



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

CENTRO DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ORGÂNICA E INORGÂNICA

BACHARELADO EM QUÍMICA

SABRINA MATIAS DOS SANTOS

OBTENÇÃO DE ESPILANTOL A PARTIR DAS FOLHAS DE JAMBU

(*Spilanthes acmella* (L.) Murr.)

FORTALEZA

2015

SABRINA MATIAS DOS SANTOS

OBTENÇÃO DE ESPILANTOL A PARTIR DAS FOLHAS DE JAMBU

(*Spilanthes acmella* (L.) Murr.)

Monografia submetida à Coordenação do Curso de Bacharelado em Química, da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Química com Habilitação Industrial. Local do estágio: Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa).

Orientador Didático: Prof. Edilberto Rocha Silveira;

Orientador Profissional: Dr. Kirley Marques Canuto

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

-
- S238o Santos, Sabrina Matias dos.
Obtenção de espilantol a partir das folhas de jambu (*Spilanthes acmella* (L.) Murr.) / Sabrina Matias dos Santos. – 2015.
36 f. : il. color.
- Monografia (graduação) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Curso de Química, Fortaleza, 2015.
Orientação: Dr. Kirley Marques Canuto.
Co-orientação: Prof. Dr. Edilberto Rocha Silveira.
1. Jambú. 2. Espectroscopia. I. Título.

CDD 540

SABRINA MATIAS DOS SANTOS

OBTENÇÃO DE ESPILANTOL A PARTIR DAS FOLHAS DE JAMBU

(*Spilanthes acmella* (L.) Murr.)

Monografia submetida à Coordenação do Curso de Bacharelado em Química, da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos para obtenção do grau de Bacharel em Química com Habilitação Industrial.

Aprovada em: 26/06/2015.

BANCA EXAMINADORA

[Redacted]

Prof. Edilberto Rocha Silveira

Universidade Federal do Ceará (UFC)

[Redacted]

Dr. Kirley Marques Canuto

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)

[Redacted]

Dra. Patrícia Coelho do Nascimento Nogueira

Universidade Federal do Ceará (UFC)

AGRADECIMENTOS

À Deus por me fazer acreditar que quando se tem fé, nada é impossível.

Aos meus pais, Ribamar e Estela, por todos os sacrifícios que realizaram para me dar uma herança de valor inestimável, meus estudos, e por terem me ensinado a ser uma pessoa guerreira e honesta, assim como eles.

Ao meu irmão Felipe, por ser para mim um exemplo de superação.

À minha madrinha, meus avós, tios e primos, por me apoiarem nas decisões que tomei.

Ao professor Edilberto Rocha Silveira, não só pelos ensinamentos como orientador, mas também pelas lições de vida transmitidas.

Ao Dr. Kirley Marques Canuto, por aceitar ser meu orientador e contribuir com meu crescimento profissional.

Aos amigos que fiz durante a graduação, meu mais sincero obrigada pelos momentos inesquecíveis, nos quais fui tão feliz.

Aos amigos e colegas de trabalho do Lafiplam, obrigada pelos ensinamentos tão valiosos.

Aos amigos e colegas de trabalho do LMQPN-Embrapa, em especial, aos técnicos Tigressa, Paulo e Lorena pela contribuição na realização deste trabalho.

RESUMO

Na busca de tratamentos alternativos para controlar as doenças parasitárias nos rebanhos bovinos brasileiros tem-se investido em pesquisas com produtos naturais, especialmente plantas que possuam atividade acaricida (carrapaticida). O jambu (*Spilanthes acmella* (L.) Murr., planta herbácea nativa da Região Norte do Brasil, pertencente a família Asteraceae, já é relatado na literatura por possuir atividade inseticida e carrapaticida, devido à presença de uma alquilamida chamada de espilantol. Dessa forma, no presente trabalho utilizou-se o extrato hexânico das folhas de *Spilanthes acmella* (L.) Murr., que foi submetido inicialmente à partição líquido-líquido e posteriormente a diversos métodos cromatográficos, como CLAE. Através da CLAE obteve-se um líquido amarelado, o qual foi caracterizado como sendo espilantol após análise espectrométrica por espectrometria de massa de alta resolução, ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C (uni e bidimensionais) e espectroscopia na região do infravermelho.

Palavras-chave: *Spilanthes acmella* (L.) Murr., Alquilamida, Espilantol.

ABSTRACT

In the search for alternative treatments to control parasitic diseases in Brazilian cattle herds has been invested in research on natural products, especially plants that have acaricide activity (ticks). The “jambu” (*Spilanthes acmella* (L.) Murr., native herbaceous plant of the Northern Region, belonging to Asteraceae family, is already reported in the literature as possessing insecticidal and acaricidal activity, due to the presence of an alkylamide named spilanthol. Thus, in this study used the hexane extract from leaves of *Spilanthes acmella* (L.) Murr., which was submitted initially to liquid-liquid partition and later for several chromatographic methods such as HPLC. Through HPLC yielded a yellow liquid, which was characterized as spilanthol after spectrometric analysis by high resolution mass spectrometry, nuclear magnetic resonance ^1H and ^{13}C (1D and 2D NMR spectroscopy) and FT-IR.

Keywords: *Spilanthes acmella* (L.) Murr.), Alkylamide, Spilanthol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Foto de <i>Spilanthes acmella</i> (L.) Murr, conhecida como jambu.....	12
Figura 2 – Estrutura química do espilantol.....	12
Figura 3 – Estrutura química das alquilamidas presentes no jambu	15
Figura 4 – Cromatogramas resultantes da eluição isocrática de SAFHEC com água ultrapura/metanol HPLC 80% em 230 nm (à esquerda) e em 270 nm (à direita).....	21
Figura 5 – Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato hexânico das folhas de jambu (SAFH).....	22
Figura 6 – Estrutura do espilantol com setas mostrando as correlações à longa distância ^1H-^{13}C, observadas no espectro bidimensional HMBC ...	25
Figura 7 – Espectro de massa de alta resolução obtido no modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$ de SAFHEC PICO 1.....	25
Figura 8 – Espectro de absorção na região do infravermelho de SAFHEC PICO 1.	26
Figura 9 – Espectro de RMN ^1H de SAFHEC PICO 1 (CDCl_3, 600 MHz).....	26
Figura 10 – Espectro de RMN ^{13}C de SAFHEC PICO 1 (CDCl_3, 150 MHz). .	27
Figura 11 – Espectro de RMN ^{13}C-DEPT135 de SAFHEC PICO 1 (CDCl_3, 150 MHz).....	27
Figura 12 – Espectro de RMN 2D ^1H, ^{13}C-HSQC de SAFHEC PICO 1 (CDCl_3, 600 x 150 MHz).....	28
Figura 13 – Espectro de RMN 2D ^1H, ^1H-COSY do SAFHEC PICO 1 (CDCl_3, 600x600 MHz).....	28
Figura 14 – Espectro de RMN 2D ^1H, ^{13}C-HMBC do SAFHEC PICO 1 (CDCl_3, 600x150 MHz).....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades do espilantol.....	16
Tabela 2 – Resultados da cromatografia de adsorção de SAFHE	20
Tabela 3 – Dados de RMN 1D e 2D de ^1H e ^{13}C para SAFHEC PICO 1 (valores de δ em ppm, em CDCl_3 600x150 MHz) e comparação com os dados da literatura (* NAKATANI;NAGASHIMA, 1992/ valores de δ em ppm, em CDCl_3 400x100 MHz).....	30

LISTA DE SIGLAS

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CL-EM – Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa

COSY – *Correlation Spectroscopy*

DAD – Detector de Arranjo Diodo

EFS – Extração em Fase Sólida

ESI – *Electrospray Ionization*

HMBC – *Heteronuclear Multiple Bond Coherence*

HSQC – *Heteronuclear Single Quantum Coherence*

IDH – Índice de Deficiência de Hidrogênio

LMQPN – Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

PTFE – Politetrafluoretileno

SAFH – *Spilanthes acmella* Folhas Hexano

SAFHAq – *Spilanthes acmella* Folhas Hexano/ Aquoso

SAFHEH – *Spilanthes acmella* Folhas Hexano/ Éter etílico/ Hexano

SAFHEC – *Spilanthes acmella* Folhas Hexano/ Éter etílico/ Clorofórmio

SAFHEAc – *Spilanthes acmella* Folhas Hexano/ Éter etílico/ Acetato de etila

SAFHEM – *Spilanthes acmella* Folhas Hexano/ Éter etílico/ Metanol

TMS – Tetrametilsilano

TOF – *Time of flight*

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	11
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1. <i>Spilanthes acmella</i> (L.) Murr. (Jambu).....	13
2.2.Alquilamidas	13
2.3.Espilantol	16
3.PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	17
3.1.Obtenção do extrato hexânico das folhas de <i>Spilanthes acmella</i>	17
3.2.Partição líquido-líquido de SAFH.....	17
3.3.Métodos cromatográficos.....	17
3.3.1.Cromatografia de adsorção.....	17
3.3.3.Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	18
3.3.4.Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa (CL-EM)	18
3.4.Métodos espectroscópicos	19
3.4.1.Espectroscopia na região do infravermelho (IV)	19
3.4.2.Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Prótio (RMN ¹ H) e de Carbono 13 (RMN ¹³ C).....	19
3.5.Isolamento do espilantol	20
3.5.1.Cromatografia de adsorção de SAFHE	20
3.5.2.Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de SAFHEC.....	21
3.5.3.Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas(CL-EM) de SAFHEC PICO 1.....	21
4.RESULTADOS E DISCUSSÃO	23
5.CONCLUSÃO	31
REFERÊNCIAS.....	32

1.INTRODUÇÃO

O Brasil possui um dos maiores rebanhos bovinos do mundo, o que contribui bastante para a economia do país. No entanto, doenças parasitárias, causadas principalmente por carrapatos, provocam muitas perdas tanto econômicas quanto qualitativas. Dessa forma, faz-se necessário o uso de carrapaticidas como clorfenvifós, diclorvós, deltametrina, cipermetrina e amitraz, substâncias na maioria das vezes tóxicas para o ser humano, que apresentam potenciais efeitos neurotóxico e carcinogênico, além de causarem câimbras, dor de cabeça, diarreia, vômito, tontura, convulsões, hipersensibilidades, entre outros sintomas (PASTORELLO, 2010; ARAÚJO *et al.*, 2013).

Tendo em vista a busca por tratamentos alternativos, têm-se investido bastante na área de produtos naturais, principalmente na obtenção de compostos bioativos de plantas que apresentem atividade carrapaticida. Uma das plantas que está sendo bem explorada é o jambu (*Spilanthes acmella* (L.) Murr.), que já é relatada na literatura por possuir atividade acaracida (CASTRO *et al.*, 2014), inseticida (MORENO *et al.*, 2011; MORENO, 2011; RAMSEWAK; ERICKSON, 1999), além de possuir também efeito anestésico (PHRUTIVORAPONGKUL *et al.*, 2008).

O jambu (Figura 1) é muito conhecido na Região Norte do Brasil por fazer parte da culinária local, em pratos como tacacá, pato no tucupi e saladas (SANTOS, 2010), e ser utilizado na medicina popular, como analgésico para tratamento de dores de dente, cabeça, garganta e aftas, entre outros (DI STATI; HIRUMA-LIMA, 2002).

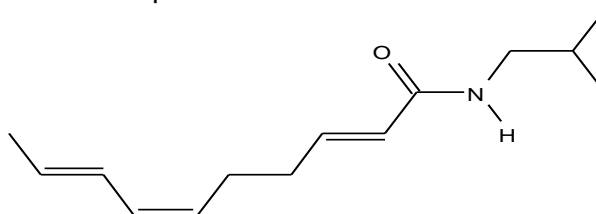
Figura 1 – Foto de *Spilanthes acmella* (L.) Murr, conhecida como jambu.



Fonte: Sana; Rani e Sulakshana (2014).

A atividade acaricida do jambu é devida à presença de uma alquilamida olefínica denominada espilantol ((2*E*,6*Z*,8*E*)-*N*-(2-metilpropil)deca-2,6,8-trienamida ou (2*E*,6*Z*,8*E*)-*N*-isobutil-2,6,8-decatrienamida) (Figura 2), também conhecida por afinina (TORRES; CHAVÉZ, 2001). O espilantol é o principal composto pungente (RATNASOORYA *et al.*, 2004) contido no jambu, o que confere o sabor refrescante e picante da planta.

Figura 2 – Estrutura química do espilantol.



Segundo Castro (2014), o extrato hexânico das folhas do jambu a uma concentração de 79,7 mg/L reduziu em 50% a oviposição e eclodibilidade dos ovos de fêmeas ingurgitadas (intumescidas com o extrato) de *Rhipicephalus microplus* e causou a morte de 50% das larvas e fêmeas ingurgitadas a uma concentração de 3,1 a 150 mg/mL, significando que o extrato hexânico de jambu foi altamente efetivo (eficiência > 95%) contra as larvas e as fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus*.

Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi isolar o espilantol através de métodos cromatográficos e caracterizá-lo quimicamente por métodos espectroscópicos e espectrométricos a

fim de se utilizar essa substância em ensaios de atividade carrapaticida a serem desenvolvidos pela Embrapa.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. *Spilanthes acmella* (L.) Murr. (jambu)

Spilanthes acmella (L.) Murr. é uma planta herbácea nativa da Região Norte do Brasil pertencente à família Asteraceae (antiga Compositae). Popularmente conhecida como jambu, apresenta como sinônimos *Spilanthes acmella* L. var *oleracea* Clarke, *Spilanthes oleracea* (L.) e *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen.

Segundo Hind e Biggs (2003), o jambu trata-se de uma planta de porte herbáceo, medindo de 30 a 60 cm de altura, com folhas compostas, opostas, membranáceas e pecioladas, inflorescências compostas de flores amarelas, caule cilíndrico e carnoso, sendo a raiz principal do tipo pivotante com abundantes ramificações laterais.

O jambu exibiu uma série de efeitos biológicos tais como atividades anestésica local (LEY *et al.*, 2006), anti-inflamatória e analgésica (CHAKRABORTY *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2008), anestésica e antipirética (CHAKRABORTY *et al.*, 2010), diurética (RATNASOORYA *et al.*, 2004; DUBEY *et al.*, 2013) e emagrecedora (EKANEM *et al.*, 2007), as quais na sua grande maioria são atribuídas à presença da alquilamida espilantol, a principal molécula bioativa da planta, que atinge sua maior concentração (1%) nas flores (SARAF *et al.*, 2002; LEY *et al.*, 2006).

2.2. Alquilamidas

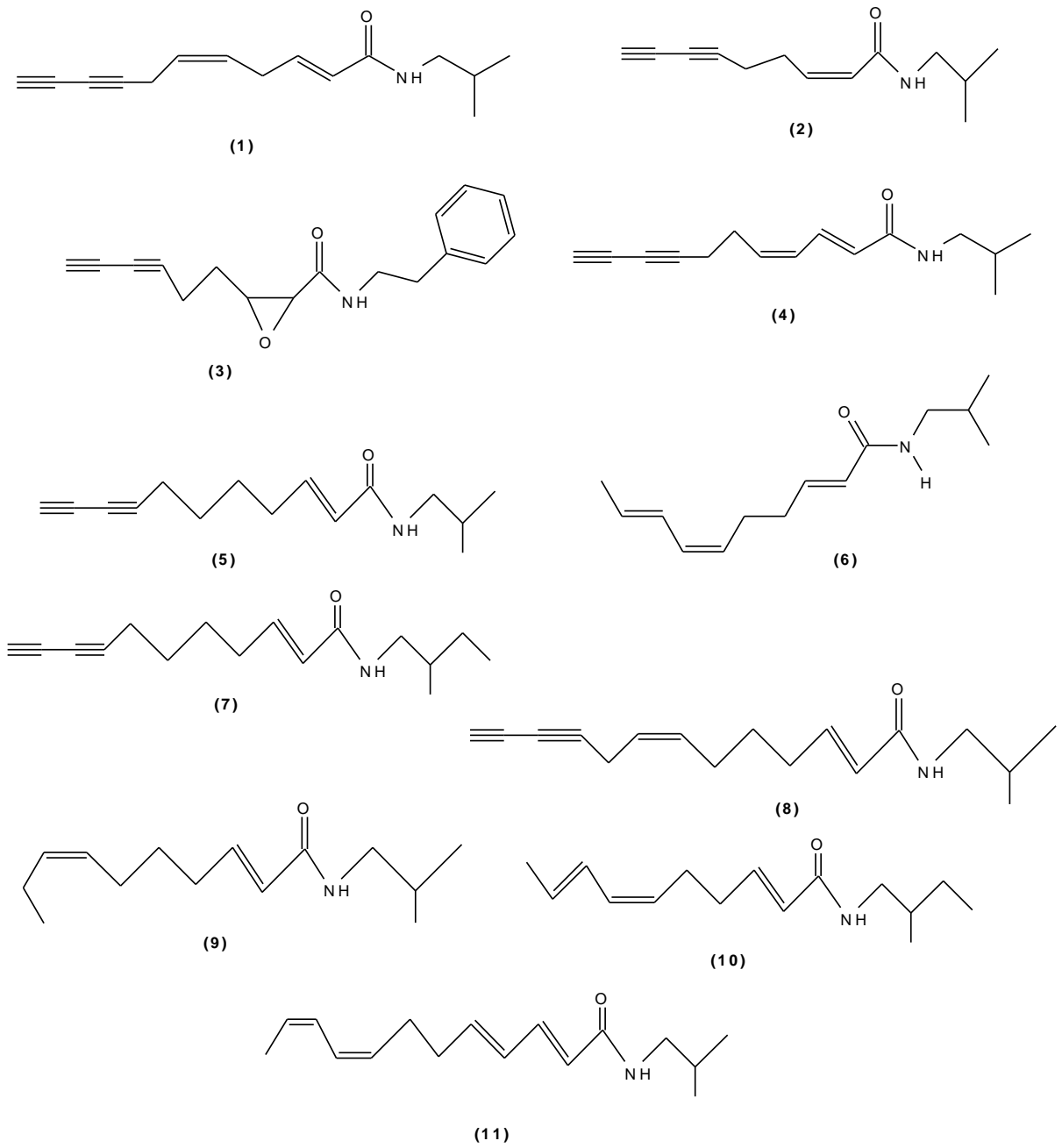
As alquilamidas ou alcamidas são formadas a partir da reação de condensação química de um ácido carboxílico de cadeia média a grande (cadeia carbônica com 10 a 18 carbonos) com uma amina (CAVALCANTI, 2008). Elas podem ser classificadas segundo o tipo de ligação entre carbonos que possuem: olefínicas (ligações duplas) e acetilênicas (pelo menos uma ligação tripla). Há ainda as que apresentam anéis homo ou heterocíclicos.

Segundo Torres e Chavéz (2001), as alquilamidas manifestam-se em poucos grupos de plantas, dos quais os mais importantes estão presentes nas

famílias Asteraceae e Solanaceae, mais especificamente nas espécies de *Capsicum* e na família Piperaceae (família das pimentas).

As alquilamidas já relatadas no jambu são (2E,5Z)-N-isobutil-undeca-2,5-dieno-8,10-diinamida (1) (CHENG et al., 2015), (2Z)-N-isobutil-2-noneno-6,8-diinamida (2), N-fenetil-2,3-epoxi-6,8-nonadiinamida (3), (2E,4Z)-N-isobutil-2,4-undecadieno-8,10-diinamida (4), (2E)-N-isobutil-2-undeceno-8,10-diinamida (5), (2E,6Z,8E)-N-isobutil-2,6,8-decatrienamida (espilantol) (6), (2E)-N-(2-metilbutil)-2-undeceno-8,10-diinamida (7), (2E,7Z)-N-isobutil-2,7-tridecadieno-10,12-diinamida (8), (2E,7Z)-N-isobutil-2,7-decadienamida (9), (2E,6Z,8E)-N-(2-metilbutil)-2,6,8-decatrienamida (10) e (2E,4E,8Z,10Z)-N-isobutil-dodeca-2,4,8,10-tetraenamida (11) (BAE et al., 2010; BOONEN *et al.*, 2010) (Figura 3).

Figura 3 – Estrutura química das alquilamidas presentes no jambu.



2.3.Espilantol

O espilantol ou afinina ((2E,6Z,8E)-N-(2-metilpropil)deca-2,6,8-trienamida ou (2E,6Z,8E)-N-isobutil-2,6,8-decatrienamida) é uma alquilamida alifática de fórmula molecular $C_{14}H_{23}NO$ e trata-se de um óleo viscoso ardente que possui coloração amarelo pálido a amarelo claro, isolado pela primeira vez por Gerber (1903).

Inicialmente essa alquilamida foi designada de afinina porque foi isolada da planta *Erigeon affinis* (Asteraceae). Mais tarde percebeu-se que a planta da qual a substância havia sido isolada era de fato a *Heliopsis longipes* (Asteraceae).

Além de *Spilanthes acmella*, o espilantol é relatado também nas raízes de *Heliopsis longipes*, apresentando um teor de 7,30 mg/g em tecidos subterrâneos secos (MOLINATORRES et al., 1996), e nas raízes de *Acmella oppositifolia*, em tecidos subterrâneos secos 0,35 mg/g e em tecidos subterrâneos verdes 0,17 mg/g (MOLINATORRES et al., 1996). Também é relatado nas plantas *Wedelia parviceps*, *Acmella ciliata* e *Acmella radicans* (RÍOS, 2012).

Algumas propriedades do espilantol são apresentadas na tabela 1:

Tabela 1 – Propriedades do espilantol.

Fórmula Molecular	$C_{14}H_{23}NO$
Massa Molecular (g/mol)	221
Ponto de Fusão (°C)	23
Ponto de Ebulição (°C)	165
Índice de refração (25 °C)	1,5135
Absorção $\lambda_{m\acute{a}x}$ (nm)	228,5

Fonte: Jacobson (1957).

3.PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

3.1.Obtenção do extrato hexânico das folhas de *Spilanthes acmella*

Seguiu-se a metodologia segundo Castro et al. (2014).

As partes aéreas de *Spilanthes acmella* foram coletadas em Parnaíba-PI (coordenadas geográficas 03.01'40.9" O41.44'57.6") em janeiro de 2007, e o espécime foi depositado no Herbário CEN da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília-DF, sob o número 81102.

O material vegetal foi seco a 40 °C e extraído três vezes consecutivas com hexano, sendo mantida sob agitação constante e aquecimento a 40°C durante 2 h, cada extração. O solvente foi evaporado sob pressão reduzida por meio do uso de um rotaevaporador. O extrato hexânico foi designado de SAFH.

3.2.Partição líquido-líquido de SAFH

O extrato hexânico (SAFH) (44,9 g) foi suspenso em 500 mL de metanol (Impex) e particionado com 187,5 mL (2x) de éter etílico (Impex) e 150 mL (2x) de água destilada. A fração hidroalcoólica foi rotaevaporada e liofilizada, sendo designada de SAFHAq (1,12 g). A fração éter etílico, previamente tratada com sulfato de sódio, foi concentrada e seca em chapa aquecedora a 50 °C, sendo designada de SAFHE (23,46 g).

3.3.Métodos cromatográficos

3.3.1.Cromatografia de adsorção

A cromatografia de adsorção foi realizada utilizando gel de sílica da Vetec 60 mesh. Realizou-se a eluição com hexano e metanol da Impex e clorofórmio e acetato de etila da Vetec.

3.3.3. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A análise foi realizada em um cromatógrafo líquido de alta eficiência da Waters, constituído de uma bomba quaternária Waters-2555 e um detector DAD Waters-2489, operando a 230 e 270 nm. A separação foi efetuada em coluna SunFire™ Prep C18 OBD™ (19 x 100 mm, 5 µm), mantida a temperatura ambiente. A amostra foi solubilizada com água ultrapura/ metanol HPLC 80% (Tedia) e filtrada através de membrana de nylon com poros de 0,22 µm (Simplepure).

A eluição ocorreu de modo isocrático com água ultrapura/ metanol HPLC 80% (Tedia) a um fluxo de 17 mL/min durante 7 min. O volume de injeção foi 500 µL, contendo cerca de 16,7 mg/mL.

3.3.4. Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massa (CL-EM)

A análise foi realizada em um sistema Acquity UPLC (Waters), acoplada com um sistema de Quadrupolo / TOF (Waters). Foi utilizada uma coluna Waters Acquity UPLC BEH (150 mm x 2,1 cm, 1,7 µm) mantida a 40 °C. As fases móveis utilizadas foram água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (B), com gradiente variando 0-15 min (2-95%) de B; 15,1-17 min (100%) de B; 17,1-19,1 min (2%) de B, fluxo de 0,4 mL/min e volume de injeção da amostra de 5 µL. O modo de aquisição foi o MSE.

A análise ocorreu por ionização por electrospray (ESI) em modo positivo, adquirida na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa de 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, e fluxo do gás de dessolvatação de 350 L/h. Leucina encefalina foi utilizada como *lockmass*. A voltagem capilar foi de 3 kV. Em baixo scan, a tensão de cone foi 15 V, energia de colisão de 6 V. Em alto scan, a tensão do cone foi de 30 V com uma rampa de energia de colisão de 30-50 rampa eV (*trap*).

O modo ESI⁻ foi adquirido na faixa de 110-1180 Da, temperatura da fonte fixa de 120 °C, temperatura de dessolvatação 350 °C, e fluxo do gás de dessolvatação de 500 L/h. Leucina encefalina foi utilizada como *lockmass*. A voltagem capilar foi de

2,6 kV. Em baixo scan, a tensão de cone foi 35 V para ESI⁻, energia de colisão de 5 eV (trap). Em alto scan, a tensão do cone foi de 35 V para ESI⁻, com uma rampa de energia de colisão de 20-40 rampa eV (trap). O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation).

A amostra foi dissolvida em água ultra pura (Milli-Q, MILLIPORE), contendo 80% de metanol e filtrada em filtro em membrana de PTFE com poros de 0,22 µm (Allcrom).

3.4.Métodos espectroscópicos

3.4.1.Espectroscopia na região do infravermelho (IV)

O espectro na região do infravermelho foi obtido em espectrômetro Varian, modelo FT-IR Spectrum 660-IR, do Laboratório Multiusuário de Química dos Produtos Naturais (LMQPN - EMBRAPA), utilizando-se pastilha de KBr.

3.4.2.Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Prótio (RMN ¹H) e de Carbono 13 (RMN ¹³C)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Prótio (RMN ¹H) e de Carbono-13 (RMN ¹³C), uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro Agilent DD2 de 600 MHz (para núcleo de ¹H), equipado com uma sonda One Probe de 5 mm de diâmetro interno (H-F/15N-31P), de detecção inversa, e gradiente de campo no eixo “z”, pertencente ao Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais (LMQPN) da Embrapa Agroindústria Tropical.

As amostras foram preparadas dissolvendo-se aproximadamente 2 mg dos padrões e extrato seco em 600 µL de clorofórmio deuterado. Os espectros unidimensionais de ¹H foram adquiridos com um tempo de espera entre cada aquisição de 2 s, AQ de 3,3 s, ganho automático, 8 a 32 transientes, quando necessário em uma janela espectral de 16 ppm e 32 k de número de pontos reais. Para o processamento desses dados, os espectros foram referenciados com o padrão interno tetrametilsilano (TMS) em 0 ppm. Foram utilizados 65.536 pontos,

efetuando multiplicação exponencial ($I_b = 0,3$ Hz) e correção manual de fase e linha de base.

Os experimentos bidimensionais *g*COSY, *g*HSQC e *g*HMBC foram realizados com largura espectral em F2 de 16 ppm para todos, em F1 de 16 ppm, 200 ppm e 240 ppm, número de promediações (ns) igual 16, 32 e 64, respectivamente. Os tempos de espera entre cada aquisição foram 1 s, com 200 pontos durante a aquisição (td) em F1 e 1.442 pontos durante a aquisição em F2. No processamento, foram utilizados 1.024 pontos (si) em F1 e 2.000 pontos em F2.

3.5. Isolamento do espilantol

3.5.1. Cromatografia de adsorção de SAFHE

Aproximadamente 23,5 g de SAFHE foi solubilizado em hexano e adsorvido em 71,75 g de gel de sílica em gral de porcelana. O adsorbato foi cromatografado sob pressão atmosférica. Utilizou-se como eluentes: hexano (1000 mL), clorofórmio (950 mL), acetato de etila (650 mL) e metanol (300 mL). As frações obtidas foram SAFHEH (5,55 g), SAFHEC (9,35 g), SAFHEAc (5,43 g) e SAFHEM (0,56 g) (Tabela 2).

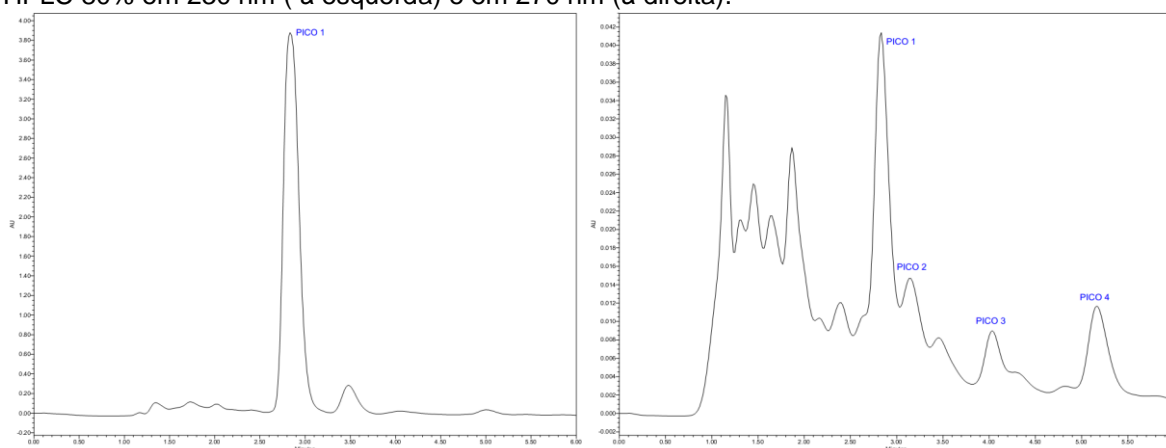
Tabela 2 – Resultados da cromatografia de adsorção de SAFHE.

Eluente	Volume obtido (mL)	Cor	Massa (g)	Designação da fração
Hexano	1000	Amarelo	5,55	SAFHEH
Clorofórmio	950	Marrom	9,35	SAFHEC
Acetato de etila	650	Preto	5,43	SAFHEAc
Metanol	300	Verde escuro	0,56	SAFHEM

3.5.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de SAFHEC

A fração SAFHEC (250 mg) foi solubilizada na fase móvel empregada, filtrada e injetada no cromatógrafo líquido. Foram coletados quatro picos que foram concentrados e liofilizados, sendo designados de SAFHEC PICO 1 (4 mg), SAFHEC PICO 2 (0,1 mg), SAFHEC PICO 3 (1 mg) e SAFHEC PICO 4 (4,8 mg) (Figura 4).

Figura 4 – Cromatogramas resultantes da eluição isocrática de SAFHEC com água ultrapura/metanol HPLC 80% em 230 nm (à esquerda) e em 270 nm (à direita).

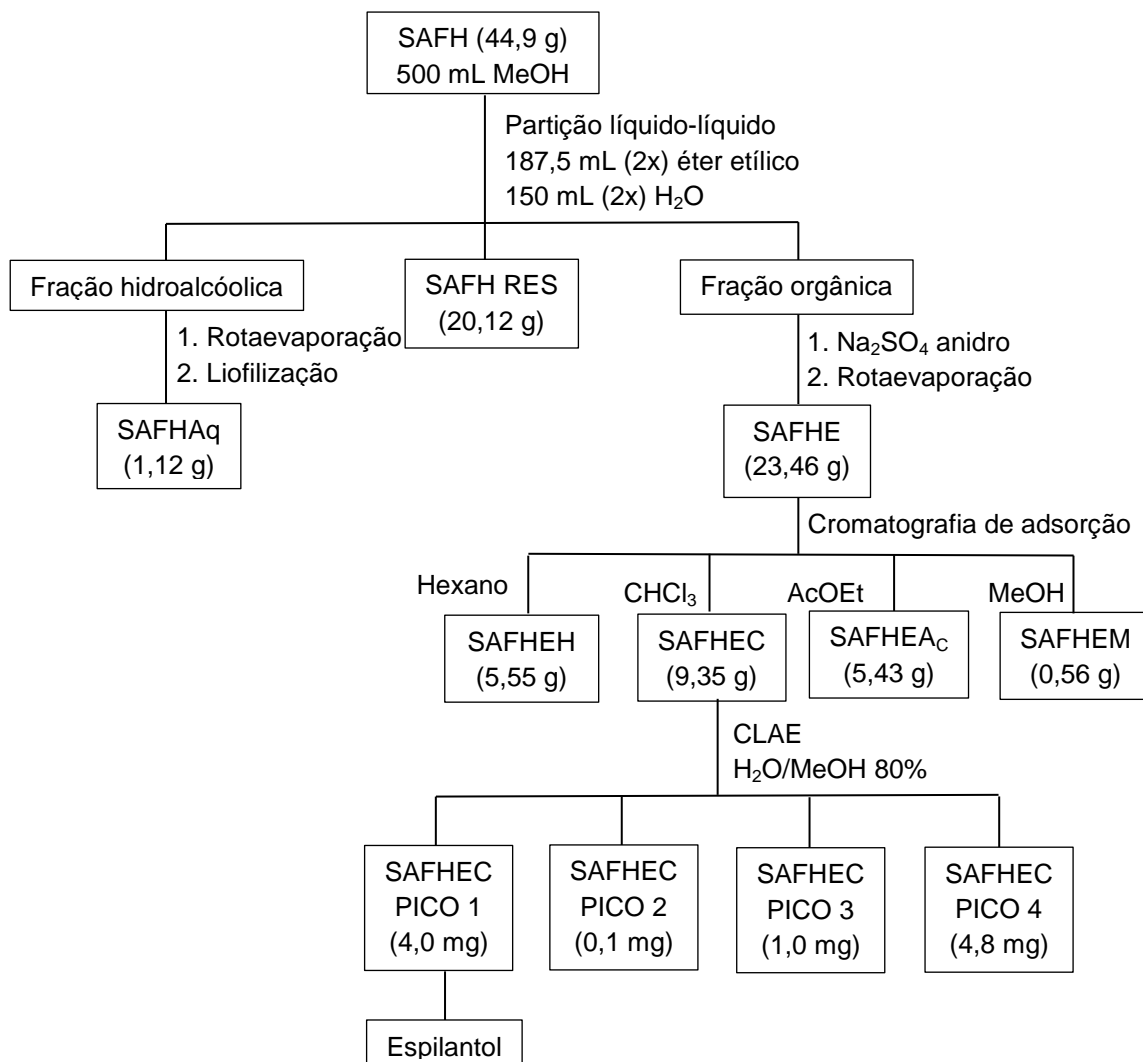


3.5.3. Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (CL-EM) de SAFHEC PICO 1

A fração SAFHEC PICO 1 (1 mg) foi dissolvida em 1 mL H₂O ultrapura/MeOH 80 %, filtrada e injetada no cromatógrafo líquido acoplado a um espectrômetro de massa.

A figura 5 mostra o fluxograma representativo para o procedimento experimental que conduziu ao isolamento do espilantol a partir do extrato hexânico de *Spilanthes acmella* (SAFH).

Figura 5 – Fluxograma da partição líquido-líquido do extrato hexânico das folhas de jambu (SAFH).



4.RESULTADOS E DISCUSSÃO

A fração SAFHEC PICO 1 foi isolada a partir de partição líquido-líquido e tratamentos cromatográficos do extrato hexânico das folhas de *Spilanthes acmella*, apresentando-se como um líquido amarelado.

O espectro de massa de alta resolução obtido por ESI no modo positivo (Figura 7) exibiu um pico correspondente à molécula protonada $[M+H]^+$ em m/z 222,1852 Daltons, induzindo à fórmula molecular $C_{14}H_{23}NO$, IDH= 4, correspondente as quatro ligações duplas presentes no espilantol.

O espectro de absorção na região do infravermelho de SAFHEC-PICO 1 (Figura 8) apresentou uma banda em 3397 cm^{-1} correspondente à deformação axial de ligação N–H, característica de amida secundária. A banda em 1670 cm^{-1} foi atribuída à deformação axial de ligação C=O, evidenciando a presença de carbonila. A absorção em 1629 cm^{-1} foi associada à deformação axial de ligação C=C, compatível à presença de sistema olefínico e a absorção em 1552 cm^{-1} referente à deformação angular de ligação N–H, enfatizando a presença da amida secundária.

O espectro de RMN 1H ($CDCl_3$, 600 MHz) (Figura 9) apresentou 6 sinais de hidrogênio na faixa de δ 0,90 a 3,15 ppm, sendo um duplete em δ 0,9 ppm (6H, $J = 6,6$ e 6 Hz), um duplete em δ 1,75 ppm (3H, $J = 6,6$ Hz), um multiplete em δ 1,77 ppm (1H, $J = 7,2$ Hz), dois quartetos em δ 2,23 (2H, $J = 7,8$ Hz) e δ 2,30 ppm (2H, $J = 7,2$ Hz) e um triplete em δ 3,12 ppm (2H, $J = 6,6$ Hz). Na faixa de δ entre 5 e 7 ppm, observou-se sinais característicos de hidrogênios olefínicos, sendo dois dupletos de triplete em δ 5,24 (1H, $J = 7,2$ e 10,8 Hz) e 6,79 ppm (1H, $J = 6,6$ e 15 Hz), dois dupletos de duplete em δ 5,95 (1H, $J = 10,8$ e 14 Hz) e 6,26 ppm (1H, $J = 13,2$ e 12,6 Hz), um duplete em δ 5,76 ppm (1H, $J = 15,6$ Hz) e um duplete de quarteto em δ 5,68 ppm (1H, $J = 6,6$ e 14,4 Hz). Mostrou também um pico de banda larga em δ 5,45 ppm, correspondente ao hidrogênio ligado ao nitrogênio.

No espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 150 MHz) (Figura 10), foram observados treze linhas espectrais, que correspondem aos quatorze carbonos presentes no espilantol, sendo δ 166,2 ppm relativo a C=O, δ em torno de 124 a 144 ppm a

carbonos olefínicos e δ entre 18 e 20 ppm a carbonos metílicos (C-3' e C-4' equivalentes).

O espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (CDCl_3 , 150 MHz) (Figura 11) revelou a presença de três carbonos metilênicos com amplitude positiva e nove carbonos com amplitude negativa, sendo sete CH e dois CH_3 , sendo um dos sinais de CH_3 pertencente a dois carbonos equivalentes (C-3' e C-4').

O espectro RMN 2D ^1H , ^1H -COSY (CDCl_3 600x600 MHz) (Figura 13) mostrou os acoplamentos geminais dos hidrogênios em δ_{H} 5,76 e 6,79 (H-2 e H-3); 6,79 e 2,23 (H-3 e H-4); 6,26 e 5,68 (H-8 e H-9); 6,26 e 5,95 (H-8 e H-7); 5,95 e 5,24 (H-7 e H-6); 5,68 e 1,75 (H-9 e H-10); 5,45 e 3,12 (N-H e H-1'); 2,30 e 5,24 (H-5 e H-6); 3,12 e 1,77 (H-1' e H-2') e 1,77 e 0,90 (H-2' e H-3'/H-4'). E um acoplamento a longa distância em δ_{H} 5,76 e 2,23 (H-2 e H-4).

A análise do espectro de RMN 2D ^1H , ^{13}C -HMBC de SAFHEC-PICO 1 (Figura 14) permitiu confirmar a estrutura do espilantol, observando-se os acoplamentos a duas ligações de H-2 (δ_{H} 5,76) com C-1 (δ_{C} 166,2); H-3 (δ_{H} 6,79) com C-2 (δ_{C} 124,3) e C-4 (δ_{C} 32,3); H-4 (δ_{H} 2,23) com C-3 (δ_{C} 143,8) e C-5 (δ_{C} 26,6); H-5 (δ_{H} 2,30) com C-4 (δ_{C} 32,3) e C-6 (δ_{C} 127,8); H-6 (δ_{H} 5,24) com C-5 (δ_{C} 26,6); H-7 (δ_{H} 5,95) com C-8 (δ_{C} 126,9); H-8 (δ_{H} 6,26) com C-7 (δ_{C} 129,6); H-9 (δ_{H} 5,68) com C-10 (δ_{C} 18,5); H-10 (δ_{H} 1,75) com C-9 (δ_{C} 130,1); H-2' (δ_{H} 1,77) com C-1' (δ_{C} 47,0) e C-3'/C-4' (δ_{C} 20,3); e C-2' (δ_{C} 28,8) com H-3'/H-4' (δ_{H} 0,90) e H-1' (δ_{H} 3,12). Os acoplamentos a $^3J_{\text{CH}}$ presentes foram de H-2 (δ_{H} 5,76) com C-4 (δ_{C} 32,3); H-3 (δ_{H} 6,79) com C-1 (δ_{C} 166,2) e C-5 (δ_{C} 26,6); H-4 (δ_{H} 2,23) com C-2 (δ_{C} 124,3) e C-6 (δ_{C} 127,8); H-5 (δ_{H} 2,30) com C-3 (δ_{C} 143,8) e C-7 (δ_{C} 129,6); H-6 (δ_{H} 5,24) com C-4 (δ_{C} 32,3) e C-8 (δ_{C} 126,9); H-7 (δ_{H} 5,95) com C-5 (δ_{C} 26,6) e C-9 (δ_{C} 130,1); H-8 (δ_{H} 6,26) com C-10 (δ_{C} 18,5); H-9 (δ_{H} 5,68) com C-7 (δ_{C} 129,6); H-10 (δ_{H} 1,75) com C-8 (δ_{C} 126,9); H-1' (δ_{H} 3,12) com C-1 (δ_{C} 166,2) e C-3'/C-4' (δ_{C} 20,3); e H-3'/H-4' (δ_{H} 0,90) com C-1' (δ_{C} 47,0) (Figura 6).

Analisando os dados espectrais de massa, infravermelho e RMN, uni e bidimensionais (deslocamentos químicos, multiplicidade, integração dos sinais,

constantes de acoplamentos dos hidrogênios, correlações entre H-H e H-C) (Tabela 3) foi possível comprovar que SAFHEC PICO 1 tratava-se do epilantol.

Figura 6 - Estrutura do epilantol com setas mostrando as correlações à longa distância ^1H - ^{13}C , observadas no espectro bidimensional HMBC.

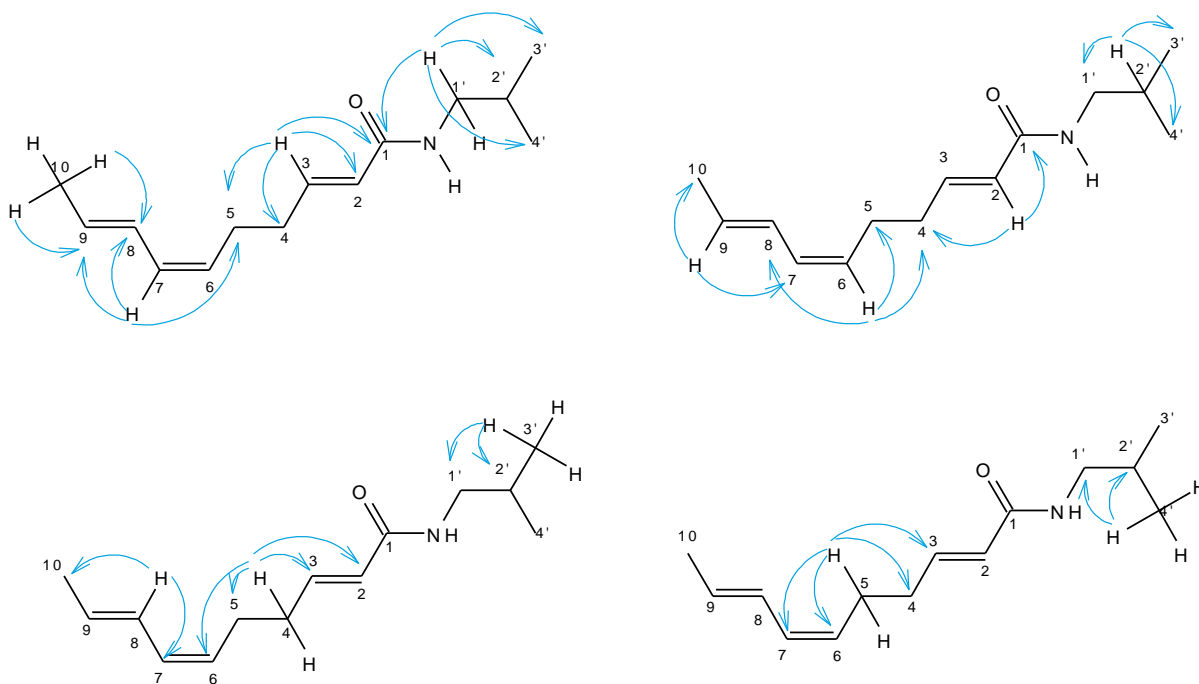


Figura 7 - Espectro de massa de alta resolução obtido no modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$ de SAFHEC PICO 1.

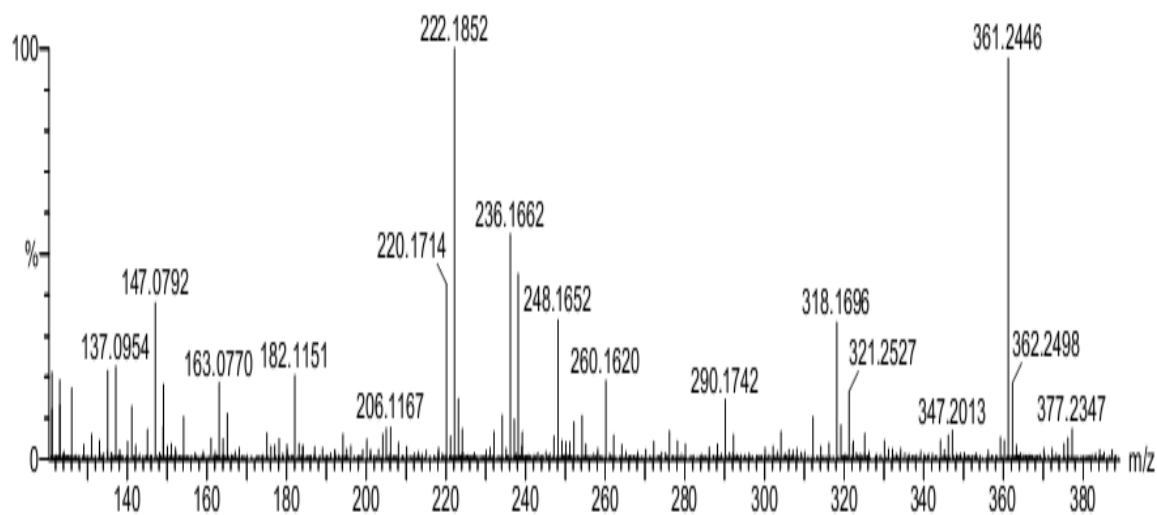


Figura 8 – Espectro de absorção na região do infravermelho de SAFHEC PICO 1.

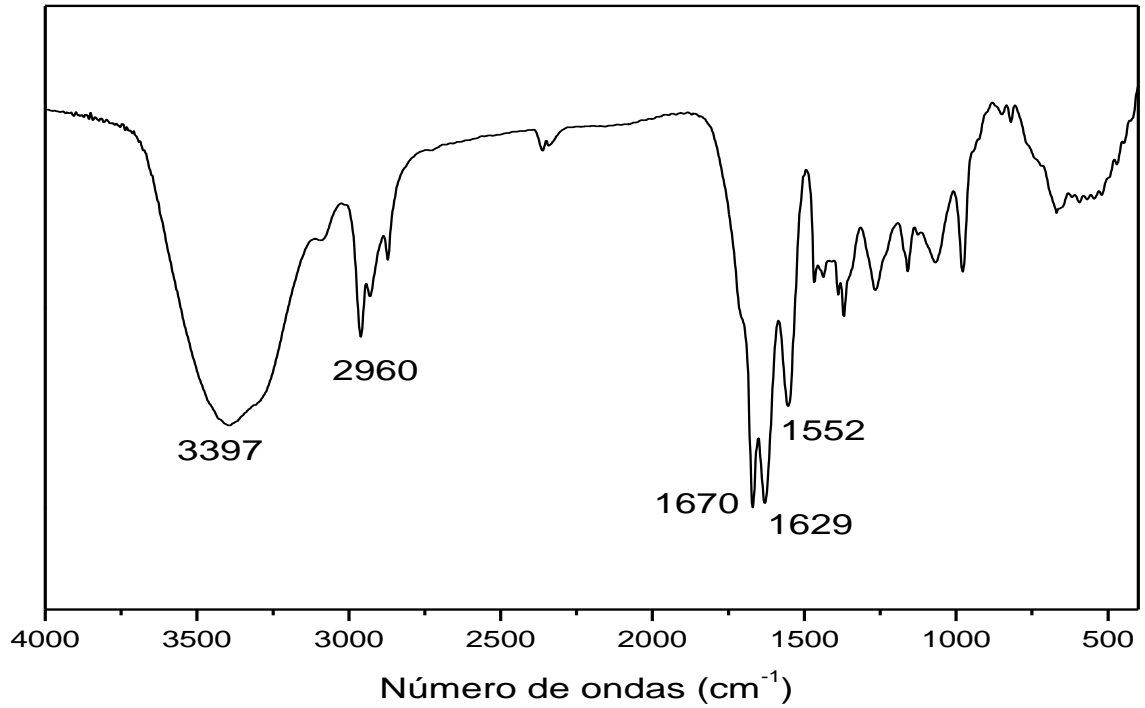


Figura 9 – Espectro de RMN ¹H de SAFHEC PICO 1 (CDCl₃, 600 MHz).

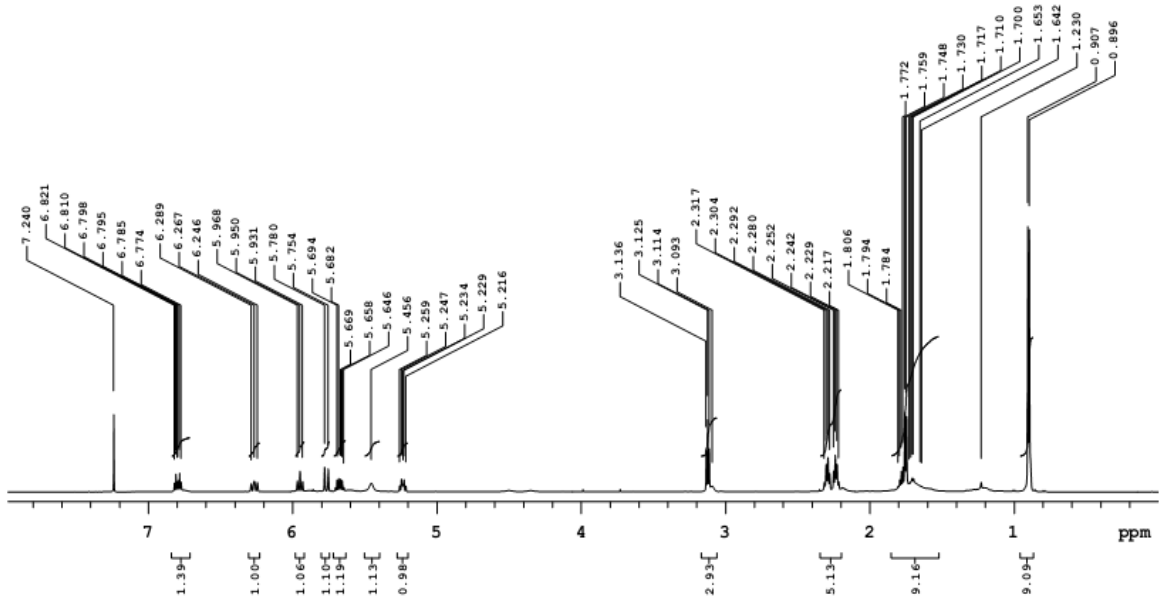


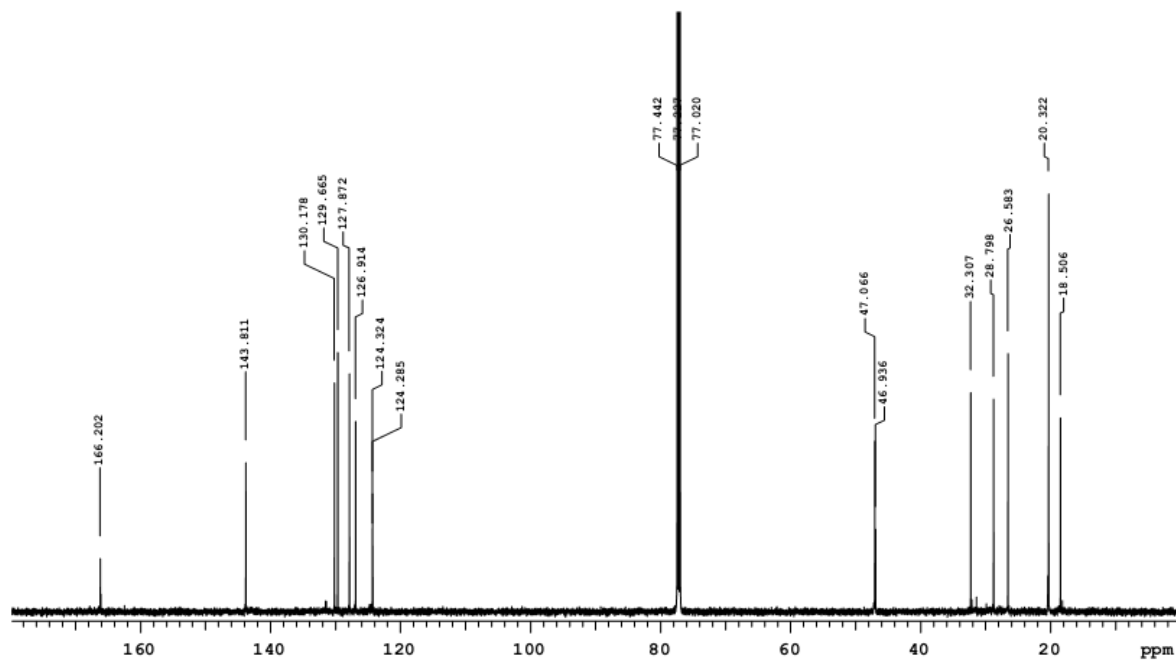
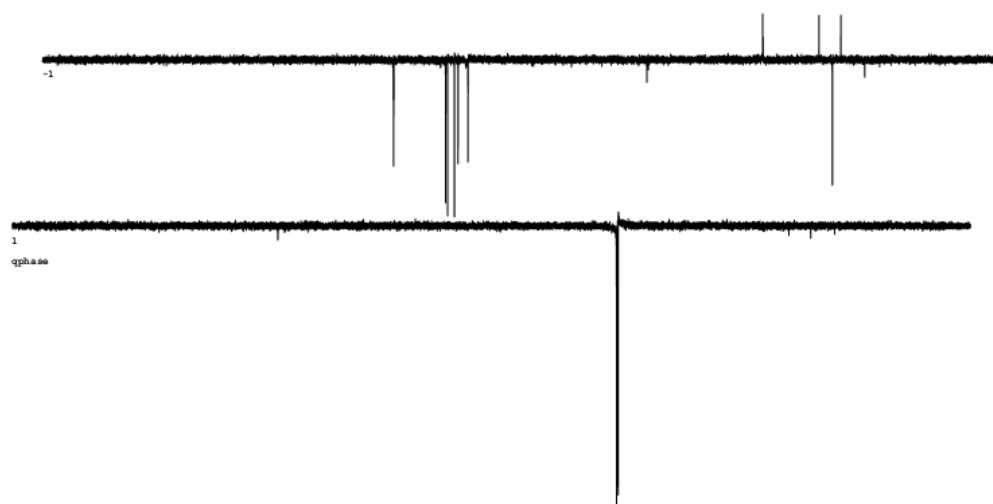
Figura 10 – Espectro de RMN ^{13}C de SAFHEC PICO 1 (CDCl_3 , 150 MHz).Figura 11 – Espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 de SAFHEC PICO 1 (CDCl_3 , 150 MHz).

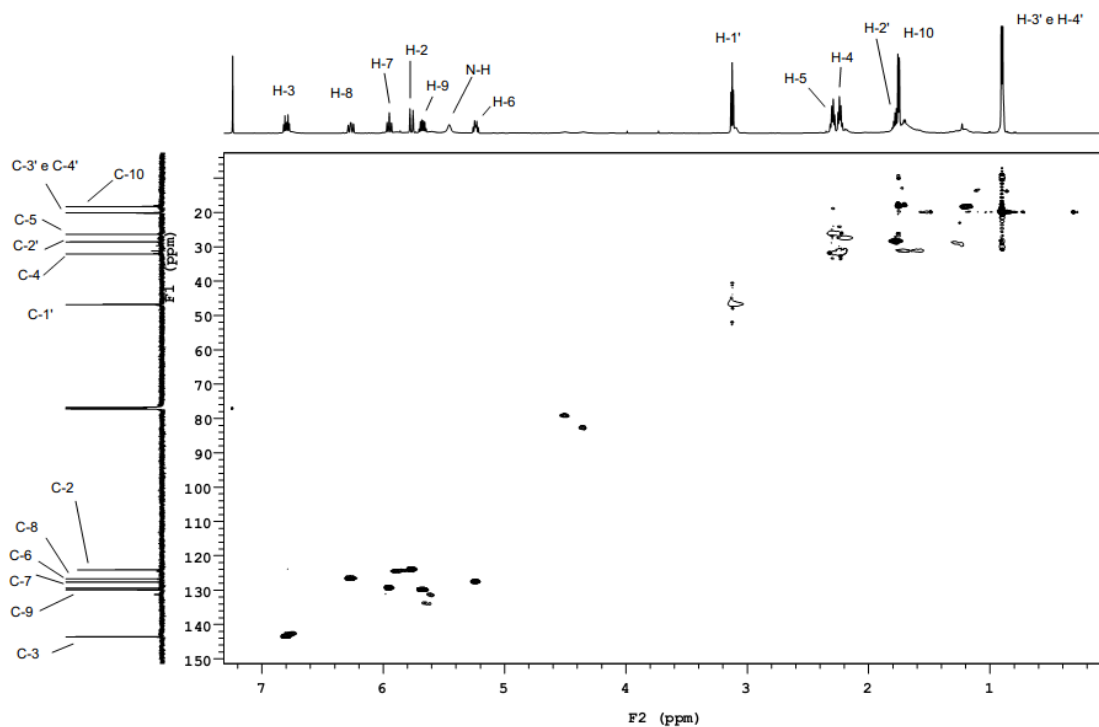
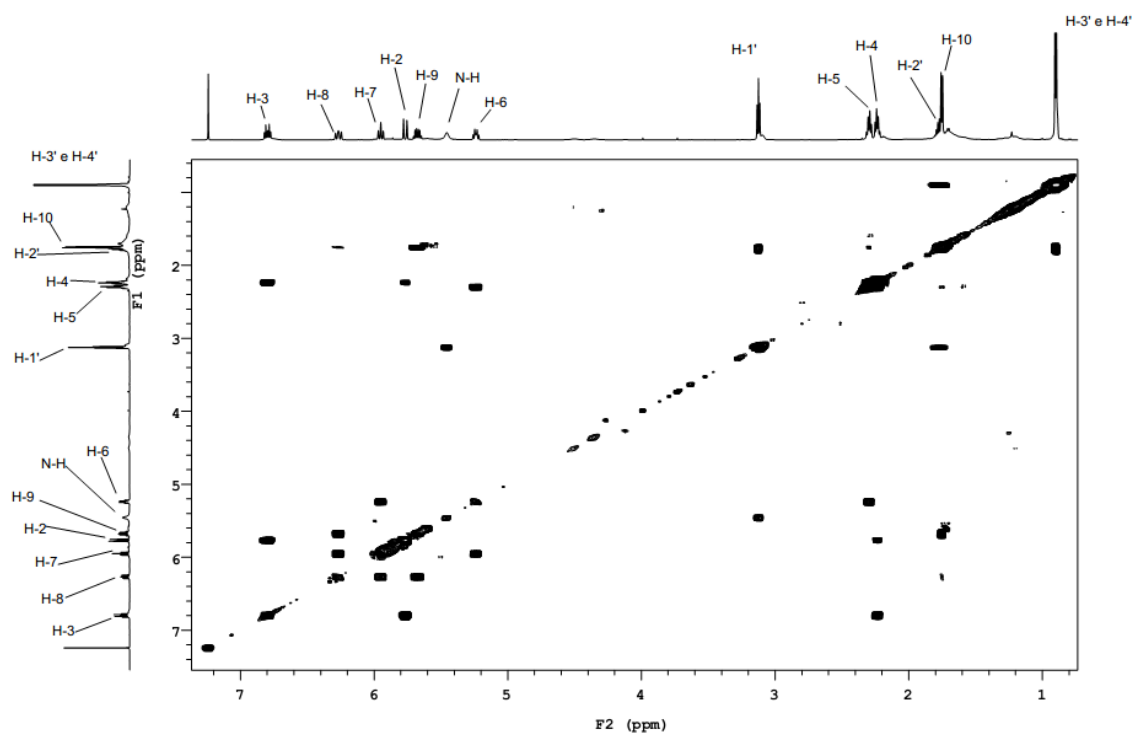
Figura 12 – Espectro de RMN 2D¹H,¹³C-HSQC de SAFHEC PICO 1 (CDCl₃, 600 x 150 MHz).Figura 13 – Espectro de RMN 2D¹H,¹H-COSY de SAFHEC PICO 1 (CDCl₃, 600 x 600 MHz).

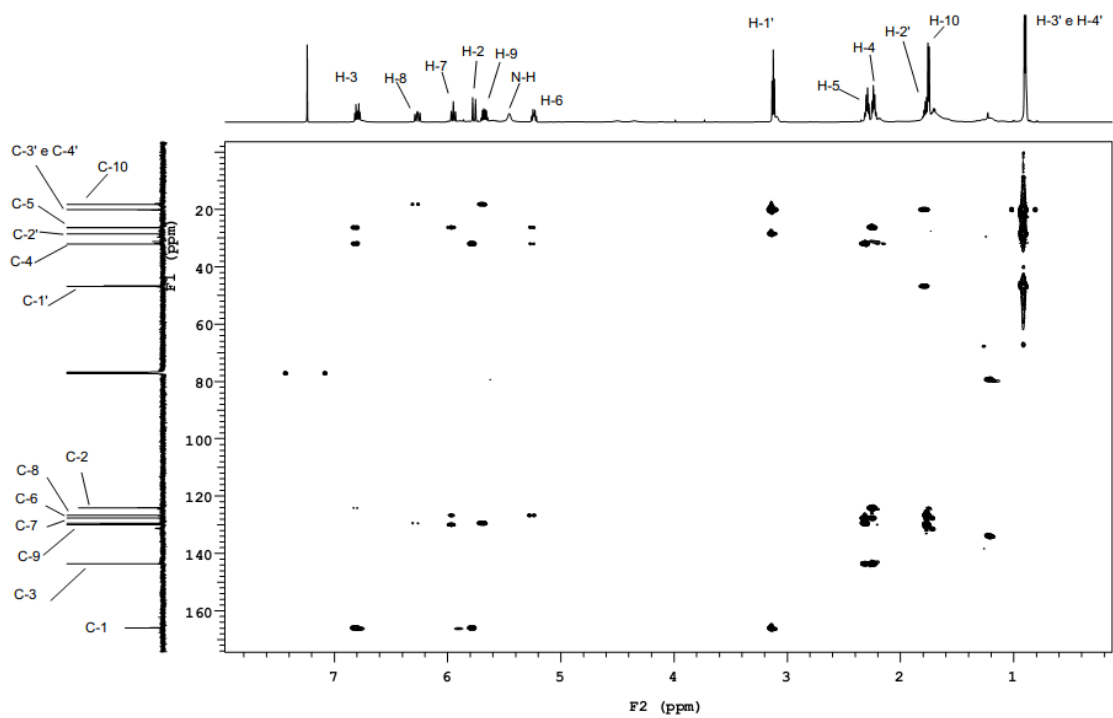
Figura 14 – Espectro de RMN 2D¹H,¹³C-HMBC de SAFHEC PICO 1 (CDCl₃, 600 x 150 MHz).

Tabela 3 – Dados de RMN 1D e 2D de ^1H e ^{13}C para SAFHEC PICO 1 (valores de δ em ppm, em CDCl_3 600x150 MHz) e comparação com os dados da literatura (* NAKATANI;NAGASHIMA, 1992/valores de δ em ppm, em CDCl_3 400x100 MHz).

Nº	HSQC				HMBC	
	δ_{C}	δ_{H} (mult, J, H)	δ_{C}^*	δ_{H} (mult, J, H)*	$^2J_{\text{C,H}}$	$^3J_{\text{C,H}}$
1	166,2	—	166,0	—	H-2	H-1', H-3
2	124,3	5,76 (d, 15,6 Hz, 1H)	124,2	5,79 (d, 15 Hz, 1H)	H-3	H-4
3	143,8	6,79 (dt, 6,6 e 15 Hz, 1H)	143,5	6,83 (dt, 15 e 7 Hz, 1H)	H-4	H-5
4	32,3	2,23 (q, 7,8 Hz, 2H)	32,1	2,23 – 2,35 (m, 2H)	H-5, H-3	H-6, H-2
5	26,6	2,30 (q, 7,2 Hz, 2H)	26,4	2,23 – 2,35 (m, 2H)	H-4, H-6	H-7, H-3
6	127,8	5,24 (dt, 7,2 e 10,8 Hz, 1H)	127,7	5,26 (dt, 11 e 7 Hz, 1H)	H-5	H-4
7	129,6	5,95 (dd, 10,8 e 11,4 Hz, 1H)	129,5	5,97 (dd, 11 e 11 Hz, 1H)	H-8	H-5, H-9
8	126,9	6,26 (dd, 13,2 e 12,6 Hz, 1H)	126,7	6,29 (dd, 11 e 15 Hz, 1H)	H-7	H-10, H-6
9	130,1	5,68 (dq, 6,6 e 14,4 Hz, 1H)	130,0	5,70 (dq, 15 e 7 Hz, 1H)	H-10	H-7
10	18,5	1,75 (d, 6,6 Hz, 3H)	18,3	1,78 (d, 7 Hz, 3H)	H-9	H-8
1'	47,0	3,12 (t, 6,6 Hz, 2H)	46,9	3,15 (dd, 7 e 6 Hz, 2H)	H-2'	H-3'/ H-4'
2'	28,8	1,77 (m, 7,2 Hz, 1H)	28,6	1,78 (m, 1H)	H-3'/ H-4', H-1'	—
3', 4'	20,3	0,90 (d, 6,6 Hz, 6H)	20,1	0,93 (d, 7Hz, 6H)	H-2'	H-1'
N-H	—	5,45(s, 1H)	—	5,47 (s, 1H)	—	—

5.CONCLUSÃO

O presente trabalho resultou na obtenção de um líquido amarelado, que através da análise dos métodos espectroscópicos e espectrométricos realizados (RMN uni e bidimensionais, CL- EM e espectroscopia na região do infravermelho) foi possível identificá-lo como espilantol.

Este trabalho permitiu a obtenção de espilantol, abrindo caminho para sua futura utilização em testes a serem desenvolvidos pela Embrapa para avaliar sua atividade carrapaticida, com o intuito de produzir carrapaticidas para rebanho bovino, que sejam menos tóxicos e que possuam a mesma ou maior eficiência que os carrapaticidas já utilizados.

REFERÊNCIAS

- ARAÚJO, A. G.; ANDRADE, A. P. P.; FERREIRA, L. B.; TAVEIRA, R. Z.; AMARAL, A. G.; SILVEIRA NETO, O. J. **Avaliação da suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a carrapaticidas em bovinos leiteiros na região do Oeste Goiano, Brasil.** *In: Semana do Curso de Zootecnia - SEZUS, 2013, São Luiz de Montes Belos. Anais...* São Luiz de Montes Belos: Universidade Estadual de Goiás, 2013. p. 10-12.
- BAE, S. S.; EHRMANN, B. M.; ETTEFAGH, K. A.; CECH, N. B. **A validated liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry method for quantification of spilanthol in *Spilanthes acmella*(L.) Murr.** *Phytochemical Analysis*, v. 21, p. 438-443, 2010.
- BOONEN, J.; BAERT, B. ; BURVENICH, C.; BLONDEEL, P.; DE SAEGER, S.; DE SPIEGELEER, B. **LC-MS profiling of N-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bio-active spilanthol.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 53, p. 243-249, 2010.
- CASTRO, K. N. C.; LIMA, D. F.; VASCONCELOS, L. C.; LEITE, J. R. S. A.; SANTOS, R. C.; PAZ NETO, A. A.; COSTA-JÚNIOR, L. M. **Acaricide activity in vitro of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus*.** *Parasitology Research*, v. 113, n. 10, p. 3697-3701, 2014.
- CAVALCANTI, V. M. S. **Extração de espilantol de *Spilanthes acmella* var *oleraceae* com dióxido de carbono supercrítico.** 2008. Tese (Doutorado em Química) - Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.
- CHAKRABORTY, A.; DEVI, R. K. B.; RITA, S.; SHARATCHANDRA, K. H.; SINGH, T. I. **Preliminary studies on antiinflammatory and analgesic activities of**

***Spilanthes acmella* in experimental animal models.** Indian Journal of Pharmacology, v. 36, n. 3, p. 148-150, 2004.

CHAKRABORTY, A.; DEVI, R. K. B.; SANJEBAM, R.; KHUMBONG, S.; THOKCHOM, I. S. **Preliminary studies on local anesthetic and antipyretic activities of *Spilanthes acmella* Murr. in experimental animals models.** Indian Journal of Pharmacology, v. 42, n. 5, p. 277-279, 2010.

CHENG, Y. B.; LIU, R. H.; HO, M. C.; WU, T. Y.; CHEN, C. Y.; LO, I. W.; HOU, M. F.; YUAN, S. S.; WU, Y. C.; CHANG, F. R. **Alkylamides of *Acmella oleracea*.** Molecules, v. 20, p. 6970-6977, 2015.

DI STATI, L. C., HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica.** 2. ed. São Paulo: UNESP, 2002. 604p.

DUBEY, S.; MAITY, S.; SINGH, M.; SARAF, S. A.; SAHA, S. **Phytochemistry, pharmacology and toxicology of *Spilanthes acmella*: a review.** Advances in Pharmacological Sciences, v.2013, p. 1-9, 2013.

EKANEM, A. P.; WANG, M.; SIMOM, J. E.; MORENO, D. A. **Antiobesity properties of two African plants (*Afromomum meleguetta* and *Spilanthes acmella* by pancreatic lipase inhibition.** Phytotherapy Research, v. 21, n. 12, p. 1253-1255, 2007.

GERBER, E. **Archives of Pharmacy,** 241-270, 1903.

HIND, N.; BIGGS, N. ***Acmella oleracea*: Compositae.** Curti's Botanical Magazine, v. 20, n. 1, p. 31-39, 2003.

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

LEY, J. P.; KRAMMER, G.; LOOFT, J.; REINDERS, G.; BERTRAM, H. J. **Structure activity relationships of trigeminal effects for artificial and naturally occurring alkamides related to spilanthol**. Flavour Science: Recent Advances and Trends, p. 21-24, 2006.

MOLINATORRES, J.; SALGADO-GARCIGLIA, R.; RAMIREZ-CHAVEZ, E; DEL RIO, R. E. **Purely olefinic alkamides in *Heliopsis longipes* and *Acmella (Spilanthus) oppositifolia***. Biochemical Systematics and Ecology, v. 24, n.1, p. 43-47, 1996.

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 Management Science, 2011.

MORENO, S.C **Bioactivity of neotropical plant compounds to agricultural and vegetable pest and selectivity to non-target insects**. 2011. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) - Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Entomologia, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

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

PASTORELLO, T. **Tem veneno na pecuária? Riscos associados ao uso de carrapaticidas na pecuária leiteira**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente) – Escola Nacional de Saúde Pública Sergio Arouca, Rio de Janeiro, 2010.

PHRUTIVORAPONGKUL, A.; CHAIWON, A.; VEJABHIKUL, S.; NETISINGHA, W.; CHANSAKAOW, S. **An anesthetic alkalamide and fixed oil from *Acmella oleracea***. Journal of Health Research, v. 22, n. 2, p. 97-99, 2008.

RAMSEWAK, R. S.; ERICKSON, A. J. **Bioactive N-isobutylamides from flower buds of *Spilanthes acmella***. Phytochemistry, v. 26, n. 51, p. 729-732, 1999.

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

RÍOS, M. Y. **Natural alkalamides: pharmacology, chemistry and distribution**. Drug Discovery Research in Pharmacognosy, c. 6, p. 107-144, 2012.

SANA, H.; RANI, A. S.; SULAKSHANA, G. **Determination of antioxidant potential in *Spilanthes acmella* using DPPH assay**. International Journal of Current Microbiology and Applied Science, v. 3, n. 7, p. 219-223, 2014.

SANTOS, D. S. **Desenvolvimento de método por CLAE-DAD para determinação de espilantol em *Spilanthes acmella* (L.) Murray**. 2010. Dissertação (Mestrado em Química) – Núcleo de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Sergipe, São Cristovão, 2010.

SARAF, D. K.; DIXIT, V. K. ***Spilanthes acmella* Murr.: study on its extract spilanthol as larvicidal compound**. Asian Journal of Experimental Sciences, v. 16, n. 1 and 2, p. 9-19, 2002.

TORRES, J. M.; CHÁVEZ, A. G. **Alcámidas em plantas: distribución e importancia**. Avance y Perspectiva, v. 20, p. 377-387, 2001.

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 LPS-induced inflammatory mediators.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 56, n. 7, p. 2341-2349, 2008.