento de pesquisas; pelo lado das empresas, para que possam ter acesso a distintos conhecimentos, a melhorias naquilo que desenvolvem, a produzir com mais qualidade.

Desta maneira, é necessário que haja investimentos, públicos e privados, na área da inovação, para que as universidades possam transformar os conhecimentos publicados nas teses e nos artigos científicos em benfeitorias para a sociedade.

6 CONCLUSÕES

Os estudos de fragmentação por UHPLC-MS-MS do extrato bruto de *Acmella ciliata* e suas frações permitiram a desreplicação e identificação de 10 alcaloides das partes aéreas de *A. ciliata*, entre elas a dioxiacmellamida, inédita na literatura, e a (7Z)-N-(isobutil)-7-tridecaen-10,12-diinamida, nova para o gênero *Acmella*.

Das 10 alcaloides identificadas, cinco foram isoladas por procedimentos cromatográficos, tendo suas estruturas caracterizadas por espectroscopia de RMN. Esses estudos permitiram o isolamento e caracterização da dioxiacmellamida, que é provavelmente um derivado formado a partir da oxidação do espilantol, quando o jambu é submetido a situações de estresse oxidativo, como a radiação UVB. O ensaio de fotodegradação mostrou que esse processo não ocorreu quando o espilantol estava em solução metanólica. Verificou-se que a luz é um fator essencial e que o oxigênio precisa entrar em contato direto com o espilantol para que seja convertido à dioxiacmellamida.

A dioxiacmellamida mostrou atividade *in vitro* frente à cepa multirresistente K1 de *Plasmodium falciparum*, com CI_{50} de 0,54 $\mu\text{g/mL}$, sendo um promissor candidato aos estudos *in vivo*.

Os resultados do ensaio preliminar de termodegradação permitiram formular a hipótese de que há a possibilidade de o espilantol sofrer degradação quando submetido aos processamentos térmicos, aos quais o jambu é submetido na culinária.

O espilantol não desencadeou a tétrede canabinoide, indicando não ter afinidade pelos receptores CB_1 . Devido à atividade nociceptiva já relatada para esta substância, há possibilidade que ela tenha afinidade por CB_2 , o que não é possível de ser avaliado pelo ensaio da tétrede canabinoide. Ensaio mais específicos, como o teste de deslocamento de radioligantes nos receptores CB_2 , devem ser empregados para avaliar esta hipótese.

Por fim, o mapeamento tecnológico permitiu verificar que ainda há uma lacuna entre o conhecimento científico produzido e o desenvolvimento de produtos que beneficiem de maneira mais efetiva a sociedade, visto que apesar de existirem diversos trabalhos mostrando o potencial farmacológico do espilantol, poucas são as tecnologias desenvolvidas para tais finalidades. É necessário que haja maiores investimentos, públicos e privados, na inovação e criação de produtos, principalmente nas universidades, que são os principais locais onde a ciência é desenvolvida.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABEYSIRI, G. R. P. I. et al. Screening of phytochemical, physico-chemical and bioactivity of different parts of *Acmella oleracea* Murr. (Asteraceae), a natural remedy for toothache. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 852-856, 2013.
- ABUJAH, C. I.; OGBONNA, A. C.; OSUJI, C. M. Functional components and medicinal properties of food: a review. **Journal of Food Science and Technology**, India, v. 52, n. 5, p. 2522-2529, 2015.
- AGRA, M. F. et al. Medicinal and poisonous diversity of the flora of "Cariri Paraibano", Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 383-385, 2007.
- AKTER, S. et al. Antidiabetic and thrombolytic effects of ethanolic extract of *Spilanthes paniculata* leaves **Journal of Plant Sciences**, v. 2, n. 6, p. 13-18, 2015.
- ALCANTARA, B. N. et al. Pharmacognostic analyses and evaluation of the in vitro antimicrobial activity of *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen (Jambu) floral extract and fractions. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 4, p. 91-96, 2015.
- ALEXANDROS, M. et al. Cannabinoid Receptors as Therapeutic Targets. **Current Pharmaceutical Design**, v. 12, n. 14, p. 1751-1769, 2006.
- ALHAMORUNI, A. et al. Cannabinoids mediate opposing effects on inflammation-induced intestinal permeability. **British Journal of Pharmacology**, Oxford, UK, v. 165, n. 8, p. 2598-2610, 2012.
- ALI, S. A. et al. Diuretic activity of aqueous extract of *Spilanthes paniculata* flower in rats. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 9, n. 3, p. 162-166, 2015.
- ALI, S. L.; SHUKLA, M.; SUBUR, W. K. Hepatoprotective and antioxidant activity of *Spilanthes paniculata* flower extracts on liver damage induced by paracetamol in rats. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 6, n. 42, p. 2905-2911, 2012.

ALTHAUS, J. B. et al. Antiprotozoal activity of *Achillea ptarmica* (Asteraceae) and its main alkalamide constituents. **Molecules**, v. 19, n. 5, p. 6428-6438, 2014.

ALTHAUS, J. B. et al. Alkalamides from *Anacyclus pyrethrum* L. and Their in Vitro Antiprotozoal Activity. **Molecules**, v. 22, n. 5, p. 796, 2017.

AMIT, A. et al. Pharmacological potential of medicinal plant used in treatment of gout. **Drug Invention Today**, v. 2, n. 10, p. 433-435, 2010.

ANDRADE, L. C. et al. Effectiveness of *Acmella oleracea* for topical anesthesia on buccal mucosa. **Revista Odonto Ciencia**, v. 28, n. 3, p. 61-65, 2013.

ARCANJO, D. D. R. et al. Bioactivity evaluation against *Artemia salina* Leach of medicinal plants used in Brazilian Northeastern folk medicine. **Brazilian Journal of Biology**, v. 72, p. 505-509, 2012.

ARRIAGA-ALBA, M.; RIOS, M. Y.; DÉCIGA-CAMPOS, M. Antimutagenic properties of affinin isolated from *Heliopsis longipes* extract. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, n. 8, p. 1035-1039, 2013.

ARTARIA, C. et al. Lifting properties of the alkalamide fraction from the fruit husks of *Zanthoxylum bungeanum*. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 33, n. 4, p. 328-333, 2011.

ASO, E.; FERRER, I. CB(2) Cannabinoid Receptor As Potential Target against Alzheimer's Disease. **Frontiers in Neuroscience**, v. 10, p. 243, 2016.

ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582-1614, 2015.

AVULA, B. et al. Characterization and screening of pyrrolizidine alkaloids and N-oxides from botanicals and dietary supplements using UHPLC-high resolution mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 178, p. 136-148, 2015.

BARBOSA, A. F. et al. Effects of *Acmella oleracea* methanolic extract and fractions on the tyrosinase enzyme. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 321-325, 2016.

BARBOSA, A.F. et al. Spilanthol: Occurrence, extraction, chemistry and biological activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 128-133, 2016b.

BAUER, R.; REMIGER, P. TLC and HPLC analysis of alkamides in *Echinacea* drugs 1,2. **Planta Medica**, v. 55, p. 367-371, 1989.

BAUER, R.; REMIGER, P.; WAGNER, H. Alkamides from the roots of *Echinacea angustifolia*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 2, p. 505-508, 1989.

BAUTISTA, D. M. et al. Pungent agents from Szechuan peppers excite sensory neurons by inhibiting two-pore potassium channels. **Nature neuroscience**, v. 11, n. 7, p. 772-779, 2008.

BENITO, C. et al. Cannabinoid CB2 receptors in human brain inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 277-285, 2008.

BESSADA, S. M. F.; BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Asteraceae species with most prominent bioactivity and their potential applications: A review. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 604-615, 2015.

BEYRER, C. et al. Neglected Diseases, civil conflicts, and the right to health. **The Lancet**, v. 370, n. 9587, p. 9, 2007.

BHAT, Z. S. et al. Comparative analysis of bioactive N-alkylamides produced by tissue culture raised versus field plantlets of *Spilanthes ciliata* using LC-Q-TOF (HRMS). **Journal of Chromatography B**, v. 1017, p. 195-203, 2016.

BINNS, S. E. et al. Light-Mediated Antifungal Activity of *Echinacea* Extracts. **Planta Med**, v. 66, n. 03, p. 241-244, 2000.

BOHLMANN, F.; ZDERO, C.; SUWITA, A. Polyacetylenverbindungen, 225. Weitere Amide aus der Tribus Anthemideae. **Chemische Berichte**, v. 107, n. 3, p. 1038-1043, 1974.

BOHLMANN, F. et al. Neue amide aus *Spilanthes alba*. **Phytochemistry**, v. 19, n. 7, p. 1535-1537, 1980.

BOONEN, J. et al. LC-MS profiling of N-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bio-active spilanthol. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, n. 3, p. 243-249, 2010a.

BOONEN, J. et al. Transdermal behaviour of the N-alkylamide spilanthol (affinin) from *Spilanthes acmella* (Compositae) extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 77-84, 2010b.

BOONEN, J. et al. Alkamid database: Chemistry, occurrence and functionality of plant N-alkylamides. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 3, p. 563-590, 2012.

BOPPRÉ, M.; COLEGATE, S. M. Recognition of Pyrrolizidine Alkaloid Esters in the Invasive Aquatic Plant *Gymnocoronis spilanthoides* (Asteraceae). **Phytochemical Analysis**, v. 26, n. 3, p. 215-225, 2015.

BOSI, C. F. et al. Pyrrolizidine alkaloids in medicinal tea of *Ageratum conyzoides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 3, p. 425-432, 2013.

BRAHMI, Z. et al. Effective Cytochrome P450 (CYP) Inhibitors Isolated from Tarragon (*Artemisia dracunculus*). **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 76, n. 5, p. 1028-1031, 2012.

BRASIL. **Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. MINISTÉRIO DA SAÚDE. SECRETARIA DE CIÊNCIA, T. E. I. E. Brasília 2006.

BRASIL. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Revista Saúde Pública**, v. 44, n. 1, p. 3, 2010.

BRUSOTTI, G. et al. Isolation and characterization of bioactive compounds from plant resources: The role of analysis in the ethnopharmacological approach. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 87, p. 218-228, 2014.

BUTLER, M. S.; ROBERTSON, A. A. B.; COOPER, M. A. Natural product and natural product derived drugs in clinical trials. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 11, p. 1612-1661, 2014.

CABRAL, G. A.; GRIFFIN-THOMAS, L. Cannabinoids as Therapeutic Agents for Ablating Neuroinflammatory Disease. **Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets**, v. 8, n. 3, p. 159-172, 2008.

CALABRIA, L. M. et al. A Phylogenetic Analysis of Tribes of the Asteraceae Based on Phytochemical Data. **Natural Product Communications**, v. 2, n. 3, p. 277-285, 2007.

CAMPILLO, N. E.; PAEZ, J. A. Cannabinoid System in Neurodegeneration: New Perspectives in Alzheimers Disease. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 5, p. 539-559, 2009.

CAMPOS-CUEVAS, J. C. et al. Tissue culture of *Arabidopsis thaliana* explants reveals a stimulatory effect of alkamides on adventitious root formation and nitric oxide accumulation. **Plant Science**, v. 174, n. 2, p. 165-173, 2008.

CARLISLE, S. J. et al. Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. **International Immunopharmacology**, v. 2, n. 1, p. 69-82, 2002.

CASADO, M. et al. Two new alkamides from roots of *Acmella decumbens*. **Natural Product Research**, v. 23, n. 14, p. 1298-1303, 2009.

CASTILHO, C. L. Plantas medicinales utilizadas en el tratamiento de enfermedades ginecológicas en Leticia y Puerto Nariño (Amazonas, Colombia). **Etnobiología**, v. 13, n. 1, p. 53-72, 2015.

CASTRO-RUIZ, J. E. et al. Affinin (Spilanthol), Isolated from *Heliopsis longipes*, Induces Vasodilation via Activation of Gasotransmitters and Prostacyclin Signaling Pathways. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 218, 2017.

CASTRO, K. N. C. et al. Acaricide activity in vitro of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus*. **Parasitology Research**, v. 113, n. 10, p. 3697-3701, 2014.

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

CHAKRABARTY, R.; ACHARYA, G. C.; SARMA, T. C. Antifungal activity of some plant extracts against *Ganoderma lucidum* (Curtis ex. Fr.) karst., causing basal stem rot disease in arecanut. **The Bioscan**, v. 9, n. 1, p. 277-281, 2014.

CHAKRABORTY, A. et al. Preliminary studies on antiinflammatory and analgesic activities of *Spilanthes acmella* in experimental animal models. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 36, n. 3, p. 3, 2004.

CHEN, G. et al. Applications of LC/MS in structure identifications of small molecules and proteins in drug discovery. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, n. 3, p. 279-287, 2007.

CHEN, Y. et al. Macrophage Activating Effects of New Alkamides from the Roots of *Echinacea* Species. **Journal of Natural Products**, v. 68, n. 5, p. 773-776, 2005.

CHENG, Y. B. et al. Alkylamides of *Acmella oleracea*. **Molecules**, v. 20, n. 4, p. 6970, 2015.

CHENNIAPPAN, K.; KADARKARAI, M. In vitro antimalarial activity of traditionally used Western Ghats plants from India and their interactions with chloroquine against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. **Parasitology Research**, v. 107, n. 6, p. 1351-1364, 2010.

CHRISTENSEN, L. P. Acetylenes and related compounds in anthemideae. **Phytochemistry**, v. 31, n. 1, p. 7-49, 1992.

CHRISTENSEN, L. P.; LAM, J. Acetylenes and related compounds in heliantheae. **Phytochemistry**, v. 30, n. 1, p. 11-49, 1991.

CILIA-LÓPEZ, V. G. et al. Analgesic activity of *Heliopsis longipes* and its effect on the nervous system. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 2, p. 195-200, 2010.

CORTEZ-ESPINOSA, N. et al. Valine and phenylalanine as precursors in the biosynthesis of alkamides in *Acmella radicans*. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 6, p. 857-861, 2011.

COTINGUIBA, F. et al. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Medicinal Chemistry Research**, v. 18, n. 9, p. 703, 2009.

CRUZ, I. et al. Alkamides from *Echinacea* disrupt the fungal cell wall-membrane complex. **Phytomedicine**, v. 21, n. 4, p. 435-442, 2014.

CRUZ, P. B. et al. Acaricidal activity of methanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthal on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 228, p. 137-143, 2016.

DAISY, M. J.; RAJU, A. R.; SUBIN, M. P. Qualitative Phytochemical Analysis and in vitro Antibacterial Activity of *Acmella ciliata* (H.B.K) Cassini and *Ichnocarpus frutescens* (Linn.) R.Br. Against Two Pathogenic Bacteria **Nature Environment and Pollution Technology**, v. 12, n. 1, p. 167-170, 2013.

DAS, B. K. et al. Antinociceptive activity of methanol extract of *Spilanthes paniculata* Linn. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 2, p. 137-144, 2014.

DAVID, B.; WOLFENDER, J.-L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 2, p. 299-315, 2015.

DE CARLI E. et al. Characterization on the patents deposits from Brazil's Public Research Institutes from 2004 to 2013. **RAI Revista de Administração e Inovação**, v. 14, n. 2, p. 168-177, 2017.

DÉCIGA-CAMPOS, M. et al. Pharmacological and Toxicological Profile of Extract from *Heliopsis longipes* and Affinin. **Drug Development Research**, v. 73, n. 3, p. 130-137, 2012.

DÉCIGA-CAMPOS, M.; RIOS, M. Y.; AGUILAR-GUADARRAMA, A. B. Antinociceptive Effect of *Heliopsis longipes* Extract and Affinin in Mice. **Planta Med**, v. 76, n. 07, p. 665-670, 2010.

DEVANE, W.A.; DYSARZ, F.A.; JOHNSON, M.R.; MELVIN, L.S.; HOWLETT, A.C. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Molecular Pharmacology**, v. 34, n. 5, p. 605-6013, 1988.

DEVANE, W.A.; HANUS, L.; BREUER A.; PARTWEE R.G.; STEVENSON L.A.; GRIFFIN, G.; GIBSON, D.; MANDELBAUM, A.; ETINGER, A.; MECHOULAM, R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p. 1946-1949, 1992.

DEVKOTA, K. P. et al. Isobutylhydroxyamides from the Pericarp of Nepalese *Zanthoxylum armatum* Inhibit NF1-Defective Tumor Cell Line Growth. **Journal of Natural Products**, v. 76, n. 1, p. 59-63, 2013.

DEWOLF, G. P. Review of Asteraceae, Cladistics & Classification. **Rhodora**, v. 97, n. 890, p. 176-178, 1995.

DOLUI, A. K.; DEBNATH, M. Antifeedant activity of plant extracts to an insect *Helopeltis theivora*. **Journal of Environmental Biology**, v. 31, n. 5, p. 557-559, 2010.

DUBEY, S. et al. Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology of *Spilanthes acmella*: A Review. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2013, p. 9, 2013.

DUMONT, M.; BEAL, M. F. Neuroprotective strategies involving ROS in Alzheimer disease. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 5, p. 1014-1026, 2011.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, 2016.

FERRARI, F. C. et al. Toxicological evaluation of ethanolic extract of *Lychnophora trichocarpha*, Brazilian arnica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 1104-1110, 2012.

FERREIRA, A.A.; GUIMARÃES, E.R.; CONTADOR, J.C. Patente como instrumento competitivo e como fonte de informação tecnológica. **Gestão & Produção**, v.16, n.2, pp. 209-221, 2009.

FRANÇA, R. O. Patente como fonte de informação tecnológica. **Perspectivas em Ciência da Informação**, v. 2, n. 2, 2007.

FREITAS. V. S. **Desenvolvimento e avaliação da eficiência de um bioadesivo contendo extrato de *Spilanthes Acmella* l. Murray para administração oral como anestésico tópico**. 2014. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2014.

FREITAS-BLANCO, V. S. et al. Development and Evaluation of a Novel Mucoadhesive Film Containing *Acmella oleracea* Extract for Oral Mucosa Topical Anesthesia. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1-18, 2016.

FRIDE, E. et al. Behavioral Methods in Cannabinoid Research. In: ONAIVI, E. S. (Ed.). **Marijuana and Cannabinoid Research: Methods and Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2006. p. 269-290.

GALOPIN, C. C.; FURRER, S. M.; GOEKE, A. Pungent and Tingling Compounds in Asian Cuisine. In: (Ed.). **Challenges in Taste Chemistry and Biology**: American Chemical Society, v.867, 2003. cap. 9, p.139-152.

GASQUET, M. et al. Evaluation in vitro and in vivo of a traditional antimalarial, "Malarial 5". **Fitoterapia**, v. 64, n. 5, p. 423-426, 1993.

GATTEFOSSÉ. 2015. Disponível em: <<http://personalcare.gattefosse.us/introducing-gatuline-expression-af/>>. Acesso em: 18 de agosto de 2017.

GEORGE, D. R. et al. Medicinal plants - the next generation. **The Lancet**, v. 387, n. 10015, p. 220-221, 2016.

GERTSCH, J.; RADUNER, S.; ALTMANN, K. H. New Natural Noncannabinoid Ligands for Cannabinoid Type-2 (CB2) Receptors. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 26, n. 5-6, p. 709-730, 2006.

GERTSCH, J. et al. Analgesic and neuropsychological effects of *Echinacea* N-alkylamides. **Planta Med**, v. 74, n. 09, p. 302, 2008.

GODLEWSKI, G.; MALINOWSKA, B.; SCHLICKER, E. Presynaptic cannabinoid CB(1) receptors are involved in the inhibition of the neurogenic vasopressor response during septic shock in pithed rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 4, p. 701-708, 2004.

GONG, J. P. et al. Cannabinoid CB2 receptors: Immunohistochemical localization in rat brain. **Brain Research**, v. 1071, n. 1, p. 10-23, 2006.

GREGER, H. Alkamides: a critical reconsideration of a multifunctional class of unsaturated fatty acid amides. **Phytochemistry Reviews**, p. 1-42, 2015.

GREGER, H.; HOFER, H.; WERNER, A. New amides from *Spilanthes oleracea*. **Monatsh. Chem.**, v. 116, p. 5, 1985.

GREGER, H.; HOFER, O. Polyenoic acid piperideides and other alkamides from *Achillea millefolium*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 9, p. 2363-2368, 1989.

GUENNE, S. et al. The relevance of Asteraceae family plants in most of the neuropsychiatric disorders treatment. **2016**, v. 8, n. 2, p. 7, 2016.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Chemical analyses of the essential oils from leaves of *Mikania glauca* Mart. ex Baker. **Journal of Essential Oil Research**, v. 24, n. 6, p. 599-604, 2012.

GUINDON, J.; HOHMANN, A. G. Cannabinoid CB2 receptors: a therapeutic target for the treatment of inflammatory and neuropathic pain. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 319-334, 2008.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

HAJDU, Z. et al. Identification of Endocannabinoid System-Modulating N-Alkylamides from *Heliopsis helianthoides* var. *scabra* and *Lepidium meyenii*. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 7, p. 1663-1669, 2014.

HAQUE, S.; LOPA, S. D.; DAS, B. K. Antioxidant potential of *Spilanthes paniculata*. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, p. 390-392, 2015.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111-129, 2015.

HERNÁNDEZ-MORALES, A. et al. Larvicidal activity of affinin and its derived amides from *Heliopsis longipes* A. Gray Blake against *Anopheles albimanus* and *Aedes aegypti*. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 18, n. 2, p. 227-231, 2015.

HERNÁNDEZ, I. et al. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract and alkamides-derived from *Heliopsis longipes* roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, n. 3, p. 649-652, 2009.

HEYWOOD, V. H.; HARBORNE, J. B.; TURNER, B. L. An overture to the Compositae. In: PRESS, A. (Ed.). **The Biology and Chemistry of the Compositae**, v.1, 1977. p.1-20.

HILL, M. N.; PATEL, S. Translational evidence for the involvement of the endocannabinoid system in stress-related psychiatric illnesses. **Biology of Mood & Anxiety Disorders**, v. 3, p. 19-19, 2013.

HINZ, B.; WOELKART, K.; BAUER, R. Alkamides from *Echinacea* inhibit cyclooxygenase-2 activity in human neuroglioma cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 360, n. 2, p. 441-446, 2007.

HISERODT, R. D. et al. Proposed mechanisms for the fragmentation of doubly allylic alkenamides (tingle compounds) by low energy collisional activation in a triple quadrupole mass spectrometer. **Journal of the American Society for Mass Spectrometry**, v. 15, n. 10, p. 1462-1470, 2004.

HOHMANN, J. et al. Alkamides and a neolignan from *Echinacea purpurea* roots and the interaction of alkamides with G-protein-coupled cannabinoid receptors. **Phytochemistry**, v. 72, n. 14–15, p. 1848-1853, 2011.

HOSSAIN, M. M. et al. In vivo antipyretic, antiemetic, in vitro membrane stabilization, antimicrobial, and cytotoxic activities of different extracts from *Spilanthes paniculata* leaves. **Biological Research**, v. 47, n. 1, p. 45, 2014.

HOWLETT, A. C. et al. International Union of Pharmacology. XXVII. Classification of Cannabinoid Receptors. **Pharmacological Reviews**, v. 54, n. 2, p. 161-202, 2002.

IVANESCU, B.; MIRON, A.; CORCIOVA, A. Sesquiterpene Lactones from *Artemisia* Genus: Biological Activities and Methods of Analysis. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2015, p. 21, 2015.

JANSEN, R. K. **The systematics of *Acmella* (Asteraceae – Heliantheae) - Systematic Botanic Monography**. 1985. Acesso em: 11/06/2014.

JAYARAJ, P. et al. Isolation of chemical constituents from *Spilanthes calva* DC: Toxicity, anthelmintic efficacy and in silico studies. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, v. 4, n. 3, p. 417-423, 2014.

JEFFREY, C. Compositae: Introduction with key to tribes. In: KADEREIT, J. W. e JEFFREY, C. (Ed.). **The Families and Genera of Vascular Plants**. Berlin: Springer-Verlag, v.VIII, 2007. p.61-87.

JENETT-SIEMS, K.; KASPER, J.; MELZIG, M. F. Constituents of *Acmella ciliata* (H.B.K.) Cass. **Zeitschrift fur Phytotherapie**, v. 30, n. S 01, p. 1-17, 2009.

JIA, J. et al. Anandamide Protects HT22 Cells Exposed to Hydrogen Peroxide by Inhibiting CB1 Receptor-Mediated Type 2 NADPH Oxidase. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2014, p. 893516, 2014.

JIROVETZ, L. et al. Chemical composition and olfactic characterization of *Acmella radicans* (Jacq.) R.K. Jansen var. *radicans* from southern India. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 21, n. 1, p. 88-91, 2006.

JONDIKO, I. J. O. A mosquito larvicide in *Spilanthes mauritiana*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 10, p. 2289-2290, 1986.

JOSHI, N. et al. Hepatoprotective activity of methanolic extract of *Spilanthes radicans* against CCl₄ induced liver toxicity in rats. **Asian Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 1, n. 2, p. 53-56, 2015.

JUDD, W. S. **Plant systematics : a phylogenetic approach**. Sunderland, Mass. : Sinauer Associates, Inc, 2008.

JULIO, P. G. S.; OLIVEIRA, D. M. T. Morfoanatomia comparada e ontogênese do pericarpo de *Bidens gardneri* Baker e *B. pilosa* L. (Asteraceae). **Brazilian Journal of Botany**, v. 32, p. 109-116, 2009.

KANADA, R. M. et al. N-trans-feruloyltyramine and flavonol glycosides from the leaves of *Solanum sordidum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 502-506, 2012.

KAR, A. et al. Safety assessment of selected medicinal food plants used in Ayurveda through CYP450 enzyme inhibition study. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 1, p. 333-340, 2017.

KASPER, J.; MELZIG, M. F.; JENETT-SIEMS, K. New Phenolic Compounds of *Acmella ciliata*. **Planta Medica**, v. 76, p. 633-635, 2010.

KATZ, L.; BALTZ, R. H. Natural product discovery: past, present, and future. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 43, n. 2, p. 155-176, 2016.

KEIPERT, R.; MELZIG, M. F. *Acmella Ciliata* (H.B.K.) Cassini. **Zeitschrift fur Phytotherapie**, v. 30, n. 01, p. 44-50, 2009.

KELLY, N. et al. Pedido de patente nº WO2011000945, **Aminoalkamides for use in the treatment of inflammatory, degenerative or demyelinating diseases of the CNS**. 2011. Disponível em: <www.epo.org> Acesso em 04/06/2017.

KHAN, H. Medicinal Plants in Light of History: Recognized Therapeutic Modality. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**, v. 19, n. 3, p. 216-219, 2014.

KIMONDO, J. et al. Ethnobotanical survey of food and medicinal plants of the Ilkisonko Maasai community in Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 463-469, 2015.

KINSEY, S. G. et al. The CB2 cannabinoid receptor-selective agonist O-3223 reduces pain and inflammation without apparent cannabinoid behavioral effects. **Neuropharmacology**, v. 60, n. 2, p. 244-251, 2011.

KONG, L. Y.; TAN, R. X. Artemisinin, a miracle of traditional Chinese medicine. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 12, p. 1617-1621, 2015.

KONISHI, Y. et al. Molecular Formula Analysis by an MS/MS/MS Technique To Expedite Dereplication of Natural Products. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 3, p. 1187-1197, 2007.

KONOVALOV, D. A. Polyacetylene Compounds of Plants of the Asteraceae Family (Review). **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 48, n. 9, p. 613-631, 2014.

KOPPEL, J.; DAVIES, P. Targeting the Endocannabinoid System in Alzheimer's Disease. **Journal of Alzheimer's disease : JAD**, v. 15, n. 3, p. 495-504, 2008.

KRAUS, G. et al. Synthesis and Natural Distribution of Anti-inflammatory Alkamides from *Echinacea*. **Molecules**, v. 11, n. 10, p. 758, 2006.

KRISHNA, M. P. et al. Antibacterial activity of *Acmella paniculata* extract on human pathogenic bacteria. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 2, n. 1, p. 132-134, 2014.

LAGNIKA, L. et al. Antimicrobial, antioxidant, toxicity and phytochemical assessment of extracts from *Acmella uliginosa*, a leafy-vegetable consumed in Bénin, West Africa. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1-11, 2016.

LALONE, C. A. et al. *Echinacea* Species and Alkamides Inhibit Prostaglandin E2 Production in RAW264.7 Mouse Macrophage Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 18, p. 7314-7322, 2007.

LANGER, K. et al. Patente n° US8828469. **Use of alkamides for masking an unpleasant flavor**. Disponível em:<www.patft.uspto.gov> Acesso em: 07/07/2017.

LI, G.-P. et al. Two New Alkamides from *Spilanthes callimorpha*. **Journal of Integrative Plant Biology**, v. 49, n. 11, p. 1608-1610, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais no Brasil – Nativas e Exóticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. 544.

LU, A. T. et al. Association of the Cannabinoid Receptor Gene (CNR1) With ADHD and Post-Traumatic Stress Disorder. **American journal of medical genetics. Part B, Neuropsychiatric genetics : the official publication of the International Society of Psychiatric Genetics**, v. 147B, n. 8, p. 1488-1494, 2008.

LUIZE, P. S. et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, p. 85-94, 2005.

LUSA, M. G. et al. Characterization and evolution of secondary metabolites in Brazilian Vernoniae (Asteraceae) assessed by LC-MS fingerprinting. **Botanical Journal of the Linnean Society**, 2016.

MAHDI, J. G. Medicinal potential of willow: A chemical perspective of aspirin discovery. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 14, n. 3, p. 317-322, 2010.

MAMIDALA, E.; GUJJETI, R. P. Phytochemical and antimicrobial activity of *Acmella paniculata* plant extracts. **Journal of BioInnovation**, v. 2, n. 1, p. 17-22, 2013.

MARCHALANT, Y. et al. Cannabinoid receptor stimulation is anti-inflammatory and improves memory in old rats. **Neurobiology of Aging**, v. 29, n. 12, p. 1894-1901, 2008.

MARESZ, K. et al. Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. **Journal of Neurochemistry**, v. 95, n. 2, p. 437-445, 2005.

MARTIN, R.; BECKER, H. Spilanthol-related Amides from *Acmella ciliata*. **Phytochemistry**, v. 23, n. 8, p. 1781-1783, 1984.

MARTIN, R.; BECKER, H. Amides and other constituents from *Acmella ciliata*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 10, p. 2295-2300, 1985.

MARTÍNEZ, S. L.; GUADARRAMA, A. B. A.; RIOS, M. Y. Minor alkamides from *Heliopsis longipes* S.F. Blake (Asteraceae) fresh roots. **Phytochem. letters**, v. 4, p. 275-279, 2011.

MATOVIC, N. et al. Stereoselective synthesis, natural occurrence and CB2 receptor binding affinities of alkylamides from herbal medicines such as *Echinacea* sp. **Organic & Biomolecular Chemistry**, v. 5, n. 1, p. 169-174, 2007.

MATTHIAS, A. et al. *Echinacea* alkylamides modulate induced immune responses in T-cells. **Fitoterapia**, v. 79, n. 1, p. 53-58, 2008.

MCRAE, J. et al. Review of the methods used for isolating pharmaceutical lead compounds from traditional medicinal plants. **The Environmentalist**, v. 27, n. 1, p. 165-174, 2007.

MEJÍA, C. A. R. et al. Actividad antimicrobiana y análisis de la composición química de una fracción de las flores de *Acmella ciliata* (Kunth) Cass. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 20, n. 4, p. 409-418, 2015.

MIGLIORINI, C. et al. Structural characterization of Cu²⁺, Ni²⁺ and Zn²⁺ binding sites of model peptides associated with neurodegenerative diseases. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 256, n. 1–2, p. 352-368, 2012.

MINTO, R. E.; BLACKLOCK, B. J. Biosynthesis and Function of Polyacetylenes and Allied Natural Products. **Progress in lipid research**, v. 47, n. 4, p. 233-306, 2008.

MISHRA, A. et al. Antiproliferative effect of flower extracts of *Spilanthes paniculata* on hepatic carcinoma cells. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 7, n. 1, p. 130-134, 2015.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: An evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, n. 10, p. 4769-4807, 2011.

MIYAZAKI, C. M. S. et al. Coumarin isolation and comparative study of biological activities of *Pterocaulon alopecuroides* DC and *Pterocaulon lorentzii* Malme. **International Journal of Phytomedicine**, v. 5, n. 3, p. 298-301, 2013.

MOIN, S. et al. Antimicrobial activity of in vitro raised *Acmella calva* (DC.) R.K. Jansen. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 5, p. 124-127, 2012.

MOLINA-TORRES, J.; GARCÍA-CHÁVEZ, A.; RAMÍREZ-CHÁVEZ, E. Antimicrobial properties of alkamides present in flavouring plants traditionally used in Mesoamerica: affinin and capsaicin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 64, n. 3, p. 241-248, 1999.

MOLINA-TORRES, J. et al. Fungistatic and Bacteriostatic Activities of Alkamides from *Heliopsis longipes* Roots: Affinin and Reduced

Amides. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 15, p. 4700-4704, 2004.

MOLINA-TORRES, J. M.; CHAVES, A. G. Alcamidas em plantas: distribucion e importancia. **Avance y Perspectiva**, v. 20, p. 11, 2001.

MOLINA-TORRES, J. M. et al. Purely olefinic alkamides in *Heliopsis longipes* and *Acmella* (*Spilanthes*) *oppositifolia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 20, p. 5, 1996.

MONDIN, C. A. et al. *Acmella* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. **Flora do Brasil 2020 em construção**, 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB15911>>. Acesso em: 13/02/2017.

MONROE, D. et al. LC-HRMS and NMR Analysis of Lyophilized *Acmella oleracea* Capitula, Leaves and Stems. **The Natural Products Journal**, v. 6, n. 2, p. 116-125, 2016.

MORENO, S. C. et al. Bioactivity of compounds from *Acmella oleracea* against *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: *Gelechiidae*) and selectivity to two non-target species. **Pest Management Science**, v. 68, p. 386-393, 2012.

MOTAWA, H. M.; WAHBA, H. E.; IBRAHIM, A. Y. Biological Studies of Flavonoids from Flowers and Herb of *Zinnia pauciflora* Plant L. **World Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 6, p. 1076-1082, 2015.

MÜLLER-JAKIC, B. et al. In Vitro Inhibition of Cyclooxygenase and 5-Lipoxygenase by Alkamides from *Echinacea* and *Achillea* Species. **Planta Med**, v. 60, n. 01, p. 37-40, 1994.

MUNRO, S.; THOMAS, K. L.; ABU-SHAAR, M. Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. **Nature**, v. 365, n. 6441, p. 61-65, 1993.

NAKATANI, N.; NAGASHIMA, M. Pungent alkamides from *Spilanthes acmella* L. var *oleracea* Clarke. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 56, n. 5, p. 759-762, 1992.

NASCIMENTO, A. M. et al. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. **Phytochemistry**, v. 85, p. 137-142, 2013.

NATURA. 2017. Disponível em: <<http://www.natura.com.br/chronos/antissinais>>. Acesso em: 20 de agosto de 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NICOLUSSI, S. et al. Guineensine is a novel inhibitor of endocannabinoid uptake showing cannabimimetic behavioral effects in BALB/c mice. **Pharmacological Research**, v. 80, p. 52-65, 2014.

NOMURA, E. C. O. et al. 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. 7, 2013.

NUNES, G. B. L. et al. Behavioral tests and oxidative stress evaluation in mitochondria isolated from the brain and liver of mice treated with riparin A. **Life Sciences**, v. 121, p. 57-64, 2015.

OGURA, M. et al. Ethnopharmacologic studies. I. Rapid solution to a problem — oral use of *Heliopsis longipes* — by means of a multidisciplinary approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 5, n. 2, p. 215-219, 1982.

OLOWA, L. F. et al. Medicinal plants used by the Higaonon tribe of Rogongon, Iligan City, Mindanao, Philippines. **Advances in Environmental Biology**, p. 1442, 2012.

ONG, H. M. et al. Antinociceptive activity of methanolic extract of *Acmella uliginosa* (Sw.) Cass. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 227-233, 2011.

ORAPIN WONGSAWATKUL, S. P. et al. Vasorelaxant and Antioxidant Activities of *Spilanthes acmella* Murr. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 9, p. 21, 2008.

OWUOR, B. O. et al. In vitro antiplasmodial activity of selected Luo and Kuria medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 779-781, 2012.

PACHER, P.; MECOULAM, R. Is lipid signaling through cannabinoid 2 receptors part of a protective system? **Progress in Lipid Research**, v. 50, n. 2, p. 193-211, 2011.

PAGE, J. E. et al. Patente nº WO2010003238 **Phase 2 protein inducing alkamides** 2010. Disponível em: <www.epo.org> Acesso em: 17/04/2017.

PAMPLONA, F. A. et al. Anti-inflammatory lipoxin A4 is an endogenous allosteric enhancer of CB1 cannabinoid receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 51, p. 21134-21139, 2012.

PANDEY, V. et al. Strong larvicidal activity of three species of *Spilanthes* (Akarkara) against malaria (*Anopheles stephensi* Liston, *Anopheles culicifacies*, species C) and filaria vector (*Culex quinquefasciatus* Say). **Parasitology Research**, v. 102, n. 1, p. 171-174, 2007.

PANERO, J. L.; FUNK, V. A. The value of sampling anomalous taxa in phylogenetic studies: Major clades of the Asteraceae revealed. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 47, n. 2, p. 757-782, 2008.

PAUL, S. et al. Assessment of anti-inflammatory and anti-arthritic properties of *Acmella uliginosa* (Sw.) Cass. based on experiments in arthritic rat models and qualitative gas chromatography-mass spectrometry analyses. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, Turkey, v. 5, n. 3, p. 257-262, 2016.

PERTWEE, R. G. The pharmacology of cannabinoid receptors and their ligands: an overview. **International Journal of Obesity**, v. 30, p. 13-18, 2006.

PERTWEE, R. G. The diverse CB(1) and CB(2) receptor pharmacology of three plant cannabinoids: $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabinol, cannabidiol and $\Delta(9)$ -tetrahydrocannabivarin. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 199-215, 2008.

- PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, India, v. 6, n. 11, p. 1-5, 2012.
- PINHEIRO, M. T. et al. Antioxidant and cytotoxic potential of aqueous crude extract of *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 12, p. 562-569, 2015.
- POLLO, L. A. E. et al. Polyacetylenes from the leaves of *Vernonia scorpioides* (Asteraceae) and their antiproliferative and antiherpetic activities. **Phytochemistry**, v. 95, p. 375-383, 2013.
- QUANG, T. H. et al. Anti-inflammatory and PPAR transactivational effects of secondary metabolites from the roots of *Asarum sieboldii*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 7, p. 2527-2533, 2012.
- RADUNER, S. et al. Alkylamides from *Echinacea* Are a New Class of Cannabinomimetics: Cannabinoid type 2 receptor-dependent and -independent immunomodulatory effects. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 20, p. 14192-14206, 2006.
- RAI, M. K.; VARMA, A.; PANDEY, A. K. Antifungal potential of *Spilanthes calva* after inoculation of *Piriformospora indica*. **Mycoses**, v. 47, n. 11-12, p. 479-481, 2004.
- RAJESHWAR, Y.; LALITHA, R. Preliminary phytochemical screening and in vitro anthelmintic effects of *Acmella paniculata* plant extracts. **International Quarterly Journal of Biology & Life Sciences**, v. 1, n. 3, p. 106-112, 2013.
- RAMSEWAK, R. S.; ERICKSON, A. J.; NAIR, M. G. Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 6, p. 729-732, 1999.
- RANER, G. M. et al. Effects of herbal products and their constituents on human cytochrome P4502E1 activity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 12, p. 2359-2365, 2007.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, p. 15, 2010.

RATNASOORIYA, W. D. et al. Diuretic activity of *Spilanthes acmella* flowers in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 14, 2004.

RIOS-CHAVEZ, P. et al. *Acmella radicans* var. *Radicans*: in vitro culture establishment and alkalamide content. **In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant**, v. 39, p. 5, 2003.

RIOS, M. Y. Natural Alkalamides: Pharmacology, Chemistry and Distribution, Drug Discovery Research in Pharmacognosy. In: OLIMAT, O. V. A. S. M. (Ed.). **Drug Discovery Research in Pharmacognosy**, 2012. cap. 6,

RIOS, M. Y.; GUADARRAMA, A. B. A.; GUTIÉRREZ, M. C. Analgesic activity of affinin, an alkalamide from *Heliopsis longipes* (Compositae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 364-367, 2007.

RODEIRO, I. et al. Inhibition of human P450 enzymes by natural extracts used in traditional medicine. **Phytotherapy Research**, v. 23, n. 2, p. 279-282, 2009.

RUIU, S. et al. N-Alkyldien and trienamides from the roots of *Otanthus maritimus* with binding affinity for opioid and cannabinoid receptors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 22, p. 7074-7082, 2013.

SAADALI, B. et al. Alkalamides from *Artemisia dracunculus*. **Phytochemistry**, v. 58, n. 7, p. 1083-1086, 2001.

SALAPOVIC, H.; GEIER, J.; REZNICEK, G. Quantification of Sesquiterpene Lactones in Asteraceae Plant Extracts: Evaluation of their Allergenic Potential. **Scientia Pharmaceutica**, v. 81, n. 3, p. 807-818, 2013.

SAMSON, M.-T. et al. Differential Roles of CB1 and CB2 Cannabinoid Receptors in Mast Cells. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 10, p. 4953-4962, 2003.

SAPRA, G. et al. Effect of an herb root extract, herbal dentifrice and synthetic dentifrice on human salivary amylase. **Dental Research Journal**, India, v. 10, n. 4, p. 493-498, 2013.

SASAGAWA, M. et al. *Echinacea* alkylamides inhibit interleukin-2 production by Jurkat T cells. **International Immunopharmacology**, v. 6, n. 7, p. 1214-1221, 2006.

SCHUMAN, M. C. et al. How does plant chemical diversity contribute to biodiversity at higher trophic levels? **Current Opinion in Insect Science**, v. 14, p. 46-55, 2016.

SEITZ, C. et al. Cloning, Functional Identification and Sequence Analysis of Flavonoid 3'-hydroxylase and Flavonoid 3',5'-hydroxylase cDNAs Reveals Independent Evolution of Flavonoid 3',5'-hydroxylase in the Asteraceae Family. **Plant Molecular Biology**, v. 61, n. 3, p. 365-381, 2006.

SEKENDAR, A. et al. Antibacterial And Cytotoxic Activity Of Methanol Extract Of *Spilanthes calva* (Dc) Leaves. **International Journal of Pharmaceutical Sciences And Research**, v. 16, p. 1707-1711, 2011.

SHANTHI, P.; AMUDHA, P. Anticariogenic Activity of *Acmella calva* (DC.) R.K. Jansen against Selected Bacterial Pathogens. **Journal of Pure and Applied Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 599-604, 2010.

SHARMA, C. et al. Small Molecules from Nature Targeting G-Protein Coupled Cannabinoid Receptors: Potential Leads for Drug Discovery and Development. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**, v. 2015, p. 238482, 2015.

SHARMA, H. P.; KUMAR, R. A. Health security in ethnic communities through nutraceutical leafy vegetables. **J Environ Res Develop**, v. 7, 2013.

SHARMAA, V. et al. *Spilanthes acmella* ethanolic flower extract: LC-MS alkylamide profiling and its effects on sexual behavior in male rats. **Phytomedicine**, v. 18, p. 9, 2011.

SHEN, B. A New Golden Age of Natural Products Drug Discovery. **Cell**, v. 163, n. 6, p. 1297-1300, 2015.

SILVA, G. A. R.; SANTOS, J. U. M. Novos registros de espécies da subtribo Ecliptinae (Heliantheae - Asteraceae) para a Amazônia brasileira. **Acta Amazonica**, v. 40, p. 499-508, 2010.

SILVEIRA, N. et al. A New Alkamide with an Endoperoxide Structure from *Acmella ciliata* (Asteraceae) and Its in Vitro Antiplasmodial Activity. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 765, 2016.

SIMAS, N. K. et al. Acetylenic 2-phenylethylamides and new isobutylamides from *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen, a Brazilian spice with larvicidal activity on *Aedes aegypti*. **Phytochemistry Letters**, v. 6, p. 67-72, 2013.

SINEI, K. A. et al. An Investigation of the Antimicrobial Activity of *Acmella caulirhiza*. **African Journal of Pharmacology and Therapeutics**, v. 2, n. 4, p. 130-133, 2013.

SITTIE, A. A. et al. Alkamides from *Phyllanthus fraternus*. **Planta Med**, v. 64, n. 02, p. 192-193, 1998.

SLOLEY, B. D. et al. Comparison of chemical components and antioxidant capacity of different *Echinacea* species. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, n. 6, p. 849-857, 2001.

SOLTIS, P. S.; SOLTIS, D. E. Flower Diversity and Angiosperm Diversification. In: RIECHMANN, L. J. e WELLMER, F. (Ed.). **Flower Development: Methods and Protocols**. New York, NY: Springer New York, 2014. p.85-102.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Instituto Plantarum, 2005.

SPELMAN, K. et al. The Traditional Medicine *Spilanthes acmella*, and the Alkylamides Spilanthol and Undeca-2E-ene-8,10-diyonic Acid Isobutylamide, Demonstrate In Vitro and In Vivo Antimalarial Activity. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 1098–1101, 2011.

SPELMAN, K.; WETSCHLER, M. H.; CECH, N. B. Comparison of alkylamide yield in ethanolic extracts prepared from fresh versus dry *Echinacea purpurea* utilizing HPLC-ESI-MS. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 49, n. 5, p. 1141-1149, 2009.

STOREY, C.; SALEM, J. I. LAY Use of amazonian plants for the treatment of tuberculosis. **Acta Amazonica**, v. 27, p. 175-182, 1997.

SUJA, S. R. et al. Antihepatotoxic Activity of *Spilanthes ciliata*. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, n. 7, p. 6, 2003.

SUSMITHA, S. et al. Studies on in-vitro Anti-inflammatory activity of *Acmella oleracea* metabolic compounds. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 2, p. 227-232, 2015.

SZABO, B.; SCHLICKER, E. Effects of Cannabinoids on Neurotransmission. In: PERTWEE, R. G. (Ed.). **Cannabinoids**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2005. p.327-365.

TALEY, S. L.; PETHE, A. S.; ROTHE, S. P. Studies on antibacterial activity of some plant extracts **International Multidisciplinary Research Journal**, v. 2, n. 12, p. 17-18, 2012.

TAWFIKE, A. F.; VIEGELMANN, C.; EDRADA-EBEL, R. Metabolomics and Dereplication Strategies in Natural Products. In: ROESSNER, U. e DIAS, D. A. (Ed.). **Metabolomics Tools for Natural Product Discovery: Methods and Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press, 2013. p.227-244.

THE ANGIOSPERM PHYLOGENY, G. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p. 1-20, 2016.

THOMPSON, T. S.; SUKESH, K.; SINGH, D. A study on the antimicrobial effect of *Acmella oleracea* against dental caries bacteria. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 3, n. 4, p. 1194-1197, 2012.

TOSO, R. E. et al. Plantas de la provincia de La Pampa, Argentina, con actividad gastroprotectora y antiespasmódica. **InVet** v. 9, n. 1, p. 145-151, 2007.

TU, Y. Artemisinin—A Gift from Traditional Chinese Medicine to the World (Nobel Lecture). **Angewandte Chemie International Edition**, v. 55, n. 35, p. 10210-10226, 2016.

TURNER, B. L. Summary of the biology of the Compositae. In: HEYWOOD, V. H. H. J. B. T., B. L. (Ed.). **The Biology and Chemistry of the Compositae**: Academic Press, v.2, 1977. p.1105-1118.

VALLI, M. et al. **Development of a Natural Products Database from the Biodiversity of Brazil**. 2013. 439-444 (76). Journal of Natural Products, American Chemical Society

VAN DER HOOFT, J. J. J. et al. Polyphenol Identification Based on Systematic and Robust High-Resolution Accurate Mass Spectrometry Fragmentation. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 1, p. 409-416, 2011.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, 2005.

VERYSER, L. et al. N-alkylamides: from plant to brain. **Functional Foods in Health and Disease**, v. 4, n. 6, p. 264-275, 2014.

VIVEROS, M. P. et al. Critical Role of the Endocannabinoid System in the Regulation of Food Intake and Energy Metabolism, with Phylogenetic, Developmental, and Pathophysiological Implications. **Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets**, v. 8, n. 3, p. 220-230, 2008.

WHO. Control of the leishmaniases. **WHO Technical Report Series**, v. 949, p. 202, 2010.

WILLCOX, M. L.; BODEKER, G. Traditional herbal medicines for malaria. **BMJ : British Medical Journal**, v. 329, n. 7475, p. 1156-1159, 2004.

WOELKART, K.; BAUER, R. The Role of Alkamides as an Active Principle of *Echinacea*. **Planta Med**, v. 73, n. 07, p. 615-623, 2007.

WOELKART, K.; OUTI, M. H. S. A.; BAUER, R. CB Receptor Ligands from Plants. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 173-186, 2008.

WOELKART, K. et al. The Endocannabinoid System as a Target for Alkamides from *Echinacea angustifolia* Roots. **Planta Med**, v. 71, n. 08, p. 701-705, 2005.

WRIGHT, K. L.; DUNCAN, M.; SHARKEY, K. A. Cannabinoid CB2 receptors in the gastrointestinal tract: a regulatory system in states of inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. 2, p. 263-270, 2008.

WU, L. C. et al. Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 2341–2349, 2008.

YAMADA, M. et al. Melanin Biosynthesis Inhibitors from Tarragon *Artemisia dracunculus*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 75, n. 8, p. 1628-1630, 2011.

YAMEY, G. Public sector must develop drugs for neglected diseases. **BMJ**, v. 324, 2002.

YAOITA, Y.; KIKUCHI, M.; MACHIDA, K. Terpenoids and related compounds from plants of the family Compositae (Asteraceae). **Natural product communications**, v. 7, n. 4, p. 533-538, 2012.

YASUDA, I.; TAKEYA, K.; ITOKAWA, H. The geometric structure of spilanthol. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 28, n. 7, p. 3, 1980.

YUAN, H. et al. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. **Molecules**, v. 21, n. 5, p. 559, 2016.

YULIANA, N. D. et al. Metabolomics for bioactivity assessment of natural products. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 2, p. 157-169, 2011.

ZAPPI, D. C. et al. Growing knowledge: an overview of Seed Plant diversity in Brazil. **Rodriguésia**, v. 66, p. 1085-1113, 2015.

ZHAO, Z. Y. et al. Edaravone Protects HT22 Neurons from H₂O₂-induced Apoptosis by Inhibiting the MAPK Signaling Pathway. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 19, n. 3, p. 163-169, 2013.

ZHU, F. et al. Clustered patterns of species origins of nature-derived drugs and clues for future bioprospecting. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 31, p. 6, 2011.

ZHU, S. M. et al. Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil of *Spilanthes paniculata* Growing Wild on the Gaoligong Mountains, China. **Asian Journal of Chemistry**, v. 2, p. 607-610, 2012.

APÊNDICE 1 – Artigo publicado no periódico *Molecules*, no ano de 2016.

Molecules **2016**, *21*(6), 765; doi:10.3390/molecules21060765



molecules

Article

A New Alkamide with an Endoperoxide Structure from *Acmella ciliata* (Asteraceae) and Its *in Vitro* Antiplasmodial Activity

Narjara Silveira 1, Julia Saar 1,2, Alan Diego C. Santos 3, Andersson Barison 3, Louis P. Sandjo 1, Marcel Kaiser 4,* and Maique W. Biavatti 1,*

¹ Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Bloco J/K, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis 88040-900, SC, Brazil; silveira.narjara@gmail.com (N.S.); jsaar@hotmail.de (J.S.); p.l.sandjo@ufsc.br (L.P.S.)

² Institut für Pharmazeutische Biologie und Phytochemie (IPBP), University of Münster, PharmaCampus, Corrensstraße 48, Münster D-48149, Germany

³ Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba 81530-900, PR, Brazil; alandiego@ufpr.br (A.D.C.S.); anderbarison@gmail.com (A.B.)

⁴ Swiss Tropical and Public Health Institute (Swiss TPH), Socinstr. 57, Basel CH-4051, Switzerland; marcel.kaiser@unibas.ch University of Basel, Petersplatz 1, Basel CH-4003, Switzerland

* Correspondence: thomschm@uni-muenster.de (T.J.S.); maique.biavatti@ufsc.br (M.W.B.); Tel.: +49-251-83-33378 (T.J.S.); +55-48-3721-3493 (M.W.B.)

Academic Editor: Dereck J. McPhee

Received: 12 May 2016; Accepted: 2 June 2016; Published: 11 June 2016

Abstract: From the aerial parts of *Acmella ciliata* (H.B.K.) Cassini (basionym *Spilanthes ciliata* Kunth; Asteraceae), three alkamides were isolated and identified by mass- and NMR spectroscopic methods as (2*E*,6*E*,8*E*)-*N*-isobutyl-2,6,8-decatrienamamide [spilanthol, (**1**)], *N*-(2-phenethyl)-2*E*-en-6,8-nonadiynamide (**2**) and (2*E*,7*Z*)-6,9-endoperoxy-*N*-isobutyl-2,7-decadienamamide (**3**). While **1** and **2** are known alkamides, compound **3** has not been described until now. It was found that the unusual cyclic peroxide **3** exists as a racemate of both enantiomers of each alkamide; the 6,9-*cis*- as well as the 6,9-*trans*-configured diastereomers, the former represents the major, the latter the minor constituent of the mixture. *In vitro* tests for activity against the human pathogenic parasites *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *Plasmodium falciparum* revealed that **1** and **3** possess activity against the NF54 strain of the latter (IC₅₀ values of 4.5 and 5.1 μM, respectively) while **2** was almost inactive. Compound **3** was also tested against multiresistant *P. falciparum* K1 and was found to be even more active against this parasite strain (IC₅₀ = 2.1 μM) with considerable selectivity (IC₅₀ against L6 rat skeletal myoblasts = 168 μM).

Keywords: *Acmella ciliata*; jambu; Asteraceae; antiplasmodial activity; alkamide; endoperoxide; *Plasmodium falciparum*
