



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DE ALIMENTOS**

TESE DE DOUTORADO

**AVALIAÇÃO QUÍMICA E BIOLÓGICA DO JAMBU (*Acmella oleracea*
L.) SECO COM AR FRIO E LIOFILIZADO**

ALAN FRANCO BARBOSA

Sob a orientação da Professora

Dra. Maria Ivone Martins Jacintho Barbosa

(Dr. Armando Ubirajara Oliveira Sabaa Srur *in memoriam*)

Sob a co-orientação do Professor

Dr. Mário Geraldo de Carvalho

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos

Seropédica, RJ
Dezembro de 2016

664

B238a

T

Barbosa, Alan Franco, 1990-

Avaliação química e biológica do jambu (*Acmella oleracea* L.) seco com ar frio e liofilizado / Alan Franco Barbosa - 2016.

225 f.: il.

Orientador: Maria Ivone Martins Jachinto Barbosa.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Inclui bibliografias.

1. Tecnologia de alimentos - Teses. 2. *Spilanthus oleracea* L. - Teses. 3. Asteraceae - Teses. 4. Hortaliça - Teses. I. Barbosa, Maria Ivone Martins Jachinto, 1977-. II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

ALAN FRANCO BARBOSA

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos.

TESE APROVADA EM 15/12/2016



Mário Geraldo de Carvalho. (Dr.) DEQUIM-ICE-UFRRJ
(Co-Orientador)



Cristiane Hess de Azevedo Meleiro. (Dra.) DTA-IT-UFRRJ



Mariana Teixeira da Costa Machado. (Dra.) DTA-IT-UFRRJ



Tatiana Silveira Feijó Cardozo. (Dra.) INJC-UFRRJ



Thadia Turon Costa da Silva. (Dra.) INJC-UFRRJ

Ao prof. Dr. Armando Ubirajara Oliveira Sabaa Srur (*in memoriam*), por
ter sido mais que um mestre, um grande amigo.
Dedico!

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelo seu amor maior; por permitir mais uma graça profissional na minha vida.

À minha família, meus queridos irmãos André Barbosa e Yana Barbosa e em especial a minha mãe, Nildia Barbosa e meu pai Edenildo Barbosa (*in memoriam*). Muito obrigado pela força, amor, carinho.

À minha noiva, Mirza Nalesso, pelo amor, carinho, companheirismo, apoio técnico e compreensão.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ) pela oportunidade e a todos os alunos e funcionários com os quais convivi, em especial aos do Departamento de Tecnologia de Alimentos e Departamento de Química.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) pelo apoio financeiro aos projetos do nosso grupo de pesquisa.

Ao meu orientador, professor Dr. Armando Ubirajara Oliveira Sabaa Srur (*in memoriam*), por todo incentivo, confiança, oportunidades e claro conhecimentos transmitidos. No momento mais difícil da minha vida profissional, com toda humildade, experiência e conhecimento ele aceitou ser meu orientador e me conduziu a experiências incríveis.

Ao meu co-orientador, professor Dr. Mário Geraldo de Carvalho pelo grande suporte no desenvolvimento dessa tese, confiança e oportunidades.

À minha atual orientadora, professora Dra. Maria Ivone Martins Jacintho Barbosa por ter aceitado a orientação.

Aos colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais (LQPN) da UFRRJ, pelo apoio técnico e pela agradável convivência no ambiente de trabalho. Agradeço em especial à Dra. Queli Fidelis, pela grande ajuda no preparo dos extratos de Jambu e isolamento do espilantol.

Ao PhD Robert Smith (FDA-EUA) pela colaboração nas análises químicas.

Ao professor PhD Luigi Millela (Universidade de Basilicata, Itália) pela parceria nas análises de atividade diurética.

Ao doutorando André Guerra (PPGCTA/UFRRJ) e a técnica de laboratório Edlene Prudencio (DTA/UFRRJ) pela colaboração nos testes de atividade antimicrobiana.

À professora Dra. Márcia Oliveira (DEQUIM/ICE/UFRRJ) e sua ex-orientada de iniciação científica, Keila Silva, pela parceria nos testes com a tirosinase.

À professora Dra. Marisa Mendes (DEQ/UFRRJ), ao professor Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior (FEA-UFPA) e Dra. Cristiane Pereira pela colaboração na extração de Jambu com CO₂ supercrítico. Agradeço também o professor Dr. José Guilherme S. Maia (PGRNA/UFOPA) por ter contribuído desde os experimentos do mestrado e pelo auxílio nos extratos de Jambu obtidos com CO₂ supercrítico.

Ao prof. Dr. Antonio Jorge Ribeiro da Silva (IPPN/UFRJ) pela análise de CG-EM da fração lipídica do Jambu.

Ao professor Dr. Rômulo Valadão por ter cedido o Laboratório de Fermentações do DTA/IT/UFRRJ para realização do experimento de isortema de adsorção.

Ao doutorando Davy Hidalgo (PPGCTA/UFRRJ) pela ajuda na modelagem matemática para obtenção das isortemas de adsorção.

À doutoranda Renata da Silva (INJC/UFRJ), pelo auxílio nas análises de fenólicos e avaliação da capacidade antioxidante do Jambu.

Aos professores que participaram da banca de qualificação e da defesa da tese, pela disponibilidade e contribuições.

BIOGRAFIA

Alan Franco Barbosa, filho de Nildia Franco Barbosa e Edenildo Pereira Barbosa, nasceu em Jequitinhonha, MG, em 05 de julho de 1990.

No ano de 2011 graduou-se Bacharel em Ciência e Tecnologia de Alimentos pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sudeste de Minas Gerais - *Campus* Rio Pomba.

Em 2014 concluiu o curso de Licenciatura em Química na Universidade Salgado de Oliveira – *Campus* São Gonçalo. No mesmo ano também concluiu o Curso de Pós-Graduação *Lato sensu* em Ciência dos Alimentos, na Universidade Federal de Pelotas – UFPel e o Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, nível de mestrado, na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro - UFRRJ.

Em março de 2014 iniciou o doutorado em Ciência dos Alimentos na UFRRJ.

Atualmente é professor efetivo do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso *Campus* Sorriso.

RESUMO

BARBOSA, Alan Franco. **Avaliação química e biológica do Jambu (*Acmella oleracea* L.) seco com ar frio e liofilizado**. 2016. 167p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

Esta tese teve por objetivo avaliar as propriedades químicas e biológicas do Jambu, bem como avaliar a estabilidade do espilantol e isolar esta amida por extração com solventes. Foram determinados o perfil de aminoácidos, ácidos graxos, minerais, polifenóis totais e livres e a capacidade antioxidante (DPPH e ABTS) do Jambu pelos processos secagem com ar frio e liofilização. As isotermas de adsorção foram construídas usando o conjunto de dados experimentais de 8 modelos matemáticos. Capítulos, folhas e hastes liofilizados de Jambu foram extraídos com metanol a 100 °C e pressão de 10 MPa e analisados por CL-EM e RMN. Avaliaram-se os efeitos do extrato metanólico e de frações obtidas com hexano e diclorometano do Jambu sobre a enzima tirosinase e atividade antimicrobiana frente ao *Micrococcus luteus* e o *Lactobacillus casei*. A fosforilação de NKCC2 foi avaliada como índice da sua ativação através de Western blotting. A taxa de expressão apical aquaporina 2 foi analisada por microscopia confocal a laser. O Jambu seco com ar frio apresentou maior teor dos nutrientes avaliados, com exceção do teor de minerais, e maior capacidade antioxidante em relação ao Jambu liofilizado. O modelo de Peleg, em todas as temperaturas avaliadas, apresentou melhores isotermas de adsorção de umidade do Jambu seco com ar frio. As concentrações de espilantol nos capítulos, folhas e hastes foram de 16,5, 0,344 e 0,241 mg/g do peso seco. O extrato metanólico de Jambu, bem como a fração hexânica (84,28 % de espilantol) foram capazes de ativar a enzima tirosinase, por outro lado, a fração obtida com diclorometano (cerca de 100 % espilantol) mostrou forte efeito de inibição da enzima tirosinase nos primeiros 10 min. Não foi observada ação antimicrobiana do extrato metanólico e fração hexânica sobre *L. casei*, porém, a fração hexânica criou halo de inibição sobre *M. luteus*. O espilantol inibiu a produção de cAMP, modulando negativamente os mecanismos de concentração de urina. Conclui-se que o Jambu submetido ao processo de secagem com ar frio ofereceu melhor qualidade química e capacidade antioxidante. O componente majoritário, espilantol, presente sobretudo nas inflorescências, não se altera com condições extremas de armazenamento. O extrato metanólico de Jambu ativa fortemente a enzima tirosinase, enquanto que a fração diclorometano inibe a tirosinase. Já a fração hexânica inibe o crescimento *Micrococcus luteus* e o espilantol inibe a produção de cAMP, contribuindo para sua aplicação em fármacos com função diurética.

Palavras-chave: *Spilanthes oleracea* L., Asteraceae, Hortaliça.

ABSTRACT

BARBOSA, Alan Franco. **Chemical and biological evaluation Jambu (*Acmella oleracea* L.) dry with cold air and lyophilized**. 2016. 167p. Thesis (Doctor Science in Food Science and Technology, Food Science). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

The chemical and biological properties of Jambu, as well as the evaluation of the stability of spilanthol and the procedures of isolation this amide by solvents extraction are described. Were determined the amino acid profile, fatty acids, minerals, and free polyphenols, and total antioxidant activity (DPPH and ABTS) by the processes of drying with cold air and lyophilization. Adsorption isotherms were constructed using the set of experimental data of eight mathematical models. Lyophilized capitula, leaves and stems of Jambu were extracted with methanol at 100 °C, and 10 MPa, and analyzed by LC-MS and NMR spectroscopy. The effect of methanol extract, and of fractions obtained by partitions with hexane and dichloromethane of methanol extracts, of the Jambu on the tyrosinase enzyme such as the antimicrobial activity front against of *Micrococcus luteus* and *Lactobacillus casei* were evaluated. The activation index of NKCC2 phosphorylation was evaluated by Western blotting. The rate of aquaporin 2 apical expression was analysed by confocal laser microscopy. Jambu dried by cold air showed higher content of nutrient, except for the mineral content, and antioxidant capacity compared to lyophilized Jambu. At all evaluated temperatures, the model of Peleg presented the best adsorption isotherms of Jambu dried by cold air. Spilanthol concentrations in capitula, leaves and stems were 16.5, 0.344 and 0.241 mg/g dry weight. The methanol extract from Jambu and the hexane fraction (84.28 % of spilanthol) were able to activate oxidant activity of the tyrosinase enzyme. On the other hand, the dichloromethane fraction (about 100 % spilanthol) showed strong inhibitory effect of tyrosinase enzyme in the first 10 min. There was no antimicrobial activity of methanol extract and hexane fraction about *L. casei*. But the hexane fraction created inhibition zone on *M. luteus*. Induced inhibition of cAMP by spilanthol modulates negatively the urine-concentrating mechanisms. It is concluded that Jambu subjected to the drying process with cold air offers better chemical quality and antioxidant capacity. The major component, espilantol, present mainly in inflorescences, does not change with extreme storage conditions. The methanolic extract of Jambu strongly activates the enzyme tyrosinase, whereas the dichloromethane fraction inhibits the tyrosinase. The hexanic fraction inhibits *Micrococcus luteus* growth and espilantol inhibits the production of cAMP, contributing to its application in drugs with diuretic function.

Key words: *Spilanthes oleracea* L., Asteraceae, Vegetable.

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

% inib	porcentagem de inibição
[M+H] ⁺	íon molecular protonado
M ⁺	íon molecular
2AA	2-aminoantraceno
A ₀	absorbância de L-DOPA + tirosinase + inibição/ativação em 0 min
A ₃₀	absorbância de L-DOPA + tirosinase + inibição/ativação em 30 min
AAE	aminoácidos essenciais
ABTS	2,2'-azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
AC	adenylate cyclase
AcOEt	acetato de etila
ANE	aminoácidos não essenciais
AOAC	association of official analytical chemist
AQP2	water channel aquaporin 2
ATP	adenosine triphosphate
AVP	arginine vasopressin
AVPR2	type-2 vasopressin receptor
B ₀	absorbância de L-DOPA + tirosinase em 30 min
B ₃₀	absorbância de L-DOPA + tirosinase em 0 min
BaCl ₂	cloreto de bário
bs	base seca
<i>ca</i>	cerca de
CaCl ₂	cloreto de cálcio
CAET	capacidade antioxidante equivalente ao trolox
CaSR	calcium sensing receptors
CCF	cromatografia em camada fina
CD	collecting ducts
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
CESA	animal experimentation ethics committee
CG/MS	gas chromatography coupled to mass spectrometry
CG-EM	cromatografia a gás acoplado a espectrometria de massas
CH ₂ Cl ₂	diclorometano
CH ₃ CN	acetonitrila
CH ₃ OH	metanol
CHCl ₃	clorofórmio
CI ₅₀	concentração inibitória máxima da metade
CIM	concentração inibitória mínima
CIT	cromatograma de íons totais
CL ₅₀	concentração letal média
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CL-EM	cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
CL-EMAR IES ⁺	cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas de alta resolução equipado com fonte de ionização de elétron-spray em modo positivo
COX-2	ciclo-oxigenase-2
CPA	cyclopiazonic acid
CTR	resting condition
DCT	distal convolute tubules
DE	desvio relativo
DE ₅₀	dose efetiva necessária para exercer 50 % do efeito máximo

DEQUIM	departamento de química
DIC	detector de ionização de chamas
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	ácido desoxirribonucleico
DP	desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EAG	equivalente de ácido gálico
EAS	extrator acelerado por solvente
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético
EFS	extração com fluído supercrítico
ELP	extrato com líquido pressurizado
eV	elétron volt
F1R1	fração hexânica do jambu 1ª repetição
F1R2	fração hexânica do jambu 2ª repetição
F1R3	fração hexânica do jambu 3ª repetição
F2	fraction 2
F2R1	fração diclorometano do jambu 1ª repetição
F2R2	fração diclorometano do jambu 2ª repetição
F2R3	fração diclorometano do jambu 3ª repetição
F3R1	fração acetato de etila de jambu 1ª repetição
F3R2	fração acetato de etila de jambu 2ª repetição
F3R3	fração acetato de etila de jambu 3ª repetição
F4R1	fração residual de jambu 1ª repetição
F4R2	fração residual de jambu 2ª repetição
F4R3	fração residual de jambu 3ª repetição
FDA	food and drug administration
FID	flame ionization detector
FITC	fenilisotiocianato
FK	foskolin
FTC-aa	feniltiocarbamil-aminoácidos
HCl	ácido clorídrico
IBGE	instituto brasileiro de geografia e estatística
IC ₅₀	half maximal inhibitory concentration
IDR	ingestão diária recomendada
i-NOS	óxido nítrico sintase induzível
INPPN	instituto de pesquisas de produtos naturais
IS	índice de similaridade
IUPAC	international union of pure and applied chemistry
<i>J</i>	constante de acoplamento
JL	jambu liofilizado
JSAF	jambu seco com ar frio
K ₂ CO ₃	carbonato de potássio
K ₂ SO ₄	persulfato de potássio
KCl	cloreto de potássio
KOH	hidróxido de potássio
L-DOPA	L-3,4-dihidroxifenilalanina
LAMIC	laboratório de análises micotoxicológicas
LPH	lactose piloridizina hidrolase
M	molaridade
m/z	relação da massa sobre a carga

m ²	metro quadrado
mbar	milésimos de bar
MeOD ₄	metanol deuterado
M _{eq}	massa em equilíbrio
MgCl ₂	cloreto de magnésio
MHz	mega-hertz
min	minutos
mL	mililitros
mm	milímetros
MPa	megapascal
MPE	methanol plant extract
m _s	massa da amostra seca
MTT	3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide
Mult	multiplicidade
N	normalidade
Na	sódio
Na ₂ SO ₄	sulfato de sódio
NaCl	cloreto de sódio
NaF	fluoreto de sódio
Ni(DPPP)Cl ₂	1,3-bis (difenilfosfino) propileno-cloreto de níquel
nm	nanômetro
NMR	nuclear magnetic resonance
NO	óxido nítrico
OMS	organização mundial da saúde
P	erro médio relativo
PBS	tampão fosfato salino
P _c	pressão crítica
pH	potencial de hidrogênio
ppm	partes por milhão
PTZ	pentilenotetrazol
PUC-RJ	pontifícia universidade católica do rio de janeiro
r ²	coeficiente de determinação
RMN ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono
RMN ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RNA	ácido ribonucleico
rpm	rotação por minuto
SNC	sistema nervosa central
Spil	spilanthol
Sr	estrôncio
TAL	thick ascending limb
T _c	temperatura crítica
TG	triglicerídeos
THF	tetraidrofurano
Ti	titânio
t _r	tempo de retenção
UFC	unidade formadora de colônia
UFJF	universidade federal de Juiz de Fora
UFPA	universidade federal do Pará
UFRJ	universidade federal do Rio de Janeiro
UFRRJ	universidade federal rural do Rio de Janeiro

UFSM	universidade federal de Santa Maria
UV	ultravioleta
V	volts
V	volume
Vis	visível
X _{e_q}	equilíbrio de umidade
X _m	monocamada
δ _C	deslocamento químico de carbono
δ _H	deslocamento químico de hidrogênio
μg	micrograma
μL	microlitro
μm	micrômetro
μM	micromolar
v _{máx}	número de onda

Sumário

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
CAPÍTULO I	3
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
1 <i>Acmella oleracea</i> L.....	4
2 Composição química da planta.....	4
3 Espilantol.....	5
3.1 Ocorrência	6
3.2 Extração, purificação e quantificação.....	7
3.3 Propriedades químicas e físicas do espilantol	8
3.4 Atividades biológicas do espilantol	10
4 Capacidade antioxidante de hortaliças	14
4.1 Método do radical DPPH•	18
4.2 Método pela captura do radical cátion ABTS•	19
5 Secagem de hortaliças	19
5.1 Secagem com ar frio	20
5.2 Liofilização	20
6 Extração com CO ₂ supercrítico	21
7 Isolamento de metabólitos especiais de plantas	22
CAPÍTULO II	39
IMPACTO DA SECAGEM COM AR FRIO E LIOFILIZAÇÃO DO JAMBU (<i>Acmella oleracea</i> L.) SOBRE AS PROPRIEDADES NUTRICIONAIS, CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E ISOTERMAS DE ADSORÇÃO	
Resumo	40
Abstract.....	40
Introdução	41
Material e métodos	41
Resultados e discussão	47
Conclusões.....	61
Referências bibliográficas	61
CAPÍTULO III	66
AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE ESPILANTOL EXTRAÍDO COM CO ₂ SUPERCRÍTICO EM DIFERENTES TEMPOS DE ARMAZENAMENTO DE <i>Acmella oleracea</i> L.	
Resumo	67
Abstract.....	67
Introdução	68
Material e métodos	69
Resultados e discussão	72
Conclusões.....	77
Referências bibliográficas	77

CAPÍTULO IV	81
CL-EMAR E ANÁLISE DE RMN DE CAPÍTULOS, FOLHAS E HASTES DE <i>Acmella oleracea</i> LIOFILIZADOS	
Resumo	82
Abstract.....	82
Introdução.....	83
Material e métodos	84
Resultados e discussão	85
Conclusões.....	100
Referências bibliográficas	100
CAPÍTULO V	104
EFEITO DO EXTRATO METANÓLICO E FRAÇÕES DE <i>Acmella oleracea</i> SOBRE A ENZIMA TIROSINASE	
Resumo	105
Abstract.....	105
Introdução.....	106
Material e métodos	107
Resultados e discussão	109
Conclusões.....	116
Referências bibliográficas	117
CAPÍTULO VI	120
ATIVIDADE ANTIMICROBIANA <i>IN VITRO</i> DE JAMBU (<i>Acmella oleracea</i> L.)	
Resumo	121
Abstract.....	121
Introdução.....	121
Material e métodos	122
Resultados e discussão	123
Conclusões.....	124
Referências bibliográficas	124
CAPÍTULO VII	127
SPILANTHOL FROM <i>ACMELLA OLERACEA</i> LOWERS THE INTRACELLULAR LEVELS OF CAMP IMPAIRING NKCC2 PHOSPHORYLATION AND WATER CHANNEL AQP2 MEMBRANE EXPRESSION IN MOUSE KIDNEY	
Resumo	128
Abstract.....	129
Introducion	129
Materials and methods.....	130
Results	135
Discussion.....	150
Conclusions	151
References	151
CAPÍTULO VIII	156
CONTEXTUALIZAÇÃO DOS ARTIGOS CIENTÍFICOS	
2 CONCLUSÕES GERAIS	159

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	160
ANEXOS	161
Anexo A – Artigo publicado na Veterinary Parasitology.	161
Anexo B – Artigo publicado na Plos One.	162
Anexo C – Artigo publicado no Brazilian Journal of Pharmacognosy.	163
Anexo D – Artigo publicado na Revista Higiene Alimentar.....	164
Anexo E – Artigo publicado no Journal of Food Process Engineering.....	165
Anexo F – Artigo publicado no The Natural Products Journal.....	166
Anexo G – Artigo publicado no Brazilian Journal of Pharmacognosy.....	167

1 INTRODUÇÃO GERAL

Conhecida popularmente como Jambu, *Acmella oleracea* L. é uma planta nativa da Amazônia muito usada como condimento em pratos típicos da região norte do Brasil, como o tacacá e o pato no tucupi, além de ter aplicação na medicina popular para o tratamento de estomatites, resfriados e como analgésico. A planta apresenta propriedades químicas importantes, que desperta o interesse da indústria farmacêutica, principalmente pela presença do metabólito especial mais abundante, considerado mais bioativo, o espilantol.

O espilantol é uma *N*-alquilamida presente em folhas, hastes e inflorescências dessa hortaliça, já foi descrita em diversas patentes. Essa amida pode ser isolada por metodologias clássicas, utilizando extração com solventes, além de extração com fluido supercrítico e micro-ondas, com posterior purificação com Cromatografia em Camada Fina (CCF) e/ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). A procura de processos de extração de rápidos, eficientes e de baixo custo para metabólito vem sendo crescente.

Nos últimos anos têm-se verificado grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais e alimentícias que visam obter novas substâncias com propriedades terapêuticas e nutricionais. Isso pode ser claramente observado pelo aumento de trabalhos publicados nessa área, tanto em congressos como em periódicos nacionais e internacionais.

Além do espilantol, o Jambu contém outros constituintes nutricionais e funcionais, como elevado conteúdo de ferro, cálcio e ainda possui as vitaminas B₁, B₂, niacina, C e pró-vitamina A. Apresenta também baixo valor calórico, assim como, a maioria das hortaliças. Outra propriedade relevante desta planta é sua capacidade antioxidante.

O conhecimento da composição química de hortaliças é fundamental para contribuição nutricional da dieta humana. Os alimentos de origem vegetal fornecem energia, principalmente pelos carboidratos. São fontes importantes de outros nutrientes (vitaminas e minerais), além de componentes não calóricos (por exemplo, antioxidantes e fibra alimentar). O conteúdo de fibra alimentar nas hortaliças secas pode representar de 28 a 30 % do peso seco.

Existem vários artigos publicados e patentes sobre atividades biológicas do Jambu e do espilantol, no entanto há poucas pesquisas sobre processamento do Jambu, bem como sua caracterização química. Há trabalhos fitoquímicos dessa hortaliça, mas poucos identificam e quantificam a sua composição química, como perfil de aminoácidos, ácidos graxos e minerais.

São necessários cuidados especiais após a colheita desta hortaliça para aumentar a sua viabilidade comercial, bem como facilitar o transporte e agregar valor ao produto. A comercialização deste produto certamente fortalece a agricultura familiar da região norte do Brasil, onde há o maior cultivo e comercialização do Jambu. Além disso, é fundamental o conhecimento e divulgação da composição química dos alimentos, bem como a descoberta de novas atividades biológicas que podem ser aplicadas na tecnologia de alimentos ou em prol da saúde humana. Neste sentido, espera-se que essa tese contribua para a divulgação desta hortaliça destacando suas propriedades químicas e biológicas, além das propriedades do seu principal metabólito especial (espilantol), incorporando informações na literatura e para o usuário deste material como alimento.

Essa tese de doutorado é continuação da pesquisa de mestrado, na qual a coleta, a identificação e a secagem com ar frio do Jambu foram realizadas durante o mestrado. Essa tese foi dividida em 8 capítulos. O primeiro capítulo é uma revisão bibliográfica, tendo parte do conteúdo publicado no artigo intitulado “Spilanthol: occurrence, extraction, chemistry and biological activities”.

O segundo capítulo deste trabalho é um artigo a ser submetido intitulado “Impacto da secagem com ar frio e liofilização do Jambu (*Acmella oleracea* L.) sobre as propriedades nutricionais, conteúdo de fenólicos totais, capacidade antioxidante e isoterma de adsorção”. Nesse capítulo foi abordado o efeito da secagem (secagem com ar frio e liofilização) sobre as propriedades nutricionais e capacidade antioxidante do Jambu. Além de obter isotermas de adsorção do Jambu seco com ar frio.

O terceiro capítulo é um artigo intitulado “Spilanthol content in the extract obtained by supercritical CO₂ at different storage times of *Acmella oleracea* L.”. Foi avaliado o efeito do tempo de armazenamento do Jambu no conteúdo de espilantol usando CO₂ como solvente, no sentido de demonstrar a estabilidade dessa amida.

O quarto capítulo é um artigo intitulado “LC-HRMS and NMR Analysis of Lyophilized *Acmella oleracea* capitula, leaves and stems”. Os objetivos desse estudo foram extrair com líquido pressurizado capítulos, folhas e hastes liofilizados de *A. oleracea* e quantificar o conteúdo de espilantol e identificar outras *N*-alquilamidas do Jambu.

O quinto capítulo é o artigo “Effects of *Acmella oleracea* methanolic extract and fractions on the tyrosinase enzyme”. Foi avaliado o efeito do extrato metanólico de *A. oleracea* e frações hexânicas e diclorometano sobre a enzima tirosinase (polifenoloxidase).

O sexto capítulo é o artigo com título de “Atividade antimicrobiana *in vitro* de Jambu (*Acmella oleracea* L.)”. Objetivou-se avaliar a atividade antimicrobiana do Jambu frente ao *Micrococcus luteus* e *Lactobacillus casei*.

O sétimo capítulo é o artigo “Spilanthol from *Acmella oleracea* Lowers the Intracellular Levels of cAMP Impairing NKCC2 Phosphorylation and Water Channel AQP2 Membrane Expression in Mouse Kidney”, que teve como objetivo a determinação do efeito do extrato metanólico de *A. oleracea* e do espilantol nos dois principais processos que envolvem o mecanismo de concentração de urina, expressão do cotransportador Na-K-2Cl (NKCC2) e expressão de aquaporina 2 (AQP2), para avaliar a atividade diurética das amostras testadas.

O oitavo capítulo é uma contextualização de minha autoria dos artigos científicos, no qual tem-se uma abordagem geral de como foi conduzida/realizada a tese, as parcerias realizadas e as publicações geradas.

Os objetivos gerais dessa tese foram avaliar as propriedades químicas e biológicas do Jambu em condições de comercialização, bem como avaliar a estabilidade do espilantol e usar metodologia de isolamento desta amida.

Os objetivos específicos foram:

- Identificar e quantificar os principais nutrientes: ácidos graxos, aminoácidos e minerais do Jambu liofilizado e seco com ar frio;
- Avaliar a capacidade antioxidante do Jambu liofilizado e seco com ar frio pelos métodos DPPH e ABTS;
- Obter experimentalmente isotermas de adsorção do Jambu seco com ar frio;
- Avaliar a estabilidade química do espilantol;
- Isolar e caracterizar o espilantol por metodologia convencional (extração com solventes);
- Avaliar a ativação ou inibição do extrato metanólico de Jambu e frações sobre a enzima tirosinase (polifenoloxidase);
- Avaliar a atividade antimicrobiana do Jambu frente as bactérias *Micrococcus luteus* e *Lactobacillus casei*;
- Avaliar a atividade diurética do extrato metanólico do Jambu e do espilantol.

CAPÍTULO I.
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1 *Acmella oleracea* L.

Acmella oleracea L., nativa das regiões tropicais do Brasil é cultivada em várias partes do mundo para alimentação, como planta ornamental e uso medicinal (LENG et al., 2011). Está amplamente distribuída nas regiões tropicais e sub-tropicais, incluindo América, Norte da Austrália, África, Malásia, Bornéu, Índia e Sri Lanka (YADAV e SINGH, 2010).

É uma herbácea perene, semi-ereta e de ramos decumbentes, com flores amarelas dispostas em capítulos (COSTA et al., 2013). Pertence a família Asteraceae (Compositae), sendo do gênero *Acmella*, que contém 35 espécies tropicais (SAVADI et al., 2010). Essa hortaliça pode ser encontrada em outros lugares do mundo com sinônimos como *Acmella ciliata* Kunth (VULPI et al., 2007) e *Spilanthes oleracea* L. (NASCIMENTO et al., 2013).

No Brasil é popularmente conhecida como “Jambu” (Figura 1), “agrião bravo” ou “agrião do Pará”. Suas folhas e flores provocam um leve formigamento e dormência da língua (NASCIMENTO et al., 2013).

As folhas e hastes do Jambu são muito utilizadas no estado do Pará (Norte do Brasil) em pratos típicos, como o tacacá e o pato no tucupí ou com arroz e pizzas (COSTA et al., 2013).

As condições adequadas de produção, como preparo da sementeira, transplantes das mudas para os canteiros, irrigação, adubação e cobertura do solo, bem como controle de pragas, podem ser encontrados nas publicações de Poltronieri e colaboradores (2000) e Homma e colaboradores (2011).

Essa herbácea apresenta-se como importante fonte de renda para pequenos produtores dos municípios do Pará, uma vez que é uma planta de múltiplo uso, reunindo elementos essenciais para formação de um sistema sustentável (GUSMÃO et al., 2005).



Figura 1. Jambu (*Acmella oleracea* L.).

2 Composição química da planta

Há um interesse crescente em todo o mundo na utilização de materiais vegetais e fitoquímicos, fundamentando-se num estilo de vida saudável e sustentável. As substâncias extraídas de plantas devem ter baixa toxicidade e elevado grau de biodegradação (PITASAWAT et al., 1998; CHOOCHOTE et al., 1999). Portanto, estes fitoquímicos extraídos tem sido utilizados em produtos nutracêuticos, farmacêuticos, medicamentos à base de plantas, especiarias, repelentes de insetos, cosméticos e perfumes (RAMLAN e MOHAMAD, 2000).

O Jambu é uma das mais importantes plantas medicinais com fonte rica de componentes terapêuticos (PRACHAYASITTIKUL et al., 2013). Fitoquimicamente, as flores, folhas e hastes dessa folhosa são relatadas por conter aminoácidos, alcaloides (PIERIS et al., 2001), compostos fenólicos, cumarina, triterpenoides (PRACHAYASITTIKUL et al., 2009) e *N*-isobutilamidas

(*N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E*-decatrienamida, conhecida como espilantol, e (2*E*)-*N*-isobutil-2-undeceno-8,10-dienamida) (RAMSEWAK, ERICKSON e NAIR, 1999).

As *N*-alquilamidas, um grupo natural de metabólitos secundários encontrados em diferentes gêneros de plantas (*Echinacea*, *Zanthoxylum*, *Heliopsis* e *Acmella*) são moléculas bioativas novas e promissoras (BOONEN et al., 2010b). O princípio ou metabólito considerado mais ativo em *Acmella oleracea* L. é uma amida antisséptica, espilantol (Figura 2) (LENG et al., 2011). Essa amida é o componente responsável pelo efeito pungente encontrado nessa hortaliça.

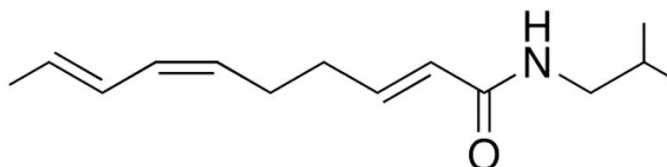


Figura 2. Estrutura química do espilantol.

Na Tabela 1 é possível observar a composição centesimal do Jambu *in natura* e seco com ar frio (em base seca) em pesquisas realizadas por Barbosa e colaboradores (2014) e Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2011).

Tabela 1. Composição centesimal e valor energético total (g/100g) de Jambu.

Determinações ¹	Jambu <i>in natura</i> *	Jambu <i>in natura</i> **	Jambu Seco***
Umidade	89,98 ± 0,10 ^a	89,0	10,07 ± 0,03 ^b
Lipídios	0,09 ± 0,01 ^a	0,30	2,97 ± 0,15 ^b
Proteína	1,61 ± 0,05 ^a	1,90	13,75 ± 0,21 ^b
Carboidratos totais ³	5,28	7,20	33,39
Fibras solúveis	0,09 ± 0,005 ^a	1,30	0,45 ± 0,02 ^b
Fibras insolúveis	1,63 ± 0,03 ^a	-	24,18 ± 0,58 ^b
Cinzas	1,32 ± 0,02 ^a	1,60	15,19 ± 0,13 ^b
Valor energético total (kcal) ²	28,37	32	215,29

¹Dados expressos como média ± desvio padrão; ²Valor teórico; ³Calculado por diferença. Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si, ao nível de 5 % de significância pelo teste t.

*Resultados expressos em base úmida. Fonte: BARBOSA et al., 2014.

**Resultados expressos em base úmida. Fonte: IBGE, 2011.

***Resultados expressos em base seca. Fonte: BARBOSA et al., 2014.

3 Espilantol

Espilantol (C₁₄H₂₃NO, 221,339 g/mol) é uma substância bioativa encontrada em diferentes plantas que são usadas tradicionalmente como remédios em todo o mundo (MOLINATORRES et al., 1996; PAULRAJ et al., 2013; PRACHAYASITTUKAL et al., 2013; RIOS e OLIVO, 2014). O seu nome IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) é (2*E*,6*Z*,8*E*)-*N*-isobutil-deca-2,6,8-trienamida (MOLINATORRES et al., 1996). É também conhecido como afinina (PRACHAYASITTUKAL et al., 2013).

As plantas em que é encontrado muitas vezes são chamadas de “planta dor de dente”, devido ao efeito analgésico do espilantol (MOLINATORRES et al., 1996; HIND e BIGGS,

2003; WU et al., 2008; TIWARI et al., 2011; DIAS et al., 2012; SHARMA et al., 2012; ABEYSIRI et al., 2013; DUBEY et al., 2013; PRACHAYASITTUKAL et al., 2013; PAULRAJ et al., 2013; RIOS e OLIVO, 2014; DANDIN et al., 2014; HAJDU, 2014). Como outras alquilamidas, é uma substância contendo uma amina de baixo peso molecular e a unidade acila insaturada, contribuindo para uma polaridade média. Assim, devido sua abundância na composição da planta, ele pode ser extraído a partir do vegetal usando metanol, etanol, CO₂ supercrítico ou hexano (NAKATANI e NAGASHIMA, 1992; SHARMA et al., 2011; DIAS et al., 2012; SINGH e CHATURVEDI, 2012a,b; HAJDU, 2014; ABEYSINGHE et al., 2014). Após ser extraído, ele pode ser purificado por meio de placa preparativa CCF (Cromatografia em Camada Fina) e/ou Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (JOHNS et al., 1982; OGURA et al., 1982; NAKATANI e NAGASHIMA, 1992; MBEUNKUI et al., 2011; PANDEY et al., 2011; MORENO et al., 2012; HAJDU, 2014).

Outras propriedades do espilantol são o efeito analgésico por via oral e antibacteriano (DUBEY et al., 2013), entre outras. Assim, o espilantol ou extratos de plantas que o contêm podem ser adicionados à pasta de dente e usados como analgésico oral em gel (como Buccaldol® e Indolphar®) e como um creme anti-rugas que pode substituir o Botox em aplicações cosméticas (DEMARNE e PASSARO, 2009; VERYSER et al., 2014). Há também alguns produtos antienvhecimento (Gatuline®, SYN®-COLL, ChroNoline™) que contêm espilantol. Há cerca de 30 patentes que descrevem produtos que são produzidos a partir de uma variedade de espécies *Splianthes* (HAW e KENG, 2003). Ele é também consumido em alimentos. As folhas de algumas das plantas (como *S. acmella*) que contêm espilantol são utilizadas como especiaria (HAW e KENG, 2003; PAULRAJ et al., 2013). A União Europeia estima que a média de ingestão diária de espilantol é de 24 g/pessoa/dia (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2015). Também é possível que o espilantol, como outras alquilamidas, tenha efeitos importantes sobre o sistema nervoso central (SNC) e sistema imune (GERTSCH, 2008; HAJDU, 2014; VERYSER et al., 2014). No entanto, seu maior potencial para melhorar a saúde humana pode ser atribuído à sua capacidade de matar os mosquitos que podem transmitir doenças tropicais, como malária e dengue (PANDEY et al., 2011; SPELMAN et al., 2011; HERNÁNDEZ-MORALES et al., 2015). Além disso, detectou-se atividade anticâncer desta substância (SOARES et al., 2014; MISHRA et al., 2015).

3.1 Ocorrência

Espilantol, também conhecida como afinina, pode ser encontrado não apenas em *Acmella oleracea*, mas também *A. ciliate*, *A. oppositifolia*, *A. radicans*, *A. brachyglossa*, *A. paniculata*, *A. uliginosa*, *Welelia parviceps* e *Heliopsis longipes* (CHUNG et al., 2008; PRACHAYASITTUKAL et al., 2013).

Muitos artigos, que descrevem a presença do espilantol, principalmente em *Heliopsis longipes*, o chamam de afinina ao em vez de espilantol (JOHNS et al., 1982; RIOS, AGUILAR-GUADARRAMA e GUTIERREZ, 2007; SPELMAN et al., 2011; DÉCIGA-CAMPOS et al., 2012). Por outro lado, há discordâncias na literatura sobre o nome do gênero e espécie de uma das plantas mais importantes que contém espilantol. Alguns chamam de *A. oleracea* (MORENO et al., 2012; SIMAS et al., 2013; ABEYSINGHE et al., 2014; CASTRO et al., 2014), mas outros chamam de *A. oleracea* (L.) R. K. Jansen (FAVORETO e GILBERT, 2010), *A. oleracea* Compositae (HIND e BIGGS, 2003), *Spilantes oleracea* L. (MARTINS et al., 2012), *Spilantes acmella*, (CHUNG et al., 2008; DEMARNE e PASSARO, 2009; PANDEY et al., 2011; PRACHAYASITTUKAL et al., 2013; SANA et al., 2014; SOARES et al., 2014; MISHRA et al., 2015), *S. acmella* L. var. *oleracea* Clarke (NAKATANI e NAGASHIMA, 1992) e *S. acmella* Murr. (Asteraceae) (SINGH e CHATURVEDI, 2012a,b; ABEYSIRI et al., 2013). Também existem cinco espécies diferentes de *Acmella* em Taiwan que contêm espilantol

(CHUNG et al., 2008). Um artigo recente descreve *S. acmella* e *S. oleracea* como sendo duas plantas separadas (TIWARI et al., 2011). Outros sinônimos incluem *A. ciliata* Kunth, *Cotula pyretharia* L., *S. fusca* Mart, *Bidens fervida* Lan e *A. uliginosa* (Sw.) Cass (BORGES, 2009; COSTA et al., 2013). Os fatos relatados acima revelam a confusão com as propriedades e classificação botânica desta planta, entretanto, não diminuem sua popularidade como alimento e, atualmente, com suas propriedades farmacêuticas.

3.2 Extração, purificação e quantificação

Como o espilantol é anfifílico, ele pode ser extraído utilizando solventes que variam em polaridade de hexano (RAMSEWAK, ERICKSON e NAIR, 1999) até metanol:H₂O (4:1, v/v) (ABEYSINGHE et al., 2014). Há também o extrato etanólico que é vendido em farmácias (BOONEN et al., 2010a,b). No entanto, nenhum experimento foi realizado para comparar a quantidade de espilantol extraído utilizando diferentes processos de extração.

O hexano foi capaz de extrair 10 g de material a partir de 1.130 g de inflorescências liofilizadas (0,9 % de rendimento) (RAMSEWAK, ERICKSON e NAIR, 1999). Outro trabalho utilizou ultra-som com 60 mL de etanol:hexano (3:7, v/v) à 50 °C e 30 minutos para solubilizar uma quantidade indeterminada de material de 2 g de inflorescências secas (COSTA et al., 2013). Simas e colaboradores (2013) utilizaram uma quantidade desconhecida de etanol à temperatura ambiente para extrair 106 g (13 %) de material de 803 g de folhas secas. Mbeunkui e colaboradores (2011) obtiveram 15 g a partir de 300 g de flores (5 % de rendimento) usando metanol à temperatura ambiente. Abeysiri e colaboradores (2013) utilizaram metanol para extrair 18,0, 16,6 e 10,2 % de folhas secas, caules e inflorescências, respectivamente. CO₂ supercrítico com etanol e água também foi utilizado para extrair espilantol de inflorescências, folhas e caules de *S. acmella* (DIAS et al., 2012).

O espilantol foi purificado a partir de extrato etanólico utilizando Cromatografia em Camada Fina (CCF), placas de gel de sílica e hexano:acetato de etila (2:1, v/v) como fase móvel (DIAS et al., 2012). CCF também foi utilizada para purificar espilantol a partir de inflorescências secas de *A. oleracea*, que foi previamente extraído com ultra-som e etanol:hexano (3:7, v/v) a 50 °C e 30 min (COSTA et al., 2013). Outro trabalho utilizou CCF seguido por CLAE em placa preparativa para purificar espilantol a partir de extrato hexânico de inflorescências (NAKATANI e NAGASHIMA, 1992). Simas e colaboradores (2013) utilizaram duas colunas de escala preparativa (XAD-16 e Sephadex LH-20), seguido por CCF em placa preparativa para purificar espilantol a partir de folhas. Outra abordagem bem sucedida foi em coluna cromatográfica de sílica gel, seguida por CCF (RAMSEWAK, ERICKSON e NAIR, 1999).

Para quantificação, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção Ultravioleta (CL-UV) e Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (CL-EM) têm sido utilizadas (BAE et al., 2010; SHARMA et al., 2011; SINGH e CHATURVEDI, 2012a,b). Ambos os métodos utilizaram coluna C18. Um método utilizando a CL-UV e Espectrometria de Massas (EM) usou fase móvel isocrática constituída por 93:7 CH₃CN: H₂O (v/v) com fluxo de 0,5 mL/min e o tempo de retenção para espilantol foi 7,34 minutos (SINGH e CHATURVEDI, 2012a,b). Bae e colaboradores (2010) validaram um método utilizando a CL-EM para quantificar espilantol numa mistura de folhas, inflorescências e raízes, as quais foram extraídas com etanol:água (19:1, v/v) à temperatura ambiente. Esses autores utilizaram eluição isocrática com CH₃CN:H₂O (1:1,v/v), fluxo de 0,2 minutos. O tempo de retenção foi de 4,97 minutos (BAE et al., 2010). A CL-EM também foi utilizada com gradiente de eluição que iniciou com 1:4 de CH₃CN:H₂O (v/v), contendo ácido acético a 1 %, aumentando para 9:1 de CH₃CN:H₂O (v/v) durante 150 minutos. O tempo de retenção de espilantol foi 62,37 minutos (SHARMA et al., 2011).

Monroe e colaboradores (2016) liofilizaram capítulos, folhas e hastes de *A. oleracea*, extraíram com metanol à 100 °C e pressão de 10 MPa (100 atm) e analisaram por CL-EM e Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C. A concentração de espilantol nos capítulos, folhas e hastes foram 16,5, 0,344 e 0,241 mg/g peso seco. Esta metodologia tem sido utilizada para solubilizar mais materiais de muitas frutas e hortaliças em relação a outros métodos, incluindo a extração de Soxhlet ou ultra-som (RICHTER et al., 1996; RICHARDS et al., 2014; LEVINE et al., 2015).

3.3 Propriedades químicas e físicas do espilantol

Espilantol é uma *N*-alquilamida, que apresenta várias bioatividades, principalmente como agente antimicrobiano, antifúngico e analgésico (VERYSER et al., 2014). Molina-Torres e colaboradores (2004) relataram que há mais de 200 alquilamidas naturais encontradas em dez famílias de hortaliças: Aristolochiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Convolvulaceae, Euphorbiaceae, Menispermaceae, Piperaceae, Poaceae, Rutaceae e Solanaceae. No entanto, Gertsch (2008) informa que mais de 400 *N*-alquilamidas foram identificadas em 26 famílias diferentes de plantas.

Há relato da síntese seletiva de espilantol com rendimento de 61 %. A via de síntese do espilantol foi como se segue: O grupo *t*-butiltio foi substituído por metil com o reagente metil de Grignard na presença de Ni (DPPP) Cl₂ com rendimento de 83 %. A análise por Cromatografia a Gás revelou que a substância apresentou pureza maior que 97 %. A remoção do grupo de proteção *t*-butildimetilsilil pode ser realizada por reação com fluoreto de tetrabutílamônio em THF durante 30 min em temperatura ambiente. A oxidação do álcool resultante com cloreto de oxalilo-DMSO e trietilamina em cloreto de metileno produziu, após coluna cromatográfica em sílica gel, um aldeído instável com 54 % de rendimento. Este aldeído foi transformado em espilantol por reação com o reagente de Wittig correspondente, que por sua vez foi preparado a partir isobutil trifenilfosfônio acetamida e LDA em THF a 0 °C por 10 min. O rendimento de espilantol foi de 61 % a partir do aldeído (IKEDA et al., 1984).

O espilantol apresenta coloração amarelo claro com ponto de fusão de 23 °C, ponto de ebulição a 165 °C, índice de refração à 298 °C de 1,5135 e um máximo de absorção de UV a 228,5 nm (JACOBSON, 1957). O seu espectro de Infravermelho foi relatado como tendo os seguintes sinais: $\nu_{\text{máx}}$ (filme) cm⁻¹: 3340, 3150, 3080, 3020, 1678, 1636, 1550, 1240, 1160, 987, 953 (NAKATANI e NAGASHIMA, 1992). Esta amida tem peso molecular com massa exata em *m/z* 221,177963. O espectro de massas detectado em modo positivo apresentou pico em *m/z* = 222, atribuído ao íon quase molecular [M+H]⁺ e picos em *m/z* = 149, um fragmento [MH-C₄H₁₁N]⁺ com perda do grupo isobutilamina, e em *m/z* = 99, que justifica o fragmento *N*-isobutilamida ligado ao grupo carbonila (JACOBSON, 1957).

Os dados espectrométricos de RMN ¹H e ¹³C foram descritos por Nakatani e Nagashima (1992), Tabela 2. Os espectros de RMN ¹H e ¹³C do espilantol são apresentados nas Figuras 3 e 4 (SANTOS, 2010). Segundo Ley e colaboradores (2006) e Rios e Olivo (2014), as atividades do espilantol como analgésica, formigamento da boca e salivação são atribuídas à função amida e a estereoquímica da unidade acila insaturada.

Tabela 2. Deslocamentos químicos de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) do espilantol em CDCl_3 (NAKATANI e NAGASHIMA, 1992).

H	δ_{H}	C	δ_{C}
2	5,79 d ($J=15$)	1	166,0
3	6,83 dt ($J=15;7$)	2	124,2
4	2,23-2,35 m	3	143,5
5	2,23-2,35 m	4	32,1
6	5,26 dt ($J=11; 7$)	5	26,4
7	5,97 dd ($J=11; 11$)	6	127,7
8	6,29; dd ($J=11; 15$)	7	129,5
9	5,70 dq ($J=15; 7$)	8	126,7
10	1,78 d ($J=7$)	9	130,0
H-N	5,47 s	10	18,3
1'	3,15 dd ($J=7; 6$)	1'	46,9
2'	1,78 m	2'	28,6
3',4'	1,78 m	3',4'	20,1

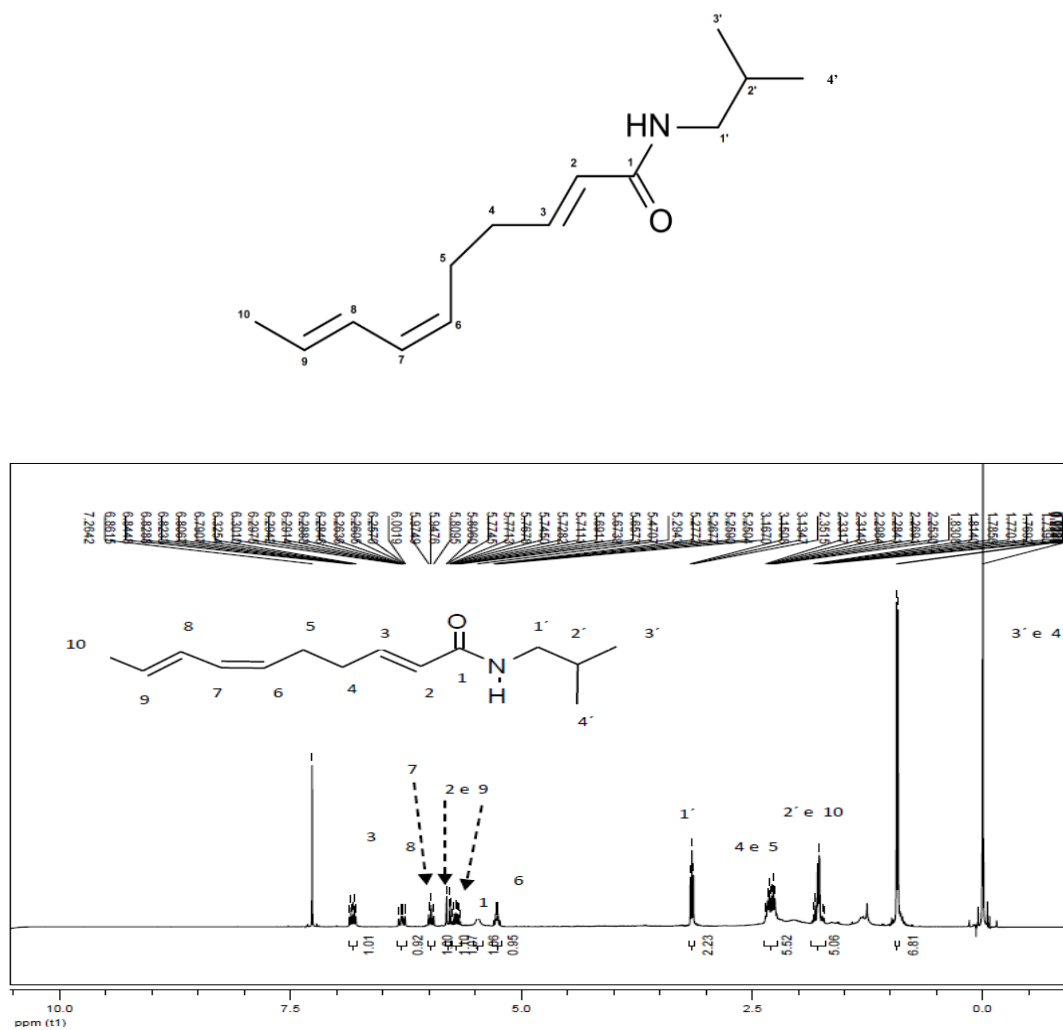


Figura 3. Espectro de RMN ^1H do espilantol (400 MHz, CDCl_3).
Fonte: SANTOS, 2010.

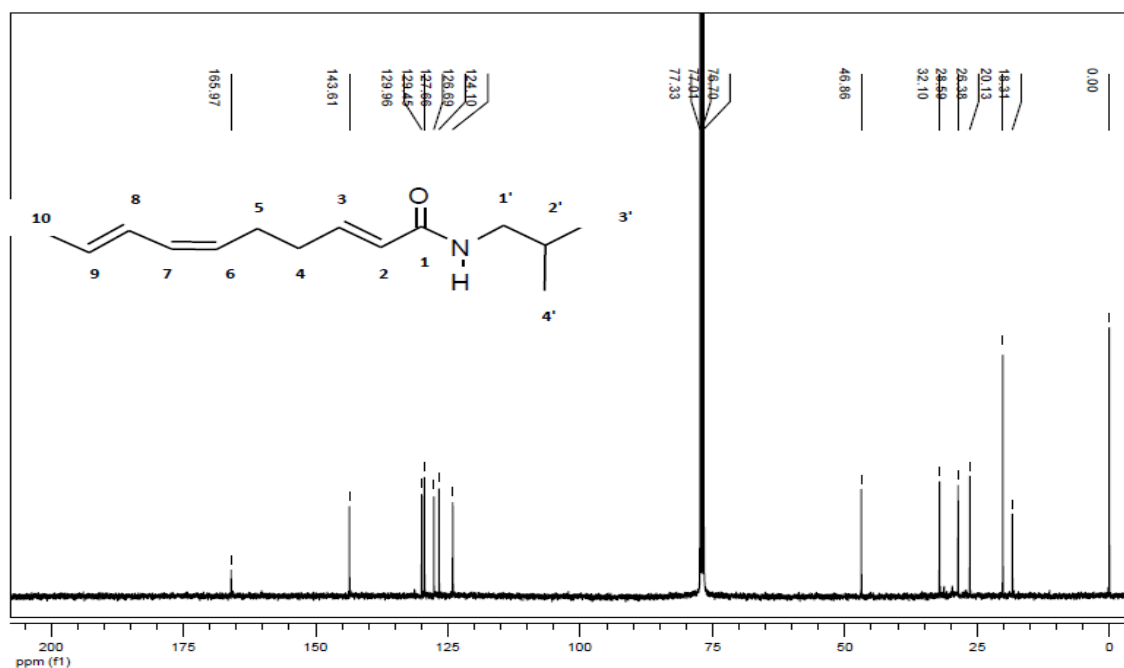


Figura 4. Espectro de RMN ^{13}C do epilantol (100 MHz, CDCl_3).
Fonte: SANTOS, 2010.

3.4 Atividades biológicas do epilantol

O epilantol tem muitas atividades biológicas, incluindo analgésico (MOLINATORRES et al., 1996; HIND e BIGGS, 2003; WU et al., 2008; CILIA-LOPEZ et al., 2010; TIWARI et al., 2011; DIAS et al., 2012; SHARMA et al., 2012; ABEYSIRI et al., 2013; DUBEY et al., 2013; PAULRAJ et al., 2013; PRACHAYASITTUKAL et al., 2013; DANDIN et al., 2014; HAJDU, 2014; RIOS e OLIVO, 2014), anti-nociceptivo (RIOS, AGUILAR-GUADARRAMA e GUTIERREZ, 2007; DÉCIGA-CAMPOS et al., 2012), antioxidante (ABEYSIRI et al., 2013), anti-inflamatório (WU et al., 2008; HERNÁNDEZ et al., 2009; DIAS et al., 2012), antimutagênico (ARRIAGA-ALBA et al., 2013), diurético (GERBINO et al., 2016), anti-rugas (DEMARNE e PASSARO, 2009), antifúngico (DUBEY et al., 2013), bacteriostático (MOLINA-TORRES et al., 2004), inseticida (KADIR et al., 1989; MORENO et al., 2012; SHARMA et al., 2012), anti-malária, larvicida contra *Aedes aegypti* e *Helicoverpa zea* (RAMSEWAK, ERICKSON e NAIR, 1999), atividade acaricida (CRUZ et al., 2016) e atividade anti-moluscicida (JOHNS et al., 1982). Também houve relatos sobre atividade como anticonvulsivante, afrodisíaco, inibidor da lipase pancreática, diurético, vasorelaxante e alívio da dor de dente (DUBEY et al., 2013).

Essa substância pode ser absorvida através da pele, intestino endotelial, mucosa oral e barreira hematocefálica (BOONEN et al., 2010a,b; VERYSER et al., 2014). Além disso, o epilantol pode melhorar a capacidade da cafeína, testosterona e cinco micotoxinas para penetrar a pele (DE SPIEGELEER et al., 2013). Assim, é importante certificar-se que as formulações contendo epilantol não estão contaminadas com micotoxinas (DE SPIEGELEER et al., 2013). Também melhorou o desempenho sexual em ratos machos como indicado pela ereção peniana, frequência de montagem, frequência de intromissão e frequência da ejaculação duraram até 14 dias após a descontinuação da sua administração (SHARMA et al., 2011). A atividade antinociceptiva do epilantol foi estudada em detalhe (DÉCIGA-CAMPOS et al., 2010). A administração intraperitoneal de 30 mg/kg de epilantol produziu efeito antinociceptivo dependente da dose quando avaliada em ratos submetidos a testes com ácido acético e

capsaicina. Antinocicepção induzida por espilantol foi bloqueada por naltrexona, *p*-clorofenilalanina e flumazenil. Assim, seu efeito antinociceptivo pode ser devido à ativação de sistemas opioide, serotoninérgico e GABAérgico. Além disso, o efeito antinociceptivo diminuiu quando os ratos foram pré-tratados com 1*H*-[1,2,4]oxadiazolo[1,2-*a*]quinoxalina-1-um e glibenclamida. Isso suporta a ideia que canais de óxido nítrico de K⁺ podem estar envolvidos no mecanismo de ação (DÉCIGA-CAMPOS et al., 2010). Estes mesmos pesquisadores verificaram que o espilantol não só tem efeito antinociceptivo, mas também modificou o comportamento da ansiedade e prolongou o tempo de hipnose induzida pelo pentobarbital de sódio. Eles também descobriram que o espilantol diminuiu o tempo de convulsões tônicas e clônicas induzidas por pentilenotetrazol (PTZ) (DÉCIGA-CAMPOS et al., 2010). A atividade analgésica foi estudada através da avaliação da inibição da contorção induzida por ácido acético em ratos (OGURA et al., 1982). Espilantol foi administrado por via oral em soluções aquosas em doses de 2,5 a 10,0 mg/kg. Ele exibiu DE₅₀ de 6,98 mg/kg. A atividade analgésica do espilantol foi atribuída ao aumento da liberação de GABA no córtex cerebral temporal (OGURA et al., 1982).

Em outro estudo, o espilantol atuou nos receptores GABA, 0,5 min depois de ser administrado a uma concentração de 1x10⁻⁴ M. Um outro estudo descobriu que o espilantol apresenta ação analgésica semelhante ao ceterolaco (CILIA-LÓPEZ et al., 2010). Além disso, seu efeito estimulante sobre o sistema nervoso de ratos adultos foi comparável à cafeína (CILIA-LOPEZ et al., 2010). A atividade antimutagênica do espilantol foi demonstrada pela sua capacidade para reduzir 2AA-e mutações NOR-induzida em TA98 e TA102 de cepas de *Salmonella Typhimurium* (ARRIAGA-ALBA et al., 2013). Espilantol (25 e 50 µg/placa) reduziu significativamente as mutações “frameshift” que foram geradas por 2-aminoantraceno (2AA) (40 %) e reduziu o dano oxidativo ADN gerado por norfloxacino (NEM) (37-50 %) (ARRIAGA-ALBA et al., 2013).

O poder antioxidante do espilantol e extratos de *A. oleracea* também foi estudado (ABEYSIRI et al., 2013). Um estudo quantificou 5,29, 1,42 e 3,42 mg de equivalente de Trolox por g de folhas secas, caules e inflorescências (ABEYSIRI et al., 2013). Eles também encontraram 7,59, 1,65 e 5,34 mg de equivalente de ácido gálico por grama de peso seco (mg EAG/g) de compostos fenólicos totais (ABEYSIRI et al., 2013). Um outro estudo encontrou 9,2, 10,3 e 7,7 mg de equivalente Trolox por grama de partes aéreas secas de *A. oleracea* cultivadas de três maneiras diferentes: no campo, com hidroponia e por indução de calos. O teor de flavonoides total foi de 11,3, 12,3 e 7,4 mg equivalente de rutina por grama de peso seco de *A. oleracea* cultivadas no campo, com hidroponia e por indução de calos, respectivamente (ABEYSINGHE et al., 2014).

A atividade anti-inflamatória de inflorescências secas foi demonstrada utilizando o modelo ativador de macrófagos murino, RAW 264.7 (WU et al., 2008). Estes macrófagos produzem óxido nítrico (NO) para mediar a inflamação, por meio do óxido nítrico sintase induzível (i-NOS) e da ciclo-oxigenase-2 (COX-2). O espilantol inibiu a produção de i-NOS, COX-2 e ARNm que os codificam. Foi também sugerido que o espilantol atenua respostas inflamatórias em macrófagos murinos RAW 264.7, em parte, devido à inativação de NF-κB. Espilantol também teve efeito anti-inflamatório sobre o modelo ácido araquidônico com DE₅₀ = 1,2 mg/orelha (WU et al., 2008). Num estudo diferente, utilizando o modelo acetato miristato de forbol, espilantol mostrou efeito dependente da dose anti-inflamatória com DE₅₀ = 1,3 mg/orelha (HERNÁNDEZ et al., 2009).

Extratos contendo espilantol têm sido utilizados para tratar dor de dente, estomatite e doenças da pele tais como eczema (BOONEN et al., 2010a,b). Estão presentes em preparações para mucosa bucal que são indicadas para dor e úlceras menores na boca. Várias preparações contendo espilantol para utilização bucal estão comercialmente disponíveis (BOONEN et al., 2010a,b). Além disso, espilantol foi incorporado em cremes dentais e enxaguantes bucais. O

objetivo é fornecer um sabor de hortelã fresca duradouro. O espilantol também aumenta a salivação, o que melhora o apetite e apresenta leve efeito anestésico, permitindo assim às pessoas com dor de dente escová-los confortavelmente (HATASA e IIOKA, 1973). Há também uma patente para a produção de cremes dentais ou outras composições orais com óleos essenciais ricos em espilantol (SHIMADA e GOMI, 1995). Além disso, o espilantol em extratos de *A. oleracea* L. inibe contrações nos músculos subcutâneos, especialmente os da face, e pode ser usado com produto anti-rugas (DEMARNE e PASSARO, 2009). Como resultado, muitos produtos anti-envelhecimento que contêm espilantol como Gatuline®, SYN®-COLL e ChroNoline™ são comercializados.

As atividades antifúngicas e bacteriostáticas do espilantol e outras alcanoides a partir das raízes de *H. longipes* também foram estudadas (MOLINA-TORRES et al., 2004). Quatro dos fungos testados mostraram inibição do crescimento de 100 %, devido à presença do espilantol: *Sclerotium rolfsii*, *S. cepivorum*, *Phytophthora infestans* e *Rhizoctonia solani* AG-3 e AG-5. Espilantol também inibiu o crescimento de *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* em baixas concentrações, 25 µg/mL (MOLINA-TORRES et al., 2004). Em outro estudo, espilantol de *S. calva* apresentou atividade antifúngica contra os fungos *Fusarium oxysporum* e *Trichophyton mentagrophytes* (RAI et al., 2004). Esta atividade aumentou quando *S. calva* foi inoculada com o endófito do *Piriformospora indica*, que também aumentou a concentração de espilantol nas raízes de *S. calva* (RAI et al., 2004). O espilantol também demonstrou ser útil como inseticida (KADIR et al., 1989; SPELMAN et al., 2011; SHARMA et al., 2012). Ele matou a traça da couve, *Plutella xylostella* L., que é uma das pragas mais destrutivas que atacam hortaliças crucíferas, como brócolis (SHARMA et al., 2012). Também foi capaz matar a traça do tomateiro, *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae), que ataca solanáceas e se tornou uma séria ameaça para o tomate na região do Mediterrâneo (MORENO et al., 2012).

Estudos electrofisiológicos indicam hiperexcitação imediata seguida por inibição completa da atividade do nervo servical. Espilantol exibiu a mais elevada toxicidade para *Tuta absoluta*, com o menor DL₅₀ = 0,13 g.mg⁻¹. Além disso, espilantol foi aproximadamente cinco vezes mais tóxico do que permetrina e cerca de 321 vezes mais potente do que o extrato de *Azadirachta indica*. Por outro lado, o espilantol não foi tóxico a dois insetos benéficos, o predador *Solenopsis saevissima* (Smith) (Hymenoptera: Formicidae) e o polinizador, *Tetragonisca angustula* (Latr.) (Hymenoptera: Apidae: Melipninae) (MORENO et al., 2012). Espilantol também demonstrou ser tóxico para os mosquitos, *Plasmodium falciparum*, que transmite a malária (SPELMAN et al., 2011). Ele apresentou CI₅₀ de 16,5 g/mL e 41,4 g/mL sobre estirpes de *P. falciparum* e CI₅₀ de 5,8 g/mL e 16,3 g/mL para estirpes de *P. falciparum* K1 resistentes à cloroquina, respectivamente. Outras investigações revelaram que em concentrações relativamente baixas, espilantol e o extrato aquoso de *S. acmella* reduziram a parasitemia, 59 e 53% em ratos infectados com *P. yoelii yoelii* 17XNL à 5 e 50 mg/kg, respectivamente. Este parasita é usado para infectar ratos no modelo animal da malária. Estes resultados fornecem evidências que suportam as atividades antimaláricas de *S. acmella* e do espilantol (SPELMAN et al., 2011). Finalmente, outros pesquisadores relataram a capacidade dos extratos de *S. acmella* Murr. para matar a barata americana, *Periplaneta americana* L., sendo de 1,3, 2,6 e 3,8 vezes mais tóxico do que o carbaril, bioresmetrina e lindano, respectivamente (KADIR et al., 1989). Espilantol também é ativo contra larvas de *Aedes aegyptii*, que pode propagar os vírus que causam a dengue, chikungunya, zika e febre amarela, bem como sobre *Helicoverpa zea* (larva do milho), em concentrações de 12,5 e 250 mg/mL, respectivamente (RAMSEWAK, ERICKSON e NAIR, 1999). Espilantol, na concentração de 7,5 ppm, causou 100 % de motilidade de ovos, larvas, pupas de *Anopheles*, *Culex*, e mosquitos *Aedes* em baixas doses (SARAF e DIXIT, 2002). A atividade inseticida de raízes de *Heliopsis longipes* contra *Anopheles albimanus* e *Aedes aegypti* foi determinada (HERNÁNDEZ-

MORALES et al., 2015). Uma concentração de 7 mg/L de extrato etanólico causou 100 % de mortalidade de larvas de *A. albimanus*, e teve o mesmo efeito sobre *A. aegypti*. Esta atividade pode ser atribuída ao espilantol; as duplas ligações conjugadas presentes na sua estrutura desta amida foram consideradas necessárias para manter a atividade larvicida. Este estudo demonstrou o potencial de *H. longipes* controlar a fase larval de *A. albimanus* e *A. aegypti*, vetores transmissores de malária e dengue, respectivamente (HERNÁNDEZ-MORALES et al., 2015).

Outro estudo explorou a atividade inseticida de *Spilanthus acmella* Murr. (SHARMA et al., 2012). O extrato de semente de *S. acmella* e espilantol foram tóxicos para *Plutella xylostella*. Atividade de 95-100 % foi observada a dose de 2 g/L de espilantol, enquanto 60-70 e 80-90 % de mortalidade foi observada em extratos de sementes preparados com metanol e hexano, a dose de 5 g/L depois 48 h de exposição. Foram observados valores de CL₅₀ de 1,49; 5,14; 5,04; 11,75 g/L para espilantol, extrato metanólico de semente, extrato hexânico e deltametrina, respectivamente. Estes resultados indicam o potencial de *S. acmella* e espilantol para controle de *P. xylostella* e outros insetos de importância agrícola (SHARMA et al., 2012). Espilantol também tem forte atividade moluscicida contra *Physa occidentalis* (DL₅₀ de 100µM) e cercária (JOHNS et al., 1982). Com concentração de 50 mg/L em água a 21 °C, caracóis foram inativados após 60 minutos e mortos dentro de 18 h. À 150 mg/L (o limite de solubilidade para espilantol) emergência de cercárias cessaram e os caracóis mostraram imobilidade depois de 30 min (JOHNS et al., 1982).

Espilantol também pode estimular o crescimento de raízes em mudas de *Arabidopsis thaliana* (CAMPOS-CUEVAS et al., 2008). Os efeitos do espilantol foi semelhante àquelas produzidas por auxinas no desenvolvimento das raízes. Estes resultados sugerem o papel do espilantol na regulação do desenvolvimento das raízes adventícias, provavelmente operando através da via de transdução de sinal NO (CAMPOS-CUEVAS et al., 2008). Espilantol também inibiu enzimas CYP P450, com valores de CI₅₀ de 25, 16,1 e 13,5 µg/mL para CYP1A1/2, CYP2D6 e CYP3A4, respectivamente (RODEIRO et al., 2009). Estes resultados sugerem que o espilantol inibe as principais enzimas P450 humanas envolvidas no metabolismo de fármacos e pode induzir potenciais interações ervas-fármacos (SMITH, 2014). Por outro lado, a inibição de CYP1A1/2 pode estar associada a diminuição do risco cancerígeno. Embora, *in vitro* a inibição da P450 não comprova necessariamente efeitos *in vivo*, recomenda-se uma avaliação cautelosa das potenciais consequências clínicas decorrentes do consumo destes produtos, especialmente para tratamentos a longo prazo (RODEIRO et al., 2009).

Em conclusão, o espilantol é um metabólito especial, com elevado potencial industrial e apresenta diversas propriedades biológicas e efeitos sobre a saúde. Ele pode ser encontrado, extraído e purificado a partir de *A. oleracea* e *H. longipes*. *A. oleracea* é utilizada como especiaria e alimento na região norte do Brasil e também utilizada em tratamento para dores de dentes. As atividades biológicas do espilantol estão relacionadas na Tabela 3. Espilantol pode ter efeito analgésico (MOLINATORRES et al., 1996; HIND e BIGGS, 2003; CILIA-LOPEZ et al., 2010; TIWARI et al., 2011; DIAS et al., 2012; SHARMA et al., 2012; DUBEY et al., 2013; PAULRAJ et al., 2013; PRACHAYASITTUKAL et al., 2013; WU et al., 2008; RIOS e OLIVO, 2014; DANDIN et al., 2014; HAJDU, 2014), antinociceptivo (RIOS, AGUILAR-GUADARRAMA e GUTIERREZ, 2007; DÉCIGA-CAMPOS et al., 2012), antioxidante (DIAS et al., 2012; ABEYSIRI et al., 2013), anti-inflamatório (WU et al., 2008; HERNÁNDEZ et al., 2009; DIAS et al., 2012), antimutagênico (ARRIAGA-ALBA et al., 2013), anti-rugas (DEMARNE e PASSARO, 2009), antifúngico (DUBEY et al., 2013), bacteriostático (MOLINA-TORRES et al., 2004), inseticida (KADIR et al., 1989; MORENO et al., 2012; SHARMA et al., 2012), anti-malária (SOARES et al., 2014), larvicida contra *Aedes aegypti* e *Helicoverpa zea* (RAMSEWAK, ERICKSON e NAIR, 1999), e moluscicida (JOHNS et al., 1982). Também houve relatos sobre sua atividade como anticonvulsivo, afrodisíaco, inibidor

da lipase pancreática, diurético e vasorelaxante (DUBEY et al., 2013). No entanto, a toxicidade humana do espilantol não foi completamente testada, ainda que *A. oleracea* e *H. Longipes* tem sido consumidas há longo tempo.

Tabela 3. Atividades biológicas do espilantol.

Atividades Biológicas	Referências
Analgésico	Prachayasittukul et al. (2013)
Antinociceptivo	Déciga-Campos et al. (2012)
Antioxidante	Abey Siri et al. (2013)
Anti-inflamatório	Dias et al. (2012)
Anti-rugas	Demarne e Passaro (2009)
Antifúngico	Dubey et al. (2013)
Bacteriostático	Molina-Torres et al. (2004)
Inseticida	Sharma et al. (2012)
Antimalária	Sharma et al. (2012)
Larvicida contra <i>Aedes aegypti</i> e <i>Helicoverpa zea</i>	Ramsewak, Erickson e Nair (1999)
Moluscicida	Johns, Graham e Towers (1982)
Anticonvulsante	Dubey et al. (2013)
Afrodisíaco	Dubey et al. (2013)
Inibidor da lipase pancreática	Dubey et al. (2013)
Agente antimicrobiano	Dubey et al. (2013)
Diurético	Gerbino et al. (2016)
Vasorelaxante	Dubey et al. (2013)
Anti-viral da imunodeficiência humana	Dubey et al. (2013)
Alívio da dor de dente	Dubey et al. (2013)
Melhora a penetração na pele de cafeína e cinco micotoxinas	Dubey et al. (2013)

4 Capacidade antioxidante de hortaliças

Grupos fenólicos fazem parte da constituição de um grande grupo de metabólitos, que consiste em um ou mais anéis aromáticos com graus variáveis de hidroxilação. Esses grupos podem sofrer metoxilação e glicosilação, contribuindo com a cor, adstringência e amargor da parte da fruta ou hortaliça que os contém (CROZIER et al., 2006).

Muitos estudos têm associado à estrutura de compostos fenólicos com suas capacidades antioxidantes (RICE-EVANS et al., 1996; ZHENG et al., 2010). Em geral, o aumento do grau de hidroxilação dos anéis aromáticos causa maior capacidade antioxidante dos ácidos hidroxicinâmicos. Por exemplo, ácido cafeico (dois grupos hidroxilas) tem maior capacidade antioxidante em relação ao ácido *p*-cumárico (Figura 5), com um grupo hidroxila (FAN et al., 2009).

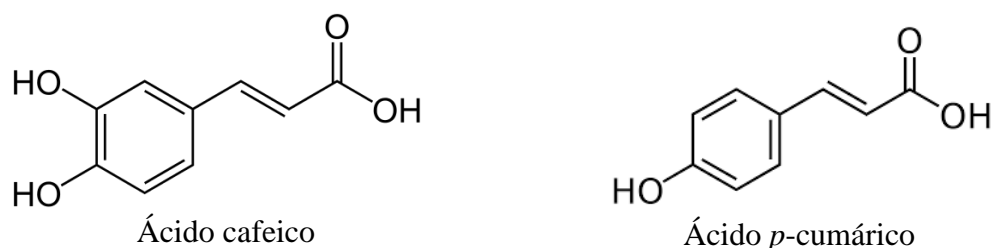


Figura 5. Estrutura química do ácido cafeico e do ácido *p*-cumárico.

Entre os metabólitos especiais, os compostos fenólicos têm sido extensivamente estudados devido seus diversos benefícios à saúde como antioxidantes, e por prevenir a inflamação crônica, doenças cardiovasculares, câncer e diabetes, etc. (ACOSTA-ESTRADA et al., 2014).

No início de 1980, um procedimento preciso foi desenvolvido para a estimativa de substâncias fenólicas livres, conjugados solúveis e insolúveis em diferentes alimentos (KRYGIER et al., 1982; SOSULSKI et al., 1982). Em numerosos ensaios efetuados de capacidade antioxidante *in vitro*, os compostos fenólicos insolúveis têm demonstrado capacidade antioxidante significativamente maior em comparação com os compostos fenólicos livres e solúveis conjugados (LIYANA-PATHIRANA e SHAHIDI, 2006; CHANDRASEKARA e SHAHIDI, 2010).

Frutas e hortaliças têm a maioria de seus fitoquímicos nas formas conjugadas livres ou solúveis. Fenóis ligados compreendem uma média de 24 % dos compostos fenólicos presentes nessas matrizes alimentícias (ADOM e LIU, 2002; SUN et al., 2002). Exemplos de compostos fenólicos insolúveis encontrados em hortaliças são apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Conteúdo de fenólicos insolúveis encontrados em hortaliças (ACOSTA-ESTRADA et al., 2014) (continua).

Fonte	Fenólicos insolúveis (%)	Referências
Cenoura (<i>Daucus carota</i>)	37,6	Chu et al. (2002)
Couves chinesas	<2	Harbaum et al. (2008)
Pak choi (<i>Brassica campestris</i> L. <i>ssp. chinensis</i> var. <i>communis</i>)		
Folha de mostarda chinesa (<i>Brassica juncea</i> Coss)		
Variedades de pimenta (<i>Capsicum annuum</i> L.)	40,59–58,71	Hervert-Hernández et al. (2010)
Arbol, chipotle, guajillo e Morita		
Folhas de couve (<i>Brassica oleraceae</i> L. var. <i>acephala</i> DC.)	5,32	Ayaz et al. (2008)
Cebola (<i>Allium cepa</i>)	9,70	Chu et al. (2002)
Var. <i>pérola</i>	22,61	Albishi et al. (2013)
Batata (<i>Solanum tuberosum</i>)	39,9	Chu et al. (2002)
Abóbora sem semente (<i>Cucurbita pepo</i>)	21,07	Peričin et al. (2009)

Quadro 1. Continua.

Fonte	Fenólicos insolúveis (%)	Referências
Pimentão vermelho (<i>Capsicum annuum</i> L.)	9,80	Chu et al. (2002)
Flores comestíveis <i>Nelumbo nucifera</i>	70,73	Kaisoon et al. (2011)
<i>Cosmos sulphureus</i>	51,42	
<i>Telosma minor</i>	26,82	

Fenólicos nas formas insolúveis são covalentemente ligados a componentes estruturais de parede celular, tais como, celulose, hemicelulose (por exemplo, arabinoxilanos), lignina, pectina e proteínas estruturais em forma de bastonete (WONG, 2006) como descritos na Figura 6. Esses metabólitos desempenham funções importantes na parede celular, fornecendo barreiras físicas e químicas, proteção contra a invasão do patógeno e adstringência que impede o ataque de insetos e animais, além de apresentarem propriedades como antibacterianos, antifúngicos e antioxidantes (SANCHO et al., 2001; LIU, 2007).

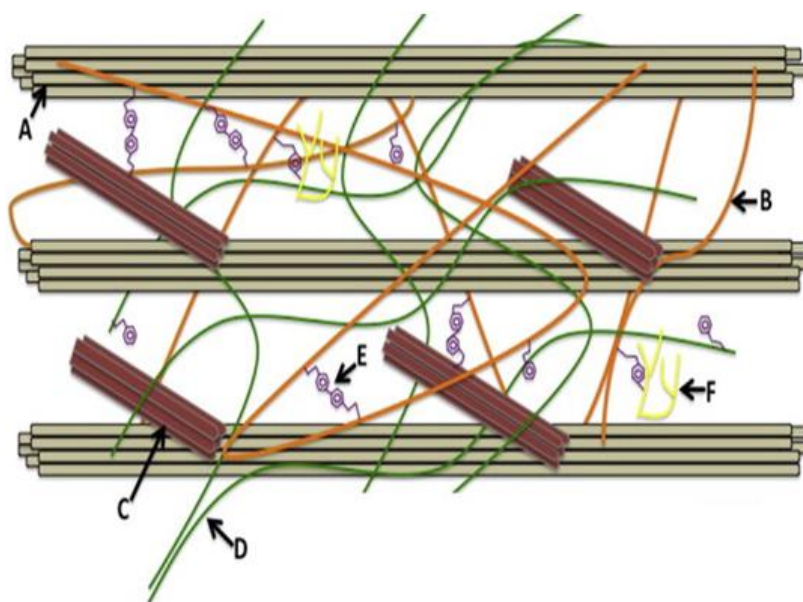


Figura 6. Representações da estrutura da parede celular primária do material vegetal e ligações cruzadas entre os componentes estruturais e compostos fenólicos. (A) Celulose. (B) Hemicelulose. (C) Proteínas estruturais. (D) Pectina. (E) Ácidos fenólicos. (F) Lignina. Fonte: Adaptada de Acosta-Estrada et al. (2014).

Formas ligadas de compostos fenólicos podem ser hidrolisadas e absorvidas. Por exemplo, após o consumo de café, os níveis plasmáticos de ácido cafeico aumentam devido à liberação e absorção deste ácido e do ácido clorogênico em complexos ligados (NARDINI et al., 2002).

Substâncias fenólicas de frutas e hortaliças podem interagir com outros metabólitos e macrocomponentes durante a mastigação e a digestão, resultando em antagonismo, aditivo e/ou efeitos sinérgicos (HEINONEN et al., 1998). Essas interações têm sido estudadas *in vitro*. No

entanto, a relevância dessas interações em termos de contribuição para a proteção da saúde ainda é obscura (MANGANARIS et al., 2014).

Existem diferentes vias de absorção comprovadas para compostos fenólicos no trato gastrointestinal, onde microrganismos, enzimas e até transportadores de glicose estão envolvidos (Figura 7). A liberação parcial de compostos fenólicos ocorre no lúmen gastrointestinal, a fim de ser processado, absorvido e metabolizado para exercer os seus benefícios à saúde (ACOSTA-ESTRADA et al., 2014).

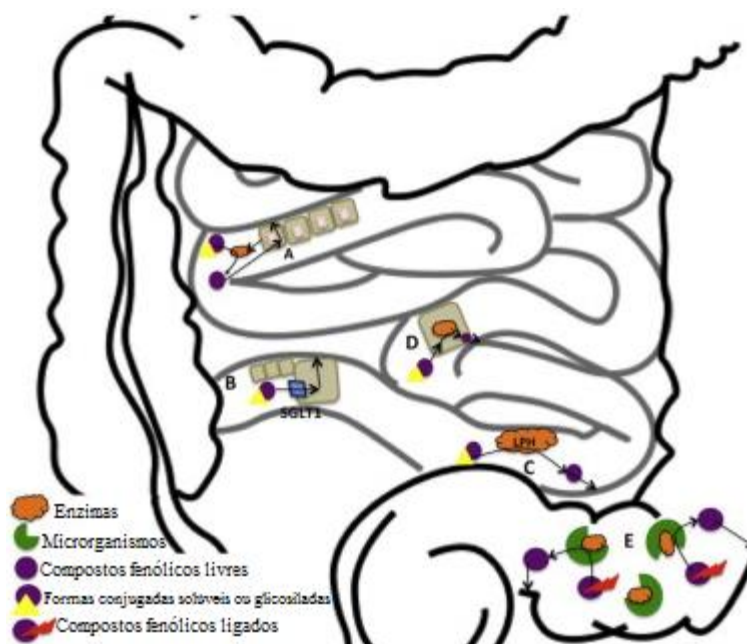


Figura 7. Vias de absorção de compostos fenólicos no trato gastrointestinal. (A) Hidrólise das formas conjugadas solúveis ligadas às células da mucosa por meio das cinamoil esterases. (B) Transporte das formas conjugadas solúveis em enterócitos pelo transportador de glicose dependente de sódio (SGLT1). (C) Lactase piloridizina hidrolase (LPH) (β -glicosidase) dos compostos fenólicos solúveis conjugados. (D) Células epiteliais citosólica β -glicosidase hidrolisada a glicosídeos e agliconas formadas após a absorção. (E) Esterase e atividades da xilanase de microrganismos do cólon (por exemplo, *Clostridium* spp., *Eubacterium* spp. e *Bifidobacterium adolescentis*).

Fonte: Adaptada de Acosta-Estrada et al. (2014).

Vários estudos investigaram o efeito do pH, metal, exposição à luz, temperatura, oxigênio e atividades enzimáticas sobre os principais grupos de frutas e hortaliças (BAKOWSKA et al., 2003).

Os benefícios à saúde reconhecidos pelos polifenóis são consistentes, no entanto, são escassos os relatos do efeito do cozimento sobre o teor de polifenóis e às vezes limitados à apenas a concentração de fenóis totais (FERRACANE et al., 2008). Como regra geral, o nível de metabólitos em frutas e hortaliças diminui exponencialmente com o aumento da duração e magnitude do cozimento. No entanto, existem relatos de casos em que o aquecimento auxilia a extratibilidade desses metabólitos, levando a um aumento de sua concentração aparente (TIWARI e CUMMINS, 2013). Portanto, o teor de metabólitos disponíveis relatado em frutas e hortaliças após o cozimento é um resultado líquido dos efeitos combinados de lixiviação e degradação durante o cozimento e mudanças na extratibilidade de metabólitos especiais durante a análise (WILLIAMS et al., 2013).

Os métodos de detecção de compostos fenólicos têm sido discutidos na literatura científica (ARCHELA e DALL'ANTONIA, 2013). A quantificação e identificação de produtos naturais podem ser realizadas por diferentes métodos. O ensaio de Folin-Ciocalteu é utilizado para determinação do teor de fenóis, mas não detecta todos os grupos fenólicos encontrados nos extratos e sofre interferência do ácido ascórbico e açúcares redutores (STALIKAS, 2007).

Diferentes metodologias de hidrólise de fenólicos ligados têm sido desenvolvidas (DEL POZO-INSFRAN et al., 2006). Após a aplicação de qualquer um dos tratamentos, os compostos fenólicos são comumente extraídos com solventes orgânicos, incluindo dois sistemas de solventes de extração de fase. Comumente os solventes de extração utilizados são álcoois (metanol e etanol), acetona, éter dietílico e acetato de etila (GUTIÉRREZ-URIBE et al., 2010).

Elucidar a identidade, natureza e abundância de grande número de metabólitos presentes em diversas amostras têm sido um desafio para os pesquisadores. Isso resultou no desenvolvimento de uma série de metodologias que visam determinar o que é definido como "capacidade" antioxidante total (HUANG e PRIOR, 2005; GINE BORDONABA e TERRY, 2012). Os diferentes procedimentos disponíveis são reconhecidos por ter prós e contras em relação a seu objetivo específico, valor informativo, exatidão, repetibilidade, simplicidade, consumo de tempo e de custos (MANGANARIS et al., 2014).

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) juntamente com o DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) tem sido utilizados para determinar a contribuição dos metabólitos individuais para a capacidade antioxidante total de frutas e hortaliças, identificando e quantificando-os (BANDONIENE e MURKOVIC, 2002; BORGES et al., 2010; NUENGCHAMNONG e INGKANINAN, 2010).

4.1 Método do radical DPPH•

DPPH• é um radical livre estável que apresenta cor púrpura escura e forte banda de absorção na faixa de 515-520 nm (AHMAD et al., 2014). A forma reduzida do DPPH• apresenta cor amarela clara, sendo possível determinar a capacidade antioxidante através da mudança de cor espectrofotometricamente, Figura 8 (KEDARE e SINGH, 2011). Quanto maior for a capacidade de eliminação de radicais livres de uma substância antioxidante, maior a redução do DPPH• e a cor púrpura na amostra é menor (CARMONA-JIMÉNEZ et al., 2014). É importante mencionar que esse método tem sido aplicado utilizando diversos protocolos, em que há diferenças quanto a solventes, concentração inicial do DPPH•, volume da amostra, tempo de incubação e apresentação dos resultados; por conseguinte, sabe-se que os resultados obtidos de acordo com diferentes protocolos não são comparáveis (SÁNCHEZ-MORENO, 2002; DAWIDOWICZ et al., 2012). Essa metodologia tem sido amplamente utilizada para mensuração de antioxidantes em matrizes alimentícias (OSMAN, 2011). A capacidade do fitoquímico em eliminar o radical DPPH• pode ser expressa como a magnitude do antioxidante (DENG et al., 2011). A solução alcóolica de DPPH• de cor púrpura desaparece com a presença do captador de radicais no sistema reativo (INTARAKAMHANG e SCHULTE, 2012). Em comparação com outros métodos, o ensaio DPPH• tem muitas vantagens, tais como boa estabilidade, sensibilidade, simplicidade e viabilidade.

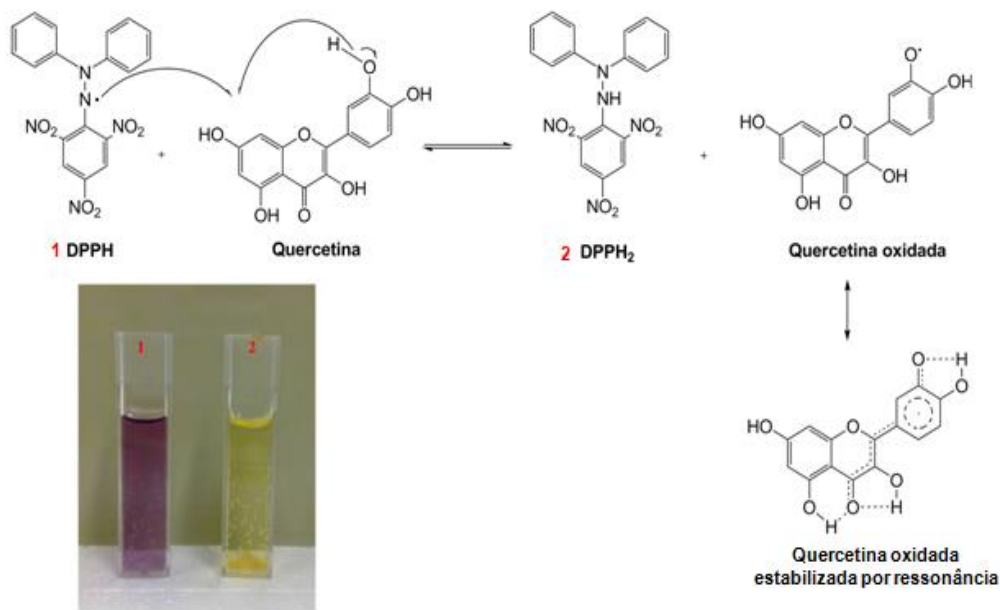


Figura 8. Redução do radical livre DPPH• pelo flavonoide antioxidante quercetina.
 Fonte: SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 2015.

4.2 Método pela captura do radical cátion ABTS•

Na presença de oxidantes apropriados, o radical ABTS•, 2,2'-azinobis cátion radical (3-etilbenzotiazolona-6-sulfonato), pode ser oxidado, gerando o cátion radical colorido, que pode ser medido espectrofotometricamente a 414, 660 ou 734 nm (LABRINEA e GEORGIU, 2004; OZCAN, 2004).

Os ensaios de capacidade de eliminação de radicais, tais como DPPH• e ABTS• são procedimentos analíticos muito utilizados na análise de alimentos, devido aos custos reduzidos e protocolos facilmente implementados (MAGALHÃES et al., 2008; NIKI, 2011; GULCIN, 2012). Em comparação com o método de DPPH•, o método de ABTS• pode ser realizado em meios aquosos e orgânicos e sobre uma ampla gama de valores de pH (KUSKOSKI et al., 2005).

O principal problema da aplicação desse teste são os variados protocolos de análises disponíveis, oferecendo diferentes escolhas em relação a substância padrão (Trolox, ácido ascórbico, ácido gálico) e tempo de reação aplicado (FRANKEL e FINLEY, 2008). Essa situação dificulta a comparação de dados entre os tipos de alimentos. Por exemplo, em vinhos tintos leituras de absorvância foram feitas em 1 min (SERUGA et al., 2011), 2 min (VRCEK et al., 2011), 6 min (LI et al., 2009), 15 min (RIVERO-PEREZ et al., 2007) e 30 min (STRATIL et al., 2008; GINJOM et al., 2010), enquanto que para cafés o tempo de reação variou de 6 a 30 min (PLAZA et al., 2010; PERRONE et al., 2012).

5 Secagem de hortaliças

As hortaliças apresentam alto teor de umidade, com conseqüente elevada perecibilidade, sendo necessário o desenvolvimento de tecnologias pós-colheita para aumentar a validade desse alimento e atender outros mercados. Uma possível tecnologia de conservação dessa hortaliça é a secagem, que consiste na remoção de parte da água livre, na forma de vapor, com conseqüente redução da atividade de água, afetando o crescimento microbiano, reações enzimáticas e outras de origem química e física (FANG e BHANDARI, 2011; KUROSZAWA et al., 2014). Além de aumentar o período de conservação dos alimentos, a secagem reduz o peso e volume dos

alimentos, diminuindo os custos de transporte e armazenamento; bem como facilita o uso e diversifica a sua oferta (JIN et al., 2014).

A secagem é um método importante e amplamente utilizado no processamento de alimentos (KOYUNCU, TOSUN e PINAR, 2007). Devido à falta de processamento adequado e oportuno, aproximadamente um terço da produção mundial de alimentos é perdida anualmente (GUSTAVSSON et al., 2011). Essa perda é ainda maior nos países em desenvolvimento, em que 30-40 % de frutas e hortaliças são desperdiçadas (KARIM e HAWLADER, 2005 a,b).

Existem vários equipamentos e diferentes técnicas de desidratação que podem ser utilizados para secagem de hortaliças, como a secagem com ar quente, secagem natural, secagem com ar frio e a liofilização. Segundo Shuhama e colaboradores (2003), o secador de bandeja com circulação de ar quente é o método mais utilizado para secagem de hortaliças. No entanto, apesar deste método apresentar simplicidade de operação e baixo custo, produz alimentos de baixa qualidade. A secagem com ar frio e a liofilização se destacam por não utilizarem temperaturas altas durante a secagem, e dessa forma há menor degradação dos nutrientes dos alimentos.

5.1 Secagem com ar frio

A secagem a frio é uma simplificação do processo de liofilização à pressão atmosférica, mediante a eliminação da etapa de congelamento. A remoção da água ocorre em ambientes de baixas temperaturas e umidades relativas, sendo mantida no estado líquido durante todo o processo (KUBOTA e CAL-VIDAL, 1987).

Barbosa e colaboradores (2014) utilizaram a secagem com ar frio para secar o Jambu. Utilizaram uma sala pequena (4 m²), ar condicionado à 25 °C e um desumidificador para diminuir a umidade relativa do ambiente. Esses autores compararam a composição química do Jambu seco com ar frio e o Jambu *in natura* e puderam concluir que o Jambu seco apresentou boa composição centesimal em relação ao Jambu *in natura*. Com relação a aceitabilidade sensorial entre o Jambu seco com ar frio e o Jambu *in natura*, Barbosa e colaboradores (2016) avaliaram a aceitação do tacacá feito com o Jambu seco com ar frio e do tacacá com Jambu *in natura*. Estes autores concluíram que houve diferença significativa ao nível de 5 % de probabilidade pelo teste de Tukey para o atributo aceitação global, sendo que o tacacá com o Jambu *in natura* obteve maior aceitação. Os outros atributos avaliados (cor, aroma, textura e *flavor*) apresentaram a mesma aceitação tanto para o tacacá com Jambu seco com ar frio quanto para o tacacá com Jambu *in natura*.

Barbosa e colaboradores (2015) publicaram um artigo de revisão sobre secagem de Jambu com circulação com ar frio que apresenta mais detalhes sobre a secagem com ar frio.

5.2 Liofilização

A liofilização é uma técnica de desidratação suave que representa o processo ideal para a produção de produtos secos de elevado valor. Esta técnica é bem conhecida por sua capacidade de manter a qualidade do produto (cor, forma, aroma e valor nutricional) maior do que qualquer outro método de secagem, devido a baixa temperatura de processamento (de -2 a -10 °C) e ausência de oxigênio durante o processamento, o que minimiza as reações de degradação (STRUMNILLO e ADAMIEC, 1996; LITVIN, MANNHEIM e MILTZ, 1998).

O processo de liofilização consiste em duas etapas, em que o produto é primeiro congelado (-20 °C), em seguida, uma quantidade controlada de calor sob vácuo é aplicado para promover a sublimação (OIKONOMOPOULOU e KROKIDA, 2013).

Finalmente, é importante ressaltar que a liofilização é um método de conservação de duração mais prolongada e de alto custo, devido às baixas taxas de secagem geradas pelos sistemas de refrigeração e vácuo, que aumentam os custos de energia (LIAPIS, PIM e BRUTTINI, 1996; RATTI, 2001). Segundo Ratti (2001) os custos da liofilização são 4 a 8 vezes maiores que os custos da secagem com circulação de ar quente. Dessa forma, o uso da liofilização em escala industrial está restrito a produtos de alto valor, bem como espécies comestíveis e medicinais (LIN, DURANCE e SCAMAN, 1998; YANG et al., 2010).

6 Extração com CO₂ supercrítico

O alto custo dos solventes orgânicos, regulamentações ambientais cada vez mais rigorosas, e novas exigências das indústrias médicas e alimentícias para utilização de produtos ultrapuros e de alto valor agregado têm aumentado a necessidade do desenvolvimento de novas tecnologias limpas para o processamento de produtos alimentícios (ZAIDUL et al., 2006). A extração com dióxido de carbono supercrítico atraiu considerável atenção como alternativa promissora para extração de óleos e outros materiais, uma vez que oferece uma série de vantagens, como a não geração de resíduo de solventes e melhor retenção de compostos aromáticos (ZAIDUL et al., 2007a; ZAIDUL et al., 2007b; ZAIDUL et al., 2007c; NORULAINI et al., 2009).

Nos últimos anos, mais de 300 espécies de plantas foram estudadas utilizando a tecnologia de extração com fluido supercrítico (EFS) (MELO et al., 2014). É interessante notar que a maior parte das pesquisas abrange EFS de biomassa vegetal (BRUNNER, 2010; MACHADO et al., 2013). Enquanto muitos extratos e substâncias puras dessas espécies já estão em uso para fins nutricionais e de saúde, outros representam potenciais aplicações envolvendo plantas, cujo conhecimento, na maioria dos casos, tem sido empiricamente estabelecido e ainda carece de pesquisas científicas (MELO et al., 2014).

O notável interesse da comunidade científica sobre essa tecnologia tem sido impulsionado pela grande versatilidade do dióxido de carbono, o solvente mais utilizado na extração supercrítica, cujas propriedades podem ser ajustadas de forma a fornecer extratos com composições desejáveis, e, ao mesmo tempo assegura um processo de separação inócua para a saúde humana e para o meio ambiente (MELO et al., 2014). Outros solventes, como por exemplo, etano e propano, também têm sido objeto de investigação, mas seu uso não é tão difundido como o dióxido de carbono.

A EFS baseia-se nas propriedades de solvatação do fluido supercrítico, que pode ser obtida pelo emprego de pressão e temperatura acima do ponto crítico de uma substância, mistura ou elemento (PEREIRA e MEIRELES, 2010; CAVALCANTI e MEIRELES, 2012). Nessas condições, os gases não irão ser condensados através do aumento da pressão. O diagrama de fase para os gases em condições supercríticas é representado na Figura 9.

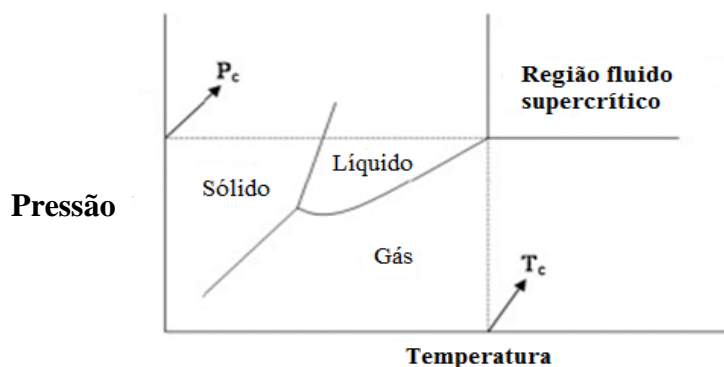


Figura 9. Diagrama de fases para gases.

Fonte: Adaptada de Guo et al. (2016).

A extração usando fluidos supercríticos é um método alternativo para substituir ou complementar o processo industrial convencional, tal como extração com solvente e prensagem (BRUNNER, 2005). A técnica de extração com fluido supercrítico apresenta várias vantagens sobre os métodos tradicionais, como a utilização de baixas temperaturas, menor consumo de energia e alta qualidade do produto, devido à ausência de solvente nos extratos. O dióxido de carbono é o fluido comprimido mais usado, porque não é tóxico, não é explosivo, não é inflamável, apresenta baixo custo, prontamente disponível e facilmente removível, além de possuir propriedades críticas moderadas ($T_c = 31,1 \text{ }^\circ\text{C}$, $P_c = 7,38 \text{ MPa}$). As desvantagens da extração com fluido supercrítico são altos custos de investimento para aquisição de equipamentos, alta demanda de energia da unidade de extração de CO_2 e risco de trabalhar com alta pressão (MARTÍNEZ et al., 2008; SAHENA et al., 2009; TEMELLI, 2009).

A extração com FS depende de fatores intrínsecos do fluido supercrítico como temperatura, pressão e algumas características extrínsecas, como as características da matriz da amostra, a interação com analistas e muitos fatores ambientais (PEREIRA e MEIRELES, 2010; CAVALCANTI e MEIRELES, 2012).

Um sistema de EFS é composto por um tanque da fase móvel, geralmente de CO_2 , uma bomba para pressurizar o gás, um forno confinando o recipiente de extração e um restritor para manter a alta pressão de extração. O extrato pode ser capturado deixando o fluido supercrítico contendo soluto despressurizar num frasco vazio (MELO et al., 2014).

As extrações podem ser realizadas nos modos dinâmico, estático ou combinado (MELO et al., 2014). A extração no modo dinâmico permite que os fluxos de fluido supercrítico passem continuamente através da amostra no vaso de extração e de fora do restritor para o vaso de aprisionamento. No modo estático circula o fluido supercrítico dentro de um circuito contendo o recipiente de extração. No modo de combinado, a extração em modo estático é realizada por um período de tempo, seguido por extração em modo dinâmico.

7 Isolamento de metabólitos especiais de plantas

Muitas plantas medicinais apresentam atividade farmacológica e tiveram seus princípios ativos identificados e caracterizados (SINGH e CHATURVEDI, 2012b). Elas podem sintetizar um número extenso de metabólitos especiais empregados em outras áreas de produtos farmacêuticos, incluindo biopesticidas, aromatizantes, corantes e aditivos alimentares.

A maioria das propriedades benéficas de frutas, hortaliças e grãos integrais tem sido atribuída a compostos químicos não nutricionais, bioativos, comumente chamados de metabólitos especiais, onde são estimados entre 5.000 e 25.000 constituintes (ACOSTA-ESTRADA et al., 2014).

A perspectiva de moléculas dietéticas disponíveis para proteger o organismo contra o aparecimento de diversas patologias é muito relevante; uma notável variedade de estudos publicados pôs em evidência os potenciais efeitos protetores de vários componentes alimentícios (SURH, 2003). Várias frutas e hortaliças, como brócolis e mirtilos, estão entre os mais protetores, devido especificamente a infinidades de substâncias ativas, tais como polifenóis, isotiocianatos e flavonoides, que ocorrem naturalmente e são referidos como metabólitos especiais.

Os metabólitos especiais são moléculas dentro da estrutura de plantas que não possuem valor nutritivo, mas possuem outras propriedades benéficas que ocorre naturalmente (Figura 10) (ZHAO et al., 2007). Parece haver pouca semelhança estrutural na sua forma, no entanto, vários metabólitos especiais têm mostrado ativar as vias de proteção que reduzem o ambiente oxidativo e relaciona-se com o ambiente inflamatório, e, portanto, muitos são referidos como antioxidantes (SHAH et al., 2010)

Os dados sobre o consumo de metabólitos especiais de frutas e hortaliças muitas vezes são derivados da análise da matéria-prima *in natura* (PATRAS et al., 2010). No entanto, muitas frutas e hortaliças são cozidas antes do consumo, alterando assim sua composição química. A magnitude e duração do aquecimento nesse processo têm influência muito forte sobre os níveis de metabólitos especiais restantes nos produtos cozidos.

A estabilidade dos produtos alimentícios funcionais durante o processamento e armazenamento é um aspecto importante a ser abordado em qualquer desenvolvimento de produto. Os consumidores esperam que a qualidade dos alimentos deva ser mantida a alto padrão durante o consumo (KILCAST e SUBRAMANIAM, 2003). Vários fatores podem afetar a estabilidade dos componentes bioativos de um produto alimentício, durante e após o processamento, incluindo o escurecimento enzimático, pH e temperatura. Portanto, antes de incorporar metabólitos especiais em alimentos é importante estudar o efeito das condições de armazenamento e processamento sobre estas substâncias (HARBOURNE et al., 2013).

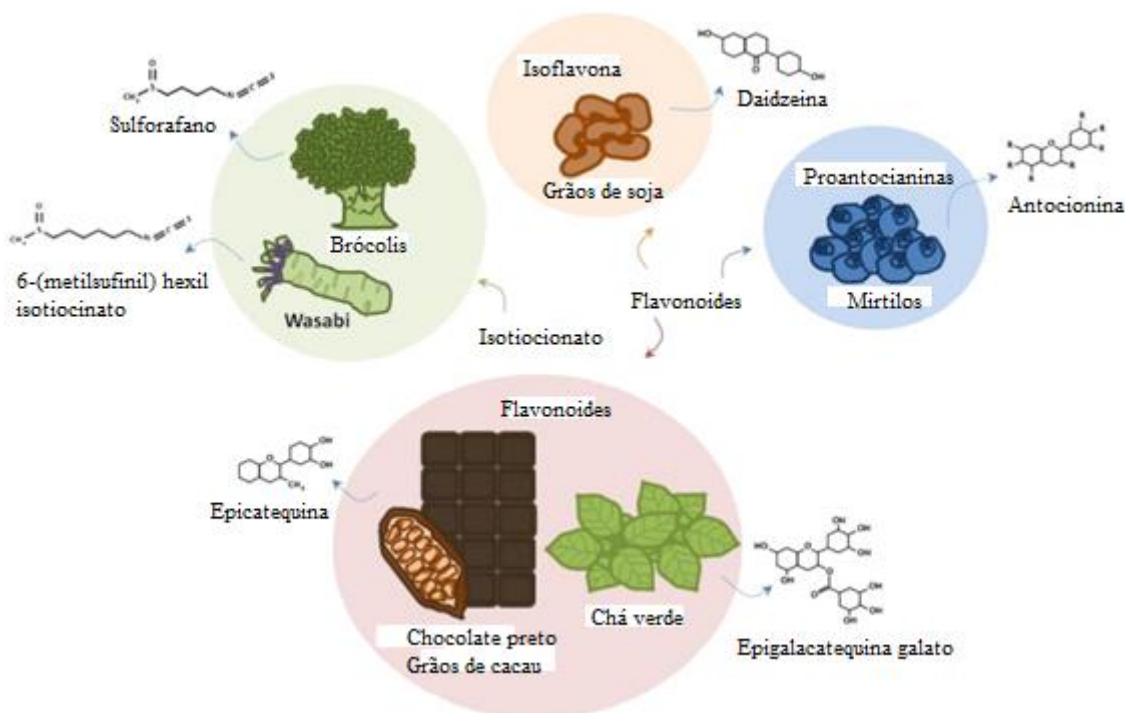


Figura 10. Diagrama da diversidade estrutural de metabólitos especiais em frutas e hortaliças. Fonte: GILLESPIE e GAVINS, 2013.

8 Referências bibliográficas

- ABEYSINGHE, D. C.; WIJERATHNE, S. M. N. K.; DHARMADASA, R. M. Secondary metabolites contents and antioxidant capacities of *Acmella oleraceae* grown under different growing systems. **World J. Agric. Res.**, v. 2, p. 163-167, 2014.
- ABEYSIRI, G. R. P. I.; DHARMADASA, R. M.; ABEYSINGHE, D. C.; SAMARASINGHE, K. Screening of phytochemical, physico-chemical and bioactivity of different parts of *Spilantes acmella* Murr. (Asteraceae), a natural remedy for toothache. **Ind. Crop. Prod.**, v. 50, p. 852-856, 2013.
- ACOSTA-ESTRADA, B. A.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; SERNA-SALDÍVAR, S. O. Bound phenolics in foods, a review. **Food Chem.**, v. 152, p. 46-55, 2014.
- ADOM, K. K.; LIU, R. H. Antioxidant activity of grains. **J. Agr. Food Chem.**, v. 50, p. 6182-6187, 2002.
- AHMAD, S.; ARSHAD, M. A.; IJAZ, S.; KHURSHID, U.; RASHID, F.; AZAM, R. Review on methods used to determine Antioxidant Activity. **Int. J. Multidiscip. Res. Dev.**, v. 1, p. 35-40, 2014.
- ALBISHI, T.; JOHN, J. A.; AL-KHALIFA, A. S.; SHAHIDI, F. Antioxidative phenolic constituents of skins of onion varieties and their activities. **J. Funct. Foods**, v. 5, p. 1191-1203, 2013.
- ARCHELA, E.; DALL'ANTONIA, L. H. Determinação de Compostos Fenólicos em Vinho: Uma revisão. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 34, p. 193-210, 2013.
- ARRIAGA-ALBA, M.; RIOS, M. Y.; DÉCIGA-CAMPOS, M. Antimutagenic properties ofaffinin isolated from *Heliopsis longipes* extract. **Pharm. Biol.**, v.51, p. 1035-1039, 2013.
- AYAZ, F. A.; HAYIRLIOGLU-AYAZ, S.; ALPAY-KARAOGLU, S.; GRÚZ, J.; VALENTOVÁ, K.; ULRICHOVÁ, J. STRNAD, M. Phenolic acid contents of kale (*Brassica oleraceae* L. var. *acephala* DC.) extracts and their antioxidant and antibacterial activities. **Food Chem.**, v. 107, p. 19-25, 2008.
- BAE, S. S.; EHRMANN, B. M.; ETTEFAGH, K. A.; CECH, N. B. A validated liquidchromatography–electrospray ionization–mass spectrometry method for quantification of spilanthol in *Spilanthus acmella* (L.) Murr. **Phytochem. Anal.**, v. 5, p. 438-443, 2010.
- BAKOWSKA, A.; KUCHARSKA, A. Z.; OSZMIANSKI, J.; The effects of heating, UV irradiation, and storage on stability of the anthocyanin-polyphenol copigment complex. **Food Chem.**, v. 81, p. 349-355, 2003.
- BANDONIENE, D; MURKOVIC, M. On-line HPLC-DPPH screening method for evaluation of radical scavenging phenols extracted from apples (*Malus domestica* L.). **J. Agr. Food Chem.**, v. 50, p. 2482-2487, 2002.

BARBOSA, A. F.; ALICIEO, T. V. R.; RODRIGUES, F. M.; RODRIGUES, L. G. S. M.; SABAA-SRUR, A. U. O. Jambu drying with cold air circulation. **J. Bioen. Food Sci.**, v. 2, p. 46-54, 2015.

BARBOSA, A. F.; MAIA, J. G. S.; FARIA, L. J. G.; GUSMÃO, S. A. L. de; SABAA-SRUR, A. U. O. Composição centesimal de Jambu (*Spilanthus oleracea* L.) *in natura* e seco. **Magistra**, v. 26, p. 1010-1013, 2014.

BARBOSA, A. F.; SABAA-SRUR, D. F.; MAIA, J. G. S.; SABAA-SRUR, A. U. O. Microbiological and sensory evaluation of Jambu (*Acmella oleracea* L.) dried by cold air circulation. **Food Sci. Technol.**, v. 36, p. 24-29, 2016.

BOONEN, J.; BAERT, B.; BURVENICH, C.; BLONDEEL, P.; DE SAEGET, S.; DE SPIEGELEER, B. LC-MS profiling of *N*-alkylamides in *Spilanthus acmella* extract and the transmucosal behavior of its main bioactive spilanthol. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 53, p. 243-249, 2010a.

BOONEN, J.; BAERT, B.; ROCHE, N.; BURVENICH, C.; DE SPIEGELEER, B. Transdermal behaviour of the *N*-alkylamide spilanthol (affinin) from *Spilanthus acmella* (Compositae) extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v. 127, p. 77-84, 2010b.

BORGES, G.; DEGENEVE, A.; MULLEN, W.; CROZIER, A. Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in blackcurrants, blueberries, raspberries, red currants and cranberries. **J. Agri. Food Chem.**, v. 58, p. 3901-3909, 2010.

BORGES, L. da S. **Biomassa, teores de nutrientes, espilantol e atividade antioxidante em plantas de Jambu (*Acmella ciliata* Kunth) sob adubação mineral e orgânica.** 2009. 108f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura) - Programa de Pós-graduação em Agronomia/Horticultura, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho".

BRUNNER, G. Applications of supercritical fluids. **Annu. Rev. Chem. Biom. Eng.**, v. 1, p. 321-342, 2010.

BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **J. Food Eng.**, v. 67, p. 21-33, 2005.

CAMPOS-CUEVAS, J. C.; PELAGIO-FLORES, R.; RAYA-GONZÁLEZ, J.; MÉNDEZ-BRAVO, A.; OTTIZ-CASTRO, R.; LÓPEZ-BUCIO, J. Tissue culture of *Arabidopsis thaliana* explants reveals a stimulatory effect of alkamides on adventitious root formation and nitric oxide accumulation. **Plant Sci.**, v. 174, p. 165-173, 2008.

CARMONA-JIMÉNEZ, Y.; GARCÍA-MORENO, M. V.; IGARTUBURU, J. M.; BARROSO, C. G. Simplification of the DPPH assay for estimating the antioxidant activity of wine and wine by products. **Food Chem.**, v. 165, p. 198-204, 2014.

CASTRO, K. N. C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L. C.; LEITE, J. R. S. A.; SANTOS, R. C.; NETO, A. A. P.; COSTA-JÚNIOR, L. M. Acaricide activity *in vitro* of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus*. **Parasitol. Res.**, v. 113, p. 3697-3701, 2014.

CAVALCANTI, R.N.; MEIRELES, M. A. A. Fundamentals of supercritical fluid extraction. JANUSZ, P. (Ed.), **Comprehensive Sampling and Sample Preparation**. Oxford: Academic Press, 2012. p. 117-133

CHANDRASEKARA, A.; SHAHIDI, F. Content of insoluble bound phenolics in millets and their contribution to antioxidant capacity. **J. Agri. Food Chem.**, v. 58, p. 6706-6714, 2010.

CHOOCHOTE, W.; KANJANAPOTHI, D.; PANTHONG, A.; TAESOTIKUL, T.; JITPAKDI, A.; CHAITHONG, U.; PITASAWAT, B. Larvicidal, adulticidal and repellent effects of *Kaempferia galanga*. **Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health**, v. 30, p. 470-476, 1999.

CHUNG, K. -F.; KONO, Y.; WANG, C. -M.; PENG, C. I. Notes on *Acmella* (Asteraceae: Heliantheae) in Taiwan. **Bot. Stud.**, v. 49, p. 73-82, 2008.

CHU, Y. F.; SUN, J.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common vegetables. **J. Agri. Food Chem.**, v. 50, p. 6910-6916, 2002.

CILIA-LÓPEZ, V. G.; JUÁREZ-FLORES, B. I.; AGUIRRE-RIVERA, J. R.; REYES-AGUERO, J. A. Analgesic activity of *Heliopsis longipes* and its effect on the nervous system. **Pharm. Biol.**, v. 48, p. 195-200, 2010.

COSTA, S. S.; ARUMUGAM, D.; GARIPEY, Y.; ROCHA, S. C. S.; RAGHAVEN, V. Spilanthal extraction using microwave: calibration curve for gas chromatography. **Chem. Eng. Trans.**, v. 32, p. 1783-1788, 2013.

CROZIER, A.; YOKOTA, T.; JAGANATH, I. B.; MARKS, S.; SALTMARSH, M.; CLIFFORD, M. N. **Secondary metabolites as dietary components in plant-based foods and beverages**. In: Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and Role in the Human Diet. CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. (Eds.) Oxford: Blackwell, 2006. p. 208-302

CRUZ, P. B.; BARBOSA, A. F.; ZERINGÓTA, V.; MELP, D.; NOVATO, T.; FIDELIS, Q. C.; FABRI, R. L.; CARVALHO, M. G. de; SABAA-SRUR, A. U. O.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O. Acaricidal activity of metanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthal on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Vet. Parasitol.**, v. 228, p. 137-143, 2016.

DANDIN, V. S.; NAIK, P. M.; MURTHY, H. M.; PARK, S. Y.; PAEK, K. Y. Rapid regeneration and analysis of genetic fidelity and scopoletin in contents of micropropagated plants of *Spilanthes oleracea* L. **J. Hort. Sci. Biotechnol.**, v. 89, p. 79-85, 2014.

DAWIDOWICZ, A. L.; WIANOWSKA, D.; OLSZOWY, M. On practical problems in estimation of antioxidant activity of compounds by DPPH method (Problems in estimation of antioxidant activity). **Food Chem.**, v. 131, p. 1037-1043, 2012.

DÉCIGA-CAMPOS, M.; ARRIAGA-ALBA, M.; VENTURA-MARTÍNEZ, R.; AGUILAR-GUADARRAMA, B.; RIOS, M. Y. Pharmacological and toxicological profile of extract from *Heliopsis longipes* and affinin. **Drug Dev. Res.**, v. 73, 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, p. 665-670, 2010.

DEL POZO-INSFRAN, D.; SERNA-SALDIVAR, S.O.; HERNÁNDEZ-BRENES, C.; TALCOTT, S. T. Polyphenolics and antioxidant capacity of white and blue corns processed into tortillas and chips. **Cereal Chem.**, v. 84, p. 162-168, 2006.

DEMARNE, F.; PASSARO, G. **Use of an *Acmella oleracea* extract for the botulinum toxin-like effect thereof in an anti-wrinkle cosmetic composition.** US Patent No. 7,531,193 B2, 2009.

DENG, J.; CHENG, W.; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay. **Food Chem.**, v. 125, p. 1430-143, 2011.

DE SPIEGELEER, B.; BOONEN, J.; MALYSHEVA, S. V.; DI MAVUNGU, J. D.; DE SAEGER, S.; ROCHE, N.; BLONDEEL, P.; TAEVERNIER, L.; VERYSER, L. Skin penetration enhancing properties of the plant *N*-alkylamide spilanthal. **J. Ethnopharmacol.**, v. 148, p. 117-125, 2013.

DIAS, A. M. A.; SANTOS, P.; SEABRAA, I. J.; JUNIOR, R. N. C.; BRAGA, M. E. M.; SOUSA, H. C. de. Spilanthal from *Spilanthes acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction. **J. Supercrit. Fluids**, v. 61, p. 62-70, 2012.

DUBEY, S.; MAITY, S.; SINGH, M.; SARAF, S. A.; SAHA, S. Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes acmella*: a review. **Adv. Pharmacol. Sci.**, Article ID 423750, 2013.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific Opinion on Flavouring Group Evaluation 303: Spilanthal from chemical group 301, EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF). **EFSA J.**, v. 13, 28 p., 2015.

FAN, G. J.; JIN, X. L.; QIAN, Y. P.; WANG, Q.; YANG, R. T.; DAI, F. Hydroxycinnamic acids as DNA-cleaving agents in the presence of CuII ions: mechanism, structure–activity relationship, and biological implications. **Chem. Eur. J.**, v. 15, p. 12889-12899, 2009.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols. **Food Chem.**, v. 129, p. 1139-1147, 2011.

FAVORETO, R.; GILBERT, B. *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (Asteraceae). **Revista Fitos**, v. 5, p. 83-91, 2010.

FERRACANE, R.; PELLEGRINI, N.; VISCONTI, A.; GRAZIANI, G.; CHIAVARO, E.; MIGLIO, C.; FOGLIANO, V. Effects of different cooking methods on antioxidant profile, antioxidant capacity, and physical characteristics of artichoke. **J. Agri. Food Chem.**, v. 56, p. 8601-8608, 2008.

FRANKEL, E. D.; FINLEY, J. W. How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. **J. Agri. Food Chem.**, v. 56, p. 4901-4908, 2008.

GERBINO, A.; SCHEANA, G.; MILANO, S.; MILELLA, L.; BARBOSA, A. F.; ARMENTANO, F.; PROCINO, G.; SVELTO, M.; CARMOSINO, M. Spilanthol from *Acmella oleracea* lowers the intracellular levels of cAMP impairing NKCC2 phosphorylation and water channel AQP2 membrane expression in mouse kidney. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, e0156021, 2016.

GERTSCH, J. Immunomodulatory lipids in plants: plant fatty acid amides and the human endocannabinoid system. **Planta Med.**, v. 74, p. 638-650, 2008.

GILLESPIE, S.; GAVINS, F. N. E. Phytochemicals: Countering risk factors and pathological responses associated with ischaemia reperfusion injury. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 138, p. 38-45, 2013.

GINÉ BORDONABA J.; TERRY, L. A. Electrochemical behaviour of polyphenol rich fruit juices using disposable screen-printed carbon electrodes: towards a rapid sensor for antioxidant capacity and individual antioxidants. **Talanta**, v. 90, p. 38-45, 2012.

GINJOM, I. R.; D'ARCY, B. R.; CAFFIN, N. A.; GIDLEY, M. J. Phenolic contents and antioxidant activities of major Australian red wines throughout the winemaking process. **J. Agri. Food Chem.**, v. 58, p. 10133-10142, 2010.

GULCIN, I. Antioxidant activity of food constituents: an overview. **Arch. Toxicol.**, v. 86, p. 345-391, 2012.

GUO, X.; YAN, X.; YU, J.; ZHANG, Y.; CHEN, S.; MAHGEREFTEH, H.; MARTYNOV, S.; COLLARD, A.; PROUST, C. Pressure response and phase transition in supercritical CO₂ releases from a large-scale pipeline. **Applied Energy**, v. 178, p. 189-197, 2016.

GUSMÃO, S. A. L.; GUSMÃO, M. T. A.; SILVESTRE, W. V. D.; LOPES, P. R. A. Caracterização do cultivo de Jambu nas áreas produtoras que abastecem a grande Belém. **Hortic. Bras.**, v. 23, n. 2, 2005.

GUSTAVSSON, J.; CEDERBERG, C.; SONESSON, U. **Global Food Losses and Food Waste**. Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2011. 29p.

GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; ROJAS-GARCÍA, C.; GARCÍA-LARA, S.; SERNASALDIVAR, S. O. Phytochemical analysis of waste water (nejayote) obtained after lime-cooking of different types of maize kernels processed into masa for tortillas. **J. Cereal Sci.**, v. 52, p. 410-416, 2010.

HAJDU, A. **An Ethnopharmacological survey conducted in the Bolivian Amazon, and identification of N-alkylamides and lignans from *Lepidium meyenii* and *Heliopsis helianthoides* var. *scabra* with effects on the central nervous system**. 2014. 67f. Thesis, Faculty of Pharmacy Department of Pharmacognosy, University of Szeged.

HARBAUM, B.; HUBBERMANN, E. M.; ZHU, Z.; SCHWARZ, K. Free and bound phenolic compounds in leaves of pak choi (*Brassica campestris* L. ssp. *Chinensis* var. *communis*) and Chinese leaf mustard (*Brassica juncea* Coss). **Food Chem.**, v. 110, p. 838-846, 2008.

- HARBOURNE, N.; MARETE, E.; JACQUIER, J. C.; O'RIORDAN, D. Stability of phytochemicals as sources of anti-inflammatory nutraceuticals in beverages - A review. **Food Res. Int.**, v. 50, p. 480-486, 2013.
- HATASA, S.; IIOKA, I. **Spilanthol-containing compositions for oral use**. U.S. Patent No. 3,720,762, 1973.
- HAW, A. B.; KENG, C. L. Micropropagation of *Spilanthus acmella* L., a bioinsecticide plant, through proliferation of multiple shoots. **J. Appl. Hort.**, v. 5, p. 65-68, 2003.
- HEINONEN, I. M.; MEYER, A. S.; FRANKEL, E. N. Antioxidant activity of berry phenolics on human low-density lipoprotein and liposome oxidation. **J. Agri. Food Chem.**, v. 46, p. 4107-4112, 1998.
- HERNÁNDEZ, I.; MÁRQUEZ, L.; MARTÍNEZ, I.; DIEGUEZ, R.; DELPORTE, C.; PRIETO, S.; MOLINA-TORRES, J.; GARRIDO, G. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract and alkaloids derived from *Heliopsis longipes* roots. **J. Ethnopharmacol.**, v. 124, p. 649-652, 2009.
- HERNÁNDEZ-MORALES, A.; ARVIZU-GÓMEZ, J. L.; CARRANZA-ÁLVAREZ, C.; GÓMEZ-LUNA, B. E.; ALVARDO-SÁNCHEZ, B.; RAMÍREZ-CHÁVEZ, E.; MOLINA-TORRES, J. Larvicidal activity of affinin and its derived amides from *Heliopsis longipes* A. Gray Blake against *Anopheles albimanus* and *Aedes aegypti*. **J. Asia-Pacific Entomol.** 18, p. 227-231, 2015.
- HERVERT-HERNÁNDEZ, D.; SÁYAGO-AYERDI, S. G.; GOÑI, I. Bioactive compounds of four hot pepper varieties (*Capsicum annuum* L.), antioxidant capacity, and intestinal bioaccessibility. **J. Agri. Food Chem.**, v. 58, p. 3399-3406, 2010.
- HIND, N.; BIGGS, N. *Acmella oleracea* compositae. **Curtis's Bot. Mag.**, v. 20, p. 31-39, 2003.
- HOMMA, A. K. O.; SANCHES, R. da S.; MENEZES, A. J. E. A. DE; GUSMÃO, S. A. L. de. Etnocultivo do Jambu para abastecimento da cidade de Belém, estado do Pará. **Amazônia: Ciência & Desenvolvimento**, v. 6, p. 125-141, 2011.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.
- IKEDA, Y.; UKAI, J.; IKEDA, N.; YAMAMOTO, H. Facile routes to natural acyclic polyenes syntheses the spilanthol and trail pheromone for termite. **Tetrahedron Lett.**, v. 25, p. 5177-5180, 1984.
- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Tabelas de composição nutricional dos alimentos consumidos no Brasil**. Pesquisa de Orçamentos Familiares 2008-2009, Rio de Janeiro: IBGE, 2011. 351p.
- INTARAKAMHANG, S.; SCHULTE, A. Automated electrochemical free radical scavenger screening in dietary Samples. **Anal. Chem.**, v. 84, p. 6767-6774, 2012.
- JACOBSON, M. The structure of spilanthol. **Chem. Ind.**, v. 2, p. 50-55, 1957.

- JIN, X.; OLIVIERO, T.; VAN DER SMAN, R. G. M.; VERKERK, R.; DEKKER, M.; VAN BOXTEL, A. J. B. Impact of different drying trajectories on degradation of nutritional compounds in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). **Food Sci. Technol.**, v. 59, p 189-195, 2014.
- JOHNS, T.; GRAHAM, K.; TOWERS, G. H. N. Molluscicidal activity of affinin and other isobutylamides from the Asteraceae. **Phytochemistry**, v. 21, p. 2737-2738, 1982.
- KADIR, H. A.; ZAKARIA, M. B.; KECHIL, A. A.; AZIRUN, M. S. Toxicity and electrophysiological effects of *Spilanthes acmella* Murr. extracts on *Periplaneta americana* L. **Pest. Sci.**, v. 25, p. 329-335, 1989.
- KAISOON, O.; SIRIAMORNUN, S.; WEERAPREEYAKUL, N.; MEESO, N. Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers from Thailand. **J. Functional Foods**, v. 3, p. 88-99, 2011.
- KARIM, M. A.; HAWLADER, M. N. A. Drying characteristics of banana: theoretical modelling and experimental validation. **J. Food Eng.**, v. 70, p. 35-45, 2005a.
- KARIM, M. A.; HAWLADER, M. N. A. Mathematical modelling and experimental investigation of tropical fruits drying. **Int. J. Heat Mass Tran.**, v. 48, p. 4914-4925, 2005b.
- KEDARE, S. B.; SINGH, R. P. Genesis and development of DPPH method of antioxidant assay. **J. Food Sci. Tech.**, v. 48, p. 412-422, 2011.
- KILCAST, D.; SUBRAMANIAM, P. **The stability and shelf-life of food**. Cambridge: Woodhead publishing, 2003. p. 386-396
- KOYUNCU, T.; TOSUN, I.; PINAR, Y. Drying characteristics and heat energy requirement of cornelian cherry fruits (*Cornus mas* L.). **J. Food Eng.**, v. 78, p. 735-739, 2007.
- KRYGIER, K.; SOSULSKI, F.; HOGGE, L. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. 1. Extraction and purification procedure. **J. Agri. Food Chem.**, v. 30, p. 330-334, 1982.
- KUBOTA, E. H.; CAL-VIDAL, J. Secagem a frio de um produto lácteo. **Rev. Inst. Latic. "Cândido Tostes"**, v. 253, p. 35-42, 1987.
- KUROZAWA, L. E.; TERNG, I.; HUBINGER, M. D.; PARK, K. J. Ascorbic acid degradation of papaya during drying: Effect of process conditions and glass transition phenomenon. **J. Food Eng.**, v. 123, p. 157-164, 2014.
- KUSKOSKI, E. M; ASUERO, A. G.; TRONCOSO, A. M; MANCINI, F. J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v. 25, p. 726-732, 2005.
- LABRINEA, E. P. GEORGIU, C. A. Stopped-flow method for assessment of pH and timing effect on the ABTS total antioxidant capacity assay. **Anal. Chim. Acta**, v. 526 p. 63-68, 2004.

- LENG, T. C.; PING, N. S.; LIM, B. P.; KENG, C. L. Detection of bioactive compounds from *Spilanthes acmella* (L.) plants and its various *in vitro* culture products. **J. Med. Plants Res.**, v. 5, p. 371-378, 2011.
- LEVINE, R. A.; RICHARDS, K. M.; TRAN, K.; LUO, R.; THOMAS, A. L.; SMITH, R. E. Determination of neurotoxic acetogenins in pawpaw (*Asimina triloba*) fruit by LC–HRMS. **J. Agric. Food Chem.**, v. 63, p. 1053-1056, 2015.
- LEY, J. P.; KRAMMER, G.; LOOFT, J.; REINDERS, G.; BERTRAM, H. Structure–activity relationships of trigeminal effects for artificial and naturally occurring alkamides related to spilanthol. **Dev. Food Sci.**, v. 43, p. 21-24, 2006.
- LIAPIS, A. I.; PIM, M. L.; BRUTTINI, R. Research and development needs and opportunities in freeze drying. **Dry. Technol.**, v. 14, p. 1265-1300, 1996.
- LI, H.; WANG, X. Y.; LI, Y.; LI, P. H.; WANG, H. Polyphenolic compounds and antioxidant properties of selected China wines. **Food Chem.**, v. 112, p. 454-460, 2009.
- LIN, T. M.; DURANCE, T. D.; SCAMAN, C. H. Characterization of vacuum microwave, air and freeze dried carrot slices. **Food Res. Int.**, v. 31, p. 111-117, 1998.
- LITVIN, S.; MANNHEIM, C.H.; MILTZ, J. Dehydration of carrots by a combination of freeze drying, microwave heating and air or vacuum drying. **J. Food Eng.**, v. 36, p. 103-111, 1998.
- LIU, R. Whole grain phytochemicals and health. **Journal of Cereal Science**, 46, p. 207-219, 2007.
- LIYANA-PATHIRANA, C. M.; SHAHIDI, F. Importance of insoluble-bound phenolics to antioxidant properties of wheat. **J. Agri. Food Chem.**, v. 54, p. 1256-1264, 2006.
- MACHADO, B. A. S.; PEREIRA, C. G.; NUNES, S.B.; PADILHA, F. F.; UMSZA-GUEZ, M. A. Supercritical fluid extraction using CO₂: main applications and future perspectives. **Separ. Sci. Tech.**, v. 48, p. 2741-2760, 2013.
- MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Anal. Chim. Acta**, v. 613, p. 1-19, 2008.
- MANGANARIS, G. A.; GOULAS, V.; VICENTE, A. R.; TERRYD, L. A. Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. **J. Sci. Food Agr.**, v. 94, p. 825-833, 2014.
- MARTÍNEZ, M. L.; MATTEA, M. A.; MAESTRI, D. M. Pressing and supercritical carbon dioxide extraction of walnut oil. **J. Food Eng.**, v. 88, p. 399-404, 2008.
- MARTINS, C. P. S.; MELO, M. T. P.; HONÓRIO, I. C. G.; D'ÁVILA, V. A.; CARVALHO JÚNIOR, W. G. O. Morphological and agronomic characterization of Jambu (*Spilanthes oleracea* L.) accessions under the conditions of North Minas Gerais State, Brazil. **Rev. Bras. Plant. Med.**, v. 14, p. 410-413, 2012.
- MBEUNKUI, F.; GRACE, M. H.; LATEGAN, C.; SMITH, P. J.; RASKIN, I.; LILA, M. A. Isolation and identification of antiplasmodial *N*-alkylamides from *Spilanthes acmella* flowers

using centrifugal partition chromatography and ESI-IT-TOF-MS. **J. Chromatogr. B**, v. 879, p. 1886-1892, 2011.

MELO, M. M. R. de; SILVESTRE, A. J. D.; SILVA, C. M. Supercritical fluid extraction of vegetable matrices: Applications, trends and future perspectives of a convincing green technology. **J. Supercrit. Fluid.**, v. 92, p. 115-176, 2014.

MISHRA, A.; ROY, S.; MAITY, S.; YADAV, R. K.; KESHARI, A. K.; SAHA, S. Antiproliferative effect of flower extracts of *Spilanthes paniculata* on hepatic carcinoma cells. **Int. J. Pharm. Sci.**, v. 7, p. 130-134, 2015.

MOLINA-TORRES, J.; SALAZAR-CABRERA, C. J.; ARMENTA-SALINAS, C.; RAMÍREZ-SÁNCHEZ, E. Fungistatic and bacteriostatic activities of alkamides from *Heliopsis longipes* roots: affinin and reduces amides. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, p.4700-4704, 2004.

MOLINATORRES, J.; SALGADO-GARCIGLIA, R.; RAMIREZ-CHANEZ, E.; DEL RIO, R. E. Purelyolefinic alkamides in *Heliopsis longipes* and *Acmella (Spilanthes) oppositifolia*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 24, p. 27-43, 1996.

MONROE, D.; LUO, R.; TRAN, K.; RICHARDS, K. M.; BARBOSA, A. F.; CARVALHO, M. G. de; SABAA-SRUR, A. U. O.; SMITH, R. E. LC-HRMS and NMR Analysis of Lyophilized *Acmella oleracea* Capitula, Leaves and Stems. **Nat. Prod. J.**, v. 6, p. 116-125, 2016.

MORENO, S. C.; CARVALHO, G. A., PICANCO, M. C.; MORAIS, E. G. F.; PEREIRA, R. M. Bioactivity of compounds from *Acmella oleracea* against *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) and selectivity to two non-target species. **Pest Manag. Sci.**, v. 68, p. 386-393, 2012.

NAKATANI, N.; NAGASHIMA, M. Pungent alkamides from *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* Clarke. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 56, p. 759-762, 1992.

NARDINI, M.; CIRILLO, E.; NATELLA, F.; SCACCINI, C. Absorption of phenolic acids in humans after coffee consumption. **J. Agr. Food Chem.**, v. 50, p. 5735-5741, 2002.

NASCIMENTO, A. M.; SOUZA, L. M. DE; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. DE P.; MARIA-FERREIRA, D.; SILVA, L. M. DA; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. **Phytochemistry**, v. 85, p. 137-142, 2013.

NIKI, E. Antioxidant capacity: which capacity and how to assess it? **J. Berry Res.**, v. 1, p. 169-176, 2011.

NORULAINI, N. A. N.; SETIANTO, W. B.; ZAIDUL, I. S. M.; NAWI, A. H.; AZIZI, C. Y. M.; OMAR, A. K. M. Effects of supercritical carbon dioxide extraction parameters on virgin coconut oil yield and medium-chain triglyceride content. **Food Chem.**, v. 116, p. 193-197, 2009.

NUENGCHAMNONG, N.; INGKANINAN, K. On-line HPLC-MS-DPPH assay for the analysis of phenolic antioxidant compounds in fruit wine: *Antidesma thwaitesianum* Muell. **Food Chem.**, v. 118, p. 147-152, 2010.

OGURA, M.; CORDELL, G. A.; QUINN, M. L.; LEON, C.; BENOIT, P. S.; SOEJARTO, D. D.; FARNSWORTH, N. R. Ethnopharmacology studies. I. Rapid solution to a problem – oral use of *Heliopsis longipes* – by means of a multidisciplinary approach. **J. Ethnopharmacol.**, v. 5, p. 215-219, 1982.

OIKONOMOPOULOU, V. P.; KROKIDA, M. K. Novel aspects of formation of food structure during drying. **Dry. Technol.**, v. 31, p. 990-1007, 2013.

OSMAN, A. M. Multiple pathways of the reaction of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH) with (+)-catechin: Evidence for the formation of a covalent adduct between DPPH and the oxidized form of the polyphenol. **Biochem. Bioph. Res. Co.**, v. 412, p. 473-478, 2011.

OZCAN, E. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. **Clinical Biochemistry**, v. 37, p. 277-285, 2004.

PANDEY, V.; CHOPRA, M.; AGRAWAL, V. *In vitro* isolation and characterization of biolarvicidal compounds from micropropagated plants of *Spilanthes acmela*. **Parasitol. Res.**, v. 108, p. 297-304, 2011.

PATRAS, A.; BRUNTON, N. P.; DONNELL, C. O.; TIWARI, B. K. Effect of thermal processing on anthocyanin stability in foods, mechanisms and kinetics of degradation. **Trends Food Sci. Tech.**, v. 21, p. 3-11, 2010.

PAULRAJ, J.; GOVINDARAJAN, R.; PALPU, P. The genus *Spilanthes* ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacological properties: a review. **Adv. Pharmacol. Sci.**, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/510298>.

PEREIRA, C.; MEIRELES, M. A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: fundamentals, applications and economic perspectives. **Food Bioprocess Tech.**, v. 3, p. 340-372, 2010.

PERIČIN, D.; KRIMER, V.; TRIVIĆ, S.; RADULOVIĆ, L. The distribution of phenolic acids in pumpkin's hull-less seed, skin, oil cake meal, dehulled kernel and hull. **Food Chem.**, v. 113, p. 450-456, 2009.

PERRONE, D.; FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Influence of coffee roasting on the incorporation of phenolic compounds into melanoidins and their relationship with antioxidant activity of the brew. **J. Agr. Food Chem.**, v. 60, p. 4265-4275, 2012.

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

PITASAWAT, B.; CHOOCHOTE W.; KANJANAPOTHI D.; PANTHONG A.; JITPAKDI A.; CHAITHONG, U. Screening for larvicidal activity of ten carminative plants. **Se Asian J. Trop. Med.**, v. 29, p. 660-662, 1998.

PLAZA, M.; AMIGO-BENAVENT, M.; DEL CASTILLO, M. D.; IBANEZ, E.; HERRERO, M. Facts about the formation of new antioxidants in natural samples after subcritical water extraction. **Food Res. Int.**, v. 43, p. 2341-2348, 2010.

POLTRONIERI, M. C.; MÜLLER, N. R. M.; POLTRONIERI, L. S. **Recomendações para a produção de Jambu: cultivar Nazaré**. Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2000. 13p. (Circular Técnica, 11).

PRACHAYASITTIKUL, S.; SUPHAPONG, S.; WORACHARTCHEEWAN, A.; LAWUNG, R.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. **Molecules**, v. 14, p. 850-867, 2009.

PRACHAYASITTUKAL, V.; PRACHAYASITTUKAL, S.; RUCHIWARAT, S.; PRACHAYASITTUKAL, V. High therapeutic potential of *Spilanthes acmella*: a review. **EXCLI J.**, v. 12, p. 291-312, 2013.

RAI, M. K.; VARMA, A.; PANDEY, A. K. Antifungal potential of *Spilanthes calva* after inoculation of *Piriformospora indica*. **Mycoses**, v. 47, p. 479-481, 2004.

RAMLAN, A. Z.; MOHAMAD ROJI, S. **Processing of herbs and herbal products. Proceedings of The Seminar on Medicinal and Aromatic Plants**. Kepong: Towards Bridging Science and Herbal Industry, 2000. p. 1-8

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

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure–antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

RATTI, C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: a review. **J. Food Eng.**, v. 49, p. 311-319, 2001.

RICHARDS, K. M.; TRAN, K.; LEVINE, R. A.; LUO, R.; MAIA, G. M.; SABAA-SRUR, A. U. O.; MACIEL, M. I. S.; MELO, E. A.; MORAES, M. R. de; GODOY, H. T.; CHAVES, M. A.; SACRAMENTO, C. K. do; THOMAS, A. L.; SMITH, R. E. Improved extraction of soluble solids from fruits. **Nat. Prod. J.**, v. 4, p. 201-210, 2014.

RICHTER, B. E.; JONES, B. A.; EZZELL, J. L.; PORTER, N. L. Accelerated solvent extraction: a technique for sample preparation. **Anal. Chem.**, v. 68, p. 1033-1039, 1996.

RIOS, M. R.; OLIVO, H. F. **Natural and synthetic alkylamides: applications in pain therapy**. New York: Elsevier, 2014. p. 79-118

RIOS, M. Y.; AGUILAR-GUADARRAMA, A. B.; GUTIERREZ, M. D. Analgesic activity of affinin, an alkamide from *Heliopsis longipes* (Compositae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 110, p. 364-367, 2007.

- RIVERO-PEREZ, M. D.; MUNIZ, P.; GONZALEZ-SANJOSE, M. L. Antioxidant profile of red wines evaluated by total antioxidant capacity, scavenger activity, and biomarkers of oxidative stress methodologies. **J. Agr. Food Chem.**, v. 55, p. 5476-5483, 2007.
- RODEIRO, I.; DONATO, M. T.; JIMENEZ, N.; GARRIDO, G.; MOLINA-TORRES, G.; MENENDEZ, R.; CASTELL, J. V.; GÓMEZ-LECHÓN, M. Inhibition of human P450 enzymes by natural extracts used in traditional medicine. **Phytother. Res.**, v. 23, p. 279-282, 2009.
- SAHENA, F.; ZAIDUL, I. S. M.; JINAP, S.; KARIM, A. A.; ABBAS, K. A.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M. Application of supercritical CO₂ in lipid extraction - a review. **J. Food Eng.**, v. 95, p. 240-253, 2009.
- SANA, H.; RANI, A. S.; SULAKSHANA, G. Determination of antioxidant potential in *Spilanthes acmella* using DPPH assay. **Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.**, v. 3, p. 219-223, 2014.
- SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Sci. Tech. Int.**, v. 8, p. 121-137, 2002.
- SANCHO, A. I.; BARTOLOMÉ, B.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; WILLIAMSON, G.; FAULDS, C. B. Release of ferulic acid from cereal residues by barley enzymatic extracts. **J. Cereal Sci.**, v. 34, p. 173-179, 2001.
- SANTOS, D. S. dos **Desenvolvimento de método por CLAE-DAD para determinação de espilantol em *Spilanthes acmella* (L.) Murray**. 2010. 90f. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Sergipe.
- SARAF, D. K.; DIXIT, V. K. *Spilanthes acmella* Murr.: study on its extract spilanthol as larvicidal compound. **Asian J. Exp. Sci.**, v. 16, p. 9-19, 2002.
- SAURA-CALIXTO, F.; GONI, I. Antioxidant capacity of the Spanish Mediterranean diet. **Food Chem.**, v. 94, p. 442-447, 2006.
- SAVADI, R. V.; YADAV, R.; YADAV, N. Study on immunomodulatory activity of ethanolic extract *Spilanthes acmella* Murr. Leaves. **Indian J. Nat. Prod. Resources**, v. 1, p. 204-207, 2010.
- SERUGA, M.; NOVAK, I.; JAKOBEK, L. Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. **Food Chem.**, v. 124, p. 1208-1216, 2011.
- SHAH, Z. A.; LI, R. C.; AHMAD, A. S.; KENSLER, T. W.; YAMAMOTO, M.; BISWAL, S. The flavanol (-)-epicatechin prevents stroke damage through the Nrf2/HO1 pathway. **J. Cerebral Blood Flow & Metabolism**, v. 30, p. 1951-1961, 2010.
- SHARMA, A.; KUMAR, V.; RATTAN, R. S.; KUMAR, N.; SINGH, B. Insecticidal toxicity of spilanthol from *Spilanthes acmella* Murr. against *Plutella xylostella* L. **Am. J. Plant Sci.**, v. 3, p. 1568-1572, 2012.

SHARMA, V.; BOONEN, J.; CHAUHAN, N. S.; THAKUR, M.; DE SPIEGELEER, B.; DIXIT, V. K. *Spilanthes acmella* ethanolic flower extract: LC-MS alkylamide profiling and its effects on sexual behavior in male rats. **Phytomedicine**, v. 18, p. 1161-1168, 2011.

SHIMADA, T.; GOMI, T. **Spilanthol-rich essential oils for manufacturing tooth-pastes or other oral compositions**. JP patent 07090294, 1995.

SHUHAMA, I. K.; AGUIAR, M. L.; OLIVEIRA, W. P.; FREITAS, L. A. P. Experimental production of annatto powders in spouted bed dryer. **J. Food Eng.**, v. 59, p. 93-97, 2003.

SIMAS, N. K.; DELLAMORA, E. C. L.; SCHRIPSEMA, J.; LAGE, C. L. S.; FILHO, A. M. O.; WESSJO-HANN, L.; PORZEL, A.; KUSTER, R. M. Acetylenic 2-phenylethylamides and new isobutylamides from *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, a Brazilian spice with larvacidal activity on *Aedes aegypti*. **Phytochem. Lett.**, v. 6, p. 67-72, 2013.

SINGH, M.; CHATURVEDI, R. Evaluation of nutrient uptake and physical parameters on cell biomass growth and production of spilanthol in suspension cultures of *Spilanthes acmella* Murr. **Bioprocess Biosyst. Eng.**, v. 35, p. 943-951, 2012a.

SINGH, M.; CHATURVEDI, R. Screening and quantification of an antiseptic alkylamide, spilanthol from *in vitro* cell and tissue cultures of *Spilantes acmella* Murr. **Ind. Crop Prod.**, v. 36, p. 321-328, 2012b.

SMITH, R. E. **Medicinal Chemistry – Fusion of Traditional and Western Medicine**. 2. ed., Sharjah: Bentham Science, 2014. p. 192-196.

SOARES, C. P.; LEMOS, V. R.; SILVA, A. G. da; CAMPOY, R. M.; SILVA, C. A. P. da; MENEGON, R. F.; ROJAHN, I.; JOAQUIM, W. M. Effect of *Spilanthes acmella* hydroethanolic extract activity on tumour cell act in cytoskeleton. **Cell Biol. Int.**, v. 38, p. 131-135, 2014.

Sociedade Brasileira de Química. **DPPH**. Disponível em: <http://qnint.sbq.org.br/qni/popup_visualizarMolecula.php?id=4J4NcOscwSWQozPv_U900znaLVcJT9yuEtosdRR6-OUaLje9-uzD1r0zo9HWIFgxKcELr89FjeGeQhTJYPGT2Q> Acesso em: 07 set. 2016

SOSULSKI, F.; KRYGIER, K.; HOGGE, L. Free, esterified, and insoluble-bound phenolic acids. **J. Agr. Food Chem.**, v. 30, p. 337-340, 1982.

SPELMAN, K.; DEPOIX, D.; MCCRAY, M.; MOURAY, E.; GRELLIER, P. The traditional medicine *Spilanthes acmella*, and the alkylamides spilanthol and undeca-2*E*-ene-8,10-diynoic acid isobutylamide, demonstrate *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity. **Phyther. Res.**, v. 25, p. 1098-1110, 2011.

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

STRATIL, P.; KUBAN, V.; FOJTOVA, J. Comparison of the phenolic content and total antioxidant activity in wines as determined by spectrophotometric methods. **Czech J. Food Sci.**, v. 26, p. 242-253, 2008.

STRUMILLO, C.; ADAMIEC, J. Energy and quality aspects of food drying. **Dry. Technol.**, v. 14, p. 423-448, 1996.

SUN, J.; CHU, Y. F.; WU, X.; LIU, R. H. Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits. **J. Agr. Food Chem.**, v. 50, p. 7449-7454, 2002.

SURH, Y. J. Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. **Nat. Rev. Cancer**, v. 3, p. 768-780, 2003.

TEMELLI, F. Perspectives on supercritical fluid processing of fats and oils. **J. Food Eng.**, v. 47, p. 583-590, 2009.

TIWARI, K. L.; JADHAV, S. K.; JOSHI, V. An updated review on medicinal herb Genus *Spilanthes*. **J. Chin. Integr. Med.**, v. 9, p. 1170-1178, 2011.

TIWARI, U.; CUMMINS, E. Factors influencing levels of phytochemicals in selected fruit and vegetables during pre- and post-harvest food processing operations. **Food Res. Int.**, v. 50, p. 497-506, 2013.

VERYSER, L.; WYNENDAELE, E.; TAEVERNIER, L.; VERBEKE, F.; JOSHI, T. TATKE, P.; DESPIEGELEER, B. *N*-alkylamides: from plant to brain. **Func. Foods Health Dis.**, v. 4, p. 264-275, 2014.

VRCEK, I. V.; BOJIC, M.; ZUNTAR, I.; MENDAS, G.; MEDIC-SARIC, M. Phenol content, antioxidant activity and metal composition of Croatian wines deriving from organically and conventionally grown grapes. **Food Chem.**, v. 124, p. 354-361, 2011.

VULPI, T. S.; MORAIS, C. P. M.; TRINDADE, A. P. F.; LIMA, M. C. de H. P.; VELOZO, L. S. M.; KAPLAN, M. A. C. Análise do Óleo Essencial dos Diferentes Órgãos de *Acmella ciliata* Kunth (Asteraceae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, p. 1128-1130, 2007.

Z Aidul, I. S. M.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M.; SATO, YSMITH JR, R. L. Separation of palm kernel oil from palm kernel with supercritical carbon dioxide using pressure swing technique. **J. Food Eng.**, v. 81, p. 248-419, 2007a.

Z Aidul, I. S. M.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M.; SMITH JR., R. L. Blending of supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extracted palm kernel oil fractions and palm oil to obtain cocoa butter replacers. **J. Food Eng.**, v. 78, p. 1397-1409, 2007b.

Z Aidul, I. S. M.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M.; SMITH JR., R. L. Supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extraction and fractionation of palm kernel oil from palm kernel as cocoa butter replacers blend. **J. Food Eng.**, v. 73, p. 210-216, 2006.

Z Aidul, I. S. M.; NORULAINI, N. A. N.; OMAR, A. K. M.; SMITH JR., R. L. Supercritical carbon dioxide (SC-CO₂) extraction of palm kernel oil from palm kernel. **J. Food Eng.**, v. 79, p. 1007-1014, 2007c.

ZHAO, J.; MOORE, A. N.; REDELL, J. B.; DASH, P. K. Enhancing expression of Nrf2-driven genes protects the blood brain barrier after brain injury. **J. Neuroscience**, v. 27, p. 10240-10248, 2007.

ZHENG, C. D.; LI, G.; LI, H. Q.; XU, X. J.; GAO, J. M.; ZHANG, A. L. DPPH scavenging activities and structure–activity relationships of phenolic compounds. **Nat. Prod. Communications**, v. 5, p. 1759-1765, 2010.

WILLIAMS, D. J.; EDWARDS, D.; INGRID HAMERNIG, I.; JIAN, L.; JAMES, A. P.; JOHNSON, S. K.; TAPSELL, L. C. Vegetables containing phytochemicals with potential anti-obesity properties: A review. **Food Res. Int.**, v. 52, p. 323-333, 2013.

WONG, D. W. S. Feruloyl esterase: A key enzyme in biomass degradation Applied. **Biochem. Biotech.**, v. 133, p. 87-112, 2006.

WU, L-C.; FAN, N-C.; LIN, M-H.; CHU, I-R.; HUANG, S-J.; HAN, S-Y. 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.

YADAV, K.; SINGH, N. Micropropagation of *Spilanthes acmella* Murr. – An Important Medicinal Plant. **Nature Sci.**, v. 8, n. 9, p. 5-11, 2010.

YANG, J.; CHEN, J. F.; ZHAO, Y. Y.; MAO, L. C. Effects of drying processes on the antioxidant properties in sweet potatoes. **Agric. Sci. China**, v. 9, p. 1522-1529, 2010.

YANG, M.; CHUNG, S. J.; CHUNG, C. E.; KIM, D. O.; SONG, W. O.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Estimation of total antioxidant capacity from diet and supplements in US adults. **British J. Nutrition**, v. 106, p. 254-263, 2011.

CAPÍTULO II.

IMPACTO DA SECAGEM COM AR FRIO E LIOFILIZAÇÃO DO JAMBU (*Acmella oleracea* L.) SOBRE AS PROPRIEDADES NUTRICIONAIS, CONTEÚDO DE FENÓLICOS TOTAIS, CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E ISOTERMAS DE ADSORÇÃO

**Alan Franco Barbosa¹; Davy Hidalgo Chávez¹, Mirza Nalesso Gomes Sanches²;
Carolina Pinto de Carvalho Martins¹, Mário Geraldo de Carvalho²; Armando
Ubirajara Oliveira Sabaa Srur^{1,3,†}**

¹ Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil

² Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro – UFRRJ, Seropédica, RJ, Brasil

³ Departamento de Nutrição Básica e Experimental, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da secagem (secagem com ar frio e liofilização) sobre as propriedades nutricionais e capacidade antioxidante do Jambu (*Acmella oleracea* L.), bem como obter isotermas de adsorção de umidade do Jmabu seco com ar frio. Foram determinados o perfil de aminoácidos, perfil de ácidos graxos, minerais, polifenóis totais e livres e a capacidade antioxidante (DPPH e ABTS) dessa hortaliça em dois tipos diferentes de secagem. As isotermas de adsorção foram construídas usando o conjunto de dados experimentais dos modelos matemáticos de Gab, Oswin, Henderson, Peleg, Halsey, Adam e Shove e Iglesias e Chirife. O Jambu seco com ar frio (JSAF) apresentou maior teor dos nutrientes avaliados, com exceção do teor de minerais, e maior capacidade antioxidante em relação ao Jambu liofilizado (JL). O modelo de Peleg, em todas as temperaturas avaliadas, representou melhor as isotermas de adsorção de umidade do JSAF, apresentando erro de 11,58-53,13 % e coeficiente de correlação variando de 0,926-0,999. Dessa forma, o Jambu seco com ar frio apresentou melhor qualidade nutricional e maior capacidade antioxidante em relação ao Jambu Liofilizado. Pelos resultados pode-se dizer que o modelo de Peleg pode representar satisfatoriamente as isotermas de adsorção de umidade do JSAF.

Palavras-chave: Espilantol, *Spilanthes oleracea*, Composição nutricional, Hortaliças, Soluções salinas saturadas, Comportamento higroscópico.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the chemical profile, total phenolic content, antioxidant capacity and moisture adsorption isotherms of Jambu (*Acmella oleracea* L.) dried through cold air circulation. The amino acid profile, fatty acids profile, minerals, total and free polyphenols, and antioxidant capacity, DPPH and ABTS, of this vegetable were set through two different drying process types. Isotherms of absorption were built using the experimental data set to mathematical Gab, Oswin, Henderson, Peleg, Halsey, Adam and Shove and Iglesias, and Chirife models. The cold air dried Jambu (CADJ) showed the highest content of assessed nutrients, except for the mineral content, and antioxidant capacity regarding the lyophilized Jambu (LJ). The Peleg model best represented the isotherms of CADJ moisture adsorption at all assessed temperatures; it presented 11.58% to 53.13 % error, besides correlation coefficient ranging that was 0.926 to 0.999. Thus, cold air dried Jambu showed better nutritional quality and antioxidant capacity regarding the lyophilized Jambu. Therefore, it can be concluded that the Peleg model can represent the moisture adsorption isotherms of CADJ a satisfactory way.

Keywords: Spilanthol, *Spilanthus oleracea*, Nutritional composition, Vegetables, Saturated salt solutions, Hygroscopic behavior.

1 Introdução

Frutas e hortaliças têm sido reconhecidas como importantes fontes de substâncias e metabólitos especiais não digeríveis que, individualmente, ou em combinação, podem agir sinergicamente para contribuir com benefícios nutricionais e de saúde (ONIVOGUI et al., 2014).

Jambu, *Acmella oleracea* L., é uma hortaliça muito utilizada no estado do Pará (Norte do Brasil) em pratos típicos, como tacacá e pato no tucupi ou com arroz e pizzas (COSTA et al., 2013). A planta apresenta propriedades químicas importantes que despertam o interesse da indústria farmacêutica, especialmente pela presença do metabólito majoritário, o espilantol (BORGES et al., 2012). Além do espilantol, o Jambu é rico em nutrientes, tais como ferro e também tem as vitaminas B1, B2, niacina, vitamina C, pró-vitamina A e cálcio (VILLACHICA, 1996).

O aumento da valorização das propriedades nutricionais e funcionais do Jambu é susceptível de encorajar o estudo dos efeitos do processamento sobre esses atributos do produto, a fim de minimizar a degradação da qualidade. A desidratação tornou-se um processo de conservação de alimentos amplamente utilizado, permitindo a extensão da validade comercial da maioria dos produtos agro-alimentares. Seu principal objetivo é a remoção da água para um nível em que reações de deterioração química e microbiana são minimizados (VEGA-GÁLVEZ et al., 2009).

Existem vários equipamentos e diferentes técnicas de desidratação que podem ser utilizados para secagem de hortaliças, como a secagem com ar quente, secagem natural, secagem com ar frio e a liofilização. Segundo Shuhama e colaboradores (2003), o secador de bandeja com circulação de ar quente é o método mais utilizado para secagem de hortaliças. No entanto, apesar deste método apresentar simplicidade de operação e baixo custo, produz alimentos de baixa qualidade. A secagem com ar frio e a liofilização se destacam por não utilizarem temperaturas altas durante a secagem, e dessa forma há menor degradação dos nutrientes dos alimentos.

Além das características nutricionais, é muito importante conhecer o comportamento higroscópico e construir isotermas de adsorção para oferecer melhores condições de armazenamento, desenvolvimento de embalagens apropriadas, conhecer a umidade de equilíbrio e as características físicas e físico-químicas dos produtos alimentícios (ALEXANDRE et al., 2007).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da secagem (secagem com ar frio e liofilização) sobre as propriedades nutricionais e capacidade antioxidante do Jambu, bem como obter isotermas de adsorção de umidade do Jambu seco com ar frio.

2 Material e métodos

2.1 Jambu

Jambu (planta inteira: folhas, hastes e inflorescências) foi coletado no Município de Igarapé-Açu (Figura 1), pertencente a Meso e Micro Nordeste Pará, Região Bragantina, estado do Pará, Brasil, sob as coordenadas: 01° 07 '33 "S e 47° 37 '27 "O. A planta (MG205534) foi identificada como *Acmella oleracea* L. (Asteraceae), e uma amostra foi depositada no herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi, na cidade de Belém, estado do Pará, Brasil.



Figura 1. Colheita do Jambu.

2.2 Preparo

O Jambu foi inicialmente lavado com água para remover os resíduos do solo. Em seguida, as raízes e as partes rasgadas e escuras da planta foram eliminadas. A planta foi higienizada durante 10 min numa solução de cloro residual livre (200 ppm) derivada do hipoclorito de sódio (10 % de pureza). Uma segunda lavagem foi realizada com solução clorada (5 ppm) durante 10 min, com o posterior escoamento.

2.3 Processo de secagem

2.3.1 Secagem de Jambu com circulação de ar frio

O processo de secagem a frio foi realizada numa sala climatizada de 4,0 m², com ar condicionado (Midea, modelo MS2E-18Cr, Brasil), a 25 °C. Além disso, foi utilizado um desumidificador (Arsec, modelo 160, Brasil), e a sala permaneceu fechada durante todo o processo de secagem (Figura 2). Após a secagem, o JSAF foi embalado em sacos de polietileno e armazenado sob refrigeração para posterior análises químicas. Antes das análises químicas, o JSAF foi triturado utilizando um mini processador (Black & Decker, modelo HC31, Brasil).



Figura 2. Secagem do Jambu.

2.3.2 Liofilizador e operação

O equipamento utilizado foi um liofilizador de bancada (Alpha 1-4/LDC-1 M, Christ, Alemanha), que consiste basicamente de uma câmara de secagem acrílica cilíndrica e transparente. Na parte superior da câmara, há uma tampa em aço inox que acopla torneiras de silicone para o encaixe dos frascos (cones) de vidro com o sistema de alívio de vácuo e, no interior da câmara de secagem, há um suporte em aço inoxidável para bandejas de inox.

As amostras foram levadas ao congelamento por 24 hs em um freezer horizontal (H500C, Electrolux, Brasil) à $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ (congelamento lento). Após o congelamento, as amostras foram dispostas no interior da câmara de secagem do liofilizador em operação por um período de 72 hs à $-51\text{ }^{\circ}\text{C}$ and 0,011 mbar. Após a secagem, o JL foi embalado em sacos de polietileno e armazenado sob refrigeração para posterior análises químicas. Antes das análises químicas, o JL foi triturado utilizando um mini processador (Black & Decker, modelo HC31, Brasil).

2.4 Determinação da composição de aminoácidos

A determinação dos teores de aminoácidos foi realizada no Laboratório de Análises Micotoxicológicas (LAMIC) da UFSM, Santa Maria, RS, por cromatografia líquida de alta performance (CLAE). As amostras passaram por hidrolização prévia com ácido clorídrico (HCl) bidestilado 6N, seguida de derivação pré-coluna dos aminoácidos livres com fenilisotiocianato (PITC) e da separação dos derivativos feniltiocarbamil-aminoácidos (PTC-aa) em coluna de fase reversa C18 (Pico-Tag - 3,9 x 300 mm), com detecção por UV a 254 nm. A quantificação da amostra foi baseada na altura de cada pico de aminoácido, sendo usada como referência a altura do pico do padrão interno de aminoácidos com concentração conhecida, com o padrão derivado nas mesmas condições e no mesmo tempo que as amostras. O teor de proteína bruta (g por 100 g de matéria seca) da amostra foi determinado pelo método de micro-Kjeldahl ($N \times 5,75$), a partir da metodologia descrita pela Association of Official Agricultural Chemists (1995).

2.5 Determinação do perfil de ácidos graxos

Os óleos das amostras foram extraídos por Bligh e Dyer (1959). Para a análise por CG-EM, foram preparados os ésteres metílicos de ambas as amostras (HARTMAN e LAGO, 1973). O material foi analisado com Cromatografia a Gás acoplada a um espectrômetro de massas com ionização por impacto de elétrons (CG-EM - Shimadzu QP-2010 Plus) e através de análise dos dados de RMN ^1H da amostra não metilada. A CG-EM foi equipada com coluna capilar de sílica fundida VF-5ms (5 % fenil 95 % metilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm espessura da película), Varian, utilizando hélio como gás de transporte a 1 mL/min. A temperatura inicial foi de 50 °C, depois de ser mantida constante durante 40 minutos foi aumentada a uma taxa de 10 °C.min $^{-1}$ -290 °C, com isotérmica final de 300 °C durante 20 min. O volume de injeção de amostra foi de 1 μL (1:50 modo split).

A percentagem de cada componente foi calculada pela área integral sob os respectivos picos em relação à área total de todos os constituintes da amostra metilada. Identificados os ésteres metílicos é possível determinar a percentagem relativa dos ácidos livres. Os espectros de massas foram postulados pela biblioteca CG-EM Postrun Analysis da Shimadzu.

A identificação dos componentes foi realizada por CG-EM, em conjunto com os dados por espectros de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN ^1H), em um espectrômetro Bruker 500 MHz. A garantia dos ácidos livres na amostra se justifica pela ausência de sinal de unidade alquila do éster, como por exemplo de metoxila para ésteres metílicos, nos espectros de RMN.

2.6 Determinação de minerais

Para a determinação do perfil de minerais, cerca de 250 mg das amostras de hortaliças foram dissolvidas em 5 mL HNO $_3$ bi destilado, por 12 horas. A digestão foi finalizada colocando os tubos em banho à 80° C por 4 hs adicionada de água mili-Q. Para realização da análise, as amostras foram diluídas 5 e 100 vezes, sendo analisadas por espectrometria de massa com plasma indutivamente acoplado no modo semi-quantitativo (Perkin Elmer, NexION 300X, EUA). As análises foram realizadas no Laboratório de Espectrometria do Instituto de Química da Pontifícia Universidade Católica (PUC) do Rio de Janeiro. Foram determinadas as concentrações de cálcio (Ca), magnésio (Mg), sódio (Na), ferro (Fe), zinco (Zn), manganês (Mn), selênio (Se), cobre (Cu), molibdênio (Mo), cromo (Cr), boro (B), alumínio (Al), rubídio (Rb), titânio (Ti), bário (Ba) e estrôncio (Sr), em triplicata. Os padrões internos utilizados foram IMPE19, marca IMEP, Bélgica; 1515 Apples leaves, U. S. Department of Commerce National

Institute of Standards and Technology Gaithersburg; 1573a Tomato leaves, U. S. Department of Commerce National Institute of Standards and Technology Gaithersburg. Os resultados foram expressos em mg do mineral correspondente por 100 g da hortaliça em peso seco.

2.7 Determinação de polifenóis totais e livres

Os extratos de polifenóis totais e livres foram obtidos de acordo com Vinson e colaboradores (2001) com algumas modificações Faller e Fialho (2009). Amostras de 100 mg de Jambu *in natura* e seco foram colocadas em tubos plásticos de 5 mL e, adicionadas, 5 mL da solução extratora, constituída de ácido clorídrico 1,2 M em 50 % metanol/água destilada para extrato de polifenóis livres e em 50 % metanol/água destilada para extrato de polifenóis totais. Os tubos Eppendorf foram aquecidos em banho-maria 90 °C por três horas. Em seguida, foram removidos e esfriados a temperatura ambiente. Após isso, as amostras foram centrifugadas a 500 rpm por cinco minutos; o sobrenadante foi removido utilizando pipeta automática.

Os polifenóis totais e livres foram determinados pelo método Folin-Ciocalteu de acordo com Karou e colaboradores (2005). A solução Folin foi preparada utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich) e água destilada 1:1 (v/v). O extrato polifenol, 30 µL, foi colocado em tubo Eppendorf, e 75 µL de solução Folin, foram adicionados. Depois de cinco minutos de reação química, 420 µL de água destilada e 75 µL de carbonato de sódio (20 %) foram adicionados. A solução reagiu por 30 minutos. Em seguida, foi mensurado com espectrofotômetro (Beckman, modelo 6300, EUA) a 750 nm usando ácido gálico como padrão. Os resultados foram expressos em equivalente ácido gálico (EAG, mg/100 g Jambu liofilizado e seco). A determinação dos polifenóis foi realizada em triplicata.

2.8 Método pela captura do radical cátion DPPH•

A atividade foi determinada usando o método de Kim e colaboradores (2002) com algumas modificações. Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico - Sigma) foi utilizado como padrão antioxidante. 100 µM de DPPH• foi dissolvido em metanol a 80 %. O Jambu, 100 mg, foi adicionado a 3,9 mL da solução metanólica de DPPH•. A mistura foi agitada vagarosamente e deixada em repouso a 25 °C no escuro durante 30 min. A diminuição da absorvância da solução foi monitorizada com um espectrofotômetro (Beckman, modelo 6300, EUA) a 517 nm, a 30 e 60 min. A capacidade antioxidante foi expressa em equivalente Trolox (CAET) mmol correspondente a 1 g Jambu.

2.9 Determinação da capacidade antioxidante equivalente de Trolox (CAET)

Para a determinação da capacidade antioxidante pelo método CAET foram obtidos extratos de acordo com a metodologia descrita por Rufino e colaboradores (2007) e a quantificação de acordo com Re e colaboradores (1999).

O radical ABTS⁺ foi formado quimicamente com K₂SO₅ (persulfato de potássio), adicionando em um frasco âmbar 5 mL da solução 7 mM de ABTS em água destilada e 88 µL da solução de K₂SO₅ 140 mM, que permaneceu fechado à temperatura por 14 horas, para formação e estabilização da solução de ABTS⁺. Esta solução concentrada de ABTS⁺ foi diluída, aproximadamente 70 a 80 vezes, em etanol 95% até atingir uma absorvância de 0,700 ± 0,020 à 734 nm. Para a construção da curva de calibração de Trolox, foram elaboradas soluções com concentrações de 100, 500, 1000, 1500 e 2000 µM em etanol 95%, as quais ao reagirem com a solução de ABTS⁺ (na proporção de 1:10) durante 6 minutos, ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, promoveram um decréscimo na absorvância da solução, lida à 734 nm, por restaurar

parte do ABTS⁺ em ABTS não radicalar. O branco será lido com etanol 95 % na mesma proporção.

A capacidade antioxidante equivalente de Trolox (CAET) foi expressa como µmol Trolox correspondente a 1 g Jambu.

2.10 Isotermas de adsorção

O método gravimétrico estático com soluções salinas saturadas em três temperaturas (20 °C, 30 °C e 40 °C), foi usado para obter as isotermas de adsorção. Amostras secas (0,1 g, em três repetições) foram colocadas dentro de cadinhos (pré-pesados). O peso foi medido em balança analítica (Mettler, modelo H80, Reino Unido) com precisão de 0,0001 g e, em seguida, as amostras foram colocadas em frascos de vidro hermeticamente fechados, contendo as soluções salinas saturadas (Tabela 1). A hermeticidade dos recipientes impedia a interferência da umidade relativa do ambiente da incubadora tipo BOD (Logan, modelo LS334, BRASIL).

Tabela 1. Atividade de água das soluções salinas saturadas em três temperaturas diferentes (GREENSPAN, 1977).

Sal	Temperaturas		
	20 °C	30 °C	40 °C
KOH	0,0932	0,0738	0,0626
MgCl ₂	0,3307	0,3244	0,3160
K ₂ CO ₃	0,4316	0,4317	0,4320
NaCl	0,7547	0,7509	0,7468
KCl	0,8511	0,8362	0,8232
BaCl ₂	0,9070	0,900	0,8930

O peso das amostras foi registrado a cada 24 h até o equilíbrio da umidade relativa. Em seguida, foram determinados o conteúdo de umidade. A umidade foi expressa em base seca (Kg de água/Kg bs). Após isso, a umidade de equilíbrio (X_{eq}) foi calculada utilizando a equação (1).

$$X_{eq} = \frac{m_{eq} - m_s}{m_s} \quad (1)$$

Onde X_{eq} = equilíbrio de umidade; m_{eq} = massa em equilíbrio; m_s = massa da amostra seca.

Os dados experimentais das isotermas de adsorção foram ajustados mediante oito modelos matemáticos (Tabela 2). Estes modelos são amplamente utilizados para obtenção de isotermas de adsorção. Para a avaliação do ajuste dos modelos aos dados experimentais foi utilizado: o erro médio relativo (% P), o desvio relativo (SE), e o coeficiente de correlação (r²), conforme Equação 2-7.

$$P(\%) = \frac{100}{N} \sum_{j=1}^N \left| \frac{y_{jcal} - y_{jexp}}{y_{jexp}} \right| \quad (2)$$

$$P(\%) = \frac{100}{N} \sum_{j=1}^N \left| \frac{y_{jcal} - y_{jexp}}{y_{jexp}} \right| \quad (3)$$

$$P(\%) = \frac{100}{N} \sum_{j=1}^N \left| \frac{y_{jcal} - y_{jexp}}{y_{jexp}} \right| \quad (4)$$

Onde:

$$S_t = \sum_{j=1}^N (\bar{y} - y_{jexp})^2 \quad (5)$$

$$\bar{y} = \frac{\sum_{j=1}^N y_j}{N} \quad (6)$$

$$SCE = \sum_{j=1}^N (y_{jcal} - y_{jexp})^2 \quad (7)$$

Onde y_{jcal} e y_{jexp} são, respectivamente, os valores calculados e experimentais de Y (Y é o teor de umidade, expresso em base seca), n_p o número de parâmetros do modelo.

Tabela 2. Modelos de isotermas de adsorção aplicados aos dados experimentais de Jambu.

Modelo	Equação
Gab	$X = \frac{X_m \cdot C \cdot k \cdot a_w}{(1 - k \cdot a_w)(1 - k \cdot a_w + C \cdot k \cdot a_w)}$
Oswin	$X = a \left(\frac{a_w}{1 - a_w} \right)^b$
Herderson	$X = \left(\frac{-\ln(1 - a_w)}{b} \right)^{\frac{1}{a}}$
Peleg	$X = k_1 \cdot a_w^{n_1} + k_2 \cdot a_w^{n_2}$
Halsey	$X = \left(-\frac{A}{\ln(a_w)} \right)^{\frac{1}{B}}$
Adam e Shove	$X = A + B \cdot a_w + C \cdot a_w^2 + D \cdot a_w^3$
Caurie	$X = \exp(A + B \cdot a_w)$
Iglesias e Chirife	$X = A + B \cdot \left(\frac{a_w}{1 - a_w} \right)$

2.10 Análise estatística

Os experimentos (exceto as determinações de aminoácidos e ácidos graxos) foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos como média \pm DP. Para comparar as médias foi utilizado o teste t de Student a nível de 5% de significância ($p < 0,05$), usando o *software* BioStat 5.0 (AYRES et al., 2007).

Os modelos matemáticos foram calculados utilizando o *software* Statistica 10.0 (StatSoft Inc., Tulsa, EUA). A estimativa não linear (Quasi-Newton) foi utilizada para análise dos parâmetros dos modelos, e para determinar o critério de convergência de 0,0001.

3 Resultados e discussão

Embora existam muitas publicações sobre o Jambu, este trabalho revela novas informações sobre as propriedades químicas e isoterma de adsorção desta hortaliça, por isso não foi possível fazer comparações destes resultados.

O Jambu *in natura* apresentou 89,93 % de umidade e o Jambu seco com ar frio apresentou 10,07 % de umidade (BARBOSA et al., 2014).

Na literatura, há mais resultados qualitativos e poucos quantitativos. Por exemplo, Preetha e colaboradores (2014) avaliaram a composição química de *A. oleracea* usando prospecção fitoquímica combinada com espectroscopia de infravermelho. Os resultados mostraram a presença de carboidratos, lipídios, fenóis, alcanidas, alcanos e alcenos, em toda planta. Na Figura 3a,b são apresentadas fotos do Jambu seco com ar frio (A) e liofilizado (B).

(A)



(B)



Figura 3. Jambu seco com ar frio (A) e liofilizado (B).

3.1 Composição de aminoácidos

Os valores individuais de teores de aminoácidos essenciais (AAE), e não essenciais (ANE) e seus teores totais de AAEs e ANEs do Jambu liofilizado (JL) e seco com ar frio (JSAF), são apresentados na Tabela 3.

Dezessete aminoácidos foram detectados no JL e JSAF, 3,48 e 3,87 % deles são aminoácidos essenciais (AAE), respectivamente, e o restante são aminoácidos não-essenciais (ANE).

Houve uma pequena diferença de AAE e ANE entre os JL e JSAF. Leucina e lisina foram os AAE predominantes com 0,63, 0,68 % (JL) e 0,99, 0,67 % (JSAF), respectivamente. Fenilalanina e isoleucina apresentaram pequena quantidade com 0,62, 0,63 % (JL) e 0,66, 0,61 % (JSAF), respectivamente. Treonina, histidina e metionina apresentaram traços com 0,47, 0,39, 0,06 % (JL) e 0,52, 0,37, 0,05 % (JSAF), respectivamente. Ácidos aspártico e glutâmico foram os ANE predominantes com 1,90, 2,07 % (JL) e 1,95, 1,48 % (JSAF), respectivamente. Valina, prolina e serina apresentaram pequena quantidade com 0,74, 0,49, 0,62 % (JL) e 0,77, 0,93, 0,64 % (JSAF), respectivamente. A arginina, alanina, glicina, tirosina e cistina apresentaram traços com 0,58, 0,59, 0,49, 0,38, 0,03 % (JL) e 0,58, 0,58, 0,52, 0,31, 0,03 %, respectivamente.

Neste estudo, a quantidade de aminoácidos foi de 11,37 % (JL) e 11,66 % (JSAF), Tabela 3. A proporção de AAE no JL e JSAF foi cerca de 0,32. A proporção de AAE para ANE foi de 0,44 (JL) e 0,50 (JSAF), que foi maior do que o requerido para adulto para AAE/ANE (0,38), recomendado pela OMS, Organização Mundial da Saúde (Joint WHO, 2007).

Tabela 3. Composição de aminoácidos do Jambu liofilizado e seco com ar frio (% em peso seco).

Aminoácidos	JL*	JSAF**
<i>Aminoácidos essenciais (AAE)</i>		
Leucina	0,63	0,99
Lisina	0,68	0,67
Fenilalanina	0,62	0,66
Isoleucina	0,63	0,61
Treonina	0,47	0,52
Histidina	0,39	0,37
Metionina	0,06	0,05
<i>Aminoácidos não-essenciais (ANE)</i>		
Ácido aspártico	1,90	1,95
Ácido glutâmico	2,07	1,48
Valina	0,74	0,77
Prolina	0,49	0,93
Serina	0,62	0,64
Arginina	0,58	0,58
Alanina	0,59	0,58
Glicina	0,49	0,52
Tirosina	0,38	0,31
Cistina	0,03	0,03
Σ_{AAE}	3,48	3,87
Σ_{ANE}	7,89	7,79
$\Sigma_{AAE}/\Sigma_{ANE}$	0,44	0,50

*Jambu liofilizado (JL), **Jambu seco com ar frio (JSAF)

Mondal, Parui e Mandal (1998) quantificaram a composição de aminoácidos livres do pólen de *A. oleracea* e o conteúdo total encontrado foi de 4 %, valor bem inferior ao encontrado no presente estudo (Tabela 3). Isso pode ser justificado porque Mondal, Parui e Mandal (1998) utilizaram metodologias de secagem e análise diferentes do presente estudo, e analisaram apenas as flores de *A. oleracea*, e não toda a planta. Mondal, Parui e Mandal (1998) identificaram os aminoácidos por Cromatografia em Camada Fina (CCF). Ninidrina em acetona (0,1 %) foi utilizada para revelar a placa. Os aminoácidos de alto peso molecular identificados foram tirosina (1.800 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de peso seco), histidina (0,570 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de peso seco) e prolina (0,157 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de peso seco). Também foram quantificados ácido aspártico e glicina; 0,910 $\mu\text{mol}/\text{mg}$ de aminoácidos não foram identificados. No presente estudo foram identificados e quantificados 17 aminoácidos, 12 a mais em relação a Mondal, Parui e Mandal (1998).

3.2 Perfil de ácidos graxos

A composição dos ésteres metílicos e seus respectivos ácidos graxos do JL e JSAF estão apresentados na Tabela 4 e os fitoesteróis na Tabela 5..

Os espectros de RMN ^1H de ambas as amostras, sem serem submetidas a metilação, apresentaram sinais compatíveis com as estruturas de ácidos graxos saturados e insaturados, além da presença de esteroides. Os maiores teores de ácidos graxos encontrados no JL e JSAF foram os ácidos linolênico e palmítico, 0,28, 0,27 % (JL) e 0,83, 0,80 % (JSAF), respectivamente (Tabela 4 e Figura 4).

Na Figura 5 a,b são apresentados os espectros de RMN ^1H da fração lipídica das amostras JSAF e JL. Foi observado sinal semelhante a um multiplete na região de δ_{H} 0,90-1,2, o qual foi atribuído a hidrogênio metílico de várias metilas pertencentes as cadeias alifáticas dos ácidos graxos. Um sinal em δ_{H} 1,26 (m) foi atribuído a hidrogênio de metileno característico de cadeia alifática saturada. Em δ_{H} 1,63 observou-se um multiplete característico de CH_2 β -carbonila e em δ_{H} 2,35 outro multiplete característico de CH_2 α -carbonila. Sinais característicos de hidrogênio pertencentes a cadeia alifática insaturada foram observados em: δ_{H} 2,06 (m), conferido a CH_2 alílico, adjacente a carbono com hibridização sp^2 e em δ_{H} 2,81 (m), atribuído a CH_2 duplamente alílico, entre dois carbonos sp^2 . O sinal em δ_{H} 5,39 (m) foi atribuído aos hidrogênios olefínicos, ligados aos carbonos sp^2 (Figura 5 a,b). Estes sinais confirmaram a identificação por CG-EM de ésteres metílicos derivados dos ácidos insaturados contribuindo à identificação do ácido linoleico e linolênico nas amostras de LJ e CADJ.

A presença dos sinais δ_{H} 3,43 (m, hidrogênio carbinólico, H-3) e δ_{H} 5,2-5,6 (m, hidrogênio vinílico, H-6, H-22 e H-23) confirma a presença de esteroides (Figura 4 a,b). Os demais sinais são compatíveis com os dados do epilantol (Tabela 2, pág. 9, NAKATANI e NAGASHIMA, 1992) apenas no JSAF. Dessa forma, pode-se afirmar a presença do epilantol apenas no extrato lipídico do JSAF, pois não estava presente no extrato lipídico do JL.

Pelos resultados apresentados nas Tabelas 4 e 5, é possível observar que o JSAF apresentou maior teor de ácidos graxos e fitoesteróis em relação ao JL. Inclusive maior quantidade dos ácidos graxos linoleico e linolênico.

Tabela 4. Tempo de retenção (t_r em CG), índice de similaridade (IS), porcentagem relativa (%) de ésteres metílicos da amostra após a metilação e seus ácidos graxos correspondentes e proposta da quantidade relativa em peso seco $g.100^{-1}$.

Jambu liofilizado (JL)					
t_R	Ésteres metílicos identificados	Ácidos graxos correspondentes	SI (%)	% Área	$g.100^{-1}$
7,033	1-pentadeceno	-	95	1,29	0,01
7,075	Undecanoato de metila	Ácido undecanoico	88	0,28	0,002
10,663	Palmitato de metila	Ácido palmítico	96	30,60	0,27
13,822	Linoleato de metila	Ácido linoleico	96	22,71	0,20
13,975	Linolenato de metila	Ácido linolênico	93	31,57	0,28
14,655	Estearato de metila	Ácido esteárico	90	1,22	0,01
22,72	Docosanoato de metila	Ácido behênico	87	0,30	0,003
24,717	Tetracosanoato de metila	Ácido lignocérico	86	0,57	0,005
26,357	Hexacosanoato de metila	Ácido cerótico	80	0,28	0,002

Jambu seco com ar frio (JSAF)					
t_R	Ésteres metílicos identificados	Ácidos graxos correspondentes	SI (%)	% Área	$g.100^{-1}$
7,37	1-pentadeceno	-	97	2,42	0,08
10,31	Espilantol	-	92	12,42	0,41
10,672	Palmitato de metila	Ácido palmítico	95	24,13	0,80
13,836	Linoleato de metila	Ácido linoleico	96	21,98	0,73
13,99	Linolenato de metila	Ácido linolênico	93	25,16	0,83
14,671	Estearato de metila	Ácido esteárico	89	1,51	0,05
22,725	Docosanoato de metila	Ácido behênico	84	0,42	0,01
24,72	Tetracosanoato de metila	Ácido lignocérico	86	0,57	0,02
26,36	Hexacosanoato de metila	Ácido cerótico	82	0,55	0,02

Tabela 5. Tempo de retenção (t_r em CG), índice de similaridade (IS), porcentagem relativa (%) de fitoesteróis e proposta da quantidade relativa em peso seco $g.100^{-1}$.

Jambu liofilizado (JL)				
t_R	Fitoesteróis	SI (%)	% Área	$g.100^{-1}$
28,932	Estigmasterol*	79	0,40	0,003
29,548	Sitosterol*	88	1,51	0,001

Jambu seco com ar frio (JSAF)				
t_R	Fitoesteróis	SI (%)	% Área	$g.100^{-1}$
28,943	Estigmasterol*	84	0,83	0,03
29,559	Sitosterol*	80	0,68	0,02

*De acordo com análise do espectro de massas e sinais no espectro de RMN.

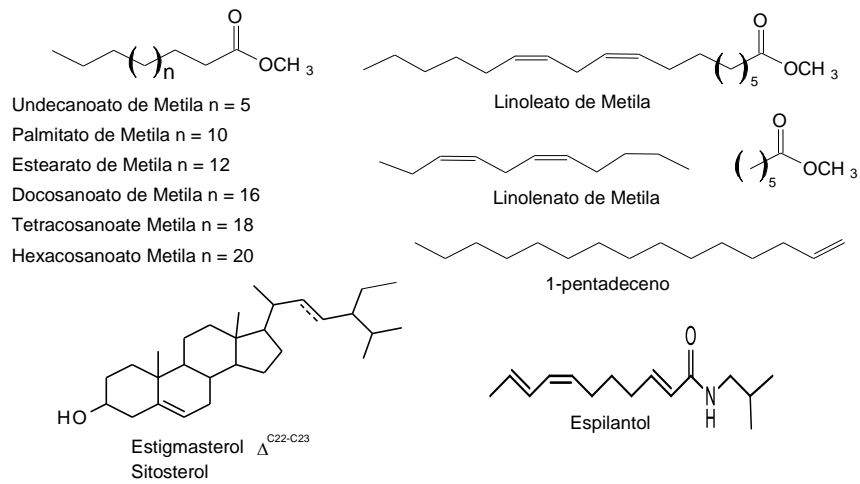


Figura 4. Estruturas das substâncias identificadas do JL e JSAF.

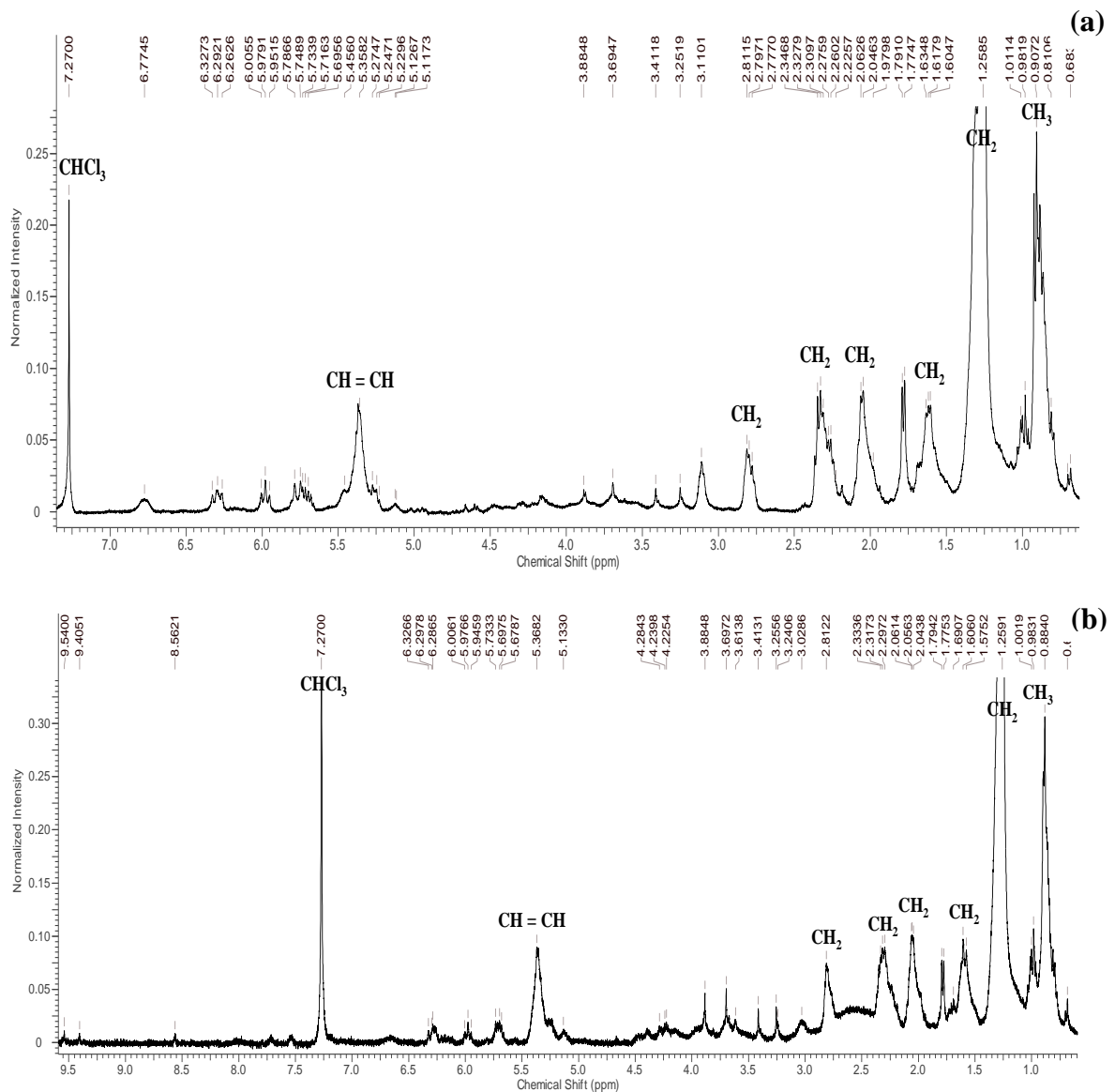


Figura 5. Espectro RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) JSAF (a). Espectro RMN ¹H (500 MHz, CDCl₃) JL (b).

Phrutivorapongkul e colaboradores (2008) identificaram e quantificaram os ácidos graxos do óleo da composição fixa das partes aéreas de *A. oleracea* desidratada. Curiosamente, o ácido graxo insaturado ômega-6, linoleico (56,37 %), foi o majoritário na hortaliça, diferindo do presente estudo. Isto significa que oleracea *A. oleracea* pode ser uma fonte rica de ácidos graxos essenciais. Foi encontrada grande quantidade de ácido palmítico (25,84 %) também, além do ácido caprílico, láurico, mirístico, palmitoleico, esteárico, oleico, araquídico, araquidônico, behênico, lignocérico e erúcido. Phrutivorapongkul e colaboradores (2008) encontraram valores muito mais elevados de ácidos graxos em relação ao presente estudo (Tabela 4), uma vez que quantificaram os ácidos graxos a partir da fração hexânica e não do Jambu seco. Além disso, eles identificaram o ácido caprílico, láurico, além do mirístico, erúcido, araquídico e araquidônico que não foram identificadas no presente estudo. No entanto, no presente estudo foram identificados metil éster undecanoato e hexacosanoato que não foram identificados por Phrutivorapongkul e colaboradores (2008).

3.3 Determinação de minerais

A Tabela 5 apresenta a composição de minerais do JL e JSAF. No JL e JSAF, o cálcio foi o mineral mais abundante, com valor de $1129,99 \pm 25,98$ e $1086,39 \pm 14,10$ mg.100 g⁻¹, respectivamente.

O magnésio (Mg) foi o segundo mineral mais abundante, com valor de $596,58 \pm 26,09$ e $440,91 \pm 7,89$, JL e JSAF, respectivamente. A Ingestão Diária Recomendada (IDR) para o Mg é de 320 mg para adultos do sexo feminino (51 à 70 anos) e 420 mg para os adultos do sexo masculino (51 à 70 anos) (IOM, 2001). Em 100 g de JL é fornecido cerca de 142 % (homens) e 186 % (mulheres) e o JSAF fornece cerca de 105 % (homens) e 138 % (mulheres) da IDR para Mg. O magnésio, quando ingerido como uma substância natural nos alimentos, não tem demonstrado exercer quaisquer efeitos adversos. Assim, um Nível Superior Tolerável de Ingestão (UL) não pode ser baseado em magnésio obtido a partir de alimentos e sim para utilização farmacológica (IOM, 2001).

Ferro (Fe), zinco (Zn), cobre (Cu) e manganês (Mn) são outros minerais de importância nutricional presentes no Jambu. A IDR para o Fe é de 18 mg/dia (mulheres) e 8 mg/dia (homens) e o Nível Superior Tolerável de Ingestão (UL) para adultos é de 45 mg/dia. O Zn apresenta IDR de 8 mg/dia (mulheres) e 11 mg/dia (homens) e UL = 40 mg/dia (para adultos). O Cu tem IDR de 0,9 mg/dia e e UL = 10 mg/dia (para adultos), e o Mn apresenta consumo adequado (AI) de de 1,8 mg/dia (mulheres) e 2,3 mg/dia (homens) e UL = 11 mg/dia (para adultos) (IOM, 2001). JL e JSAF (100 g) fornecem 96-220 % do IDR para o Fe, 75-146 % do IDR de Zn, 250-333 % do AI de Mn e 154-192 % do IDR para o Cu. O manganês tem um papel importante na respiração e metabolismo do nitrogênio, enquanto o cobre atua como um componente de fenolases, lacase e ácido ascórbico oxidase (ALABI e ALAUSA, 2006).

Aguiar e colaboradores (2014) encontraram teor de ferro superior no Jambu seco com circulação de ar quente ($6,4$ mg.100⁻¹ g, base úmida; $56,14$ mg.100⁻¹ g, base seca) em comparação com este estudo. A diferença pode ser explicada pelas diferentes metodologias utilizadas ou por fatores como clima, solo ou tipo de adubação utilizada, orgânica ou mineral (BORGES et al., 2013).

Os níveis de zinco encontrados em diferentes tecidos da planta são conhecidos por serem essenciais para a função e/ou estrutura de várias enzimas, incluindo peptidases, transfosforilase, etc. Além disso, o zinco é um componente essencial para o DNA e RNA polimerase. O zinco também é conhecido por atividades biológicas como: anti-viral, anti-bacteriano, anti-fúngico e anti-câncer (BRISIBE et al., 2009).

De modo geral, o conteúdo mineral do JSAF diminuiu significativamente em relação ao JL. No entanto, o teor de sódio encontrado no JL ($6,86 \pm 0,47$) foi muito menor do que em JSAF

(35,23 ± 0,28). Isso ocorreu, possivelmente, devido à migração de sódio do Jambu para a água durante o congelamento antes da liofilização. O congelamento lento forma grandes cristais de gelo com consequente lixiviação de nutrientes para a água (SANZ et al., 1999).

Tabela 5. Composição dos minerais do JL e JSAF, mg.100 g⁻¹ em peso seco.

Minerais	JL	JSAF	IDR*
Cálcio	1129,99 ± 25,99 ^a	1086,39 ± 14,104 ^a	1000 mg
Magnésio	596,58 ± 26,09 ^a	440,91 ± 7,89 ^b	260 mg
Sódio	6,86 ± 0,47 ^a	35,23 ± 0,28 ^b	-
Ferro	17,61 ± 1,57 ^a	17,39 ± 1,21 ^a	14 mg
Zinco	11,71 ± 0,57 ^a	8,25 ± 0,28 ^b	7 mg
Manganês	6,01 ± 0,12 ^a	5,77 ± 0,08 ^a	2,3 mg
Selênio	0,17 ± 0,01 ^a	0,11 ± 0,01 ^b	34 µg
Cobre	1,73 ± 0,07 ^a	1,39 ± 0,05 ^b	900 µg
Molibdênio	0,30 ± 0,01 ^a	0,22 ± 0,01 ^b	34 µg
Cromo	0,24 ± 0,02 ^a	0,24 ± 0,01 ^a	35 µg
Boro	7,66 ± 0,24 ^a	4,93 ± 0,15 ^b	-
Alumínio	6,28 ± 0,65 ^a	6,41 ± 0,50 ^a	-
Rubídio	5,30 ± 0,40 ^a	5,82 ± 0,19 ^a	-
Titânio	3,43 ± 0,14 ^a	3,26 ± 0,14 ^a	-
Bário	0,27 ± 0,01 ^a	0,41 ± 0,01 ^b	-
Estrôncio	1,84 ± 0,12 ^a	1,95 ± 0,05 ^a	-

Resultados expressos como média ± DP

^{a,b}Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si, ao nível de 5 % de significância pelo teste t.

IDR = Ingestão Diária Recomendada.

*Fonte: BRASIL, 2003.

Miranda e colaboradores (2010) avaliaram o efeito da temperatura de secagem (entre 40 e 80 °C) sobre as propriedades nutricionais de quinoa. Quando se compara a quinoa *in natura*, com as amostras de quinoa desidratadas, observou-se que a operação de secagem reduziu 10 % de proteínas, 12 % de gordura e 27 % de fibras e cinzas. No entanto, o processo de secagem utilizado no presente trabalho, a secagem com ar frio, manteve a composição nutricional do Jambu em comparação com o processo de liofilização.

Maiga e colaboradores (2005) determinaram as quantidades de minerais essenciais e tóxicos de flores de *A. oleracea* desidratada com circulação de ar a temperatura ambiente. Os níveis de ferro, manganês, zinco foram de 0,3 mg/g, 107,7 µg/g e 62,8 µg/g, respectivamente. Estes valores estão abaixo dos encontrados no presente estudo (Tabela 5). Isso pode ser justificado porque Maiga e colaboradores (2005) avaliaram os minerais presentes apenas nas flores do Jambu, e não na planta toda (inflorescência, hastes e folhas) como no presente estudo. Ou ainda por utilizarem metodologia diferente do presente estudo. Esses pesquisadores determinaram as concentrações dos minerais utilizando um espectrômetro atômico de chama (Varian AA 50B) equipado com a lâmpada apropriada para o respectivo mineral utilizando chama de ar acetileno. Já no presente estudo os minerais foram quantificados com espectrômetro de absorção atômica (Perkin Elmer nexion, modelo 300X, EUA).

3.4 Polifenóis totais e livres

O conteúdo de polifenóis totais e livres do JL e JSAF são apresentados na Tabela 6.

O JSAF apresentou maior concentração de polifenóis totais e livres (15,11 e 9,99 mg EAG.100 g⁻¹, respectivamente), ao nível de 5 % pelo teste t de Student, em comparação com JL (9,01 e 3,82 mg EAG.100 g⁻¹, respectivamente).

Esses resultados não estão em conformidade com resultados relatados na literatura. Kawaree e colaboradores (2008) avaliaram óleos voláteis das folhas frescas de três espécies diferentes, sendo que *S. oleracea* L. apresentou o maior teor de polifenóis, bem como capacidade antioxidante. Dias e colaboradores (2012) avaliaram extratos obtidos a partir de flores, folhas e hastes de Jambu *in natura* por meio da extração com CO₂ supercrítico e encontram teor de polifenóis totais maior em comparação com o presente estudo (0,6 a 2,49 % EAG, base seca). O JL e JSAF também apresentaram baixo teor de polifenóis totais (9,01 e 15,11 mg EAG.100 g⁻¹, respectivamente), em comparação com outras hortaliças, como couve, alface e folha de mostarda (624, 787, 826 mg EAG.100 g⁻¹, respectivamente) (DENG et al., 2013).

Pelos resultados encontrados pode-se afirmar que o processo de liofilização diminuiu o teor de polifenóis em comparação com a secagem com circulação de ar frio. Possivelmente isto ocorreu pela lixiviação dos polifenóis durante o congelamento da hortaliça, antes da liofilização. As condições de congelamento podem ter impacto no processo de liofilização (HOTTOT, ANDRIEU e VESSOT, 2007) e, conseqüentemente, na qualidade do produto final liofilizado obtido (NOWAK et al., 2016).

Análises realizadas a partir de extratos vegetais encontraram resultados de polifenóis totais maiores em relação à hortaliça seca, uma vez que existe uma maior concentração de substâncias; e, conseqüentemente, apresentará maior capacidade antioxidante. Nanasombat e Teckchuen (2009), por exemplo, encontraram 18,7 mg EAG/100g extrato metanólico seco na análise de conteúdo de polifenóis totais de Jambu, valor muito maior do que o encontrada neste estudo (Tabela 6).

Tabela 6. Conteúdo de polifenóis totais e livres do JL e JSAF, mg EAG.100 g⁻¹ em peso seco.

	JL	JSAF
Polifenóis totais	9,01 ± 0,42 ^a	15,11 ± 0,37 ^b
Polifenóis livres	3,82 ± 0,95 ^a	9,99 ± 0,35 ^b
% Polifenóis conjugados	57,60 %	33,88 %

Resultados expressos como média ± DP

^{a,b}Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si, ao nível de 5 % de significância pelo teste t.

3.5 Capacidade antioxidante

A Tabela 7 apresenta a capacidade antioxidante do JL e JSAF.

JL e JSAF apresentaram capacidade antioxidante (ABTS•+) (14,46 e 21,40 µmol Trolox.g⁻¹, respectivamente) semelhante à de outras hortaliças, como couve, alface e folhas de mostarda (8,24, 13,36, 15,23 µmol Trolox.g⁻¹, respectivamente) (DENG et al., 2013).

JSAF apresentou maior capacidade antioxidante, DPPH• e ABTS•+ (4,53 mmol Trolox.g⁻¹ e 21,40 µmol Trolox.g⁻¹) em comparação com o JL (3,95 mmol Trolox.g⁻¹ e 14,46 µmol Trolox.g⁻¹).

O Jambu seco com circulação de ar frio apresentou maior capacidade antioxidante em comparação com o Jambu liofilizado, devido ao maior teor de polifenóis totais. Dessa forma, o tipo de secagem utilizada influencia a composição química e, portanto, a capacidade antioxidante dessa hortaliça.

Miranda e colaboradores (2010) avaliaram o efeito da temperatura de secagem (entre 40 e 80 °C) sobre o conteúdo de polifenóis total e a capacidade antioxidante da quinoa. A capacidade antioxidante foi afetada pela temperatura de secagem. A degradação térmica, especialmente, à 60, 70 e 80 °C, resultaram numa redução notável no teor de polifenóis total.

A capacidade antioxidante de extratos de Jambu obtidos a partir de solventes polares e apolares foi investigada. Verificou-se que o extrato acetato de etila da flor do Jambu apresentou maior capacidade antioxidante (DPPH e ABTS) quando comparado com os outros extratos testados (WU et al., 2008). Por outro lado, extratos metanólicos de folhas e flores de Jambu apresentaram baixa capacidade antioxidante (NANASOMBAT e TECKCHUEN, 2009). As partes aéreas do Jambu também foram avaliadas (WONGSAWATKUL et al., 2008; PRACHAYASITTIKUL et al., 2009). Os extratos de acetato de etila e metanol apresentaram maior capacidade antioxidante (DPPH). Isto pode ser devido à presença de compostos fenólicos e cumarinas que estão presentes nos extratos (PRACHAYASITTIKUL et al., 2009). Além disso, as frações isoladas a partir do extrato clorofórmico apresentaram boa capacidade antioxidante, o que pode ser atribuído à presença de triterpenoides, estigmasterol e seus glicosídeos (PRACHAYASITTIKUL et al., 2009).

Tabela 7. Capacidade antioxidante de JL e JSAF em peso seco.

	LJ	JSAF
DPPH [*] - CAET (mmol.g ⁻¹) ¹	3,95±0,18 ^a	4,53±0,01 ^b
DPPH [*] - CAET (mmol.g ⁻¹) ²	3,97± 0,12 ^a	4,35 ± 0,03 ^b
ABTS ⁺⁺ - CAET (µmol.g ⁻¹)	14,46±0,55 ^a	21,40±1,33 ^b

Resultados expressos como média ± DP

^{a,b}Médias seguidas de mesma letra, na linha, não diferem entre si, ao nível de 5 % de significância pelo teste t.

¹CAET: Capacidade antioxidante em equivalente Trolox (Trolox.g⁻¹ mmol) em 30 minutos.

²CAET: Capacidade antioxidante em equivalente Trolox (Trolox.g⁻¹ mmol) em 60 minutos.

3.6 Isotermas de adsorção

A construção das isotermas de adsorção do JSAF encerrou-se em um período de 40 dias.

A análise de regressão não linear de ajuste dos resultados experimentais está apresentada na Tabela 8. Os modelos foram comparados em função do erro médio relativo por cento (P), desvio relativo (DR) e o coeficiente de determinação (r²) para as temperaturas estudadas. Todos os modelos apresentaram r² alto (Tabela 8) e variou de 0,883 a 0,998, respectivamente para os modelos de Adam e Shove e Peleg. O modelo de Peleg apresentou valores de DR e % P de 0,016 e 11,59, respectivamente, a 20 °C. O modelo de Peleg apresentou também valores mais elevados de r² e valores baixos de DR e % P para as outras temperaturas (0,991; 0,037 e 13,13-30 °C, e 0,999; 0,015 e 12,57-40 °C, repectivamente).

Assim, os parâmetros do modelo Peleg podem ser recomendados para prever as isotermas de adsorção do JSAF. Este modelo matemático tem sido aplicado com sucesso em vários produtos alimentícios, como em folhas de oliva (BAHLOUL, BOUDRIOUA e KECHAOU, 2008), em casca e folhas de laranja (BEJAR, MIHOUBI e KECHAOU, 2012), entre outros.

Os valores do conteúdo de umidade da monocamada (X_m), referente ao modelo de GAB, nas temperaturas estudadas (Tabela 8), encontram-se dentro do valor determinado para alimentos de acordo com Labuza e colaboradores (1985), que indicam valor máximo para X_m de 10 % (b.s.).

Tabela 8. Parâmetros estimados e critérios de ajuste dos modelos aplicados aos dados experimentais para as isotermas de adsorção do JSAF (continua).

Modelo	Temperatura		
	20 °C	30 °C	40 °C
Gab	$X = \frac{X_m \cdot C \cdot k \cdot a_w}{(1 - k \cdot a_w)(1 - k \cdot a_w + C \cdot k \cdot a_w)}$		
X_m	0,025	0,037	0,032
C	1034821	1034789	1034821
K	1,065	1,028	1,068
P (%)	23,46	19,722	10,066
DR	0,042	0,017	0,010
r^2	0,984	0,994	0,999
Oswin	$X = a \left(\frac{a_w}{1 - a_w} \right)^b$		
A	0,015	0,064	0,030
B	1,684	0,920	1,476
P (%)	58,05	28,654	43,813
DR	0,068	0,029	0,037
r^2	0,944	0,978	0,982
Henderson	$X = \left(\frac{-\ln(1 - a_w)}{b} \right)^{\frac{1}{a}}$		
A	0,241	0,491	0,297
B	2,585	3,314	2,500
P (%)	62,69	43,028	51,680
DR	0,075	0,042	0,045
r^2	0,931	0,954	0,974
Peleg	$X = k_1 \cdot a_w^{n_1} + k_2 \cdot a_w^{n_2}$		
K_1	0,203	0,489	0,143
n_1	0,954	6,724	0,784
K_2	21,222	0,489	3,633
n_2	37,757	6,724	16,502
P (%)	11,58	13,126	12,573
DR	0,016	0,037	0,015
r^2	0,998	0,991	0,999
Halsey	$X = \left(-\frac{A}{\ln(a_w)} \right)^{\frac{1}{B}}$		
A	0,080	0,052	0,089
B	0,570	0,969	0,630
P (%)	53,75	15,326	36,418
DR	0,064	0,022	0,032
r^2	0,950	0,988	0,987

Tabela 8. Continuação.

Modelo	Temperatura		
	20 °C	30 °C	40 °C
Adam e Shove	$X = A + B \cdot a_w + C \cdot a_w^2 + D \cdot a_w^3$		
A	-0,233	-0,089	-0,128
B	3,674	1,875	2,894
C	-10,703	-5,602	-9,358
D	8,492	4,684	7,943
P (%)	39,94	10,838	36,836
DR	0,139	0,033	0,080
r ²	0,883	0,986	0,960
Caurie	$X = \exp(A + B \cdot a_w)$		
A	-15,227	-7,310	-11,037
B	16,399	7,295	11,935
P (%)	65,37	46,282	54,968
DR	0,082	0,048	0,050
r ²	0,918	0,940	0,969
Iglesias e Chirife	$X = A + B \cdot \left(\frac{a_w}{1 - a_w}\right)$		
A	0,002	0,025	-0,011
B	0,064	0,050	0,077
P (%)	43,564	15,280	47,059
DR	0,092	0,021	0,065
r ²	0,896	0,989	0,946

Observou-se que as isotermas de adsorção apresentaram crescimento lento entre os valores de atividade da água (a_w) de 0,01 a 0,75; após esse valor houve um grande aumento em todas as temperaturas. Resultados semelhantes foram observados por Righetto e Neto (2005), Gabas e colaboradores (2007) e Santos e colaboradores (2014). As curvas obtidas apresentaram formato do tipo III (forma de J) (Figuras 6, 7 e 8), comportamento característico da maioria dos alimentos com alto teor de açúcar, conforme Hérbard e colaboradores (2003), como *Piper nigrum* L. (YOGENDRARAJAH et al., 2015), maçã (SAID, BELLAGHA e ALLAF, 2015), goiaba em pó (SANTOS et al., 2014), coentro desidratado (SILVA et al., 2010), etc. Na última região da curva, a água exerce uma forte influência sobre a estabilidade do produto seco, uma vez que, estando na forma de moléculas livres, pode dissolver componentes, resultando numa aceleração de reações indesejáveis (SANTOS et al., 2014). Na Figura 9 estão apresentadas as isotermas de adsorção obtidas para o Jambu (*A. oleracea* L.) seco com circulação de ar frio à 20 °C, 30 °C e 40 °C.

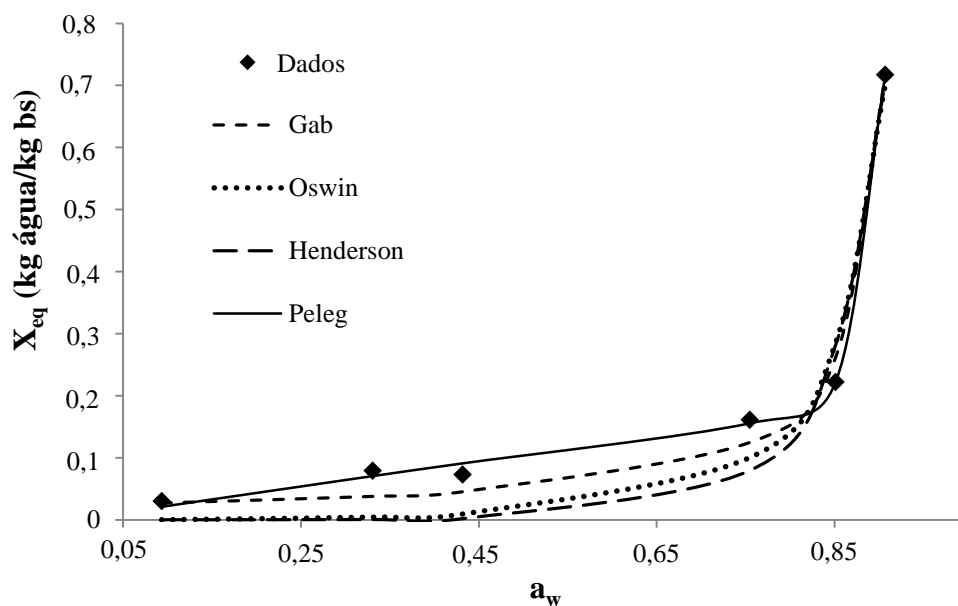


Figura 6. Isotermas de adsorção dos modelos matemáticos a 20 °C obtidos para o Jambu (*A. oleracea* L.) seco com circulação de ar frio.

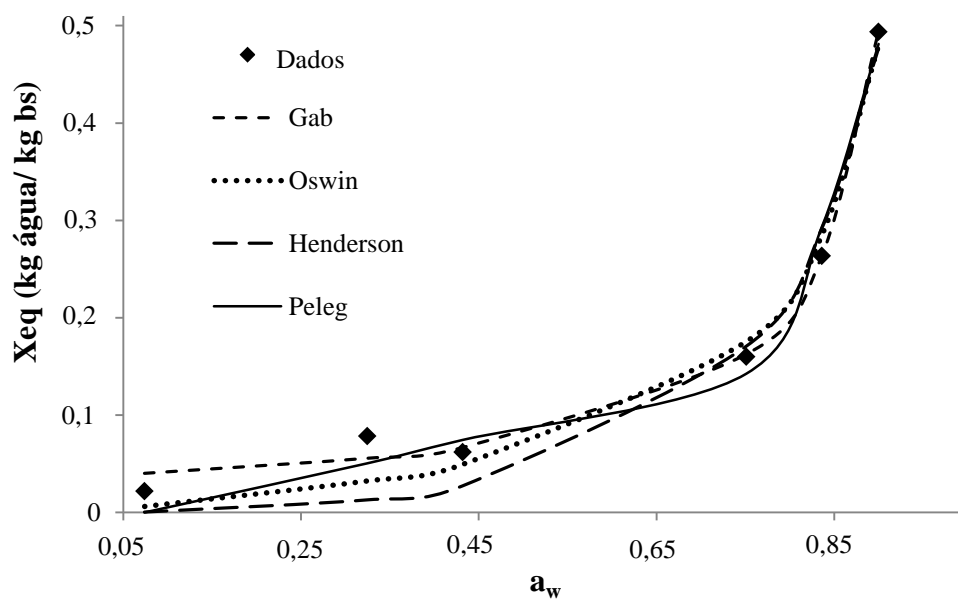


Figura 7. Isotermas de adsorção dos modelos matemáticos a 30 °C obtidos para o Jambu (*A. oleracea* L.) seco com circulação de ar frio.

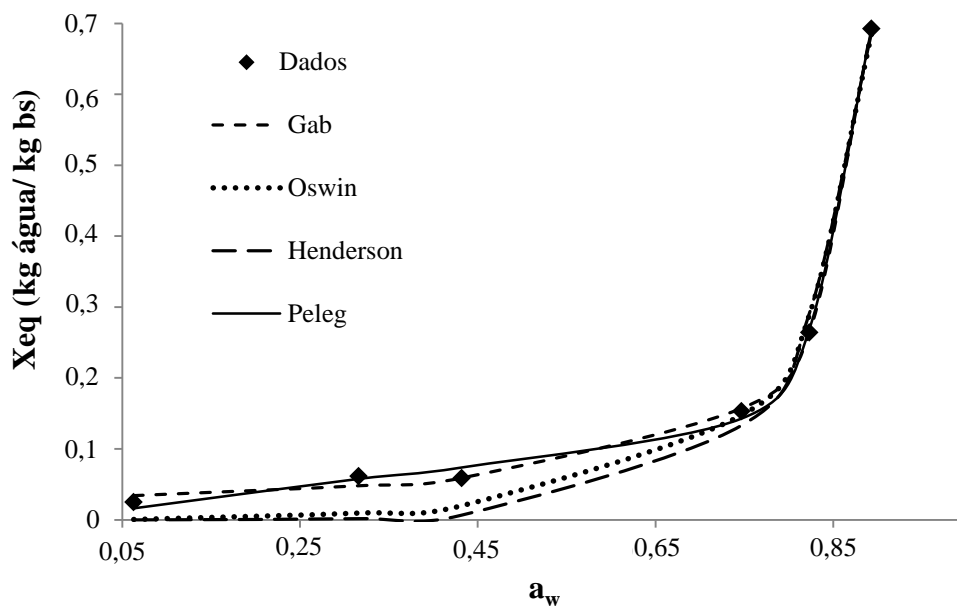


Figura 8. Isotermas de adsorção dos modelos matemáticos a 40 °C obtidos para o Jambu (*A. oleracea* L.) seco com circulação de ar frio.

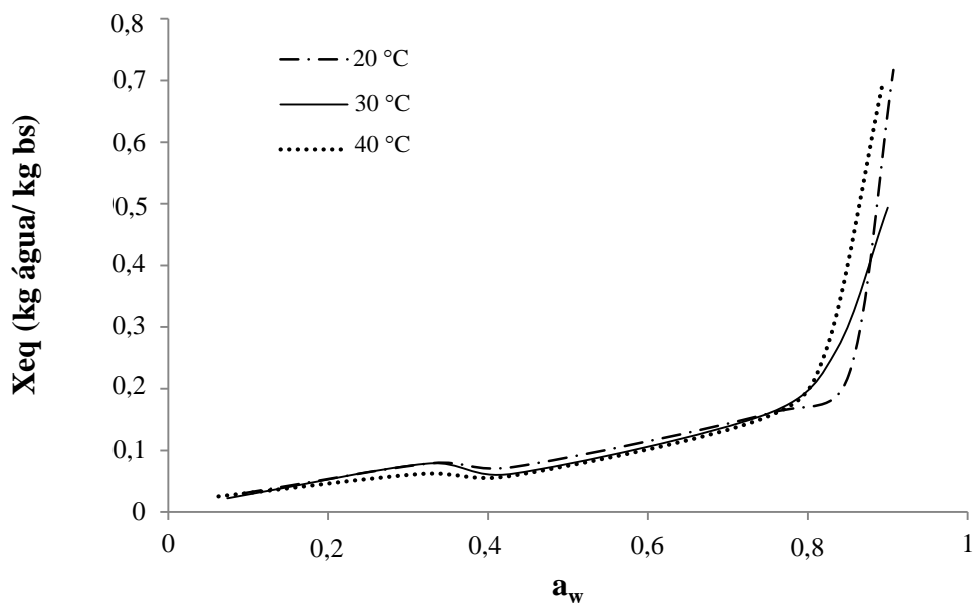


Figura 9. Isotermas de adsorção obtidas para o Jambu (*A. oleracea* L.) seco com circulação de ar frio à 20 °C, 30 °C e 40 °C.

As isotermas de adsorção do JSAF são muito importantes para o estudo do comportamento higroscópico, da composição físico-química e do desenvolvimento de novos produtos e de novas embalagens para essa hortaliça.

4 Conclusões

O Jambu submetido ao processo de secagem com ar frio apresentou melhor composição química, exceto quanto ao teor de minerais, e maior capacidade antioxidante em relação ao Jambu liofilizado. Assim, a secagem com circulação de ar frio para o Jambu pode ser utilizada, pois apresenta melhor composição química frente ao processo de liofilização, que é uma técnica de secagem importante por conservar o valor nutricional dos alimentos.

O modelo de Peleg teve um ajuste satisfatório na predição das isotermas do JSAF, com erro variando de 11,58 a 53,13 % e coeficiente de correlação variando de 0,926 a 0,999, nas temperaturas utilizadas.

5 Referências bibliográficas

AGUIAR, J. P. L.; YUYAMA, L. K. O.; SOUZA, F. das C. do A.; PESSOA, A. Biodisponibilidade do ferro do Jambu (*Spilanthes oleracea* L.): estudo em murinos. **Rev Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, p. 19-24, 2014.

ALABI, D. A.; ALAUSA, A. A. Evaluation of the mineral nutrients and organic food contents of the seeds of *Lablab purpureus*, *Leucaena leucocephala* and *Mucuna utilis* for domestic consumption and industrial utilization. **World J. Agr. Sci.**, v. 2, p. 115-118, 2006.

ALEXANDRE, H. V.; FIGUEIRÊDO, R. M. F. de; QUEIROZ, A. J. de M. Isotermas de adsorção de umidade da pitanga em pó. **Rev Biologia e Ciências da Terra**, v. 7, p. 11-20, 2007.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods of analysis**. 16th ed., Washington: AOAC, 1995. 200p.

AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. dos **BioEstat 5.0- Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Manaus: Sociedade Civil Mamirauá/MCT-CNPq, 2007.

BAHLOUL, N.; BOUDHRIOUA, N.; KECHAOU, N. Moisture desorption-adsorption isotherms and isosteric heats of sorption of Tunisian olive leaves (*Olea europaea* L.). **Ind. Crop. Prod.**, v. 28, p. 162-176, 2008.

BARBOSA, A. F.; MAIA, J. G. S.; FARIA, L. J. G.; GUSMÃO, S. A. L. de; SABAA-SRUR, A. U. O. Composição centesimal de Jambu (*Spilanthes oleracea* L.) *in natura* e seco. **Magistra**, v. 26, p. 1010-1013, 2014.

BEJAR, A. K.; MIHOUBI, N. B.; KECHAOU, N. Moisture sorption isotherms – Experimental and mathematical investigations of orange (*Citrus sinensis*) peel and leaves. **Food Chem.**, v. 132, p. 1728-1735, 2012.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Phys.**, v. 37, p. 911-917, 1959.

BORGES, L. da S.; GOTO, R.; LIMA, G. P. P. Exportação de nutrientes em plantas de jambu, sob diferentes adubações. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 34, p. 107-116, 2013.

BORGES, L. da S.; VIEIRA, M. A. R.; MARQUES, M. O. M.; VIANELLO, F.; LIMA, G. P. P. Influence of Organic and Mineral Soil Fertilization on Essential Oil of *Spilanthes oleracea* cv. Jambuarana. **Am. J. Plant Physio.**, v. 7, p. 135-142, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Aprova regulamento técnico sobre rotulagem nutricional de alimentos embalados, tornando obrigatória a rotulagem nutricional. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 26 de dezembro de 2003, Seção 1, p. 33, 2003.

BRISIBE, E. A.; UMOREN, U. E.; BRISIBE, F.; MAGALHÃES, P. M.; FERREIRA, J. F. S.; LUTHRIA, D.; WU, X.; PRIOR, R.L. Nutritional characterisation and antioxidant capacity of different tissues of *Artemisia annua* L. **Food Chem.**, v. 115, p. 1240-1246, 2009.

COSTA, S. S.; ARUMUGAM, D.; GARIEPY, Y.; ROCHA, S. C. S.; RAGHAVAN, V. Spilanthol extraction using microwave: calibration curve for gas chromatography. **Chem. Eng. Trans.**, v. 32, 2013.

DENG, G.; LINA, X.; XUB, X.; GAOA, L.; XIEA, J.; LIA, H. Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 vegetables. **J. Funct. Foods**, v. 5, p. 260-266, 2013.

DIAS, A. M. A.; SANTOS, P.; SEABRA, I. J.; CARVALHO JUNIOR, R. N. C.; BRAGA, M. E. M.; SOUSA, H. C. de Spilanthol from *Spilanthes acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction. **J. Supercrit. Fluids**, v. 61, p. 62-70, 2012.

FALLER, A. L. K.; FIALHO, E. Polyphenol availability in fruits and vegetables consumed in Brazil. **Rev. Saúde Pública**, v. 43, p. 1-8, 2009.

GABAS, A. L.; TELIS, V. R. N.; SOBRAL, P. J. A.; TELIS-ROMERO, J. Effect of maltodextrin and arabic gum in water vapor sorption thermodynamic properties of vacuum dried pineapple pulp powder. **J. Food Eng.**, v. 82, p. 246-252, 2007.

GREENSPAN, L. Humidity fixed points of binary saturated aqueous solutions. **J. Res. Nat. Bur. Stand.**, v. 81, p. 89-96, 1977.

HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acids methyl esters. **Lab. Pract.**, v. 22, p. 475-476, 1973.

HÉRBRARD, A.; OULAHNA, D.; GALET, L.; CUQ, B.; ABECASSIS, J.; FAGES, J. Hydration properties of durum wheat semolina: influence of particle size. **Powder Technol.**, v. 130, p. 211-218, 2003.

HOTTOT, A.; ANDRIEU, J.; VESSOT, S. Sublimation kinetics during freeze-drying of pharmaceutical protein formulation. **Dry. Technol.**, v. 25, p. 753-758, 2007.

INSTITUTE OF MEDICINE (IOM). **Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc**. National Academy Press, Washington, DC, 2001.

Joint WHO. **Protein and amino acid requirements in human nutrition**. World Health Organ technical report series, v. 935, p. 1-265, 2007.

KAROU, D.; DICKO, M. H.; SIMPORE, J.; TRAORE, A. S. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. **Afr. J. Biotechnol.**, v. 4, p. 823-828, 2005.

KAWAREE, R.; OKONOGLI, S.; CHOWWANAPHOONPOHN, S.; PHUTDHAWONG, W. Chemical composition and antioxidant evaluation of volatile oils from Thai medicinal plants. **Book Series: Acta Horticulturae**, v. 786, p. 209-215, 2008.

KIM, D-O.; LEE, K. W.; LEE, H. J.; LEE, C. Y. Vitamin C equivalent antioxidant capacity (vceac) of phenolic phytochemicals. **J. Agr. Food Chem.**, v. 50, p. 3713-3717, 2002.

LABUZA, T. P.; KAAANANE, A.; CHEN, J. Y. Effects of temperature on the moisture sorption isotherms and water activity shift of two dehydrated foods. **J. Food Sci.**, v. 50, p. 385-392, 1985.

MAIGA, A.; DIALLO, D.; BYE, R.; PAULSEN, B. S. Determination of Some Toxic and Essential Metal Ions in Medicinal and Edible Plants from Mali. **J. Agr. Food Chem.**, v. 53, p. 2316-2321, 2005.

MIRANDA, M.; VEGA-GÁLVEZ, A.; LÓPEZ, J.; PARADA, G.; SANDERS, M.; ARANDA, M.; URIBE, E.; DI SCALA, K. Impact of air-drying temperature on nutritional properties, total phenolic content and antioxidant capacity of quinoa seeds (*Chenopodium quinoa* Willd.). **Ind. Crop. Prod.**, v. 32, p. 258-263, 2010.

MONDAL, A. K.; PARUI S; MANDAL, S. Analysis of the free amino acid content in pollen of nine Asteraceae species of known allergenic activity. **Ann. Agr. Env. Med.**, v. 5, p. 17-20, 1998.

NANASOMBAT, S; TECKCHUEN, N. Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. **J. Med. Plants Res.**, v. 3, p. 443-449, 2009.

NOWAK, D.; PIECHUCKA, P.; WITROWA-RAJCHERT, D.; WIKTOR, A. Impact of material structure on the course of freezing and freeze-drying and on the properties of dried substance, as exemplified by celery. **J. Food Eng.**, v. 180, p. 22-28, 2016.

ONIVOGUI, G.; ZHANG, H.; MLYUK, E.; DIABY, M.; SONG, Y. Chemical composition, nutritional properties and antioxidant activity of monkey apple (*Anisophyllea laurina* R. Br. ex Sabine). **J. Food Nutr. Res.**, v. 2, p. 281-287, 2014.

PHRUTIVORAPONGKUL, A.; CHAIWON, A.; VEJABHIKUL, S. NETISINGHA, W.; CHANSAKAOW, S. An anesthetic alkamide and fixed oil from *Acmella oleracea*. **J. Health Res.**, v. 22, p. 97-99, 2008.

PRACHAYASITTIKUL, S.; SUPHAPONG, S.; WORACHARTCHEEWAN, A.; LAWUNG, R.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. **Molecules**, v. 14, p. 850-867, 2009.

PREETHA, T. S.; MOHAN, S. N.; NAJEENA, P. M.; DEEPTHI, S. R. Chemical fingerprinting of *Spilanthes acmella* L. (murr.) - an acutely threatened medicinal plant of pharmaceutical

importance by hptlc, ftir and uv-vis spectroscopic tools. **World J. Pharm. Pharm. Sci.**, v. 3, p. 1275-1287, 2014.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M. and RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Bio. Med.**, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

RIGHETTO, A. M.; NETTO, F. M. Effect of encapsulating materials on water sorption, glass transition and stability of juice from immature acerola. **Int. J. Food Properties**, v. 8, p. 337-346, 2005.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical ABTS•+**. Comunicado Técnico (Embrapa Agroindústria Tropical), 2007.

SAID, L. B. H.; BELLAGHA, S.; ALLAF, K. Measurements of texture, sorption isotherms and drying/rehydration kinetics of dehydrofrozen-textured apple. **J. Food Eng.**, v. 165, p. 22-33, 2015.

SANTOS, A. A. C. dos; FLORÊNCIO, A. K. G. D.; ROCHA, E. M. de F. F.; COSTA, J. M. C. da. Avaliação físico-química e comportamento higroscópico de goiaba em pó obtida por *spray-dryer*. **Rev. Ciência Agronômica**, v. 45, p. 508-514, 2014.

SANZ, P. D.; ELVIRA, C.; MARTINOB, M.; ZARITZKYB, N.; OTEROA, L.; CARRASCOA, J. A. Freezing rate simulation as an aid to reducing crystallization damage in foods. **Meat Sci.**, v. 52, p. 275-278, 1999.

SHUHAMA, I. K.; AGUIAR, M. L.; OLIVEIRA, W. P.; FREITAS, L. A. P. Experimental production of annatto powders in spouted bed dryer. **J. Food Eng.**, v. 59, p. 93-97, 2003.

SILVA, A. S.; ALMEIDA, F. de A. C.; ALVES, N. M. C.; MELO, K. dos S.; GOMES, J. P. Característica higroscópica e termodinâmica do coentro desidratado. **Rev. Ciência Agronômica**, v. 41, p. 237-244, 2010.

VEGA-GÁLVEZ, A.; DI SCALA, K.; RODRÍGUEZ, K.; LEMUS-MONDACA, R.; MIRANDA, M.; LÓPEZ, J.; PÉREZ-WON, M. Effects of air-drying temperature on physicochemical properties, antioxidant capacity and total phenolic content of red pepper (*Capsicum annum*, L. var. Hungarian). **Food Chem.**, v. 117, p. 647-653, 2009.

VILLACHICA, H.; CARVALHO, J. E. U.; MULLER, C. H.; DIAZ, S. C.; ALMANZA, M. **Frutales y hortalizas promissórios de la Amazônia**. Lima: TCA; Secretaria Protempore, 1996. 110p.

VINSON, J. A.; SU, X.; ZUBIK, L.; BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **J. Agr. Food Chem.**, v. 49, p. 5315-5321, 2001.

WONGSAWATKUL, O.; PRACHAYASITTIKUL, S.; ISARANKURA-NA-AYUDHYA, C.; SATAYAVIVAD, J.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. Vasorelaxant and antioxidant activities of *Spilanthes acmella* Murr. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 9, p. 2724-2744, 2008.

WU, L. C.; FAN, N. C.; LIN, M. H.; CHU, I. R.; HUANG, S. J.; HU, C. Y.; HAN, S. Y. Antiinflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. **J. Agr. Food Chem.**, v. 56, p. 2341-2349, 2008.

YOGENDRARAJAH, P.; SAMAPUNDO, S; DEVLIEGHIERE, F.; DE SAEGER, S.; DE MEULENAER, B. Moisture sorption isotherms and thermodynamic properties of whole black peppercorns (*Piper nigrum* L.). **LWT - Food Sci. Technol.**, v. 64, p. 177-188, 2015.

CAPÍTULO III.

AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE ESPILANTOL EXTRAÍDO COM CO₂ SUPERCRÍTICO EM DIFERENTES TEMPOS DE ARMAZENAMENTO DE *Acmella oleracea* L.

Artigo publicado no Journal of Food Process Engineering

BARBOSA, A. F.; PEREIRA, C. de S. S.; MENDES, M. F.; JUNIOR, R. N. de C.; CARVALHO, M. G. de; MAIA, J. G. S.; SABAA-SRUR, A. U. O. Spilanthol content in the extract obtained by supercritical CO₂ at different storage times of *Acmella oleracea* L. **Journal of Food Process Engineering**. doi:10.1111/jfpe.12441

Alan Franco Barbosa^{1*}, Cristiane de Souza Siqueira Pereira², Marisa Fernandes Mendes³, Raul Nunes de Carvalho Junior⁴, Mário Geraldo de Carvalho⁵, José Guilherme Soares Maia⁶ e Armando Ubirajara Oliveira Sabaa-Srur^{1,7†}

¹Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, km 7 23897-000, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

²Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Athos da Silveira Ramos 149, Ilha do Fundão 21941-902, Rio de Janeiro, Brasil.

³Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, km 7 23897-000, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil.

⁴Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Pará, Rua Augusto Corrêa S/N, Guamá 66075-900, Belém, Pará, Brasil.

⁵Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR 465, km 7 23897-000, Seropédica, Rio de Janeiro, Brasil

⁶Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais da Amazônia, Universidade Federal do Oeste do Pará, Rua Vera Paz, s/n, Salé 68035-110, Santarém, Pará, Brasil.

^{1,7}Departamento de Nutrição Básica e Experimental, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho 373, Ilha do Fundão 21941-902, Rio de Janeiro, Brasil.

RESUMO

Avaliou-se o efeito do tempo de armazenamento no conteúdo de espilantol do extrato de Jambu obtido por CO₂ supercrítico. Jambu liofilizado e parcialmente desidratado com circulação de ar frio foi armazenado numa estufa a 40 °C durante 195 dias. Após diferentes períodos de armazenamento (0, 21, 41, 89 e 195 dias), as amostras foram submetidas à extração com fluido supercrítico nas mesmas condições operacionais de 300 bar e 40 °C. Os extratos obtidos foram analisados por RMN e CG-EM. O extrato de Jambu liofilizado e em diferentes tempos de armazenamento apresentaram o respectivo conteúdo espilantol, % (dias de armazenamento): 1,07 (liofilizado); 0,68 (0); 0,41 (21); 0,31 (41); 0,41 (89); e 0,42 (195). Estas determinações permitiram identificar a presença do espilantol como o metabólito principal nos extratos, independentemente do tempo de armazenamento. Apesar de ter reduzido o conteúdo de espilantol, esses resultados revelam a viabilidade de comercialização desse produto em função da sua composição química.

Palavras-chave: Hortaliças, Espilantol, Extração com Fluido Supercrítico, Rendimento Global.

ABSTRACT

The effect of the storage time on spilanthol content in the extract from Jambu obtained by supercritical CO₂ was evaluated in respect of their chemical properties. Lyophilized Jambu and partially dehydrated with cold air circulation stored in an oven at 40 °C for 195 days. After different storage times (0, 21, 41, 89 and 195 days), the samples were submitted to supercritical

fluid extraction at the same operational condition of 300 bar and 40 °C. The extracts were analyzed by ¹H and ¹³C NMR and GC-MS. The extract from lyophilized Jambu with different storage times provided the respective spilanthol content, % (storage days): 1.07 (lyophilized); 0.68 (0); 0.41 (21); 0.31 (41); 0.41 (89); and 0.42 (195). These determinations allowed to identify the presence of spilanthol as the major metabolite in the extracts, regardless of storage time. Although it has reduced the content of epilantol, these results reveal the viability of the market of this product in chemical composition.

Key words: Vegetables, Spilanthol, Supercritical Fluid Extraction, Global Yield.

1 Introdução

Popularmente conhecida como Jambu, *Acmella oleracea* L. é uma planta nativa da Amazônia, muitas vezes usada como condimento na culinária do norte do Brasil, além de ter aplicação na medicina popular para o tratamento de estomatite, resfriados e como analgésico (NASCIMENTO et al., 2013). A planta tem propriedades químicas importantes de interesse da indústria farmacêutica, especialmente pela presença do metabólito considerado mais importante, o epilantol (BORGES et al., 2012).

O epilantol é um representante importante das *N*-alquilamidas que tem aumentado o interesse biomédico nas últimas duas décadas (BOONEN et al., 2012). Este grupo de moléculas bioativas atua na proteção de plantas e produtos biocidas, alimentos funcionais, cosméticos e fármacos (VERYSER et al., 2014).

O epilantol está presente em diversas espécies do gênero *Acmella* e da família Asteraceae (Compositae), como *Acmella oleracea* L. e também é conhecido como afinina. O epilantol pode ser encontrado também em *A. ciliate*, *A. oppositifolia*, *A. radicans*, *A. brachyglottis*, *A. paniculata*, *A. uliginosa*, *Welelia parviceps* e *Heliopsis longipes* (CHUNG et al., 2008; PRACHAYASITTUKAL et al., 2013). Esta amida foi obtida a partir de *A. oleracea* em 1957 (JACOBSON, 1957) e depois sintetizada em 1984 por Ikeda e colaboradores (1984). Existem diferenças entre as espécies, métodos e solventes utilizados na extração, além do solo, clima e fase de crescimento que podem influenciar a concentração desta amida em espécies *Acmella*.

Comercialmente, 5 mg de epilantol custa cerca de R\$ 800,00 (2014, Chromadex, Alemanha). O epilantol foi descrito como um óleo viscoso e de cor amarelo claro (JACOBSON, 1957). Costa e colaboradores (2013) melhoraram a extração do epilantol usando micro-ondas com etanol e hexano (3:7) como solventes. Este óleo essencial foi extraído a 50 °C durante 30 min e analisado por cromatografia gasosa, para confirmar a presença do epilantol. Os resultados mostraram ser um método rápido de extração com alto coeficiente de determinação de 99,8 %.

Dias e colaboradores (2012) estudaram os extratos a partir de folhas, hastes e flores de Jambu, obtidos por CO₂ supercrítico, seguida por outra extração com etanol, água e misturas como co-solventes. Os resultados mostraram que as flores apresentam maior teor de epilantol, o que justifica a maior capacidade antioxidante, bem como maior atividade anti-inflamatória. O rendimento do epilantol em extratos de flores neste estudo foi de 65,4 %, seguido por 47,3 % nas hastes e 19,7 % nas folhas. Relataram ainda que a extração com CO₂ supercrítico apresenta seletividade para extração de epilantol, especialmente no caso de flores. Esta é uma das vantagens do processo em questão, que geralmente usa o dióxido de carbono como solvente, além de não ser tóxico, de baixo custo e tem elevada volatilidade, proporcionando um extrato isento de solvente orgânico.

Entre as atividades do epilantol, pode-se mencionar atividade acaricida (CASTRO et al., 2014; CRUZ et al., 2016), utilizado para as doenças de pele tais como eczema (BOONEN

et al., 2010b), efeito anti-rugas (DEMARNE e PASSARO, 2005), analgésico (RIOS et al., 2007), anti-malária (SPELMAN et al., 2011), fungioestático e bacterioestático (MOLINA-TORRES et al., 2004), atividade contra o *Aedes aegypti* (RAMSEWAK, ERIKSON e NAIR, 1999), diurético (RATNASOORIYA et al., 2004; GERBINO et al., 2016), anti-séptico, estimulação imunológica (ROJAS et al., 2006), induz a secreção de saliva (SHARMA et al., 2011), atividade insecticida (KADIR et al., 1989; MORENO et al., 2012; SHARMA et al., 2012).

Mais detalhes sobre a ocorrência, extração, química e atividades biológicas do espilantol foram descritos por Barbosa et al. (2016).

Como o espilantol é a principal substância presente no Jambu, e esta hortaliça é comestível, torna-se fundamental avaliar o conteúdo dessa amida em função do tempo e condições de armazenamento do produto, pois fatores como temperatura e tempo de armazenamento, bem como embalagem utilizada podem interferir na presença de substâncias nos alimentos. A presença do espilantol mesmo em condições extremas de armazenamento indicaria a viabilidade de comercialização do Jambu quanto aos aspectos químicos, pois seu principal metabólito especial estaria presente. Dessa forma, diante das atividades biológicas e contribuições para os alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos, justifica-se avaliar o efeito do tempo de armazenamento do Jambu no conteúdo de espilantol usando CO₂ supercrítico como solvente, no sentido de demonstrar a manutenção dessa amida.

2 Material e métodos

2.1 Jambu

O Jambu (*Acmella oleracea* L.) foi coletado em Igarapé-Açu (estado do Pará), nas seguintes coordenadas: 01° 07' 33" S e 47° 37' 27" O (OLIVEIRA et al., 2011). Um exemplar da espécie (MG205534) foi depositado no Museu Paraense Emílio Goeldi, em Belém, Brasil. As inflorescências, folhas e hastes foram secas e trituradas. Foi utilizado um mini processador (Black & Decker, modelo HC31T, Brasil) para moer o Jambu. A distribuição do tamanho de partícula foi analisada usando uma série de peneiras (8-65 mesh), sob agitação mecânica (Bertel, modelo VP-01, Brasil). O diâmetro médio da partícula foi calculado com base no diâmetro médio de Sauter (MASSARANI, 1984).

2.2 Processo de secagem

Para a secagem do Jambu, inicialmente, a hortaliça foi lavada com água corrente a fim de remover resíduos do solo. Em seguida, as raízes foram removidas com facas inoxidáveis, eliminando partes do Jambu amassadas e com bordas escurecidas. A matéria-prima foi sanitizada por imersão durante 10 minutos numa solução de 200 ppm (mg.L⁻¹) de cloro residual livre, derivado do hipoclorito de sódio com 10 % de pureza. A última lavagem foi realizada com a imersão de uma solução de 5 ppm (mg.L⁻¹) de cloro residual livre durante 10 minutos com drenagem subsequente da água.

O processo de secagem a frio foi realizado em sala climatizada com ar condicionado (Midea, modelo MS2E-18CR, Brasil) à 25 °C e utilizando um desumidificador (Arsec, modelo 160, Brasil), numa sala de 4 m² que permaneceu fechada durante o processo de secagem. O ar frio secou o Jambu até 10,07 % de umidade (Tabela 1).

O Jambu *in natura* foi previamente liofilizado antes da extração com CO₂ supercrítico. A liofilização foi realizada no liofilizador Alpha 1-4/LDC-1 M (Christ, Osterode, Alemanha). O Jambu *in natura* foi liofilizado durante 72 horas a -51 °C e 0,011 mbar.

2.3 Armazenamento do Jambu

O monitoramento do conteúdo de espilantol foi realizado utilizando 25 g de Jambu seco (inflorescência, folhas e hastes) embalado em sacos de polietileno de baixa densidade e folha de alumínio. As amostras foram armazenadas numa estufa a 40 °C durante 0, 41, 61, 89 e 195 dias. Para cada tempo, determinou-se a umidade de acordo com o método da Association of Official Analytical Chemist 934,06 (AOAC, 1997). Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados obtidos foram expressos como média e desvio padrão (\pm DP). Para comparar a média foi utilizado o teste de Tukey ao nível de 5 % de significância ($p > 0,05$), usando o *software* BioStat 5.0 (AYRES et al., 2007). O teor de espilantol foi quantificado através do CG-EM e confirmado sua presença por RMN. As amostras foram armazenadas a 40 °C, temperatura de armazenamento acima da temperatura usual de armazenamento de alimentos, para simular condições extremas de armazenamento do produto.

2.4 Procedimento experimental para EFS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Termodinâmica Aplicada e Biocombustíveis (UFRRJ, Seropédica, Brasil) de acordo com a metodologia descrita por Dias e colaboradores (2012). A coluna de extração do extrator tem capacidade de $4,2 \times 10^{-5} \text{ m}^3$. O solvente utilizado foi o dióxido de carbono (99,9 % de pureza mínima, White Martins LTDA, Rio de Janeiro, Brasil). Os experimentos não foram replicados devido a frequência da extração do material. Os rendimentos dos extratos foram obtidos a partir do Jambu liofilizado e seco com ar frio. Inicialmente, o extrator foi preenchido com, aproximadamente, 0,005 kg de Jambu. As condições experimentais utilizadas foram: temperatura de 40 °C, pressão de 300 bar e a taxa de fluxo de solvente utilizada foi de $2,73 \times 10^{-4} \text{ kg/s}$. As amostras foram coletadas em dezenove intervalos de 10 minutos. A Figura 1 apresenta a ideia da extração do espilantol a partir do Jambu e a Figura 2 ilustra o equipamento utilizado para a extração com CO_2 supercrítico.

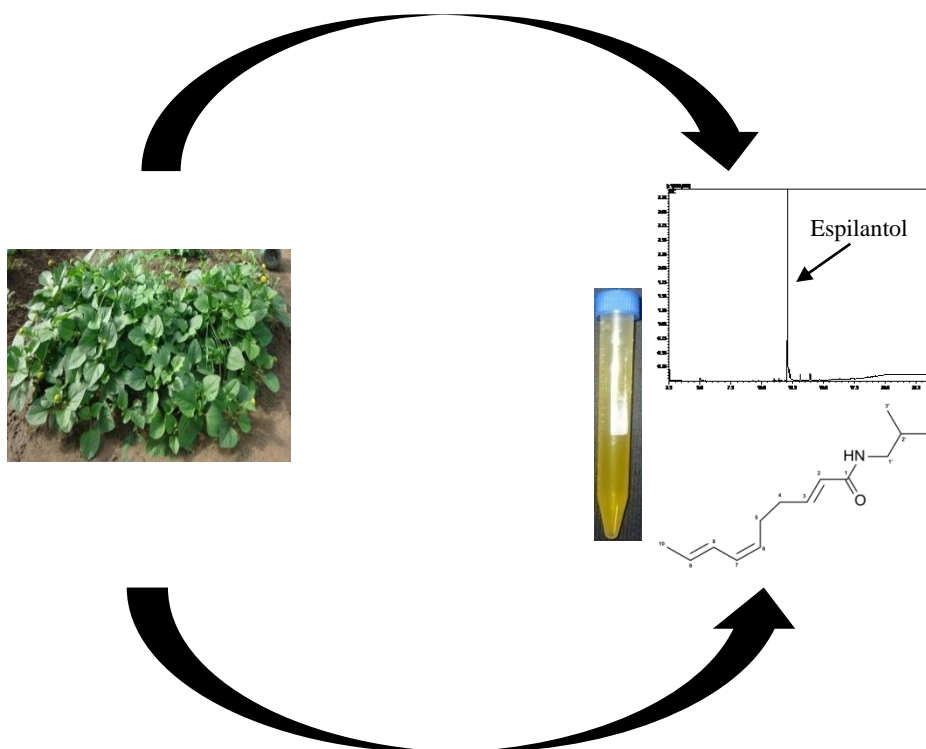


Figura 1. Extração de espilantol a partir do Jambu.



Figura 2. Equipamentos utilizados para extração com CO₂ supercrítico.

2.5 Análises químicas

O material foi analisado por Cromatografia a Gás acoplada a um Espectrômetro de Massa - CG/EM (Shimadzu, modelo QP-2010, Japão) e pela interpretação dos espectros de RMN ¹H e ¹³C (Bruker, modelo advance III, EUA). Utilizou-se diclorometano (99,9 %, grau CLAE, Sigma-Aldrich Inc., EUA) como solvente nas análises de CG/EM e para as análises com RMN utilizou-se clorofórmio deuterado (99 %, Sigma-Aldrich Inc., EUA). O CG/EM foi equipado com coluna capilar de sílica fundida VF-5ms (5 % fenil 95 % metilpolisiloxano, 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm espessura da película), Varian, utilizando hélio como gás de transporte a 1 mL/min. A temperatura inicial do forno foi de 100 °C, que depois de ser mantida constante durante 40 minutos foi aumentada a uma taxa de 10 °C.min⁻¹ até 290 °C, com isotérmica final de 300 °C em 20 min.

O volume de injeção da amostra foi de 1 mL (1:50 modo split). As temperaturas do injetor e detector foram 300 °C. Os espectros de massa foram obtidos numa gama de *m/z* 10-300, pela técnica de impacto de elétrons a 70 eV. A análise quantitativa da composição química das amostras foi realizada num cromatógrafo a gás HP 5890 série II com detector de ionização de chama (DIC).

A porcentagem de cada componente foi calculada pela área integral sob os respectivos picos em relação à área total de todos os constituintes da amostra. Os componentes identificados foram confirmados pela análise dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio e carbono (RMN ¹H e ¹³C).

3 Resultados e discussão

3.1 Jambu

O diâmetro médio das amostras variou de 0,47-0,66 mm. A Tabela 1 apresenta os valores de umidade do Jambu seco em cada extração com CO₂ supercrítico.

Durante o armazenamento do Jambu, foi observada a diminuição da umidade. Houve diferença significativa ao nível de 5 % de significância pelo teste de Tukey, e o teor de umidade em todas as extrações teve conteúdo diferente, exceto nas extrações 2 e 4 (Tabela 1). Todas as amostras foram armazenadas a 40 °C, a uma temperatura mais elevada do que a temperatura de armazenamento de alimentos e, por conseguinte, esse comportamento era esperado conforme a Tabela 1. Além disso, a embalagem é permeável ao oxigênio e apresenta baixa barreira ao vapor de água, o que permite a perda de umidade.

3.2 Rendimento global da EFS

De acordo com Dias e colaboradores (2012), com base em estudos publicados (STASHENKO et al., 1996; SUN et al., 2002), as altas temperaturas e baixas pressões são essenciais para a obtenção de alto teor de espilantol nos extratos. Alguns estudos indicam ainda que o aumento da densidade do solvente não envolve no aumento do conteúdo de espilantol. Devido as condições operacionais já estudadas por outros autores (340-355 bar, 45-60 °C) e também citadas por Dias e colaboradores (2012), foi escolhida a pressão de 300 bar e temperatura de 40 °C, a fim de ter uma comparação padrão com a literatura, embora os objetivos sejam diferentes.

A primeira extração do Jambu seco e liofilizado tiveram rendimentos mais elevados (Tabela 1), provavelmente devido à maior concentração de matéria graxa. Como o aumento do tempo de armazenamento, a matéria graxa diminui, provavelmente devido à oxidação desses nutrientes, aumentando a concentração do espilantol no extrato. No entanto, o espilantol pode ter funcionado como um antioxidante (ABEYSIRI et al., 2013), para estabilizar os radicais livres originados pelo processo de oxidação de lípidos, o que diminuiu o conteúdo dessa amida nas amostras.

A perda desses nutrientes pode ser justificada pela alta temperatura de armazenamento utilizada, acima da temperatura normal de armazenamento de alimentos. Além disso, foi utilizada embalagem permeável ao oxigênio, não impedindo a oxidação, no entanto as amostras não sofreram foto-oxidação, uma vez que as embalagens foram cobertas com folha de alumínio. Além disso, os lípidos são substâncias altamente instáveis e, por causa da alta temperatura, eles são submetidos a mudanças drásticas das suas características sensoriais, valor nutricional e funcional (GUERRA e LAJOLO, 2005). Os rendimentos após diferentes tempos de armazenamento estão apresentados na Tabela 1. A Figura 3 apresenta a curva de extração (massa acumulada em função do tempo de extração), obtida para o extrato de Jambu seco, que apresentou o maior teor de espilantol durante o armazenamento do produto.

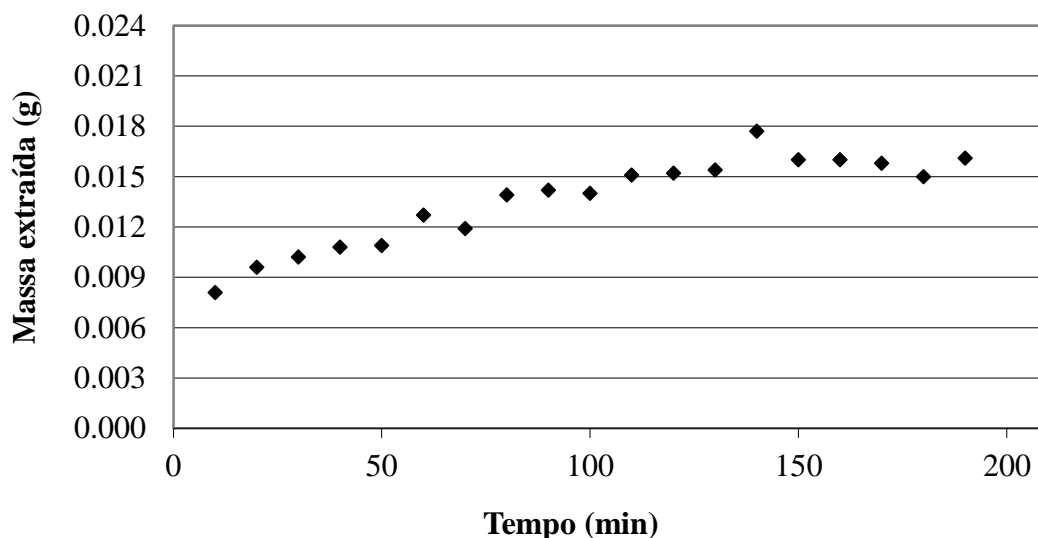


Figura 3. Curva experimental de extração do Jambu obtido a 300 bar e 40 °C, que teve o maior teor de espilantol (5ª extração).

3.3 Análises químicas

A Tabela 1 apresenta a área relativa (%) e os rendimentos do espilantol das amostras avaliadas. O espilantol é o maior metabólito em todas as extrações, o que demonstra a importância desta substância ativa. É importante notar a presença de outra amida, *N*-(2-metilbutil)-(2*E*, 6*Z*, 8*E*)-decatrienamida, que tem estrutura química semelhante ao espilantol. Esta substância, também conhecida como homoespilantol, é a segunda *N*-alquilamida mais abundante em extrato etanólico de *Spilanthes* (9,04 % da quantidade total de *N*-alquilamidas) (BOONEN et al. 2010a,b).

Comparando o conteúdo do espilantol do Jambu liofilizado e seco após 195 dias de armazenamento (Tabela 1), pode-se observar que o espilantol está ainda presente na amostra seca com 39 %. Os cromatogramas da análise de CG/EM apresentaram picos com tempos de retenção (t_R , em minutos) 12,169, 12,225 e 12,158 para o extrato de Jambu liofilizado e primeira e quinta extração, respectivamente (Figura 4). No cromatograma de número 2, Figura 4 (b), pode-se observar o pico principal do extrato de Jambu seco (primeira extração). Além do espilantol há presença de outros bioativos, tais como esqualeno, normalmente presentes em óleos de peixe e outros metabólitos especiais presentes em plantas, tais como acetato de lupelila (0,05 %) e óxido de cariofileno (0,01 %).

Tabela 1. Rendimentos dos extratos de Jambu (*A. oleracea* L.) e teor de espilantol e umidade para a extração do Jambu seco com CO₂ supercrítico.

	Umidade (%)	Rendimentos globais (% b.s.)	Área relativa % do espilantol	Rendimentos do espilantol (% b.s.)
Jambu Liofilizado	-	1,41	76,21	1,07
Jambu Seco - (0 dia)	10,07 ± 0,03 ^a	1,61	42,14	0,68
“ - (21 dias)	6,11 ± 0,27 ^b	0,41	100	0,41
“ - (41 dias)	16,88 ± 0,36 ^c	0,31	100	0,31
“ - (89 dias)	5,44 ± 0,11 ^b	0,41	100	0,41
“ - (195 dias)	2,07 ± 0,68 ^d	0,88	47,98	0,42

Letras diferentes entre colunas indicam diferença estatística significativa (p <0,05).

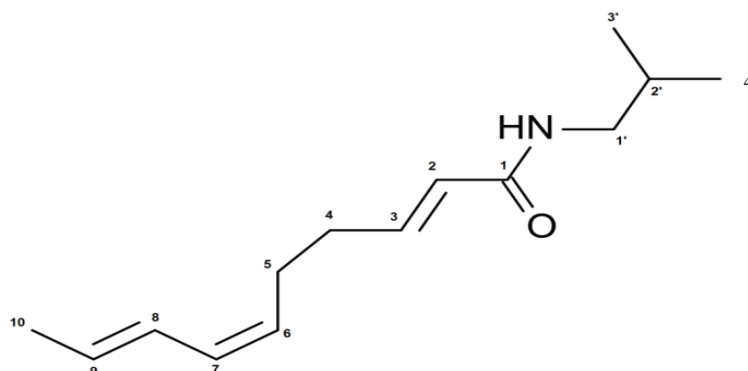
Após 195 dias de armazenamento, o espilantol ainda estava presente com cerca de 63 % no Jambu. O espilantol permaneceu no produto por causa da sua estabilidade química (estrutura química), de alto peso molecular (221 g/mol) e elevado ponto de ebulição (165 °C) (JACOBSON, 1957). A 2^o, 3^o e 4^o extração com CO₂ supercrítico de Jambu seco apresentou 100 % de espilantol na análise de CG/EM, apresentando 87 %, 88 % e 87 % de similaridade com a biblioteca, respectivamente.

O principal componente presente no extrato foi identificado pelo pico 12,09 minutos (segunda, terceira e quarta extração) no cromatograma de CG, Figura 4 (c), que apresentou o espectro de massa (Figura 5) com valores de picos [*m/z* (íon, %)]: 221 (M⁺, 2), 141 (M-C₆H₈, 50), 126 ([C₇H₁₂NO]⁺, 40), 98 ([C₅H₈NO]⁺, 35), 81(C₆H₉⁺, 100)], que estão em conformidade com a estrutura do espilantol (Figura 6).

A estrutura do espilantol foi confirmada pela análise dos espectros de RMN ¹H e RMN ¹³C, (Tabela 2), comparando-se com dados da literatura (NAKATANI e NAGASHIMA, 1992), referentes ao espilantol.

Tabela 2. Dados de RMN do espilantol (1), em CDCl₃, δ , j em Hz, comparados com a literatura.

Espilantol (1)			(Nakatani e Nagashima, 1992)	
C	δ_c	δ_H (mult., J)	δ_c	δ_H
1	166,21	-	166,0	-
CH				
2	123,92	5,80 (d,15)	124,20	5,79 br (d, 15)
3	143,80	6,83 (dt, 15, 6,5)	143,50	6,83 (dt, 15)
6	127,58	5,26 (m, 7,2)	127,70	5,26 (dt, 11)
7	129,39	5,97 (t, 11)	129,50	5,97 (dd, 11)
8	126,62	6,29 (tbr, 11)	126,70	6,29 br (dd, 15)
9	129,95	5,71 (dq, 15,0, 7,0)	130,00	5,70 (dq, 15)
2'	28,55	1,78 (m)	28,60	-
CH₂				
4	32,11	2,30 (m)	32,10	2,23-2,35 m
5	26,33	2,27 (m)	26,40	2,23-2,35 m
1'	47,29	3,15 (dd, 6,7)	46,90	3,15 (dd)
CH₃				
10	18,33	1,77 (d, 7,0)	18,30	1,78 (d)
3' e 4'	20,07	0,93 (d, 6,0)	20,10	1,78 (m)
NH	-	5,49 (s)	-	5,47 (s)



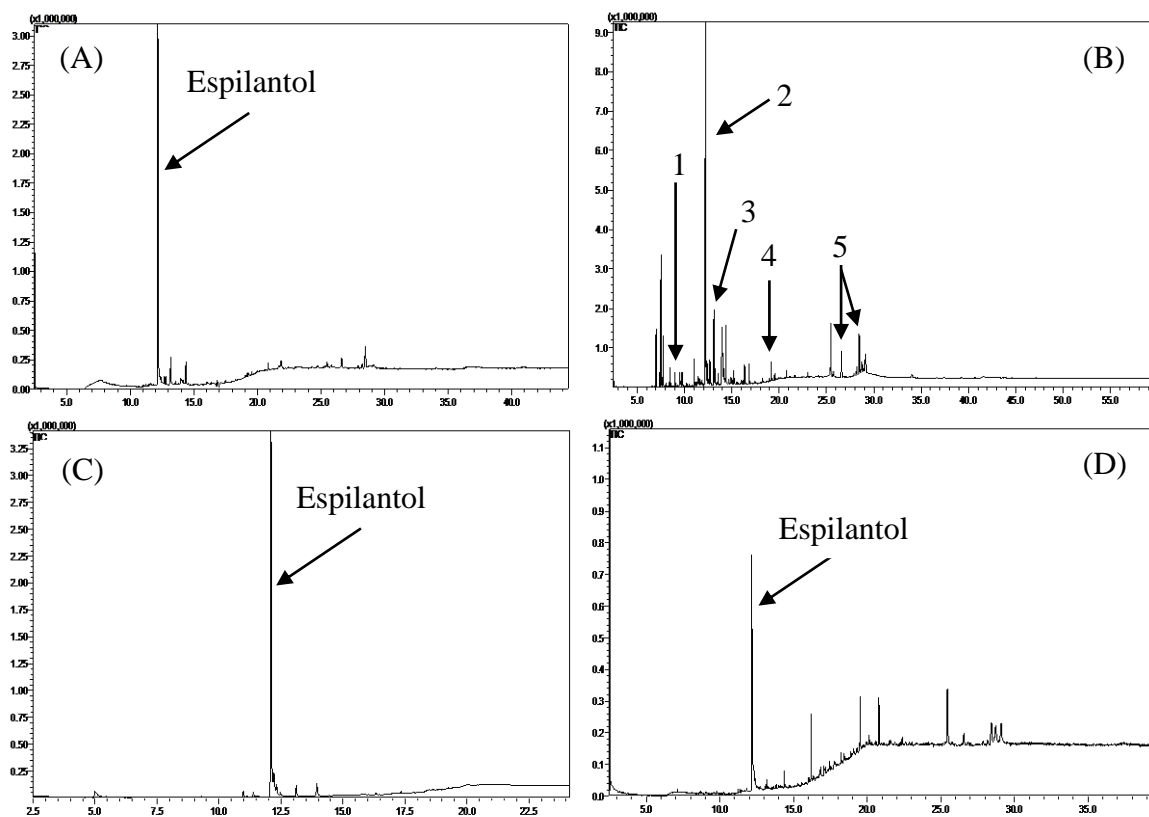


Figura 4. Cromatograma de CG/EM do extrato de Jambu liofilizado (A), 1^a (B), 2^a, 3^a, 4^a (C) e 5^a (D) extração do Jambu obtido por CO₂ supercrítico.
 1- Óxido de Carfileno; 2- Espilantol; 3- *N*-(2-metilbutil)-(2*E*,6*Z*,8*E*)-decatrienamida;
 4- Esqualeno; 5- Acetato de Lupelila

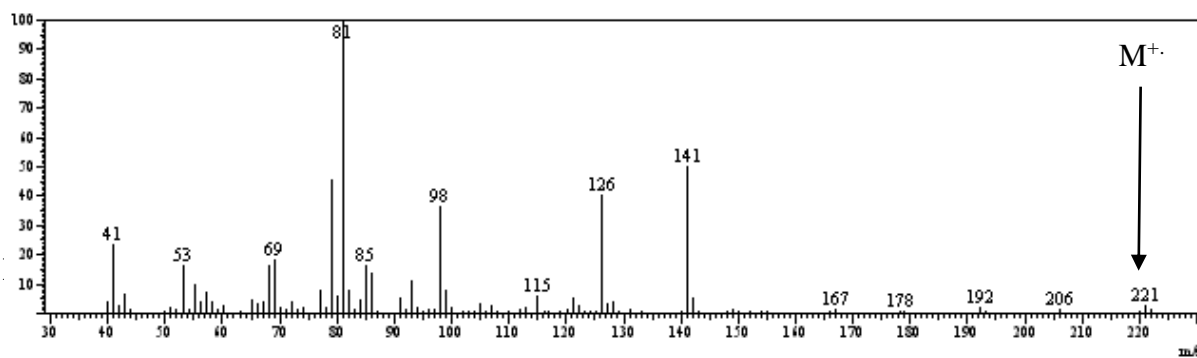


Figura 5. Espectro de massas do espilantol.

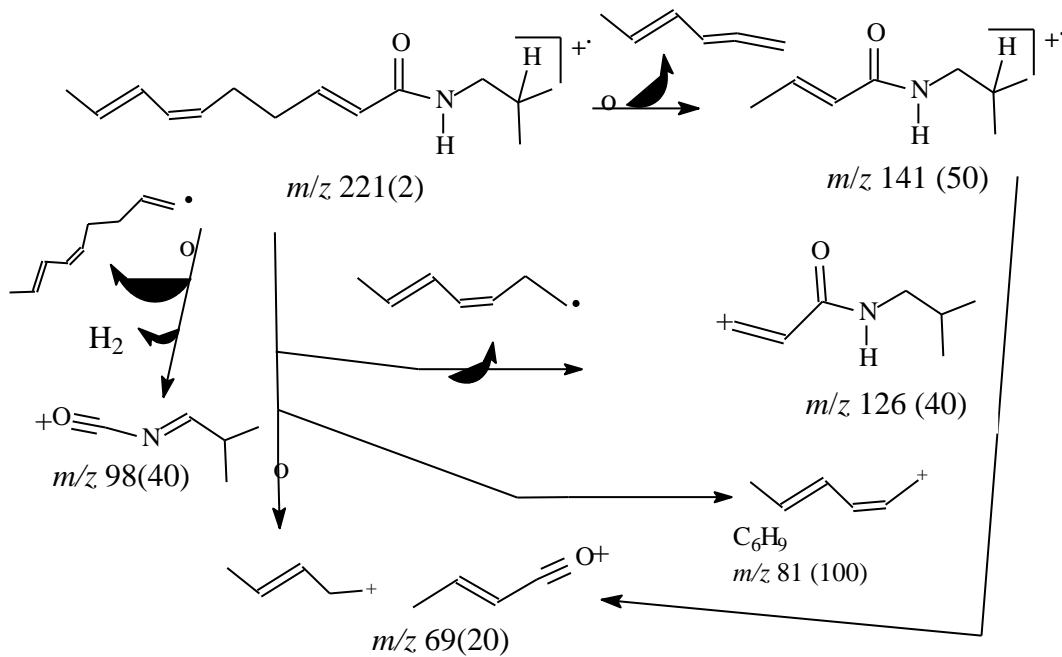


Figura 6. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos detectados no espectro de massas do espilantol.

4 Conclusões

A presença do espilantol como o metabólito principal nos extratos, independentemente do tempo de armazenamento, revelou a viabilidade da comercialização do produto quanto aos aspectos químicos do Jambu seco, mantendo sua principal substância, mesmo após 195 dias de armazenamento sob condições extremas de temperatura e embalagem. Houve uma redução no teor de espilantol no tempo 0 de armazenamento do Jambu seco com ar frio (0,68 % em peso seco) comparado ao final de 195 dias de armazenamento (0,42 % em peso seco).

5 Referências bibliográficas

ABEYSIRI, G. R. P. I.; DHARMADASA, R. M.; ABEYSINGHE, D. C.; SAMARASINGHE, K. Screening of phytochemical, physico-chemical and bioactivity of different parts of *Spilantes acmella* Murr. (Asteraceae), a natural remedy for toothache. **Industrial Crops and Products**, v. 50, p. 852-856, 2013.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis of AOAC International**. 16 ed., Gaithersburg: AOAC International, 1997.

AYRES, M.; AYRES JR., M.; AYRES, D. L.; SANTOS, A. S. dos. **BioEstat 5.0 – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas**. Manaus: Sociedade Civil Mamirauá/MCT-CNPq, 2007.

BARBOSA, A. F.; CARVALHO, M. G. de; SMITH, R. E.; SABAA-SRUR, A. U. O. Spilanthol: occurrence, extraction, chemistry and biological activities. **Brazilian J. Pharmacognosy**, v. 26, p. 128-133, 2016.

- BOONEN, J.; BAERT, B.; BURVENICH, C.; BLONDEEL, P., DE SAEGER, S.; DE SIELGELEER, B. LC-MS profiling of *N*-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bio-active spilanthol. **J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 53, p. 243-249, 2010a.
- BOONEN, J.; BAERT, B.; ROCHE, N.; BURVENICH, C.; DE SPIEGELEER, B. Transdermal behaviour of the *N*-alkylamide spilanthol (affinin) from *Spilanthes acmella* (Compositae) extracts. **J. Ethnopharmacology**, v. 127, p. 77-84, 2010b.
- BOONEN, J.; BRONSELAER, A.; NIELANDT, J.; VERYSER, L.; DE TER, G.; DESPIEGELEER, B. Alkamid database: Chemistry, occurrence and functionality of plant *N*-alkylamides. **J. Ethnopharmacology**, v. 142, p. 563-590, 2012.
- BORGES, L. da S.; VIEIRA, M. A. R.; MARQUES, M. O. M.; VIANELLO, F.; LIMA, G. P. P. Influence of Organic and Mineral Soil Fertilization on Essential Oil of *Spilanthes oleracea* cv. Jambuarana. **American J. Plant Physiology**, v. 7, p. 135-142, 2012.
- CASTRO, K. N. C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L. C.; LEITE, J. R. S. A.; SANTOS, R. C.; PAZNETO, A. A.; COSTA-JÚNIOR, L. M. Acaricide activity *in vitro* of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus*. **Parasitology Research**, v. 113, p. 3697-3701, 2014.
- CHUNG, K.-F.; KONO, Y.; WANG, C.-M.; PENG, C. I. Notes on *Acmella* (Asteraceae: Heliantheae) in Taiwan. **Bot. Stud.**, v. 49, p. 73-82, 2008.
- COSTA, S. S.; ARUMUGAM, D.; GARIPEY, Y.; ROCHA, S. C. S.; RAGHAVAN, V. Spilanthol extraction using microwave: calibration curve for gas chromatography. **Chemical Engineering Transactions**, v. 32, p. 1783-1788, 2013.
- CRUZ, P. B.; BARBOSA, A. F.; ZERINGÓTA, V.; MELP, D.; NOVATO, T.; FIDELIS, Q. C.; FABRI, R. L.; CARVALHO, M. G. de; SABAA-SRUR, A. U. O.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O. Acaricidal activity of metanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Vet. Parasitol.**, v. 228, p. 137-143, 2016.
- DEMARNE, F.; PASSARO, G. **Use of an *Acmella oleracea* extract for the botulinumtoxin-like effect thereof in an anti-wrinkle cosmetic composition**. US Patent No. 7,531,193 B2, 2005.
- DIAS, A. M. A.; SANTOS, P.; SEABRA, I. J.; CARVALHO JUNIOR, R. N.; BRAGA, M. E. M.; SOUSA, H. C. de. Spilanthol from *Spilanthes acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction. **J. Supercritical Fluids**, v. 61, p. 62-70, 2012.
- GERBINO, A.; SCHENA, G.; MILANO, S.; MILELLA, L.; BARBOSA, A. F.; ARMENTANO, F.; PROCINO, G.; SVELTO, M.; CARMOSINO, M. Spilanthol from *Acmella oleracea* lowers the intracellular levels of cAMP impairing NKCC2 phosphorylation and water channel AQP2 membrane expression in mouse kidney. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, e0156021, 2016.
- GUERRA, N. B.; LAJOLO, F. M. Ação antioxidante de especiarias face diferentes atividades de água. **Food Sci. Technol.**, v. 25, p. 45-50, 2005.

IKEDA, Y.; UKAI, J.; IKEDA, N.; YAMAMOTO, H. Facile routes to natural acyclicpolyenes syntheses the spilanthol and trail pheromone for termite. **Tetrahedron Letters**, v. 25, p. 5177-5180, 1984.

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

KADIR, H. A.; ZAKARIA, M. B.; KECHIL, A. A.; AZIRUN, M. S. Toxicity and electrophysiological effects of *Spilanthes acmella* Murr. **Pesticide Science**, v. 25, p. 329-335, 1989.

MASSARANI, G. **Problemas em Sistemas Particulados**. São Paulo: Edgard Blucher, 1984. 114p.

MOLINA-TORRES, J.; SALAZAR-CABRESA, C. J.; ARMENTA-SALINAS, C.; RAMÍREZ-SÁNCHEZ, E. Fungistatic and bacteriostatic activities of alkamides from *Heliopsis longipes* roots: Affinin and reduces amides. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, 4700-4704, 2004.

MORENO, S. C.; CARVALHO, G. A.; PIKANÇO, M. C.; MORAIS, E. G. F.; PEREIRA, R. M. Bioactivity of compounds from *Acmella oleracea* against *Tuta absoluta* (meyrick) (lepidoptera: gelechiidae) and selectivity to two non-target species. **Pest Manage Sci.**, v. 68, p. 386-393, 2012.

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

NASCIMENTO, A. M.; SOUZA, L. M. de; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. de P.; MARIA-FERREIRA, D.; SILVA, L. M. da; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. **Phytochemistry**, v.85, p. 137-142, 2013.

OLIVEIRA, A.; AMARAL, A. J.; ANDRADE, J.; NASCIMENTO, V.; MENDES, K.; REIS, J. Desenvolvendo construções de apriscos na agricultura familiar. **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, p. 1-4, 2011.

PRACHAYASITTUKAL, V.; PRACHAYASITTUKAL, S.; RUCHIWARAT, S.; PRACHAYASITTUKAL, V. High therapeutic potential of *Spilanthes acmella*: A review. **EXCLI J.**, v. 12, p. 291-312, 2013.

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

RATNASOORIYA, W. D.; PIERIS, K. P. P.; SAMARATUNGA, U.; JAYAKODY, J. R. A. C. Diuretic activity of *Spilanthes acmella* flowers in rats. **J. Ethnopharmacology**, v. 91, p. 317-320, 2004.

RIOS, M. Y.; AGUILAR-GUADARRAMA, A. B.; GUTIERREZ, M. D. Analgesic activity of affinin, an alkamide from *Heliopsis longipes* (Compositae). **J. Ethnopharmacology**, v. 110, p. 364-367, 2007.

ROJAS, J. J.; OCHOA, V. J.; OCAMPO, S. A.; MUÑOZ, J. F. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: a possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, p. 2-7, 2006.

SHARMA, A.; KUMAR, V.; RATTAN, R. S.; KUMAR, N.; SINGH, B. Insecticidal toxicity of spilanthol from *Spilanthes acmella* Murr. against *Plutella xylostella* L. **American J. Plant Sciences**, v. 3, p. 1568-1572, 2012.

SHARMA, V.; BOONEN, J.; CHAUHAN, N. S.; THAKUR, M.; DE SPIEGELEER, B.; DIXIT, V. K. *Spilanthes acmella* ethanolic flower extract: LC-MS alkylamide profiling and its effects on sexual behavior in male rats. **Phytotherapy**, v. 18, p. 1161-1169, 2011.

SPELMAN, K.; DEPOIX, D.; MCCRAY, M.; MOURAY, E.; GRELLIER, P. 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.

STASHENKO, E. E.; PUERTAS, M. A.; COMBARIZA, M. Y. Volatile secondary metabolites from *Spilanthes americana* obtained by simultaneous steam distillation-solvent extraction and supercritical fluid extraction. **J. Chromatography A**, v. 752, p. 223-232, 1996.

SUN, L.; REZAEI, K. A.; TEMELLI, F.; OORAIKUL, B. Supercritical fluid extraction of alkylamides from *Echinacea angustifolia*. **J. Agr. Food Chem.**, v. 50, p. 3947-3953, 2002.

VERYSER, L.; WYNENDAELE, E.; TAEVERNIER, L.; VERBEKE, F.; JOSHI, T.; TATKEB, P.; DE SPIEGELEER, B. *N*-alkylamides: from plant to brain. **Functional Foods in Health and Disease**, v. 4, p. 264-275, 2014.

CAPÍTULO IV.

CL-EMAR E ANÁLISE DE RMN DE CAPÍTULOS, FOLHAS E HASTES DE *Acmella oleracea* LIOFILIZADOS

Artigo publicado no The Natural Products Journal

MONROE, D.; LUO, R.; TRAN, K.; RICHARDS, K. M.; BARBOSA, A. F.; MÁRIO G. de CARVALHO, M. G. de; SABAA-SRUR, A. U. O.; SMITH, R. E. 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. doi: 10.2174/2210315506666160218232311

Doug Monroe^a, Rensheng Luo^b, Kevin Tran^a, Kristy M. Richards^a, Alan Franco Barbosa^c, Mário G. de Carvalho^d, Armando U. O. Sabaa-Srur^{c,†}, Robert E. Smith^{a,*}

^a FDA 11510 W 80th St, Lenexa, KS, 66214, USA

^b University of Missouri – St. Louis 63121, USA

^c Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil

^d Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brasil

RESUMO

Capítulos, folhas e hastes de *Acmella oleracea* liofilizados foram extraídos com metanol a 100 °C e pressão de 10 MPa (100 atm) num recipiente selado e analisados por Cromatografia Líquida acoplada a um espectrômetro de massas equipado com fonte de ionização de elétron-spray em modo positivo (CL-EMAR IES⁺) e RMN ¹H e ¹³C. Foram solubilizados 28,3 % das folhas, 24,7 % das hastes e 31,1 % dos capítulos. Os espectros de RMN apresentaram principalmente sinais de CHO e CH₂O de carboidratos. A CL-EMAR foi capaz de quantificar o espilantol (*N*-isobutil-2*E*,6*Z*,8*E*-decatrienamida, C₁₄H₂₃NO) e detectar, pelo menos outras dez *N*-alquilamidas com íons [M+H]⁺ e as seguintes fórmulas moleculares: 204,13829 (C₁₃H₁₇NO), 252,13829 (C₁₇H₁₇NO), 230,15394 (C₁₅H₁₉NO), 232,16759 (C₁₅H₂₁NO), 246,18524 (C₁₆H₂₃NO), 258,18524 (C₁₇H₂₃NO), 224,20087 (C₁₄H₂₅NO), 236,20089 (C₁₅H₂₅NO), 220,16959 (C₁₄H₂₁NO) e 248,20089 (C₁₆H₂₅NO). As concentrações de espilantol nos capítulos, folhas e hastes foram de 16,5, 0,344 e 0,241 mg/g em base seca, respectivamente. Para confirmar sua presença por RMN, foi necessária purificação parcial. Assim, uma porção dos resíduos do extrato metanólico foi dissolvida em clorofórmio e lavada com água deionizada. A percentagem de compostos anfífilicos nos capítulos, folhas e hastes foram 7,69, 8,42 e 3,09 % em base seca, respectivamente. Os sinais de RMN do espilantol foram observados nos espectros das amostras solúveis em clorofórmio.

Palavras-chave: *Acmella oleracea*, CL-EMAR, RMN, Espilantol, *N*-alquilamidas.

ABSTRACT

Lyophilized *Acmella oleracea* capitula, leaves and stems were extracted with methanol at 100 °C and 10 MPa (100 atm) pressure in a sealed container and analyzed by liquid chromatography coupled to high-resolution mass spectrometry in positive mode electrospray ionization (ESI⁺ LC-HRMS) and ¹H and ¹³C NMR. This solubilized 28.3 % of the leaves, 24.7 % of the stems and 31.1 % of the capitula. The NMR spectra were dominated by signals due to the CHO and CH₂O of carbohydrates. LC-HRMS was able to quantify spilanthol (deca-2*E*,6*Z*,8*E*-trienoic acid isobutylamide, C₁₄H₂₃NO) and detect at least ten other *N*-alkamides as [M+H]⁺ ions with the following molecular formulas: 204.13829 (C₁₃H₁₇NO), 252.13829 (C₁₇H₁₇NO), 230.15394 (C₁₅H₁₉NO), 232.16759 (C₁₅H₂₁NO), 246.18524 (C₁₆H₂₃NO), 258.18524 (C₁₇H₂₃NO), 224.20087 (C₁₄H₂₅NO), 236.20089 (C₁₅H₂₅NO),

220.16959 (C₁₄H₂₁NO) e 248.20089 (C₁₆H₂₅NO). The concentrations of spilanthol in the capitula, leaves and stems were 16.5, 0.344 and 0.241 mg/g dry weight. To confirm its presence by NMR, partial purification was required. So, a portion of the residues remaining after evaporating off the methanol were partitioned between chloroform and deionized water. The percentage of amphiphilic compounds in the capitula, leaves and stems were 7.69, 8.42 and 3.09 % dry weight, respectively. NMR signals due to spilanthol were seen in their spectra of CHCl₃ fraction.

Key words: *Acmella oleracea*, LC-HRMS, NMR, Spilanthol, *N*-alkamides.

1 Introdução

Acmella oleracea é conhecida como a “planta dor de dente”, devido às suas propriedades analgésicas orais (NAKATANI e NAGASHIMA, 1992; DUBEY et al., 2013). No Brasil, ela é conhecida como Jambu, mas na Índia, as pequenas árvores *Syzygium jambos* também são conhecidas como Jambu (SELVAM et al., 2013) e na Malásia, goiaba (*Psidium guajava* L.) é conhecida como Jambu batu (LIM, LIM e TEE, 2006). No entanto, há discordâncias na literatura sobre o nome do seu gênero e espécie. Conforme descrito num artigo de revisão recente (BARBOSA et al., 2016), alguns nomes são listados como *A. oleracea*, mas outros chamam de *A. oleracea* (L.) RK Jansen, *A. oleracea* Compositae, *Spilanthes oleracea* L., *S. acmella*, *S. acmella* L. var. *oleracea* Clarke e *S. acmella* Murr. (Asteraceae) (NAKATANI e NAGASHIMA, 1992; HIND e BIGGS, 2003; CHUNG et al., 2008; DEMARNE e PASSARO, 2009; MBEUNKUI et al., 2011; PANDEY, CHOPRA e AGRAWAL, 2011; MARTINS et al., 2012; MORENO et al., 2012; ABEYSIRI et al., 2013; DUBEY et al., 2013; PRACHAYASITTUKAL et al., 2013; SIMAS et al., 2013; ABEYSINGHE, WIJERATHNE e DHARMADASA, 2014; ALCANTARA et al., 2014; CASTRO et al., 2014; SANA, RANI e SULAKSHANA, 2014; SOARES et al., 2014; MISHRA et al., 2015; BARBOSA et al., 2016).

Em adição aos seus efeitos analgésicos, *A. oleracea* e seu metabólito especial considerado mais ativo, o espilantol, tem demonstrado ter atividade antifúngica, larvicida acaricida, anti-malária, anti-nociceptiva, antioxidante, anti-inflamatória, antimutagênico, diurético, anti-rugas, bacteriostático, atividades inseticida contra *Aedes aegypti* e *Helicoverpa zea* e atividade anti-moluscicida (JOHNS, GRAHAM e TOWERS, 1982; KADIR et al., 1989; NAKATANI e NAGASHIMA, 1992; RAMSEWAK, ERICKSON e NAIR, 1999; MOLINA-TORRES et al., 2004; RIOS, AGUILAR-GUADARRAMA e GUTIERREZ, 2007; WU et al., 2008; BORGES, 2009; DEMARNE e PASSARO, 2009; HERNÁNDEZ et al., 2009; SHARMA et al., 2011; DÉCIGA-CAMPOS et al., 2012; DIAS et al., 2012; MORENO et al., 2012; ABEYSIRI et al., 2013; ARRIAGA-ALBA, RIOS e DÉCIGA-CAMPOS, 2013; CASTRO et al., 2014; SOARES et al., 2014; CRUZ et al., 2016; GERBINO et al. 2016).

Esses efeitos fisiológicos são devidos às *N*-alquilamidas, incluindo o espilantol (C₁₄H₂₃NO, 221,339 g/mol) (SPELMAN et al., 2011), que segundo a IUPAC recebe a nomenclatura (2*E*, 6*Z*, 8*E*)-*N*-isobutil-2,6,8-decatrienamida (SHARMA et al., 2011). Espilantol (ou afinina) é encontrado não apenas em *A. oleracea*, mas também em *A. oppositifolia*, *A. radicans*, *A. brachyglossa*, *A. ciliate*, *A. paniculata*, *A. uliginosa*, *Welelia parviceps* e *Heliopsis longipes* (CHUNG et al., 2008; PRACHAYASITTUKAL et al., 2013).

Boonen et al. (2010) descreveram o perfil de um extrato etanólico de *A. oleracea* disponível no mercado por meio da Cromatografia Líquida acoplada a espectrômetro de massas. Eles descobriram que o espilantol foi a amida mais abundante, mas outras *N*-alquilamidas também foram detectadas.

No entanto, o espilantol é a única dessas amidas que está disponível comercialmente. Além disso, os valores de *m/z* dos íons [M+H]⁺ de outras alquilamidas encontradas

anteriormente (VERYSER et al., 2014) não foram medidos com precisão suficiente para ter certeza de que as fórmulas moleculares estavam corretas. Até o presente estudo não há relato de Extração com Líquido Pressurizado (ELP) com qualquer parte da planta *A. oleracea*, nem espectros de RMN do extrato. Assim, os objetivos deste estudo foram fazer uma ELP de capítulos, folhas e hastes de *A. oleracea* liofilizados, além de quantificar o conteúdo de espilantol e identificar outras *N*-alquilamidas conhecidas, bem como obter e interpretar espectros de RMN ^1H e ^{13}C dos extratos.

2 Material e métodos

Capítulos, folhas e hastes de Jambu foram coletados no município de Igarapé-Açu, pertencente a Região Bragantina, estado do Pará, nas coordenadas: 01° 07 '33' 'S e 47° 37 '27' 'O. A planta (MG205534) foi identificada como *Acmella oleracea* L. e incorporada ao herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi, na cidade de Belém, estado do Pará. A hortaliça foi lavada com água a fim de remover os resíduos do solo. Em seguida, as raízes foram removidas com facas inoxidáveis. Os capítulos, folhas e hastes foram higienizados por imersão durante 10 minutos numa solução de cloro residual livre (200 mg/L) obtido a partir de hipoclorito de sódio (10 % de pureza). A lavagem final foi realizada com a imersão em solução de 5 mg/L durante 10 min, com posterior drenagem da água. Em seguida, eles foram congelados, liofilizados e enviados para a *Food and Drug Administration* (FDA) para análise.

Clorofórmio (CHCl_3), clorofórmio deuterado (CDCl_3), metanol (CH_3OH), metanol deuterado (MeOD_4) e acetonitrila (CH_3CN) utilizados foram da Sigma-Aldrich, St. Louis, MO. O espilantol (padrão comercial) foi da ChromaDex (Irving, CA).

Cerca de 10 g de capítulos, folhas e hastes liofilizados foram misturados com HydroMatrixTM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) para encher a célula de amostra de aço inoxidável de 100 mL usada no Extrator Acelerado por Solvente (EAS) (ThermoFisher Scientific, Sunnyvale, CA). Em seguida, foi adicionado metanol enquanto a temperatura e pressão aumentaram para 100 °C e 10,3 MPa (1500 psi, 100 atm), durante 3 min (tempo estático). Em seguida, o solvente foi purgado para um vaso coletor. Um total de quatro ciclos foram realizados para extrair estaticamente a amostra, resultando num volume total de cerca de 160 mL. O solvente foi evaporado e os resíduos oleosos restantes foram pesados. Uma porção de cada resíduo foi redissolvida em CD_3OD para análise de RMN, enquanto outra porção foi submetida a partição com CHCl_3 e água. A fração CHCl_3 foi recolhida para obter a porção anfifílica do extrato metanólico. O CHCl_3 foi evaporado e os resíduos foram redissolvidos em CDCl_3 para análise de RMN. A terceira porção do resíduo remanescente, após a evaporação do CH_3OH a partir do extrato metanólico foi redissolvida em $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v) para análise por Cromatografia Líquida acoplada a um espectrômetro de massas de alta resolução equipado com fonte de ionização de elétron-spray em modo positivo (CL-EMAR IES⁺).

CL-EMAR IES⁺ foi executada em um Q-ExactiveTM Orbitrap equipado com ionização por eletrospray na temperatura de 350 °C, coluna Hypersil OURO C18 (100 x 2,1 mm, de 1,9 μm de tamanho de partícula) da Thermo Fisher Scientific (Rockville, MD) que foi mantida a 30 °C. Utilizou-se voltagem de pulverização de 3,50 V no IES⁺, temperatura capilar de 325 °C e voltagem capilar de 32,50 V. O programa de gradiente de eluição é apresentado na Tabela 1. A taxa de fluxo foi de 0,30 mL/min.

Para quantificar o espilantol, valores de *m/z* variando de 222,18413-222,18635, 126,09083-126,09209 e 141,11413-141,11555 Da foram obtidos do Cromatograma de Íons Totais (CIT). Esses íons correspondem ao $[\text{M}+\text{H}]^+$, e dois fragmentos respectivamente. Além disso, os seguintes valores de *m/z* e fórmulas moleculares das dez outras *N*-alquilamidas foram identificadas pelo CIT: 204,13829 ($\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{NO}$), 252,13829 ($\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}$), 230,15394 ($\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{NO}$), 232,16759 ($\text{C}_{15}\text{H}_{21}\text{NO}$), 246,18524 ($\text{C}_{16}\text{H}_{23}\text{NO}$), 258,18524 ($\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}$),

224,20087 (C₁₄H₂₅NO), 236,20089 (C₁₅H₂₅NO), 220,16959 (C₁₄H₂₁NO) e 248,20089 (C₁₆H₂₅NO). As curvas de calibração foram obtidas usando 0,050-5,0 mg/mL de espilantol. As amostras foram diluídas em CH₃CN:H₂O (1:1, v/v) até produzirem picos com áreas dentro dos padrões de calibração. As análises de RMN foram realizadas usando um espectrômetro Agilent DD2 600 MHz (Santa Clara, CA).

Tabela 1. Programa de gradiente de eluição.

Tempo (min)	% A	% B
0,00	90	10
0,50	90	10
10,0	50	50
13,0	5	95
20,0	5	95
20,5	90	10
25,5	90	10

% A: 0,1% ácido fórmico em água.

% B: 0,1% ácido fórmico em CH₃CN.

3 Resultados e discussão

10 g de folhas, hastes e capítulos de Jambu liofilizados foram submetidos a extração com metanol num EAS e forneceram 2,83 g, 2,47 g e 3,11 g de extrato que correspondem a 28,3, 24,7 e 31,1 % de rendimento, respectivamente.

Os nomes, número das estruturas químicas, Fórmula Molecular, valores de m/z detectados e os tempos de retenção das *N*-alquilamidas identificadas estão listados na Tabela 2 e as estruturas representadas na Figura 1.

Tabela 2. *N*-alquilamidas encontradas em capítulos, hastes e folhas de Jambu (*A. oleracea*).

Nome	Fórmula molecular	[M+H] ⁺	t _R (min) ^a
<i>N</i> -isobutil-2 <i>Z</i> -en-6,8-nonadiinamida (1)	C ₁₃ H ₁₇ NO	204,13829	10,79
<i>N</i> -fenetil-2,3-epoxi-6,8-nonadiinamida (2)	C ₁₇ H ₁₇ NO	252,13829	12,02
<i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> ,4 <i>Z</i> -dien-dieno-8,10-undecadiinamida (3)	C ₁₅ H ₁₉ NO	230,15394	11,66
<i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> -en-8,10-undecadiinamida (4)	C ₁₅ H ₂₁ NO	232,16759	12,48
<i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> -decatrienamida (espilantol)	C ₁₄ H ₂₃ NO	222,18524	12,45
<i>N</i> -(2-metilbutil)-2 <i>E</i> -en-8,10-undecadiinamida (5)	C ₁₆ H ₂₃ NO	246,18524	12,68
<i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> ,7 <i>Z</i> -tridecadieno-10,12-diinamida (6)	C ₁₇ H ₂₃ NO	258,18524	12,79
<i>N</i> -isobutil-2 <i>E</i> ,7 <i>Z</i> -decadienamida (7)	C ₁₄ H ₂₅ NO	224,20087	13,00
<i>N</i> -(2-metilbutil)-2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i> -decatrienamida (8)	C ₁₅ H ₂₅ NO	236,20089	13,00
Alquilamida não identificada (9)	C ₁₄ H ₂₁ NO	220,16959	5,86 ^b
<i>N</i> -isobutil-dodeca-2 <i>E</i> ,4 <i>E</i> ,8 <i>Z</i> ,10 <i>Z</i> -tetraenamida (10)	C ₁₆ H ₂₅ NO	248,20089	13,22

^a Tempo de retenção (t_R) do maior pico que produziu cada íon.

^b Existe também um pico com t_R de 5,67 minutos que produziu íon [M+H]⁺ com m/z = 220,16959 que é quase tão grande quanto o pico com t_R de 5,86 minutos.

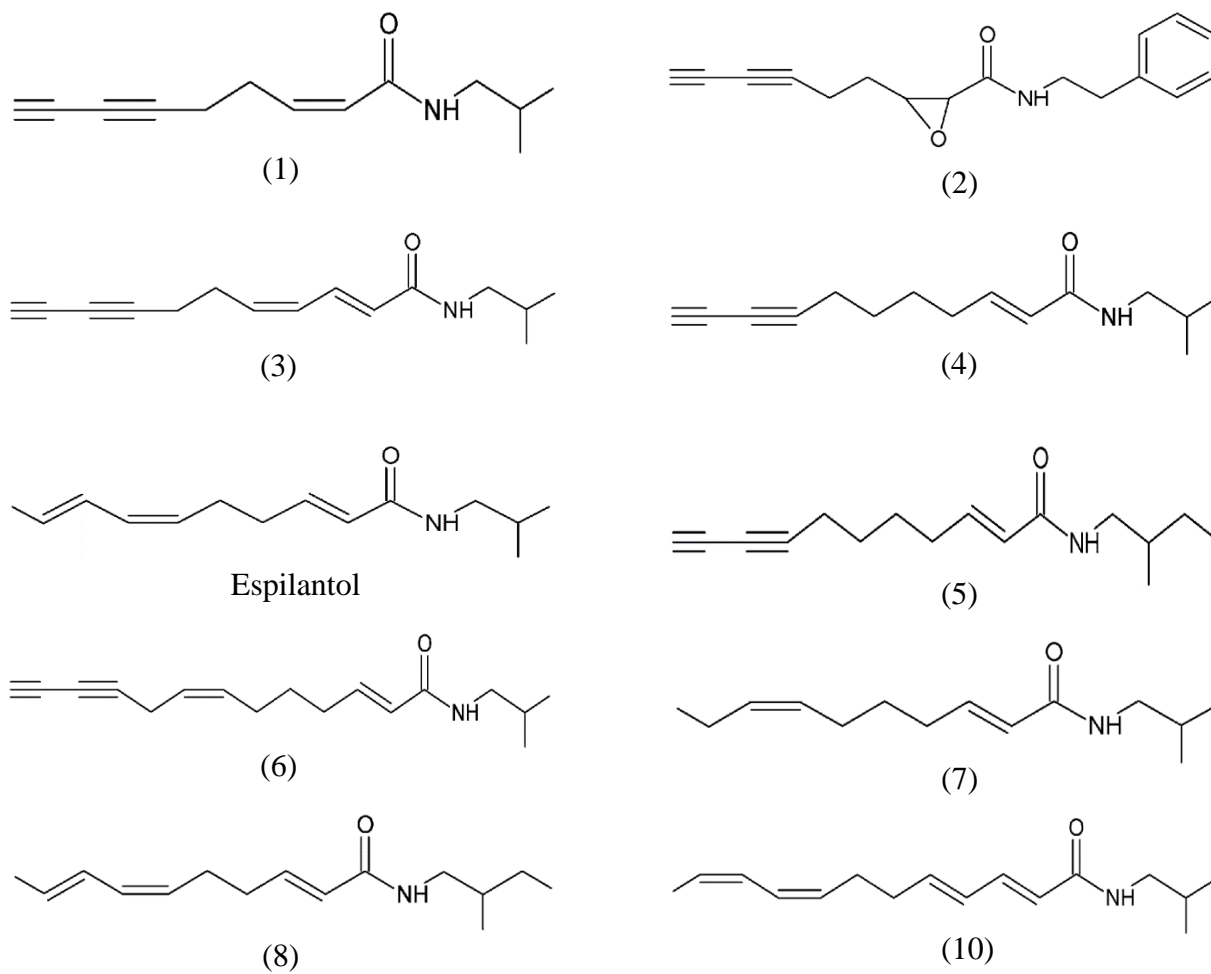


Figura 1. Estrutura das *N*-alquilamidas identificadas.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C do extrato metanólico de capítulos de Jambu liofilizados são apresentados nas Figuras 2 e 3.

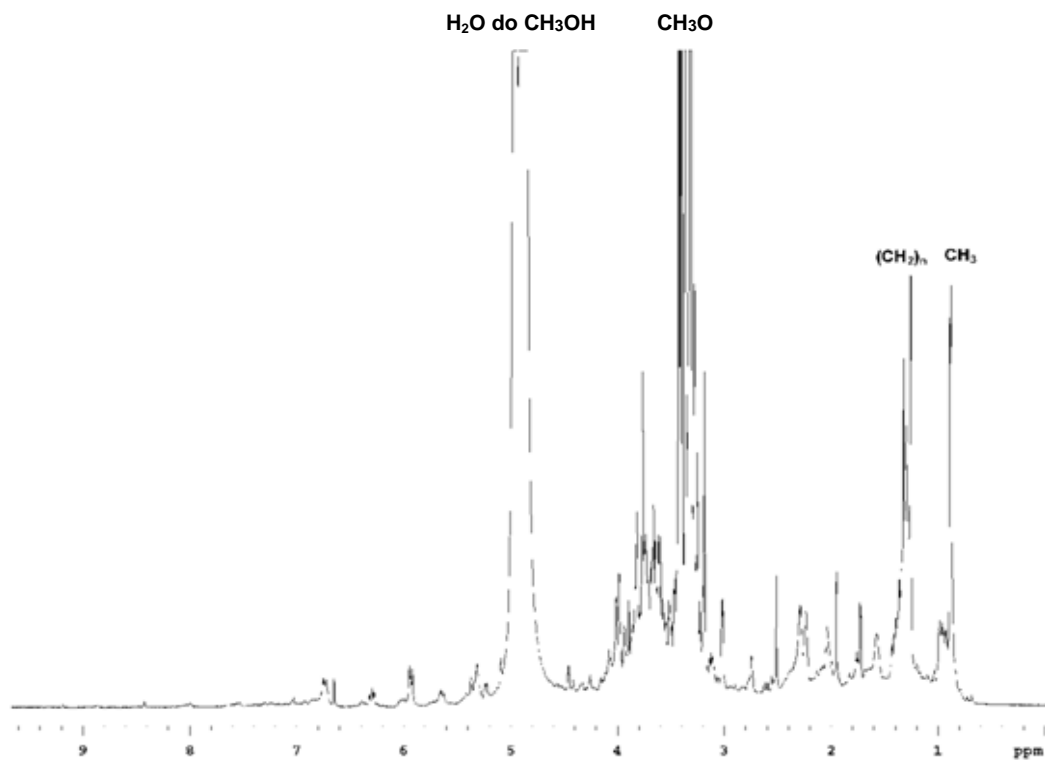


Figura 2. RMN ^1H do extrato metanólico de capítulos de Jambu liofilizados.

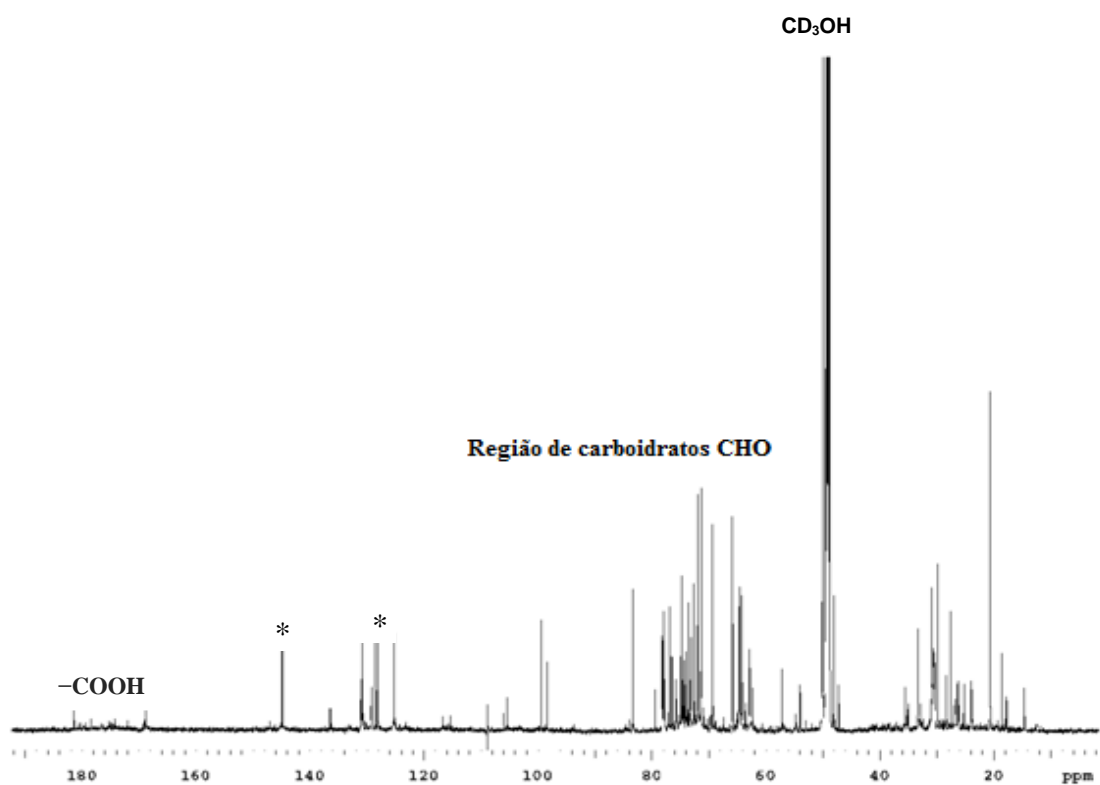


Figura 3. RMN ^{13}C do extrato metanólico de capítulos de Jambu liofilizados.

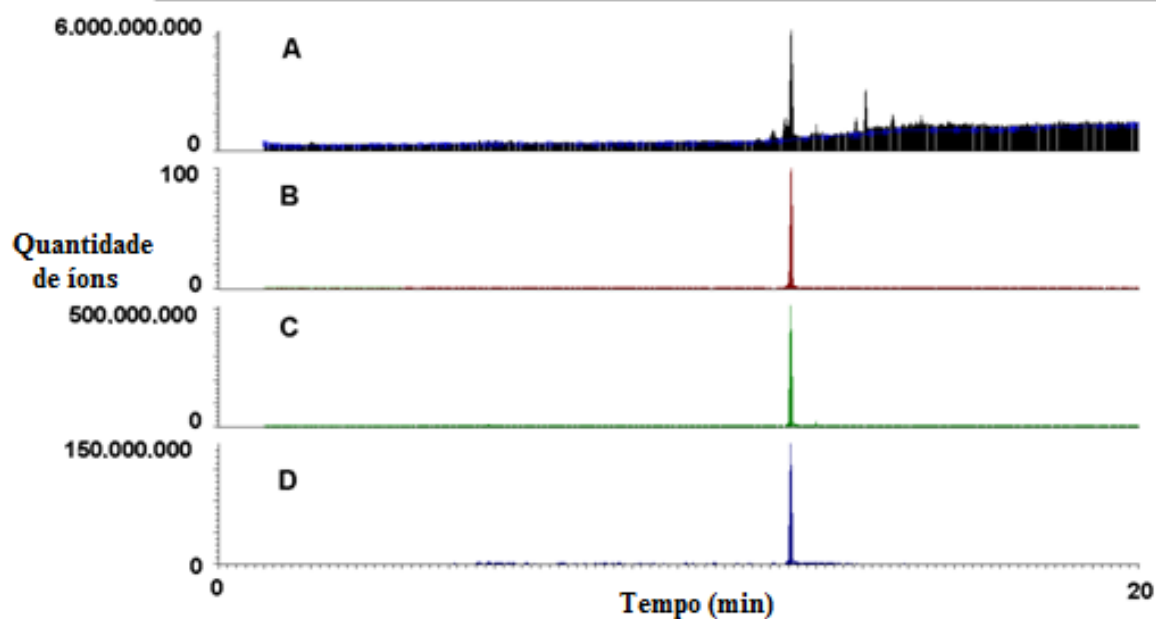
*: Espilantol

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C apresentaram sinais majoritários devido as presenças de CHO e CH_2O de carboidratos livres ou ligados a unidades acilas. São observados também

sinais de CH₃ e (CH₂)_n de unidades acilas. Além dos ácidos graxos livres ocorrem a forma de ésteres de glicerol ou outros carboidratos. Foram identificados nos espectros de RMN ¹³C sinais de carboxilas de ésteres na faixa de δ_H 173-177, e de carboxilas de ácidos graxos com sinal em torno de 180 ppm (LUO et al., 2012; RICHARDS et al., 2014). Os sinais adicionais de carbonos olefínicos permitem propor a presença de material graxo insaturado contendo uma enona com dupla adicional na cadeia, podendo ser atribuído ao espilantol ou ésteres constituídos da unidade acila (decatrienila) proveniente do espilantol livre ou esterificado com outras unidades alquílicas, que pode ser metílicos ou carboidratos. Ácidos graxos glicosilados têm sido detectados em noni (*Morinda citrifolia*) e muitas outras frutas (KIM et al., 2010; RICHARDS et al., 2014). Eles podem atuar como importantes imunomoduladores, além de terem propriedades anticancerígenas (AKIHISA et al., 2010; NAYAK e MENGI, 2010).

Os espectros de RMN ¹H apresentaram pequenos sinais que correspondem aos grupos já relatados em espilantol (NAKATANI e NAGASHIMA, 1992). No entanto, muitas outras substâncias podem produzir sinais com os mesmos deslocamentos químicos. Quando os extratos metanólicos foram analisados por CL-EMAR, o espilantol foi detectado e quantificado. Não só o íon [M+H]⁺ com *m/z* = 222,18524, mas também fragmentos com *m/z* = 141,11484 e 126,09146 foram observados no espectro do espilantol e em cada uma das amostras, como apresenta a Figura 4.

Capítulos de Jambu



Folhas de Jambu

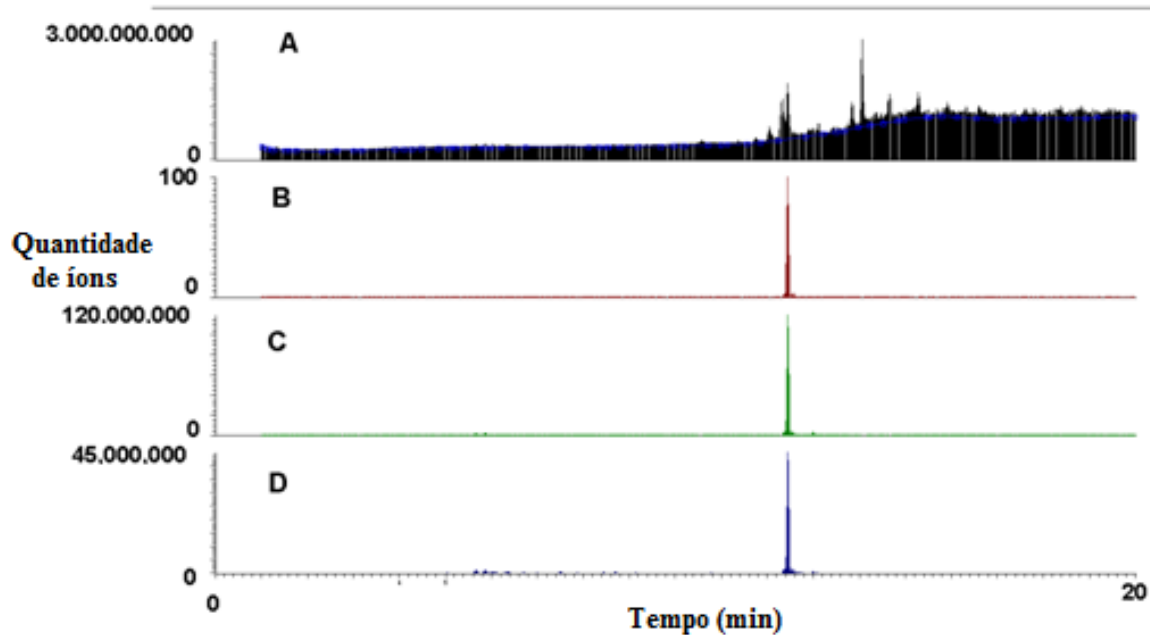


Figura 4. Cromatogramas CL-EMAR IES⁺ de extratos metanólicos (100 °C, pressão de 10 MPa) de 31,1 % de capítulos, folhas e hastes de Jambu liofilizado e o padrão de espilantol. **A:** Cromatograma de íons totais; **B:** Massa com m/z 222,18524 ($[M+H]^+$) correspondente ao espilantol; **C e D:** Massas com m/z 126,09146 e 141,11484 correspondentes à fragmentação do espilantol (continua).

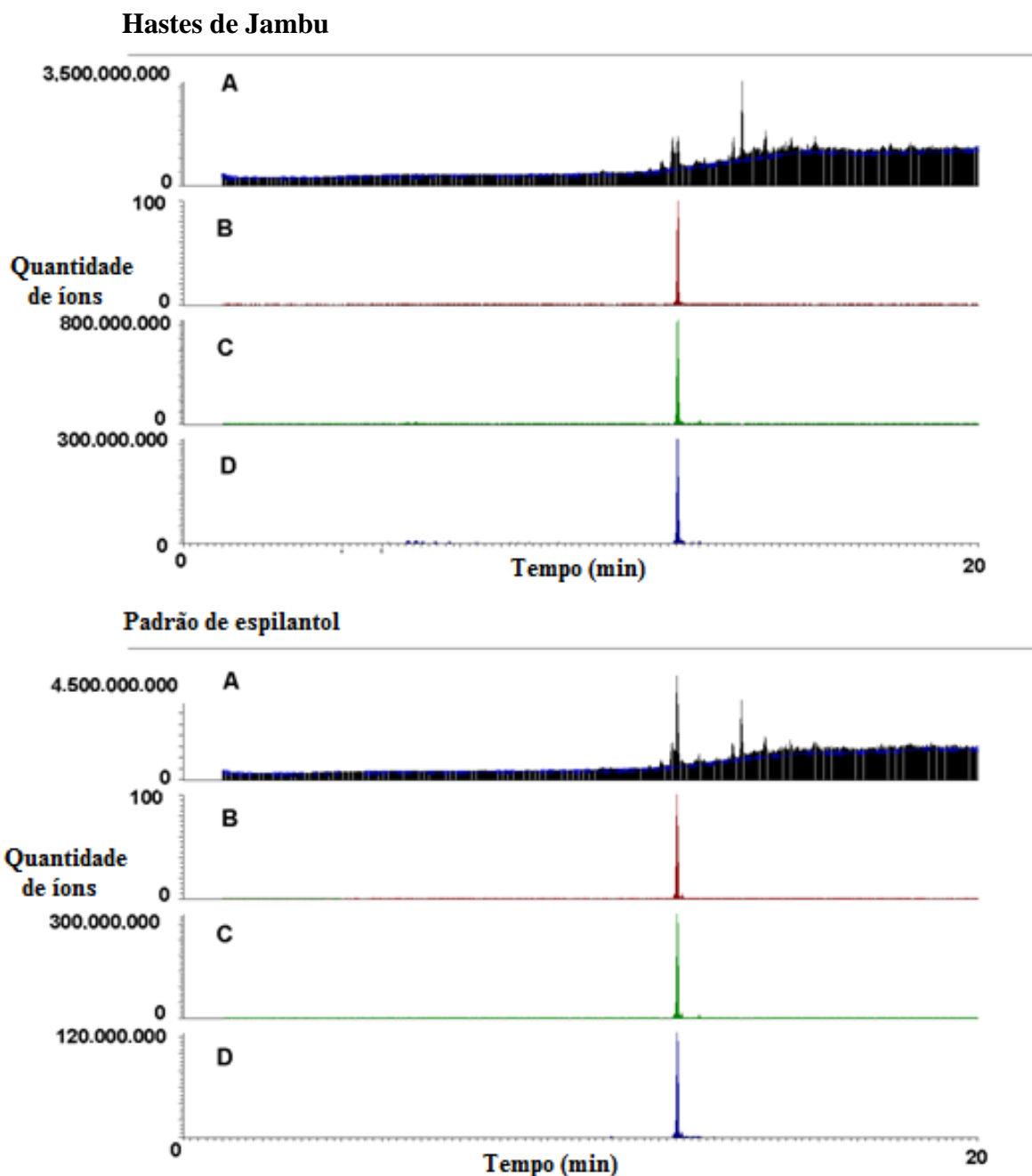


Figura 4. Continuação.

As concentrações do espilantol foram de 16,5, 0,344 e 0,241 mg/g (base seca) nos capítulos, folhas e hastes, respectivamente. Além disso, como apresentado na Figura 5, pelo menos dez outras *N*-alquilamidas foram detectadas: C₁₃H₁₇NO (**1**), C₁₇H₁₇NO (**2**), C₁₅H₁₉NO (**3**), C₁₅H₂₁NO (**4**), C₁₆H₂₃NO (**5**), C₁₇H₂₃NO (**6**), C₁₄H₂₅NO (**7**), C₁₅H₂₅NO (**8**), C₁₄H₂₁NO (**9**) e C₁₆H₂₅NO (**10**), Figura 1. No entanto, sem padrões comerciais destas amidas, elas não puderam ser quantificadas.

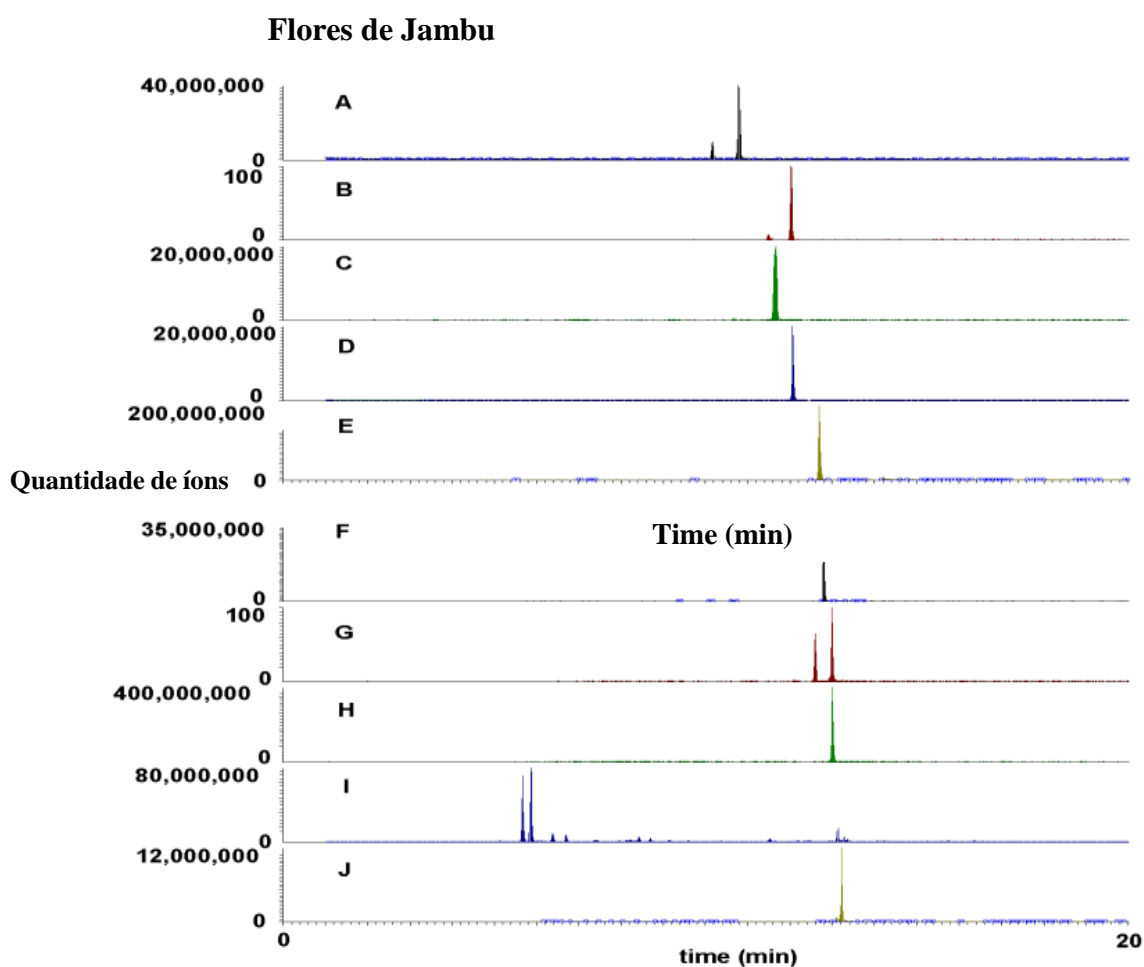


Figura 5. Cromatograma CL-EMAR IES⁺ do extrato metanólico (100 °C, pressão de 10 MPa) de 31,1 % de capítulos de Jambu liofilizados.

A Massa com m/z 204,13829 ([M+H]⁺); **B** Massa com m/z 252,13829 ([M+H]⁺); **C** Massa com m/z 230,15394 ([M+H]⁺); **D** Massa com m/z 232,16759 ([M+H]⁺); **E** Massa com m/z 246,18524 ([M+H]⁺); **F** Massa com m/z 258,18524 ([M+H]⁺); **G** Massa com m/z 224,20087 ([M+H]⁺); **H** Massa com m/z 236,20089 ([M+H]⁺); **I** Massa com m/z 220,16959 ([M+H]⁺); **J** Massa com m/z 248,20089 ([M+H]⁺).

Uma porção de cada resíduo restante após evaporação do CH₃OH foi submetida a partição com CHCl₃ e água deionizada. A fração CHCl₃ foi recolhida, o solvente foi evaporado e uma porção dos resíduos foram redissolvidos em CDCl₃ para análise de RMN. A porcentagem de substâncias anfifílicas dos capítulos, folhas e hastes de Jambu foram 7,69, 8,42 e 3,09 % em base seca, respectivamente. Os espectros de RMN e CL-EMAR do extrato das folhas e hastes são apresentados nas Figuras 9 até 18. Os espectros de RMN ¹H e ¹³C da porção anfifílica dos capítulos são apresentados nas Figuras 6, 7 e 8. Os sinais de vários hidrogênios (H-1', H-2, H-3, H-6, H-7, H-8 e H-9) são similares, mas o sinal do hidrogênio NH apareceu cerca de dez vezes maior. Isto é consistente com a hipótese de que tem outras *N*-alquilamidas em quantidades significativas estão presentes no material analisado. Alguns dos sinais no espectro de RMN das substâncias anfifílicas das folhas, hastes e capítulos são devido ao espilantol (NAKATANI e NAGASHIMA, 1992). No entanto, representam apenas 16,6, 11,7, e 18,5 % da área total dos picos nos espectros de RMN ¹H das frações anfifílicas das folhas, capítulos e hastes, respectivamente. Assim, há provavelmente muitas outras substâncias anfifílicas que ainda não

foram identificadas, algumas das quais têm NH. Havia também sinais menores no espectro de RMN da fração anfifílica das hastes (mas não nos capítulos e folhas) que eram devido à outra *N*-alquilamida, (2*E*)-*N*-(2-metilbutil)-2-undeceno-8,10-diinamida (NAKATANI e NAGASHIMA, 1992).

Devido ao fato do RMN ser menos sensível do que a CL-EMAR, foram encontradas outras *N*-alquilamidas pela técnica de CL-EMAR que não estavam presentes em concentrações suficientemente para produzir sinais esperados (NAKATANI e NAGASHIMA, 1992) nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C dos capítulos, hastes ou folhas de Jambu. Além disso, havia sinais de $-\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{CHO}-$ e carbonila ($\text{C}=\text{O}$) de triglicerídios (LUO et al., 2012) nos capítulos, conforme a Figura 6, mas não nas folhas ou hastes. Deve-se notar que o metanol pressurizado não solubilizou a maioria dos triglicerídios, uma vez que solubiliza apenas os triglicerídios que têm cadeia curta ou ácidos graxos poli-insaturados. Assim, o $-\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{CHO}-$ e a carbonila ($\text{C}=\text{O}$) são devido aos triglicerídios que têm cadeia curta ou ácidos graxos poli-insaturados, estando mais abundantes nos capítulos do que nas folhas ou hastes. No entanto, os capítulos, folhas e hastes podem ter triglicerídios de cadeia longa, ácidos graxos saturados que são solúveis em hexano e CHCl_3 , mas não em metanol, de modo que não estariam presentes nos extratos analisados neste trabalho (RICHARDS et al., 2014).

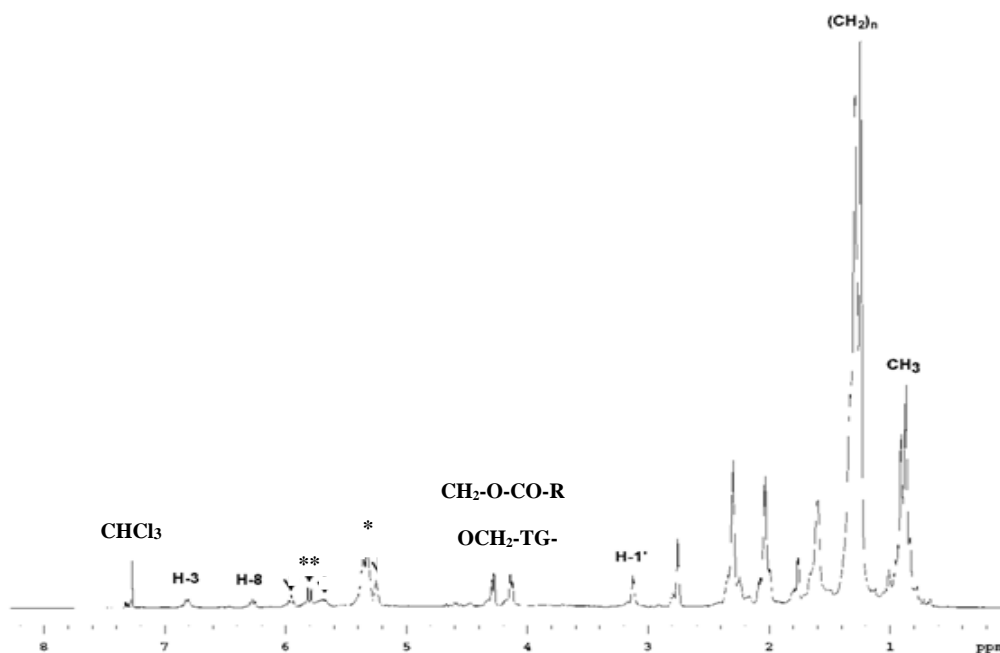
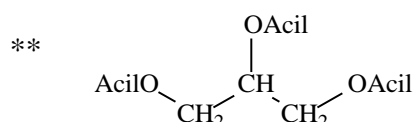


Figura 6. RMN ^1H da porção anfifílica do extrato metanólico de capítulos de Jambu liofilizados (31,1 %) com partição em CHCl_3 , redissolvido em CDCl_3 .

* =C-H(acila) O-CH-TG-



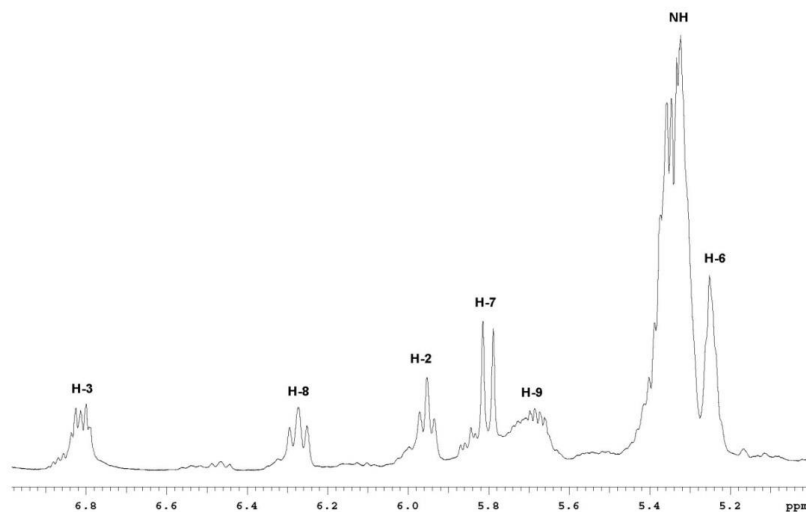


Figura 7. RMN ^1H da porção anifílica do extrato metanólico de capítulos de Jambu liofilizados (31,1 %) com partição em CHCl_3 , redissolvido em CDCl_3 . Expansão do espectro para visualizar a região de 5,0 - 7,0 ppm.

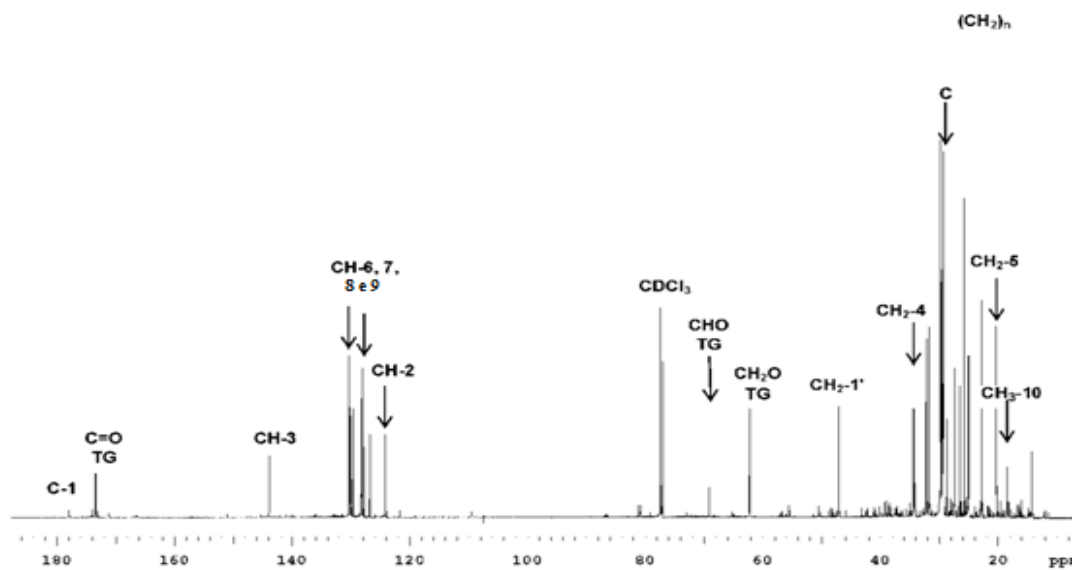


Figura 8. RMN de ^{13}C da porção anifílica do extrato metanólico dos capítulos de Jambu liofilizados (31,1 %) com partição em CHCl_3 , redissolvido em CDCl_3 . Os sinais devido ao CH-1' , CH-2 , CH-3 , CH-6 , CH-7 e CH-8 do espilantol são identificados com setas. Há também sinalizações devido à $-\text{CH}_2\text{O}-$, $-\text{CHO}-$ e $\text{O}=\text{C-OR}$ de triglicerídeos (TG).

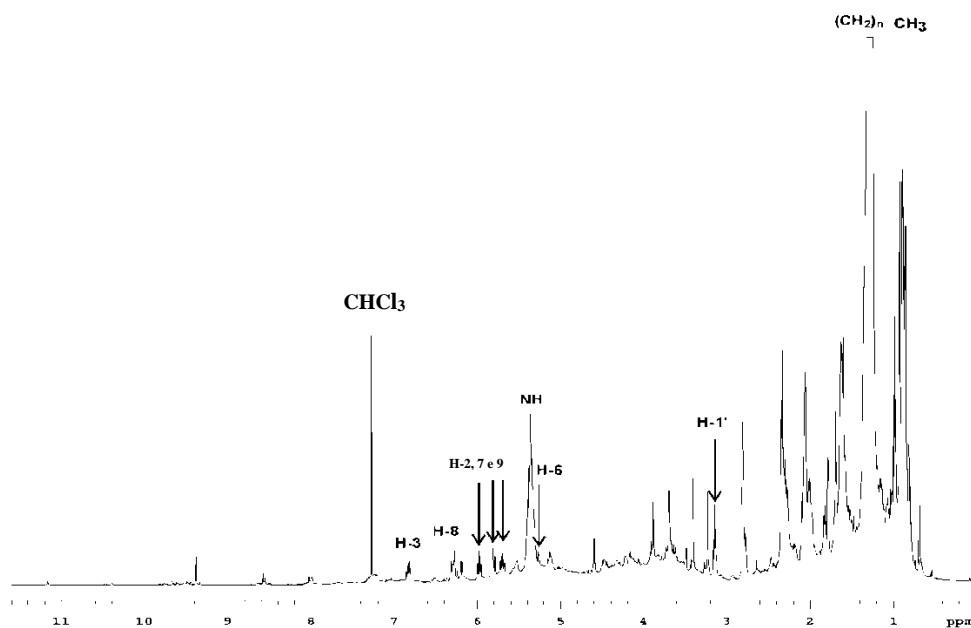


Figura 9. RMN ^1H da porção anfífila do extrato metanólico de folhas de Jambu liofilizadas com partição em CHCl_3 , redissolvido em CDCl_3 . Os sinais de NH, H-1', H-2, H-3, H-6, H-7 e H-8 do espilantol são identificados com setas.

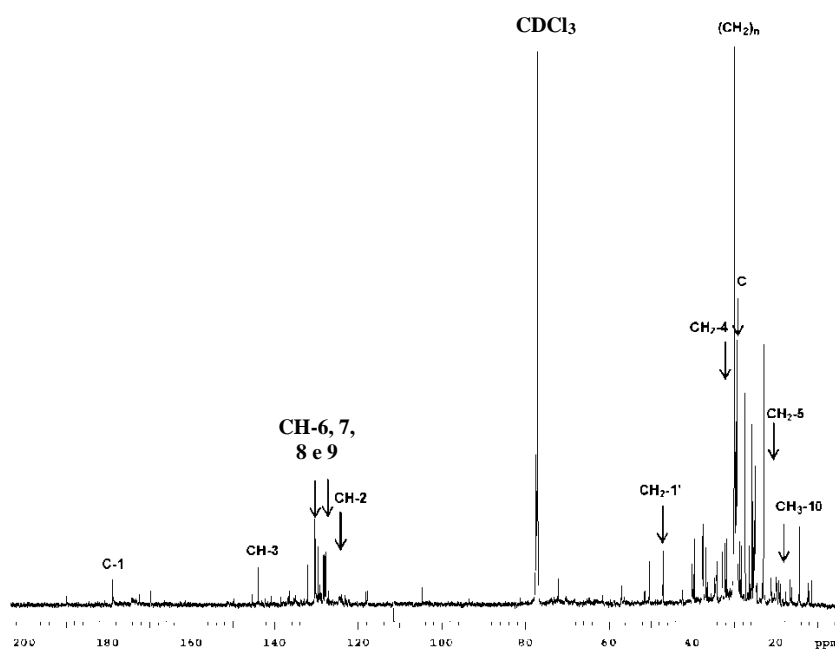


Figura 10. RMN ^{13}C da porção anfífila do extrato metanólico de folhas de Jambu liofilizadas com partição em CHCl_3 , redissolvido em CDCl_3 . Os sinais devido ao CH-1', CH-2, CH-3, CH-6, CH-7 e CH-8 do espilantol são identificados com setas.

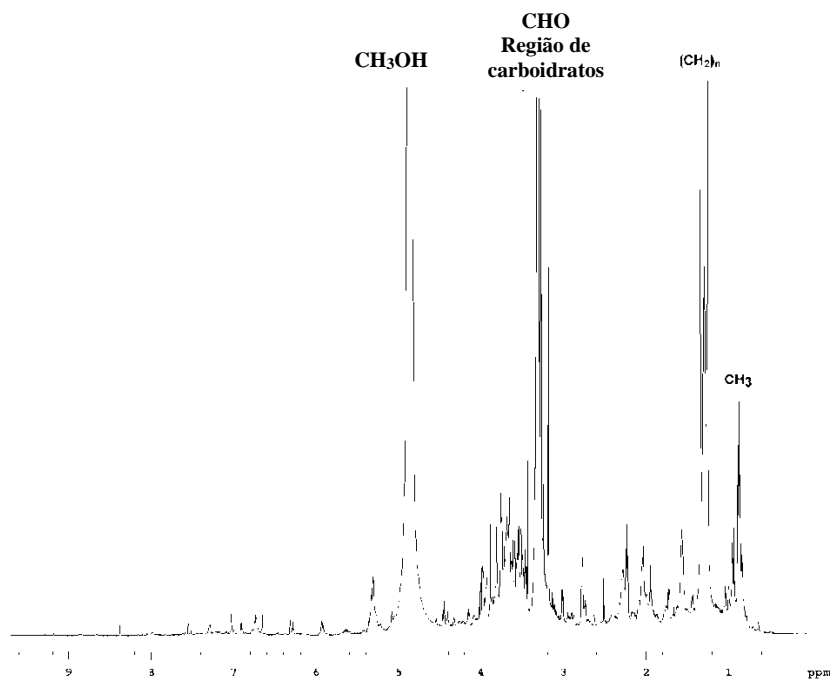


Figura 11. RMN ^1H do extrato metanólico de folhas de Jambu liofilizadas em CD_3OD .

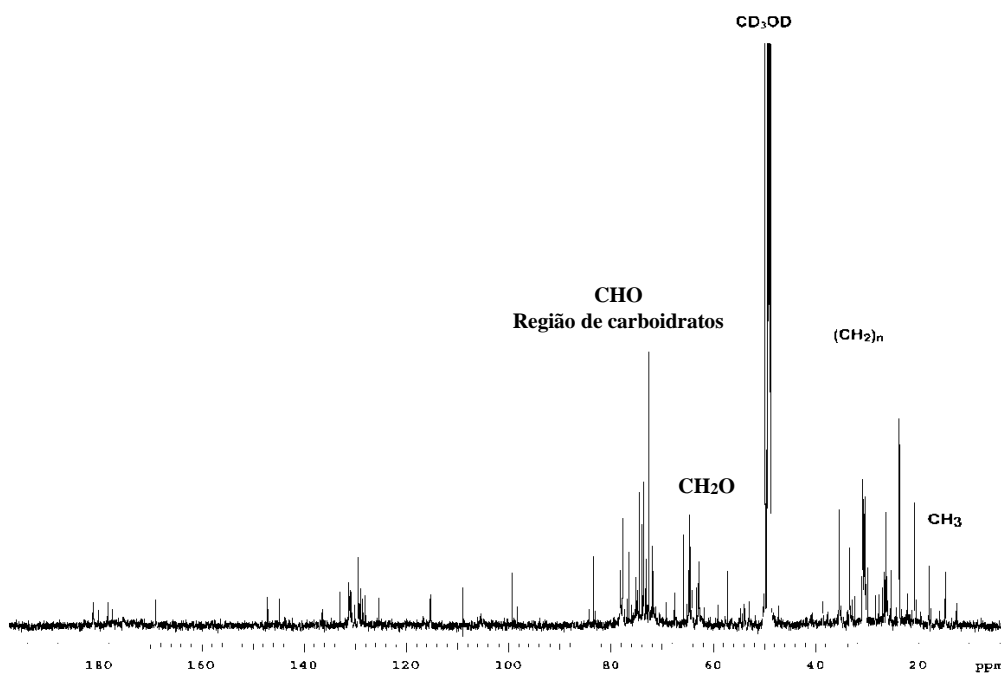


Figura 12. RMN ^{13}C do extrato metanólico de folhas de Jambu liofilizadas em CDCl_3 .

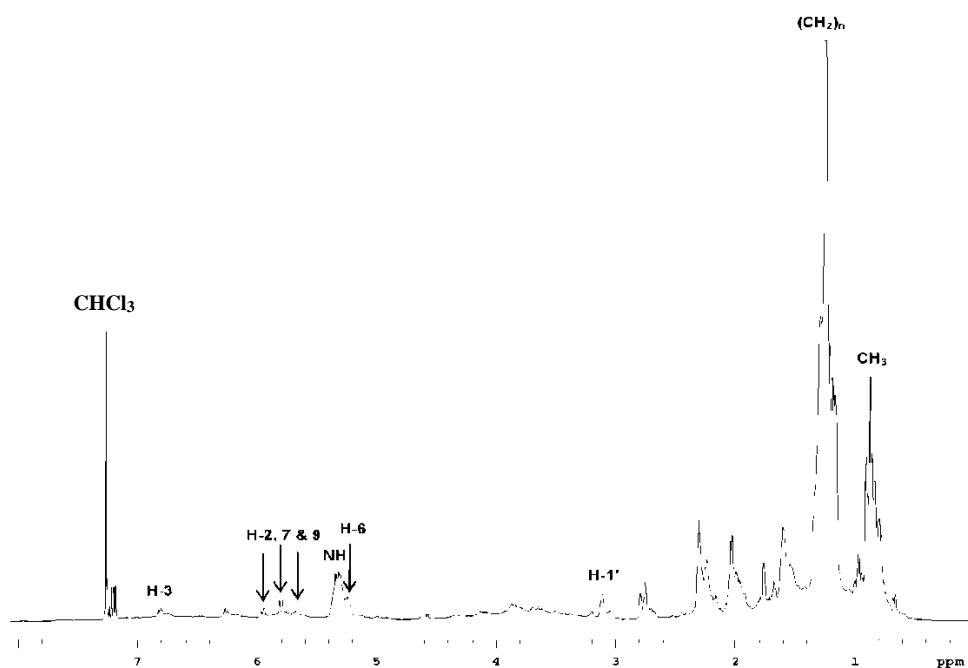


Figura 13. RMN ^1H da porção anifilica do extrato metanólico de hastes de Jambu liofilizadas com partição em CHCl_3 , redissolvido em CDCl_3 .

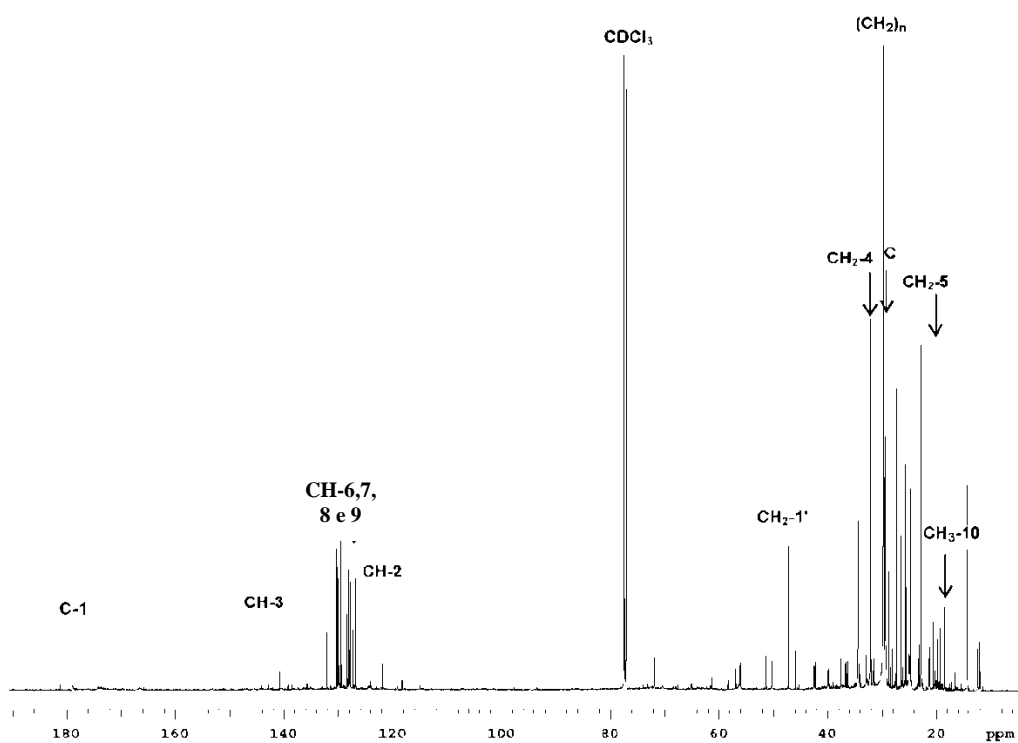


Figura 14. RMN ^{13}C da porção anifilica do extrato metanólico de hastes de Jambu liofilizadas com partição em CHCl_3 , redissolvido em CDCl_3 . Os sinais do CH-1', CH-2, CH-3, CH-6, CH-7 e CH-8 do espilantol são identificados no espectro.

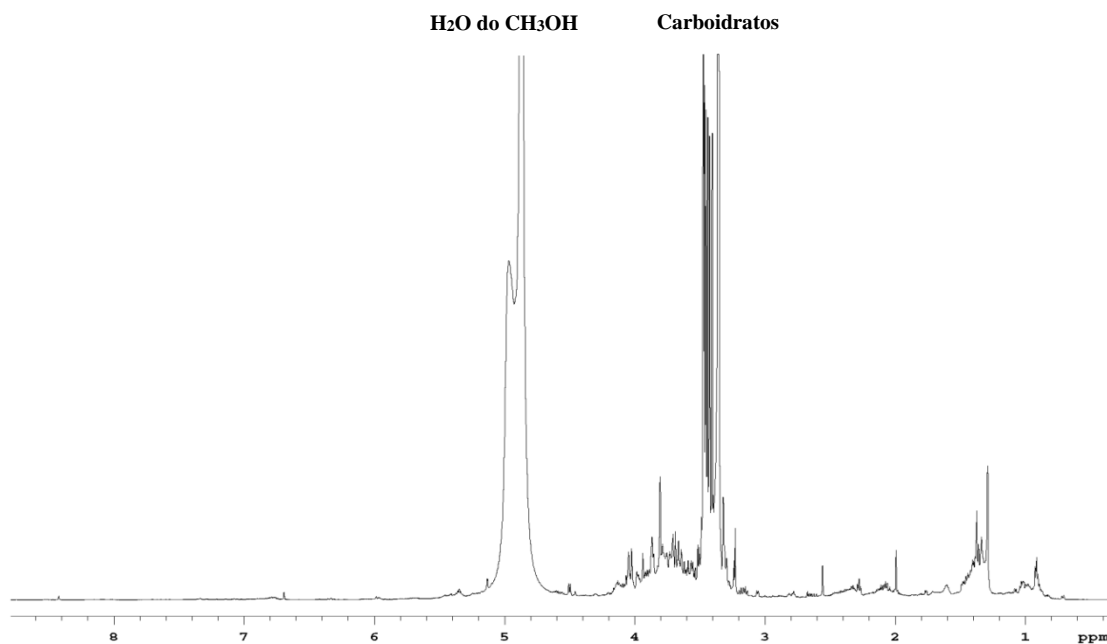


Figura 15. RMN ^1H do extrato metanólico de hastes de Jambu liofilizadas extraído à 100 °C e 10 MPa, em CD_3OD .

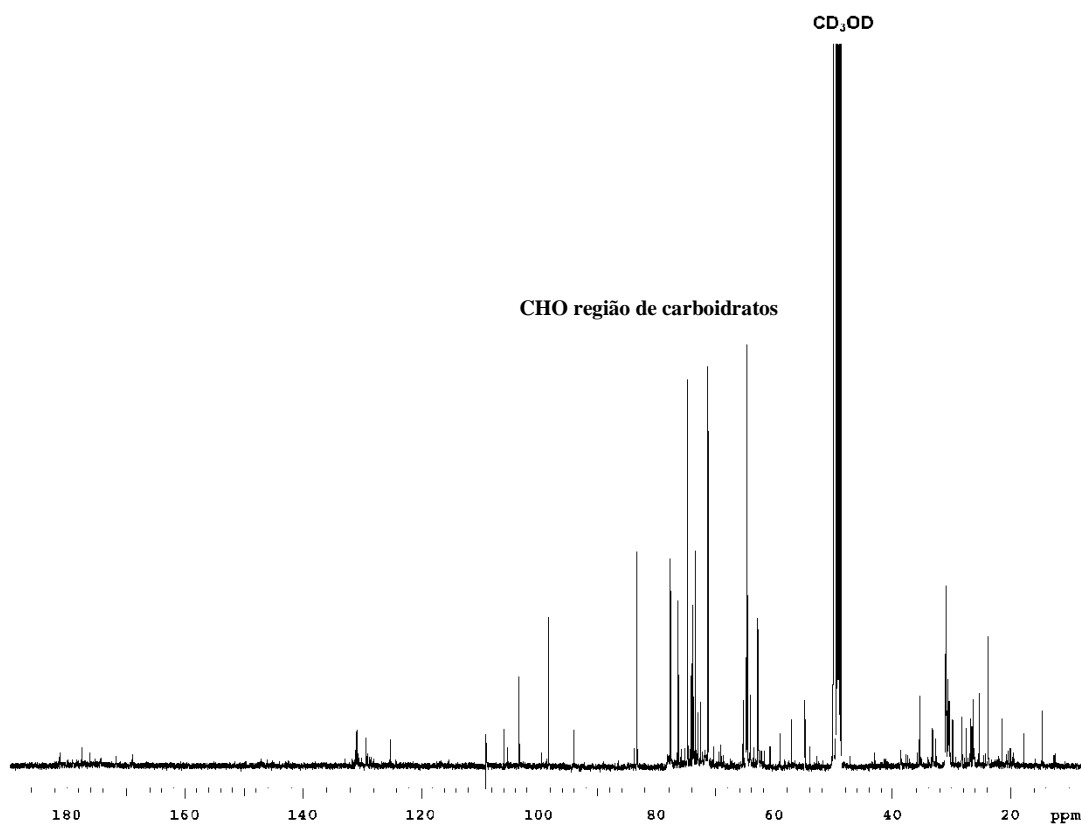


Figura 16. RMN ^{13}C do extrato metanólico de hastes de Jambu liofilizadas extraído à 100 °C e 10 MPa, em CD_3OD .

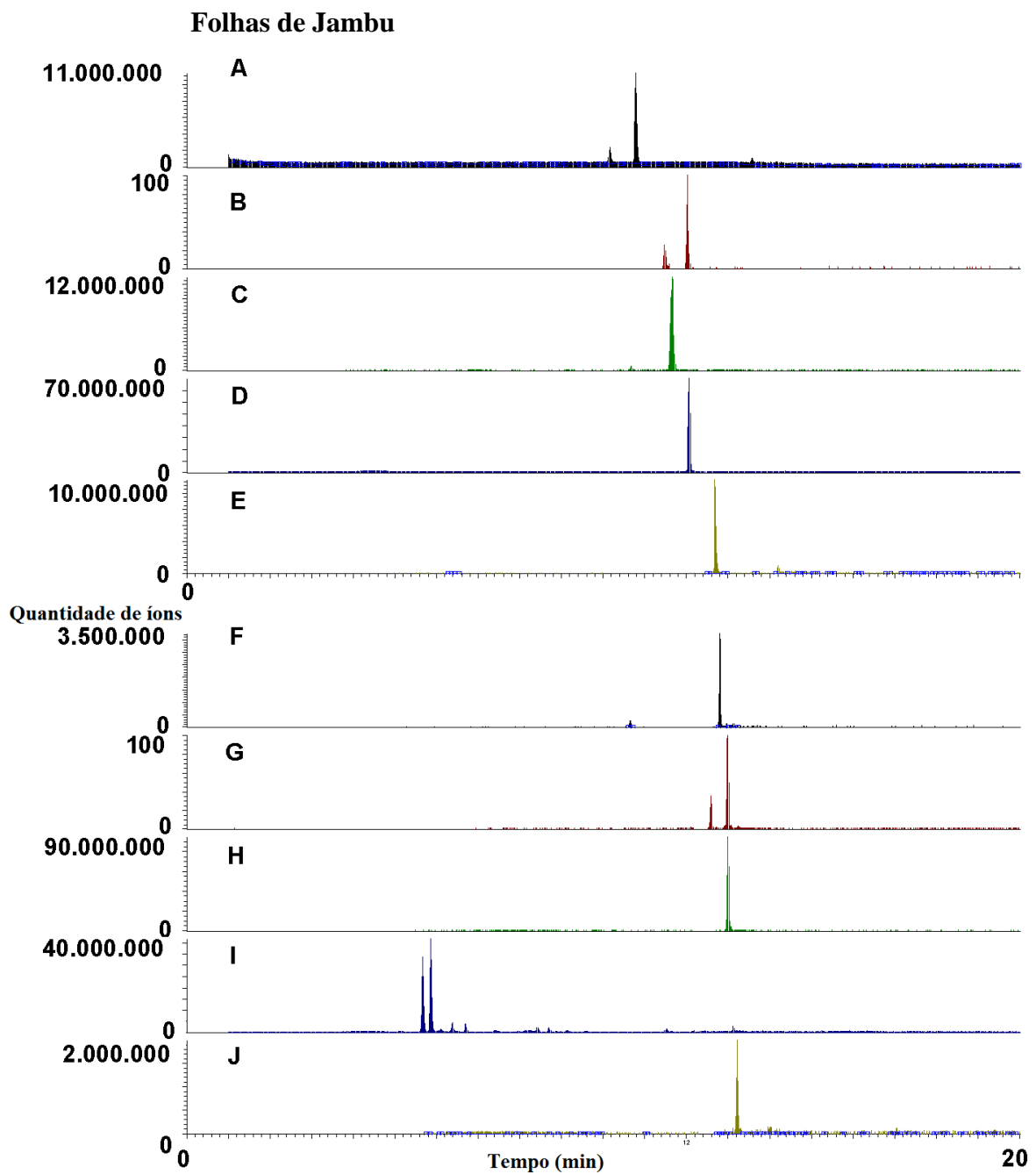


Figura 17. Cromatogramas CL-EMAR do extrato metanólico de folhas de Jambu liofilizadas extraídas à 100 °C e pressão de 10 MPa.

A Massa extraída para $[M+H]^+$ m/z 204,13829; **B** Massa extraída para $[M+H]^+$ m/z 252,13829
C Massa extraída para $[M+H]^+$ m/z 230,15394; **D** Massa extraída para $[M+H]^+$ m/z 232,16759
E Massa extraída para $[M+H]^+$ m/z 246,18524; **F** Massa extraída para $[M+H]^+$ m/z 258,18524
G Massa extraída para $[M+H]^+$ m/z 224,20087; **H** Massa extraída para $[M+H]^+$ m/z 236,20089
I Massa extraída para $[M+H]^+$ m/z 220,16959; **J** Massa extraída para $[M+H]^+$ m/z 248,20089

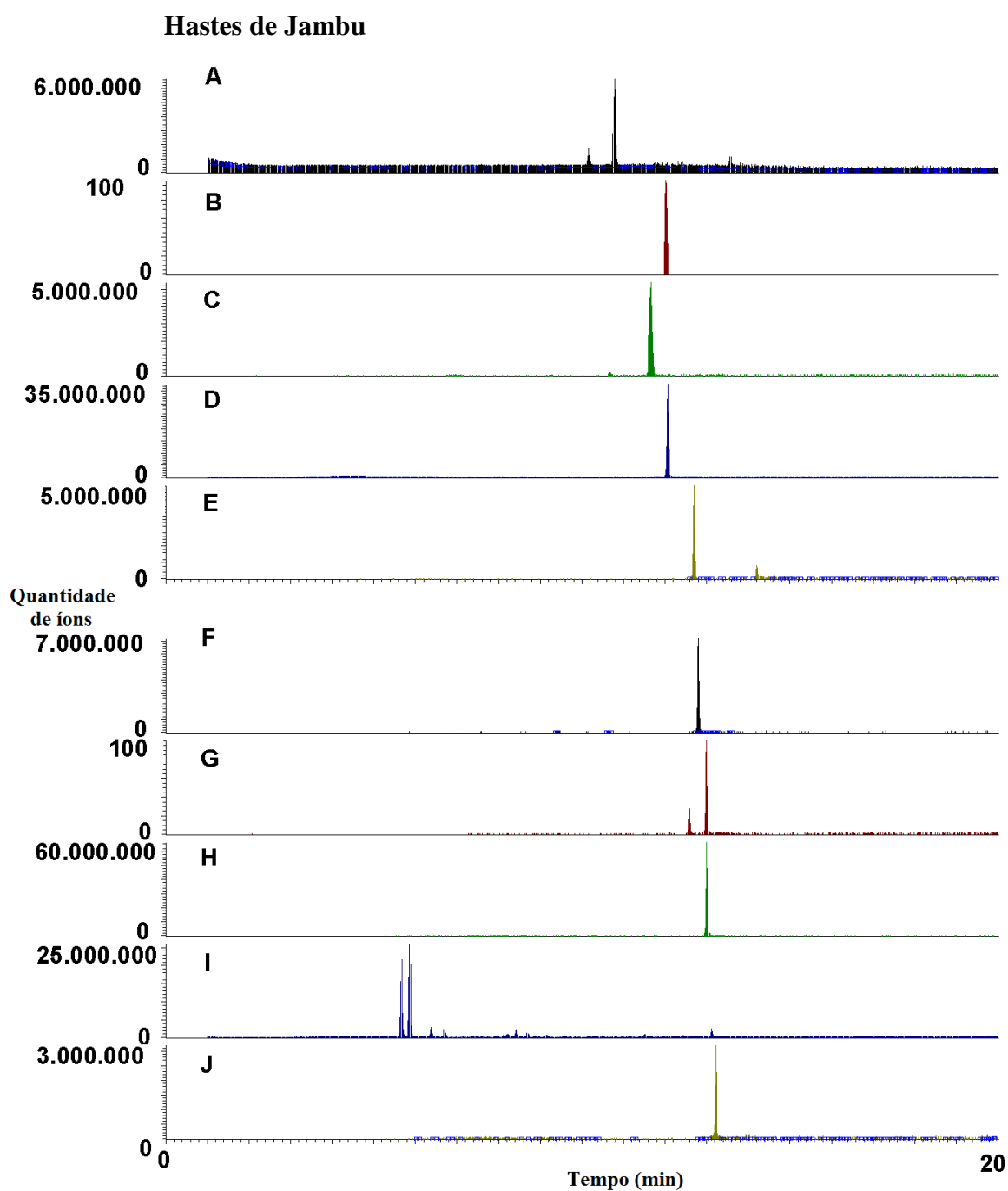


Figura 18. Cromatogramas CL-EMAR do extrato metanólico de hastes de Jambu liofilizadas extraídas à 100 °C e pressão de 10 MPa.

A Massa extraída para $[M+H]^+$ m/z 204,13829; **B** Massa extraída para $[M+H]^+$ m/z 252,13829
C Massa extraída para $[M+H]^+$ m/z 230,15394; **D** Massa extraída para $[M+H]^+$ m/z 232,16759
E Massa extraída para $[M+H]^+$ m/z 246,18524; **F** Massa extraída para $[M+H]^+$ m/z 258,18524
G Massa extraída para $[M+H]^+$ m/z 224,20087; **H** Massa extraída para $[M+H]^+$ m/z 236,20089
I Massa extraída para $[M+H]^+$ m/z 220,16959; **J** Massa extraída para $[M+H]^+$ m/z 248,20089.

4 Conclusões

A extração com metanol a seco à 100 °C e pressão de 10 MPa (100 atm) forneceu 31,1 % de extrato de capítulos, 28,3 % de folhas e 24,7 % de hastes de *A. oleracea*. A análise com CL-EMAR IES⁺ foi capaz de quantificar o espilantol e detectar pelo menos dez outras *N*-alquilamidas. As concentrações do espilantol nos capítulos, folhas e hastes foram de 16,5, 0,344 e 0,241 mg/g (base seca), respectivamente. Em contraste, o espilantol e as *N*-alquilamidas estavam presentes nos extratos metanólicos, em concentrações baixas. Os espectros de RMN dos extratos metanólicos apresentaram sinais mostrando que os carboidratos são os componentes majoritários nesses extratos. As frações ricas em substâncias anfifílicas, fração clorofórmica obtida através de partição dos extratos metanólicos, foram analisadas e detectaram as respectivas percentagens destas substâncias, sendo 7,69, 8,42 e 3,09 % (base seca), respectivamente em capítulos, folhas e hastes. Os sinais de RMN do espilantol foram observados nos espectros destas frações.

5 Referências bibliográficas

ABEYSINGHE, D. C.; WIJERATHNE, S. M. N. K.; DHARMADASA, R. M. Secondary metabolites contents and antioxidant capacities of *Acmella oleracea* grown under different growing systems. **World J. Agr. Res.**, v. 2, p. 163-167, 2014.

ABEYSIRI, G. R. P. I.; DHARMADASA, R. M.; ABEYSINGHE, D. C.; AMARASINGHE, K. Screening of phytochemical, physico-chemical and bioactivity of different parts of *Spilantes acmella* Murr. (Asteraceae), a natural remedy for toothache. **Ind. Crop. Prod.**, v. 50, p. 852-856, 2013.

AKIHISA, T.; SEINO, K.; KANEKO, E.; WATANABE, K.; TOCHIZAWA, S.; FUKATSU, M.; BANNO, N.; METONI, K.; KIMURA, Y. Melanogenesis inhibitory activities of iridoid, hemiterpene, and fatty acid-glycosides from the fruits of *Morinda citrifolia* (noni). **J. Oleo. Sci.**, v. 59, p. 49-57, 2010.

ALCANTARA, B. N. de; KOBAYASHI, Y. T.; BARROSO, K. F.; SILVA, I. D. R. da; ALMEIDA, M. B. de; BARBOSA, W. L. M. Pharmacognostic analyses and evaluation of the *in vitro* antimicrobial activity of *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen (Jambu) floral extracts and fractions. **J. Med. Plant Res.**, v. 9, p. 91-96, 2014.

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

BARBOSA, A. F.; CARVALHO, M. G. de; SMITH, R. E.; SABAA-SRUR, A. U. O. Spilanthol: occurrence, extraction, chemistry and biological activities. **Braz. J. Pharmacog.**, v. 26, p. 128-133, 2016.

BOONEN, J.; BAERT, B.; ROCHE, N.; BURVENICH, C.; DE SPIEGELEER, B.; BOONEN, J.; BAERT, B.; BURVENICH, C.; BLONDEEL, P.; DE SAEGET, S.; DE SPIEGELEER, B. LC-MS profiling of *N*-alkylamides in *Spilanthus acmella* extract and the transmucosal behavior of its main bioactive spilanthol. **J. Pharmaceut. Biomed. Anal.**, v. 53, p. 243-249, 2010.

BORGES, L. da S. **Biomassa, teores de nutrientes, espilantol e atividade antioxidante em plantas de Jambu (*Acmella ciliata* Kunth) sob adubação mineral e orgânica.** 2009. 108f.

Dissertação (Mestrado em Agronomia/Horticultura) - Programa de Pós-graduação em Agronomia/Horticultura, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

CASTRO, K. N. C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L. C.; LEITE, J. R. S. A.; SANTOS, R. C.; NETO, A. A. P.; COSTA-JÚNIOR, L. M. Acaricide activity *in vitro* of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus*. **Parasitol. Res.**, v. 113, p. 3697-3701, 2014.

CHUNG, K. -F.; KONO, Y.; WANG, C. -M.; PENG, C. I. Notes on *Acmella* (Asteraceae: Heliantheae) in Taiwan. **Bot. Stud.**, v. 49, p. 73-82, 2008.

CRUZ, P. B.; BARBOSA, A. F.; ZERINGÓTA, V.; MELP, D.; NOVATO, T.; FIDELIS, Q. C.; FABRI, R. L.; CARVALHO, M. G. de; SABAA-SRUR, A. U. O.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O. Acaricidal activity of metanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Vet. Parasitol.**, v. 228, p. 137-143, 2016.

DÉCIGA-CAMPOS, M.; ARRIAGA-ALBA, M.; VENTURA-MARTÍNEZ, R.; AGUILAR-GUADARRAMA, B.; RIOS, M. Y. Pharmacological and toxicological profile of extract from *Heliopsis longipes* and affinin. **Drug Develop. Res.**, v. 73, p. 130-137, 2012.

DEMARNE, F.; PASSARO, G. **Use of an *Acmella oleracea* extract for the botulinum toxin-like effect thereof in an anti-wrinkle cosmetic composition.** US Patent No. 7,531, 193 B2, 2009.

DIAS, A. M. A.; SANTOS, P.; SEABRA, I. J.; JUNIOR, R. N. C.; BRAGA, M. E. M.; SOUSA, H. C. de. Spilanthol from *Spilanthes acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction. **J. Supercrit. Fluids**, v. 61, 62-70, 2012.

DUBEY, S.; MAITY, S.; SINGH, M.; SARAF, S. A.; SAHA, S. Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes acmella*: A review. **Adv. Pharmacol. Sci.**, Article ID 423750, 2013.

GERBINO, A.; SCHENA, G.; MILANO, S.; MILELLA, L.; BARBOSA, A. F.; ARMENTANO, F.; PROCINO, G.; SVELTO, M.; CARMOSINO, M. Spilanthol from *Acmella oleracea* lowers the intracellular levels of cAMP impairing NKCC2 phosphorylation and water channel AQP2 membrane expression in mouse kidney. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, e0156021, 2016.

HERNÁNDEZ, I.; MÁRQUEZ, L.; MARTÍNEZ, I.; DIEGUEZ, R.; DELPORTE, C.; PRIETO, S.; MOLINA-TORRES, J.; GARRIDO, G. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract and alkaloids-derived from *Heliopsis longipes* roots. **J. Ethnopharmacol.**, v. 124, p. 649-652, 2009.

HIND, N.; BIGGS, N. Plate 460. *Acmella oleracea* Compositae. **Curtis's Bot. Mag.**, v. 20, p. 31-39, 2003.

JOHNS, T.; GRAHAM, K.; TOWERS, G. H. N. Molluscicidal activity of affinin and other isobutylamides from the Asteraceae. **Phytochem.**, v. 21, p. 2737-2738, 1982.

- KADIR, H. A.; ZAKARIA, M. B.; KECHIL, A. A.; AZIRUN, M. S. Toxicity and electrophysiological effects of *Spilanthes acmella* Murr. extracts on *Periplaneta americana* L. **Pest. Sci.**, v. 25, p. 329-335, 1989.
- KIM, H.-K.; KWON, M.-K.; KIM, J.-N. Identification of novel fatty acid glucosides from the tropical fruit *Morinda citrifolia* L. **Phytochem. Lett.**, v. 3, p. 238-241, 2010.
- LIM, Y. Y.; LIM, T. T.; TEE, J. J. Antioxidant properties of guava fruit: comparison with some local fruits. **Sunway Acad. J.**, v. 3, p. 9-20, 2006.
- LUO, R.; TRAN, K.; LEVINE, R. A.; NICKOLS, S. M.; MONROE, D.; SABAA-SRUR, A. U. O.; SMITH, R. E. Distinguishing components in Brazilian açai and in products obtained in the USA by using NMR. **Nat. Prod. J.**, v. 2, p. 86-94, 2012.
- MARTINS, C. P. S.; MELO, M. T. P.; HONÓRIO, I. C. G.; D'ÁVILA, V. A.; CARVALHO, JÚNIOR, W. G. O. Morphological and agronomic characterization of Jambu (*Spilanthes oleracea* L.) accessions under the conditions of North Minas Gerais State, Brazil. **Rev. Bras. Plantas Medicina Botucatu**, v. 14, p. 410-413, 2012.
- MBEUNKUI, F.; GRACE, M. H.; LATEGAN, C.; SMITH, P. J.; RASKIN, I.; LILA, M. A. Isolation and identification of antiplasmodial *N*-alkylamides from *Spilanthes acmella* flowers using centrifugal partition chromatography and ESI-IT-TOF-MS. **J. Chromatogr. B**, v. 879, p. 1886-1892, 2011.
- MISHRA, A.; ROY, S.; MAITY, S.; YADAV, R. K.; KESHARI, A. K.; SAHA, S. Antiproliferative effect of flower extracts of *Spilanthes paniculata* on hepatic carcinoma cells. **Int. J. Pharmaceut. Sci.**, v. 7, p. 130-134, 2015.
- MOLINA-TORRES, J.; SALAZAR-CABRERA, C. J.; ARMENTA-SALINAS, C.; RAMÍREZ-SÁNCHEZ, E. Fungistatic and bacteriostatic activities of alkamides from *Heliopsis longipes* roots: affinin and reduces amides. **J. Agr. Food Chem.**, v. 52, p. 4700-4704, 2004.
- MORENO, S. C.; CARVALHO, G. A.; PICANÇO, M. C.; MORAIS, E. G. F.; PEREIRA, R. M. Bioactivity of compounds from *Acmella oleracea* against *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera: Gelechiidae) and selectivity to two non-target species. **Pest. Manag. Sci.**, v. 68, p. 386-393, 2012.
- NAKATANI, N.; NAGASHIMA, M. Pungent alkamides from *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* Clarke. **Biosci. Biotech. Biochem.**, v. 56, p. 759-762, 1992.
- NAYAK, S.; MEGI, S. Immunostimulant activity of noni (*Morinda citrifolia*) on T and B lymphocytes. **Pharmaceut. Biol.**, v. 48, p. 724-731, 2010.
- PANDEY, V.; CHOPRA, M.; AGRAWAL, V. *In vitro* isolation and characterization of biolarvicidal compounds from micropropagated plants of *Spilanthes acmella*. **Parasitol. Res.**, v. 108, p. 297-304, 2011.
- PRACHAYASITTUKAL, V.; PRACHAYASITTUKAL, S.; RUCHIWARAT, S.; PRACHAYASITTUKAL, V. High therapeutic potential of *Spilanthes acmella*: A review. **EXCLI J.**, v. 12, p. 291-312, 2013.

- RAMSEWAK, R. S.; ERICKSON, A. J.; NAIR, M. G. Bioactive *N*-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes Acmella*. **Phytochem.**, v. 51, p. 729-732, 1999.
- RICHARDS, K. M.; TRAN, K.; LEVINE, R. A.; LUO, R.; MAIA, G. M.; SABAA-SRUR, A. U. O.; MACIEL, M. I. S.; MELO, E. A.; MORAES, M. R. de; GODOY, H. T.; CHAVES, M. A.; SACRAMENTO, C. K. do; THOMAS, A. L.; SMITH, R. E. Improved extraction of soluble solids from fruits. **Nat. Prod. J.**, v. 4, p. 201-210, 2014.
- RIOS, M. Y.; AGUILAR-GUADARRAMA, A. B.; GUTIERREZ, M. D. Analgesic activity of affinin, an alkamide from *Heliopsis longipes* (Compositae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 110, p. 364-367, 2007.
- SANA, H.; RANI, A. S.; SULAKSHANA, G. Determination of antioxidant potential In *Spilanthes acmella* using DPPH assay. **Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.**, v. 3, p. 219-223, 2014.
- SELVAM, N. T.; VENKATAKRISHNAN, V.; DHAMODHARAN, R.; MURUGESAN, S.; KUMAR, S. Hepatoprotective activity of methanolic extract of *Syzygium jambos* (Linn.) leaf against paracetamol intoxicated Wistar albino rats. **Ayu.**, v. 34, p. 305-308, 2013.
- SHARMA, V.; BOONEN, J.; CHAUHAN, N.S.; THAKUR, M.; DE SPIEGELEER, B.; DIXIT, V. K. *Spilanthes acmella* ethanolic flower extract: LC-MS alkylamide profiling and its effects on sexual behavior in male rats. **Phytomed.**, v. 18, p. 1161-1168, 2011.
- SIMAS, N. K.; DELLAMORA, E. C. L.; SCHRIPSEMA, J.; LAGE, C. L. S.; FILHO, A. M. O.; WESSJOHANN, L.; PORZEL, A.; KUSTER, R.M. Acetylenic 2-phenylethylamides and new isobutylamides from *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, a Brazilian spice with larvicidal activity on *Aedes aegypti*. **Phytochem. Lett.**, v. 6, p. 67-72, 2013.
- SOARES, C. P.; LEMOS, V. R.; SILVA, A. G. da; CAMPOY, R. M.; SILVA, C. A. P. da; MENEGON, R. F.; ROJAHN, I.; JOAQUIM, W. M. Effect of *Spilanthes acmella* hydroethanolic extract activity on tumour cell actin cytoskeleton. **Cell Biol. Int.**, v. 38, p. 131-135, 2014.
- SPELMAN, K.; DEPOIX, D.; MCCRAY, M.; MOURAY, E.; GRELLIER, P. The traditional Medicine *Spilanthes acmella*, and the alkylamides spilanthol and undeca-2*E*-ene-8,10-dienoic acid isobutylamide, demonstrate *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity. **Phytother. Res.**, v. 25, p. 1098-1100, 2011.
- VERYSER, L.; WYNENDAELE, E.; TAEVERNIER, L.; VERBEKE F.; JOSHI, T.; TATKE, P.; DE SPIEGELEER, B. *N*-alkylamides: from plant to brain. **Func. Foods Health Dis.**, v. 4, p. 264-275, 2014.
- WU, L.-C.; FAN, N. C.; LIN, M.-H.; CHU, I.-R.; HUANG, S. J.; HAN S.Y. Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. **J. Agr. Food Chem.**, v. 56, p. 2341-2349, 2008.

CAPÍTULO V.

EFEITO DO EXTRATO METANÓLICO E FRAÇÕES DE *Acmella oleracea* SOBRE A ENZIMA TIROSINASE

Artigo publicado no Brazilian Journal of Pharmacognosy

BARBOSA, A. F.; SILVA, K. C. B.; OLIVEIRA, M. C. C. de; CARVALHO, M. G. de; SABAA-SRUR, A. U. O. Effects of *Acmella oleracea* methanolic extract and fractions on the tyrosinase enzyme. **Braz. J. Pharmacog.**, v. 26, p. 321-325, 2016. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.01.004>

**Alan F Barbosa^{1*}, Keila C B Silva², Márcia C C de Oliveira², Mário G de Carvalho²,
Armando U O Sabaa-Srur^{1,3†}**

¹Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

²Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

³Instituto de Nutrição, Departamento de Nutrição Básica e Experimental, University Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito do extrato metanólico e das frações hexânica (84,28 % espilantol) e diclorometano (cerca de 100 % espilantol) de Jambu sobre a enzima tirosinase. O extrato de Jambu desidratado foi obtido por maceração com metanol. O resíduo do extrato foi solubilizado em MeOH/H₂O (8:2) e submetido a partição Líq.-líq com solventes orgânicos. Ambas as extrações e partições foram realizadas em 3 repetições e as análises foram realizadas utilizando CG-EM e RMN ¹H e ¹³C. As frações hexânicas forneceram amostras contendo 84,28, 82,91 e 62,83 % de espilantol nas repetições 1, 2 e 3, respectivamente. A fração diclorometano apresentou 88,55 % de espilantol na repetição 1, e cerca de 100 % de espilantol nas repetições 2 e 3. O extrato de Jambu, bem como a fração hexânica (84,28 % de espilantol) foram capazes de ativar a atividade oxidante da enzima tirosinase para L-DOPA. A fração diclorometano (cerca de 100 % espilantol) mostrou forte efeito de inibição da enzima tirosinase nos primeiros 10 min. Estes resultados levantam o interesse no estudo em formulações para uso tópico do espilantol, uma vez que pode prevenir a hiperpigmentação cutânea ou processos de despigmentação. Além disso, o espilantol pode ser utilizado no controle do escurecimento enzimático em frutas e hortaliças.

Palavras-chave: Jambu, *Acmella oleracea*, Espilantol, Tirosinase.

ABSTRACT

The current study aims to evaluate the effect of methanolic extract, hexane (84.28 % spilanthol) and dichloromethane (approximately 100 % spilanthol) fractions of *Acmella oleracea* on the tyrosinase enzyme. The extract from dehydrated Jambu was obtained by maceration using methanol. The extract residue was solubilized in MeOH/H₂O (8:2) and subjected to Liq.-liq partition with organic solvents. Both extraction and partition were conducted in 3 replicates and the analyses were performed using GC-MS, ¹H and ¹³C NMR. The hexane fraction provided samples containing 84.28, 82.91 and 62.83 % of spilanthol in repetitions 1, 2 and 3, respectively. The fraction obtained with dichloromethane showed 88.55 % of spilanthol in repetition 1, and approximately 100 % spilanthol in repetitions 2 and 3. The Jambu extract as well as the hexane fraction (84.28 % spilanthol) were able to activate the oxidizing activity of the tyrosinase enzyme for L-DOPA. The dichloromethane fraction (approximately 100%

spilanthol) showed stronger inhibition effect of the tyrosinase enzyme within the first 10 min. These results raise the interest in the study on spilanthol formulations for topical use, since it may prevent and/or slow skin hyperpigmentation or depigmentation processes. Furthermore, spilanthol may be used in the control of enzymatic browning in fruits and vegetables.

Key words: Jambu, *Acmella oleracea*, Spilanthol, Tyrosinase.

1 Introdução

Acmella oleracea é uma planta nativa da Amazônia, popularmente conhecida como Jambu. Ela é frequentemente utilizada como condimento em pratos típicos na culinária do norte do Brasil, como tacacá e pato-no-tucupi. Ela também é usada na medicina popular para tratar estomatite, resfriados e dores em geral (NASCIMENTO et al., 2013). *A. oleracea* é considerada uma planta nativa e muito importante na região amazônica, e é encontrada em grandes áreas de cultivo (REBELLO e HOMMA, 2005). O espilantol foi o principal metabólito frequentemente isolado de *A. oleracea*. É uma amida alifática descrita como um óleo viscoso, que produz efeito anestésico e formigamento na língua (MOLINA-TORRES et al., 1996), e também é capaz de penetrar a pele (BOONEN et al., 2010a,b; SPIEGELEER et al., 2013). Além disso, o espilantol tem efeito anti-rugas (DEMARNE e PASSARO, 2005), diurético (RATNASOORIYA et al., 2004; GERBINO et al., 2016), fungistático e bacteriostático (MOLINA-TORRES et al., 2004), apresenta propriedades sensoriais (LEY et al., 2006), atividade anti-séptica, estimulação imune (ROJAS et al., 2006), propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (DIAS et al., 2012), indução a secreção de saliva (RAMSEWAK, ERICKSON e NAIR, 1999; SHARMA et al., 2011), analgésico (RIOS et al., 2007), atividade acaricida (CASTRO et al., 2014; CRUZ et al., 2016), bem como utilização contra doenças de pele, tais como eczema (BOONEN et al., 2010a,b).

A. oleracea tem propriedades químicas importantes que despertou o interesse da indústria farmacêutica, devido ao seu metabólito ativo, espilantol (BORGES et al., 2012). Atualmente, a busca por produtos naturais com ação inibitória sobre o processo melanização aumentou com foco na fenol oxidase tirosinase.

A tirosinase, também conhecida como uma polifenol oxidase (PPO), está largamente distribuída em microrganismos, animais e plantas. Ela catalisa a oxidação de monofenóis, *o*-difenois e *o*-quinonas (KARIOTI et al., 2007). A tirosinase é conhecida como uma enzima chave na biossíntese da melanina e é responsável pela melanização nos animais e escurecimento de plantas. A tirosinase também é responsável por reações escurecimento enzimático em frutas e hortaliças danificadas durante o manuseio e processamento pós-colheita. Assim, controlar o escurecimento enzimático é essencial durante os processos de fabricação de polpa de fruta e derivados (SEO et al., 2003; KHAN et al., 2006).

A síntese de tirosinase ocorre dentro de organelas altamente especializadas chamadas melanossomas. Estudos têm demonstrado a presença da tirosinase em todos os melanomas avaliados (FIGUEIREDO, 2003). O aumento da produção e acumulação de melanina pode levar a distúrbios, tais como melasma (MIOT, 2009). Muitos produtos químicos e alimentos têm demonstrado efeito inibitório sobre a melanogênese, através da inibição da atividade da enzima tirosinase. Esse resultado aumentou a demanda por produtos naturais. Assim, o objetivo do presente estudo é avaliar o efeito do extrato metanólico de *A. oleracea* e frações hexânica (84,28 % de espilantol) e diclorometano (cerca de 100 % de espilantol) sobre a enzima tirosinase.

2 Material e métodos

2.1 Jambu

O material vegetal (folhas, hastes e inflorescências) das amostras de Jambu foi coletado na cidade de Igarapé-Açu, que está localizada na Região Bragantina, no nordeste do estado do Pará, Brasil, nas coordenadas: 01° 07 '33' 'S e 47° 37' 27 'O (OLIVEIRA et al., 2011). A planta (MG205534) foi identificada como *Acmella oleracea* L. e incorporada ao herbário do Museu Emílio Goeldi, Belém, Estado do Pará.

A planta foi inicialmente lavada com água para remover os resíduos do solo. As raízes foram removidas usando facas inoxidáveis, e as partes rasgadas e amassadas da planta, bem como aquelas escurecidas foram eliminadas. As matérias-primas foram higienizadas através de imersão em solução contendo 200 ppm (mg.L^{-1}) de cloro residual livre a partir de hipoclorito de sódio com 10 % de pureza, durante 10 minutos. A última lavagem foi realizada através da imersão numa solução contendo 5 ppm (mg.L^{-1}), durante 10 minutos, com subsequente drenagem da água.

O processo de secagem à frio foi realizado em sala climatizada com ar condicionado (Midea, modelo MS2E-18CR, Brasil) à 25 °C, e desumidificador (Arsec, modelo 160, Brasil). A sala com 4 m² permaneceu fechada durante o processo de secagem.

2.2 Procedimento de extração

O material vegetal de *A. oleracea* seco foi triturado e submetido à maceração exaustiva com metanol (MeOH) à temperatura ambiente (MBEUNKUI et al., 2011). O solvente foi removido em evaporador rotativo a 40 °C sob pressão reduzida. O metanol utilizado tinha 99,8 % de pureza e a extração foi efetuada durante cerca de 30 dias, com aproximadamente 6 litros de solvente. O extrato metanólico foi solubilizado em MeOH/H₂O (8:2) e a solução foi submetida a extrações sucessivas em funil de separação com os solventes: hexano [$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$], diclorometano (CH_2Cl_2) e acetato de etila (AcOEt), conforme Figura 1. Três repetições foram realizadas para obter o extrato, bem como a extração Líq-líq.

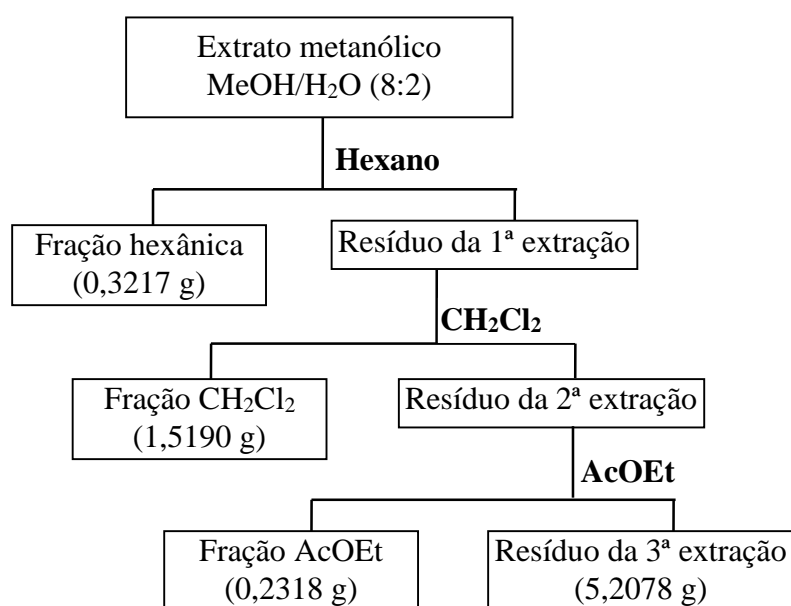


Figura 1. Fracionamento do extrato metanólico de *A. oleracea* na segunda repetição.

2.3 Atividade da enzima tirosinase

Os reagentes utilizados para os testes da enzima tirosinase foram obtidos na Sigma-Aldrich. A atividade de inibição da tirosinase foi medida com UV-Vis de acordo com o método de Patil e Zucker (1965) com modificações.

As modificações consistiram na utilização de concentração diferente de EDTA. Além disso, a L-DOPA foi utilizada como substrato e, finalmente, a tirosinase comercial foi utilizada. O extrato metanólico de Jambu e as frações hexânica (84,28 % espilantol) e diclorometano (contendo aproximadamente 100 % espilantol) foram solubilizados em dimetilsulfóxido (10 mg.mL⁻¹) e diferentes alíquotas da solução foram adicionadas ao meio de reação contendo a enzima tirosinase (50-100 unidades), EDTA (0,022 mmol.L⁻¹), L-DOPA (0,17 mmol.L⁻¹) em PBS (50 mmol.L⁻¹, pH 8,0) em temperatura ambiente. O tempo para esta fenolase oxidar a L-DOPA foi de 30 min. As leituras de reação foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu, modelo Mini-1240, Japão) de UV-Vis a 475 nm.

O outro teste avaliado foi a ação do extrato metanólico do Jambu usando o meio de reação da enzima com incidência direta de irradiação ultravioleta à 312 nm (UV utilizando lâmpada 131) em intervalos de 10 min e 30 min.

As concentrações de 0,66 e 0,16 mg.mL⁻¹ (extrato metanólico), 0,51-0,05 mM (fração hexânica contendo aproximadamente 84,28 % de espilantol) e 0,53 mM (fração diclorometano contendo cerca de 100 % de espilantol) foram utilizadas no ensaio da avaliação da cinética da enzima na presença das amostras. A evolução da reação foi monitorada por leituras em UV-Vis à 475 nm durante 30 min e 60 min em intervalos de 10 min. Os valores da ativação e inibição foram calculados a partir da equação 1:

$$\% \text{inib} = \left\{ \frac{[(B_{30} - B_0) - (A_{30} - A_0)]}{(B_{30} - B_0)} \right\} \times 100 \quad (1)$$

onde B₀= absorbância de L-DOPA + tirosinase no t = 0 min, B₃₀= absorbância de L-DOPA + tirosinase no tempo = 30 min, A₀= absorbância de L-DOPA + tirosinase + inibição/ativação no tempo = 0 min, e A₃₀= absorbância de L-DOPA + tirosinase + inibição/ativação no tempo = 30 min.

A equação anterior permite avaliar a ação de extratos vegetais e substâncias orgânicas sobre a enzima tirosinase no t = 0 min. A possível absorção das amostras à 475 nm (que estão relacionados com a produção dopacromona) é subtraída.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em média ± DP. Os gráficos foram obtidos utilizando o *software* Origin (função estatística ANOVA).

2.4 Análises químicas

As frações hexânicas e diclorometano foram analisadas por meio de um Cromatógrafo a Gás acoplado a um Espectrômetro de Massas - CG/EM (Shimadzu, modelo QP-2010, Japão) e através de RMN ¹H e ¹³C (Bruker, modelo advance III, EUA). Diclorometano (99,9 %, grau CLAE, Sigma-Aldrich Inc., EUA) foi utilizado como solvente para a análise de CG/EM. O CDCl₃ (99 %, Sigma-Aldrich Inc., EUA) foi utilizado como solvente nas análises de RMN das frações. O MeOD₄ (99 %, Sigma-Aldrich Inc., EUA) foi utilizado como solvente na análise de RMN do extrato metanólico de Jambu. O CG/EM foi equipado com coluna de sílica fundida VF-5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm espessura da película), usando hélio como gás de transporte a 1 mL/min. A temperatura inicial do forno foi de 100 °C; foi mantida constante

durante 40 min e com aumento de 10 °C.min⁻¹ até 290 °C. O volume de injeção da amostra foi de 1 µL (1:50 modo split). Tanto o injetor como o detector foi fixado em 300 °C. A porcentagem de cada componente foi calculada através da área sob a área integral dos respectivos picos em comparação com a área total de todos os componentes da amostra. Os espectros de massas foram postulados pela biblioteca CG-EM Postrun Analysis da Shimadzu. O componente principal foi identificado de acordo com informações a partir dos métodos de análise anteriormente mencionados e comparação utilizando os dados RMN ¹H (espectrômetro Bruker 500 MHz) e RMN de carbono ¹³C (espectrômetro Bruker 125 MHz).

Foi quantificado o teor de espilantol no extrato metanólico de Jambu utilizando a CL-EMAR ISE⁺ de acordo com metodologia proposta por Cruz e colaboradores (2016).

3 Resultados e discussão

A Tabela 1 apresenta os dados do extrato metanólico de *A. oleracea* e as frações das três repetições.

Tabela 1. Frações obtidas no extrato metanólico a partir de folhas, hastes e inflorescências de *A. oleracea*

Repetições (massa de Jambu seco)	Massa do extrato metanólico	Frações	Código	Massa da fração (g)	% de espilantol
1 ^a (66,00)	12,51	Hexano	F1R1	0,0821	84,28
		Diclorometano	F2R1	0,2264	88,55
		Acetato de etila	F3R1	0,2662	-
		Resíduo	F4R1	4,4151	-
2 ^a (265,00)	48,45	Hexano	F1R2	0,3217	82,90
		Diclorometano	F2R2	1,5190	100,00
		Acetato de etila	F3R2	0,2318	-
		Resíduo	F4R2	5,2078	-
3 ^a (263,90)	40,58	Hexano	F1R3	0,3819	62,83
		Diclorometano	F2R3	3,1742	79,41
			F2R32	0,4569	100,00
		Acetato de etila	F3R3	0,2791	-
	Resíduo	F4R3	6,9670	-	

F1R1 = fração hexânica do Jambu 1^a repetição

F1R2 = fração hexânica do Jambu 2^a repetição

F1R3 = fração hexânica do Jambu 3^a repetição

F2R1 = fração diclorometano do Jambu 1^a repetição

F2R2 = fração diclorometano do Jambu 2^a repetição

F2R3 = fração diclorometano do Jambu 3^a repetição

F3R1 = fração acetato de etila de Jambu 1^a repetição

F3R2 = fração acetato de etila de Jambu 2^a repetição

F3R3 = fração acetato de etila de Jambu 3^a repetição

F4R1 = fração residual de Jambu 1^a repetição

F4R2 = fração residual de Jambu 2^a repetição

F4R3 = fração residual de Jambu 3^a repetição

O componente principal das frações hexânica (F1R1) e diclorometano (F2R32) foi identificado através dos picos com tempo de retenção 12,21 e 12,09 minutos (Figura 2a e Figura 4). Ambos os picos apresentaram sinais principais m/z (%): (M^+ , 2) 221, 141 ($M-C_6H_8$, 50), 126 ($[C_7H_{12}NO]^+$, 40), 98 ($[C_5H_8NO]^+$, 35), 81 ($C_6H_9^+$, 100), como é apresentado na Figura 2b, e estes dados estão de acordo com a estrutura do espilantol. Na Figura 3 é apresentada uma proposta de fragmentação para justificar os principais picos do espectro de massas do espilantol, com as abundâncias relativas. A estrutura do espilantol também foi confirmada através da análise de RMN 1H e ^{13}C (Figuras 5, 6, 7, 8, 9, e 10) e comparação com os dados descritos na literatura (NAKATANI e NAGASHIMA, 1992).

É importante destacar a presença da *N*-(2-metilbutil)-(2*E*,6*Z*,8*E*)-decatrienamida na fração hexânica. A estrutura química desta amida é semelhante a do espilantol. Esta substância também é conhecida como homoespilantol e é a segunda *N*-alquilamida mais abundante no extrato etanólico de *Spilanthes*, uma vez que representa 9,04 % da quantidade total das *N*-alquilamidas (BOONEN et al., 2010a).

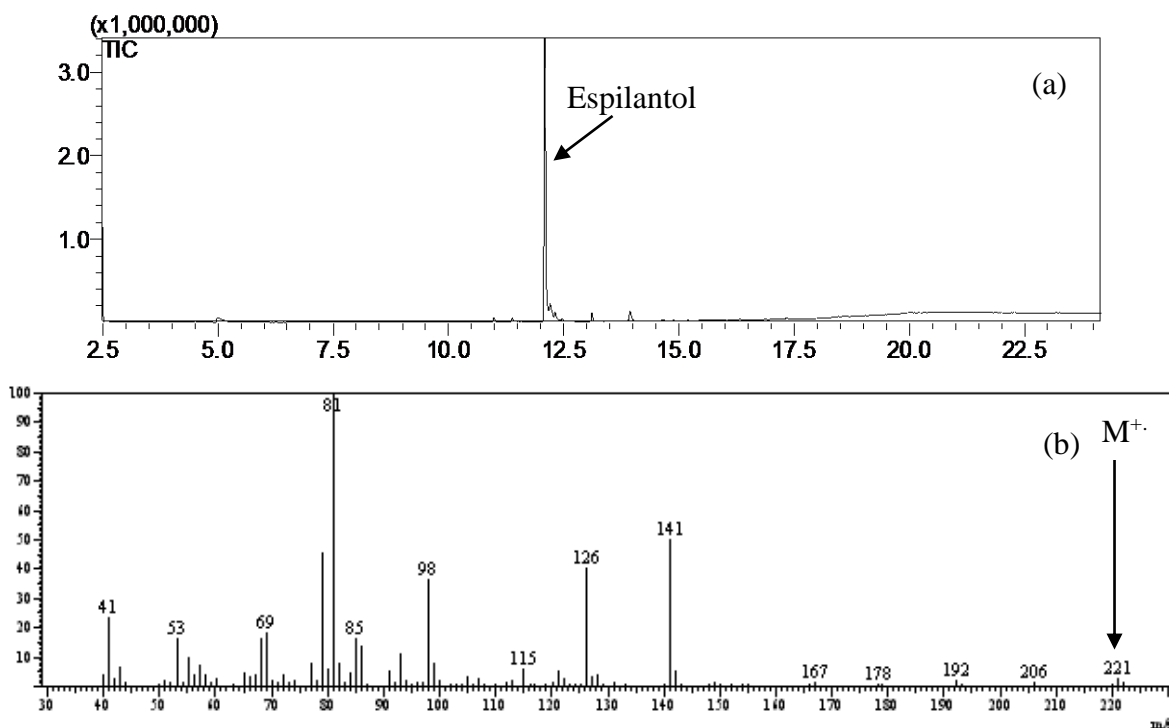


Figura 2a e 2b. Cromatograma da fração diclorometano (F2R32) (2a) e o espectro de massa do espilantol (2b).

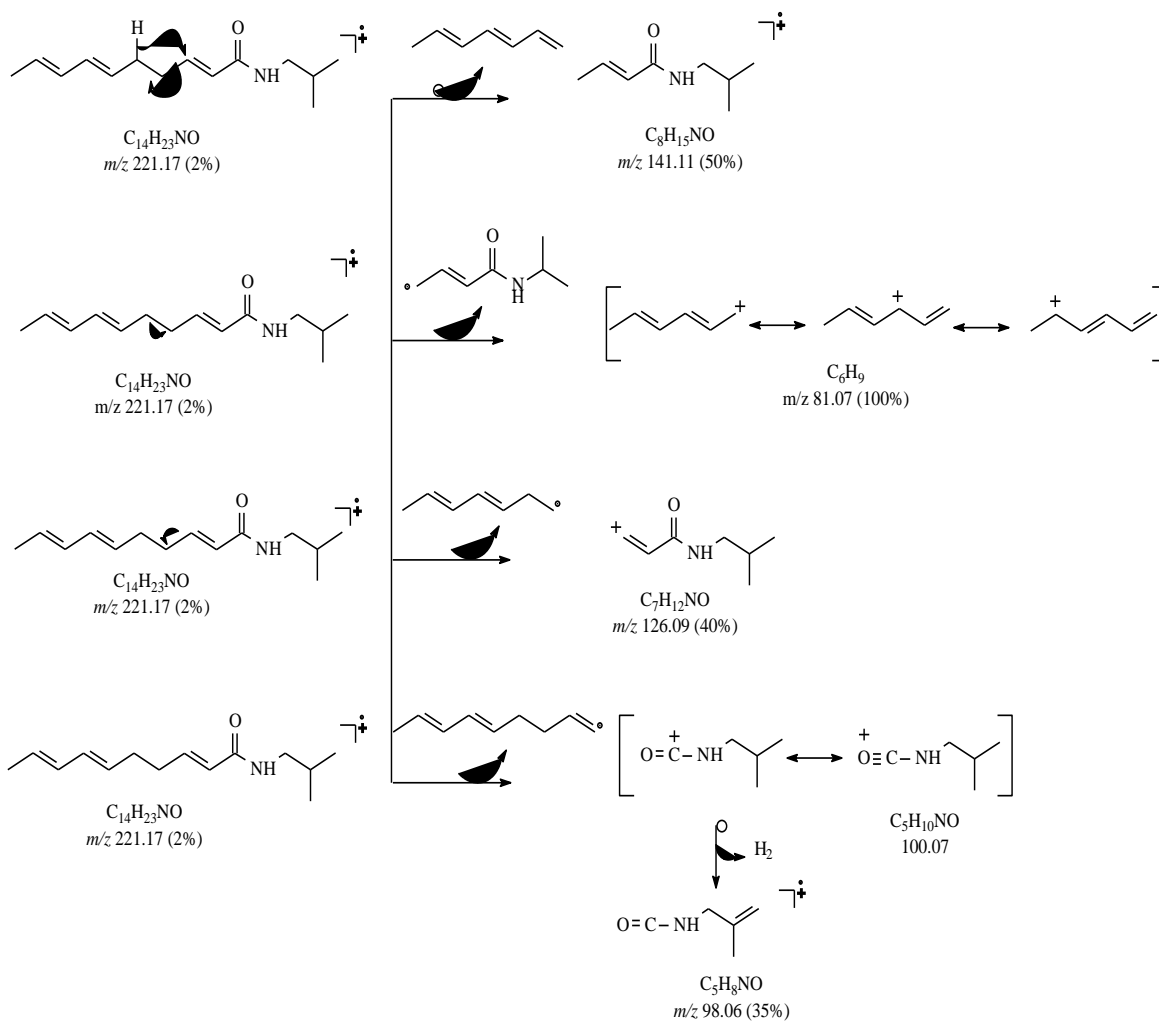


Figura 3. Proposta de fragmentação para justificar os principais picos do espectro de massas do espilantol (Figura 2b), com as abundâncias relativas.

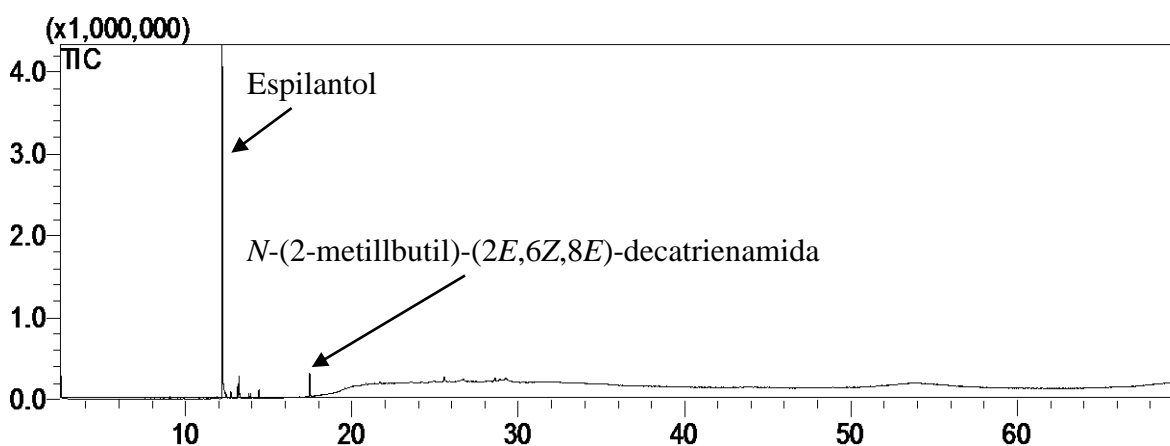


Figura 4. Cromatograma da fração hexânica (F1R1).

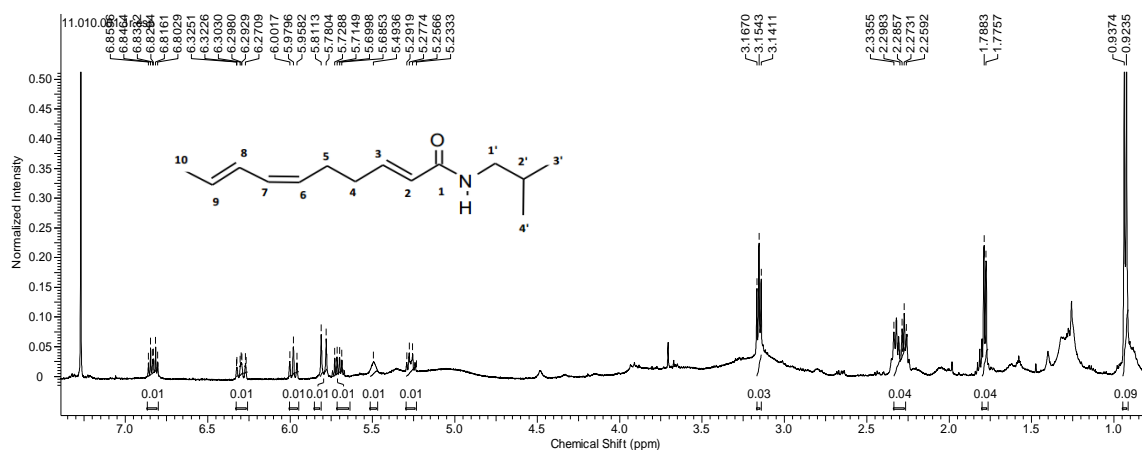


Figura 5. RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3). Espectro da fração diclorometano, 2^a repetição.

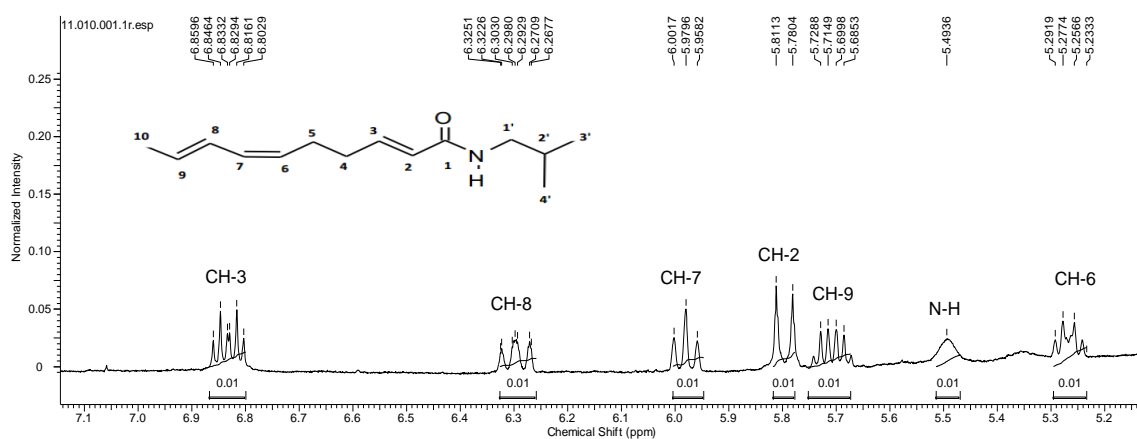


Figura 6. Expansão entre δ_{H} 7,1-5,2 RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3). Espectro da fração diclorometano, repetição 2.

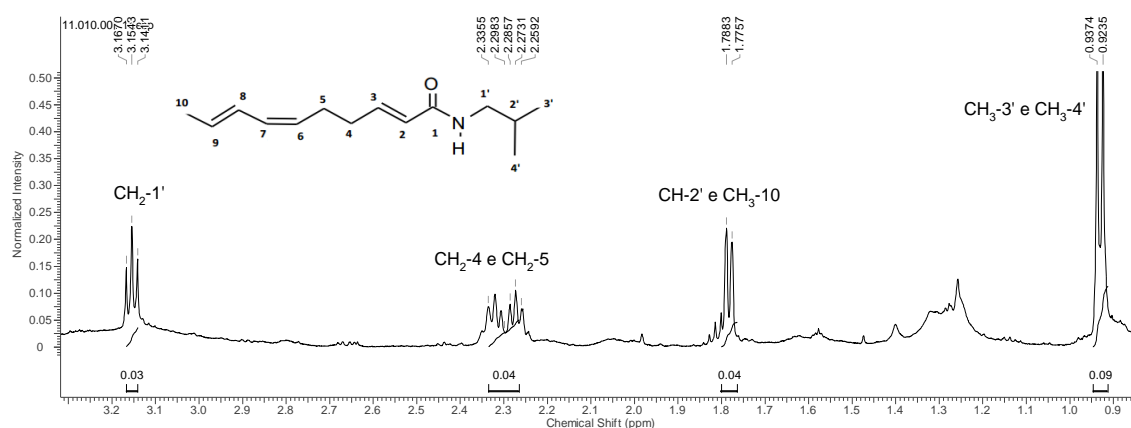


Figura 7. Expansão entre δ_{H} 3.2-0.9 RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3). Espectro da fração diclorometano, repetição 2.

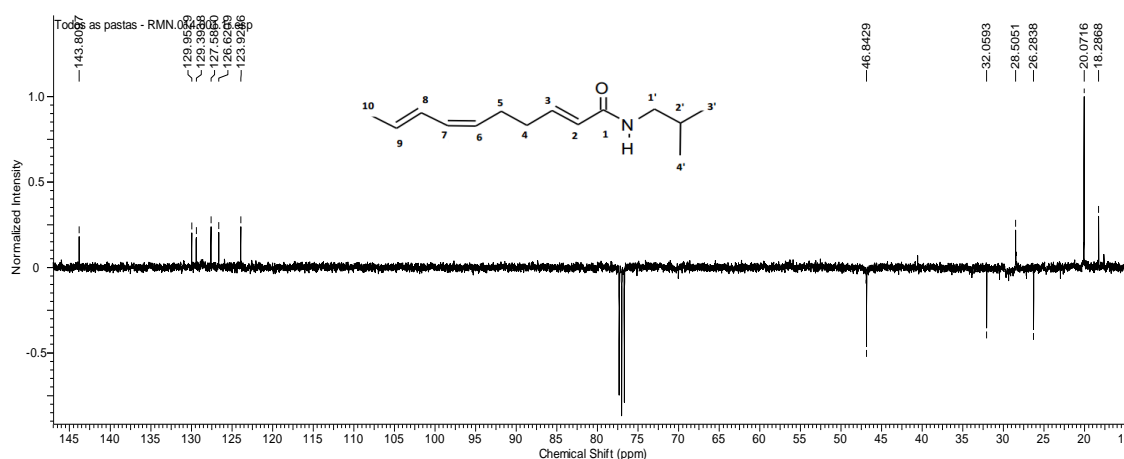


Figura 8. RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3). Espectro da fração diclorometano, repetição 2.

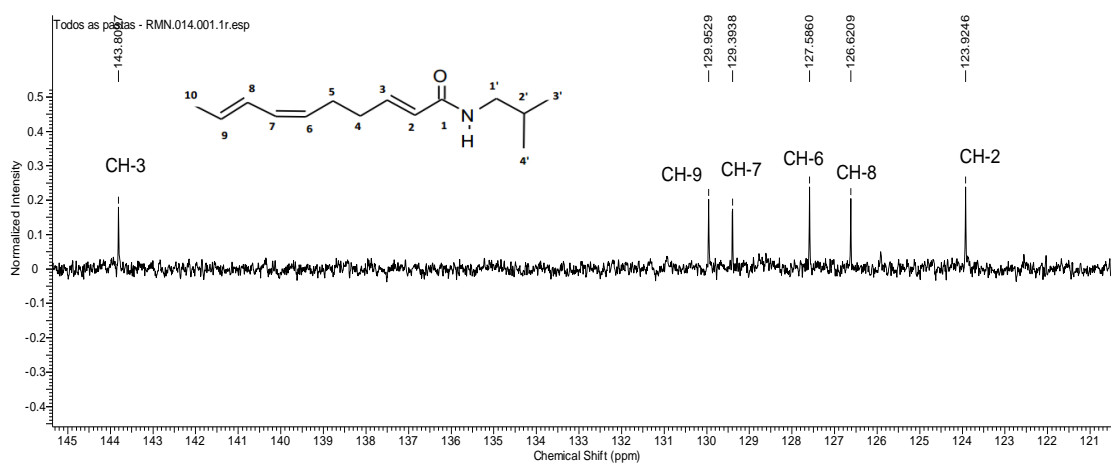


Figura 9. Expansão entre δ_{H} 145-121 RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3). Espectro da fração diclorometano, repetição 2.

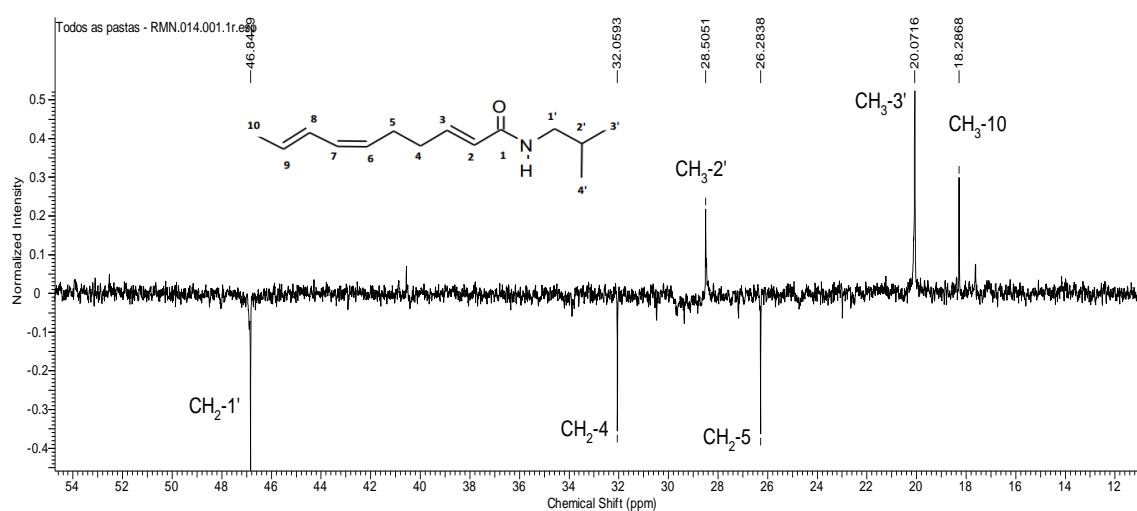


Figura 10. Expansão entre δ_{H} 54-12 RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3). Espectro da fração diclorometano, repetição 2.

O extrato metanólico de Jambu apresentou 0,187 % de espilantol conforme Cruz e colaboradores (2016).

Colorimetria é facilmente adaptável a uma análise de substratos e inibidores da tirosinase. Na presença de tirosina-tirosinase, inibidores da reação impedem o desenvolvimento da cor (SPENCER et al., 1956).

O mecanismo de ação da tirosinase e sua interação com L-DOPA foi descrito em detalhes por Chang (2009) e Chang (2012).

As análises mostraram que o extrato metanólico de Jambu e a fração hexânica (84,28 de % espilantol) são capazes de ativar a ação oxidante da enzima tirosinase para L-DOPA (Tabela 2).

Tabela 2. Ativação da tirosinase pelo extrato metanólico de Jambu e fração hexânica.

Extrato metanólico de Jambu (0,187 % de espilantol)		Fração hexânica (84,28 % de espilantol)	
[mg.mL ⁻¹]	% de ativação	[mM]*	% de ativação
0,83	357	0,51	40
0,66	297	0,38	23
0,5	107	0,13	10
0,33	63	0,07	5
0,16	39	0,05	1

*Relativo a concentração de espilantol na amostra.

O aumento da formação de dopacromo foi avaliado após a radiação de luz ultravioleta direta sobre o extrato metanólico a 312 nm, e mostraram alta ativação da enzima. Este comprimento de onda é parte da radiação UV-B, que é parcialmente absorvida pelo ozônio na atmosfera. A parte dessa radiação que realmente atinge a Terra é responsável por lesões de pele. Esta análise foi realizada em duas concentrações: 0,66 e 0,16 mg.mL⁻¹, e resultou em aumento de 57 % e 9 %, no final da análise de 30 min, respectivamente. O impacto direto da radiação UV a 312 nm diminuiu significativamente a ativação de energia no extrato metanólico de Jambu (Figura 11).

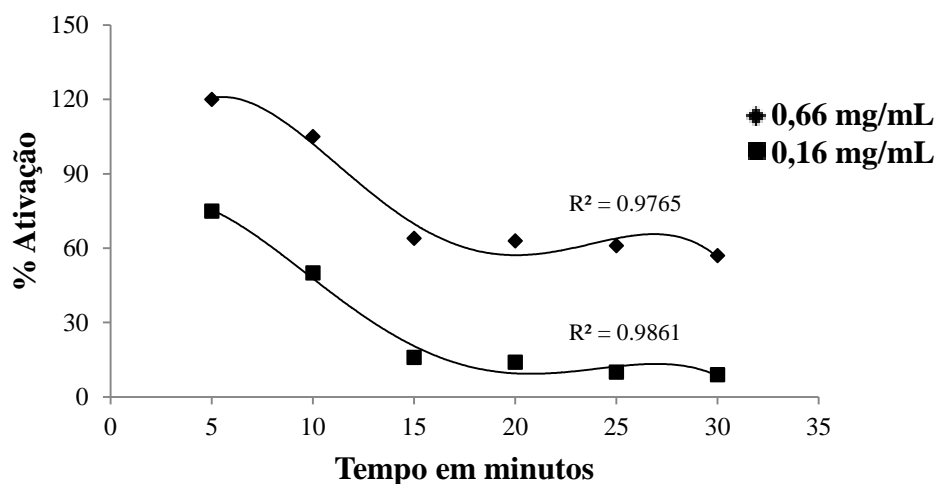


Figura 11. Gráfico do efeito da radiação UV (312 nm) sobre o poder de ativação do extrato metanólico de Jambu sobre a enzima tirosinase.

Outro fato interessante foi observado durante a cinética de ativação da tirosinase. O potencial de ativação da enzima tirosinase através da fração hexânica a 475 nm contendo 84,28 % de espilantol atingiu seu máximo em trinta minutos; no entanto, não houve significativo decaimento da ativação até 60 min (Figura 12).

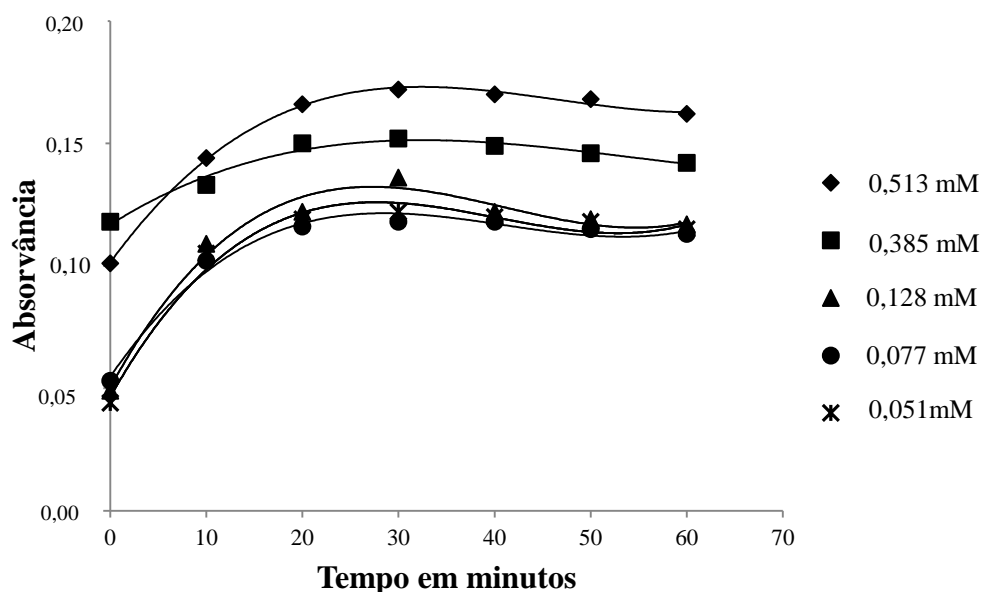


Figura 12. Cinética de ativação da enzima tirosinase sobre L-DOPA na presença da fração hexânica.

A fração diclorometano contendo cerca de 100 % de espilantol apresentou inibição da enzima tirosinase ($CI_{50} = 0,50$ mM), com maior poder de inibição da enzima nos primeiros 10 min. Após este tempo, o poder de inibição diminuiu (Figuras 13 e 14).

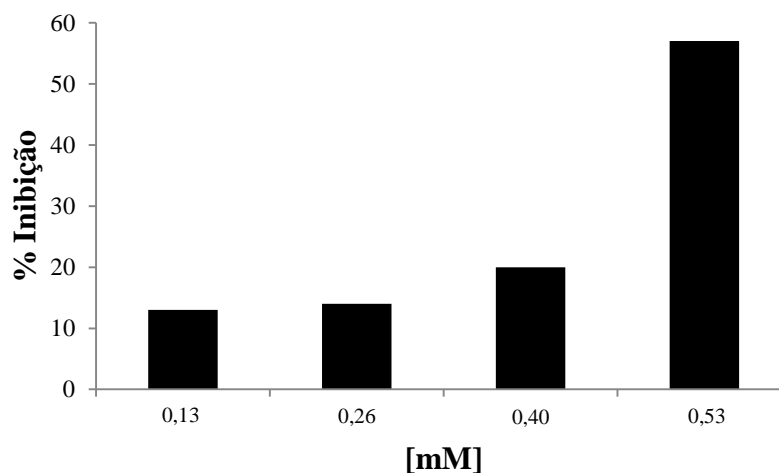


Figura 13. Inibição da enzima tirosinase pela fração diclorometano (contendo aproximadamente 100 % de espilantol), com substrato de L-DOPA.

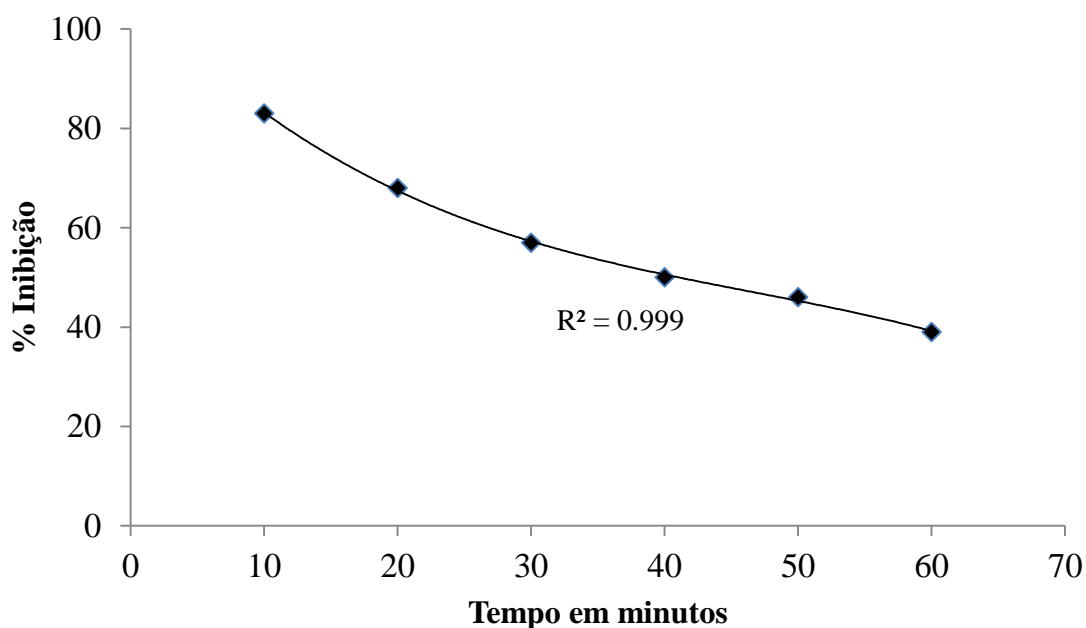


Figura 14. Cinética da inibição da enzima tirosinase através da fração de diclorometano contendo cerca de 100 % de espilantol (0,53 mM).

Nesses experimentos, obtivemos o aumento da porcentagem de produção dopacroma, porcentagem de ativação, em adição a cinética da enzima, na presença dessas amostras.

A capacidade da fração diclorometano inibir a atividade da tirosinase pode ser traduzida para seu potencial como agente branqueador da pele. A produção de melanina é reduzida quando a atividade da enzima tirosinase é inibida, o que resulta numa pele mais clara (KARIM et al., 2014).

Esses resultados indicam que o espilantol pode ser usado para controlar o escurecimento enzimático em frutas e hortaliças, uma vez que esta amida inativa a enzima tirosinase (polifenol oxidase) que está envolvida no processo de escurecimento desses produtos. Assim, o espilantol pode aumentar a validade comercial e a qualidade nutricional das frutas e hortaliças processadas, como o inibidor padrão da tirosinase (ácido kójico), CI_{50} de 0,130 mM (OKUNJI et al., 2007).

Inibidores da tirosinase são agentes químicos capazes de reduzir reações enzimáticas, como escurecimento da casca de frutas e hortaliças e melanização na pele humana. Portanto, esses agentes apresentam bom potencial comercial, tanto no processamento de alimentos como nas indústrias de cosméticos (LIM, LIM e YULE, 2009).

4 Conclusões

A ativação ou inativação da enzima tirosinase depende do grau de pureza dos extratos e frações do Jambu. O extrato metanólico do Jambu e fração hexânica (84,28 % de espilantol) ativaram a enzima tirosinase através do aumento de dopacromo. Portanto, produtos à base de Jambu podem ser utilizados como cosméticos (cremes, sabão, etc.). Essas amostras podem também acelerar a produção de melanina (que escurece a pele), assim como formação de melanomas. No entanto, seu uso contra os processos de despigmentação localizados (pele e cabelo) exige mais estudos, uma vez que a análise utilizando radiação UVB mostrou formulações viáveis contendo esse extrato em países tropicais.

Dessa forma, o espilantol desperta interesse no estudo de formulações com esta amida em produtos tópicos. Certamente ele pode prevenir e/ou reduzir os processos de hiperpigmentação da pele. Outra possível aplicação do espilantol é no controle do

escurecimento enzimático em frutas e hortaliças. Os inibidores da tirosinase não estão comercialmente disponíveis, especialmente aqueles a partir de fontes naturais, e isto limita sua avaliação em estudo *in vivo*, que é necessário grande quantidade de testes de inibição.

Assim, mais estudos precisam ser realizados com inibidores, incluindo ajuda e cooperação de grupos de cosméticos ou de biotecnologia.

5 Referências bibliográficas

BOONEN, J.; BAERT, B.; BURVENICH, C.; BLONDEEL, P.; DE SAEGET, S.; DE SPIEGELEER, B. LC-MS profiling of *N*-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behavior of its main bioactive spilanthol. **J. Pharmaceut. Biomed. Anal.**, v. 53, p. 243-249, 2010a.

BOONEN, J.; BAERT, B.; ROCHE, N.; BURVENICH, C.; DE SPIEGELEER, B. Transdermal behaviour of the *N*-alkylamide spilanthol (affinin) from *Spilantes acmella* (Compositae) extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v. 127, p. 77-84, 2010b.

BORGES, L. da S.; VIEIRA, M. A. R.; MARQUES, M. O. M.; VIANELLO, F.; LIMA, G. P. P. Influence of organic and mineral soil fertilization on essential oil of *Spilanthes oleracea* cv. Jambuarana. **Am. J. Plant Physiol.**, v. 7, p. 135-142, 2012.

CASTRO, K. N. C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L. C.; LEITE, J. R. S. A.; SANTOS, R. C.; NETO, A. A. P.; COSTA JÚNIOR, L. M. Acaricide activity *in vitro* of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus*. **Parisitol. Res.**, v. 113, p. 3697-3701, 2014.

CHANG, T-S. An updated review of tyrosinase inhibitors. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 10, p. 2440-2475, 2009.

CHANG, T-S. Natural melanogenesis inhibitors acting through the down-regulation of tyrosinase activity. **Materials**, v. 5, p. 1661-1685, 2012.

CRUZ, P. B.; BARBOSA, A. F.; ZERINGÓTA, V.; MELP, D.; NOVATO, T.; FIDELIS, Q. C.; FABRI, R. L.; CARVALHO, M. G. de; SABAA-SRUR, A. U. O.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O. Acaricidal activity of metanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae). **Vet. Parasitol.**, v. 228, p. 137-143, 2016.

DEMARNE, F., PASSARO, G. **Use of an *Acmella oleracea* extract for the botulinum toxin-like effect thereof in an anti-wrinkle cosmetic composition.** US Patent No. 7,531, 193 B2, 2005.

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

FIGUEIREDO, L. C. Câncer de pele: Estudos nos principais marcadores moleculares do melanoma cutâneo. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, p. 179-183, 2003.

GERBINO, A.; SCHENA, G.; MILANO, S.; MILELLA, L.; BARBOSA, A. F.; ARMENTANO, F.; PROCINO, G.; SVELTO, M.; CARMOSINO, M. Spilanthol from *Acmella*

oleracea lowers the intracellular levels of cAMP impairing NKCC2 phosphorylation and water channel AQP2 membrane expression in mouse kidney. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, e0156021, 2016.

KARIM, A. A.; AZLAN, A.; ISMAIL, A.; HASHIM, P.; GANI, S. S. A.; ZAINUDIN, B. H.; ABDULLAH, N. A. Phenolic composition, antioxidant, anti-wrinkles and tyrosinase inhibitory activities of cocopod extract. **BMC Complem. Altern. M.**, v. 14, p. 381-394, 2014.

KARIOTI, A.; PROTOPAPPA, A.; MEGOULAS, N.; SKAL TSA, H. Identification of tyrosinase inhibitors from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*. **Bioorgan. Med. Chem.**, v. 15, p. 2708-2714, 2007.

KHAN, K. M.; MUGHAL, U. R.; KHAN, M. T. H.; ULLAH, Z.; PERVEENB, S.; CHOUDHARY, M. I. Oxazolones: New tyrosinase inhibitors; synthesis and their structure-activity relationships. **Bioorgan. Med. Chem.**, v. 14, p. 6027-6033, 2006.

LEY, J. P.; KRAMMER, G.; LOOFT, J.; REINDERS, G.; BERTRAM, H. Structure-activity relationships of trigeminal effects for artificial and naturally occurring alkamides related to spilanthol. **Dev. Food. Sci.**, v. 43, p. 21-24, 2006.

LIM, T. Y.; LIM, Y. Y.; YULE, C. M. Evaluation of antioxidant, antibacterial and anti-tyrosinase activities of four *Macaranga* species. **Food Chem.**, v. 114, p. 594-599, 2009.

MBEUNKUI, F.; GRACE, M. H.; LATEGAN, C.; SMITH, P. J.; RASKIN, I.; LILA, M. A. Isolation and identification of antiplasmodial *N*-alkylamides from *Spilanthes acmella* flowers using centrifugal partition chromatography and ESI-IT-TOF-MS. **J. Chromatogr. B.**, v. 879, p. 1886-1892, 2011.

MIOT, L. D. B.; MIOT, H. A.; SILVA, M. G. da; MARQUES, M. E. A. Fisiopatologia do melasma. **An Bras Dermatol.**, v. 84, p. 623-635, 2009.

MOLINA-TORRES, J.; SALAZAR-CABRERA, C. J.; ARMENTA-SALINAS, C.; RAMÍREZ-SÁNCHEZ, E. Fungistatic and bacteriostatic activities of alkamides from *Heliopsis longipes* roots: affinin and reduces amides. **J. Agr. Food Chem.**, v. 52, p. 4700-4704, 2004.

MOLINA-TORRES, J.; SALGADO-GARCIGLIA, R.; RAMIREZ-CHANEZ, E.; DEL RIO, R. E. Purely olefinic alkamides in *Heliopsis longipes* and *Acmella (Spilanthes) oppositifolia*. **Biochem. Sys. Ecol.**, v. 24, p. 43-47, 1996.

NAKATANI, N.; NAGASHIMA, M. Pungent alkamides from *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* Clarke. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 56, p. 759-762, 1992.

NASCIMENTO, A. M.; SOUZA, L. M. de; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. de P.; MARIA-FERREIRA, D.; SILVA, L. M. da; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. **Phytochemistry**, v. 85, p. 137-142, 2013.

OKUNJI, C.; KOMARNYTSKY, S.; FEAR, G.; POULEV, A.; RIBNICKY, D. M.; AWACHIE, P. I.; ITO, Y.; RASKIN, I. Preparative isolation and identification of tyrosinase inhibitors from the seeds of *Garciniakola* by high-speed counter-current chromatography. **J. of Chromatography A**, v. 1151, p. 45-50, 2007.

- OLIVEIRA, A.; AMARAL, A. J.; ANDRADE, J.; NASCIMENTO, V.; MENDES, K.; REIS, J. Desenvolvendo construções de apriscos na agricultura familiar. **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, p. 1-4, 2011.
- PATIL, S. S.; ZUCKER, M. Potato phenolases. **J. Biol. Chem.**, v. 240, p. 3938-3943, 1965.
- RAMSEWAK, R. S.; ERICKSON, A. J.; NAIR, M. G. Bioactive *N*-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes Acmella*. **Phytochem.**, v. 51, p. 729-732, 1999.
- RATNASOORIYA, W. D.; PIERIS, K. P. P.; SAMARATUNGA, U.; JAYAKODY, J. R.A.C. Diuretic activity of *Spilanthes acmella* flowers in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 91, p. 317-320, 2004.
- REBELLO, F. K.; HOMMA, A.K. O uso da terra na Amazônia: uma proposta para reduzir desmatamentos e queimadas. **Amazônia: Ci. & Desenv.**, v. 1, p. 199-236, 2005.
- RIOS, M. Y.; AGUILAR-GUADARRAMA, A. B.; GUTIERREZ, M. D. Analgesic activity of affinin, an alkalamide from *Heliopsis longipes* (Compositae). **J. Ethnopharmacol.**, v. 110, p. 364-367, 2007.
- ROJAS, J. J.; OCHOA, V. J.; OCAMPO, S. A.; MUÑOZ, J. F. Screening for antimicrobial activity of ten medicinal plants used in Colombian folkloric medicine: a possible alternative in the treatment of non-nosocomial infections. **BMC Complem. Altern. M.**, v. 6, p. 2-7, 2006.
- SEO, S. Y.; SHARMA, V. K.; SHARMA, N. Mushroom tyrosinase: recent prospects. **J. Agr. Food Chem.**, v. 51, p. 2837-2853, 2003.
- SHARMA, V.; BOONEN, J.; CHAUHAN, N. S.; THAKUR, M.; DE SPIEGELEER, B.; DIXIT, V. K. *Spilanthes acmella* ethanolic flower extract: LC-MS alkylamide profiling and its effects on sexual behavior in male rats. **Phytomedicine**, v. 18, p. 1161-1168, 2011.
- SPENCER, R. P.; VALENTINE, R. J.; FIELD, J. B. Tyrosinase substrates and inhibitors studied colorimetrically. **Acta pharmacol. ettoxicol.**, v. 12, p. 196-199, 1956.
- SPIEGELEER, B.; BOONEN, J.; MALYSHEVA, S. V.; MAVUNGU, J. D.; DE SAEGER, S.; ROCHE, N.; BLONDEEL, P.; TAEVERNIER, L.; VERYSER, L. Skin penetration enhancing properties of the plant *N*-alkylamide spilanthol. **J. Ethnopharmacol.**, v. 148, p. 117-125, 2013.

CAPÍTULO VI.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE JAMBU (*Acmella oleracea* L.)

Artigo publicado na Revista Higiene Alimentar

BARBOSA, A. F.; GUERRA, A. F.; PRUDENCIO, E. R.; CARVALHO, M. G. de; SABAA-SRUR, A. U. O. Atividade antimicrobiana *in vitro* de jambu (*Spilanthes oleracea* L.). **Higiene alimentar**, v. 29, p. 3109-3113, 2015.

Alan Franco Barbosa¹; André Fioravante Guerra¹; Edlene Ribeiro Prudencio²; Mário Geraldo de Carvalho²; Armando Ubirajara Oliveira Sabaa Srur^{1,3†}

¹Departamento de Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

²Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

³Departamento de Nutrição Básica e Experimental, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

RESUMO

O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do Jambu frente ao *Micrococcus luteus* e o *Lactobacillus casei*. Foram utilizados o extrato metanólico e a fração hexânica do Jambu para os testes de atividade antimicrobiana. A obtenção das amostras testadas foi de acordo com proposta de Barbosa e colaboradores (2016). O material foi analisado por CG/EM e RMN ¹H e ¹³C. O principal componente da fração hexânica, espilantol, foi identificado com pico em 12,21 min na análise com CG. Essa amostra contém 84,28 % de espilantol. Não foi observada ação antimicrobiana do extrato metanólico e fração hexânica sobre *L. casei*. Porém a fração hexânica criou halo de inibição sobre *M. luteus*. Diante desses resultados a fração hexânica do Jambu pode ser utilizada no controle do *M. luteus*.

Palavras-chave: Hortaliça, *Acmella oleracea*, Asteracea.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antimicrobial activity of Jambu against *Micrococcus luteus* and *Lactobacillus casei*. The methanol extract and the hexane fraction of Jambu for antimicrobial activity tests were used. Obtaining samples tested was in accordance with the proposal of Barbosa et al. (2016). The material was analyzed by GC/MS and ¹H and ¹³C NMR. The main component of the hexane fraction, spilanthol was identified with a peak at 12.21 min in the GC analysis. This sample contains 84.28 % of spilanthol. There was no antimicrobial activity of methanol extract and hexane fraction of *L. casei*. But the hexane fraction created inhibition zone on *M. luteus*. With these results, the hexane fraction of Jambu can be used in the control of *M. luteus*.

Key words: Vegetable, *Acmella oleracea*, Asteracea.

1 Introdução

Conhecida popularmente como Jambu (*Acmella oleracea* L.) é uma planta nativa da Amazônia muito usada como condimento em pratos típicos da região Norte do Brasil, como o tacacá e o pato no tucupi, além de ter aplicação na medicina popular para o tratamento de estomatites, resfriados e como analgésico (NASCIMENTO et al., 2013). A planta apresenta

propriedades químicas importantes, que desperta o interesse da indústria farmacêutica, principalmente pela presença do seu princípio ativo, espilantol (BORGES et al., 2012). O espilantol, também conhecido como afinina (OLIVER-BEVER, 1983), está presente em várias espécies do gênero *Acmella* e na família Asteracea, como por exemplo, na planta *A. oleracea* (RAMSEWAK, ERIKSON e NAIR, 1999). Essa amida, além de ter sido sintetizada em 1984 por Ikeda e colaboradores, foi isolada de *A. oleracea* em 1903 (GERBER, 1903) e, posteriormente de *S. acmella* (GOKHALE e BHIDE, 1945).

A. oleracea já é conhecida por apresentar atividade antimicrobiana (RATNASOORIYA et al., 2004; PRACHAYASITTIKUL et al., 2009), fungistática e bacteriostática (MOLINA-TORRES et al., 2004). No entanto, não há trabalhos que avaliem a atividade bacteriana do extrato metanólico e fração hexânica do Jambu, com composição química semelhante às amostras testadas no presente estudo, sobre *Micrococcus luteus* e *Lactobacillus casei*.

Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos e direcionados à descoberta de novos agentes antimicrobianos provenientes de extratos vegetais e outros produtos naturais, com o objetivo de descobrir compostos com atividade comparada à dos tradicionalmente utilizados, porém, com menor toxicidade, mais eficazes contra a resistência de microrganismos patogênicos e com menor impacto ambiental (BONA et al., 2014). Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do Jambu frente ao *Micrococcus luteus* e *Lactobacillus casei*.

2 Material e métodos

Folhas, hastes e inflorescências de Jambu foram coletadas no município de Igarapé-Açu, que pertence ao Meso e Micro Região Nordeste Bragantina Paraense, leste do Pará e tem as coordenadas: 01° 07' 33" S e 47° 37' 27" O (OLIVEIRA et al., 2011). Um exemplar da planta (MG205534) foi identificado como *Acmella oleracea* L. e incorporado ao herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, PA.

O processo de secagem a frio foi realizado em sala climatizada com ar condicionado a 25 °C e utilização de um desumidificador. As amostras testadas foram obtidas através de extração com metanol e partição com solventes orgânicos de acordo com proposta de Barbosa e colaboradores (2016).

O material foi analisado por Cromatógrafo a Gás acoplado a um Espectrômetro de Massas - CG/EM (Shimadzu, modelo QP-2010, Japão) e por dados espectrais de Ressonância Magnética Nuclear - RMN ¹H e ¹³C. A identificação do constituinte majoritário foi baseada na informação obtida pelos métodos analíticos mencionados e comparação com dados da literatura.

Foram utilizados o extrato metanólico e a fração hexânica do Jambu para os testes de atividade antimicrobiana. Para isso, as culturas de *Micrococcus luteus* (ATCC 4698; INCQS 356) e *Lactobacillus casei* (Christian Hansen) foram ativadas por 3 transferências sucessivas em caldo Infusão Cérebro Coração (Himedia) e Man Rogosa Sharp (Himedia) adicionado de 0,05 % de cisteína (Vetec), respectivamente.

Placas contendo 15 mL de Agar Infusão Cérebro Coração (Himedia) e Agar Man Rogosa Sharp (Himedia) adicionado de 0,05 % de cisteína (Vetec), com espessura de aproximadamente 4 mm, foram inoculadas com 1 mL de suspensão bacteriana contendo ca de 1,5 x 10⁶ UFC/mL (0,5 escala de Mac Farland). Após solidificação, adicionou-se, com auxílio de alça microbiológica, um *pool* equivalente de extrato metanólico e fração hexânica. As placas foram incubadas a 35 °C por 48 horas em aerobiose (*Micrococcus luteus*) e anaerobiose (*Lactobacillus casei*). Os halos de inibição foram medidos com auxílio de um paquímetro desde a extremidade do extrato ou fração até a interface transparência/crescimento microbiano.

3 Resultados e discussão

O principal componente da fração hexânica (espilantol) foi identificado no pico 12,21 min no cromatograma CG. Essa amostra contém 84,28 % de espilantol, além de outras substâncias (Tabela 1).

Tabela 1. Tempo de retenção (t_R em CG-EM), similaridade (SI) e porcentagem de área (%) da fração hexânica.

Fração hexânica		SI (%)	% Área
t_R			
12,216	<i>N</i> -Isobutil-2(<i>E</i>),6(<i>Z</i>),8(<i>E</i>)-decatrienamida (Espilantol)	90	84,28
13,146	3-metil-butenato de trideca-2-ino	90	3,26
13,224	<i>N</i> -(2-metilbutil)-(2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i> ,8 <i>E</i>)-decatrienamida	85	5,45
14,413	Oxalato de ciclohexil, octila	87	1,94
17,471	Ftalato	94	5,06

Não foi observada ação antimicrobiana do extrato metanólico e fração hexânica sobre *Lactobacillus casei* (Christian Hansen). Porém a fração hexânica criou halo de inibição de $3,23 \pm 0,25$ mm sobre *Micrococcus luteus* (ATCC 4698; INCQS 356), Figura 1.

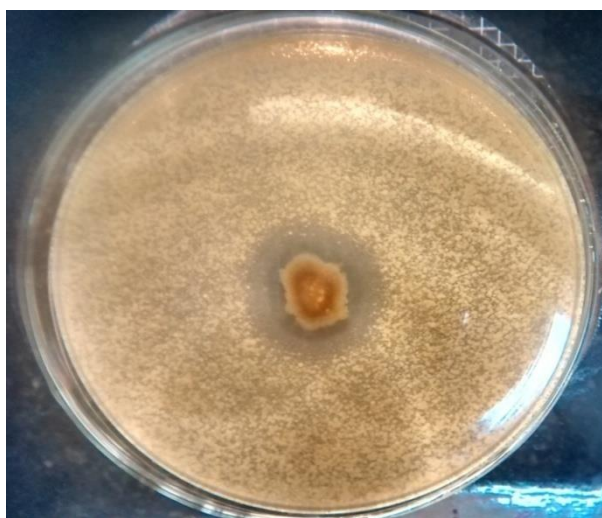


Figura 1. Halo de inibição da fração hexânica do Jambu sobre *Micrococcus luteus*.

Pelos resultados pode-se inferir que o metabólito responsável pela atividade antimicrobiana do Jambu é o espilantol, visto que o extrato metanólico não apresentou atividade, já a fração hexânica com 84,28 % de espilantol teve atividade bacteriana.

Muitos microrganismos pertencentes ao gênero *Micrococcus* fazem parte da microbiota normal da pele humana (KLOOS e MUSSELWHITE, 1975; KOCUR et al., 2006), podendo também ser encontrado no ambiente; o *M. luteus* já foi isolado em água, animais e em sedimentos marinhos (BULTEL-PONCE et al., 1998). Este microrganismo é causador de infecções crônicas em peixes de aquicultura responsáveis por grandes perdas de produtividade (AYDIN et al., 2005). Em ambientes aquáticos de água doce foi isolado formando biofilme (BUSWELL et al., 1997; RICKARD et al., 2002). Já o *L. casei* pode atuar como uma bactéria

probiótica ou deteriorante. Dessa forma, é de suma importância a descoberta de agentes antimicrobianos eficazes contra essas bactérias e que sejam de baixo custo para assim, evitar perdas de produção e durante o armazenamento de produtos alimentícios.

Prachayasittikul e colaboradores (2009) avaliaram 27 estirpes de microrganismos frente a frações dos extratos de clorofórmio e metanol de *Spilanthes oleracea* L. Os resultados mostraram que as frações inibiram o crescimento de muitos microrganismos testados, por exemplo, *Corynebacterium diphtheriae* NCTC 10356 com concentração inibitória mínima (CIM) de 64-256 µg/mL e de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 com CIM de 128-256 µg/mL.

Molina-Torres e colaboradores (2004) testaram atividade fungistática e bacteriostática do Jambu utilizando o espilantol e outras 2 amidas. 4 dos fungos testados mostraram sensibilidade importante na presença do espilantol: *Sclerotium rolfsi*, *Sclerotium cepivorum*, *Phytophthora infestans* e *Rhizoctonia solani* grupos AG3 e AG5, exibindo inibição de crescimento de 100 %. A amida *N*-isobutil-2*E*-decanamida apresentou atividade bacteriostática maior que o espilantol contra *Escherichia coli* e *Erwinia carotovora*. Por outro lado, apenas a *N*-isobutil-decanamida exibiu atividade significativa sobre o crescimento de *Bacillus subtilis*.

O Jambu é encontrado em grande quantidade na região norte do Brasil, isso proporciona a essa espécie potencial real de industrialização e produção em escala comercial. O cultivo desta espécie pode ser fonte de renda alternativa para a população rural (GUSMÃO et al., 2005; HOMMA et al., 2011).

Novos estudos são necessários para avaliar a eficácia do espilantol e o potencial para o desenvolvimento de embalagens de alimentos, embalagens ativas, que contêm essa fração hexânica para inativar o *Micrococcus luteus*. Além de avaliações técnicas, faz-se necessária a verificação da viabilidade comercial/econômica.

4 Conclusões

A fração hexânica causou um halo de inibição sobre *Micrococcus luteus* (ATCC 4698; INCQS 356), porém esta inibição não foi observada quando utilizada o extrato metanólico do Jambu. Não foi observado nenhum efeito inibidor sobre *Lactobacillus casei*. Dessa forma, a fração hexânica do Jambu tem potencial para controlar o crescimento de *Micrococcus luteus*.

5 Referências bibliográficas

- AYDIN, S.; CILTAS, A.; YETIM, H.; AKYURT, I. Clinical, Pathologic and Haematological Effect of *Micrococcus luteus*, infection in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). **J. Anim. Vet. Adv.**, v. 4, p. 167-174, 2005.
- BARBOSA, A. F.; Silva, K. C. B.; Oliveira, M. C. C. de; CARVALHO, M. G. de; SABAA-SRUR, A. U. O. Effects of *Acmella oleracea* methanolic extract and fractions on the tyrosinase enzyme. **Braz. J. Pharmacog.**, v. 26, p. 321-325, 2016.
- BONA, E. A. M. de; PINTO, F. G. da S.; FRUET, T. K.; JORGE, T. C. M.; MOURA, A. C. de. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 81, p. 218-225, 2014.
- BORGES, L. da S.; VIEIRA, M. A. R.; MARQUES, M. O. M.; VIANELLO, F.; LIMA, G. P. P. Influence of Organic and Mineral Soil Fertilization on Essential Oil of *Spilanthes oleracea* cv. Jambuarana. **Am. J. Plant Physiol.**, v. 7, p. 135-142, 2012.

- BULTEL-PONCE, V.; DEBITUS, C.; BERGE, J.; CERCEAU, C.; GUYOT, M. Metabolites from the sponge-associated bacterium *Micrococcus luteus*. **J. Mar. Biotechnol.**, v. 6, p. 233-236, 1998.
- BUSWELL, C. M.; HERLIHY, Y. M.; MARSH, P. D.; KEEVIL, C. W.; LEACH, S. A. Coaggregation amongst aquatic biofilm bacteria. **J. Appl. Microbiol.**, v. 83, p.477-484, 1997.
- GERBER, E. **Archives of Pharmacy**, v. 241, p. 270, 1903.
- GOKHALE, V. G.; BHIDE, B. V. Chemical investigation of *Spilanthes acmella*. **J. Indian Chem. Soc.**, v. 22, p. 250-252, 1945.
- GUSMÃO, S. A. L.; GUSMÃO, M. T. A.; SILVESTRE, W. V. D.; LOPES, P. R. A. Caracterização do cultivo de Jambu nas área produtoras que abastecem a grande Belém. **Hortic. Bras.**, v. 23, 2005.
- HOMMA, A. K. O.; SANCHES, R. da S.; MENEZES, A. J. E. A. de; GUSMÃO, S. A. L. de Etnocultivo do Jambu para abastecimento da cidade de Belém, estado do Pará. **Amazônia: Ciência & Desenvolvimento**, v. 6, p. 125-141, 2011.
- IKEDA, Y.; UKAI, J.; IKEDA, N.; YAMAMOTO, H. Facile routes to natural acyclic polyenes syntheses the spilanthal and trail pheromone for termite. **Tetrahedron Lett.**, v. 25, p. 5177-5180, 1984.
- KLOOS, W. E.; MUSSELWHITE, M. S. Distribution and persistence of *Staphylococcus* and *Micrococcus* species and other aerobic bacteria on human skin. **J. Appl. Microbiol.**, v. 30, p. 381-395, 1975.
- KOCUR, M.; KLOOS, W. E.; SCHLEIFER, K. H. The Genus *Micrococcus*. **Prokaryotes**, v. 3, p. 961-971, 2006.
- MOLINA-TORRES, J.; SALAZAR-CABRERA, C. J.; ARMENTA-SALINAS, C.; RAMÍREZCHÁVEZ, E. Fungistatic and bacteriostatic activities of alkaloids from *Heliopsis longipes* roots: affinin and reduced amides. **J. Agr. Food Chem.**, v. 52, p. 4700-4704, 2004.
- NASCIMENTO, A. M.; SOUZA, L. M. de; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. de P.; MARIAFERREIRA, D.; SILVA, L. M. da; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. **Phytochemistry**, v. 85, p. 137-142, 2013.
- OLIVEIRA, A.; AMARAL, A. J.; ANDRADE, J.; NASCIMENTO, V.; MENDES, K.; REIS, J. Desenvolvendo construções de apriscos na agricultura familiar. **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, 2011.
- OLIVER-BEVER, B. Medicinal plants in tropical west Africa II. Plants acting on the nervous system. **J. Ethnopharmacol.**, v. 7, p. 1-93, 1983.
- PRACHAYASITTIKUL, S.; SUPHAPONG, S.; WORACHARTCHEEWAN, A.; LAWUNG, R.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. **Molecules**, v. 14, p. 850-867, 2009.

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

RATNASOORIYA, W. D.; PIERIS, K. P. P.; SAMARATUNGA, U.; JAYAKODY, J. R. A. C. Diuretic activity of *Spilanthes acmella* flowers in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 91, p. 317-320, 2004.

RICKARD, A. H.; LEACH, S. A.; HALL, L. S.; BUSWELL, B. C.; HIGH, N. J.; HANDLEY, P. S. Phylogenetic Relationships and Coaggregation Ability of Freshwater Biofilm Bacteria. **Appl. Environ. Microb.**, v. 68. p. 3644-3650, 2002.

CAPÍTULO VII.

**SPILANTHOL FROM *ACMELLA OLERACEA* LOWERS THE
INTRACELLULAR LEVELS OF cAMP IMPAIRING NKCC2
PHOSPHORYLATION AND WATER CHANNEL AQP2 MEMBRANE
EXPRESSION IN MOUSE KIDNEY**

Artigo publicado na revista Plos One

GERBINO, A.; SCHENA, G.; MILANO, S.; MILELLA, L.; BARBOSA, A. F.; ARMENTANO, F.; PROCINO, G.; SVELTO, M.; CARMOSINO, M. Spilanthol from *Acmella oleracea* lowers the intracellular levels of cAMP impairing NKCC2 phosphorylation and water channel AQP2 membrane expression in mouse kidney. **PLoS ONE**, v. 11, n. 5, e0156021, 2016. doi:10.1371/journal.pone.0156021

Andrea Gerbino¹, Giorgia Schena², Serena Milano¹, Luigi Milella², Alan Franco Barbosa³, Francesca Armentano², Giuseppe Procino¹, Maria Svelto¹ and Monica Carmosino²

¹Department of Biosciences, Biotechnologies and Biopharmaceutics, University of Bari "Aldo Moro", 70126 Bari, Italy

²Department of Sciences, University of Basilicata, Viale dell' Ateneo Lucano 10, 85100 Potenza, Italy

³Department of Food Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, BR 465 Km 07. Seropédica-Rio de Janeiro, Brazil

RESUMO

Acmella oleracea é bem reconhecida na medicina tradicional brasileira como diurético, embora poucos dados científicos foram publicados para apoiar este efeito. O objetivo deste estudo foi determinar o efeito molecular do extrato de *Acmella oleracea* e sua principal alcaloide, o espilantol, nos dois principais processos que envolvem o mecanismo de concentração de urina: atividade do transportador de Na-K-2Cl (NKCC2) no ramo ascendente espesso e no canal de água de aquaporina 2 na membrana plasmática apical de células de ductos coletores. A fosforilação de NKCC2 foi avaliada como índice da sua ativação através de Western blotting. A taxa de expressão apical de aquaporina 2 foi analisada por microscopia confocal a laser. Eventos de sinalização intracelular induzida por espilantol foram dissecados por experimento de vídeo-imagem. A exposição ao espilantol reduziu o nível de fosforilação basal de NKCC2 tanto em fatias de rim de ratos isolados recentemente como em células HEK293 que expressam NKCC2. Além disso, a exposição do espilantol abaixou a desmopressina e o aumento dependente de Cl⁻ em fosforilação NKCC2 em fatias de rim de ratos e células HEK293 expressando NKCC2, respectivamente. Da mesma forma, o espilantol reduziu a desmopressina e a forscolina estimulada por acumulação de aquaporina 2 na membrana plasmática apical do ducto de coleta no rim do rato e células MCD4, respectivamente. Quando administrado por via oral, o espilantol induziu um aumento significativo tanto na produção de urina quanto na excreção urinária de sal associada com a osmolalidade da urina marcadamente reduzida em comparação com os ratos controle. Finalmente, a nível celular, o espilantol rapidamente reduziu ou inverteu os níveis basal e aumentou os níveis de cAMP através de um mecanismo que envolve aumento intracelular [Ca²⁺]. Em conclusão, a inibição induzida por espilantol na produção de cAMP modula negativamente os mecanismos de concentração de urina garantindo, assim, uma grande promessa para o seu uso como diurético.

Palavras-chave: NKCC2; AQP2; diuréticos; espilantol; vias de sinalização.

ABSTRACT

Acmella oleracea is well recognized in Brazilian traditional medicine as diuretic, although few scientific data have been published to support this effect. Aim of this study was to determine the molecular effect of *A. oleracea* extract and its main alkylamide spilanthol on two major processes involved in the urine concentrating mechanism: Na-K-2Cl symporter (NKCC2) activity in the thick ascending limb and water channel aquaporin 2 accumulation at the apical plasma membrane of collecting duct cells. Phosphorylation of NKCC2 was evaluated as index of its activation by Western blotting. Rate of aquaporin 2 apical expression was analyzed by confocal laser microscopy. Spilanthol-induced intracellular signalling events were dissected by video-imaging experiments. Exposure to spilanthol reduced the basal phosphorylation level of NKCC2 both in freshly isolated mouse kidney slices and in NKCC2-expressing HEK293 cells. In addition, exposure to spilanthol strongly reduced both desmopressin and low Cl⁻-dependent increase in NKCC2 phosphorylation in mouse kidney slices and NKCC2-expressing HEK293 cells, respectively. Similarly, spilanthol reduced both desmopressin- and forskolin-stimulated aquaporin 2 accumulation at the apical plasma membrane of collecting duct in mouse kidney slice and MCD4 cells, respectively. Of note, when orally administered, spilanthol induced a significant increase in both urine output and salt urinary excretion associated with a markedly reduced urine osmolality compared with control mice. Finally, at cellular level, spilanthol rapidly reduced or reversed basal and agonist-increased cAMP levels through a mechanism involving increases in intracellular [Ca²⁺]. In conclusion, spilanthol-induced inhibition of cAMP production negatively modulates urine-concentrating mechanisms thus holding great promise for its use as diuretic.

Key words: NKCC2; AQP2; diuretics; spilanthol; signalling pathways.

1 Introduction

Na⁺-K⁺-2Cl⁻-cotransporter (NKCC2) is responsible for 25 % of the active sodium reabsorption in the kidney. It is, therefore, an important factor in the regulation of the circulating fluid volume and in long-term blood pressure control. The physiological importance of NKCC2 in the regulation of blood pressure has been well established with the use of loop diuretics such as bumetanide and furosemide that act as functional blockers of the cotransporter and are among the most powerful antihypertensive drug available to date (SHANKAR and BRATER, 2003).

However, their efficacy may decrease with time, and the chronic use of loop diuretics leads to activation of the renin-angiotensin system, which might worsen intra-renal hemodynamics (TESTANI et al., 2010).

For this reason new synthetic, semi-synthetic or natural sources (herbs and botanicals) of loop diuretics might be useful. In line with this there are an increasing number of published articles claiming that plants or plant-derived actives may function as mild diuretic agents (TAHRAOUI et al., 2007; WRIGHT et al., 2007). A large majority of this research has determined the degree of clinical support for the traditional use of common or folklore medicines. *Acmella oleracea*, known as Jambu, was originally introduced from Brazil and nowadays cultivated and used medicinally in many parts of the world (DUBEY et al., 2013).

Extensive phytochemical investigations of *Acmella oleracea* had previously been reported. It constitutes a diverse group of compounds. Major isolates were lipophilic alkylamides or alkamides bearing different numbers of unsaturated hydrocarbons (alkenes and alkynes), such as spilanthol (SHARMA et al., 2011) also known as affinin (*2E,6Z,8E*)-*N*-isobutyl-2,6,8-decatrienamamide (LEY et al., 2006). Spilanthol is the main constituent isolated from many parts of *A. oleracea* (PRACHAYASITTIKUL et al., 2009) and it has been

demonstrated to exert different biological activities e.g. anti-inflammatory (WU et al., 2008); antinociceptive without causing adverse effects (NOMURA et al., 2013) or penetration enhancing effect on model drugs (DE SPIEGELEER et al., 2013). On the other hand few papers suggested that the extracts obtained from different parts of *A. oleracea* could be useful for treating hypertension, in fact they demonstrated the vasorelaxant (WONGSAWATKUL et al., 2008) and diuretic effects (RATNASOORIYA et al., 2004). Ratnasooriya et al. (2004) demonstrated that the strong diuretic effect evoked by *A. oleracea* extract after 1 h was similar to that of furosemide and was accompanied by marked increases in both urinary Na⁺ and K⁺ levels. On one hand, these features strongly suggested that the *A. oleracea* extract could act as a loop diuretic reducing NKCC2 activity.

The release of the antidiuretic hormone arginine vasopressin (AVP) from the pituitary gland into the bloodstream elicits an antidiuretic action upon activation of the type-2 vasopressin receptor (AVPR2) (BIRNBAUMER et al., 1992), a G protein-coupled receptor expressed at the basolateral plasma membrane of the epithelial cells lining the Thick Ascending Limb of Henle (TAL), distal convolute tubules (DCT) and collecting ducts (CD). Once activated AVPR2 interacts with G_{αs} increasing intracellular cAMP levels and triggering a cascade of intracellular signals mostly mediated by PKA activation. In particular, AVP stimulates NaCl reabsorption in the TAL mainly through NKCC2 phosphorylation (GIMÉNEZ and FORBUSH, 2003) whose increased activity contributes to the generation/maintenance of the cortico-medullary osmotic gradient thus providing the driving force for water reabsorption in kidney tubules. In addition, AVP elicits apical membrane exposure of the water channel aquaporin 2 (AQP2) (FUSHIMI et al., 1994) from a pool of intracellular storage vesicles in principal cells of the CD, significantly increasing water permeability at this site (for a review see Boone and Deen, 2008). Therefore, aim of this study was to determine the molecular effect of *A. oleracea* extract and its main alkylamide spilanthalol on these two major processes involved in the urine concentrating mechanism: NKCC2 activity in the TAL and AQP2 accumulation at the apical plasma membrane of CD cells. Here we show for the first time that exposure to spilanthalol reduces both NKCC2 phosphorylation and AQP2 plasma membrane accumulation by a Ca²⁺/cAMP interplay mechanism, leading to increased urine output and urinary salt excretion when orally administered.

2 Materials and methods

2.1 Experimental animals

All animal experiments were performed in accordance with the Italian Institute of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, which conforms with the European Union Directive for the protection of experimental animals (2010/63/EU), and received approval from the Animal Experimentation Ethics Committee (CESA) of University of Bari "Aldo Moro", Italy. C57BL6/J mice were maintained on a 12 h light/12 h dark cycle, with free access to water and pelleted food.

2.2 Evaluation of the diuretic activity

C57BL6/J mice were used to evaluate the effect of spilanthalol on urinary parameters. Mice (n=6 for each group) were kept in metabolic cages to measure 24 h diuresis, osmolality and urine electrolytes. Animals were treated with spilanthalol 800 mg/kg in food or vehicle alone. Urine collected was measured at the end of 24 h after treatment and total volume, osmolality and Na⁺, K⁺ and Cl⁻ in the urine were determined. Urinary electrolytes were measured by ion

selective electrode method. Unpaired data were assessed for statistical significance using the Student's t test. Significance was accepted for p values < 0.05.

2.3 Solutions and materials

Anti-phosphatase buffer for cell lysis contained 150 mM NaCl, 30 mM NaF, 5 mM EDTA, 15 mM Na₂HPO₄, 15 mM pyrophosphate and 20 mM HEPES (pH 7.2) with 1% Triton X-100, supplemented with phosphatase and protease inhibitors (1:50, Roche, Basel, Switzerland). The low Cl⁻ solution used to activate NKCC2 contained 1 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 1 mM Na₂SO₄, 1 mM CaCl₂, 15 mM Na-HEPES and 134 mM Na-gluconate, pH 7.4. The Ringer's solution used to perfuse cells during imaging experiment contained 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 10 mM Hepes, 5 mM Glucose, 1.0 mM CaCl₂, pH 7.4. Cells were stimulated with a variety of drugs as described in the results, including ATP, Cyclopiazonic acid and BAPTA-AM. Unless otherwise stated, all chemicals were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, USA).

2.4 Plant material and extract preparation

A. oleracea was collected in Igarapé-Açu (Pará State – Brazil; coordinates: 01 ° 07 '33" S and 47 ° 37' 27" W). A voucher specimen (MG205534) was deposited at the Museu Paraense Emílio Goeldi (www.museu-goeldi.br/), Belém, Brazil. No permits were required for *A. oleracea* collection. The plant flowers, leaves and stems were dried and comminuted. Cold-drying process was carried out in the climatized room with air conditioning (Midea, model MS2E-18CR, Brazil) at 25 °C and by using the de-humidifier (Arsec, model 160, Brazil), in a 4 m² room and it remained closed during the drying procedure. The plant material was grounded and then subjected to exhaustive extraction process by maceration with methanol (MeOH) at room temperature. The solvent was distilled in a rotary evaporator at 40 °C under reduced pressure. The residue obtained of the MeOH extract, as previously proposed by Mbeunkui et al. (2011), it was solubilised in MeOH/H₂O (8:2) and the solution subjected to successive extractions in separatory funnel with the solvents n-hexane and dichloromethane.

2.5 Chemical Analysis

The material was analyzed by a gas chromatograph coupled to a mass spectrometer - GC/MS (model QP-2010 Plus, Shimadzu, Japan) and by ¹H and ¹³C NMR spectra data (model advance III, Bruker, Billerica, MA, USA). Dichloromethane (99.9 %, HPLC grade) was used as the solvent in GC/MS analysis and CDCl₃ (99 %) was used as the solvent in NMR analysis. The GC/MS was equipped with a Factor Four/VF-5 ms fused-silica capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm film thickness), using helium as carrier gas at 1 mL/min. The initial oven temperature was 100 °C, which after being held constant for 40 min was increased at a rate of 10 °C/min to 290 °C, with a final isotherm (300 °C) for 20 min. The sample injection volume was 1 µL (1:50 split mode). The injector and detector temperatures were both 300 °C. The mass spectra were obtained in a range of *m/z* 10–300, by the electron impact technique at 70 eV. The quantitative analysis of the samples's chemical composition was carried out in a HP 5890 Series II gas chromatograph with flame ionization detector (FID), using the same operational conditions and the same type of column as in the GC/MS analysis, with exception of the injector and detector temperatures that were of 250 and 300 °C, respectively. The percentage of each constituent was calculated by the integral area under the respective peaks in relation to the total area of all the sample constituents. The identification of the major constituent was done based on the information obtained from the mentioned analytic methods, together with proton NMR

(500 MHz) and carbon-13 NMR (125 MHz) spectra data analysis, obtained in a Bruker spectrometer, and comparison with literature data.

2.6 MTT Assay

To test the cytotoxic effects of both the methanol plant extract (MPE) and spilanthol, the cell viability was determined using the (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium] bromide) (MTT) as a substrate, a yellow, water-soluble tetrazolium dye. MTT is taken up into cells and reduced, mainly by mitochondrial enzymes of living cells, to yield a purple water-insoluble formazan product. Briefly, HEK293 cells were seeded into a 96-well tissue culture plate at a density of 1×10^4 cells/well at 37 °C, and exposed to varying concentrations of either MPE or spilanthol (10, 50, 100, 200, 300, 400 µg/mL) for 24 h. Cells incubated with vehicle alone were used as negative control. At the end of treatment, cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS), replenished with 100 µL of media containing 10 µL of MTT (5 mg/mL) and incubated in the dark for 4 h at 37 °C. The resulted formazan crystals were dissolved in 100 µL of DMSO and the absorbance intensity was measured by MULTISKAN GO Microplate Reader (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) at 560 nm, with a reference wavelength of 750 nm. All experiments were performed in triplicate and the cell viability was expressed as a percentage relative to untreated control cells.

2.7 Kidney slices: preparation and treatment

Briefly, adult C57BL/6J male mice were anesthetized with an i.p. injection of tribromoethanol (250mg/kg) and euthanized by cervical dislocation. Kidneys were quickly removed, and sections of approximately 250 µm were cut using a McILWAIN Tissue Chopper (Ted Pella, Inc., Redding, Ca, USA). Kidney slices were incubated at 37 °C for 15 min in Dulbecco's modified Eagle's medium-GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) containing 20 mM HEPES sodium salt. Medium was previously pre-equilibrated in a 5 % CO₂ incubator. After equilibration, slices were stimulated for 2 h at 37 °C either with spilanthol (100 µg/mL), MPE (100 µg/mL) or with the vehicle alone (DMSO), in the same medium. To mimic physiological conditions another set of slices was stimulated for 30 min with spilanthol (100 µg/mL) either alone or followed by a 40 min incubation with desmopressin (dDAVP, 100 nM). Control slices were either stimulated with dDAVP (100 nM) or with the vehicle alone. Treated slices were then divided into two groups, one subjected to western blotting and one to immunofluorescence analysis.

2.8 Cell culture and treatment

HEK293 cells stably expressing NKCC2 (NKCC2-HEK293) (CARMOSINO et al., 2015) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose, GlutaMAX™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), 10 % fetal bovine serum, penicillin (50 U/mL) and streptomycin (50 U/mL) at 37 °C, 5 % CO₂ in a humidified incubator. Cells were grown until ~80 % confluence and then treated either with spilanthol or MPE (100 µg/mL in growth medium) or with the vehicle alone (DMSO), for 24 h at 37 °C, 5 % CO₂. Concentration of use was selected based on MTT measurements on cells viability. When required, NKCC2 activation was induced by a 1 h incubation at 37 °C, 5 % CO₂ in low Cl⁻ medium either in combination with spilanthol (100 µg/mL in growth medium) or vehicle alone, as control condition. Mouse cortical collecting duct MCD4 cells stably expressing human AQP2 were generated and cultured as described elsewhere (STOOS et al., 1991; IOLASCON et al., 2007; PROCINO et al., 2008). To evaluate the effect of spilanthol on AQP2 accumulation at the apical plasma

membrane, MCD4 cells were incubated with 100 μ M forskolin alone for 30 min or after 1 h preincubation with spilanthal (100 μ g/mL in growth medium) both at 37 °C, 5 % CO₂. AQP2 localization was detected by immunofluorescence followed by confocal laser-scanning microscopy.

2.9 Cell and tissue fractionation and immunoblotting

All samples, both from cells and tissues, were processed as follow: cells or slices were lysed in ice-cold antiphosphatase buffer and sonicated for 15 sec. Slices were lysed for 60 additional min on ice. Unsolubilized material was pelleted by centrifugation at 13,000 g for 30 min at 4 °C. Supernatants were separated by standard SDS-PAGE and analyzed by western blotting. Samples were resolved on 8% homemade polyacrylamide gel. After blocking with 3 % bovine serum albumin in TRIS buffer saline-tween 20 (TBS-T), blots were incubated overnight at 4 °C with the following antibodies in blocking buffer: antibody *vs* p-NKCC2 (dil. 1:500) and *vs* total NKCC2 (dil.1:500, cat. #3562P, Millipore, Billerica, MA, USA). Membranes were washed and incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Negative controls with secondary antibodies alone were performed (not shown). Antibody *vs* p-NKCC2 was kindly provided by Prof. Biff Forbush from the Department of Cellular and Molecular Physiology, Yale University, New Haven, CT, USA. Target proteins were revealed with an enhanced chemiluminescent detection system superSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Chemiluminescence was detected with Chemidoc XRS detection system imaged with Image Lab Software (Bio-Rad, Hercules, California, U.S.A.) and quantified with ImageJ software (<http://imagej.nih.gov/ij/>).

2.10 Immunofluorescence confocal analysis

Mouse kidney slices were fixed by immersion in 4 % paraformaldehyde in PBS at 4 °C overnight, cryopreserved in 30 % sucrose in PBS for 12 h and then embedded in optimal cutting temperature medium. Ultra-thin sections (10 μ m) collected on Superfrost/Plus Microscope Slides (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) were subjected to immunofluorescence analysis as follow: non-specific binding sites were blocked with 1 % bovine serum albumin in PBS for 30 min at room temperature. Sections were then incubated with primary antibodies *vs* pNKCC2 (dil. 1:500), *vs* AQP2 (Eurogentec, Seraing, Liège, Belgium, dil: 1:1000) and *vs* Tamm-Horsfall Protein (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA, dil: 1:100) overnight at 4 °C in the same solution. The following day sections were washed in PBS and incubated with the appropriate 488 Alexa-Fluor-conjugated secondary antibody (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) for 1h at room temperature. Confocal images were obtained with a confocal laser-scanning fluorescence microscope Leica TSC-SP2 (Leica Microsystem, Wetzlar, Germany). NKCC2-HEK293 and MCD4 cells seeded on glass coverslips were fixed in ice-cold methanol for 5min, washed in PBS and subjected to immunofluorescence analysis (antibodies *vs* pNKCC2, dil. 1:500, and *vs* AQP2, dil. 1:3000) as described before. Rabbit affinity-purified polyclonal antibody against human AQP2 was previously described (TAMMA et al., 2007).

2.11 FRET-based measurement of cAMP in single cells

Intracellular cAMP level was imaged in single cells using Epac H90 [CFP(nd)-EPAC(δ DEP/CD)-cp173Venus(d)] (VAN DER KROGT et al., 2008). This reporter (kindly provided by Prof. Kees Jalink, Netherlands Cancer Institute) is a soluble monomeric construct that relies on conformation-dependent FRET between YFP- and CFP-labeled fragments of the Epac protein. NKCC2-HEK293 cells were transiently transfected with Epac H90 using the Lipofectamine 2000 transfection reagent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Real-time digital imaging measurements of the 480 nm-to-535 nm FRET emission ratio (reflecting the degree of Epac conformational changes and, thus, intracellular cAMP levels) were carried out using a Metafluor-based imaging set-up described in the following section for intracellular Ca^{2+} measurements. 480/535 nm FRET emission ratio was recorded and normalized to basal fluorescence ratio observed in the absence of stimulus (R/R0). At the end of each experiment using the cAMP probe, cells were stimulated with a supramaximal dose of forskolin (5–10 μM), a reliable activator of adenylate cyclase (AC). Since cells were occasionally fluorescent but nonetheless nonresponsive to agonists (possibly because of improper folding or targeting of the probe), only the cells that responded to forskolin with a large ratio increase were statistically averaged. Data from 5-8 cells were summarized in a single experiment, and at least four independent runs were conducted. Paired data were assessed whenever possible for statistical significance using the Student's t test. Data are expressed as means \pm SEM with n equal to the number of experiments. $P < 0.05$ was considered statistically significant for cAMP FRET experiments.

Steady state FRET experiments were performed as previously described (DI MISE et al., 2015). Briefly, NKCC2-HEK293 cells were grown onto \varnothing 20mm glass coverslips at 37 °C and transfected with Epac H90 using Lipofectamine 2000. Cells were either left under basal condition or stimulated for 30 min with forskolin (100 μM) or alternatively with spilanthalol at 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (60 min) in regular medium at 37 °C. 48 hours post-transfection cells were fixed with ice-cold methanol and mounted on glass slides. Steady state FRET measurements were carried out using MetaMorph software (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Toronto, Canada). It is important to note that cAMP production decreases the netFRET signal calculated using the following equation. NetFRET signal = FRET signal – a x YFP signal – b x CFP signal where a and b are the ratio of the signal in FRET channel to the signal in YFP channel in the absence of donor and to the signal in CFP channel in the absence of acceptor respectively. Data from 15 different fields each one containing at least 3 cells were summarized for a single coverslip/treatment, and at least three independent coverslips were blind-analyzed.

Unpaired data were assessed for statistical significance using the Student's t test. Data are expressed as means \pm SEM with n equal to the total number of cells analyzed. $P < 0.05$ was considered statistically significant for cAMP FRET experiments.

2.12 Intracellular Ca^{2+} measurements

For intracellular Ca^{2+} measurements, cells were seeded on \varnothing 40 mm glass coverslips. Either NKCC2-HEK293 or MCD4 cells were loaded with 5-7 μM Fura-2AM for 30 min at 37 °C in DMEM. For fluorescence measurements, the coverslips with dye-loaded cells were mounted in a perfusion chamber (FCS2 Closed Chamber System, BIOPTECHS, Butler, U.S.A.) and measurements were performed using an inverted microscope (Nikon Eclipse TE2000-S microscope, Shinagawa, Tokyo, Japan) equipped for single cell fluorescence measurements and imaging analysis. The sample was illuminated through a 40X oil immersion objective (NA = 1.30). The Fura-2AM loaded sample was excited at 340 and 380 nm every 5 seconds. Emitted fluorescence was passed through a dichroic mirror, filtered at 510 nm (Omega

Optical, Brattleboro, VT, USA) and captured by a cooled CCD camera (CoolSNAP HQ, Photometrics, Tucson, AZ, USA). Fluorescence measurements were carried out using Metafluor software (Molecular Devices, MDS Analytical Technologies, Toronto, Canada). Results are presented as the ratio of the fluorescence signal obtained upon excitation at 340/380 nm normalized to the basal fluorescence ratio observed in the absence of stimulus (R/R0). The bar graphs show the averaged rate of fluorescence ratio changes with respect to those elicited by ATP used in each experiment as internal control. Data from 20 to 40 cells were summarized in a single run, and at least three independent experiments were conducted.

Paired data were assessed for statistical significance using the Student's t test. Data are expressed as means \pm SEM with n equal to the number of experiments. P <0.05 was considered statistically significant for Fura-2 ratio imaging experiments.

3 Results

3.1 Isolation of spilanthol from *Acmella oleracea*

To isolate spilanthol, the main component of *A. oleracea*, MeOH plant extract (MPE) was subjected to successive extractions with n-hexane and dichloromethane solvents to obtain different plant fractions. All fractions were then subjected to detailed chemical analysis (see Methods) to identify their components.

We found that Fraction 2 (F2) contains spilanthol with a 99 % grade of purity. The percentage of the F2 main constituent was calculated by the integral area under the respective peaks in relation to the total area of all the sample constituents; the grade of purity of the main compound was 99 % (Fig 1A). F2 was then subjected to MS analysis to identify the structure of the main compound. The electron impact ionization analysis MS spectra (Fig 1B) evidenced a molecular ion peak at m/z 221.04, corresponding to a molecular formula of $C_{14}H_{23}NO$, and two peaks at m/z 81.04 and 141.01 respectively, that are characteristic fragments coming from the spilanthol mass spectra. In fact, the two main fragments were generated from the amidic bond fragmentation that is normally observed in this kind of compounds (BOONEN et al., 2010).

As described above, the confirmation that F2 was spilanthol was also performed with proton NMR (500 MHz) and carbon-13 NMR (125 MHz) spectra data analysis, comparing our results with literature data (data not shown) (MARTIN and BECKER, 1984). Due to these results it is possible to confirm spilanthol as the main constituent of the dichloromethane fraction/F2 with 99 % grade of purity.

3.2 Citotoxicity assay

To identify the non-toxic concentration of both MPE and spilanthol, we performed the cytotoxic assay on HEK293 cells. As shown in Fig 1C, both MPE and spilanthol induced cell death in a dose-dependent manner as compared with vehicle controls. The IC50 values at 24 h for MPE and spilanthol were 234 μ g/mL and 260 μ g/mL, respectively. Based on these results, in the following functional studies, we used both MPE and spilanthol at 100 μ g/mL or lower, far below the IC50 values.

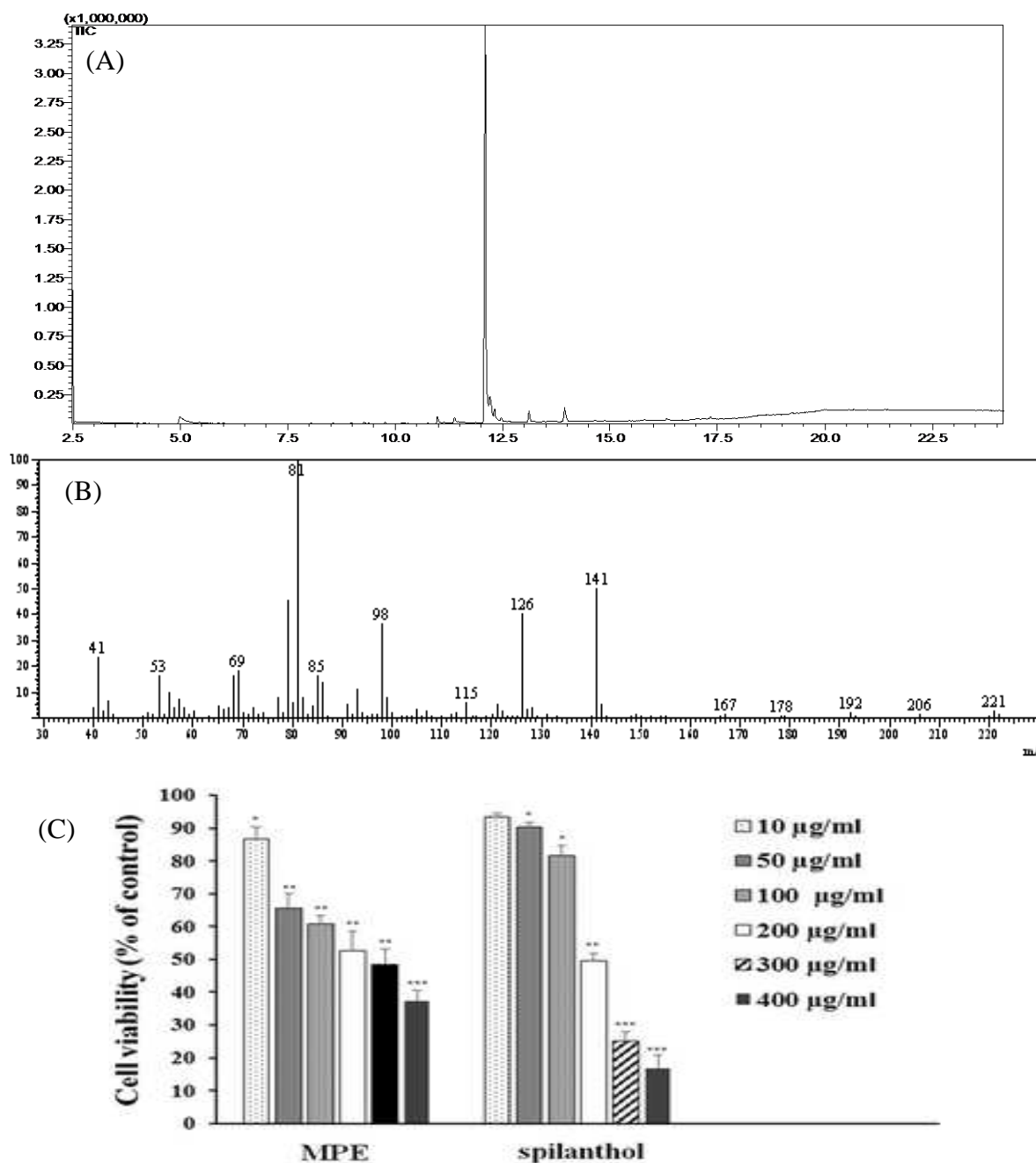


Figure 1. Isolation of spilanthol and evaluation of its cytotoxicity. **(A)** Chromatogram of sample containing spilanthol - dichloromethane fractions. **(B)** Mass spectrum of spilanthol. **(C)** Viability of HEK293 cells cultured in the absence and presence of diverse doses of either MPE or spilanthol. Cells were subjected to MTT assay as described in Materials and Methods. The cell viability of control cells was defined as 100 % (not shown in the histogram). The reported values are mean \pm SD from three independent experiments (* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 vs control).

3.3 Spilanthol inhibits NKCC2 phosphorylation under basal and stimulated conditions

At first, we investigated the putative effect induced by spilanthol on NKCC2 whose activity, crucial for NaCl reabsorption in the TAL, drives the urine concentrating mechanism. We aimed at quantifying the phosphorylation of NKCC2 (pNKCC2) as index of its activation using an antibody that specifically recognizes the regulatory phospho-threonines 96 and 101

(FLEMMER et al., 2002) (known as R5), required for NKCC2 activity (GIMÉNEZ and FORBUSH, 2005). Here, immunofluorescence experiments on freshly isolated kidney slice showed the expression and the proper apical localization of pNKCC2 in the TAL cells under unstimulated conditions (Fig 2A). R5 antibody signal was clearly confined at the apical membrane of AQP2-negative tubules (Fig 2A, left panel) and in Tamm-Horsfall positive tubules visualized in the sequential slice (Fig 2A, right panel).

A semi-quantitative analysis of pNKCC2 on kidney slices lysates exposed to either 100 µg/mL MPE or 100 µg/mL spilanthol showed a significant reduction of pNKCC2 level compared to control conditions, as measured by Western blotting (Fig 2B, MPE, Spil).

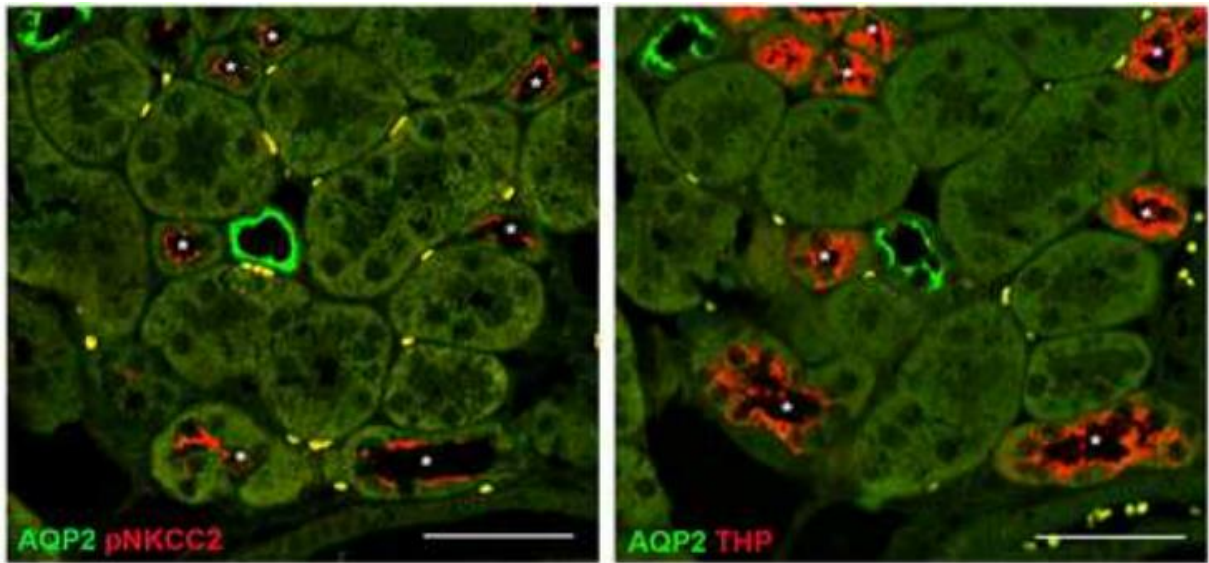
Concentration below 100 µg/mL of both spilanthol and MPE resulted ineffective in modulating the NKCC2 phosphorylation in this experimental condition (data not shown).

Densitometric analysis showed a significant reduction of pNKCC2 (normalized to total NKCC2) in kidney slices exposed to either MPE (pNKCC2 expression: 8966.35 a.u. ± 1208.12 vs 16508.84 a.u. ± 726.45, ***p<0.001) or spilanthol (pNKCC2 expression: 5725.34 a.u. ± 327.14 vs 16508.84 a.u. ± 726.45, *** p<0.001) compared to control condition. Interestingly, the effect induced by spilanthol was significantly larger than that exerted by MPE (pNKCC2 expression: 5725.34 a.u. ± 327.14 vs 8966.35 a.u. ± 1208.12, ** p<0.01).

The same results were obtained in parallel experiments performed using HEK293 cells stably transfected with the full length NKCC2 (Fig 3, NKCC2-HEK293 cells).

Densitometric analysis showed a significant reduction of pNKCC2 (normalized to total NKCC2) in NKCC2-HEK293 cells exposed to either MPE (pNKCC2 expression: 1.88 a.u. ± 0.20 vs 4.90 a.u. ± 0.28, ***p<0.001) or spilanthol (pNKCC2 expression: 0.81 a.u. ± 0.04 vs 4.90 a.u. ± 0.28, ***p<0.001) compared to control condition (Fig 3, MPE, Spil). Spilanthol-induced reduction of pNKCC2 was significantly larger than that evoked by MPE (pNKCC2 expression: 0.81 a.u. ± 0.04 vs 1.88 a.u. ± 0.20, **p<0.01).

(A)



(B)

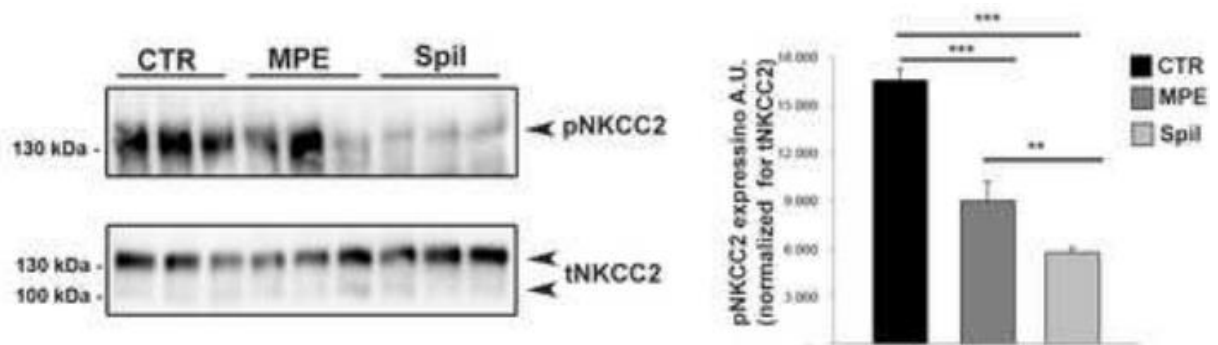


Figure 2. Exposure to spilanthal reduced basal NKCC2 phosphorylation (pNKCC2) in mouse kidney slices. **(A)** Coimmunostaining of R5 antibody (pNKCC2) with AQP2 as marker of collecting ducts (AQP2) and Tamm-Horsfall Protein as marker of TAL tubules (THP) in serial kidney sections. Asterisks indicate corresponding TAL tubules in the serial sections, Bar = 30 μ m. **(B)** Kidney slices (250 μ m) were stimulated 2h with either 100 μ g/mL MPE or 100 μ g/ml spilanthal, then lysed and total protein extracts analyzed for pNKCC2 expression as shown by this representative Western blot. **Right panel.** Densitometric analysis showed a significant reduction of pNKCC2 (normalized to total NKCC2) in kidney slices stimulated with either MPE ($***p < 0.001$) or spilanthal ($***p < 0.001$) compared to control condition. Spilanthal-induced reduction of pNKCC2 was significantly larger than that evoked by MPE ($**p < 0.01$). Comparable results were obtained in two different mice preparations and significance calculated by Student's T-test for unpaired data.

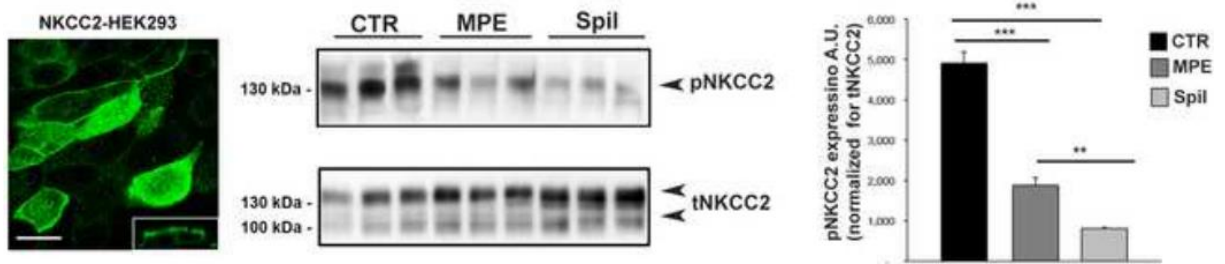
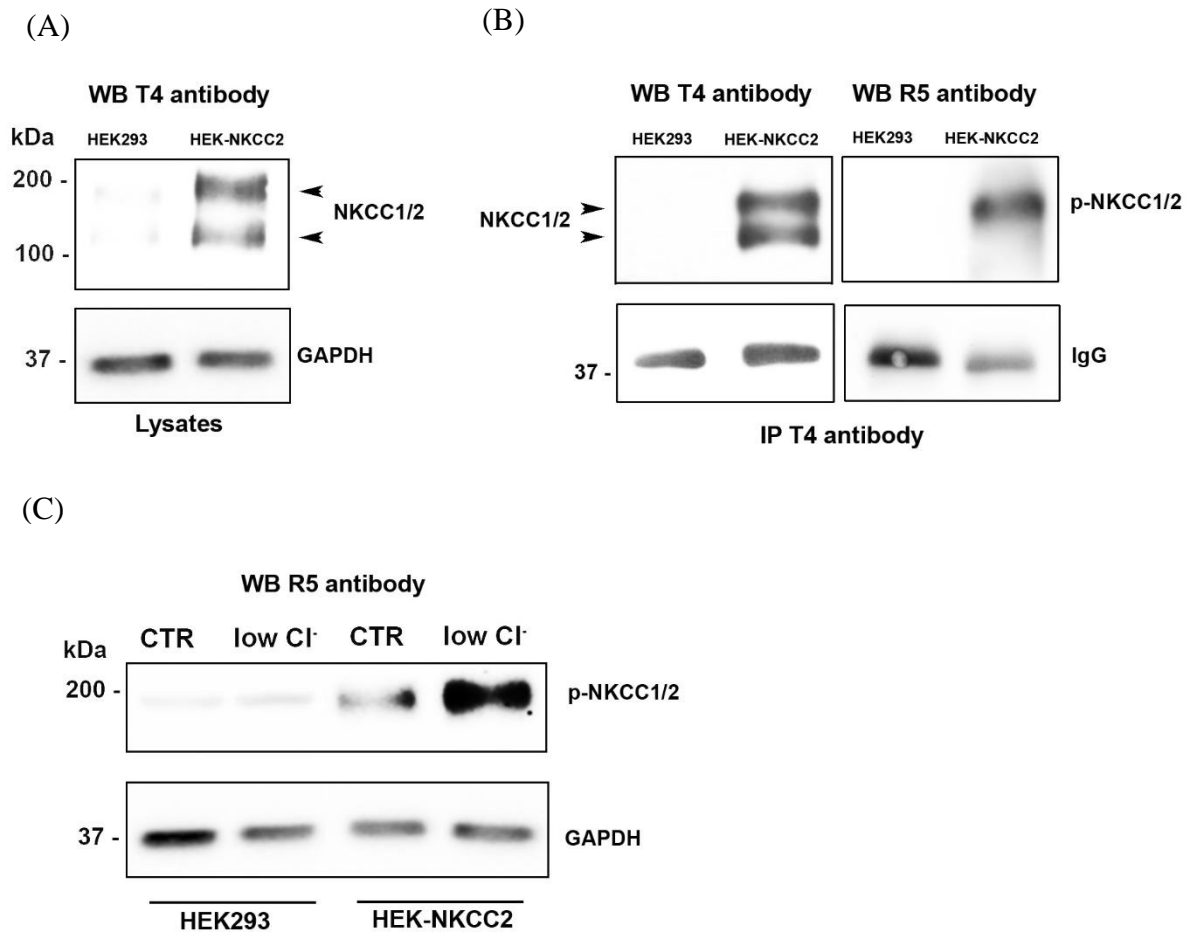


Figure 3. Exposure to spilanthal reduced basal NKCC2 phosphorylation (pNKCC2) in NKCC2 expressing HEK cells. **Left panel.** HEK293 cells stably transfected with NKCC2 were stained for NKCC2 and analyzed with confocal laser-scanning microscopy. Note the proper localization of NKCC2 in this cell line. Bar = 10 μ m. **Middle panel.** NKCC2-HEK293 cells were stimulated overnight with either 100 μ g/mL MPE or 100 μ g/mL spilanthal, then lysed and total protein extracts analyzed for pNKCC2 expression as shown by this representative Western blot. **Right panel.** Densitometric analysis showed a significant reduction of pNKCC2 (normalized to total NKCC2) in NKCC2-HEK293 cells stimulated with either MPE (** p <0.001) or spilanthal (** p <0.001) compared to control condition. Spilanthal-induced reduction of pNKCC2 was significantly larger than that evoked by MPE (** p <0.01). Comparable results were obtained in three different experiments and significance calculated by Student's T-test for unpaired data.

Control experiments in untransfected HEK293 cells were reported in S1 Fig.

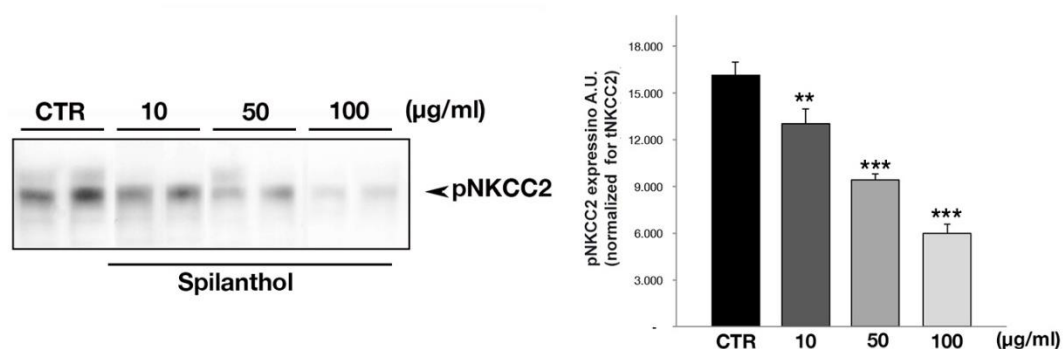
Results obtained so far suggested that spilanthal is the main bioactive component of the plant extract able to impinge NKCC2 phosphorylation. We indeed, performed the following experiments using spilanthal.

Moreover, in NKCC2-HEK293 cells, spilanthal resulted effective also at lower doses as shown in the dose-response assay shown in the S2 Fig.



Supplementary 1 Fig. Western blot analysis using T4 and R5 antibody on both untransfected and NKCC2 expressing HEK293 cells.

A) Expression of NKCC cotransporters in lysates from untransfected (HEK293) and NKCC2-expressing HEK293 cells (HEK-NKCC2), using T4 antibody recognizing both NKCC1 and NKCC2 (Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, Iowa; <http://dshb.biology.uiowa.edu/Na-K-Cl->). The expression of endogenous NKCC1 in HEK293 cells was barely detectable compared to the expression of NKCC2 in NKCC2-transfected HEK293 cells, used in the *in vitro* study. **B)** Western Blotting using either T4 antibody (WB T4 antibody) or R5 antibody (WB R5 antibody) on NKCC1/2 immunoprecipitates from untransfected (HEK293) and NKCC2-expressing HEK293 cells (HEK-NKCC2) lysates. T4 antibody, used to immunoprecipitate both NKCC1 and 2, was unable to immunoprecipitate the endogenously expressed NKCC1 in HEK293 cells, most likely for the low level of NKCC1 expression in HEK293 cells. Thus, R5 antibody was able to recognize only NKCC2 immunoprecipitated from NKCC2-expressing HEK293 cells lysate (WR R5 antibody, pNKCC1/2). **C)** Western blotting using R5 antibody on lysates from untransfected (HEK293) and NKCC2-expressing HEK293 cell (HEK-NKCC2) either in resting (CTR) or activating conditions (low Cl⁻). R5 antibody showed a faint signal at the molecular weight corresponding to NKCC, in untransfected HEK293 cells, which however did not increase in low Cl⁻ activating conditions.



Supplementary 2 Figure. Effect of increasing dose of Spilanthol on NKCC2 phosphorylation in renal cells. Left panel. NKCC2-HEK293 cells were stimulated overnight with the indicated amount of Spilanthol (10, 50, 100 µg/mL) then lysed and total protein extracts analyzed for pNKCC2 expression as shown by this representative Western blot. Right panel. Densitometric analysis showed a significant reduction of pNKCC2 (normalized to total NKCC2) in NKCC2-HEK293 cells proportional at the concentration of Spilanthol used (*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$) compared to control condition. Comparable results were obtained in three different experiments and significance calculated by Student's T-test for unpaired data.

Next, we aimed at investigating whether spilanthol was also able to inhibit NKCC2 phosphorylation when the cotransporter was under intense activating conditions. It is known that desmopresin (dDAVP) enhances NKCC2 phosphorylation in the TAL primarily via AVPR2-mediated increase in intracellular cAMP (GIMÉNEZ and FORBUSH, 2003). We indeed, assayed the spilanthol effect on kidney slices treated with dDAVP by western blotting (Fig 4A). As expected the phosphorylation levels of NKCC2 in response to dDAVP significantly increased. However, when kidney slices were pretreated with 100 µg/mL spilanthol for 60 min, the dDAVP-induced increase of pNKCC2 recorded in stimulating conditions was significantly reduced (Fig 4A, dDAVP, dDAVP + Spil). The densitometric analysis of pNKCC2 normalized *vs* total NKCC2 showed that the significant increase of pNKCC2 induced by dDAVP (pNKCC2 expression: 2283.44 a.u. \pm 313.53 *vs* 12505.68 a.u. \pm 1397.62, *** $p < 0.001$) was inhibited in kidney slices after pretreatment with spilanthol (pNKCC2 expression: 12505.68 a.u. \pm 1397.62 *vs* 6221.56 a.u. \pm 437.94, *** $p < 0.001$).

Similar results were obtained in NKCC2-HEK293 cells where NKCC2 was maximally activated by incubating cells in a low Cl⁻ solution (Fig 4B). Intracellular Cl⁻ depletion activates NKCC2 by promoting the phosphorylation of three threonines (96, 101, and 111) in the amino terminus (PONCE-CORIA et al., 2008). As expected the level of pNKCC2 clearly increased in response to low Cl⁻ stimulation (Fig 4B, low Cl⁻, - Spil) in NKCC2-HEK293 cells. On the other hand, in cells pretreated with 100 µg/mL spilanthol the amount of pNKCC2 was decreased both under basal conditions and upon low Cl⁻ activation relative to cells not exposed to spilanthol (Fig 4B, low Cl⁻, + Spil). The densitometric analysis of pNKCC2 normalized *vs* total NKCC2 showed a significant increase of pNKCC2 in low Cl⁻-stimulated NKCC2-HEK293 cells when compared with unstimulated cells (pNKCC2 expression: 4555.57 a.u. \pm 667.12 *vs* 9457.29 a.u. \pm 814.20, *** $p < 0.001$). Pretreatment with 100 µg/mL spilanthol reduced the amount pNKCC2 both under basal conditions (pNKCC2 expression: 4555.57 a.u. \pm 667.12 *vs* 2088.71 a.u. \pm

200.00, $**p < 0.01$) and upon low Cl^- activation (pNKCC2 expression: $9457.29 \text{ a.u.} \pm 814.20$ vs $4728.98 \text{ a.u.} \pm 674.56$, $^{\circ\circ}p < 0.01$) relative to cells not exposed to spilanthol.

Collectively these results suggest that: 1) *A. oleracea* extract may act as diuretic inhibiting the NKCC2 activity in the TAL; 2) spilanthol is the bioactive compound of *A. oleracea* responsible for its diuretic properties.

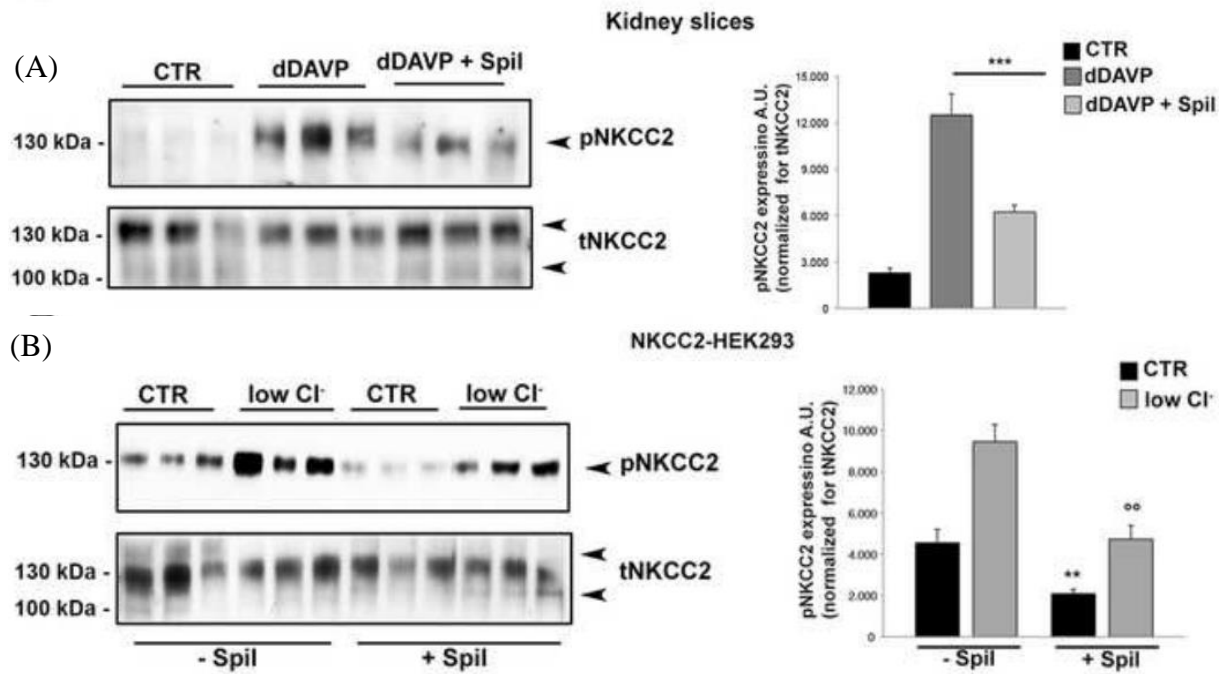


Figure 4. Exposure to spilanthol reduced both dDAVP- and low Cl^- stimulated NKCC2 activation in mouse kidney slices and NKCC2-HEK293 cells. **(A) Left panel.** Freshly-isolated kidney slices were stimulated 40 min with desmopressin (dDAVP) either in the absence (dDAVP) or in the presence of $100 \mu\text{g/mL}$ spilanthol (dDAVP + spil), then lysed and total protein extracts analyzed for pNKCC2 expression as shown by the representative Western blot. **Right panel.** The densitometric analysis normalized vs total NKCC2 showed that the significant increase of pNKCC2 induced by dDAVP ($***p < 0.001$) was inhibited after pretreatment with spilanthol ($***p < 0.001$) in kidney slices. Comparable results were obtained in two different mice preparation and significance calculated by Student's T-test for unpaired data. **(B) Left panel.** NKCC2-HEK293 cells were stimulated with 1h incubation in low Cl^- medium either in the presence of spilanthol ($100 \mu\text{g/mL}$ in growth medium) or not, as control condition. Cells were then lysed and total protein extracts analyzed for pNKCC2 expression as shown by this representative Western blot. **Right panel.** The densitometric analysis normalized vs total NKCC2 showed a significant increase of pNKCC2 in low Cl^- -stimulated NKCC2-HEK293 cells when compared with unstimulated cells ($***p < 0.001$). Pretreatment with $100 \mu\text{g/ml}$ spilanthol reduced the amount of pNKCC2 both under basal conditions ($** p < 0.01$) and upon low Cl^- activation ($^{\circ\circ}p < 0.01$) relative to cells not exposed to spilanthol. Comparable results were obtained in three different experiments and significance calculated by Student's T-test for unpaired data.

3.4 Spilanthol reduces AQP2 apical expression in both MCD4 cells and kidney slices

We then focused our attention on the AVP-dependent AQP2 accumulation at the apical plasma membrane of CD, another important player in the urinary concentrating mechanism. At first, the study was performed on freshly isolated kidney slice. In order to physiologically

stimulate AQP2 exposure on the apical membrane of the cells lining the CD we used the AVPR2 specific agonist dDAVP. As shown in Fig 5A, we analyzed AQP2 subcellular localization in freshly isolated kidney slices in resting condition (CTR), after 100 µg/ml spilanthal exposure (Spil), and after stimulation with dDAVP in the absence (dDAVP) or in the presence of spilanthal (Spil+dDAVP). Spilanthal did not increase the rate of AQP2 apical exposure when compared to kidney slices in control condition. Of note, exposure to spilanthal largely prevented the dramatic redistribution of AQP2 on the apical membrane induced by the exposure to dDAVP in freshly isolated kidney slices.

We then assessed the putative inhibitory effect of spilanthal on AQP2 translocation on MCD4 cells, a clone of M-1 cells stably transfected with human-AQP2 (STOOS et al., 1991; IOLASCON et al., 2007; PROCINO et al., 2008). Fig 5B reports the confocal analysis of AQP2 subcellular localization in MCD4 renal cells in unstimulated condition and after incubation with the AC activator forskolin (FK), either in the absence or in the presence of 100 µg/mL spilanthal (Spil+FK). Compared to the prevalent cytosolic AQP2 staining in resting conditions, the increased cAMP level induced by exposure to forskolin clearly redistributed AQP2 staining at the apical plasma membrane of MCD4 cells. Of note, 30 min pre-exposure to 100 µg/mL spilanthal significantly prevented the FK-induced effect on AQP2 membrane accumulation as observed both in a xy confocal plan, passing through the cell apical membrane (upper panel), and in the xz confocal plan.

Altogether, these findings indicate that spilanthal effectiveness as diuretic seems to be related to its inhibitory effects on both NKCC2 phosphorylation in the TAL and AQP2 accumulation at the apical plasma membrane of CD.

We wondered therefore to verify whether spilanthal was able to increase diuresis as well as salt urinary excretion when administered *in vivo*.

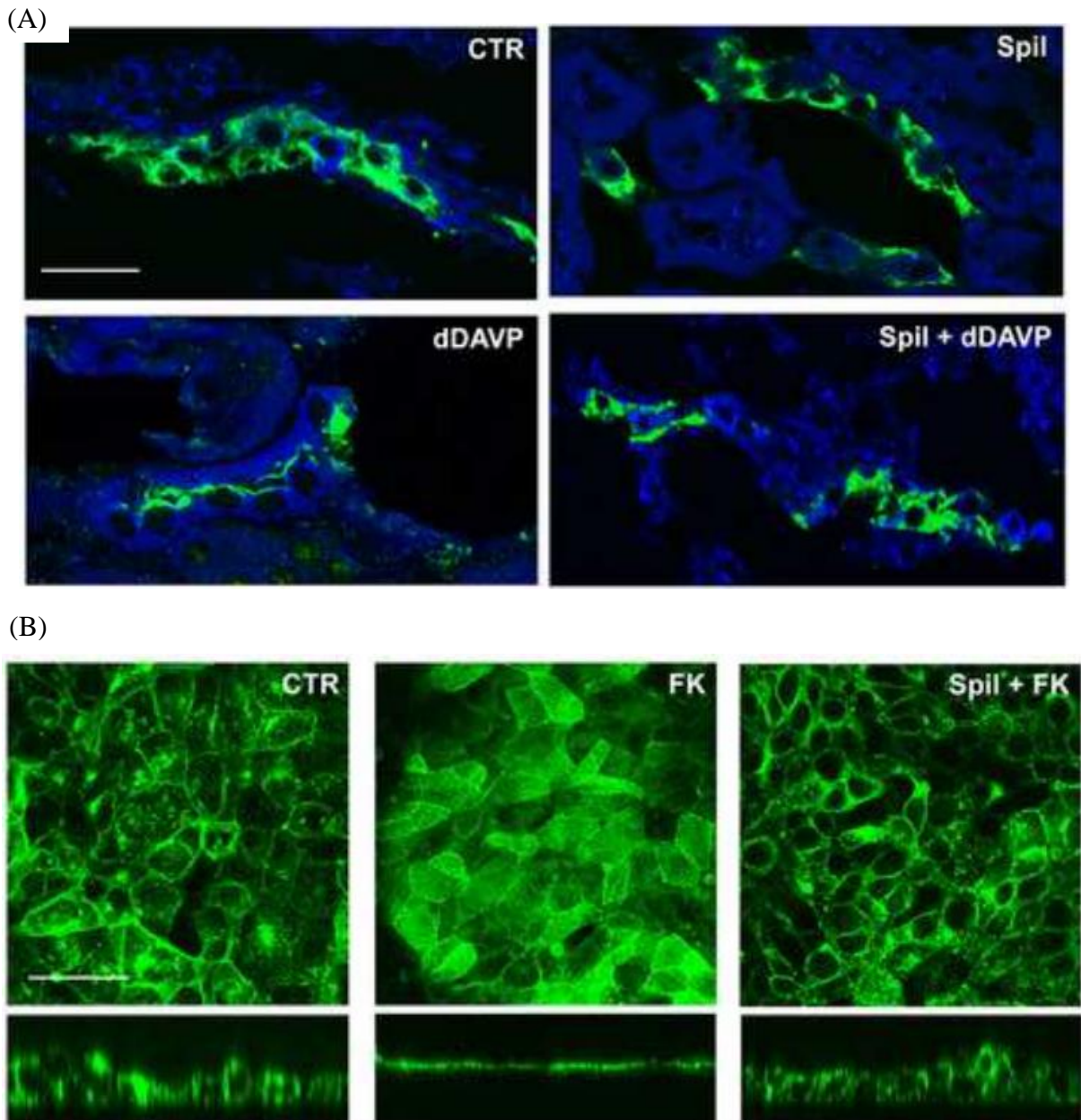


Figure 5. Spilanthol decreases apical plasma membrane expression of AQP2 in freshly isolated kidney slices and MCD4 cells. **(A)** Immunofluorescence analysis of AQP2 subcellular localization in freshly isolated kidney slices in resting condition (Ctr), after 100 µg/mL spilanthol stimulation (Spil), and after incubation with dDAVP in the absence (dDAVP) or in the presence of the spilanthol (Spil + dDAVP). Compared to Ctr and Spil conditions, dDAVP redistributed AQP2 staining to the apical plasma membrane. Of note, spilanthol prevented the dDAVP-induced effect on AQP2 membrane accumulation. Bar = 30 µm. **(B)** Immunofluorescence analysis of AQP2 subcellular localization in MCD4 renal cells in resting condition and after incubation with forskolin (FK) in the absence or in the presence of 100 µg/mL spilanthol (Spil + FK). AQP2 immunostaining was visualized in the xy apical confocal plan (upper panels) and in the xz confocal plan (lower panels). Compared to Ctr conditions, FK redistributed AQP2 staining to the apical plasma membrane. Spilanthol prevented the FK-induced effect on AQP2 membrane accumulation. Bar = 20 µm. Pictures are representative of at least three independent experiments giving the same results.

3.5. *In vivo* effect of acute administration of spilanthol on urinary parameters

Twenty-four-hour urine samples were obtained by placing the mice in metabolic cages, 6 for each group. As shown in Table 1, 800 mg/Kg p.o. spilanthol-treated mice exhibited a significant 2-fold increase in urine output compared with control mice (ml/24h: 2.23 ± 0.202 vs. 1.05 ± 0.180 , $n = 6$ per group, $p < 0.01$). This observation was associated with a markedly reduced urine osmolality compared with control mice (milliosmoles/kg/24h: 1697 ± 309.5 vs. 3083 ± 196.5 , $n = 6$ per group, $p < 0.05$). In addition, spilanthol-induced diuresis was accompanied by an increase in sodium (mEq/24h: 0.210 ± 0.017 vs. 0.123 ± 0.018 , $p < 0.05$), potassium (mEq/24h: 0.200 ± 0.019 vs. 0.130 ± 0.011 , $p < 0.05$) and chloride (mEq/24h: 0.31 ± 0.023 vs. 0.21 ± 0.025 , $p < 0.05$) excretion.

These results clearly suggested that orally administered spilanthol is able to mimic the effect of furosemide, strongly supporting the conclusion from our *ex vivo* and *in vitro* studies.

We therefore aimed at understanding at cellular level the mechanisms by which spilanthol exerted the effects reported so far on the urine concentrating mechanisms.

Table 1. 24-h Urine output, urine osmolality and renal electrolyte excretion in control and spilanthol treated mice (800 mg/kg p.o.).

Urine Parameter	Control	Spilanthol	
Volume (mL)/24 h	1.05 ± 0.180	2.23 ± 0.202	**
Osmolality (mOsmol/kg)/24 h	3083 ± 196.5	1697 ± 309.5	**
Na ⁺ mEq/24 h	0.123 ± 0.018	0.21 ± 0.017	*
K ⁺ mEq/24 h	0.13 ± 0.011	0.20 ± 0.019	*
Cl ⁻ mEq/24 h	0.21 ± 0.025	0.31 ± 0.023	*

Values are means \pm SEM of measurements in $n=6$ mice/group. Statistical analysis was performed using Student's T-test for unpaired data. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

3.5. Role of spilanthol in terminating cAMP signaling

Because AVPR2 activation enhances NKCC2 phosphorylation and AQP2 membrane accumulation primarily via increases in intracellular cAMP, we assessed whether or not exposure to 100 μ g/mL spilanthol might impinge cAMP signaling induced by a physiological agonist such as isoproterenol in NKCC2-HEK293 cells. The representative grey trace in Fig. 6A shows that exposure to spilanthol by itself reduced cAMP levels, as measured by the FRET-based probe H90. Under the continuous presence of spilanthol, the large elevation of the emission ratio induced by 10 μ M isoproterenol was partly abolished as evident by comparison with the black trace representing a cell not exposed to spilanthol (Fig 6A). In addition, exposure to spilanthol also reduced the elevation of intracellular cAMP level induced by forskolin (Fig 6B, FK), which directly activates AC. Statistical analysis revealed that spilanthol significantly inhibited the production of cAMP induced by both 10 μ M isoproterenol ($\Delta R/R_0$: $0.621 \text{ a.u.} \pm 0.031$, $n=28$ cells vs $0.279 \text{ a.u.} \pm 0.012$, $n=25$ cells, *** $p < 0.001$) and 10 μ M forskolin ($\Delta R/R_0$: $0.651 \text{ a.u.} \pm 0.017$, $n=28$ cells vs $0.226 \text{ a.u.} \pm 0.024$, $n=25$ cells, *** $p < 0.001$), respectively.

Interestingly, spilanthol exposure was also able to reverse cAMP production in cells previously stimulated with isoproterenol. The representative grey trace in Fig 6C indicated that

spilanthol addition, during the isoproterenol-induced cAMP elevation, caused a rapid reversal of the emission ratio, as measured with the Epac-based probe. The representative black trace indicates control recording not exposed to spilanthol. These data indicate that short-time exposure (1-5 min) to spilanthol was able to reduce or reverse agonist-induced cAMP production in NKCC2-HEK293 cells.

We then wondered whether or not a longer exposure to spilanthol (60 min) similar to that used to evaluate its effect on NKCC2 phosphorylation was able to affect intracellular cAMP levels. Steady state FRET experiments were performed with Epac-H90, which reports increases in cAMP levels as reduction of NetFRET signal (Fig 6D). H90-transfected NKCC2-HEK293 cells were either left under basal condition (resting) or treated with 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ spilanthol (60 min) or 10 μM forskolin (30 min). Compared with untreated cells (NetFRET: 13073.82 a.u. \pm 880.18, n=128 cells), long-term exposure to spilanthol significantly increased netFRET signal (NetFRET: 16013.22 a.u. \pm 661.98, n=115 cells, * p <0.05 vs untreated) indicating a reduction of basal intracellular cAMP. On the other hand, forskolin significantly reduced net FRET signal when compared with untreated cells (NetFRET: 8445.308 a.u. \pm 1267.65, n=120 cells, ** p <0.01 vs untreated).

Altogether these results indicate that both short- and long-term exposure to spilanthol rapidly reduced or reversed basal and agonist-induced increases of cAMP levels in NKCC2-HEK293 cells, respectively.

In view of previous studies in which Ca^{2+} -mediated agonists were found to reduce intracellular cAMP levels in renal cells (DE JESUS FERREIRA et al., 1998), parallel experiments were performed with Fura-2 loaded NKCC2-HEK293 cells to examine whether spilanthol had any effect on intracellular Ca^{2+} signaling. Results shown in Fig 7A indicate that in the presence of 1.2 mM extracellular Ca^{2+} in the perfusing solution, 15-20 min exposure to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ spilanthol elicited a biphasic cytosolic Ca^{2+} increase: a fast and large transient followed by a slow increase in intracellular calcium levels. Fig 7B showed that the cytosolic Ca^{2+} transient induced by spilanthol was significantly larger than that produced by a sub-maximal dose of the Ca^{2+} -mobilizing agonist ATP (100 μM) used in the same cells as internal control. In addition, the data in Fig 7B right inset, showed that spilanthol-induced Ca^{2+} increase ($\Delta\%$ Ratio vs ATP: 568.44 % \pm 61.24, n=75 cells) was significantly reduced in the absence of extracellular Ca^{2+} ($\Delta\%$ Ratio vs ATP: 403.89 % \pm 41.40, n=68 cells, * P <0.05), suggesting that an important component of the Ca^{2+} signal elicited by spilanthol was represented by Ca^{2+} entry across the plasma membrane.

To evaluate the role of internal Ca^{2+} stores in the effect exerted by spilanthol, NKCC2-HEK293 cells were exposed to the sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -adenosine triphosphatase (SERCA) pump inhibitor cyclopiazonic acid (CPA; 20 μM , 20 min) in the absence of extracellular Ca^{2+} (Fig 7C). CPA-induced depletion of internal Ca^{2+} stores as a result of Ca^{2+} leak from the ER transiently elevates intracellular Ca^{2+} levels. Under these experimental conditions exposure to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ spilanthol did not cause any change in the Fura-2 ratio clearly indicating that spilanthol enhanced both Ca^{2+} influx at the plasma membrane and Ca^{2+} release from the intracellular calcium stores. Similar results were obtained in parallel experiments performed on Fura-2 loaded MCD4 cells (data not shown).

We next attempted to evaluate the relative contributions of Ca^{2+} signaling on spilanthol-mediated inhibition of cAMP production in NKCC2-HEK293 cells. During these experiments we eliminated the Ca^{2+} signaling component by pretreating the cells with BAPTA-AM, a cell-permeant highly selective Ca^{2+} chelator. Control experiments (Fig 8A) demonstrated that spilanthol and ATP were not able to induce any increase in intracellular Ca^{2+} levels in BAPTA-pretreated NKCC2-HEK293 cells loaded with Fura-2. Under these experimental conditions the elevation of the Epac H90 emission ratio induced by neither 10 μM isoproterenol ($\Delta\text{R}/\text{R}_0$: 0.675 a.u. \pm 0.013) nor 10 μM forskolin ($\Delta\text{R}/\text{R}_0$: 0.627 a.u. \pm 0.031) were reduced by pre-exposure to

spilanthol (Fig 8B). In addition, spilanthol by itself did not reduce basal cAMP levels, as measured by FRET, clearly indicating that spilanthol exerts its inhibitory action on cAMP signaling working through intracellular Ca^{2+} increases.

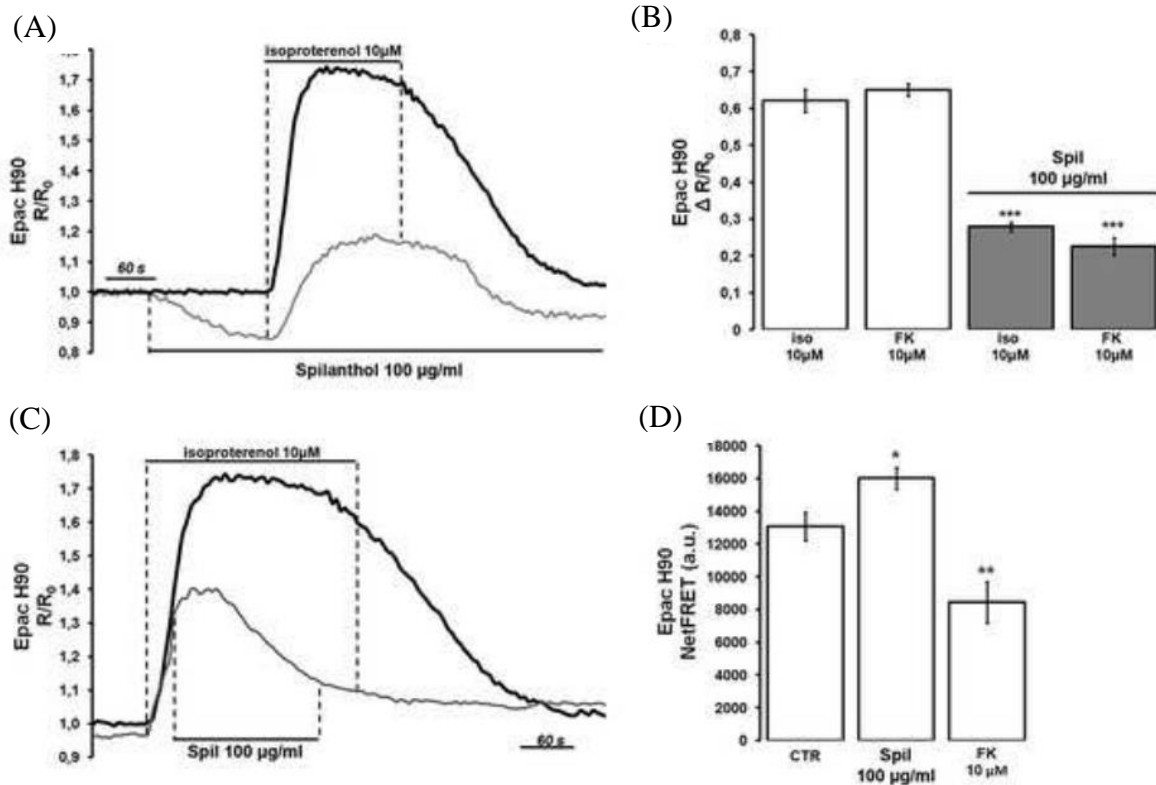


Figure 6. Stimulation of NKCC2-HEK293 cells with spilanthol both prevents and reverses isoproterenol-induced cAMP formation as measured by the 480/535 nm emission ratio of the Epac sensor H90. **(A)** The grey trace shows that the response to a supramaximal dose of 10 μM isoproterenol is reduced by pretreatment with 100 $\mu\text{g/ml}$ spilanthol. Note that exposure to spilanthol by itself reduced basal cAMP levels. The black trace represents control recording not exposed to spilanthol. **(B)** Statistical analysis revealed that spilanthol inhibited the production of cAMP induced by both 10 μM isoproterenol (***) and 10 μM forskolin (***) $p < 0.001$). Comparable results were obtained in 4 different runs and significance calculated by Student's T-test for unpaired data. **(C)** The grey trace shows that acute addition of 100 $\mu\text{g/ml}$ spilanthol during stimulation with 10 μM isoproterenol reverses the ratio elevation. The black trace represents control recording not exposed to spilanthol. **(D)** H90-transfected NKCC2-HEK293 cells were either left under basal condition (resting) or treated with 100 $\mu\text{g/ml}$ spilanthol (60 min) or 10 μM forskolin (30 min). Compared with untreated cells, spilanthol significantly increased netFRET signal (* $p < 0.05$ vs untreated). On the other hand, forskolin significantly reduced netFRET signal when compared with untreated cells (** $p < 0.01$ vs untreated). Unpaired data were assessed for statistical significance using the Student's t test. Data are expressed as means \pm SEM with n equal to the total number of cells analyzed.

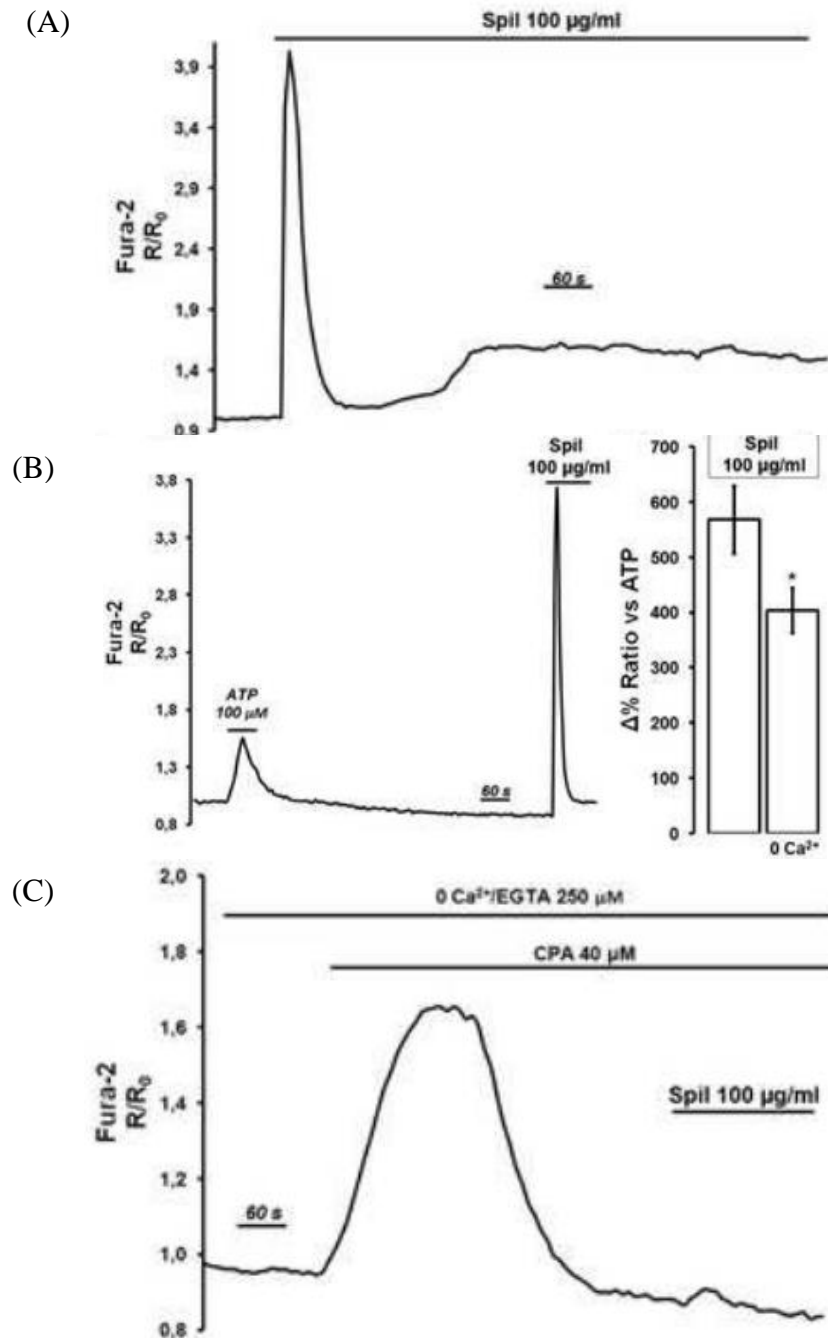


Fig 7. Spilanthol increases intracellular Ca^{2+} as measured in Fura-2-loaded NKCC2-HEK293 cells. **(A)** Exposure to spilanthol (15 min, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) induced a biphasic increase in intracellular Ca^{2+} level: a fast and transient peak followed by a slow and sustained increase of the basal Ca^{2+} level. Representative trace of $n=82$ cells in 4 different experiments. **(B)** Spilanthol-induced intracellular Ca^{2+} increase was compared whenever possible with response induced by a maximal dose of the Ca^{2+} -mobilizing agonist ATP (100 μM) used in all the experiments performed as internal control. Representative trace of $n=75$ cells in 4 different experiments. Right inset shows data indicating that spilanthol-induced Ca^{2+} increase was significantly reduced in the absence of extracellular Ca^{2+} (* $P < 0.05$). Unpaired data were assessed for statistical significance using the Student's t test. Data are expressed as means \pm SEM with n equal to the total number of cells analyzed. **(C)** The intracellular Ca^{2+} increase exerted by exposure to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ spilanthol was completely prevented after CPA/ 0 Ca^{2+} -induced ER-emptying. Representative trace of $n=65$ cells in 4 different experiments.

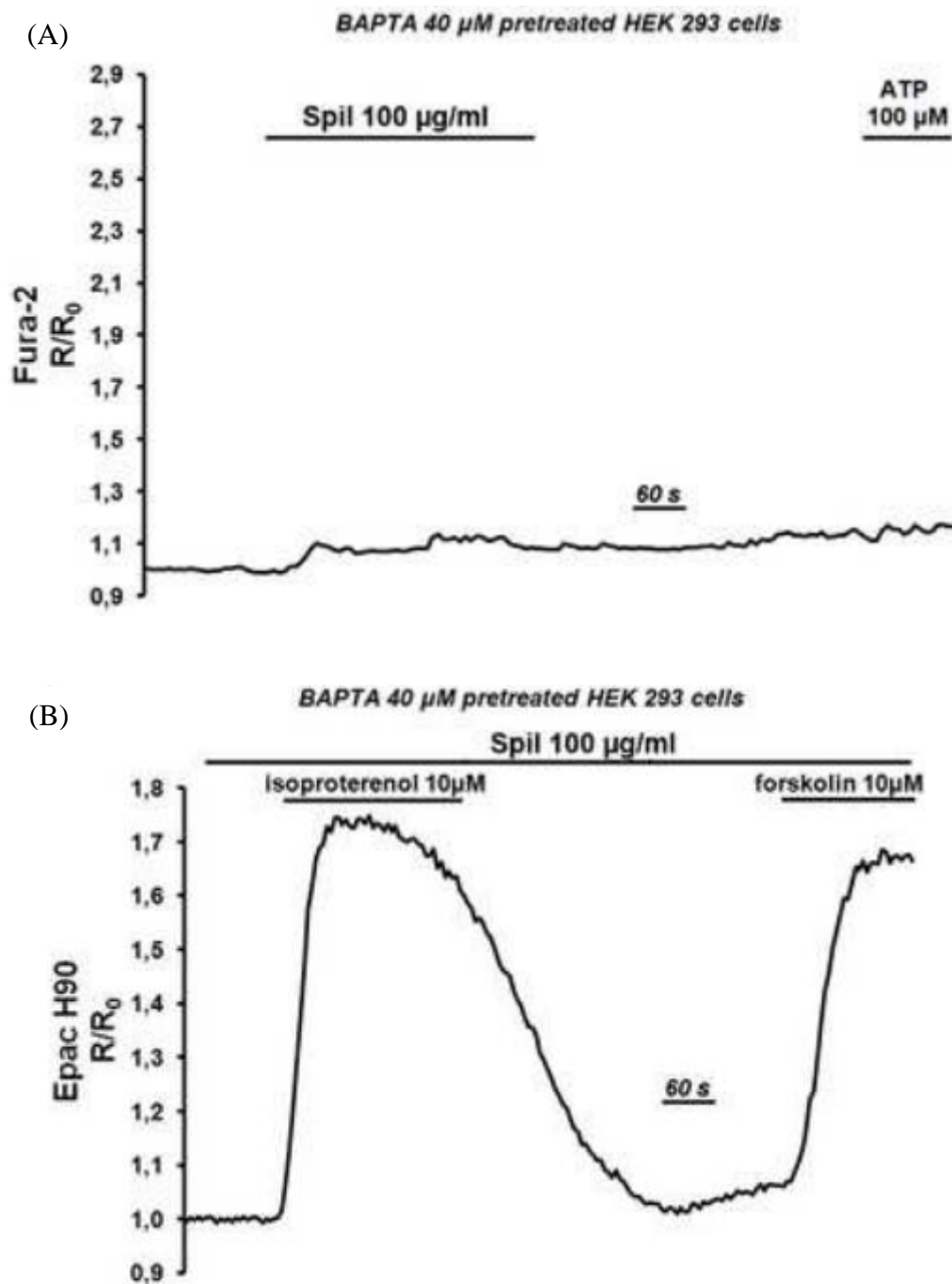


Fig 8. Spilanthol-induced inhibition of cAMP production is sensitive to $[Ca^{2+}]_i$. **(A)** After pretreatment with BAPTA-AM (30 min, 40 μ M) neither exposure to spilanthol 100 μ g/mL nor to ATP (100 μ M) were able to increase intracellular Ca^{2+} level as measured in Fura-2 loaded NKCC2-HEK293 cells. Representative trace of n=72 cells in 4 different experiments. **(B)** Under the same experimental condition (BAPTA-AM, 30 min, 40 μ M) spilanthol did not inhibit cAMP production induced by either 10 μ M isoproterenol or 10 μ M forskolin as measured by the 480/535 nm emission ratio of the cAMP/FRET probe. Representative trace of n=23 cells in 4 different experiments.

4 Discussion

Diuretics are one of the most commonly prescribed drugs, used to reduce the abnormal accumulation of excess fluid in the body. They are widely used for the clinical management of hypertension and edema and act by eliminating the excess fluid through increasing the volume of urine excretion reducing Na^+ and water reabsorption (GU et al., 2012). Considering the growing concern that has been raised about the adverse effects of classic diuretics such as thiazides and loop diuretics (TESTANI et al., 2010), new equally effective drugs are interesting and needed.

Extracts from *Acmella oleracea* have been reported to exert potent diuretic effects in rats (RATNASOORIYA et al., 2004; MOREIRA et al., 1989). Specifically, Ratnasooriya et al. (2004) demonstrated that the strong diuretic effect evoked by *Acmella oleracea* extract after 1 h was similar to that evoked by the NKCC2 blocker furosemide (RATNASOORIYA et al., 2004).

Based on these findings we dissected the molecular mechanisms underlying this effect in both freshly isolated mouse kidney slices and cell line models expressing either NKCC2 or AQP2, the main transporters involved in the urinary concentrating process.

NKCC2 phosphorylation at the 3 N-terminal regulatory threonines is well known to be a) induced by vasopressin (GIMÉNEZ and FORBUSH, 2003), b) a prerequisite for NKCC2 activation and transport activity (LYTLE et al., 1995), inhibited by furosemide (LYTLE et al., 1995).

Interestingly, we found that the main constituent of *A. oleracea*, spilanthol, is able to strongly inhibit NKCC2 phosphorylation/activation in both resting and activating conditions in freshly isolated kidney slices. Of note, when orally administered to mice, spilanthol exerts a significant diuretic effect concomitantly to increased kaliuretic and natriuretic responses suggesting that it is acting as a furosemide-like diuretic.

Of note, we also found that spilanthol inhibits vasopressin-induced AQP2 translocation in mouse CD cells, which is a prerequisite for water reabsorption during anti-diuresis in physiological conditions suggesting that spilanthol might act also as 'acquaretic'.

The reduced efficiency in the urine concentrating mechanisms reflects, at cellular level, a complex interplay between Ca^{2+} and cAMP elicited by exposure to spilanthol. We demonstrated for the first time that spilanthol significantly increased intracellular Ca^{2+} levels in renal cells with a mechanism that involves both Ca^{2+} influx at the plasma membrane and Ca^{2+} release from the ER. Nonetheless, whether spilanthol is activating a G α q-protein coupled receptor or it is acting like a Ca^{2+} -specific ionophore, is still without an answer. Interestingly, spilanthol is responsible for the *tingling* sensate induced by *A. oleracea*. It is indeed likely that, like other alkaloids inducing same sensate such as capsaicin, spilanthol may activate TRPA1, a specific transient receptor potential (TRP) (RIERA et al., 2009).

Importantly, we found that the spilanthol-induced cytosolic Ca^{2+} increase significantly reduces cAMP levels in renal cells. It is well recognized that both NKCC2 activation and AQP2 membrane expression are cAMP-mediated mechanisms. NKCC2 has been demonstrated to be phosphorylated and shuttled into the apical membrane of the TAL in response to vasopressin (GIMÉNEZ and FORBUSH, 2003) and cAMP elevation (ORTIZ, 2006) in a PKA-dependent manner (CACERES, ARES and ORTIZ, 2009). The cAMP-mediated AQP2 phosphorylation and translocation toward the apical membrane of CD has been also extensively demonstrated (BOONE and DEEN, 2008).

In many cell types, the intracellular Ca^{2+} concentration regulates cAMP levels through interactions of Ca^{2+} on cAMP synthesis and/or cAMP hydrolysis. These effects of $[\text{Ca}^{2+}]_i$ are linked to the presence of Ca^{2+} -sensitive adenylyl cyclases (ACs) and/or Ca^{2+} /calmodulin-dependent phosphodiesterases (PDEs). Importantly, high Ca^{2+} suppresses cAMP production in

response to forskolin inhibiting the AVP-dependent AC in medullary TAL (mTAL) in rat kidneys (HENN et al., 2004). Moreover, de Jesus Ferreira et al. (1998) described coexpression of Ca^{2+} inhibitable AC type 6 (AC6) and the Calcium Sensing Receptors (CaSR) in the cortical TAL of the kidney and further showed potent antagonism of cAMP signaling during CaSR stimulation by physiological levels of extracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ (DE JESUS FERREIRA et al., 1998). In addition, AC6 was found to be functionally expressed in CD and involved in the regulation of cAMP production in at this site (HÉLIÈS-TOUSSAINT et al., 2000). We performed functional experiments in HEK293 cells, which endogenously express many isoforms of AC (AC1, 3, 5, 6, 7, and 9 and soluble, bicarbonate-sensitive AC (GENG et al., 2005; LUDWIG and SEUWEN, 2002; WAYMAN, HINDS and STORM, 1995)[40-42], of which some are inhibitable by Ca^{2+} (e.g., AC5 and AC6), and which do not express Ca^{2+} /calmodulin-dependent phosphodiesterases (WILLOUGHBY and COOPER, 2006). Indeed, our functional studies suggest that *in vivo* spilanthol, inducing a massive increase in intracellular $[\text{Ca}^{2+}]$ may act inhibiting the AC6 rather than activating Ca^{2+} /calmodulin-dependent PDEs in TAL and CD.

However, it has also been reported that both NKCC2 and AQP2 might be regulated by PDEs. For instance, PDE type 4 (PDE4) blunts the stimulatory effect of β -adrenergic receptor stimulation on NKCC2 trafficking in TALs suspension from rat kidneys (HAQUE, CACERES and ORTIZ, 2012). PDE4 also inhibits AQP2 shuttling at the plasma membrane (STEFAN et al., 2007) and its hyperactivity causes nephrogenic diabetes insipidus (NDI) in a mouse model (HENN et al, 2004), thus suggesting a crucial role of PDEs in the diuresis.

Among the PDE members family PDE1 was reported to be efficiently activated by the Ca^{2+} /calmodulin complex (OMORI and KOTERA, 2007) and expressed in both TAL and CD (DOUSA, 1999). Therefore, we cannot exclude that spilanthol *in vivo* may activate the Ca^{2+} /calmodulin-sensitive PDE1 in the kidney tubules.

5 Conclusions

Collectively these data are of extreme pathophysiological importance since they indicate that spilanthol is able to mimic the diuretic effect of furosemide *in vivo* targeting intracellular pathways in the kidney upstream to both NKCC2 and AQP2 thus suggesting spilanthol as a novel powerful molecule in the pharmacological field of diuretics.

Considering the growing concern that has been raised about the adverse effects of classic diuretics such as thiazides and loop diuretics, new equally effective synthetic, semi-synthetic or natural sources (herbs and botanicals) drugs are interesting and needed.

Furthermore, applying to spilanthol the technologies to specifically deliver therapeutic molecules in the kidney (for review see Zhou, Sun and Zhang, 2014) would minimize the off-target effects and enhance its renal efficacy within the renal tissue.

6 References

BIRNBAUMER, M.; SEIBOLD, A.; GILBERT, S.; ISHIDO, M.; BARBERIS, C.; ANTARAMIAN, A.; BRABET, P.; ROSENTHAL, W. Molecular cloning of the receptor for human antidiuretic hormone. **Nature**, v. 357, p. 333-335, 1992.

BOONE, M.; DEEN, P. M. Physiology and pathophysiology of the vasopressin-regulated renal water reabsorption. **Pflugers Arch.**, v. 456, p. 1005-1024, 2008.

BOONEN, J.; BAERT, B.; BURVENICH, C.; BLONDEEL, P.; DE SAEGER, S.; DE SPIEGELEER, B. LC-MS profiling of N-alkylamides in Spilanthos acmella extract and the

transmucosal behaviour of its main bio-active spilanthol. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 53, 243-249, 2010.

CACERES, P. S.; ARES, G. R.; ORTIZ, P. A. cAMP stimulates apical exocytosis of the renal Na(+)-K(+)-2Cl(-) cotransporter NKCC2 in the thick ascending limb: role of protein kinase A. **J. Biol. Chem.**, v. 284, p. 24965-24971, 2009.

CARMOSINO, M.; GERBINO, A.; HENDY, G. N.; TORRETTA, S.; RIZZO, F.; DEBELLIS, L.; PROCINO, G.; SVELTO, M. NKCC2 activity is inhibited by the Bartter's syndrome type 5 gain-of-function CaR-A843E mutant in renal cells. **Biol. Cell.**, v. 107, p. 98-110, 2015.

DE JESUS FERREIRA, M. C.; HÉLIÈS-TOUSSAINT, C.; IMBERT-TEBOUL, M.; BAILLY, C.; VERBAVATZ, J. M.; BELLANGER, A. C.; CHABARDÈS, D. Co-expression of a Ca²⁺-inhibitable adenylyl cyclase and of a Ca²⁺-sensing receptor in the cortical thick ascending limb cell of the rat kidney. Inhibition of hormone-dependent cAMP accumulation by extracellular Ca²⁺. **J. Biol. Chem.**, v. 273, p. 15192-15202, 1998.

DE SPIEGELEER, B.; BOONEN, J.; MALYSHEVA, S. V.; MAVUNGU, J. D.; DE SAEGER, S.; ROCHE, N.; BLONDEEL, P.; TAEVERNIER, L.; VERYSER, L. Skin penetration enhancing properties of the plant *N*-alkylamide spilanthol. **J. Ethnopharmacol.**, v. 148, p. 117-125, 2013.

DI MISE, A.; TAMMA, G.; RANIERI, M.; SVELTO, M.; HEUVEL, B.; LEVTCHENKO, E. N.; VALENTI, G. Conditionally immortalized human proximal tubular epithelial cells isolated from the urine of a healthy subject express functional calcium-sensing receptor. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 308, p. 1200-1206, 2015.

DOUSA, T. P. Cyclic-3',5'-nucleotide phosphodiesterase isozymes in cell biology and pathophysiology of the kidney. **Kidney Int.**, v. 55, p. 29-62, 1999.

DUBEY, S.; MAITY, S.; SINGH, M.; SARAF, S. A.; SAHA, S. Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes acmella*: a review. **Adv. Pharmacol. Sci.**, Article ID 423750, 2013.

FLEMMER, A. W.; GIMENEZ, I.; DOWD, B. F.; DARMAN, R. B.; FORBUSH, B. Activation of the Na-K-Cl cotransporter NKCC1 detected with a phospho-specific antibody. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 37551-37558, 2002.

FUSHIMI, K.; SASAKI, S.; YAMAMOTO, T.; HAYASHI, M.; FURUKAWA, T.; UCHIDA, S.; KUWAHARA, M.; ISHIBASHI, K.; KAWASAKI, M.; KIHARA, I.; MARUMO, F. Functional characterization and cell immunolocalization of AQP-CD water channel in kidney collecting duct. **Am. J. Physiol.**, v. 267, 573-582, 1994.

GENG, W.; WANG, Z.; ZHANG, J.; REED, B. Y.; PAK, C. Y.; MOE, O. W. Cloning and characterization of the human soluble adenylyl cyclase. **Am. J. Physiol. Cell Physiol.**, v. 288, p. 1305-1316, 2005.

GIMÉNEZ, I.; FORBUSH, B. Regulatory phosphorylation sites in the NH₂ terminus of the renal Na-K-Cl cotransporter (NKCC2). **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 289, p. 1341-1345, 2005.

GIMÉNEZ, I.; FORBUSH, B. Short-term stimulation of the renal Na-K-Cl cotransporter (NKCC2) by vasopressin involves phosphorylation and membrane translocation of the protein. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 26946-26951, 2003.

GU, Q.; BURT, V. L.; DILLON, C. F.; YOON, S. Trends in antihypertensive medication use and blood pressure control among United States adults with hypertension: the National Health and Nutrition Examination Survey, 2001 to 2010. **Circulation**, v. 126, p. 2105-2114, 2012.

HAQUE, M. Z.; CACERES, P. S.; ORTIZ, P. A. β -Adrenergic receptor stimulation increases surface NKCC2 expression in rat thick ascending limbs in a process inhibited by phosphodiesterase 4. **Am J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 303, p. 1307-1314, 2012.

HÉLIÈS-TOUSSAINT, C.; AARAB, L.; GASC, J. M.; VERBAVATZ, J. M.; CHABARDÈS, D. Cellular localization of type 5 and type 6 ACs in collecting duct and regulation of cAMP synthesis. **Am. J. Physiol. Renal Physiol.**, v. 279, p. 185-194, 2000.

HENN, V.; EDEMIR, B.; STEFAN, E.; WIESNER, B.; LORENZ, D.; THEILIG, F.; SCHMITT, R.; VOSSEBEIN, L.; TAMMA, G.; BEYERMANN, M.; KRAUSE, E.; HERBERG, F. W.; VALENTI, G.; BACHMANN, S.; ROSENTHAL, W.; KLUSSMANN, E. Identification of a novel A-kinase anchoring protein 18 isoform and evidence for its role in the vasopressin induced aquaporin-2 shuttle in renal principal cells. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 26654-26665, 2004.

IOLASCON, A.; AGLIO, V.; TAMMA, G.; D'APOLITO, M.; ADDABBO, F.; PROCINO, G.; SIMONETTI, M. C.; MONTINI, G.; GESUALDO, L.; DEBLER, E. W.; SVELTO, M.; VALENTI, G. Characterization of two novel missense mutations in the AQP2 gene causing nephrogenic diabetes insipidus. **Nephron. Physiol.**, v. 105, p. 33-41, 2007.

LEY, J. P.; BLINGS, M.; KRAMMER, G.; REINDERS, G.; SCHMIDT, C. O.; BERTRAM, H. J. Isolation and synthesis of acmellonate, a new unsaturated long chain 2-ketol ester from *Spilanthes acmella*. **Nat. Prod. Res.**, v. 20, p. 798-804, 2006.

LUDWIG, M. G.; SEUWEN, K. Characterization of the human adenylyl cyclase gene family: cDNA, gene structure, and tissue distribution of the nine isoforms. **J. Recept. Signal Transduct Res.**, v. 22, p. 79-110, 2002.

LYTLE, C.; XU, J. C.; BIEMESDERFER, D.; FORBUSH, B. Distribution and diversity of Na-K-Cl cotransport proteins: a study with monoclonal antibodies. **Am. J. Physiol.**, v. 269, p. 1496-1505, 1995.

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

MBEUNKUI, F.; GRACE, M. H.; LATEGAN, C.; SMITH, P. J.; RASKIN, I.; LILA, M. A. Isolation and identification of antiplasmodial N-alkylamides from *Spilanthes acmella* flowers using centrifugal partition chromatography and ESI-IT-TOF-MS. **J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.**, v. 879, p. 1886-1892, 2011.

MOREIRA, V. M.; MAIA, J. G.; DE SOUZA, J. M.; BORTOLOTO, Z. A.; CAVALHEIRO, E. A. Characterization of convulsions induced by a hexanic extract of *Spilanthes acmella* var. *oleracea* in rats. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 22, p. 65-67, 1989.

NOMURA, E. C.; RODRIGUES, M. R.; DA SILVA C. F.; HAMM, L. A.; NASCIMENTO, A. M.; DE SOUZA L. M.; CIPRIANI, T. R.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. Antinociceptive effects of ethanolic extract from the flowers of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 150, p. 583-589, 2013.

OMORI, K.; KOTERA, J. Overview of PDEs and their regulation. **Circ. Res.**, v. 100, p. 309-327, 2007.

ORTIZ, P. A. cAMP increases surface expression of NKCC2 in rat thick ascending limbs: role of VAMP. **Am J Physiol Renal Physiol.**, v. 290, p. 608-616, 2006.

PONCE-CORIA, J.; SAN-CRISTOBAL, P.; KAHLE, K. T.; VAZQUEZ, N.; PACHECO-ALVAREZ, D.; DE LOS HEROS, P.; JUÁREZ, P.; MUÑOZ, E.; MICHEL, G.; BOBADILLA, N. A.; GIMENEZ, I.; LIFTON, R. P.; HEBERT, S. C.; GAMBA, G. Regulation of NKCC2 by a chloride-sensing mechanism involving the WNK3 and SPAK kinases. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 105, p. 8458-8463, 2008.

PRACHAYASITTIKUL, S.; SUPHAPONG, S.; WORACHARTCHEEWAN, A.; LAWUNG, R.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. Bioactive metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. **Molecules**, v. 14, p. 850-867, 2009.

PROCINO, G.; BARBIERI, C.; TAMMA, G.; DE BENEDICTIS, L.; PESSIN, J. E.; SVELTO, M.; VALENTI, G. AQP2 exocytosis in the renal collecting duct - involvement of SNARE isoforms and the regulatory role of Munc18b. **J Cell Sci.**, v. 121, p. 2097-2106, 2008.

RATNASOORIYA, W. D.; PIERIS, K. P.; SAMARATUNGA, U.; JAYAKODY, J. R. Diuretic activity of *Spilanthes acmella* flowers in rats. **J. Ethnopharmacol.**, v. 91, p. 317-320, 2004.

RIERA, C. E.; MENOZZI-SMARRITO, C.; AFFOLTER, M.; MICHLIG, S.; MUNARI, C.; ROBERT, F.; VOGEL, H.; SIMON, S. A.; LE COUTRE, J. Compounds from Sichuan and Melegueta peppers activate, covalently and non-covalently, TRPA1 and TRPV1 channels. **Br. J. Pharmacol.**, v. 157, p. 1398-1409, 2009.

SHANKAR, S. S.; BRATER, D. C. Loop diuretics: from the Na-K-2Cl transporter to clinical use. **Am. J. Physiol. Renal. Physiol.**, v. 284, p. 11-21, 2003.

SHARMA, V.; BOONEN, J.; CHAUHAN, N. S.; THAKUR, M.; DE SPIEGELEER, B.; DIXIT, V. K. *Spilanthes acmella* ethanolic flower extract: LC-MS alkylamide profiling and its effects on sexual behavior in male rats. **Phytomedicine**, v. 18, p. 1161-1169, 2011

STEFAN, E.; WIESNER, B.; BAILLIE, G. S.; MOLLAJEW, R.; HENN, V.; LORENZ, D.; FURKERT, J.; SANTAMARIA, K.; NEDVETSKY, P.; HUNDSRUCKER, C.; BEYERMANN, M.; KRAUSE, E.; POHL, P.; GALL, I.; MACINTYRE, A. N.; BACHMANN, S.; HOUSLAY, M. D.; ROSENTHAL, W.; KLUSSMANN, E. Compartmentalization of cAMP-dependent signaling by phosphodiesterase-4D is involved in the regulation of

vasopressin-mediated water reabsorption in renal principal cells. **J. Am. Soc. Nephrol.**, v. 18, p. 199-212, 2007.

STOOS, B. A.; NÁRAY-FEJES-TÓTH, A.; CARRETERO, O. A.; ITO, S.; FEJES-TÓTH, G. Characterization of a mouse cortical collecting duct cell line. **Kidney Int.**, v. 39, p. 1168-1175, 1991.

TAHRAOUI, A.; EL-HILALY, J.; ISRAILI, Z. H.; LYOUSSEI, B. Ethnopharmacological survey of plants used in the traditional treatment of hypertension and diabetes in south-eastern Morocco (Errachidia province). **J. Ethnopharmacol.**, v. 110, p. 105-117, 2007.

TAMMA, G.; PROCINO, G.; STRAFINO, A.; BONONI, E.; MEYER, G.; PAULMICHL, M. FORMOSO, V.; SVELTO, M.; VALENTI G. Hypotonicity induces aquaporin-2 internalization and cytosol-to-membrane translocation of ICln in renal cells. **Endocrinology**, v. 148, p. 1118-1130, 2007.

TESTANI, J. M.; CHEN, J.; MCCAULEY, B. D.; KIMMEL, S. E.; SHANNON, R. P. Potential effects of aggressive decongestion during the treatment of decompensated heart failure on renal function and survival. **Circulation**, v. 122, p. 265-272, 2010.

VAN DER KROGT, G. N.; OGINK, J.; PONSIOEN, B.; JALINK, K. A comparison of donor-acceptor pairs for genetically encoded FRET sensors: application to the Epac cAMP sensor as an example. **PLoS One**, v. 3, p. 1-9, 2008.

ZHOU, P.; SUN, X.; ZHANG, Z. Kidney-targeted drug delivery systems. **Acta Pharm. Sin B.**, v. 4, p. 37-42, 2014.

WAYMAN, G. A.; HINDS, T. R.; STORM, D. R. Hormone stimulation of type III adenylyl cyclase induces Ca²⁺ oscillations in HEK-293 cells. **J. Biol. Chem.**, v. 270, p. 24108-24115, 1995.

WILLOUGHBY, D.; COOPER, D. M. Ca²⁺ stimulation of adenylyl cyclase generates dynamic oscillations in cyclic AMP. **J Cell Sci.**, v. 119, p. 828-836, 2006.

WONGSAWATKUL, O.; PRACHAYASITTIKUL, S.; ISARANKURA-NA-AYUDHYA, C.; SATAYAVIVAD, J.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. Vasorelaxant and antioxidant activities of *Spilanthes acmella* Murr. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 9, p. 2724-44, 2008.

WRIGHT, C. I.; VAN-BUREN, L.; KRONER, C. I.; KONING, M. M. Herbal medicines as diuretics: a review of the scientific evidence. **J. Ethnopharmacol.**, v. 114, 1-31, 2007.

WU, L. C.; FAN, N. C.; LIN, M. H.; CHU, I. R.; HUANG, S. J.; HU, C.Y.; HAN, S. Y. Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS25 induced inflammatory mediators. **J. Agric. Food Chem.**, v. 56, p. 2341-2349, 2008.

CAPÍTULO VIII.
CONTEXTUALIZAÇÃO DOS ARTIGOS CIENTÍFICOS

A ideia inicial de trabalhar com Jambu surgiu em 2012 durante o mestrado em Ciência dos Alimentos na UFRRJ. Inicialmente iríamos estudar as propriedades químicas, físico-químicas e sensoriais do Jambu minimamente processado. No entanto, meu orientador (Prof. Dr. Armando U. O. Sabaa-Srur) sugeriu trabalharmos com a secagem do Jambu, pois este princípio de conservação aumenta ainda mais a validade comercial do produto, podendo ser comercializado no Brasil e até mesmo em outros países. Além disso, a única pesquisa em 2012 sobre tecnologia aplicada ao Jambu era sobre o Jambu minimamente processado na Universidade Federal de Viçosa e por isso, seria interessante trabalhar com linha de pesquisa diferente.

Ainda no mestrado fui à Belém para comprar o Jambu e trazê-lo ao Rio de Janeiro e assim dar início ao experimento do mestrado, realizando a secagem com ar quente e demais análises. Todavia, tivemos a ideia de secar o Jambu em Belém para evitar o transporte de um volume tão grande da hortaliça *in natura*. Então, entrei em contato com o Prof. Dr. José G. S. Maia (UFPA) para fazermos uma parceria e conseqüentemente eu secaria o Jambu na Universidade Federal do Pará. Na ocasião tive uma reunião com o referido professor e ele me apresentou outros dois professores que iriam colaborar com o projeto; um na área de secagem (Prof. Dr. Lênio J. G. de Faria - UFPA) e outro na área de cultivo do Jambu (Prof. Dr. Sérgio A. L. de Gusmão - Universidade Federal Rural da Amazônia). A previsão inicial era permanecer uma semana na cidade de Belém, porém foi prolongado para 1 mês. O Prof. Dr. Sérgio Gusmão me auxiliou na coleta do Jambu na cidade de Igarapé-açu, Pará (130 Km de Belém), pois ele tinha um projeto de extensão sobre o plantio de hortaliças nesta cidade.

O Prof. Dr. Lênio Faria sugeriu a secagem do Jambu com ar frio, também chamada de secagem a sombra, pois diminuiria a perda de nutrientes do Jambu. Além disso, eu e o prof. José G. Maia, fomos à UFPA *Campus* Abaetetuba, para realizarmos a extração do Jambu com CO₂ supercrítico para avaliarmos a degradação do espilantol em função do tempo de armazenamento. O Prof. José G. Maia foi fundamental na concessão do espaço para secagem do Jambu, disponibilização de recursos para compra do desumidificador, bandejas plásticas, mão-de-obra para adequação da sala de secagem, bem como orientação e consolidação das parcerias supracitadas.

Com o retorno ao Rio de Janeiro fiz análises químicas, microbiológicas e sensoriais referentes a dissertação de mestrado. Para continuar as extrações com CO₂ supercrítico fiz parceria com a Profa Dra. Marisa F. Mendes (UFRRJ) e sua ex-orientada de doutorado (UFRJ), Cristiane de S. S. Pereira que me ajudaram no manuseio do equipamento.

Ainda durante o mestrado iniciei os experimentos do doutorado e procurei a ajuda do meu atual co-orientador, prof. Dr. Mário Geraldo de Carvalho, que colaborou muito nas análises químicas (CG-EM, RMN ¹H e ¹³C), além do grande suporte financeiro para realização das análises, participação de congressos nacionais e internacionais, bem como pagamento de tradução, taxa de publicação de artigos e, inclusive, a proposta do artigo de revisão. Sob supervisão do meu co-orientador, prof. Dr. Mário G. de Carvalho, e ajuda de sua ex-orientada de doutorado Queli C. Fidelis, conseguimos isolar o espilantol. Com o isolamento do espilantol começamos incluir de testes biológicos no trabalho.

O primeiro teste biológico foi com a enzima tirosinase, também conhecida como polifenoxidase, que está diretamente envolvida no escurecimento enzimático de frutas e hortaliças e por isso, justifica-se a análise com o objetivo de evitar o escurecimento enzimático nesses produtos. Para realização dos testes com a tirosinase, fizemos parceria com a Profa Dra. Márcia C. C. de Oliveira (DEQUIM-UFRRJ) e sua ex-orientada de iniciação científica, Keila C. B. Silva (DEQUIM-UFRRJ). Em seguida realizei testes de atividade antimicrobiana no Departamento de Tecnologia de Alimentos, sob auxílio do doutorando André F. Guerra e a técnica de laboratório Edlene R. Prudencio. Foram realizados também testes de atividade

diurética do Jambu e do espilantol com parcerias de pesquisadores da Itália sob supervisão do Prof. PhD Luigi Millela.

Além dos testes biológicos realizei análises químicas e avaliação da capacidade antioxidante do Jambu. O perfil de ácidos graxos foi realizado na Central Analítica do INPPN-UFRJ e DEQUIM-UFRRJ, sob orientação do Prof. Antonio J. R. da Silva e meu co-orientador. A análise do perfil de minerais foi paga e realizada na Pontifícia Universidade Católica do Rio de Janeiro (PUC-RJ). Essas duas análises foram acompanhadas por mim e realizadas por técnicos especializados. O perfil de aminoácidos foi realizado pelo LAMIC da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). A amostra foi enviada e as análises foram realizadas pelo LAMIC, esta análise também foi paga. O conteúdo de polifenóis e a avaliação da capacidade antioxidante foram realizados na UFRJ, sob auxílio da Dra. Renata M. P. da Silva. Na FDA-EUA foram realizadas a identificação e quantificação das amidas presentes nas folhas, hastes e inflorescência do Jambu, inclusive o espilantol.

Um trabalho paralelo a tese de doutorado foi realizado sobre a atividade acaricida do Jambu com parcerias de pesquisadores da UFJF (Dr. Caio Monteiro e equipe); na ocasião participei pessoalmente da diluição e preparo das amostras para em seguida serem aplicadas nas larvas e fêmeas ingurgitadas.

A partir desta tese foram publicados 13 resumos em eventos nacionais e internacionais, além de 7 artigos publicados, sendo 1 de revisão; 4 artigos ainda serão submetidos a revistas. Para mais detalhes consulte os anexos. Há ainda possibilidade de publicar 3 resumos em congressos.

Dos 13 resumos publicados, 8 foram apresentados por mim, com participação direta em todos os resumos na escrita dos mesmos. No artigo de revisão fui o autor principal (1º autor), visto a maior contribuição na escrita deste artigo. Dos artigos publicados, 4 foram com testes biológicos; no artigo sobre atividade antimicrobiana eu mesmo realizei as análises com a ajuda de mais duas pessoas. As análises da atividade da enzima tirosinase não foram realizadas por mim, apenas preparei as amostras, identifiquei e quantifiquei as substâncias testadas e acompanhei o teste, visto que não tenho preparo suficiente para realizar esses testes. No artigo publicado sobre atividade diurética do Jambu com parceria com pesquisadores da Itália, também por serem testes específicos, apenas preparei, identifiquei e quantifiquei as substâncias testadas. No artigo sobre atividade acaricida do Jambu participei pessoalmente da diluição e preparo das amostras para os testes de atividade acaricida. Outro artigo publicado foi sobre identificação e quantificação de amidas presentes no Jambu, inclusive o espilantol. Essas análises foram realizadas por CL-EM no *Food and Drug Administration* (FDA-EUA). Essas análises não foram realizadas por mim por eu não ter acesso a esse equipamento, portanto sequei as amostras (liofilização) e enviei as amostras para o FDA. No artigo sobre a degradação do espilantol em função do tempo de armazenamento, eu identifiquei e quantifiquei as amostras, além de acompanhar todas as extrações com CO₂ supercrítico. O experimento de isotermais de adsorção foi realizado exclusivamente por mim com ajuda apenas na modelagem matemática por um colega de doutorado (Davy H. Chávez). As análises químicas foram realizadas na UFRJ e UFRRJ (perfil de ácidos graxos), PUC-RJ (perfil de minerais) e UFSM (perfil de aminoácidos). Essas análises foram realizadas nessas universidades devido a parcerias do meu orientador. Ressalto que no Departamento de Química – UFRRJ, há uma Central Analítica e as análises (CG-EM e RMN ¹H e ¹³C) de todos os alunos são realizadas por técnicos devidamente preparados para os devidos fins.

2 CONCLUSÕES GERAIS

Este trabalho permitiu as seguintes conclusões quanto:

- Avaliação química do Jambu

- * O Jambu submetido ao processo de secagem com ar frio oferece melhor qualidade química e capacidade antioxidante em relação ao Jambu liofilizado;
- * O modelo de Peleg apresenta um ajuste satisfatório na predição das isotermas do Jambu seco com ar frio.

- Avaliação do conteúdo de espilantol

- * O componente majoritário, espilantol, não se altera com condições extremas de armazenamento;
- * As inflorescências do Jambu apresentam maior teor de espilantol, seguida das folhas e hastes.

- Avaliação biológica do Jambu

- * O extrato metanólico de Jambu ativa fortemente a enzima tirosinase, enquanto que a fração diclorometano (espilantol) inibe a tirosinase.
- * A fração hexânica inibe o crescimento de *Micrococcus luteus*. Já o extrato metanólico do Jambu não teve atividade antimicrobiana sobre o *Micrococcus luteus*. Além disso, o extrato metanólico do Jambu e a fração hexânica não inibiram o crescimento de *Lactobacillus casei*.
- * O espilantol inibiu a produção de cAMP, contribuindo para sua aplicação em fármacos com função diurética.

3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O interesse científico pela condução de estudos que visam avaliar os efeitos químicos e biológicos da utilização de extratos de plantas na promoção da saúde humana tem recebido atenção especial de pesquisadores. Apesar de promissor, os resultados obtidos e discutidos até o presente momento sobre o Jambu não esclarecem as quantidades de ingestão e doses respostas. A importância de novos estudos especialmente no que se refere à ação antioxidante do espilantol, testes *in vivo* do extrato e do espilantol frente a enzima tirosinase, com consequente desenvolvimento de cosméticos para despigmentar ou hiperpigmentar a pele são fundamentais merecendo estudos adicionais nesses aspectos.

Portanto, é necessário intensificar a investigação que permita a aplicação em estudos com humanos e avaliar o efeito sinérgico das *N*-alquilamidas presentes no Jambu e se o consumo crônico desta hortaliça não traz efeitos adversos em humanos. Além disso, é de suma importância o isolamento e quantificação das outras *N*-alquilamidas presentes no Jambu para realização de testes biológicos e entendimento de propriedades químicas e biológicas desta planta.

ANEXOS

Anexo A – Artigo publicado na Veterinary Parasitology.

Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.08.026>

Veterinary Parasitology 228 (2016) 137–143



Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar



Research paper

Acaricidal activity of methanol extract of *Acmella oleracea* L. (Asteraceae) and spilanthol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae)



Paula Barroso Cruz^a, Alan Franco Barbosa^{c,d}, Viviane Zeringóta^g, Diego Melo^h, Tatiane Novato^g, Queli Cristina Fidelis^e, Rodrigo Luiz Fabriⁱ, Mário Geraldo de Carvalho^e, Armando Ubirajara Oliveira Sabaa-Srur^{c,f}, Erik Daemon^a, Caio Márcio Oliveira Monteiro^{a,b,*}

^a Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora- Rua José Lourenço Kelmer, s/n - Campus Universitário - Bairro São Pedro - Juiz de Fora - MG, 36036-900, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal de Goiás - Avenida Esperança, s/n, Campus Samambaia, Goiânia - GO, 74.690-900, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia BR 465 - Km 7, Seropédica - RJ, 23897-000, Brazil

^d Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso - Campus Sorriso, Avenida dos Universitários, 799, Bairro Santa Clara, Sorriso-MT, 78.890-000, Brazil

^e Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rodovia BR 465 - Km 7, Seropédica - RJ, 23897-000, Brazil

^f Departamento de Nutrição Básica e Experimental, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, Rio de Janeiro - RJ, 21949-900, Brazil

^g Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465, Km 7 - Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

^h Programa de Pós-graduação em Biologia Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, BR-465, Km 7 - Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

ⁱ Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora - Rua José Lourenço Kelmer, s/n - Campus Universitário - Bairro São Pedro - Juiz de Fora - MG, 36036-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 April 2016

Received in revised form 23 August 2016

Accepted 31 August 2016

Keywords:

Cattle tick
Tropical horse tick
Ixodidae
Lethal time
N-alkylamide

ABSTRACT

We evaluated the acaricidal activity of *Acmella oleracea* methanol extract and spilanthol on *Rhipicephalus microplus* and *Dermacentor nitens*. The extract was made through maceration with methanol. From this extract, a dichloromethane fraction with 99% spilanthol was obtained and tested on *R. microplus* larvae and engorged females and *D. nitens* larvae. For evaluation against larvae, the modified larval packet test was used, and both the methanol extract and dichloromethane fraction were tested at concentrations of 0.2–50 mg/mL. The modified larval packet test was also used in the lethal time (LT) test, with the methanol extract at a concentration of 12.5 mg/mL and the percentage mortality was assessed after 15, 30, 45, 60, 75, 90, 120 min and 24 h. The 50% lethal time calculation (LT₅₀) was performed in this test. The engorged female test was performed with *R. microplus* only, at concentrations of 25–200 mg/mL for methanol extract and 2.5–20.0 mg/mL for spilanthol. The methanol extract caused 100% mortality of the *R. microplus* and *D. nitens* larvae at concentrations of 3.1 and 12.5 mg/mL, respectively. Spilanthol resulted in 100% mortality of *R. microplus* larvae at concentration of 1.6 mg/mL and of *D. nitens* at 12.5 mg/mL. In the lethal time assay using the methanol extract, the mortality rate was 100% for *R. microplus* and *D. nitens* larvae after 120 min and 24 h, with LT₅₀ values of 38 and 57 min, respectively. In the test of females, the egg mass weight and the hatching percentage of the groups treated with concentrations equal to or higher than 50.0 mg/mL of methanol extract were significantly reduced ($p < 0.05$), while for spilanthol, the reduction of the egg mass weight and hatching percentage occurred from concentrations of 10.0 mg/mL and 2.5 mg/mL, respectively.

* Corresponding author at: Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas - Comportamento e Biologia Animal da Universidade Federal de Juiz de Fora- Rua José Lourenço Kelmer, s/n - Campus Universitário - Bairro São Pedro - Juiz de Fora - MG, 36036-900, Brazil.

E-mail addresses: paulabarrosocruz@hotmail.com (P.B. Cruz), alan.barbosa@srs.ifmt.edu.br (A.F. Barbosa), viviane@yaho.com.br (V. Zeringóta), diego.ufjf@gmail.com (D. Melo), tatinovatoj@gmail.com (T. Novato), qcf.036@yahoo.com.br (Q.C. Fidelis), rodrigo.fabri@ufjf.edu.br (R.L. Fabri), mariogdecarvalho@gmail.com (M.G. de Carvalho), erikdaemon@ufjf.edu.br (E. Daemon), caiooliveira@ufjf.edu.br (C.M.O. Monteiro).

0304-4017/© 2016 Published by Elsevier B.V.

Doi: 10.1371/journal.pone.0156021



RESEARCH ARTICLE

Spilanthol from *Acmella Oleracea* Lowers the Intracellular Levels of cAMP Impairing NKCC2 Phosphorylation and Water Channel AQP2 Membrane Expression in Mouse Kidney

Andrea Gerbino¹, Giorgia Schena², Serena Milano¹, Luigi Milella², Alan Franco Barbosa³, Francesca Armentano², Giuseppe Procino¹, Maria Svelto¹, Monica Carmosino^{2*}

1 Department of Biosciences, Biotechnologies and Biopharmaceutics, University of Bari "Aldo Moro", 70126, Bari, Italy, **2** Department of Sciences, University of Basilicata, Viale dell'Ateneo Lucano 10, 85100, Potenza, Italy, **3** Department of Food Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, BR 465 Km 07, Seropédica, Rio de Janeiro, Brazil

* monica.carmosino@unibas.it



click for updates

OPEN ACCESS

Citation: Gerbino A, Schena G, Milano S, Milella L, Barbosa AF, Armentano F, et al. (2016) Spilanthol from *Acmella Oleracea* Lowers the Intracellular Levels of cAMP Impairing NKCC2 Phosphorylation and Water Channel AQP2 Membrane Expression in Mouse Kidney. PLoS ONE 11(5): e0156021. doi:10.1371/journal.pone.0156021

Editor: Eric Feraïlle, University of Geneva, SWITZERLAND

Received: January 5, 2016

Accepted: May 9, 2016

Published: May 23, 2016

Copyright: © 2016 Gerbino et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This work was supported by the 'Ricerca di interesse locale RIL' to M.C., University of Basilicata and by Fondo per gli Investimenti della Ricerca di Base-Rete Nazionale di Proteomica to M. S. (grant number RBRN07BMCT_009). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Acmella oleracea is well recognized in Brazilian traditional medicine as diuretic, although few scientific data have been published to support this effect. Aim of this study was to determine the molecular effect of *Acmella oleracea* extract and its main alkylamide spilanthol on two major processes involved in the urine concentrating mechanism: Na-K-2Cl symporter (NKCC2) activity in the thick ascending limb and water channel aquaporin 2 accumulation at the apical plasma membrane of collecting duct cells. Phosphorylation of NKCC2 was evaluated as index of its activation by Western blotting. Rate of aquaporin 2 apical expression was analyzed by confocal laser microscopy. Spilanthol-induced intracellular signalling events were dissected by video-imaging experiments. Exposure to spilanthol reduced the basal phosphorylation level of NKCC2 both in freshly isolated mouse kidney slices and in NKCC2-expressing HEK293 cells. In addition, exposure to spilanthol strongly reduced both desmopressin- and low Cl⁻-dependent increase in NKCC2 phosphorylation in mouse kidney slices and NKCC2-expressing HEK293 cells, respectively. Similarly, spilanthol reduced both desmopressin- and forskolin-stimulated aquaporin 2 accumulation at the apical plasma membrane of collecting duct in mouse kidney slice and MCD4 cells, respectively. Of note, when orally administered, spilanthol induced a significant increase in both urine output and salt urinary excretion associated with a markedly reduced urine osmolality compared with control mice. Finally, at cellular level, spilanthol rapidly reduced or reversed basal and agonist-increased cAMP levels through a mechanism involving increases in intracellular [Ca²⁺]. In conclusion, spilanthol-induced inhibition of cAMP production negatively modulates urine-concentrating mechanisms thus holding great promise for its use as diuretic.



Original Article

Effects of *Acmella oleracea* methanolic extract and fractions on the tyrosinase enzyme



Alan F. Barbosa^{a,*}, Keila C.B. Silva^b, Márcia C.C. de Oliveira^b, Mário G. de Carvalho^b, Armando U.O. Sabaá Srur^{a,c}

^a Department of Food Technology, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brazil

^b Department of Chemistry, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brazil

^c Department of Basic and Experimental Nutrition, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 23 July 2015
Accepted 20 January 2016
Available online 23 February 2016

Keywords:
Jambu
Acmella oleracea
Spilanthol
Tyrosinase

ABSTRACT

The aim of the current study is to evaluate the effect of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, Asteraceae, methanolic extract, hexane (84.28% spilanthol) and dichloromethane (approximately 100% spilanthol) fractions on the tyrosinase enzyme. The dehydrated jambu extract was obtained through maceration using methanol. The extract residue was solubilized in MeOH/H₂O (8:2) and subjected to liq.–liq. partition in organic solvents. Both the extraction and the partition procedures were conducted with three replicates. The analyses were performed using GC–MS, ¹H and ¹³C NMR. The hexane fraction provided samples containing 84.28, 82.91 and 62.83% spilanthol in repetitions 1, 2 and 3, respectively. The dichloromethane fraction showed 88.55% spilanthol in repetition 1, and approximately 100% spilanthol in repetitions 2 and 3. The jambu extract as well as the hexane fraction (84.28% spilanthol) were able to activate the oxidizing activity of the tyrosinase enzyme for L-DOPA. The dichloromethane fraction (approximately 100% spilanthol) showed stronger inhibition effect on the tyrosinase enzyme in the first 10 min. The results raise the interest in study in spilanthol formulations for topical use, since it may prevent and/or slow skin hyperpigmentation or depigmentation processes. Furthermore, spilanthol may be used to control the enzymatic browning in fruits and vegetables.

© 2016 Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introduction

Acmella oleracea (L.) R.K. Jansen, Asteraceae, is a native Amazonian plant popularly known as *jambu*. It is often used as condiment in typical dishes of the Northern Brazilian cuisine, such as *tacacá* and *pato-no-tucupi* (duck intucupi sauce). It is also used in folk medicine to treat stomatitis, colds and general pain (Nascimento et al., 2013). *A. oleracea* is considered to be an important native plant in the Amazon region, and it is found in large cultivation areas (Rebello and Homma, 2005). Spilanthol has been the main metabolite often isolated from *A. oleracea*. It is an aliphatic amide described as a burning viscous oil, which produces anesthetic effect and tongue tingling (Molina-Torres et al., 1996), and it is also able to penetrate the skin (Boonen et al., 2010a,b; Spiegeleer et al., 2013). Besides Spilanthol's anti-wrinkle effect (Demarne and Passaro, 2005), it is also possible mentioning its

diuretic (Ratnasooriya et al., 2004), fungistatic and bacteriostatic activities (Molina-Torres et al., 2004), sensory properties (Ley et al., 2006), antiseptic activity, immune stimulation (Rojas et al., 2006), antioxidant and anti-inflammatory properties (Dias et al., 2012), saliva-secretion induction (Ramsewak et al., 1999; Sharma et al., 2011), analgesic (Rios et al., 2007), and acaricide activity (Castro et al., 2014), as well its use against skin diseases such as eczema (Boonen et al., 2010a,b).

A. oleracea has important chemical properties that awakened the interest of the pharmaceutical industry due to its active ingredient, spilanthol (Borges et al., 2012). Currently the search for natural products with inhibitory action on melanization process has increased, focusing on the phenol oxidase tyrosinase.

Tyrosinase, also known as polyphenol oxidase (PPO), is widely distributed in microorganisms, animals and plants. It catalyzes the oxidation of monophenols, *o*-diphenols and *o*-quinones (Karioti et al., 2007). Tyrosinase is known as a key enzyme in melanin biosynthesis and it is responsible for melanization in animals and for browning in plants. Tyrosinase is responsible for enzymatic browning reactions in damaged fruits during post-harvest

* Corresponding author.

E-mail: alanfbarbosa@ufrj.br (A.F. Barbosa).

Anexo D – Artigo publicado na Revista Higiene Alimentar.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE JAMBU (*Spilanthes oleracea* L.)

IN VITRO ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF JAMBU (*Spilanthes oleracea* L.)

Alan Franco Barbosa¹; André Fioravante Guerra¹, Edlene Ribeiro Prudencio², Mário Geraldo de Carvalho²; Armando Ubirajara Oliveira Sabaa Srur^{1,3}

¹Departamento de Tecnologia de Alimentos, Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

²Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ)

³Departamento de Nutrição Básica e Experimental, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Resumo

O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do jambu frente ao *Micrococcus luteus* e o *Lactobacillus casei*. Foram utilizados o extrato metanólico e a fração hexânica do jambu para os testes de atividade antimicrobiana. A obtenção das amostras testadas foi de acordo com proposta de Barbosa e colaboradores (2014). O material foi analisado por CG/MS e RMN ¹H and ¹³C. O principal componente da fração hexânica, espilantol, foi identificado com pico em 12.21 min na análise com CG. Essa amostra contém 84,28 % de espilantol. Não foi observado ação antimicrobiana do extrato metanólico e fração hexânica sobre *Lactobacillus casei*. Porém a fração hexânica criou halo de inibição sobre *Micrococcus luteus*. Diante desses resultados a fração hexânica do jambu pode ser utilizada no controle do *Micrococcus luteus*.

Palavras-chave: Hortaliça, *Acmella oleracea*, Asteracea.

Introdução

Conhecida popularmente como jambu (*Spilanthes oleracea* L.) é uma planta nativa da Amazônia muito usada como condimento em pratos típicos da região Norte do Brasil, como o tacacá e o pato no tucupi, além de ter aplicação na medicina popular para o tratamento de estomatites, resfriados e como analgésico (NASCIMENTO et al., 2013). A planta apresenta propriedades químicas importantes, que desperta o interesse da indústria farmacêutica, principalmente pela presença do seu princípio ativo, espilantol (BORGES et al., 2012).

O espilantol, também conhecido como afinina (OLIVER-BEVER, 1983), está presente em várias espécies do gênero *Acmella* e na família Asteracea, como por exemplo, na planta *A. oleracea* (RAMSEWAK et al., 1999). Essa amida, além de ter sido sintetizada em 1984 por Ikeda e colaboradores, foi isolada de *A. oleracea* em 1903 (GERBER, 1903) e, posteriormente de *A. acmella* (GOKHALE e BHADE, 1945).

S. oleracea L. já é conhecida por apresentar atividade antimicrobiana (RATNASOORIYA et al., 2004; PRACHAYASITTIKUL et al., 2009), fungistático e bacteriostático (MOLINA-TORRES et al., 2004). No entanto, não há trabalhos que avaliem a atividade bacteriana do extrato metanólico e fração hexânica do jambu, com composição química semelhante às amostras testadas no presente estudo, sobre *Micrococcus luteus* e *Lactobacillus casei*.

SPILANTHOL CONTENT IN THE EXTRACT OBTAINED BY SUPERCRITICAL CO₂ AT DIFFERENT STORAGE TIMES OF ACMELLA OLERACEA L.

ALAN FRANCO BARBOSA^{1,8}, CRISTIANE DE SOUZA SIQUEIRA PEREIRA²,
MARISA FERNANDES MENDES³, RAUL NUNES DE CARVALHO JUNIOR⁴,
MÁRIO GERALDO DE CARVALHO⁵, JOSÉ GUILHERME SOARES MAIA⁶
and ARMANDO UBIRAJARA OLIVEIRA SABAA-SRUR^{1,7}

⁸Corresponding author.

TEL: +55-21-979919350;

FAX: +55-21-26821023;

EMAIL: alanfbarbosa@yahoo.com.br

Received for Publication December 22, 2015

Accepted for Publication May 31, 2016

doi:10.1111/jfpe.12441

ABSTRACT

The effect of the storage time on spilanthol content in the extract from Jambu obtained by supercritical CO₂ was evaluated on respect of their chemical properties. Lyophilized Jambu and partially dehydrated with cold air circulation was stored in an oven at 40°C for 195 days. After different storage times (0, 21, 41, 89 and 195 days), the samples were submitted to supercritical fluid extraction at the same operational condition of 300 bar and 40°C. The obtained extracts were analyzed by ¹H and ¹³C NMR and GC-MS. The extract from lyophilized Jambu and from different storage times provided the respective spilanthol content, % (storage days): 1.07 (lyophilized); 0.68 (0); 0.41 (21); 0.31 (41); 0.41 (89) and 0.42 (195). These determinations allowed the identification of the constant presence of spilanthol as the major metabolite in the extracts, regardless of storage time, revealing the viability of the market for this product in chemical composition.

PRACTICAL APPLICATIONS

This paper showed the presence of spilanthol in all the extracts from a supercritical fluid, despite of the different storage times that the raw material (Jambu) was submitted, proving that it did not suffer degradation. This result is significant because spilanthol is considered the most special metabolite present in Jambu. Moreover, it has many biological properties and confers flavor with tingling and salivation during consumption.

INTRODUCTION

Popularly known as Jambu, *Acmella oleracea* L. is a native plant from Amazon, often used as a flavor in popular dishes of northern Brazil, having as well application in popular medicine for the treatment of stomatitis, colds and as an analgesic (Nascimento *et al.* 2013). The plant has important

chemical properties that improve the interest of the pharmaceutical industry, especially due to the presence of a high-value component, known as spilanthol (Borges *et al.* 2012).

The spilanthol is an outstanding representative of the *N*-alkylamides, which high biomedical interest has increased in the last two decades (Boonen *et al.* 2012; Monroe *et al.*

LC-HRMS and NMR Analysis of Lyophilized *Acmella oleracea* Capitula, Leaves and Stems

Doug Monroe^a, Rensheng Luo^b, Kevin Tran^a, Kristy M. Richards^a, Alan Franco Barbosa^c, Mário G. de Carvalho^d, Armando U.O. Sabaa-Srur^c and Robert E. Smith^{a,*}

^aFDA 11510 W 80th St, Lenexa, KS, 66214, USA; ^bUniversity of Missouri, St. Louis 63121;

^cDepartment of Food Technology, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Brazil; ^dChemistry Department, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Brazil

Abstract: Lyophilized *Acmella oleracea* capitula, leaves and stems were extracted with methanol at 100 °C and 10 MPa (100 atm) pressure in a sealed container and analyzed by LC-HRMS and NMR. This solubilized 28.3% of the leaves, 24.7% of the stems and 31.1% of the capitula. The NMR spectra were dominated by signals due to the CHO and CH₂O of carbohydrates. Spilanthol and other *N*-alkamides were present in the methanolic extracts at concentrations that were too low to enable their detection by NMR. In contrast, LC-HRMS was able to quantify spilanthol (deca-2*E*,6*Z*,8*E*-trienoic acid isobutylamide, *syn.* affinin, C₁₄H₂₃NO) and detect at least ten other *N*-alkamides as [M+H]⁺ ions with the following molecular formulas and *m/z* values: C₁₃H₁₇NO (1), C₁₇H₁₇NO (2), C₁₅H₁₉NO (3), C₁₅H₂₁NO (4), C₁₆H₂₃NO (5), C₁₇H₂₃NO (6), C₁₄H₂₅NO (7), C₁₅H₂₅NO (8), C₁₄H₂₁NO (9) and C₁₆H₂₅NO (10). The concentrations of spilanthol in the capitula, leaves and stems were 16.5, 0.344 and 0.241 mg/g dry weight. To confirm its presence by NMR, partial purification was required. So, a portion of the residues remaining after evaporating off the methanol were partitioned between chloroform and deionized water. The percentage of amphiphilic compounds in the capitula, leaves and stems were 7.69, 8.42 and 3.09% dry weight, respectively. NMR signals due to spilanthol were seen in their spectra.

Keywords: *Acmella oleracea*, LC-HRMS, NMR, spilanthol, *N*-alkamides.

INTRODUCTION

Acmella oleracea is known as the toothache plant, due to its oral analgesic properties [1, 2]. In Brazil, it is known as jambu, but in India, the small tree *Syzygium jambos* is also known as jambu [3] and in Malaysia, guava (*Psidium guajava* L.) is known as jambu batu [4]. However, there is some disagreement in the literature over the name of its genus and species. As described in a recent review article [5], some listed it as *A. oleracea*, but others call it *A. oleracea* (L.) R. K. Jansen, *A. oleracea* Compositae, *S. oleracea* L., *S. acmella*., *S. acmella* L. var. *oleracea* Clarke and *S. acmella* Murr. (Asteraceae) [1, 2, 5, 6-21]. At least one article stated that the flower heads of *S. acmella* L. var. *oleracea* Clarke are yellow, but those of *S. acmella* are purple [2]. To add to the confusion, one review article on the genus *Spilanthes* Jacq stated that “The genus is often confused with the genus *Acmella* Rich. Ex Pers.”, “*Spilanthes* species have discoid heads and *Acmella* species have rayed heads”, and “*Spilanthes* has a chromosome number of 16, whereas *Acmella* has 12 or 13” [22]. In complete contrast, others reported that the flowers of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen have discoid heads and a chromosome number of 2n = 68 or 70 [23]. Monographs

have been written about each genus (*Acmella* and *Spilanthes*) [24, 25], but the “toothache plant” was placed in the *Acmella* genus [26]. Some of its common names include jambu, agrião do Pará and paracress [25]. The monograph on *Acmella* warned of false synonyms for *A. oleracea* that appear on various websites. Some of them state that the “accepted scientific name” is *Spilanthes acmella* (L.) Murr., but the photos on them clearly show *A. oleracea* [25]. This monograph also stated that the “currently accepted name” for *Spilanthes acmella* (L.) Murr. is *Blainvillea acmella* (L.) Philipson [25]. There is another article that described a Mexican plant that was called *Acmella* (*Spilanthes*) *oppositifolia*, while the Nahuatl name was chilcuage [26]. There are also five different species of *Acmella* in Taiwan that contain spilanthol [18]. Finally, there is an article that lists *S. acmella* and *S. oleracea* as being two separate plants [27]. Other synonyms include *A. ciliata* Kunth, *Cotula pyretharia* L., *S. fusca* MART, *Bidens fervida* Lan and *A. uliginosa* (Sw.) Cass” [28, 29].

In addition to its analgesic effects, *A. oleracea* and one of its active ingredients, spilanthol, have been shown to have antifungal, anti-larvicidal, anti-malarial, antinociceptive, antioxidant, anti-inflammatory, antimutagenic, anti-wrinkle, bacteriostatic, insecticidal activities against *Aedes aegypti* and *Helicoverpa zea* neonates, and anti-molluscicidal activities [1, 8-10, 17, 21, 29-40]. There have also been reports on its activities as an anticonvulsant, antioxidant, aphrodisiac, pancreatic lipase inhibitor, antimicrobial agent,

*Address correspondence to this author at the U.S. FDA, 11510 W 80th St, Lenexa, KS, 66224, USA; Tel: 913-752-2191; Fax: 913-752-2122; E-mail: Robert.smith@fda.hhs.gov



Review Article

Spilanthol: occurrence, extraction, chemistry and biological activities



Alan F. Barbosa^a, Mário G. de Carvalho^a, Robert E. Smith^{b,*}, Armando U.O. Sabaá-Srur^{a,c}

^a Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, Brazil

^b Park University, Parkville, MO, USA

^c Curso de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 July 2015

Accepted 31 July 2015

Available online 9 September 2015

Keywords:

Acmella oleracea

Alkamides

Bioactivity

Spilanthes oleracea L.

Heliopsis longipes

ABSTRACT

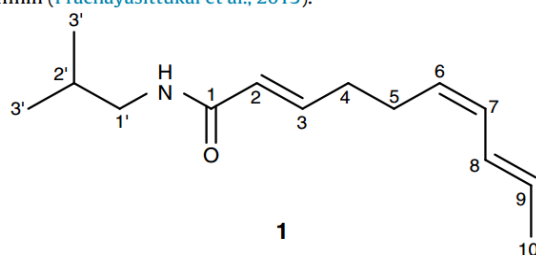
Spilanthol (C₁₄H₂₃NO, 221.339 g/mol) is a bioactive compound that is found in many different plants that are used as traditional remedies throughout the world. It is present in *Heliopsis longipes* and several species in the genus *Acmella*, including *A. oleracea* L., also known as paracress and jambu. Its leaves and flowers have sensory properties (pungency, tingling, numbing, mouth-watering) that make it a popular spice and ingredient in several Brazilian dishes. Spilanthol can exert a variety of biological and pharmacological effects including analgesic, neuroprotective, antioxidant, antimutagenic, anti-cancer, anti-inflammatory, antimicrobial, antilarvicidal and insecticidal activities. So, the aim of this review is to present a literature review on the spilanthol that describes its occurrence, chemistry, extraction and biological activities.

© 2015 Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introduction

Spilanthol (C₁₄H₂₃NO, 221.339 g/mol) (**1**) is a bioactive compound that is found in many different plants that are used as traditional remedies throughout the world (Molinatorres et al., 1996; Prachayasittukul et al., 2013; Paulraj et al., 2013; Rios and Olivo, 2014). Its IUPAC name is (2*E*,6*Z*,8*E*)-*N*-isobutyl-2,6,8-decatrienamide (Molinatorres et al., 1996). It is also known as

affinin (Prachayasittukul et al., 2013).



The plants in which it is found are often called toothache plants, due to the analgesic effect of spilanthol (Molinatorres et al., 1996; Hind and Biggs, 2003; Wu et al., 2008; Tiwari et al., 2011; Dias et al., 2012; Sharma et al., 2012; Abeyasiri et al., 2013; Dubey et al., 2013; Prachayasittukul et al., 2013; Paulraj et al., 2013; Rios and

Olivo, 2014; Dandin et al., 2014; Hajdu, 2014). Like other alkamides, it is an amphiphilic compound with a relatively polar amide and a less polar fatty acyl. So, it can be extracted from plants using either methanol, ethanol, supercritical CO₂ or hexane (Nakatani and Nagashima, 1992; Sharma et al., 2011; Dias et al., 2012; Singh and Chaturvedi, 2012a,b; Hajdu, 2014; Abeyasinghe et al., 2014). After being extracted, it can be purified by preparative scale TLC and/or HPLC (Johns et al., 1982; Ogura et al., 1982; Mbeunkui

et al., 2011; Pandey et al., 2011; Moreno et al., 2012; Nakatani and Nagashima, 1992; Hajdu, 2014). In addition to its oral analgesic effect, it also has antibacterial effects (Dubey et al., 2013). So, either spilanthol or extracts of plants that contain it may be added to toothpaste and used as an oral analgesic in gels (such as Buccaldol[®] and Indolphar[®]) and as an anti-wrinkle cream that can substitute for Botox in cosmetic applications (Demarne and Passaro, 2009; Veryser et al., 2014). There are also some anti-aging products (Gatuline[®], SYN[®]-COLL, ChroNoline[™]) that contain spilanthol. There are about 30 patents that describe products that are made from a variety of *Spilanthes* species (Haw and Keng, 2003). It is also eaten in foods. The leaves of some of the plants (like *S. acmella*) that contain spilanthol are used as a spice (Haw and Keng, 2003; Paulraj et al., 2013). The European Union estimated that the average daily intake of spilanthol was 24 μg/person/day (Veryser et al., 2014). It is also possible that spilanthol, like other alkamides, can have important effects on the central nervous system (CNS) and immune system (Gertsch, 2008; Hajdu, 2014; Veryser et al., 2014). However, its greatest potential for saving lives and improv-

ing human health may be its ability to kill mosquitoes that can spread tropical diseases like malaria and dengue fever (Pandey

* Corresponding author.

E-mail: robert.smith05@park.edu (R.E. Smith).