



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E
ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ANA PAULA DE SOUZA E SILVA

AVALIAÇÃO DO TEOR DE ESPILANTOL NO CICLO DE CULTURA DE DUAS
CULTIVARES DE *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen EM EXTRATOS OBTIDOS
POR EXTRAÇÃO SUPERCRTICA

BELÉM – PARÁ
2018

ANA PAULA DE SOUZA E SILVA

**AVALIAÇÃO DO TEOR DE ESPILANTOL NO CICLO DE CULTURA DE DUAS
CULTIVARES DE *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen EM EXTRATOS OBTIDOS
POR EXTRAÇÃO SUPERCRTICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, Instituto de Tecnologia, para obtenção do título de Mestre em Ciência, Tecnologia e Engenharia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Gracialda Costa Ferreira.

BELÉM - PA

2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD Sistema de Bibliotecas da
Universidade Federal do Pará Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)**

D278a De Souza e Silva, Ana Paula.
AVALIAÇÃO DO TEOR DE ESPILANTOL NO CICLO DE CULTURA DE DUAS CULTIVARES
DE *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen EM EXTRATOS OBTIDOS POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA /
Ana Paula De Souza e Silva. — 2018.
61 f. : il. color.

Orientador(a): Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior
Coorientação: Profª. Dra. Gracialda Costa Ferreira
Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto
de Tecnologia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2018.

1. *Acmella oleracea* . 2. Jambu. 3. Extração supercrítica. 4. Espilantol. I. Título.

CDD 620

ANA PAULA DE SOUZA E SILVA

**AVALIAÇÃO DO TEOR DE ESPILANTOL NO CICLO DE CULTURA DE DUAS
CULTIVARES DE *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen EM EXTRATOS OBTIDOS
POR EXTRAÇÃO SUPERCRÍTICA**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Orientador)

Prof^a. Dr^a Gracialda Costa Ferreira
(UFRA- Co-orientadora)

Prof^a. Dr^a. Geormenny Rocha dos Santos
(PPGCTA/ITEC/UFPA – Membro Interno)

Prof. Dr. José Carlos de Araújo Cardoso Filho
(ITEC/UFPA – Membro Externo)

Prof^a. Dr^a. Alessandra Santos Lopes
(FEA/ITEC/UFPA – Suplente interno)

Prof. Dr^a. Silvia Helena Marques da Silva
(INSTITUTO EVANDRO CHAGAS – Suplente externo)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fortalecer todos os dias.

A minha família por sempre me incentivar.

Aos meus pais Antonio e Ester e minha irmã Jamilly pelos ensinamentos, pela paciência, incentivo constante, apoio irrestrito em todos os momentos inclusive os mais difíceis e por todo amor dedicado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Raul Nunes de Carvalho Junior, pela valiosa orientação, contribuição, incentivo e pelos inúmeros ensinamentos. E principalmente por acreditar no meu trabalho.

A minha Co-orientadora, Prof^a Dr^a Gracialda Costa Ferreira, pelos ensinamentos, paciência e valiosa contribuição.

Aos funcionários, professores e alunos do Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Engenharia de Alimentos, pela ajuda durante os anos de mestrado.

A Prof^a Dr^a. Maria Grings pelo fornecimento das amostras de jambu.

A Prof^a Dr^a Geormenny Rocha dos Santos e Prof. Dr. José Carlos de Araújo Cardoso Filho pela participação em minha banca examinadora e pelas contribuições para a realização deste trabalho.

A CAPES pelo auxílio financeiro.

Aos amigos do Labex, em especial ao Marcos Almeida (*in memoriam*), por sempre estarem dispostos a ajudar uns aos outros, compartilhando de conhecimento, incentivo e momentos de alegria.

RESUMO

A *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen é uma espécie nativa da América do Sul, popularmente conhecida como jambu, e que tem sido consumida durante muitos anos como planta ornamental, medicinal e alimentícia. Para obtenção do espilantol, principal composto bioativo desta espécie, diversas técnicas de extração vêm sendo utilizadas no intuito de se obter a substância isolada de maneira otimizada, uma vez que não o encontra-se disponível comercialmente. Dentre as técnicas, a extração com dióxido de carbono supercrítico destaca-se, uma vez que mostrou alta seletividade para o espilantol, apresentando rendimento acima de 50% da substância no extrato e resultando em uma pureza acima de 90% do composto isolado. O objetivo deste trabalho foi avaliar a influência da pluviosidade e tempo de colheita no rendimento de extração de espilantol com CO₂ supercrítico, em duas cultivares de *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen, bem como avaliar o efeito farmacológico dos extratos. Para isso, foram feitos os seguintes procedimentos: caracterização da matéria-prima; otimização das variáveis do processo (vazão e tempo); obtenção dos extratos por extração supercrítica; determinação do custo do processo em escala analítica; determinação da concentração de compostos fenólicos totais dos extratos por Folin-Ciocalteu; quantificação do teor de espilantol nos extratos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, e avaliação de sua atividade antinociceptiva in vivo. Os principais resultados foram: a análise mineral indicou altos teores de ferro, cálcio, zinco e magnésio; a otimização do processo resultou na diminuição do gasto de CO₂ de 955,8g para 477,9g e diminuição do custo de extração R\$20,47 para R\$11,45. O maior teor de espilantol foi de 29,22%, enquanto o maior teor de fenólicos foi 43,04%. As flores das duas cultivares de *Acmella oleracea* foram consideradas boas fontes de ferro, cálcio, zinco e magnésio. Os maiores valores de rendimento de extrato, teor de espilantol e fenólicos totais foram obtidos na estação chuvosa e nos menores tempos de colheita. Entre as duas cultivares avaliadas, não foram encontradas diferenças estatísticas significativas. O teste de atividade antinociceptiva demonstrou que para a dose de 300mg/kg o percentual de inibição foi tão eficaz quanto à indometacina, que é o fármaco padrão.

Palavras-chave: *Acmella oleracea*. Jambu. Extração Supercrítica. Espilantol. Atividade Antinociceptiva.

ABSTRACT

Acmella oleracea (L.) R. K. Jansen is a species native to South America, popularly known as jambu, and has been consumed for many years as an ornamental, medicinal, and food plant. To obtain espilantol, the main bioactive compound of this species, various extraction techniques have been used in order to obtain the isolated substance, since it is not commercially available. Among the techniques, supercritical carbon dioxide extraction stands out as it showed high selectivity for espilantol, with yields above 50%, resulting in a purity above 90% of the isolated compound. The objective of this work was to evaluate the influence of rainfall and harvest time on the yield of spilanthal with supercritical CO₂ in two cultivars of *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen flowers, as well as to evaluate their pharmacological effect. For this purpose, the following procedures were performed: raw material characterization; optimization of the process variables (flow and time); obtaining of extracts by supercritical extraction; determining of the process cost on an analytical scale; determination of the total phenolic compounds concentration in the extracts by Folin-Ciocalteu method; spilanthal content quantification in the extracts by gas chromatography coupled to mass spectrometry, and evaluation of its antinociceptive *in vivo* activity. The main results were: the mineral analysis indicated high levels of iron, calcium, zinc, and magnesium; the process optimization resulted in a CO₂ use decrease from 955,8g to 477,9g, and reduced extraction costs from R\$ 20.47 to R\$ 11.45. The higher espilantol content was 29.22%, while the highest phenolic content was 43.04%. The flowers of both *Acmella oleracea* cultivars were considered good sources of iron, calcium, zinc, and magnesium. The highest values of extract yield, spilanthal content and total phenolic compounds were obtained in the rainy season and in the shortest harvest times. Between the two cultivars evaluated, no significant statistical differences were found.

Key words: *Acmella oleracea*. Jambu. Supercritical Extraction. Spilanthal. Antinociceptive activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Classificação taxonômica de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. Jansen	4
Figura 2 – Detalhes das estruturas vegetativa e reprodutivas de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen a) raiz da cultivar jamburana, b) raiz da cultivar nazaré, c) caule da cultivar jamburana d) caule da cultivar nazaré, e) inflorescência cultivar jamburana f) inflorescência cultivar nazaré, g) folha cultivar jamburana, h) folha cultivar nazaré.....	6
Figura 3 – Plantas de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. Jansen em fase de floração. Cultivares (a) nazaré e (b) jamburana	7
Figura 4 - Estrutura da Anandamina (<i>N</i> -arachidonoylethanolamine)	10
Figura 5 - Estrutura do espilantol	11
Figura 6 - Estrutura do homoespilantol	12
Figura 7 - Diagrama de fases P-T de uma substância pura	15
Figura 8 - Diagrama de fluxo de atividades deste trabalho	18
Figura 9 - Ilustração da célula de extração com leito empacotado.....	23
Figura 10 - Representação esquemática da unidade de extração supercrítica.....	23
Figura 11 - Efeito do extrato de <i>Acmella oleracea</i> e Indometacina sobre o estímulo nociceptivo induzido pelo ácido acético 1% em camundongos	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de concentração na composição nutricional de 100g de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen.....	9
Tabela 2 - Propriedades físicas do espilantol	11
Tabela 3 - Atividades bioativas de <i>Acmella oleracea</i>	13
Tabela 4 - Valores de propriedades características de gases, líquidos e fluidos supercríticos.	16
Tabela 5 - Relação das amostras incluindo estação de cultivo, tempo de desenvolvimento e cultivares utilizadas de <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. Jansen	19
Tabela 6 - Parâmetros operacionais utilizados no espectrômetro de absorção atômica de chama.	21
Tabela 7 - Rendimento de biomassa de cultivo de jambu	28
Tabela 8 - Valores médios e desvio padrão da composição centesimal de inflorescências de jambu desidratado.....	29
Tabela 9 - Valores da composição de minerais de flores de jambu.....	30
Tabela 10 - Custo de obtenção, preparo e armazenamento de matéria-prima.....	31
Tabela 11 - Custo de extração	32
Tabela 12 - Valores médios de rendimentos globais, teor de espilantol e compostos fenólicos totais de extratos obtidos por extração supercrítica.....	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Geral	3
2.2 Específicos.....	3
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1 <i>Acmella oleracea</i> (L.) R. K. Jansen.....	4
3.1.1 Classificação taxonômica, descrição botânica e características morfológicas	4
3.1.2 Cultivo e métodos de propagação.....	6
3.2 Composição química e aspectos nutricionais	8
3.1.2 Espilantol	11
3.3 Aplicações	12
3.4 Métodos de extração e obtenção do espilantol	14
3.5 Processo de extração supercrítica	14
3.5.1 Descrição geral	14
3.5.2 Parâmetros do processo	16
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
4.1 Matéria-prima	19
4.1.1 Secagem, moagem e granulometria.....	20
4.1.2 Determinação da umidade	20
4.1.3 Composição nutricional e mineral.....	20
4.1.4 Determinação da densidade real, densidade aparente e porosidade do leito	21
4.2 Extração supercrítica	22
4.2.3 Determinação do fluxo de solvente	24
4.2.4 Determinação dos rendimentos globais.....	24
4.2.5 Avaliação do custo do processo em escala analítica	25
4.3 Análise dos extratos.....	25

4.3.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais	25
4.3.3 Quantificação do teor de espilantol por CG-MS	25
4.4 Atividade farmacológica	26
4.4.1 Animais.....	26
4.4.2 Atividade antinociceptiva	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1 Cultivo, caracterização da matéria-prima e do leito de extração.....	28
5.2 Composição nutricional e mineral	28
5.3 Extração supercrítica	30
5.3.1 Determinação do fluxo de solvente	30
5.3.2 Determinação do custo do processo	31
5.3.2 Rendimentos globais de extração	32
5.4 Análise dos extratos.....	33
5.4.1 Teor de espilantol por Cromatografia Gasosa	33
5.4.2 Análise de Compostos Fenólicos Totais (CFT).....	34
5.5 Atividade antinociceptiva.....	35
6 CONCLUSÕES.....	37
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	38
8 LISTA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O MESTRADO	39
8.1 Artigos publicados em periódicos	39
8.2 Artigos submetidos para publicação em periódicos	39
8.3 Capítulos de livros publicados.....	39
8.4 Trabalhos completos publicados em anais de congressos	40
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

Acmella é um gênero botânico da família Compositae ou Asteraceae composto por aproximadamente 60 espécies existentes em regiões de clima tropical como América, África e Índia. *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen, uma espécie nativa da América do Sul e de grande ocorrência na Amazônia. Popularmente conhecida como jambu, jambuaçú, jamburana, agrião-bravo, agrião-do-pará e agrião-do-brasil. É cultivada ao longo do ano possuindo ciclo de 50 a 90 dias dependendo da região. Além disso, é classificada como herbácea C₃, fortemente ramificada e atinge no máximo 50 centímetros de altura (CHUNG et. al., 2008; SAHU et al., 2011; TIWARI et. al., 2011; WONGSAWATKUL et al., 2008).

Acmella oleracea tem sido consumida durante muitos anos como planta ornamental, medicinal e alimentícia. Na culinária brasileira é utilizada como tempero na composição de saladas, sopas e pratos típicos tradicionais (DIAS et. al., 2012), como legumes frescos (TIWARI et. al., 2011) e ainda como tempero em aperitivo japonês (LENG et. al., 2011). Suas flores e folhas possuem gosto pungente, que causam sensação de salivação, dormência e formigamento (HIND, N. & BIGGS, N. 2003; JIROVETZ et. al., 2006). O uso de *Acmella oleracea* na medicina popular tem sido reportado mundialmente em diversas publicações etnofarmacológicas. A decocção é utilizada como laxante e diurético (BUNYAPRAPHATSARA & CHOKECHAREUNPORN, 1999; PERRY & METZGER, 1980). A mastigação da planta é feita para aliviar a dor de dente e doenças nas gengivas e garganta (JIROVETZ et. al., 2006). Outras doenças como reumatismo, febre, hemorroidas, asma e dor de garganta também costumam ser tratadas através do uso popular da *Acmella oleracea* (BUNYAPRAPHATSARA & CHOKECHAREUNPORN, 1999; CHOPRA et. al., 1956; FARNSWORTH & BUNYAPRAPHATSARA, 1992).

Nas últimas décadas, o número de publicações sobre aplicações de *Acmella oleracea* na é crescente, e com propósito de validar o uso etnofarmacológico dessa espécie, essas publicações demonstram que os extratos têm formulações e componentes bioativos com uma vasta gama de aplicações potenciais para as indústrias cosmética, farmacêutica e alimentícia (SILVEIRA et. al., 2018). Diversos estudos descrevem a composição química de extratos obtidos por diferentes métodos, bem como avaliam as possíveis aplicações que os extratos podem ter. Várias classes de compostos bioativos foram identificados, isolados e caracterizados em *Acmella oleracea*, entre eles estão as alcaloides, esteroides, flavonoides e ésteres (KRISHNASWAMY & PRASANNA, 1975; MUKHARYA & ANSARI, 1987; GREGER, 1988). O trabalho inicial encontrou entre as N-alquilamidas, o Spilanthol (como affina ou

deca-2E, 6Z, 8E-trienoato de isobutilamida) como principal componente de característica anfipática (GERBER, 1903).

Estudos com extratos de *Acmella oleracea* apresentaram atividade analgésica, antipirética e anti-inflamatória e essas atividades podem ser atribuídas aos flavonóides e β -sitosterol (SARAVONGVIVAD E SUPAVILAI, 1977; NAIR et al., 2012; D'ARMOUR & SMITH, 1941; CHAKRABORTY et. al., 2004; JYOTHI et. al., 2008; RATNASOORIYA & PIERIS, 2005; SADAVONGVIVAD & SUPAVILAI, 1977; NAIR et. al., 2012). Além dessas atividades, outras também foram investigadas, tais como atividade diurética (RATNASOORIYA et. al., 2004), atividade acaricida (CASTRO et. al., 2014), atividade vasorelaxante e antioxidante (WONGSAWATKUL et. al., 2008), atividades larvicida e ovicida (SARAF & DIXIT, 2002; PITASAWAT et. al., 1998) e efeito neuroprotetor (WILASINEE et. al., 2017).

Para obtenção do composto bioativo espilantol, diversas técnicas de extração vem sendo utilizadas no intuito de se obter a substância isolada de maneira otimizada, uma vez que não o encontra-se disponível comercialmente. O método de extração e solventes empregados no processo influenciam no rendimento e seletividade de espilantol. A utilização de dióxido de carbono supercrítico mostrou alta seletividade para o espilantol, apresentando rendimento de 65% da substância no extrato e resultando em uma pureza acima de 90% do composto isolado (DIAS et.al, 2012). Portanto, a utilização da técnica de extração com fluido supercrítico mostra-se como alternativa promissora para obtenção de extratos concentrados ou ainda do espilantol isolado, por ser uma tecnologia limpa, que não apresenta resíduos tóxicos no final do processo, permitindo ainda a recuperação do solvente. Desta forma, optou-se pela utilização da extração com fluido supercrítico, considerando-se a necessidade de consolidação do processo de obtenção de espilantol, aliado às vantagens que a extração com fluido supercrítico apresenta na obtenção desse composto (CAVALCANTI, 2008; DIAS et.al., 2017).

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a influência da pluviosidade e tempo de colheita no rendimento de extração de espilantol com CO₂ supercrítico, em duas cultivares de *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen, bem como avaliar o efeito farmacológico dos extratos.

2.2 Específicos

- Obtenção, preparo e caracterização da matéria-prima;
- Otimizar as variáveis do processo (vazão e tempo);
- Obter os extratos por extração supercrítica;
- Determinar o custo do processo em escala analítica;
- Determinar a concentração de compostos fenólicos totais dos extratos;
- Quantificar o teor de espilantol nos extratos;
- Avaliar a atividade antinociceptiva *in vivo*;

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen

3.1.1 Classificação taxonômica, descrição botânica e características morfológicas

A figura 1 apresenta a classificação taxonômica da espécie *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen.



Figura 1 – Classificação taxonômica de *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen
Fonte: Autoria própria

Acmella oleracea (L.) R. K. Jansen é uma planta medicinal originária da América do Sul, de ocorrência nas regiões norte, nordeste, sul e sudeste do Brasil, sendo também distribuída na Índia, Malásia, África Central e Ocidental e no norte da Austrália (JANSEN, 1981; RAMSEWAK et. al., 1999; MAHENDRA et. al., 2001; YADAV & SINGH, 2010). Possui como sinonímia botânica relevante *Spilanthes oleracea* L. e é popularmente conhecida no Brasil como jambu, jambuaçú, jamburana, agrião-bravo, agrião-do-pará e agrião-do-brasil. Em inglês, a erva é frequentemente mencionada como “toothache plant” (planta da dor de dente) (MORENO et. al., 2011; DI STASI, 2002).

O jambu é uma planta herbácea anual do tipo C₃, considerada perene, fortemente ramificada, semiereta ou quase rasteira, e se multiplica tanto por sementes como por hastes enraizadas, chegando a atingir entre 32 a 60 cm de altura. Possui raiz pivotante com numerosas ramificações laterais e raízes adventícias no caule e nos ramos que entram em contato com o solo (VILLACHICA et. al., 1996; LORENZI & MATOS, 2002; SAVADI, et. al., 2010).

O caule é cilíndrico, rastejante e ramificado em dicásio. Apresenta pigmentação verde ou verde arroxeadada. Em seu crescimento inicial, os ramos são tenros e tornam-se lignificados com o envelhecimento da planta. Suas folhas são simples, opostas, membranáceas, alongadas, pecioladas, com pecíolos achatados de 10 a 20 mm de comprimento. O limbo geralmente apresenta contorno foliar oval de 40-79 mm de largura e 53-106 mm de comprimento. A borda do limbo é dentada com ápice agudo. A coloração varia do verde escuro ao verde claro, ou ainda verde arroxeadado dependendo da variedade ou cultivar (HIND & BIGGS, 2003; CHUNG et. al., 2008; GUSMÃO & GUSMÃO, 2013).

As inflorescências são isoladas, dispostas em capítulos globosos axilares ou terminais longo pedunculados. Os pedúnculos apresentam entre 3,5-12,5 mm de comprimento. Os capítulos apresentam entre 10,5-23,5 mm de altura e 11-17 mm de diâmetro. As flores são hermafroditas e seu tubo da corola apresenta coloração amarela ou alaranjada, podendo apresentar variação para o arroxeadado na região mais apical do capítulo (REVILLA, 2001; LORENZI & MATOS, 2002; FERREIRA et. al., 2009).

Os frutos são aquênios e atingem cerca de 2 mm de comprimento, com pericarpo negro ou cinza escuro, e cercado parcialmente pelas páleas membranosas e brácteas secas. Com a formação dos aquênios, os capítulos tornam-se ressequidos a partir da base, passando a apresentar tonalidade creme e indicando o início do período de coleta de sementes, que se dá ao final do período de secagem das inflorescências. A figura 2 apresenta alguns dos aspectos morfológicos do jambu, descritos anteriormente e observados nas cultivares estudadas neste trabalho (HIND & BIGGS, 2003; GUSMÃO & GUSMÃO, 2013).

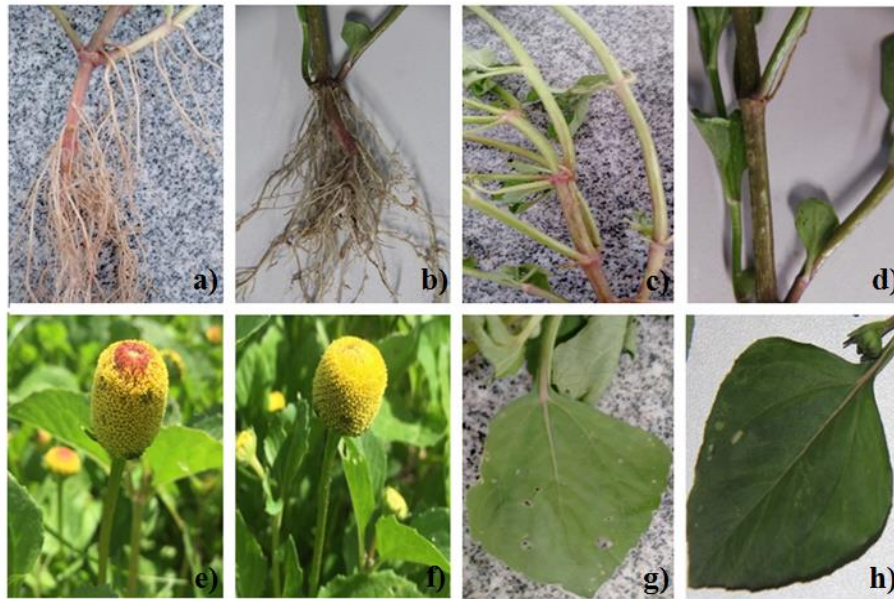


Figura 2 – Detalhes das estruturas vegetativa e reprodutivas de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen a) raiz da cultivar jamburana, b) raiz da cultivar nazaré, c) caule da cultivar jamburana d) caule da cultivar nazaré, e) inflorescência cultivar jamburana f) inflorescência cultivar nazaré, g) folha cultivar jamburana, h) folha cultivar nazaré.

Fonte: Autoria própria

3.1.2 Cultivo e métodos de propagação

Acmella oleracea (L.) R. K. Jansen pode ser encontrada em seu estado selvagem em regiões de temperatura e umidade elevadas, podendo se desenvolver também em locais com radiação direta reduzida ou em florestas secundárias e margens de lagos. Para o melhor desenvolvimento do cultivo do jambu, recomendam-se temperaturas entre 25°C e 35°C, porém, relatos de cultivos em condições de temperatura entre 15°C e 35°C, indicaram não alterar significativamente as características da planta. Temperaturas superiores à faixa de 34°C e 38°C diminuem o percentual de germinação (VILLACHICA et. al., 1996; RAMSEWAK et. al., 1999; GUSMÃO & GUSMÃO, 2013).

Nos ambientes de ocorrência natural do jambu, observam-se meios parcialmente sombreados. Entretanto, pesquisas evidenciam que o cultivo da planta na faixa equatorial a pleno sol, apresenta desempenho agrônômico mais acelerado, como maior quantidade de folhas, por exemplo. O jambu é intensamente adaptado a regiões com elevada umidade relativa tanto do ar quanto do solo, apresentando melhor desempenho em percentuais de umidade superiores a 80%. Nas regiões próximas da Cidade de Belém, onde se registra cultivo intenso de jambu, a temperatura média anual é de aproximadamente 27,2°C, com pluviosidade média

de 2.537 mm/ano e umidade relativa do ar de 86%. Tais características climáticas favorecem o cultivo da planta em qualquer época do ano. Quanto as características do solo, grande parte dos cultivares ocorrem em solos areno-argilosos e ricos em matéria orgânica, sendo os de várzea não inundáveis ou ainda os solos ácidos também toleráveis ao cultivo (VILLACHICA et. al., 1996; SAWAKI, 2000; HIND & BIGGS, 2003). A figura 3 apresenta o cultivo de duas cultivares de jambu.



Figura 3 – Plantas de *Acemella oleracea* (L.) R. K. Jansen em fase de floração. Cultivares (a) nazaré e (b) jamburana
Fonte: autoria própria

A cultura do jambu possui ciclo de aproximadamente 45-70 dias e período de germinação de 5-7 dias, exigindo pouca tecnologia de manuseio. Pode ser propagado por sementes ou sexuada e por hastes enraizadas, sendo a propagação sexuada a mais usual. A utilização de tal método apresenta alguns riscos fitossanitários que comprometem a produção e a qualidade da planta. Pragas e doenças como lagartas, formigas, paquinhas, moscas, pulgões e fungos são alguns patógenos que podem causar danos ao cultivo da planta, mesmo aos tipos selvagens (COUTINHO et. al., 2006; GUSMÃO et. al., 2006).

Com finalidade de se conservar a espécie de maneira segura, ou ainda de se multiplicar as plantas em larga escala, estudos sobre micropropagação de *Acemella oleracea* tem sido reportados na literatura, a fim de se aperfeiçoar ou desenvolver métodos de micropropagação em meios de cultura livres de doenças e pragas e com altas taxas de multiplicação. *A. oleracea* foi micropropagada através da folha, broto axilar e ponta do tiro, apresentando sucesso nos resultados. O cultivo *in vitro* através da folha explantes foliares com formação máxima de calo em 2, 4-D na concentração de 6,78 μ M/litro, com caule verde-amarelado. A micropropagação

utilizando brotos axilares como explantes apresentaram múltiplos brotos em cinco semanas. Quando se utilizou pontas de brotação e segmentos nodais como explantes para proliferação de pinos múltiplos, obteve-se multiplicação máxima de 7,0 brotos por explante. Tais resultados mostram compatibilidade com estudos de micropropagação de *A. oleracea*, apresentando uma alternativa promissora para o cultivo da espécie e sua conservação (HAW & KENG, 2003; SARITHA & NAIDU, 2007; TANWER et.al., 2010; SAHU et.al., 2011).

3.2 Composição química e aspectos nutricionais

As plantas produzem uma vasta e diversificada variedade de substâncias. Suas composições químicas são definidas através das inúmeras reações que constituem o metabolismo desses organismos e são distribuídos distintivamente entre os grupos taxonômicos dentro do reino vegetal. Tal metabolismo é dividido em primário e secundário, onde o primário é entendido como um conjunto de processos metabólicos que desempenham papel essencial ao vegetal. Essas substâncias abrangem os vegetais de maneira geral, e são responsáveis pelo processo de fotossíntese e transporte de nutrientes, como os aminoácidos, carboidratos, proteínas e lipídios. O metabolismo secundário apresenta substâncias que não estão ligadas diretamente à manutenção da vida das plantas, mas garantem vantagens à sua sobrevivência. Essas substâncias são distribuídas de maneira característica entre as espécies vegetais e podem atuar como agentes de resistência a herbivoria e ataque de patógenos ou ainda como atrativo de organismos benéficos, como polinizadores e dispersores (KOSSEL, 1891; CROTEAU et.al., 2000; SIMÕES et.al., 2003; WINK, 2003).

A. oleracea apresenta composição química, assim como os demais vegetais, dependente de alguns fatores tais como: método de cultivo empregado, umidade, temperatura, tipo de solo e luminosidade, além da atuação de doenças e pragas. Na literatura são encontradas diversas abordagens sobre os constituintes químicos do jambu. Estudos realizados com o óleo fixo da espécie indicaram em sua composição química de ácidos graxos a presença de ácido linoleico (ômega-6) como componente majoritário, numa proporção de 56,37%, seguido pelo ácido palmítico (25,84%), ácido oleico (8,72%) e ácido esteárico (4,54%). Segundo os autores, tal composição indica a possibilidade de utilização do jambu como uma possível fonte de ácidos graxos essenciais (NAGAI & KISHIMOTO, 2008; PHRUTIVORAPONGKUL et.al., 2008).

A composição do óleo essencial de *A. oleracea* foi avaliada tanto de suas partes aéreas (caules e folhas) quanto de suas inflorescências. Lemos et.al. (1993) analisaram por GC/MS o

óleo essencial das partes aéreas de jambu obtido por destilação por arraste a vapor e identificaram 18 compostos, sendo os três majoritários o β -cariofileno (30,24%), Timol (18,30%) e γ -cadineno (13,34%). Baruah (1993) extraiu o óleo essencial das flores de jambu por hidrodestilação e também o analisou por GC/MS, onde foram identificados 20 compostos. Os componentes majoritários identificados foram o limoneno (23,6%), β -cariofileno (20,9%), (Z)- β -ocimeno (14,0%) e germacreno-D (10,8%).

A composição físico-química de *A. oleracea* também foi investigada. A tabela 1 apresenta sua composição nutricional para 100g de folhas. O Ministério da Saúde estabelece em seu regulamento de informações nutricionais que um alimento que apresente uma faixa de 15 a 29% dos valores estabelecidos para uma ingestão diária recomendada, é classificado como fonte de determinado mineral ou vitamina. Desta forma, o jambu pode ser identificado como uma fonte de Vitamina C, Cálcio e Fósforo (BRASIL, 1998).

Tabela 1 – Valores de concentração na composição nutricional de 100g de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen

Componente	Concentração	Unidade
Água	89,0	g
Valor energético	32,0	cal
Proteínas	1,9	g
Lipídeos	0,3	g
Carboidratos	7,2	g
Fibras	1,3	g
Cinza	1,6	g
Cálcio	162,0	mg
Fósforo	41,0	mg
Ferro	4,0	mg
Vitamina B1	0,03	mg
Vitamina B2	0,21	mg
Niacina	1,0	mg
Vitamina C	20,0	mg

Fonte: VILLACHICA (1996)

Além das citadas anteriormente, outras classes de compostos bioativos também foram identificados, isolados e caracterizados. Dentre eles estão os terpenóides, esteroides,

flavonoides, ésteres de amina e de amirina e alcaloides ricos em alcanidas e N-isobutilamidas. Atualmente, o jambu tem despertado o interesse de empresas e pesquisadores em virtude das propriedades do seu extrato. Tais propriedades são atribuídas aos constituintes do óleo essencial, mas precisamente às alcanidas ou alquilamidas e N-isobutilamidas. (KRISHNASWAMY & PRASANNA, 1975; MUKHARYA & ANSARI, 1987; GREGER, 1988).

Alcanidas são um grupo de metabólitos secundários presentes em 33 famílias de plantas, sendo a Asteraceae, Solanaceae e Piperaceae as três famílias mais importantes em que as alcanidas se encontram. Suas estruturas moleculares são simples, constituídas por uma amina e um ácido graxo de cadeia média a longa (C8 a C18), onde a natureza do ácido e os resíduos de amina caracterizam distintivamente cada família e gênero de plantas, atuando como critérios quimiotaxonômicos. Atribuem-se às alcanidas a função de reguladoras do crescimento da planta, promovendo ou inibindo o crescimento e formação de raízes, mostrando efeito positivo na produção de biomassa vegetal (TORRES & CHÁVEZ, 2001; CAVALCANTI, 2008; CAMPOS-CUEVAS et.al., 2008; RIOS, 2012).

Estruturalmente, as alcanidas representam uma classe de compostos lipídicos que se relacionam aos endocanabinoides animais (Anandamida), e baseado na semelhança estrutural destes compostos, as alcanidas são consideradas altamente ativas no sistema nervoso central (RIOS, 2012). A figura 4 apresenta a estrutura da Anandamina.

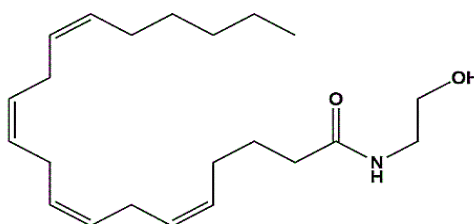


Figura 4 - Estrutura da Anandamina (*N*-arachidonylethanolamine)

Fonte: PubChem

Devido ao alto interesse de indústrias farmacêuticas e cosméticas, pesquisadores tem investigado sobre o isolamento e elucidação de alcanidas, presentes não só no jambu como também em outras espécies do gênero *Acmella*. A literatura apresenta alguns trabalhos onde os autores isolaram algumas alcanidas, bem como validaram suas metodologias para identificação das mesmas. Recentemente, foram isoladas por métodos de HPLC, ESI-MS e LC-MS, onze N-alcanidas, oito N-isobutilamidas, duas 2-metilbutilamidas e uma 2-feniletilamida, a partir de

extratos etanólicos de *Acmella*. Dentre as alcanidas presentes nesta espécie, o espilantol (N-isobutil-2(E), 6(Z),8(E)-decatrienamida) é a que se apresenta em maior concentração, sendo considerado agente responsável pela maioria das atividades biológicas desta planta (BOONEN et.al., 2010; BAE et.al., 2010; PANDEY et.al., 2011; SHARMA et.al., 2011; SINGH & CHATURVEDI, 2012; COSTA et.al., 2013; VERYSER et.al., 2015).

3.1.2 Espilantol

O espilantol é um composto bioativo encontrado em várias espécies de plantas que são utilizadas como medicamentos tradicionais em todo o mundo. É uma alcanida alifática de fórmula molecular $C_{14}H_{23}NO$ e nomenclatura IUPAC (2E,6Z,8E)-N-isobutil-2,6,8-decatrienamida. Também conhecida como afinina e descrita como um óleo amarelo, viscoso ardente que produz um efeito anestésico e de formigamento na língua. Sua fórmula estrutural, bem como seus dados de propriedades físicas estão apresentados na figura 4 e tabela 2 respectivamente (MOLINATORRES et al., 1996; PRACHAYASITTUKAL et.al., 2013; PAULRAJ et.al., 2013; RIOS & OLIVO, 2014).

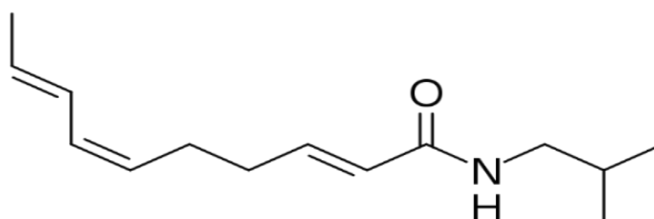


Figura 5 - Estrutura do espilantol
Fonte: PubChem

Tabela 2 - Propriedades físicas do espilantol

Fórmula molecular	$C_{14}H_{23}NO$
Massa molecular (g/gmol)	221
Densidade (g/cm³)	0,896
Ponto de fusão (°C)	23
Ponto de ebulição (°C)	165
Índice de refração (25°C)	1,5135
Absorção $\lambda_{máx}$ (nm)	228,5
Pressão de vapor (mmHg a 25°C)	0,00000402

Fonte: Jacobson (1957) e Chemnet

Geralmente, encontra-se o espilantol com uma segunda alcanida denominada homoespilantol, de fórmula estrutural N-2-metilbutil-2E,6Z,8E-decatrienamida, porém em concentração menor (LEY et.al., 2005). A figura 6 apresenta a estrutura do homoespilantol.

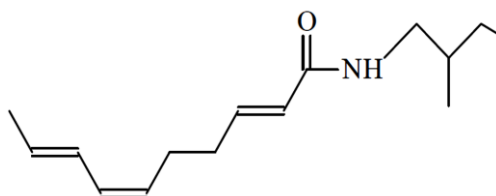


Figura 6 - Estrutura do homoespilantol
Fonte: PubChem

3.3 Aplicações

Acmella oleracea é considerada uma hortaliça doméstica devido seu alto consumo, principalmente na região norte do Brasil. As aplicações alimentícias mais conhecidas do jambu são as utilizadas na composição de pratos típicos paraenses e muito apreciados pela população, como o pato no tucupi e tacacá além de outros pratos e saladas. Algumas pessoas consideram a sensação de dormência, formigamento e salivação desagradável, entretanto, a planta perde boa parte dessa característica e seu forte sabor quando cozida (HIND, N. & BIGGS, N. 2003; JIROVETZ et. al., 2006; TIWARI et. al., 2011; DIAS et. al., 2012; PAULRAJ et. al., 2013).

Na medicina popular, o uso de *Acmella oleracea* tem sido reportado mundialmente em inúmeras publicações etnofarmacológicas. Sua infusão ou decocção são utilizadas para o tratamento de inflamações na boca, anemia, malária, estomatites e dispepsia, sendo também empregado como anti-helmíntico, estimulante do apetite, antibiótico, diurético, laxante e regulador das funções digestivas. A mastigação desta planta é feita para o tratamento de doenças nas gengivas e garganta, bem como para aliviar a dor de dentes. Outras doenças como reumatismo, febre, hemorroidas e asma também costumam ser tratadas através do uso popular da *Acmella oleracea* (CHOPRA et. al., 1956; PERRY & METZGER, 1980; FARNSWORTH & BUNYAPRAPHATSARA, 1992; BUNYAPRAPHATSARA & CHOKECHAREUNPORN, 1999; JIROVETZ et. al., 2006).

Extratos de jambu vem sendo utilizados na indústria de cosméticos em cremes faciais anti-sinais, cremes dentais, enxaguantes bucais, shampoos e máscaras faciais rejuvenescedoras. Várias patentes são registradas relatando o uso do extrato ou do espilantol isolado para aplicações na área de cosméticos. Um dos relatos descreve a utilização do espilantol como

alternativa ao uso da bactéria empregada na aplicação do botox (DEMARNE & PASSARO, 2005; ARTARIA et.al., 2011).

Atividades biológicas de *Acmella oleracea* foram investigadas em diversos experimentos. Seus extratos apresentaram atividade analgésica, antipirética e antiinflamatória e essas atividades podem ser atribuídas aos flavonoides e β -sitosterol (SARAVONGVIVAD & SUPAVILAI, 1977; NAIR et. al., 2012; D'ARMOUR & SMITH, 1941; WITKIN et.al., 1961; CHAKRABORTY et.al., 2004; JYOTHI et.al., 2008; RATNASOORIYA & PIERIS, 2005; SADAVONGVIVAD & SUPAVILAI, 1977; NAIR et.al., 2012). Além dessas atividades, outras também foram investigadas, tais como atividade diurética (RATNASOORIYA et.al., 2004), atividade acaricida (CASTRO et.al., 2014), atividade vasorelaxante e antioxidante (WONGSAWATKUL et.al., 2008), atividades larvicidas e ovicidas (SARAF & DIXIT, 2002; PITASAWAT et.al., 1998) e efeito neuroprotetor (WILASINEE et.al., 2017). Algumas das atividades biológicas avaliadas estão descritas na tabela 3, juntamente com suas respectivas referências.

Tabela 3 - Atividades bioativas de *Acmella oleracea*

Atividade	Referência
Anestésico local	Narayana et.al., 2001
Atividade antipirética	Narayana et.al., 2001
Atividade anti-inflamatória	Ratnasooriya et.al., 2004
Atividade analgésica	L.-C.Wu et.al., 2008
Atividade antifúngica	V.M.Moreira et.al., 1989
Atividade diurética	Peiris et.al., 2001; Mondal et.al., 1998
Atividade vasorelaxante	Ahmed et.al, 2004; Wu et.al., 2008
Atividade antioxidante	Ahmed et.al, 2004; Wu et.al., 2008
Inibidor da lipase pancreática	Whittle, 1964
Atividade larvicida e antimalárica	Saraf & Dixit, 2002
Atividade afrodisíaca	Sharma et.al., 2011
Atividade imunomoduladora	Sharma et.al. 2012
Bioinseticida	Ramsewak et.al.,1999; Jondiko, 1986; Krishnaswamy et.al.,1975
Convulsante	Mondal et.al., 1998

3.4 Métodos de extração e obtenção do espilantol

Atualmente, os extratos de jambu são comercializados por diversos fabricantes de extratos de ervas como suplementos e os constituintes e atividades biológicas desses extratos tem sido investigados. O espilantol isolado não é um composto disponível comercialmente, o que possibilita a busca por metodologias de extração da substância de maneira otimizada. O primeiro relato de isolamento do espilantol foi publicado em 1945 por Gokhale e Bhide a partir de extratos etanólicos obtidos das cabeças de flores de *Acmella oleracea*.

Para se obter espilantol em grande escala com maiores rendimentos e pureza, são necessários métodos de extração mais efetivos. A literatura sugere que a extração de espilantol pode ser realizada através de técnicas de maceração simples, extração em fase sólida, microondas e extração por fluido supercrítico. Em grande parte dos estudos realizados, foram utilizados metanol, etanol, hexano e solventes hidroetanólicos para extração. Há também estudos sobre o rendimento de espilantol, onde tais resultados apresentam baixos rendimentos em sua maioria, excetuando o método de extração por fluido supercrítico e Soxhlet que apresentaram rendimentos elevados em comparação aos demais métodos reportados na literatura (CAVALCANTI, 2008; SINGH & CHATURVEDI, 2012; DIAS et.al., 2012; COSTA et.al., 2014).

Até o momento, várias técnicas analíticas têm sido utilizadas para isolamento, detecção e quantificação de espilantol. Dentre elas, a ressonância magnética nuclear de ¹H e ¹³C (RMN), cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS) e cromatografia líquida-espectrometria de massa (HPLC-MS) estão entre as mais utilizadas. A cromatografia de partição centrífuga (CPC) é outra técnica que também pode ser utilizada para o isolamento quantitativo de alcaloides. Mbeunkui et.al. (2011) demonstraram o potencial da CPC para o isolamento em larga escala das principais alcaloides de *Acmella oleracea*, onde os resultados apresentaram uma alta recuperação dos compostos alvo, comparado às técnicas de cromatografia em coluna e cromatografia em camada fina (NAKATANI & NAGASHIMA, 1992; RAMSEWAK et.al., 1999; BAE et.al., 2010; MBEUNKUI et.al., 2011; LENG et.al., 2011; SINGH E CHATURVEDI, 2012; COSTA et.al., 2014).

3.5 Processo de extração supercrítica

3.5.1 Descrição geral

Nos últimos anos, tem havido um interesse crescente na recuperação de compostos bioativos de produtos naturais. A extração com fluido supercrítico tem sido reconhecida como

um processo favorável para aplicações em alimentos, cosméticos e medicamentos, uma vez que se trata de uma tecnologia limpa, seletiva, e que fornece um produto final livre de solventes orgânicos tóxicos.

A Extração por Fluido Supercrítico (SFE – Supercritical Fluid Extraction) é uma tecnologia de separação que usa um fluido supercrítico como solvente. É uma operação unitária que se fundamenta no equilíbrio e nas propriedades físico-químicas dos fluidos supercríticos. Todo fluido é caracterizado pelo seu ponto crítico, que representa a maior temperatura e pressão em que uma substância pode existir como vapor e líquido em equilíbrio, e quando o fluido ultrapassa suas temperatura e pressão críticas, deixando de apresentar calor latente de vaporização, é considerado um fluido supercrítico (SOVOVÁ *et. al.*, 2010; CHUANG, 2007; BRUNNER, 2005; BRUNNER, 1994).

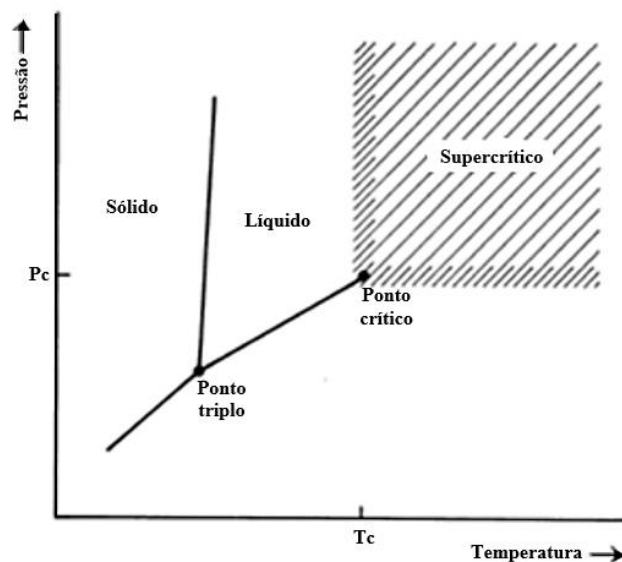


Figura 7 - Diagrama de fases P-T de uma substância pura
Fonte: Brunner (1994)

Uma das propriedades do fluido supercrítico está em apresentar características intermediárias entre as de um líquido e um gás. Apresentam densidade e difusividade similares às do líquido e viscosidade próxima à dos gases. Portanto, baixos valores de viscosidade aliada à ausência de tensão superficial, facilitam a penetração do fluido no interior da matriz sólida, enquanto que altos valores de densidade conferem ao fluido elevado poder de solubilização.

Tabela 4 - Valores de propriedades características de gases, líquidos e fluidos supercríticos.

Estado do fluido	Densidade (g/cm³)	Difusividade (cm²/s)	Viscosidade (g/cm.s)
Gás 1atm e 15-30 °C	(0,6 - 2,0) x 10 ⁻³	0,1 – 0,4	(1,0 - 3,0) x 10 ⁻⁴
Líquido 1atm e 15-30 °C	0,6 – 1.6	(0,2 - 2,0) x 10 ⁻⁵	(0,2 - 3,0) x 10 ⁻²
Fluido Supercrítico P _C , T _C	0,2 – 0,5	0,7 x10 ⁻³	(1 - 3) x 10 ⁻⁴

Fonte: Brunner (2005)

Além das propriedades físico-químicas, para se ter vantagem diante dos processos convencionais, um fluido supercrítico deve apresentar temperatura crítica baixa, pequena entalpia de vaporização, alta volatilidade, deve ser inerte, não tóxico, não corrosivo e não inflamável. A partir dessas características exigidas, o CO₂ tem se tornado o solvente mais utilizado nos diversos segmentos, por apresentar as características descritas anteriormente e também por ser relativamente barato e imediatamente disponível em elevado grau de pureza (BRUNNER, 1994; BRUNNER, 2005; QUISPE-CONDORI *et. al.*, 2005; BRAGA, 2005). O dióxido de carbono é uma substância apolar, por ser uma molécula com momento dipolo igual a zero, sua polaridade é semelhante à de outros solventes apolares tipicamente utilizados em processos de extração sólido-líquido, como o hexano (LUQUE De CASTRO *et al.*, 2004; ROSA *et al.*, 2009).

3.5.2 Parâmetros do processo

Na extração com fluido supercrítico, a seletividade do processo depende de alguns parâmetros. Dentre eles o tipo de solvente utilizado, o tipo de matéria-prima, a pressão e temperatura de operação, vazão e densidade. O tipo de matriz sólida utilizada pode atuar como interferente devido à granulometria do material e os métodos de secagem utilizados, que são parâmetros que influenciam significativamente no processo. Desta forma, deve-se levar em consideração tanto o tratamento mecânico quanto o tratamento térmico da matéria-prima.

No que se refere ao tamanho das partículas, à medida que o diâmetro diminui, sua área de contato aumenta, elevando a disponibilidade do soluto devido o rompimento das estruturas

celulares do vegetal, o que facilita a transferência de massa do sólido para o fluido supercrítico e reduz o tempo de extração. No entanto, partículas com diâmetro muito pequeno, reduzem a eficiência do processo, causando a compactação do leito e conseqüentemente o surgimento de caminhos preferenciais, resultando na diminuição do rendimento global de extração (SOVOVÁ et.al., 1994; BRUNNER, 1994; REVERCHON, 1997; BJÖRKLUND et.al., 1998; EGGERS et.al., 2000; BERTUCCO & VETTER, 2001; REVERCHON & MARCO, 2006; LAROZE et.al., 2010).

Quanto ao teor de umidade da matéria-prima, podem ser utilizados materiais frescos ou desidratados. O nível de influência do teor de umidade varia de acordo com o tipo de óleo a ser extraído. Para óleos vegetais, dados da literatura recomendam um percentual de umidade de 3 a 12%, pois valores acima desta faixa diminuem o contato do solvente supercrítico com a matriz e provocam um bloqueio dos sítios lipofílicos. A utilização de materiais frescos se dá quando os componentes desejáveis são instáveis ou muito voláteis. Porém, utilizam-se mais comumente materiais previamente desidratados, a fim de se evitar a proliferação de microorganismos e a degradação da matéria-prima (EGGERS et.al., 1996; LANG & WAI, 2001; SALDAÑA, 2002).

A densidade de fluido supercrítico é um parâmetro que pode ser controlado através da modificação da pressão ou temperatura do processo. É definida também como a distância média entre as moléculas da substância. Para alimentos, a densidade é dividida em densidade real, aparente. A densidade real caracteriza-se pela densidade do material, onde se desconsidera sua porosidade; Densidade aparente é definida pela densidade da amostra, levando-se em consideração seus poros. A relação entre as densidades real e aparente resulta no valor de porosidade do leito (BRUNNER, 1994; ROSA et.al., 2009; Pereira & Meireles, 2013).

O aumento da pressão, à temperatura constante, causa um aumento na densidade do fluido supercrítico, aumentando o seu poder de solubilização. Por outro lado, o aumento da temperatura, à pressão constante, gera uma redução na densidade do fluido e um aumento na pressão de vapor do soluto. A redução da densidade acarreta uma redução no poder de solubilização; já o aumento da pressão de vapor favorece uma maior solubilização do soluto no solvente supercrítico. Portanto, o aumento da temperatura à pressão constante pode tanto aumentar a solubilidade do soluto quanto diminuí-la (ROSA et.al., 2009).

A vazão do solvente é um parâmetro que pode controlar a extração se as condições de equilíbrio ou se a transferência de massa da superfície da partícula para o fluido for o fator predominante durante o processo de extração. No entanto, se o mecanismo de resistência à transferência de massa interna for a etapa controladora do processo, a vazão do solvente não influenciará significativamente o processo de extração (BJÖRKLUND et.al., 1998).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O desenvolvimento deste trabalho seguiu as seguintes etapas:

- Cultivo e coleta das matérias-primas *in natura* e determinação da biomassa;
- Preparo e caracterização das matérias-primas, incluindo secagem, moagem, composição centesimal, teor de minerais e determinação de parâmetros para extração (umidade, diâmetro médio de partículas, densidade real, densidade aparente e porosidade do leito);
- Otimização do processo de extração (redução de tempo e custo);
- Determinação do custo do processo de extração em escala analítica antes e após otimização;
- Caracterização dos extratos (quantificação do teor de compostos fenólicos totais e quantificação do teor de espilantol);
- Avaliação da atividade farmacológica dos extratos pelo teste de antinociceptividade *in vivo*.

As etapas estão ilustradas na figura 8 e suas metodologias descritas nos tópicos posteriores.

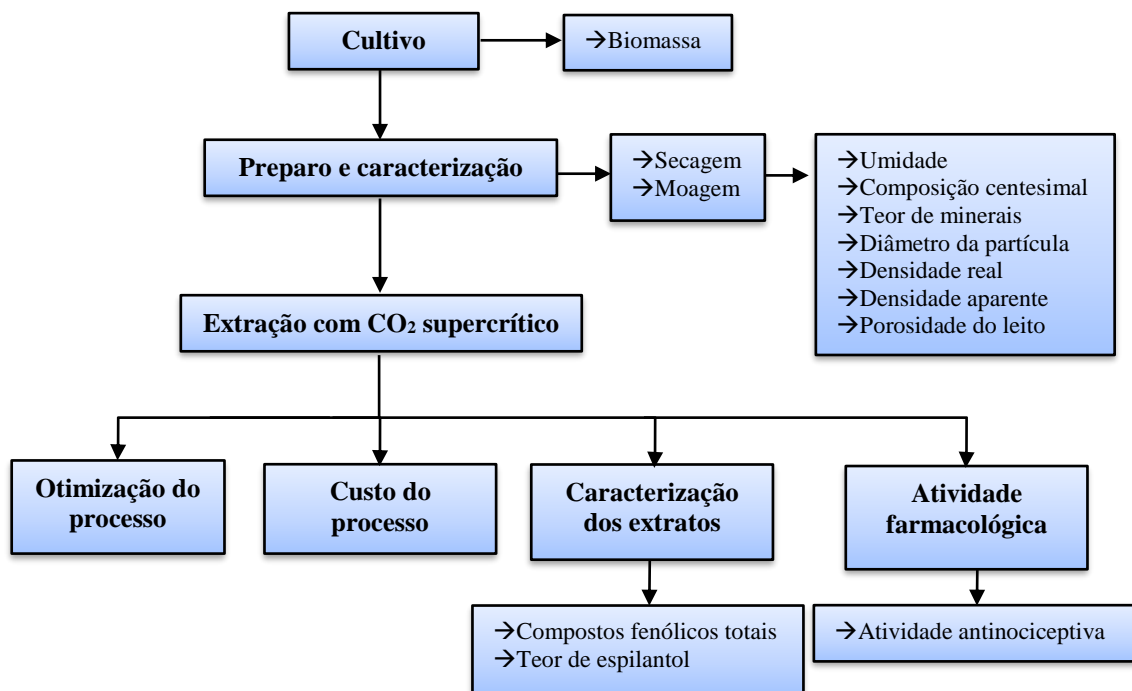


Figura 8 - Diagrama de fluxo de atividades deste trabalho

Fonte: Autoria própria

4.1 Matéria-prima

Neste trabalho, foram utilizadas inflorescências de duas cultivares de *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen, denominadas de Nazaré e Jamburana. A determinação botânica foi realizada no Laboratório de Taxonomia de Árvores – Herbário Felisberto Camargo (UFRA- Brasil) com números de identificação de FC-UFRA 5985 e FC-UFRA 5986.

As amostras são provenientes de cultivo orgânico em campo aberto, realizado no Departamento de Olericultura do Instituto Federal do Pará, Campus de Castanhal. Um experimento de cultivo foi instalado em julho de 2016 correspondendo a estação seca, onde se predomina a escassez de chuva na região amazônica, e outro em março de 2017, correspondendo a estação úmida, no qual se registra altos índices de chuva na mesma região. Os dois experimentos foram realizados por delineamento completamente casualizado, com três repetições e duas épocas de colheita (61 e 76 dias após a semeadura), baseado no tempo de senescência da planta.

Desta forma, as amostras colhidas foram avaliadas quanto ao seu período de cultivo (estação úmida e estação seca), tempo de colheita (61 e 76 dias) e tipo de cultivar (Nazaré e Jamburana), resultando em oito amostras, que foram identificadas conforme a tabela 5:

Tabela 5 - Relação das amostras incluindo estação de cultivo, tempo de desenvolvimento e cultivares utilizadas de *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen

Amostras			Identificação
Período (estação)	Tempo (dias)	Cultivar	
Úmida	61	Nazaré	MP1
Úmida	61	Jamburana	MP2
Úmida	76	Nazaré	MP3
Úmida	76	Jamburana	MP4
Seca	61	Nazaré	MP5
Seca	61	Jamburana	MP6
Seca	76	Nazaré	MP7
Seca	76	Jamburana	MP8

Após cada colheita, as raízes foram removidas, e as plantas foram higienizadas em água corrente e secas naturalmente. Em seguida, as inflorescências foram separadas para posterior determinação do rendimento de biomassa.

4.1.1 Secagem, moagem e granulometria

As amostras foram secas a 40°C por 48 h em estufa de circulação de ar (Fabbe-Primar, Brasil). Em seguida, foram moídas em bateladas em um moinho de facas.

Para determinação da distribuição do tamanho das partículas, utilizou-se 100 g de amostra. Foram utilizadas peneiras da série padrão Tyler com aberturas de 24 a 48 mesh (W. S. Tyler, USA), acopladas a um agitador magnético (PRODUTEST, modelo 3580, Brasil). A operação foi realizada por 20 minutos até total separação das partículas. Em seguida, as frações foram coletadas, pesadas e acondicionadas em sacos de polipropileno, submetidas a vácuo e armazenadas em freezer doméstico (Brastemp Frost free) sob temperatura de -5°C. O diâmetro médio das partículas foi determinado de acordo com o método recomendado pela ASAE Standart (1998), de acordo com a equação 1:

$$d_{mg} = \log^{-1} \left[\frac{\sum_{i=1}^n \left(w_i \log \bar{d}_i \right)}{\sum_{i=1}^n w} \right] \quad (1)$$

Onde:

$$\bar{d}_i = (d_i \cdot d_{i+1})^{0,5}$$

d_i : abertura nominal da i-ésima peneira (mm);

d_{i+1} : abertura nominal da peneira maior que a i-ésima peneira (mm);

w_i : massa do material retida na i-ésima peneira.

4.1.2 Determinação da umidade

A determinação do teor de umidade foi realizada em um analisador de umidade infravermelho com precisão de $\pm 0,01\%$ (GEHAKA, modelo IV-2500, Brasil), antes de cada extração, afim de se manter o controle deste parâmetro. Esta análise foi realizada no laboratório de Produtos de Origem animal (LAPOA, FEA-UFPA).

4.1.3 Composição nutricional e mineral

Todas as análises realizadas para a composição centesimal, foram feitas de acordo com as metodologias da AOAC, 2016, utilizando aproximadamente 3g de amostra, com os seguintes procedimentos: a umidade foi determinada por método gravimétrico (método nº 941.11) por secagem em estufa (105°C) até apresentar peso constante. O resíduo mineral fixo (cinzas)

também foi determinado por gravimetria (método nº 941.12), por meio da incineração da matéria orgânica em mufla a 550°C, utilizando as mesmas amostras secas do teste de umidade, até obtenção de cinzas claras. Os lipídios foram determinados por extração em aparelho Soxhlet (método nº 923.05), utilizando éter de petróleo como solvente. O teor de proteínas foi determinado pelo processo de digestão Kjeldahl (método nº 960.48), através da transformação do número de g de nitrogênio encontrado, em número de g de protídios. A determinação do teor de carboidratos foi realizada por diferença (resolução RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003) (BRASIL, 2003). As determinações dos teores de umidade, cinzas, lipídios e proteínas foram realizadas em duplicata. O valor calórico foi determinado por cálculos descritos por Furlan et. al. (2007), multiplicando-se o teor de lipídios por 9 e os teores de proteínas e carboidratos por 4, sendo expresso em kcal.

Para determinação dos minerais, utilizou-se uma massa de 0,5g de cada amostra (seca e triturada) e, em seguida, foram digeridas em uma mistura de HNO₃ + HClO₄ (3:1) em bloco digestor e mantidas sob temperatura ambiente por 24h. Posteriormente, elevou-se a temperatura do bloco digestor para 120°C até o total desprendimento do vapor castanho, em seguida elevou-se a temperatura para 200°C até total desprendimento do vapor branco. Após resfriamento, as amostras foram filtradas e transferidas para balões volumétricos de 50 mL, sendo aferidos até a marca com água deionizada. As amostras foram digeridas em duplicata e os brancos analíticos foram preparados da mesma forma, sem adição da amostra. Os teores de Fe, Ca, Zn, Mg, Mn e Cu foram determinados por espectrometria de absorção atômica de chama (Varian SpectraAA 220, Mulgrave, Austrália). As condições operacionais utilizadas estão descritas na tabela 6.

Tabela 6 - Parâmetros operacionais utilizados no espectrômetro de absorção atômica de chama.

Parâmetro	Fe	Ca	Zn	Mg	Mn	Cu
Comprimento de onda (nm)	248,3	422,7	213,9	285,2	279,5	324,8
Corrente da lâmpada (mA)	10,0	10,0	7,5	7,5	7,5	7,5
Resolução espectral (nm)	0,2	0,5	0,2	0,5	0,2	0,5

4.1.4 Determinação da densidade real, densidade aparente e porosidade do leite

A densidade real das partículas (ρ_r) foi determinada por picnometria com gás hélio pela Central Analítica do Instituto de Química da Unicamp, com metodologia descrita no manual de operação do equipamento (Picnômetro automático Quantachrome, modelo Ultrapyc 1200e,

USA). Esta técnica foi adotada devido a sua precisão em determinar o volume do sólido, uma vez que o gás hélio é inerte e penetra facilmente nos poros acessíveis da matriz vegetal, em virtude do pequeno tamanho dos seus átomos.

A densidade aparente (ρ_a) foi calculada através da razão entre a massa de amostra utilizada para empacotar o leito (m), pelo volume do leito de extração (V), de acordo com a equação 2:

$$\rho_a = \frac{m}{V} \quad (2)$$

Onde:

ρ_a : densidade aparente;

m : massa de amostra utilizada para empacotar o leito;

V : volume do leito

A porosidade do leito (ε) foi determinada pela relação matemática entre as densidades real e aparente, como descrito na equação 3:

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_a}{\rho_r} \quad (3)$$

Onde:

ε : porosidade do leito;

ρ_a : densidade aparente;

ρ_r : densidade real.

4.2 Extração supercrítica

O procedimento operacional iniciou-se a partir do momento em que os equipamentos foram ligados. Em seguida, a montagem da célula (3,17cm de diâmetro e 12,62cm de comprimento) foi realizada com 10g de matéria-prima para seu empacotamento, resultando em uma razão de altura do leito (L) e diâmetro do leito (D) de 2,5, ocupando 61,8% do comprimento da célula de extração. O restante do volume da célula foi preenchido com algodão e esferas de vidro na entrada a fim de que atuassem como difusores e assegurassem a dispersão homogênea do solvente através do leito de matéria-prima, e na saída da célula para evitar que as partículas de matéria-prima fossem arrastadas para os dutos capilares com a corrente de solvente. A figura 9 apresenta uma ilustração da célula de extração com suas respectivas medidas do leito empacotado. O equipamento utilizado para as extrações foi extrator Spe-edTM SFE (Applied Separations, Inc, Allentown, PA USA, modelo 7071) (figura 10), com célula extratora de 100 mL, um recirculador Polyscience, F08400796, USA), um compressor de ar de volume

interno de 19,7 L (Schulz, modelo CSA 7,8, Brasil), um cilindro de CO₂ (pureza 99,9, White Martins, Brasil) e um medidor de vazão (Alicat Scientific, M5SLPM, USA).

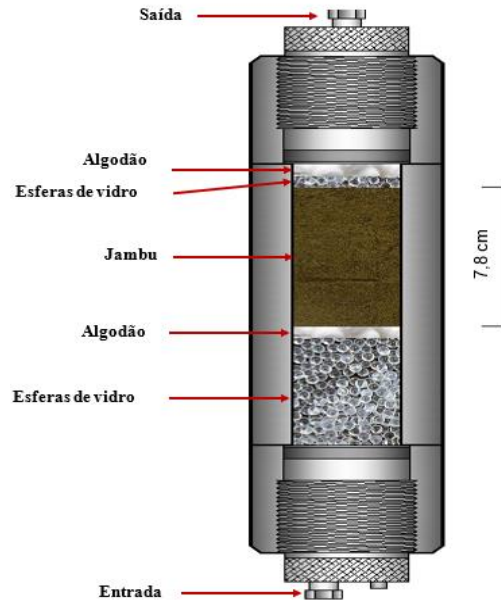


Figura 9 - Ilustração da célula de extração com leito empacotado
Fonte: Autoria própria

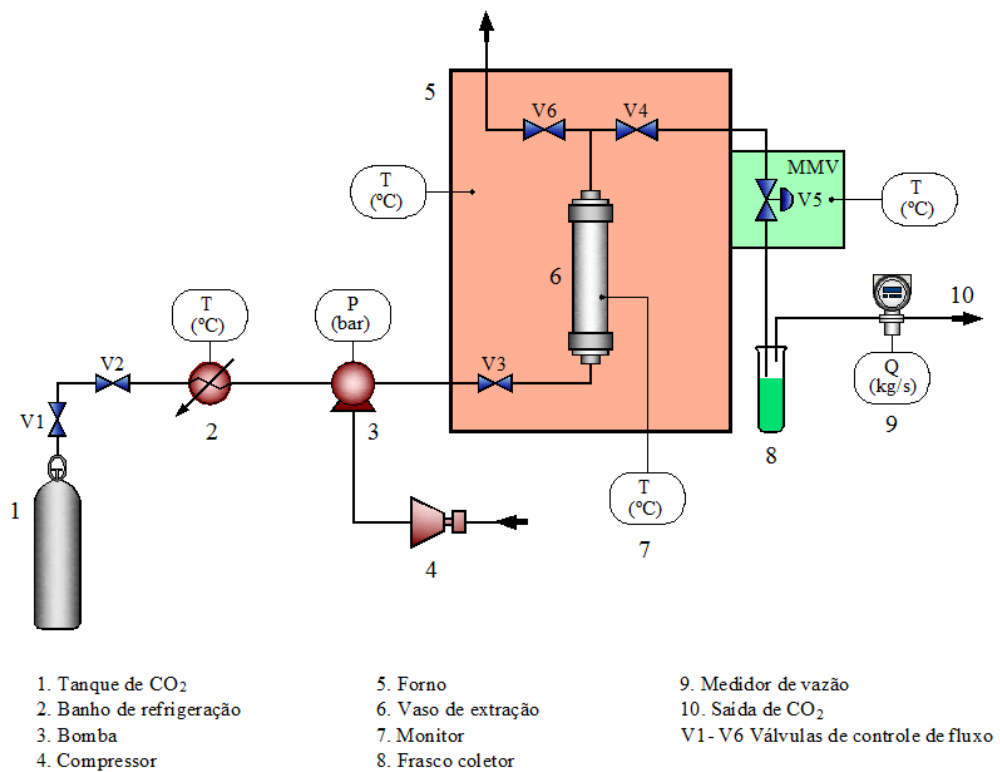


Figura 10 - Representação esquemática da unidade de extração supercrítica
Fonte: Bezerra et. al. (2018)

Após o processo de montagem da célula, iniciou-se o procedimento operacional, que seguiu as etapas constantes no manual de operações da Applied Separations (2004). Todo o processo segue a sequência que se inicia na montagem da célula, a pressurização do sistema e ajuste da temperatura de operação, para então dar início ao período estático e dinâmico de extração. Seguidamente, a última etapa do processo que consiste na despressurização do sistema, limpeza, desligamento do equipamento e desmontagem da célula.

4.2.3 Determinação do fluxo de solvente

Para determinação da vazão de solvente, as amostras (MP1 a MP8) foram misturadas. As condições operacionais de extração com CO₂ supercrítico foram: temperatura (70°C), pressão (320bar), tempo (30 min estático e 180 min dinâmico) e vazão (3 L/min). Esta condição foi descrita por Dias et. al. (2017) como a condição ótima para rendimento de espilantol. O procedimento experimental para determinação do fluxo de solvente foi realizado da seguinte forma: a) Primeiramente foi realizada a extração de acordo com a metodologia proposta por Dias et. al. (2017), com o objetivo de se determinar o rendimento global de extração para as amostras que foram misturadas; b) em seguida, foram realizadas extrações de acordo com a metodologia proposta por Dias et. al. (2017) porém, utilizando os tempos de 120 e 60 min de período dinâmico a fim de se determinar o rendimento global de extração para os respectivos tempos utilizados; c) Nesta etapa, um novo valor de fluxo de solvente foi calculado a partir da equação 4 para o período dinâmico de 120 min, sendo mantido o mesmo valor de relação de massa de solvente por massa de amostra (S/F).

$$Q_{CO_2} = \frac{M_{CO_2}}{t_2} \quad (4)$$

4.2.4 Determinação dos rendimentos globais

Os experimentos para determinação dos rendimentos globais foram realizados em triplicata na unidade de extração descrita no item 4.2. As extrações foram realizadas de acordo com os parâmetros descritos por Dias et. al. (2017) e fluxo de solvente determinado no item 4.2.3. Os rendimentos globais foram calculados a partir da razão entre massa de extrato e massa de amostra em base seca, conforme equação 5:

$$X_{0 \text{ b.s.}} (\%) = \frac{m_0}{m_a \times \left(1 - \frac{U_a}{100}\right)} \times 100 \quad (5)$$

4.2.5 Avaliação do custo do processo em escala analítica

Para determinação do custo operacional em escala analítica foram avaliadas as etapas do processo descrito no item 4.2, além dos custos com obtenção, preparo e caracterização da matéria-prima. Uma avaliação em relação a mudança no fluxo de solvente e tempo de extração também foi realizada. O custo com consumo de energia dos equipamentos foi calculado a partir da equação 6, baseado na tarifa de R\$0,561 estipulada pelas Centrais Elétricas do Pará S/A.

$$E = P \times \Delta t \times 0,561 \quad (6)$$

4.3 Análise dos extratos

4.3.1 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais foi determinado nos extratos de acordo com a metodologia descrita por Singleton et. al. (1999) e Georgé et. al. (2005). Foram utilizados 35 mg de cada extrato e diluídos em 25 mL de EtOH a 70% (v/v). Um volume de 0,5 mL das soluções foi submetido a reação com 2,5 mL de Folin-Ciocalteu a 10% (v/v) e 2 mL de solução de carbonato de sódio a 7,5% (m/v). As amostras foram mantidas sob abrigo de luz por uma hora. As medidas de absorvância foram feitas em espectrofotômetro UV-VIS modelo Evolution (Thermo Scientific, EUA) a 760 nm. O teor de compostos fenólicos foi expresso em miligramas de ácido gálico equivalente (GAE) por grama de extrato em base seca (db) (mg GAE/ g de extrato), utilizando uma curva de calibração ($y = 0,0099x - 0,0277$; $R^2 = 0,9991$). As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.3 Quantificação do teor de espilantol por CG-MS

Foram adicionados aproximadamente 10mg de extrato em tubos cônicos de 2mL. Em seguida, 100µL de uma solução saturada de metilato de potássio foi agitada em vortex por 1 min em banho ultrassom à 30°C por 2min. Foram adicionados 200 µL de hexano, centrifugados a 10.000 rpm durante 1 min e sendo separada a fase orgânica.

O solvente foi separado da fase orgânica, onde foram adicionados 50µL de N,O-bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida + 1% trimetilclorosilano (BSTFA + 1% TMCS), e mantidos sob agitação em ultrassom durante 1 min a 30°C. O BSTFA foi evaporado e adicionados 500 µL da solução Hexano:CH₂Cl₂ (1:1). As amostras foram armazenadas em vials para posterior análise em GC-MS.

As análises em cromatografia gasosa foram realizadas através do uso de um Cromatógrafo Gasoso (CG) ThermoScientific Trace 1300 acoplado a um espectrômetro de massa (EM) ThermoScientific MS-ISQ Single Quadrupolo com auto-amostrador AI 1310, equipado com coluna capilar ZB-5HT (30m x 0,25mm x 0,1µm), foi usado gás Hélio como carreador a um fluxo de 1mL/min. Injeção de amostra de 1,0µL no modo Splitless. O injetor operou a 220°C e a programação de temperatura do forno iniciou com 50°C até 200°C (8 °C/min), mantendo-se por 1min., elevando-se até 300°C (15°C/min.), se mantendo por 5 min. Elevando-se novamente até 350°C (15°C/min.) e mantendo-se por mais 9 minutos. O MS-ISQ operou com interface a 280°C, fonte de ionização a 280°C, faixa de massa (40-1000 Da). Ionização eletrônica a 70eV. As identificações das substâncias foram realizadas através da comparação dos espectros de massas com os das bibliotecas comerciais NIST 2011 e WILEY 2009.

4.4 Atividade farmacológica

4.4.1 Animais

Para o teste de antinociceptividade foram utilizados camundongos machos (*Mus musculus*), linhagem Swiss, adultos (25-40g). Os animais, provenientes do Instituto Evandro Chagas, foram alojados no Biotério Setorial da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará, acomodados em gaiolas e mantidos sob condições controladas de temperatura (25°C) e ciclo de claro/escuro de 12h. A fase clara iniciava-se às 6h e terminava às 18h, com acesso a água e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos realizados de manuseio dos animais foram de acordo com as normas institucionais (Parecer CEUA nº 5628170418).

4.4.2 Atividade antinociceptiva

A atividade antinociceptiva foi realizada por meio de testes de contorções abdominais, descritas de acordo com o método de Koster et.al. (1959). As contorções foram induzidas nos camundongos através da administração de ácido acético 1% i.p. em volume de 0,1mL para cada 10g de peso do animal.

A reação do animal a esse estímulo consiste no desenvolvimento de movimentos repetidos de contração da parede abdominal, rotação do corpo e extensão das patas traseiras. Ao conjunto de reações descritas, denomina-se por contorções abdominais. Onde a intensidade da nocicepção é quantificada como o número total de contorções abdominais durante o período de observação de 20 minutos, iniciando-se a contagem 10 minutos após a administração do ácido acético. Durante o tempo de observação, os animais foram mantidos em funis de vidro

com diâmetro de aproximadamente 22cm. O extrato foi administrado uma hora antes da administração do agente nociceptivo. Um grupo de animais recebeu solução de Tween 80 a 1% (grupo controle). A droga padrão, indometacina (10mg/kg), foi administrada 60 minutos antes da administração do ácido acético. Todos os grupos foram constituídos por 10 animais.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Cultivo, caracterização da matéria-prima e do leito de extração

O rendimento de massa fresca e seca de flor, bem como o teor de água das oito amostras estão apresentados na tabela 7. O rendimento de biomassa variou de 123,86g a 597,8g. Os maiores tempos de colheita apresentaram os maiores rendimentos de biomassa, para os dois períodos de cultivo. A cultivar Nazaré apresentou os maiores rendimentos em relação à cultivar Jamburana nos menores tempos de colheita. O teor de água para todas as amostras foi acima de 90%, demonstrando o funcionamento normal das células do vegetal.

Tabela 7 - Rendimento de biomassa de cultivo de jambu

Amostra	Massa fresca total (g)	Massa fresca de flor (g)	Massa seca de flor (g)	Teor de água (%)
MP1	20756,3	3279,5	244,3	90,5
MP2	18758,4	3245,2	242,7	92,5
MP3	21597,0	5852,8	558,8	90,5
MP4	21090,4	5863,1	567,0	90,3
MP5	21257,6	5378,2	236,3	95,6
MP6	21782,7	2918,9	123,8	92,5
MP7	23028,1	5873,2	577,4	90,5
MP8	22545,0	7597,7	597,8	92,1

A caracterização das amostras apresentou valores de diâmetro médio das partículas (d_p) de $0,36 \pm 0,04$ mm, densidade real (d_r) de $1,23 \pm 0,01$ g/cm³, densidade aparente (d_a) de $0,18 \pm 0,01$ g/cm³ e porosidade do leito de 0,86.

Os parâmetros de caracterização e preparo da matéria-prima foram mantidos constantes para todas amostras utilizadas no processo de extração, a fim de que estes não exercessem influência significativa nos rendimentos de extração, uma vez que não foram avaliados neste trabalho como variáveis do processo.

Os valores de diâmetro médio de partículas e porosidade do leito obtidos mantiveram-se na faixa utilizada por Dias et.al. (2017).

5.2 Composição nutricional e mineral

As composições aproximadas das amostras estão apresentadas na tabela 8. Após procedimento de secagem, as amostras apresentaram valores de umidade entre 10 e 13%. Como descrito em outros vegetais, as inflorescências apresentaram um alto teor de água. Dias et. al.

(2012), Barbosa et. al. (2016) e Dias et. al. (2017) caracterizaram o percentual de umidade das inflorescências em 4,3%, 10,07% e 20% respectivamente, obtendo rendimentos em massa de 4,82%, 1,61% e 7,52%. Os autores afirmam que a umidade é um parâmetro que influencia diretamente no rendimento da extração de alquilamidas lipofílicas. O teor de cinzas variou entre 10 e 11,9% e o de proteínas apresentou valor máximo de 21,7 e mínimo de 18,2%, e diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$). O conteúdo lipídico total apresentou maiores valores para a estação úmida (MP1 a MP4), sendo as amostras de maior tempo de colheita (MP3 e MP4) as que apresentaram maiores teores lipídicos.

Tabela 8 - Valores médios e desvio padrão da composição centesimal de inflorescências de jambu desidratado.

Amostras	Umidade	Cinzas	Lipídios	Proteínas	Carboidratos	Valor energético
MP1	13,3±0,1 ^a	11,3±0,2 ^{ab}	7,6±0,02 ^b	20,6±0,3 ^{abc}	50,4	352,2
MP2	12,7±0,1 ^a	11,2±0,3 ^{ab}	8,0±1,6 ^{ab}	20,0±0,1 ^{abcd}	51,2	356,7
MP3	12,0±0,2 ^{bc}	11,1±0,1 ^b	10,5±0,7 ^a	18,5±0,8 ^{cd}	51,1	372,9
MP4	11,9±0,02 ^c	10,9±0,1 ^{bc}	9,8±0,6 ^{ab}	18,2±0,6 ^d	52,2	369,8
MP5	12,7±0,03 ^a	10,0±0,1 ^d	9,7±0,4 ^{ab}	21,3±1,1 ^{ab}	43,3	343,5
MP6	12,6±0,3 ^{ab}	10,3±0,2 ^{cd}	7,3±0,4 ^b	21,7±0,3 ^a	51,2	357,7
MP7	10,7±0,04 ^d	11,9±0,2 ^a	7,2±0,2 ^b	20,0±0,3 ^{abcd}	52,8	356,6
MP8	10,2±0,3 ^d	11,2±0,1 ^{ab}	7,3±0,01 ^b	19,2±0,6 ^{bcd}	54,6	360,7

Valores expressos em g/100g de amostra e valor energético expresso em kcal/100g. Dados representam a média ± desvio-padrão (base seca). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo Teste de Tukey.

A composição mineral das inflorescências está demonstrada na tabela 9. Os elementos com maiores concentrações foram Ca e Mg. Todos os elementos, com exceção do Fe, apresentaram diferenças estatísticas entre si ($p < 0,05$). Os elementos Fe, Ca, Zn e Mg apresentaram valores acima do percentual estabelecido pelo Ministério da Saúde. A partir disso, pode-se considerar as inflorescências de *Acmella oleracea* das duas cultivares como fonte de tais minerais.

Tabela 9 - Valores da composição de minerais de flores de jambu

Amostra	Fe	Ca	Zn	Mg	Mn	Cu
MP1	169,4±3,7 ^a	7818±2,23 ^b	40,8±2,38 ^{ab}	5227,4±1,3 ^a	0,29±0,1 ^{cd}	2,68±0,33 ^{ab}
MP2	189,3±3,0 ^a	8587±1,78 ^a	39,7±0,09 ^{abcd}	5095,0±1,5 ^{ab}	2,71±1,2 ^c	1,24±0,06 ^{abc}
MP3	212,3±2,5 ^a	6777,5±4,5 ^{cd}	36,2±0,2 ^{cde}	4727,7±4,1 ^{bc}	0,50±0,04 ^d	3,38±1,27 ^a
MP4	176,1±2,5 ^a	7095±2,06 ^c	35,7±0,7 ^e	4497,0±1,3 ^{cde}	1,67±0,8 ^d	1,73±0,6 ^{abc}
MP5	156,9±2,1 ^a	6147,2±2,3 ^d	39,9±0,6 ^{abc}	4249,1±8,9 ^{de}	9,72±0,5 ^b	1,75±0,42 ^{abc}
MP6	192,6±0,2 ^a	6267±1,73 ^d	42,3±0,8 ^a	4133,0±4,5 ^e	13,1±1,2 ^a	1,32±0,58 ^{bc}
MP7	228,9±1,1 ^a	6522,6±1,7 ^{cd}	37,7±0,8 ^{bcde}	4633,3±7,7 ^{cd}	8,79±0,4 ^b	2,69±2,00 ^{ab}
MP8	403,0±2,5 ^a	6373±2,56 ^d	35,8±0,4 ^{de}	4295,2±1,1 ^{de}	10,94±0,8 ^{ab}	0,43±1,34 ^{abc}

Valores expressos em mg/L. Dados representam a média ± desvio-padrão (base seca). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo Teste de Tukey.

5.3 Extração supercrítica

5.3.1 Determinação do fluxo de solvente

O rendimento global obtido na primeira etapa do processo de otimização, utilizando a metodologia descrita por Dias et.al. (2017), foi de 9,45±0,54% e este resultado foi superior ao obtido por estes autores. Esta diferença de rendimento pode ser explicada pelo método de cultivo realizado ou ainda pela diferença entre as espécies estudadas neste trabalho com a dos autores. Os resultados dos rendimentos obtidos na segunda etapa do processo de otimização foram de 9,04% e 9,00% para os tempos de 120 e 60 min, respectivamente e foram obtidos 95,66% e 95,24% de rendimento de extrato, comparando com a metodologia utilizada na primeira etapa. Estes valores indicam, levando em consideração o custo operacional do processo é possível interromper a extração no tempo de 120 minutos. Uma vez que se minimiza o custo do processo, sendo que nas extrações realizadas em 180min são consumidos 955,8 g de CO₂ e em 120 min são consumidos 637,2 g de CO₂. Além disso, há redução do consumo de energia e depreciação do equipamento de extração.

Na terceira etapa de otimização, o cálculo do fluxo de CO₂ para o tempo de 120min foi de 4,5L/min, utilizando a equação 4. Desta forma, o consumo de CO₂ manteve-se o mesmo (955,8g). No entanto, o custo energético do equipamento manteve-se reduzido. Considerando dados da literatura para o aumento de vazão, alguns autores afirmam que, quanto maior a taxa de fluxo, menor o tempo de extração (ÖZKAL et.al., 2005; GROSSO et.al., 2010). Com isso, durante a realização dos ensaios, observou-se que após 60 min de período dinâmico, a matriz sólida esgotava-se, e nos 60min restantes de operação, além da quantidade de extrato ser mínima ocorria congelamento da válvula micrométrica. Desta forma, todos os demais experimentos foram realizados a uma taxa de fluxo de solvente de 4,5L/min com tempo

dinâmico de extração de 60min, resultando em uma redução no consumo para 477,9g de CO₂. Desta maneira, foi realizada a otimização do processo. Duba & Fiori (2015) afirmam que para aplicações comerciais, o fluxo de solvente deve ser otimizado em termos de tempo de extração e volume de solvente consumido em cada operação.

5.3.2 Determinação do custo do processo

A determinação do custo do processo foi realizada primeiramente para a obtenção, preparo e armazenamento de matéria-prima, onde obteve-se um custo de R\$429,40 para obtenção de 3,822kg de amostras de inflorescências secas, trituradas e embaladas à vácuo. O custo das inflorescências *in natura* foi estipulado em R\$60,00/kg, baseado no valor de mercado em Belém-Pará. A tabela 10 apresenta os custos relacionados ao processamento de matéria-prima.

Tabela 10 - Custo de obtenção, preparo e armazenamento de matéria-prima

Atividade	Potência (Watts)	Unidades	Tempo (horas)	Valor (R\$)
Matéria-prima <i>in natura</i>	-	5,709kg	-	342,54
Secagem (estufa)	400	-	48	10,77
Moagem (moinho)	300	-	56	9,42
Armazenamento (Embalagem à vácuo)	-	24 un.	-	66,67
Total				429,40

Na segunda etapa, foi calculado o custo do processo de extração para o tempo de 60min de período dinâmico, que foi o tempo utilizado para todas as extrações, onde obteve-se um valor de R\$11,45 e estão apresentados na tabela 11. Foram utilizadas 10g de amostra e o custo da massa de CO₂ consumida foi calculada em relação ao valor de R\$5,00/kg, que representa o valor de mercado.

Tabela 11 - Custo de extração

Atividade	Potência (Watts)	Unidade	Tempo (horas)	Valor (R\$)
Matéria-prima	-	10g	-	3,84
Massa de solvente (CO ₂)	-	474g	-	2,37
Compressor	1.118,55	-	1	0,63
Bomba	5.500	-	1	3,09
Recirculador	840	-	1	0,47
Forno de extração	1.870	-	1	1,05
Total (R\$)				11,45

Para uma extração de 180 min de período dinâmico e vazão de 3L/mim, o custo de obtenção do extrato foi de R\$20,47 e para o tempo de 120 min, mantendo-se a mesma condição, o custo diminuiu para R\$13,66, porém o rendimento de extrato também diminuiu. Desta forma, foi possível realizar a redução do custo do processo por meio da avaliação do melhor fluxo de solvente, sendo reduzido o custo de consumo de energia e de solvente, mesmo com uma taxa de fluxo mais alta. O custo de matéria-prima manteve-se o mesmo, uma vez que essa etapa do processo é necessária e não há como otimizá-la.

5.3.2 Rendimentos globais de extração

Na tabela 12 são apresentados os valores médios de rendimento global de extração em base seca. O rendimento variou de um valor mínimo de 7,77% (MP5) a um valor máximo de 9,72% (MP4). Alguns autores relatam uma ampla faixa de rendimento de extrato para extração supercrítica de jambu. Dias et. al. (2017) relataram rendimento de 7,52% para a mesma condição adotada neste trabalho. Barbosa et. al. (2016) obtiveram rendimento de 1,61% de extrato para amostras obtidas sob diferentes processos de secagem, mas para uma condição de extração diferente (40°C e 300bar) deste trabalho. Blanco et. al. (2018) obtiveram rendimento de 3,5%, enquanto Cavalcanti (2008) obteve rendimento de 4,53% para diferentes tempos de extração. A distinção entre os resultados se dá não somente pela diferença entre condições operacionais, mas também por outros fatores que vão desde o pré-tratamento da matéria-prima até o tipo de solvente utilizado.

A variedade de cultivares e os fatores ambientais também podem desempenhar influência no rendimento de extração (FIORI et. al, 2014). Para o rendimento em massa de

extrato, neste trabalho foram observadas diferenças entre os períodos em que foram cultivadas as amostras de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen. Os maiores rendimentos obtidos foram para a estação úmida (MP1 a MP4), sendo as amostras com maior tempo de colheita, as que apresentaram maior rendimento de extrato nesta estação, não sendo observadas diferenças significativas entre as duas cultivares na estação úmida ($p \leq 0,05$). A estação seca não apresentou diferenças significativas entre os tempos de colheita e entre as cultivares. Portanto, nota-se que para efeito de rendimento em massa de extrato, os fatores avaliados neste trabalho (período de cultivo, tempo de colheita e cultivar) apresentaram diferença estatística apenas para o período de cultivo.

Tabela 12 - Valores médios de rendimentos globais, teor de espilantol e compostos fenólicos totais de extratos obtidos por extração supercrítica

Amostra	Rendimento (%)	Espilantol (%/A)	CFT (mg EAG/g de extrato)
MP1	9,31±0,05 ^{ab}	29,22±0,74 ^a	38,24±0,04 ^b
MP2	8,76±0,85 ^{ab}	19,82±0,03 ^d	43,04±0,01 ^a
MP3	9,7±1,15 ^a	18,14±0,03 ^e	18,14±0,04 ^f
MP4	9,72±0,26 ^a	25,89±0,04 ^c	25,89±0,03 ^d
MP5	7,77±0,33 ^b	11,29±0,04 ^g	11,29±0,04 ^h
MP6	8,05±0,40 ^b	27,35±0,35 ^b	27,35±0,02 ^c
MP7	8,01±0,13 ^b	19,89±0,04 ^d	19,89±0,05 ^e
MP8	8,34±0,43 ^b	16,53±0,04 ^f	16,53±0,01 ^g

Dados representam a média ± desvio-padrão (base seca). Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si, a 5% de probabilidade, pelo Teste de Tukey.

5.4 Análise dos extratos

5.4.1 Teor de espilantol por Cromatografia Gasosa

Os valores obtidos de teor de espilantol estão apresentados na tabela 12. Para uma única condição de extração adotada neste trabalho, foram obtidos diferentes percentuais de espilantol para as amostras avaliadas, variando de 11,29 a 29,22%. Comportamentos inversos entre as cultivares e as duas estações de cultivo foram observados. Para a estação chuvosa, o teor de espilantol aumentou com o tempo para a cultivar Jamburana, ocorrendo o inverso para a cultivar Nazaré. Para a estação seca, o teor de espilantol diminuiu com o tempo para a cultivar Jamburana e aumentou para a cultivar Nazaré. Estatisticamente, as amostras apresentaram diferenças entre si ($p \leq 0,05$), demonstrando que nenhum dos parâmetros avaliados (cultivar, tempo e período) apresentaram influência sob o teor de espilantol.

Os percentuais obtidos neste trabalho demonstram-se superiores aos encontrados na literatura (BLANCO et. al., 2018; BARBOSA et. al., 2016; DIAS et. al., 2017). Dentre os trabalhos encontrados para extração supercrítica de jambu, apenas Dias et. al. (2017) utilizaram as mesmas condições de temperatura e pressão, obtendo teores muito abaixo (2,6%) dos obtidos neste trabalho, tanto para a mesma condição quanto para todas as outras condições adotadas pelos autores. O trabalho de Dias et. al. (2012), apresenta um percentual de espilantol superior (65,4%) aos obtidos neste trabalho, para uma única condição operacional de 250bar e 50°C. Diferenças nos teores de substâncias são esperadas, uma vez que plantas apresentam metabolismo dependente do cultivo, que pode influenciar negativa ou positivamente na produção de determinados metabólitos secundários. Além disso, os métodos de preparo da amostra também exercem influência sob a obtenção de substâncias de interesse.

5.4.2 Análise de Compostos Fenólicos Totais (CFT)

Os resultados da análise de Compostos Fenólicos Totais (CFT) dos extratos, foram apresentados na tabela 12. Os valores obtidos variaram de 11,29 a 43,04 mg EAG/g extrato, apresentando diferenças estatísticas entre si ($p \leq 0,05$). As maiores concentrações fenólicas foram observadas na estação úmida (MP1 a MP4). De maneira geral, é possível observar que todas as amostras apresentaram diferenças entre si, para todos os parâmetros avaliados, demonstrando que o período de cultivo, tempo de colheita, e cultivar, não exerceram influência sobre o teor de CFT.

A biossíntese de compostos fenólicos tem sido descrita como responsável pela resposta da planta aos diversos causadores de estresse, incluindo escassez ou excesso de água, podendo esta última ter sido uma das causas dos maiores valores de CFT obtidos na estação úmida. Borges et. al. (2015), quantificaram o teor de compostos fenólicos totais nas folhas e inflorescências das cultivares Nazaré e Jamburana, sob fertilização orgânica e mineral, os autores observaram uma faixa de 292,81 a 307,59mg EAG/100g para a cultivar Jamburana e 271,50 a 303,95mg EAG/100g de amostra para a cultivar Nazaré, esta diferença em relação aos resultados obtidos neste trabalho pode ser justificada pela distinção entre os cultivos. Outros autores também investigaram o teor de fenólicos em *Acmella oleracea*, Rao et. al. (2012) avaliaram partes aéreas da planta, obtendo o maior valor de 38,83 mg/g, onde o extrato metanólico apresentou maior conteúdo fenólico. Dias et. al. (2012) obteve extratos com CO₂ supercrítico de flores de *Acmella oleracea*, com resultados variando de 0,60 a 2,49 % EAG, os autores avaliaram a extração supercrítica em duas etapas, com e sem utilização de cossolvente, além de utilizarem condição operacional de extração diferente da adotada neste trabalho.

Portanto, é esperado se obter resultados diferentes entre os trabalhos, uma vez que além dos métodos de extração serem diferentes, há também os fatores que interferem sob o metabolismo da planta, como clima e método de cultivo, por exemplo.

5.5 Atividade antinociceptiva

Os resultados apresentados na figura 11 mostram o efeito dose-dependente do extrato de *Acmella oleracea* sobre o número de contorções abdominais, induzidas pelo ácido acético 1%. Os animais testados na dose de 100 mg/kg não apresentaram diferença significativa quando comparados ao grupo controle, apresentando um percentual de inibição de 19,77%. Já os grupos testados nas doses de 200 e 300 mg/kg apresentaram diferença estatística quando comparados ao grupo controle com $p < 0,005$, apresentando percentuais de inibição de 46,43% e 49,5% respectivamente. Assim como a indometacina, que é o fármaco padrão, como já esperado, demonstrou uma diferença significativa quando comparado ao controle, apresentando um percentual de inibição de 53,96%. O extrato de *Acmella oleracea* na dose de 200mg/kg foi capaz de reduzir de maneira significativa o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. A dose de 300mg/kg apresentou percentual de inibição tão eficaz quanto à indometacina.

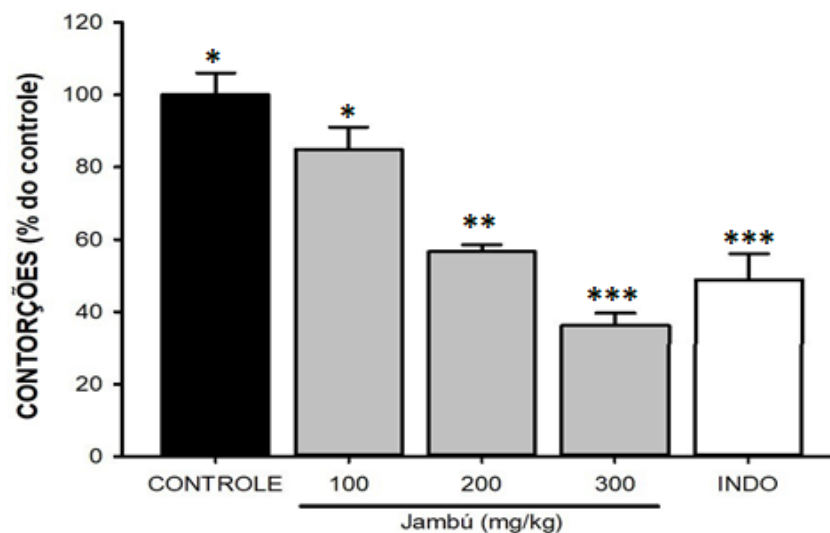


Figura 11 - Efeito do extrato de *Acmella oleracea* e Indometacina sobre o estímulo nociceptivo induzido pelo ácido acético 1% em camundongos

Cada coluna representa média \pm e.p.m de 10 animais. $P < 0,05$, quando comparado ao grupo controle.

Na literatura, não há relatos de teste de atividade analgésica periférica com extrato de

Acmella oleracea, logo, este estudo apresenta relevância no meio científico. Porém, são necessárias análises mais completas, uma vez que a atividade do extrato neste teste não é conclusiva, onde a mesma demonstra apenas se o extrato possui ou não atividade antinociceptiva de origem anti-inflamatória. Resultados conclusivos podem ser obtidos por meio da realização de testes complementares como o teste de formalina e teste de placa quente. Embora o teste de contorções não tenha uma especificidade, alguns estudos o correlacionam às doses utilizadas neste teste em roedores com doses utilizadas em humanos (DUBINSKY et. al., 1987).

6 CONCLUSÕES

Neste trabalho, foram avaliadas possíveis diferenças entre flores de duas cultivares de jambu. Para isso, foram avaliados o período de cultivo (estação chuvosa e estação seca) e tempo de colheita (61 e 76 dias). Os resultados de colheita, demonstraram maiores rendimentos de biomassa para a estação chuvosa, variando de 242,7g a 567,0g. Os teores de Fe, Ca, Zn e Mg obtidos, demonstraram que as flores podem ser consideradas como fonte de tais minerais, baseado nos percentuais estabelecidos pelo Ministério da Saúde (15 a 29%). Os resultados de rendimento global, teor de espilantol e compostos fenólicos totais apresentaram os maiores valores para a estação chuvosa e nos menores tempos de colheita (61 dias). O aumento da taxa de fluxo de solvente resultou no aumento do rendimento de extração e consequentemente na redução do custo de energia elétrica do processo de R\$20,47 para R\$11,45 e na redução do consumo de solvente de 955,8g para 477,9g. O teste de atividade antinociceptiva para a maior concentração de extrato (300mg/kg) apresentou percentual de inibição (49,5%) tão eficaz quanto ao obtido com a droga padrão indometacina (53,96%). De maneira geral, foi possível observar neste trabalho que as flores das duas cultivares de *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre si para as análises de teor de espilantol e compostos fenólicos totais. Desta forma, a partir dos dados avaliados pode-se concluir que não houve distinção entre a cultivar Nazaré e Jamburana, mas que possíveis estresses hídricos (falta ou escassez de água) podem afetar na produção desses metabólitos secundários do vegetal.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Diante dos resultados apresentados e conclusões obtidas neste trabalho, sugere-se:

- Realizar o isolamento do marcador químico (espilantol).
- Obter as curvas globais de extração a partir dos dois valores de fluxo de solvente testados neste trabalho, para avaliar o teor de espilantol em cada intervalo.
- Realizar avaliação mais completa do custo do processo em escala analítica.
- Realizar outros testes biológicos de atividade analgésica para se obter resultados mais conclusivos.

8 LISTA DE PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O MESTRADO

8.1 Artigos publicados em periódicos

CORRÊA, B. S.; SILVA, R. C.; VILHENA, M. B.; **SILVA, A. P. S.** The application of demand forecast models: case study on bearing factory. JOURNAL OF ENGINEERING AND TECHNOLOGY FOR INDUSTRIAL APPLICATIONS. 2018.

CORDEIRO, R. M.; **SILVA, A. P. S.**; PINTO R.H.H.; COSTA, W. A.; SILVA, S. H. M.; PINHEIRO, W. B. S.; ARRUDA, M. S. P.; CARVALHO JUNIOR, R. N. Supercritical CO₂ extraction of ucuúba (*Virola surinamensis*) seed oil: Global yield, kinetic data, fatty acid profile, and antimicrobial activities. CHEMICAL ENGINEERING COMMUNICATIONS, 2018.

8.2 Artigos submetidos para publicação em periódicos

PIRES, F. C. S.; **SILVA, A. P. S.**; SALAZAR, M. A. R.; COSTA, W. A.; COSTA, H. S. C.; LOPES, A. S.; ROGEZ, H.; CARVALHO Jr., R. N. Determination of process parameters and bioactive properties of the murici pulp (*Byrsonima crassifolia*) extracts obtained by supercritical extraction. THE JOURNAL OF SUPERCRITICAL FLUIDS, 2018.

CORRÊA, B. S.; COSTA, M. S.; CABRERA-PASCA, G. A.; SENA, C.; PINTO, R. H. H.; **SILVA, A. P. S.**; CARVALHO Jr., R. N.; ISHIDA, L.; RAMOS, J. G. A.; FREITAS, R. S.; SAIKI, M.; MATOS, I. T.; CORRÊA, E. L.; CARBONARI, A. W. Magnetic properties of Fe₃O₄ small nanoparticles coated with natural oils: observation of a large increase in the magnetization. JOURNAL OF ALLOYS AND COMPOUNDS, 2018.

COSTA, W. A.; BEZERRA, F. W. F.; OLIVEIRA, M. S.; BEZERRA, P. N.; PIRES, F. C. S.; **SILVA, A. P. S.**; CRUZ, J. N.; BRASIL, D. S. B.; CARVALHO JR., R. N. Obtainment, Applications and Future Perspectives of Palm Kernel. JOURNAL OF SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2018.

8.3 Capítulos de livros publicados

SILVA, A. P. S.; COSTA, W. A.; SALAZAR, M. A. R.; BEZERRA, P. N.; PIRES, F. C. S.; FERREIRA, M. C.; MENEZES, E. G. O.; URBINA, G. R. O.; BARBOSA, J.; CARVALHO Jr.; R. N. Therapeutic potential of fat acids in diseases treatments and preventions. In: Fatty Acids. Xed Rijeka. InTech, 2018.

OLIVEIRA, M. S.; ALMEIDA, M. M.; SALAZAR, M. A. R.; PIRES, F. C. S.; BEZERRA, F. W. F.; CUNHA, V. M. B.; CORDEIRO, R. M. C.; URBINA, G. R. O.; SILVA, M. P.; **SILVA, A. P. S.**; PINTO, R. H. H.; CARVALHO Jr., R. N. Potential of medicinal use of essential oils from aromatic plants. Potential of Essential Oils. Xed Rijeka. InTech, 2018.

PIRES, F. C. S.; ALMEIDA, M. M.; **SILVA, A. P. S.**; SALAZAR, M. A. R.; URBINA, G. R. O.; SILVA, P. S.; SILVA, S. G.; BEZERRA, P. N.; MARQUES-DA-SILVA, S. H.; CARVALHO JUNIOR, R. N. Therapeutic potential of extracts from Amazonian plants with antimicrobial activity. In: Méndez-Vilas, A. (Ed.). Antimicrobial research: Novel bioknowledge and educational programs. Badajoz: Formatex Research Center, 2017, v. 6, p. 504-515.

8.4 Trabalhos completos publicados em anais de congressos

SILVA, A. P. S.; BATISTA, C. C. R.; SILVA, M. P.; COSTA, W. A.; TUMA, J. C.; BEZERRA, P. N.; CORDEIRO, R. M.; CARVALHO, A. R. B.; FERREIRA, G. C. CARVALHO Jr., R. N. Cinética de extração do óleo da polpa de açaí (*Euterpe oleracea*) com CO₂ supercrítico: experimentos e modelagem matemática. In: 58º Congresso Brasileiro de Química, 2018, São Luís.

COSTA, W. A.; BEZERRA, F. W. F.; OLIVEIRA, M. S.; BEZERRA, P. N.; CRUZ, J. N.; SILVA, S. G.; SILVA, C. C.; **SILVA, A. P. S.**; PINTO, R. H. H.; CARVALHO Jr., R. N. Composição de ácidos graxos de óleo de palmiste obtido por extração supercrítica. In: 58º Congresso Brasileiro de Química, 2018, São Luís.

COSTA, W. A.; BEZERRA, F. W. F.; OLIVEIRA, M. S.; BEZERRA, P. N.; CRUZ, J. N.; SILVA, S. G.; **SILVA, A. P. S.**; SILVA, C. C.; FERREIRA, M. C. R.; CARVALHO Jr., R. N. Transesterificação supercrítica de óleo de palmiste usando metanol. In: 58º Congresso Brasileiro de Química, 2018, São Luís.

SILVA, A. P. S.; MENEZES, E. G. O.; SALAZAR, M. A. R.; URBINA, G. R. O.; ARAÚJO, M. E.; CARVALHO Jr., R. N. Predição da solubilidade de constituintes do óleo de jambu em CO₂ supercrítico, utilizando contribuição de grupos e equações de estado. In: Congresso brasileiro de ciência e tecnologia de alimentos, Belém. CBCTA, 2018.

SILVA, A. P. S.; SOUSA, S. H. B.; SALAZAR, M. A. R.; URBINA, G. R. O.; PIRES, F. C. S.; CARVALHO Jr., R. N. Influência da sazonalidade nos teores de compostos fenólicos e da capacidade antioxidante de flores de duas cultivares de jambu (*Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen). In: Congresso brasileiro de ciência e tecnologia de alimentos, Belém. CBCTA, 2018.

TUMA, J. C.; PINTO, R. H. H.; CORDEIRO, R. M.; CORDEIRO, COSTA, W. A.; **SILVA, A. P. S.**; CARVALHO Jr., R. N. Cinética de secagem da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.). In: Congresso brasileiro de ciência e tecnologia de alimentos, Belém. CBCTA, 2018.

SALAZAR, M. A. R.; URBINA, G. R. O.; **SILVA, A. P. S.**; CUNHA, V. M. B.; SILVA, M. P.; CARVALHO Jr., R. N. Obtenção da fração enriquecida em flavonoides do extrato etanólico do *Cissus sicyoides* L. a partir de extração em fase sólida e identificação por cromatografia líquida de alta eficiência.). In: Congresso brasileiro de ciência e tecnologia de alimentos, Belém. CBCTA, 2018.

URBINA, G. R. O.; SALAZAR, M. A. R.; **SILVA, A. P. S.**; CUNHA, V. M. B.; SILVA, M. P.; CARVALHO Jr., R. N. Determinação da composição química do óleo essencial das folhas de cipó-de-alho (*Mansoa standleyi*) obtido por hidrodestilação. In: Congresso brasileiro de ciência e tecnologia de alimentos, Belém. CBCTA, 2018.

CORRÊA, B. S.; **SILVA, A. P. S.**; PAES, S. C. P.; COSTA, M. S.; COSTA, C. S.; CARVALHO Jr, R. N. C.; CARBONARI, A.W. Óleo de açaí como alternativa na síntese e revestimento de nanopartículas de óxido de ferro. In: 15º Encontro de profissionais da química da Amazônia, 2017, Belém. XVV EPQA, 2017.

COSTA, W. A.; SILVA, C. J.; LIMA, C. R.; OLIVEIRA, M. S.; GARCIA, K. C. S. P.; SANTOS, A. P. M.; **SILVA, A. P. S.**; CARVALHO JUNIOR, R. N.; MARTELLI, M. C.; BRASIL, D. S. B. Propriedades físicas da adsorção de btx sobre carvão ativado. In: 15º Encontro de profissionais da química da Amazônia, 2017, Belém. XVV EPQA, 2017.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, F.; M. S. T. SELIM, A. K. DAS, AND M. S. K. CHOUDHURI, “Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Lippia nodiflora* Linn,” *Pharmazie*, vol. 59, no. 4, pp. 329–333, 2004.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. Washington, 1997.

ARTARIA, C.; MARAMALDI, G.; BONFIGLI, A.; RIGANO, L.; APPENDINO, G. Lifting properties of the alkamide fraction from the fruit husks of *Zanthoxylum bungeanum*. *Int J Cosmet Sci.* v.33, p.328-33, 2011.

ASAE. AMERICAN SOCIETY OF AGRICULTURAL ENGINEERS. Method of determining and expressing particle size of chopped forage materials by screening. St. Joseph, p.562-564. (ASAE Standards S424.1), 1998.

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.

BARUAH, R.N. Characterization of the essential oil from flower heads of *Spilanthes acmella*. *Journal of Essential Oil Research.* v. 5, p.693-695, 1993.

BERTUCCO, A., VETTER, G. High pressures process technology: Fundamentals and applications. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science B.V., p. 659, 2001.

BJÖRKLUND, E., JARENO, M., MATHIASON, L., JÖNSSON, J. A., KARLSSON, L. Illustration of important mechanisms controlling mass transfer in supercritical fluid extraction. *Analitica Chimica Acta.* v. 368, p.117-128, 1998.

BLANCO, V. S. F.; MICHALAK, B.; ZELIOLI, I. A. M.; OLIVEIRA, A. S. S.; RODRIGUES, M. V. N.; FERREIRA, A. G.; GARCIA, V. L.; CABRAL, F. A.; BEIJO, A. K.; RODRIGUES, R. A. F. Isolation of spilanthol from *Acmella oleracea* based on Green Chemistry and evaluation of its *in vitro* anti-inflammatory activity. *The Journal of Supercritical Fluids.* V. 140, p. 372-379, 2018.

BOONEN, J.; BAERT, B.; BURVENICH, C.; BLONDEEL, P.; SAEGER, S.; SPIEGELEER, B. LC–MS profiling of N-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the

BORGES, L. S.; VIEIRA, M. C. S.; VIANELLO, F.; GOTO, R.; LIMA, G. P. P. Antioxidant compounds of organically and conventionally fertilized jambu (*Acmella oleracea*). *Biological Agriculture & Horticulture.* V. 32, p. 149-158, 2015.

BRUNNER, G. Gas extraction: An introduction to fundamentals of supercritical fluids and the applications to separation processes. New York, USA: Steinkopff Darmstadt Springer, 1994, 387 p.

BUNYAPRAPHATSARA, N.; CHOKECHAREUNPORN, O. *Tradition medicinal plants*; Prachachon: Bangkok, 1999.

CAMPOS-CUEVAS, J.C; PELAGIO-FLORES, R.; RAYA-GONZALEZ, J.; MENDEZ-BRAVO, A.; ORTIZ-CASTRO, R. & LOPEZ-BUCIO, J. Tissue culture of *Arabidopsis thaliana* explants reveals a stimulatory effect of alkalimides on adventitious root formation and nitric oxide accumulation. *Plant Science*, v.174, pp. 165–173, 2008.

CASTRO KNC, LIMA DF, VASCONCELOS LC, LEITE JRSA, SANTOS RC, PAZ NETO AA, COSTA-JÚNIOR LM, Acaricide activity in vitro of *Acmella oleracea* against *Rhipicephalus microplus*. *Parasitol Res*, 2014, 3697-3701, 113.

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

CHAKRABORTY A, DEVI BRK, RITA S, SHARATCHANDRA K, SINGH TI. Preliminary studies on antiinflammatory and analgesic activities of *Spilanthes acmella* Murr. In experimental animal models. *Indian J Pharmacol* 2004;36:148-50.

CHOPRA, R.N.; NAYARA, S.L.; CHOPRA, I.C. *Glossary of Indian medicinal plants*; Council of Scientific & Industrial Research: New Delhi, 1956; pp. 168-169.

CHUNG, K.F.; KONO, Y; WANG, C.M.; PENG, C. Notes on *Acmella* (*Asteraceae: Heliantheae*) in Taiwan. **Botanical Studies**, v.49, p.73-82, jun./dez.2008.

CORDEIRO, R. M., Obtenção de Gordura das Sementes de Ucuúba (*Virola surinamensis*) por Meio de Extração com CO₂ em Estado Supercrítico: Rendimento Global, Dados Cinéticos, Ácidos Graxos Totais e Atividade Antimicrobiana. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química), Universidade Federal do Pará. Belém, 2015.

COSTA, S.S.; ARUMUGAM, D.; GARIEPY, 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.

COUTINHO, L.N.; APARECIDO, C.C.; FIGUEIREDO, M.B. Galls and deformatios on jambu (*Spilanthes oleracea*) caused by *Tecaphora Spilanthes* (Ustilaginales). **Summa Phytopathologica**, v.32, p.283-285, 2006.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural products (secondary metabolites). **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. 2.ed. American Society of Plant Physiologists, 2000.

D'ARMOUR FE, SMITH DL. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* 1941;72:74-9.

DEMARNE, F.; PASSARO, G. Use of an *Acmella oleracea* extract for its botox-like effect in an antiwrinkle cosmetic composition. FR Pat. 286513; ago. 2005.

DI STASI, L. C. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. São Paulo: Editora UNESP. p.472-483, 2002.

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

DIAS, A.M.A; DA SILVA, A.C.S; BOTELHO, J.R.S; JUNIOR, R.N.C.; DE SOUSA, H.C.; BRAGA, M.E.M. Temperature and density effects of the scCO₂ extraction of spilanthol from *Spilanthes acmella* flowers. **The journal of supercritical fluids**. v.121, p.32-40, 2017.

DUBA, K. S.; FIORI, L. Supercritical CO₂ extraction of grape seed oil: Effect of process parameters on the extraction kinetics. **J. Supercritical Fluids**. v. 98, p. 33-43, 2015

DUBINSKY, B.; GEBRE-MARIAM, S.; CAPETOLA, R. J.; ROSENTHALE, M. E. The analgesic drugs: human therapeutic correlates of their potency in laboratory animal models of hyperalgesia. **Agents Actions**, vol 20, p.50–60, 1987.

EGGERS, R., AMBROGI, A., SCHNITZLER, J. Special features of SCF solid extraction of natural products: Deoiling of wheat gluten and extraction of rose hip oil. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*, v.17, n.3, p. 1-7, 2000.

FARNSWORTH, N.R.; BUNYAPRAPHATSARA, N. *Thai medicinal plants recommended for primary health care system*; Prachachon: Bangkok, 1992.

FERREIRA, S. da C.; CARVALHO-OKANO, R.M. de; NAKAJIMA, J.N. A família Asteraceae em um fragmento florestal, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v.60, n.4, p.903-942, 2009.

FIORI, L.; LAVELLI, V.; DUBA, K. S.; HARSHA, P. S. C. S.; MOHAMED, H. B.; GUELLA, G. Supercritical CO₂ extraction of oil from seeds of six grape cultivars: Modeling of mass transfer kinetics and evaluation of lipid profiles and tocol contents. **J. Supercritical Fluids**. v. 94, p. 71-80, 2014.

FRANÇA, J.V; QUEIROZ, M.S.R.; AMARAL, B.P; SIMAS, N.K.; SILVA, N.C.B.; LEAL, I.C.R. Distinct growth and extractive methods of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen rising different concentrations of spilanthol: An important bioactive compound in human dietary. **Food research international**. v.89, p.781-789, 2016.

GERBER E. 1903. Ueber die chemischen Bestandteile der Parakresse (*Spilanthes oleracea*, Jacquin). *Arch Pharm* 241: 270–289.

GOKHALE VG, BHIDE BV. Chemical investigation of *Spilanthes acmella* Murr. **J. Ind. Chem. Soc.**, v.22, p.250–252, 1945.

GREGER H. Comparative phytochemistry of the alkylamides. In *Chemistry and Biology of Naturally-occurring Acetylenes and Related Compounds (NOARC)*, Lam J, Breteler H, Arnason T, Hansen L (eds). v.7, p.159-178, 1988.

GROSSO, C.; COELHO, J.P.; PESSOA, F.L.P.; FARELEIRA, J.M.N.A.; BARROSO, J.G.; URIETA, J.S.; PALAVRA, A.F.; SOVOVÁ, H. Mathematical modelling of supercritical CO₂ extraction of volatile oils from aromatic plants, **Chemical Engineering Science**. v.65, p. 3579–3590, 2010.

GUSMÃO, M.T.A.; GUSMÃO, S.A.L. Jambu da Amazônia [*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen]: características gerais, cultivo convencional, orgânico e hidropônico. Universidade Federal Rural da Amazônia. v.1, 135p. 2013.

GUSMÃO, S.A.L.; GUSMÃO, M.T.A.; VELASCO, W.; SILVESTRE, D.; LOPES, P.R.A. Caracterização do cultivo de jambu nas áreas produtoras que abastecem a grande Belém. **Associação Brasileira de Horticultura**. 2006. Disponível em www.abhorticultura.com.br/Biblioteca/Default.asp. Acesso em: 01 jul. 2017.

HAW AB, KENG CL. Micropropagation of *Spilanthes acmella* L., a bio-insecticide plant, through proliferation of multiple shoots. **J. Appl. Hort.** v.5(2), p.65-68, 2003.

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

JANSEN, R.K. Systematics of *Spilanthes* (Compositae: Heliantheae). **Syst. Bot.** v.6, p.231-257, 1981.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; ABRAHAM, G.T.; SHAFI, M.P. Chemical composition and olfatoric characterization of *Acmella radicans* (Jacq.) R.K. Jansen var. *radicans* from southern India, **Flavour and Fragrance Journal**. v.21, p.88-91, 2006.

JONDIKO, I. J. O. "A mosquito larvicide in *Spilanthes mauritiana*," **Phytochemistry**, vol. 25, no. 10, pp. 2289-2290, 1986.

JYOTHI G, WILLIAM MC, RAVI KB, KRISHNA MG. Antinociceptive and anti-inflammatory activity of methanolic extract of leaves of *Shorea Robusta*. **Pharmacologyonline** 2008;1:9-19.

KOSSEL, A. Über die Chemische Zusammensetzung der Zelle, **Archiv für Physiologie**. 181-186, 1891.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DEBEER, E. J. M. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc**, vol 18, p.412, 1959.

KRISHNASWAMY, N. R.; S. PRASANNA, T. R. SESHANDRI, AND T. N. C. VEDANTHAM, " α - and β -Amyrin esters and sitosterol glucoside from *Spilanthes acmella*," **Phytochemistry**, vol. 14, no. 7, pp. 1666-1667, 1975.

LANG, Q., WAI, C. M. Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies- a practical review. **Talanta**, v.53, p.771-782, 2001.

LAROZE, L.E. et.al. Extraction of antioxidants from several berries pressing wastes using conventional and supercritical solvents. **European food research and technology**. v.231, p.669-677, 2010.

LEMO, T.L.G.; PESSOA, O.D.L.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; CRAVEIRO, A.A. The essential oil of *Spilanthes acmella* Murr. **Journal of Essential Oil Research**. v. 3, p. 369-370, 1991.

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 Plant Res**. v.5, p.371-8, 2011.

LEY, J. P., KRAMMER, G., BERTRAM, H. J. Structure activity relationships of trigeminal effects for artificial and naturally occurring alkamides related to spilanthol. In Proceedings of the 11th Weurmann Flavour Research Symposium, Roskilde, Denmark. June, 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A.; Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas. **Nova Odessa**: Instituto plantarum de estudos da Flora LTDA. 512p. 2002.

MAHENDRA, R.; DEEPAK, A.; ARCHANA, S.; AJIT, V. Positive growth responses of the medicinal plants *Spilanthes calva* and *Withania somnifera* to inoculation by *Piriformospora indica* in a field trial. **Mycorrhiza**, v.11, p.123-128, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de vigilância sanitária. Regulamento técnico referente à informação nutricional complementar. Portaria Nº 27 de 13 de janeiro de 1998.

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

MONDAL, A. K.; S. PARUI, AND S. MANDAL, “Analysis of the free amino acid content in pollen of nine Asteraceae species of known allergenic activity,” *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*, vol. 5, no. 1, pp. 17–20, 1998.

MOREIRA, V.M.; J. G.MAIA, J. M. DE SOUZA, Z. A. Bortolotto, and E. A. Cavaleiro, Characterization of convulsions induced by a hexanic extract of *Spilanthes acmella* var. *oleracea* in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 22, pp. 65–67, 1989.

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.

MUKHARYA, D.K.; ANSARI, A.H. Olean-12-en-3-O-beta-D-galactopyranosyl (1→4)-O-alpha Lrhamnopyranoside: A new triterpenoidal saponin from the roots of *Spilanthes acmella* (Murr.). **Indian Journal of Chemistry B**. 26:86, 1987.

NAGAI, K.; KISHIMOTO, A. Manejo do solo e adubação. Equilíbrio nutricional. Melhoramento do solo. Saúde da planta. **Guatapará**: IPTDA, JATAK, p.71, 2008.

NAIR JJ, AREMU AO, VAN STADEN J. Antiinflammatory effects of *Leucosidea sericea* (Rosaceae) and identification of the active constituents. *S Afr J Bot* 2012;80:75-6.

NARAYANA, K.R.; M. S. REDDY, M. R. CHALUVADI, AND D. R. KRISHNA. Bioflavonoids classification, pharmacological, biochemical effects and therapeutic potential. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 33, pp. 2–16, 2001.

ÖZKAL, S.G.; YENER, M.E.; BAYINDIRLI, L. Mass transfer modeling of apricot kernel oil extraction with supercritical carbon dioxide, **J. Supercritical Fluids**. v.35, p. 119–127, 2005.

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.

PAULRAJ, J.; GOVINDARAJAN, R.; PALPU, P. The genus *Spilanthes* ethnopharmacology, phytochemistry, and pharmacological properties: A review. **Advances in Pharmacological Sciences**. p.1-23, 2013.

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

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Grandezas físicas e termofísicas. In: MEIRELES, M. A. A; PEREIRA, C.G. Fundamentos de Engenharia de alimentos. Atheneu, São Paulo, 2013, v. 6, cap. 11, p. 387-404.

PERRY, L.M.; METZGER, J. *Medicinal plants of East and South-East Asia*; MIT Press: Cambridge, 1980.

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

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

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

RAMSEWAK, R. S.; A. J. ERICKSON, AND M. G. NAIR, “Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. **Phytochemistry**, vol. 51, no. 6, pp. 729–732, 1999.

RAO, M.; RAO, B. G.; RAO, Y. V. Antioxidant activity of *Spilanthes acmella* extracts. **International Journal of Phytopharmacology**. V. 3, p. 216-220, 2012.

RATNASOORIYA WD, PIERIS KPP. Attenuation of persistent pain and hyperalgesia by *Spilanthus acmella* flowers in rats. *Pharm Biol* 2005;43:614-9.

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

REVERCHON, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 10, p.1-37, 1997.

REVERCHON, E., DE MARCO, I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter- Review. **Journal of Supercritical Fluids**, v.38, p. 146-166, 2006.

REVILLA, J. Plantas da Amazônia: Oportunidades Econômicas sustentáveis. Manaus : INPA, 405p, 2001.

RIOS, M.R.; OLIVO, H.F. Natural and synthetic alkylamides: applications in pain therapy. **Atta-Ur-Rahman (Ed.)**, Studies in Natural Products Chemistry, Elsevier, New York, pp. 79-118, 2014.

RIOS, M.Y. Natural Alkamides: Phamacology, Chemistry and Distribution. *Drug Discovery Research in Pharmacognosy*. p. 107-144, 2012.

ROSA, P. T. V.; PARAJÓ, J. C.; DOMÍNGUEZ, H.; MOURE, A.; DÍAZ-REINOSO, B.; R. L. SMITH, JR.; TOYOMIZU, M.; FLORUSSE, L. J.; PETERS, C. J.; GOTO, M.; LUCAS, S.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical and pressurized fluid extraction applied to the food industry. In: MEIRELES, M. A. A. Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications, CRC Press, New York, 2009. cap. 6, p. 269-402.

SADAVONGVIVAD C, SUPAVILAI P. Three monohydroxycoumarins from *Alyxia lucida*. *Phytochemistry* 1977; 16:1451.

SAHU J, JAIN K, JAIN B, SAHU RK. A review on phytopharmacology and micropropagation of *Spilanthes acmella*. *Pharmacologyonline newslett*. v.2, p.1105-10, 2011.

SALDAÑA, M.D.A. Extração de alcalóides de produtos naturais com fluido supercrítico. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade Estadual de Campinas, 2002. 287 p. Tese (Doutorado).

SARAF, D. K. AND V. K. DIXIT. “*Spilanthes acmella* Murr.: study on its extract spilanhol as larvicidal compound,” *Asian Journal Experimental Science*, vol. 16, no. 1-2, pp. 9–19, 2002.

SARITHA KV, NAIDU CV. High frequency plant regeneration and in vitro flowering of regenerated plantlets of *Spilanthes acmella* Murr – An important threatened bio-insecticide medicinal plant, *Acta Horticulturae*. v.756, p.183-198, 2007.

SAVADI, R.V.; YADAV, R.; YADAV, N. Study on immunomodulatory activity of ethanolic extract of *Spilanthes acmella* Murr. leaves. *Indian Journal of Natural Products and Resources*. V.1(2), p.204-207, 2010.

SHARMA, A.; V. KUMAR, R. S. RATTAN, N. KUMAR, AND B. SINGH, “Insecticidal toxicity of Spilanhol from *Spilanthes acmella* Murr. against *Plutella xylostella*,” *American Journal of Plant Sciences*, vol. 3, pp. 1568–1572, 2012.

SHARMA, V.; J. BOONEN, N. S. CHAUHAN, M. THAKUR, B. DE SPIEGELEER, AND V. K. DIXIT, “*Spilanthes acmella* ethanolic flower extract: LC-MS alkylamide profiling and its effects on sexual behavior in male rats,” *Phytomedicine*, vol. 18, no. 13, pp. 1161–1169, 2011.

SIMÕES, C. M. O.; SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. Porto Alegre, UFRGS, Florianópolis, UFSC, 2003. p. 403, 498.

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

SOVOVÁ, H.; KUČERA, J.; JEŽ, J. Rate of the vegetable oil extraction with supercritical 142 CO₂ – II. Extraction of grape oil. *Chemical Engineering Science*, v.49, n.3, p.415-420, 1994.

TANWER BS, CHOUDHARY RK, VIJAYVERGIA R. *In vitro* and *in vivo* Comparative Study of Primary Metabolites and Antioxidant Activity in *Spilanthes Acmella* Murr. *International Journal of Biotechnology and Biochemistry*. v.6(5), p.819–825, 2010.

TIWARI K.L.; JADHAV S.K.; JOSHI V. An updated review on medicinal herb genus *Spilanthes*. **Chin J Integr Med.** v.9, p.1170-8, 2011.

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

VERYSER, L.; TAEVERNIER, L.; ROCHE, NT.; BLONDEEL, P. Implementation of a single quad MS detector in high-throughput transdermal research of plant extracts. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.115, p. 594-602, 2015.

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, p. 322-327, 1996.

WHITTLE, B. A. "The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic & non-narcotic analgesics. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, vol. 22, pp. 246–249, 1964.

WILASINEE SUWANJANG, BONGKOT KHONGNIAM, SUJITTRA SRISUNG, SUPALUK PRACHAYASITTIKUL, VIRAPONG PRACHAYASITTIKUL, Neuroprotective effect of *Spilanthes acmella* Murr. on pesticide-induced neuronal cells death, **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, 1-7, 2017.

WINK, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. **Phytochemistry**. v.64, p.3-19, 2003.

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** 2008;9:2724-44.

WU, L.-C.; N.-C. FAN, M.-H. LIN ET AL. 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, pp.2341–2349, 2008.

YADAV K, SINGH N. Micropropagation of *Spilanthes acmella* Murr. – An Important Medicinal Plant. **Nature and Science**, v. 8(9), p.5-11, 2010.

ANEXO I – Certificado do comitê de ética animal da Ufpa



UFPA
Universidade Federal do Pará

**Comissão de Ética no
Uso de Animais**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA E DAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DA ESPÉCIE *ACMELLA OLERACEA* (L.) R.K. JANSEN", protocolada sob o CEUA nº 5628170418 (000000), sob a responsabilidade de **Enéas de Andrade Fontes Júnior** e equipe; Ana Paula de Souza e Silva; Raul Nunes de Carvalho Júnior; Mayra Arouck Barros; Enéas de Andrade Fontes Júnior; Cristiane do Socorro Ferraz Maia; Jane Cecília Silveira de Matos - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) na reunião de 24/05/2018.

We certify that the proposal "INVESTIGATION OF ACUTE ORAL TOXICITY AND PHARMACOLOGICAL PROPERTIES OF *ACMELLA OLERACEA* (L.) R.K. JANSEN", utilizing 84 Heterogenics mice (84 males), 12 Heterogenics rats (12 females), protocol number CEUA 5628170418 (000000), under the responsibility of **Enéas de Andrade Fontes Júnior** and team; Ana Paula de Souza e Silva; Raul Nunes de Carvalho Júnior; Mayra Arouck Barros; Enéas de Andrade Fontes Júnior; Cristiane do Socorro Ferraz Maia; Jane Cecília Silveira de Matos - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 05/24/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de 05/2018 a 08/2018

Área: **Farmacologia da Infamação E do Comportamento - Lafico**

Origem:	Biotério Central ICB/UFPA			
Espécie:	Camundongos heterogênicos	sexo:	Machos	Idade: 5 a 6 semanas
Linhagem:	Swiss			N: 84
				Peso: 25 a 35 g
Origem:	Biotério Central ICB/UFPA			
Espécie:	Ratos heterogênicos	sexo:	Fêmeas	Idade: 7 a 8 semanas
Linhagem:	Wistar			N: 12
				Peso: 150 a 200 g

Local do experimento: **Laboratório de Farmacologia da Infamação e do Comportamento - LAFICO**

Belé, 29 de maio de 2018

M^a Vivina B. Monteiro

Profa. Dra. Maria Vivina Barros Monteiro
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará

Vanessa J. de Mello

Profa. Dra. Vanessa Jola de Mello
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará