

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Abordagem química e investigação do efeito anti-inflamatório de *Acmella oleracea* (L.)
R.K. Jansen em modelos pré-clínicos

RENAN STEIN

Porto Alegre, 2020

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Abordagem química e investigação do efeito anti-inflamatório de *Acmella oleracea*
(L.) R.K. Jansen em modelos pré-clínicos

Dissertação apresentada por Renan Stein
como requisito parcial à obtenção do título
de Mestre em Ciências Farmacêuticas
junto ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Farmacêuticas, Universidade
Federal do Rio Grande do Sul.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Luis Konrath

Porto Alegre, 2020

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado Acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31 de março de 2020, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dr. Gilsane Lino Von Poser
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Grace Gosmann
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dr. Mirna Bainy Leal
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

CIP - Catalogação na Publicação

Stein, Renan
Abordagem química e investigação do efeito
anti-inflamatório de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen
em modelos pré-clínicos / Renan Stein. -- 2020.
128 f.
Orientador: Eduardo Luis Konrath Konrath.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre,
BR-RS, 2020.

1. *Acmella oleracea*. 2. N-alquilamidas. 3.
Espilantol. 4. Quimase. 5. Inflamação. I. Konrath,
Eduardo Luis Konrath, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacognosia do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Parte fundamental deste trabalho foi realizada no Laboratório de Bioquímica Farmacológica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, sob a supervisão do Dr. Markus Berger. As análises cromatográficas foram realizadas no Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, sob a supervisão do Prof. Dr. Eliseu Rodrigues. A pesquisa foi financiada pelo CNPq e CAPES.

AGRADECIMENTOS

Falar de agradecimentos é relembrar o verdadeiro sentido de colaboração. Dois anos de aprendizado se passaram, marcados pela presença de pessoas queridas e essenciais para a criação e desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores do PPGCF pela sabedoria compartilhada através das aulas, palestras ou conversas, provocando dúvidas, desconstruindo e desmistificando temas importantes para o andamento das atividades acadêmicas e principalmente por transpor minha zona de conforto, permitindo com que as visões fossem ampliadas e transcendidas como ser científico.

Aos meus colegas de laboratório, Kelin, pela admiração em sua dedicação, Vic, pelo riso fácil e descontraído, Rafa pelas piadas, Dani e Carol, pela troca de experiências e desabafos, especialmente ao meu IC Leo, pela parceria e reflexão sobre assuntos delicados e decisivos dentro do Mestrado. Agradeço também ao pessoal do Laboratório 504 e à Júlia, pelo auxílio prestado no decorrer dos experimentos.

Ao professor Eduardo, meu querido orientador, por todo trabalho desenvolvido e intenso e vigoroso acompanhamento ao longo do Mestrado. Agradeço pela paciência, flexibilidade e compressão, mesmo em momentos delicados e cientificamente sombrios, quando questionamos a si mesmos sobre o propósito de estar na pesquisa. Obrigado por me tornar mais forte e resiliente.

Às queridas meninas da Farmácia Sanar, Paloma, Dani, Elis e especialmente Michele, pela compreensão durante um ano cobrindo minhas saídas para as aulas do mestrado, além dos desabafos e momentos de descontração.

À minha família, especialmente meu pai José e minha mãe Teresinha por todo apoio e incentivo em momentos difíceis durante minha vida pessoal e também acadêmica. As conversas e decisões (como bom geminiano que sou) cercam um

grande número de pessoas ao meu redor, porém o peso da opinião de vocês foi e sempre será o fator decisivo.

À minha “co-orientadora” e por ventura também irmã, Ana, pela intensa participação em minhas decisões dentro e fora do Mestrado. Não apenas fostes essencial me preparando pra situações durante estes dois anos, como também pude usufruir de tua sabedoria científica, pelos inúmeros, longos e incontáveis áudios trocados. Obrigado por me motivar a sempre ir adiante.

Aos meus amigos e colegas, Diego, Carine, Dayse pela troca de experiências e especialmente minha querida amiga Camila, pelos incontáveis desabafos e insistentes momentos de incentivo, mesmo sabendo das adversidades naturalmente programadas pelo ciclo de aprendizado.

Ao meu querido amigo Bóris, pelo convívio, parceria e pela presença fundamental nos momentos de calor dos acontecimentos, nos desabafos da madrugada e reflexões sobre a maior parte da minha vida acadêmica. Obrigado pela amizade de todas as horas e conselhos que me destes, mais que um amigo, te considero um irmão.

Agradeço também ao amigo Darlei (*in memoriam*) por servir de inspiração na trajetória acadêmica. Obrigado pelos momentos de convívio e pela fundação do *Ça ne te regarde pas*, junto das amigas Camila e Caroll, que será eternamente lembrado pelas nossas jantas, conversas e risadas.

Por fim, agradeço a todos que passaram por minha vida em algum momento durante esses dois anos, regados de grande aprendizado e experiências inigualáveis. Vocês foram significativamente importantes em minha caminhada. A todos, meu eterno agradecimento.

*“O que sai de mim vem do prazer
De querer sentir o que eu não posso ter
O que faz de mim ser o que sou
É gostar de ir por onde ninguém for”.*

Carlos Roberto Piazzoli

RESUMO

Acmella oleracea (Asteraceae), popularmente conhecida como jambu, é uma espécie utilizada no norte do Brasil e regiões tropicais do planeta em função de suas propriedades medicinais de combate a dor de dente e afecções bucais, além de seu uso como ingrediente na culinária, devido ao efeitos de pungência e salivação. Sua composição conta com a presença de *N*-alquilamidas, metabólitos formados por uma cadeia longa alifática, ligada a uma porção amida e radical posterior específico, sendo o espilantol o metabólito mais conhecido, além de estar associado às propriedades biológicas da espécie. As *N*-alquilamidas estão conectadas a propriedades farmacológicas, tais como anti-inflamatória, analgésica, estimulante, diurética, anti-obesidade, antisséptica dentre outras. Desta forma, este trabalho procurou avaliar a composição química de *N*-alquilamidas presentes nos extratos de folhas (AOEE-L) e flores (AOEE-F) de *A. oleracea*, através da técnica de CLAE-ESI-MS/MS, além de efeitos anti-inflamatórios *in vitro* empregando-se a linhagem celular A7r5 (células vasculares de músculo liso), através da inibição da atividade da enzima quimase, óxido nítrico (NO) e aspectos antioxidantes. Além disso, avaliou-se a atividade anti-inflamatória *in vivo*, através do ensaio de edema em pata de ratos com indução por formalina, análise de NO plasmático, parâmetros bioquímicos e avaliação histológica. Os resultados para as análises químicas revelaram a presença de onze *N*-alquilamidas distintas, distribuídas entre ambos os extratos. A avaliação *in vitro* resultou em inibição de 79,4% de quimase para AOEE-L, 89,2% para AOEE-F e 66,3% para espilantol, nas doses máximas ensaiadas. A avaliação antioxidante resultou em redução da produção de óxido nítrico em até 70% (extratos e espilantol), redução de 60,2, 75,8 e 39% para o ânion $O_2^{\cdot-}$, e aumento de cinco a sete vezes na atividade de CAT, para AOEE-L, AOEE-F e espilantol em suas doses máximas. Para os ensaios *in vivo*, a dose de 100 mg/kg dos extratos AOEE-L, AOEE-F e 6,2 mg/kg de espilantol, reduziram em 80, 90 e 100% a formação do edema, decorridos 240 min do tratamento, respectivamente. Quanto ao NO plasmático, houve uma redução na sua formação em torno de 79, 76,1 e 94,5%, para AOEE-L, AOEE-F e espilantol, nas doses máximas testadas. Os cortes histológicos demonstraram uma redução do infiltrado leucocitário após o tratamento com os extratos e espilantol. Verificou-se que nenhum extrato ou mesmo o espilantol induziu toxicidade hepática ou renal, conforme avaliado pelos parâmetros bioquímicos. O mecanismo de ação proposto para a atividade anti-inflamatória dos extratos de *A. oleracea* envolve a inibição de quimase, redução de NO e atividade antioxidante. A atividade anti-inflamatória significativa verificada no presente trabalho prova que *A. oleracea* e espilantol possuem potencial para o desenvolvimento de um possível medicamento anti-inflamatório.

Palavras-chave: *Acmella oleracea*, *N*-alquilamidas, espilantol, quimase e inflamação.

ABSTRACT

Acmella oleracea (Asteraceae), popularly known as jambu, is a species used in northern Brazil and tropical regions of the planet due to its medicinal properties to combat toothache and oral diseases, in addition to its use as an ingredient in cooking, due its pungency and induction of salivation. The chemical composition includes the presence of *N*-alkylamides, metabolites composed by a long aliphatic chain linked to an amide portion and a number of specific radicals. Spilanthol is the most well-known metabolite, associated with the biological properties of *Acmella oleracea*. *N*-alkylamides are associated to a number of pharmacological properties, such as anti-inflammatory, analgesic, stimulant, diuretic, anti-obesity, antiseptic, among others. In this way, this work aims to evaluate the chemical composition of *N*-alkylamides present in the extracts of leaves (AOEE-L) and flowers (AOEE-F) of *A. oleracea*, by CLAE-ESI-MS/MS, the anti-inflammatory *in vitro* activity using the cell line A7r5 (vascular smooth muscle cells), by inhibition of chymase enzyme activity, nitric oxide (NO) and also antioxidant aspects. The anti-inflammatory activity was also evaluated *in vivo*, using the formalin-induced rat paw edema assay, plasma NO analysis, biochemical parameters and histological evaluation. The results for the chemical analysis revealed the presence of eleven distinct *N*-alkylamides, distributed between both extracts. The *in vitro* evaluation resulted in an inhibition of 79.4% of chymase activity for AOEE-L, 89.2% for AOEE-F and 66.3% for spilanthol, at the highest concentrations tested. The antioxidant evaluation resulted in a reduction of nitric oxide production by up to 70% (extracts and spilanthol), a reduction of 60.2, 75.8 and 39% for the anion $O_2^{\cdot-}$, and an increasement of five to seven times the CAT activity, for AOEE-L, AOEE-F and spilanthol in their highest concentrations. For the *in vivo* tests, the dose of 100 mg/kg of AOEE-L, AOEE-F and 6.2 mg / kg of spilanthol extracts, reduced edema formation by up to 80, 90 and 100%, after 240 min of treatment, respectively. As for plasma NO, a reduction in its formation around 79, 76.1 and 94.5% was detected, for AOEE-L, AOEE-F and spilanthol, at the highest doses tested. Histological sections showed a reduction in leukocyte infiltrate after treatment with extracts and spilanthol. It was found that extracts or spilanthol did not induce hepatic or renal toxicity, as assessed by appropriated biochemical parameters. The proposed mechanism of action for the anti-inflammatory activity of *A. oleracea* extracts involves chymase inhibition, NO reduction and antioxidant activity. The significant anti-inflammatory activity verified in the present study proves that *A. oleracea* and espilanthol have potential for the development of a possible anti-inflammatory phytomedicine.

Key-words: *A. oleracea*, spilanthol, *N*-alkylamides, chymase and inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS	2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
ACAT	Acil-Coa:colesterol aciltransferase
AIES	Anti-inflamatório esteroidal
AINES	Anti-inflamatório não-esteroidal
ALT	Alanina aminotransferase
ANG	Angiotensina
AOEE-F	Extrato etanólico de flores de <i>Acmella oleracea</i>
AOEE-L	Extrato etanólico de folhas de <i>Acmella oleracea</i>
APO	Apolipoproteína
AST	Aspartato aminotransferase
CAT	Catalase
CCD	Cromatografia em camada delgada
CDCI ₃	Clorofórmio deuterado
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COX	Ciclooxigenase
CRE	Creatinina
DE ₅₀	Dose efetiva 50%
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2- difenil-1-picril-hidrazil
ESI	Ionização por eletrospray
GSH	Glutathiona peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIF	Fator indutivo de hipóxia
HOCl	Ácido hipocloroso
ICAM	Molécula de adesão intracelular
IgE	Imunoglobulina E
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase indutiva
LD ₅₀	Dose letal 50%

LOX	Lipooxigenase
LPS	Lipopolissacarideo
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MMP	Metaloproteinase
MTT	Bromidrato de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NBT	Nitroblue tetrazólium
NEDD	Dicloridrato de <i>N</i> -(-1-naftil)-etilenodiamina
NF-κβ	Fator de transcrição nuclear kappa beta
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NO ₃	Nitrato
NOS	Óxido nítrico sintase
O ₂ ^{•-}	Ânion superóxido
O ₂ ^{•2-}	Ânion peróxido
OH [•]	Radical hidroxila
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
PNPMF	Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
ppm	Partes por milhão
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNS	Espécies reativas de nitrogênio
ROS	Espécies reativas de oxigênio
SOD	Superóxido dismutase
STAT	Transdutor de sinal e ativador de transcrição
SULF	Sulfanilamida
TGF	Fator de crescimento tumoral
TGO	Transaminase oxalacética
TGP	Transaminase pirúvica
TIC	Total Ion Chromatogram
TNF	Fator de necrose tumoral
TRPV	Receptores vaniloides de potencial transitório
URE	Ureia
VSMC	Célula vascular do músculo liso

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura básica para as <i>N</i> -alquilamidas e suas subdivisões de acordo com alguns dos substituintes encontrados na posição R3.....	39
Figura 2. Rota de biossíntese de <i>N</i> -alquilamidas pertencentes a espécies da família Asteraceae. (adaptado de RIOS; OLIVO, 2014).	41
Figura 3. <i>N</i> -alquilamidas subdivididas conforme sua classificação botânica com seus principais exemplos. (a) alcanidas pertencentes ao gênero <i>Capsicum</i> (Solanaceae), (b) alcanidas presentes ao gênero <i>Zanthoxylum</i> (Rutaceae), (c) alcanidas do gênero <i>Piper</i> (Piperaceae) e (d) alcanidas presentes no gênero <i>Spilanthes</i> (Asteraceae).....	43
Figura 4. Aspectos morfológicos para as partes aéreas da espécie <i>Acmella oleracea</i> (L) R.K. Jansen (retirado de Hind e Biggs, 2003).....	44
Figura 5. Estrutura molecular do espilantol, com destaque para seu radical alifático A, grupamento amida B e radical isobutila C.....	47
Figura 6. Esquema contendo as principais atividades biológicas descritas para a enzima quimase e envolvimento em processos que contribuem para a instalação de inflamação crônica e patologias associadas	57
Figura 7. Cromatograma de Íons Totais (TIC-Scan) obtido para o extrato de flores de <i>A. oleracea</i> (AOEE-F) através da técnica de CLAE-ESI-MS/MS a λ 218 nm.	91
Figura 8. Cromatograma de Íons Totais (TIC-Scan) obtido para o extrato de folhas de <i>A. oleracea</i> (AOEE-L) através da técnica de CLAE-ESI-MS/MS a λ 218 nm.....	91
Figura 9. Fragmentações características para a identificação de <i>N</i> -alquilamidas em Asteraceae (BOONEN <i>et al.</i> , 2012).....	91
Figura 10. Cromatografia em camada delgada indicando isolamento de espilantol, observados em câmara UV 260 nm e revelador de anisaldeído sulfúrico.....	91
Figura 11. Efeito de AOEE-L, AOEE-F e espilantol sobre a viabilidade celular verificado através do ensaio de MTT em células VSMC. * $p < 0,05$	91
Figura 12. Investigação do potencial inibitório <i>in vitro</i> dos extratos etanólicos de folhas (LE), e flores (FE) de <i>A. oleracea</i> (a) bem como do espilantol isolado (b) para as proteases pró-inflamatórias quimase, quimiotripsina, tripsina, elastase, trombina e plasmina. * $p < 0,05$	91

Figura 13. Efeito de AOEE-L, AOEE-F (a) e espilantol (b) sobre a inibição da enzima quimase em células vasculares de músculo liso após estímulo com meio hiperglicêmico. * $p < 0,05$ (#) $p < 0,05$ vs. concentrações prévias.....	91
Figura 14. Efeito de AOEE-L, AOEE-F (a) e espilantol (b) sobre a produção de nitratos/nitritos em células vasculares de músculo liso após estímulo com meio hiperglicêmico. * $p < 0,05$; (#) $p < 0,05$ vs.salina 25 mM	91
Figura 15. Efeito de AOEE-L, AOEE-F (a) e espilantol (b) sobre a produção de radicais ânion superóxido em células vasculares de músculo liso após estímulo com meio hiperglicêmico. * $p < 0,05$	91
Figura 16. Efeito de AOEE-L, AOEE-F (a) e espilantol (b) sobre a atividade da enzima catalase em células vasculares de músculo liso após estímulo com meio hiperglicêmico.....	91
Figura 17. Efeito de AOEE-L (quadro a), AOEE-F (quadro b) e espilantol (quadro c) sobre o edema em pata de ratos após estímulo inflamatório com formalina.	91
Figura 18. Efeito do tratamento com AOEE-L e AOEE-F (10, 30 e 100 mg/kg) e espilantol (6,18 mg/kg) na produção de nitritos	91
Figura 19. Seção de cortes histológicos indicando infiltrados celulares nos grupos de animais: (a) tecido controle (salina), (b) formalina 2%, (c) formalina + indometacina 10 mg/kg, (d) formalina + AOEE-L 100 mg/kg, (e) formalina + AOEE-F (100 mg/kg) e (f) formalina + espilantol.	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. <i>N</i> -alquilamidas encontradas em partes aéreas de <i>A. oleracea</i>	46
Tabela 2. Gradiente de solventes empregado para o isolamento de espilantol.....	63
Tabela 3. Composição do extrato de flores de <i>Acmella oleracea</i> (AOEE-F) e identificação das <i>N</i> -alquilamidas presentes.	91
Tabela 4. Composição do extrato de folhas de <i>Acmella oleracea</i> (AOEE-L) e identificação das <i>N</i> -alquilamidas presentes.	91
Tabela 5. Dados do espectro de RMN- ¹ H do composto isolado em comparação com dados da literatura (δ ppm, multiplicidade, constante de acoplamento J).	91
Tabela 6. Dados do espectro de RMN- ¹³ C do composto isolado em comparação com dados da literatura	91
Tabela 7. Avaliação de parâmetros bioquímicos no plasma de animais após o modelo de edema em pata induzido por formalina (AST, ALT, URE e CRE).....	91

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3 REVISÃO DA LITERATURA	33
3.1 PLANTAS MEDICINAIS COMO FONTE DE PRODUTOS NATURAIS	35
3.2 A CLASSE DAS <i>N</i> -ALQUILAMIDAS	39
3.3 <i>ACMELLA OLERACEA</i> (L.) R.K. JANSEN	43
3.3.1 Aspectos químicos de <i>Acmella oleracea</i>	45
3.3.2 Espilantol	46
3.3.3 Aspectos farmacológicos de <i>Acmella oleracea</i> e espilantol	49
3.4 INFLAMAÇÃO E PROCESSO INFLAMATÓRIO	51
3.4.1 Mediadores imunológicos	53
3.4.2 Quimase	56
4 MATERIAIS E MÉTODOS	59
4.1 MATERIAIS	61
4.1.1 Reagentes utilizados	61
4.1.2 Animais	62
4.1.3 Material Vegetal	62
4.2 AVALIAÇÃO QUÍMICA E ISOLAMENTO	62
4.2.1 Obtenção dos extratos	62
4.2.2 Processo de isolamento do espilantol	63
4.2.3 Análise cromatográfica com o uso da técnica de CLAE-ESI-MS/MS	64
4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>IN VITRO</i>	65
4.3.1 Cultura de células vasculares de músculo liso (VSMC)	65
4.3.2 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT	65
4.3.3 Triagem para avaliação <i>in vitro</i> de extratos e espilantol frente a diferentes proteases	66
4.3.4 Determinação do efeito inibitório dos extratos e espilantol para a enzima quimase	67
4.3.5 Determinação da produção de nitratos e nitritos em VSMC	67

4.3.6 Avaliação da produção do radical ânion superóxido (O ₂ ^{•-}).....	68
4.3.7 Avaliação da atividade da enzima CAT	68
4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>IN VIVO</i>	69
4.4.1 Modelo de formação de edema em pata de ratos por formalina.....	69
4.4.2 Tratamentos e indução do edema	69
4.4.3 Avaliação de parâmetros bioquímicos plasmáticos	70
4.4.4 Avaliação histológica	70
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	71
5 RESULTADOS	73
5.1 AVALIAÇÃO QUÍMICA.....	75
5.1.1 Rendimentos de AOEE-L e AOEE-F e produto isolado	91
5.1.2 Análise cromatográfica para os extratos através da metodologia de CLAE-ESI-MS/MS	91
5.1.3 Identificação do composto espilantol	91
5.2 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>IN VITRO</i>	91
5.2.1 Avaliação da citotoxicidade dos extratos e espilantol em células vasculares do músculo liso (VSMC)	91
5.2.2 Inibição da enzima quimase	91
5.2.3 Avaliação da produção de nitritos/nitratos celular.....	91
5.2.4 Avaliação da atividade antioxidante.....	91
5.3 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA <i>IN VIVO</i>	91
5.3.1 Indução de edema em pata de ratos	91
5.3.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos plasmáticos.....	91
5.3.3 Análise histológica	91
6 DISCUSSÃO	93
7 CONCLUSÕES.....	107
REFERÊNCIAS	111
ANEXOS.....	125

O interesse por medicamentos de origem totalmente sintética vem decaindo nos últimos anos, observado o baixo índice de produção de novos fármacos pela indústria (ATANASOV *et al.*, 2015). Newman e Cragg (2016) realizaram um extensivo levantamento a respeito de novos fármacos aprovados entre os anos de 1981 e 2014. De um total de 1.562 moléculas, aproximadamente 50% foram originadas de produtos naturais (RAO *et al.*, 2019).

Além de inspiração para a descoberta de novos fármacos desde o século XIX, os produtos naturais têm sua atenção voltada para a era contemporânea devido ao seu uso étnico e características químicas que podem favorecer maior adaptação de ligantes, como anéis aromáticos e maior presença de carbonos quirais (DAVISON; BRIMBLE, 2019). Dentre inúmeras fontes de obtenção de produtos naturais, as plantas pertencem ao maior grupo produtor de metabólitos secundários bioativos descritos (NEWMAN; CRAGG, 2016). Desde o período circundante à segunda guerra mundial (1940) até hoje, as plantas, dentre animais, fungos e bactérias, originaram aproximadamente um terço (39,1%) dos produtos naturais utilizados como precursores de fármacos. No entanto, apenas 70.000 espécies com potencial terapêutico foram exploradas (BOY *et al.*, 2018).

Os avanços tecnológicos envolvendo a espectroscopia nas décadas de 1980 e 1990 propiciaram melhores estudos de exploração, investigação, separação e elucidação de estruturas químicas presentes em extratos vegetais (BORGES *et al.*, 2017). No entanto, devido à complexidade de suas matrizes, necessitam evolução e avanço em tecnologias para acompanhar novas descobertas na investigação e estudo de metabólitos (BRANDÃO; DUARTE; DUARTE, 2019).

Dentre as classes de metabólitos provenientes de plantas, encontram-se as *N*-alquilamidas, um grupo de moléculas formado por uma cadeia longa alifática ou aromática, poliinsaturada derivada de um ácido graxo, conectado a uma porção amida, com um radical curto ligado ao nitrogênio (BOONEN *et al.*, 2012). As *N*-alquilamidas pertencem a uma classe de compostos que tem despertado grande relevância nos últimos anos, uma vez que diversas plantas medicinais contendo esses metabólitos possuem grande popularidade como condimento alimentício, além de propriedades terapêuticas para tratamento de afecções bucais e dores de dente (GULLEDGE *et al.*, 2017; KUMAR, 2018). Cerca de 300 compostos pertencentes a

esta classe já foram isolados, tendo suas estruturas elucidadas e avaliadas quanto a seus efeitos farmacológicos (RIOS; OLIVO, 2014).

As espécies vegetais que sintetizam *N*-alquilamidas estão distribuídas em mais de 35 famílias (WYNENDAELE *et al.*, 2019), podendo ser encontradas em regiões tropicais, de clima quente e úmido, como por exemplo, norte do Brasil, China, Índia, Malásia, México e Tailândia (RIOS; OLIVO, 2014). Espécies vegetais oriundas da família Asteraceae possuem destaque, em especial para as tribos Anthemideae, Heliantheae e Senecioneae, pelo motivo de serem as únicas produtoras de amidas contendo alcinos na porção poliinsaturada da cadeia longa derivada dos ácidos graxos (BOONEN *et al.*, 2012). Entre as espécies pertencentes a essa família, encontra-se a *Acmella oleracea* (L.) R.K Jansen (tribo *Heliantheae*), tipicamente encontrada no norte do Brasil (Pará, Amazonas e Rondônia), e popularmente chamada de jambu, agrião-do-Brasil, abecedária, ou agrião-do-Pará (PAULRAJ, 2013).

Acmella oleracea (L.) R.K. Jansen é um arbusto rasteiro com altura média de aproximadamente 30 centímetros, folhas ovaladas sinuosas e denteadas, com capítulos florais amarelados com extremidade púrpura-avermelhada (FAVORETO & GILBERT, 2010). A espécie é tipicamente utilizada como condimento culinário em pratos regionais, como tacacá e tucupí (SHINOHARA *et al.*, 2014), em função do seu sabor pungente e à propriedade sialagoga (salivante). Seu uso popular se dá pelo efeito analgésico e anti-inflamatório auxiliando no tratamento de dores de dente, estomatites, resfriados, dermatites e também em função dos efeitos estimulante, digestivo, emenagogo e sialagogo (PAULRAJ, 2013).

Considerando-se o uso popular da espécie *A. oleracea*, uma série de estudos foram relatados na literatura, sendo investigadas as propriedades analgésicas (BOONEN *et al.*, 2010; DALAZEN *et al.*, 2018; DUBEY *et al.*, 2013), diurética (GERBINO *et al.*, 2018), anti-inflamatória (BAKONDI *et al.*, 2019; CONTI *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2018; WU *et al.*, 2018), anti-obesidade (HUANG *et al.*, 2019), afrodisíaca (SHARMA *et al.*, 2011), dentre outras. Os efeitos farmacológicos descritos para a espécie, de forma geral são atribuídos às *N*-alquilamidas, sendo o *espilantol* a molécula mais conhecida, além de ser considerado o composto bioativo de *A. oleracea* (MONROE *et al.*, 2016).

Nesse sentido, as patologias decorrentes de processos inflamatórios são mencionadas como alvos importantes para o desenvolvimento de novos medicamentos ou terapias. Como exemplos, cabe citar diferentes tipos de artrites, aterosclerose, doença de Crohn, asma, Diabetes mellitus, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, câncer, além de danos relacionados à síndrome metabólica e progressão de tumores (TASNEEM *et al.*, 2019). Todas estas de caráter crônico, ou seja, o período primário de combate inflamatório, denominado agudo, tem sua duração de poucos dias estendida para meses ou anos, levando a efeitos degenerativos de alto grau de impacto (AGARWAL; NAKARA; SHANMUGAM, 2019).

Nos processos inflamatórios, mastócitos, macrófagos e neutrófilos, são responsáveis pela mobilização de outros agentes (histamina, serotonina) e mecanismos de defesa, além de da liberação de cininas e citocinas, sinalizando os efeitos iniciais definidos como rubor, inchaço, prurido e calor (MADJENE *et al.*, 2019). Mastócitos são encontrados nos tecidos de contato direto com o ambiente externo, ou seja, vias aéreas, derme e sistema gastrointestinal, e desempenham um papel importante na inflamação por intermédio da liberação de seus grânulos contendo proteases chamadas de triptase e quimase (CONTI *et al.*, 2019).

A quimase é considerada um agente pró-inflamatório que estimula interleucinas, como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-T8, fator de crescimento tumoral beta (TGF- β) e neutrófilo peptídeo 2, além de fazer a conversão de angiotensina I em angiotensina II, especialmente no tecido cardíaco (80%) (ATIAKSHIN; BUCHWALLOW; TIEMANN, 2019), promovendo processos de angiogênese, aneurisma de aorta, fibrose e infarto cardíaco e outros relacionados com inflamação crônica, contribuindo como agravante em muitas das doenças da contemporaneidade (MIYAZAKI *et al.*, 2006).

Grande parte dos fármacos anti-inflamatórios disponíveis no mercado não responde de maneira satisfatória e totalitária às doenças mencionadas, além de proferir efeitos adversos indesejáveis (KHISHORE *et al.*, 2019). Desta maneira, este trabalho visa à busca de um agente anti-inflamatório a partir da espécie *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, popularmente empregada para o tratamento de diversas desordens, incluindo distúrbios relacionados à inflamação, utilizando-se tanto extratos etanólicos quanto o produto isolado espilantol.

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho é a avaliação do efeito anti-inflamatório dos extratos etanólicos brutos de flores e folhas da espécie *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen e do composto isolado espilantol, através do modelo de edema de pata induzido por formalina em ratos (*in vivo*), e em VSMC (células musculares lisas vasculares) em meio hiperglicêmico (*in vitro*).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste trabalho contemplam:

- Avaliação quantitativa e comparativa dos perfis de *N-alquilamidas* presentes nos extratos brutos de flores e folhas de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, através de técnica de análise cromatográfica por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de massas (CLAE/ESI-MS-MS) de alta resolução;
- Isolamento e caracterização do composto espilantol para avaliação biológica e farmacológica em ensaios *in vitro* e *in vivo*
- Investigação *in vitro* da viabilidade celular (método de MTT), atividade antioxidante (atividade da enzima catalase e produção do radical ânion superóxido) e produção de óxido nítrico (NO) para os extratos e para o espilantol em células do tecido liso vascular (VSMC), linhagem A7r5;
- Avaliação *in vitro* do efeito anti-inflamatório dos extratos e espilantol em células do tecido liso vascular (VSMC), linhagem A7r5, por indução de inflamação em meio hiperglicêmico, através da inibição de quimase;
- Investigação *in vivo* do potencial anti-inflamatório dos extratos e espilantol através da metodologia de edema de pata induzida por formalina em ratos Wistar, seguido de avaliação histológica do tecido e determinação da produção de óxido nítrico (NO) no soro coletado dos animais.

3.1 PLANTAS MEDICINAIS COMO FONTE DE PRODUTOS NATURAIS

As plantas medicinais sempre foram alvo de curiosidade dos seres humanos, seja pela crença em seus poderes mágicos ou pelo atrativo natural encontrado nas cores, odores e formas. Relatos descritos em papiros foram encontrados desde a antiga Mesopotâmia em 2600 a.C, passando para o Egito em 1550 a.C, compreendendo acervos com mais de 1.000 plantas que poderiam auxiliar no tratamento de enfermidades ou por simplesmente possuírem atrativos aromáticos e comestíveis (RAO *et al.*, 2019). O desenvolvimento desta cultura etnobotânica circundou a China e Índia, onde a medicina tradicional foi derivada dessas antigas civilizações prevalendo fortemente até a atualidade. Já em países ocidentais essa cultura foi extensamente desenvolvida a partir dos povos Greco-romanos (PATWARDHAN, 2005).

Durante o período da idade média, entre os séculos V e XIII, o uso de plantas esteve associado à bruxaria e rituais satânicos. Este preceito destituiu-se com a chegada da tipografia nos séculos XV e XVI, sendo aprofundado no século XVIII, por Anton von Störck e William Withering através de investigações científicas (PATWARDHAN, 2005). No início do século XIX, Friederich Setürner isolou o primeiro analgésico narcótico a partir do látex da papoula (*Papaver somniferum* L.) e o batizou de *morphium* (morfina), ponto de partida para o aprofundamento de pesquisas conduzidas com o isolamento de metabólitos de plantas medicinais na época. Logo após, outros alcaloides foram isolados a partir de fontes vegetais, como a cafeína, a cocaína, a atropina e a capsaicina, bem como a síntese total do ácido acetilsalicílico em 1853. Com a descoberta da penicilina em 1928, foi iniciada a era dos antibióticos, que expandiram de forma acentuada sua utilização durante o século XX em diante (ATANASOV *et al.*, 2015).

A descoberta de novos fármacos teve um grande impulso durante e após o período da 2ª Guerra Mundial. A expansão das indústrias financiadas por países envolvidos na guerra, principalmente a Alemanha, fomentou bases de busca, bem como pesquisa clínicas (realizadas de forma não regulamentada bioeticamente) e engenharia. Segundo Borges e colaboradores (2017), os avanços na área da cromatografia e espectroscopia nas décadas de 80 e 90 possibilitaram um incremento no número de publicações contendo derivados de origem vegetal, devido

à modernização das técnicas de identificação, separação e elucidação de metabólitos de interesse (BRANDÃO; DUARTE; DUARTE, 2019). Em uma revisão a respeito de novos fármacos realizada por Newman e Cragg (2016) dentre os anos de 1981 a 2014, os autores apontam que foram aprovadas 1.562 novas moléculas, dentre elas 54 metabólitos totalmente naturais, 268 moléculas derivadas de metabólitos naturais e cinco fármacos sintetizados utilizando-se grupos farmacóforos de metabólitos secundários, totalizando 21,2% de novos fármacos.

Das drogas aprovadas pelo *Food and Drug Administration* (FDA) desde a década de 1940, 39,1% são oriundas de produtos naturais, dentre o uso clínico majoritário voltado para o combate do câncer, 48,9% são derivados de produtos naturais. Cerca de 200.000 metabólitos isolados e com comprovada ação biológica estão descritos na literatura, demonstrando sua relevância ao longo dos anos e cada vez mais agregando novas fontes de terapia no combate a enfermidades, síndromes e patologias (BOY *et al.*, 2018).

No Brasil em 2006 o Decreto nº 5.813 em conjunto com a Portaria Interministerial nº 2.960/2008, criou o Comitê Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. O objetivo foi verificar a ampliação das opções terapêuticas aos usuários e a garantia de acesso a plantas medicinais e fitoterápicos e serviços relacionados pelo Sistema Único de Saúde (SUS), além de acompanhar as iniciativas de promoção à pesquisa, desenvolvimento de tecnologias e inovações nas diversas fases da cadeia produtiva. O comitê conta com a participação de vários ministérios e representantes de assuntos específicos. Em 2009, foi criada a Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS (RENISUS), voltada para a ampliação de dados técnico-científicos de segurança e eficácia, e abrangendo 71 espécies com potencial terapêutico (BRASIL, 2006; BRASIL, 2009).

Em 2016, através de incentivos e da promoção da Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (PNPMF), foi desenvolvido o Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira contendo monografias de plantas medicinais, formas de utilização, aspectos farmacológicos e toxicológicos, trazendo evidências científicas, com o intuito de orientar a conduta de prescrição de plantas e fitoterápicos no Brasil (BRASIL, 2016). Em 2011, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) lança o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, cujo 1º suplemento foi aprovado em 2018, objetivando divulgar monografias para o

uso de plantas medicinais, e propiciar incentivo à produção de fitoterápicos no âmbito das Farmácias Vivas.

A PNPMF em conjunto com a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (2015), oferta serviços de fitoterapia em mais de 1.107 municípios Brasileiros em 26 Unidades Federativas. Entre os anos de 2015 a 2019 foram dispensados mais de 10 milhões de fitoterápicos pela rede de atenção básica a saúde (BRASIL, 2019). Os medicamentos constam na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME, 2020) e são indicados, por exemplo, para uso ginecológico, tratamento de queimaduras, auxiliares terapêuticos de gastrite e úlcera, além de medicamentos com indicação para artrite e osteoartrite. Dentre os treze medicamentos fitoterápicos disponíveis, quatro deles possuem ação anti-inflamatória comprovada: espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek), garra-do-diabo (*Harpagophytum procumbens* DC. ex Meissn.), salgueiro (*Salix alba* L.) e unha-de-gato (*Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roem. & Schult.).

Marmitt e colaboradores (2015) realizaram um estudo de revisão acerca de plantas com propriedade anti-inflamatória citadas na RENISUS, abrangendo trabalhos publicados entre os anos de 2009 a 2013, e envolvendo estudos farmacológicos clínicos e pré-clínicos para as possíveis espécies. Das 452 publicações mencionadas, 44 relacionavam estudos com plantas listadas na RENISUS. Porém quando avaliadas as propriedades anti-inflamatórias, apenas 10 espécies foram citadas, destacando flavonoides como os metabólitos majoritários associados a estas ações terapêuticas.

Até o ano de 2016, mais de 45.000 espécies de plantas pertencentes à flora brasileira foram investigadas ao longo de 28 anos, apresentando comprovação científica por investigação de mecanismos de ação. O consumo de espécies como a castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa* Bonpl., Lecythidaceae), por exemplo, em pacientes em processo de hemodiálise demonstrou reduzir a expressão de citocinas pro-inflamatórias (TNF- α e IL-6) plasmáticas, promovendo uma redução no risco aterogênico e inflamatório (STOCKLER-PINTO *et al.*, 2014). Extratos de açaí (*Euterpe oleracea* Mart., Arecaceae), uma espécie comumente utilizada como alimento, expressaram alto potencial antioxidante reduzindo danos lesivos à membrana celular, DNA, entre outros correlacionados com inflamação, estando tais efeitos relacionados à presença de antocianos e ácidos fenólicos (MATHEUS *et al.*,

2006). Outra espécie dotada de atividade anti-inflamatória, a espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae), demonstrou efeitos gastroprotetivos pela inibição de receptores histaminérgicos H₂, responsáveis pela produção de ácido clorídrico (SANTOS-OLIVEIRA; COULAUD-CUNHA; COLAÇO, 2009). A erva-baleeira (*Varronia curassavica* Jacq. sin. *Cordia verbenacea* DC., Boraginaceae) provou seus efeitos anti-inflamatórios pela redução da migração de leucócitos, inibição de interleucinas, bem como ciclooxigenases, atribuído aos flavonóides e terpenos presentes em seu óleo essencial (STAKE-NILSSON *et al.*, 2011). Tais evidências terapêuticas levaram ao desenvolvimento e produção do primeiro medicamento fitoterápico nacional, o Acheflan®, lançado em 2005 em formato de gel tópico e posteriormente, spray (2007), com indicação para processos inflamatórios dolorosos, como contusões e tendinites (PASSOS *et al.*, 2007; DUTRA *et al.*, 2016).

Um estudo de revisão mais amplo sobre o espectro anti-inflamatório de plantas medicinais empregando-se diversos modelos pré-clínicos *in vitro* e *in vivo*, principalmente pelo método de indução de edema de pata, ressaltou a importância de metabólitos amplamente estudados e com relativa popularidade, como curcumina, colchicina, resveratrol, capsaicina, quercetina, acetato de amirina, filicena, ácido oleanoico, entre outros, obtidos das plantas *Thymus serpyllum* (serpilho), *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), *Salvia triloba* (sálvia-do-Mediterrâneo), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Origanum majorana* (manjerona), *Ligustrum lucidum* (ligustro), *Lavandula latifolia* (alfazema). Dentre os mecanismos anti-inflamatórios investigados, estão a redução de interleucinas (IL-1, IL-6 e TNF- α), leucotrienos e prostaglandinas pela inibição de ciclooxigenases e lipoxigenases, além de fatores de transcrição (AZAB; NASSAR; AZAB, 2016).

Segundo revisão conduzida por Dutra e colaboradores (2016), ao longo de 28 anos mais de 34.614 trabalhos foram publicados, tanto em periódicos nacionais quanto internacionais, realizados por pesquisadores brasileiros. Nestes trabalhos foram enfatizadas as propriedades medicinais, usos etnofarmacológicos, estudos de segurança, elucidação de metabólitos secundários e mecanismos de ação para plantas nativas e exóticas cultivadas no Brasil. Com relação às classes químicas, foram citados flavonoides, taninos, alcaloides, antocianos, glicosídeos cardiotônicos, iridoides e *N*-alquilamidas apresentando relevância na medicina e na pesquisa.

Porém a existência de um fator limitando o avanço de estudos, como ausência de pesquisas clínicas, pode ser atribuído à complexidade da estrutura química de alguns metabólitos, toxicidade e ausência de dados farmacocinéticos (DAVISON; BRIMBLE, 2019).

3.2 A CLASSE DAS N-ALQUILAMIDAS

N-alquilamidas, alcanidas ou alquenamidas constituem uma classe de metabólitos secundários provenientes de alguns fungos e bactérias, e majoritariamente a partir de espécies vegetais. Possuem baixo peso molecular (abaixo de 300 daltons) e são constituídas por uma cadeia alifática poliinsaturada oriunda de ácidos graxos, ligada a um grupamento amino, com a porção posterior ao nitrogênio sendo um radical pequeno (RIOS; OLIVO, 2014), conforme demonstrado na Figura 1.

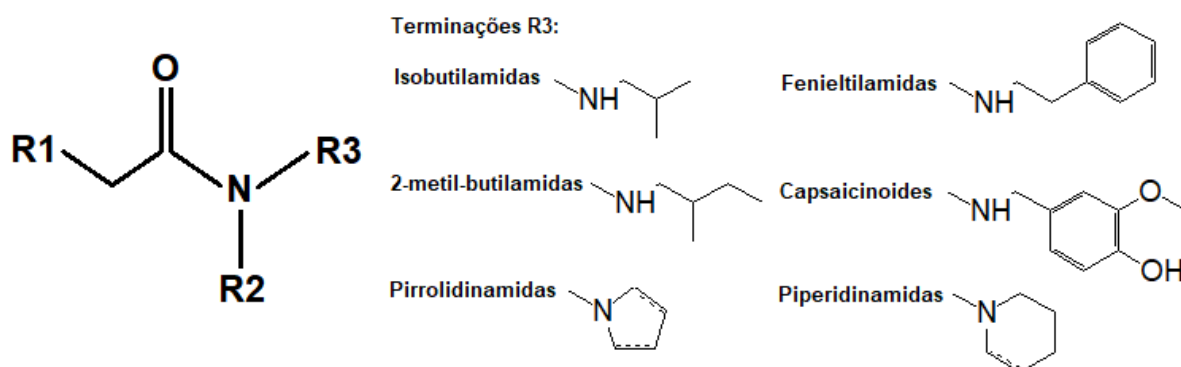


Figura 1. Estrutura básica para as *N*-alquilamidas e suas subdivisões de acordo com alguns dos substituintes encontrados na posição R3.

Em R1, geralmente se encontram cadeias médias (C₈ a C₁₅), diversificadas pelo número e tipo de insaturações, ligações planares com certa estabilidade, bem como isomeria *cis* (Z) e *trans* (E), tendo a possível presença de heteroátomos na cadeia ou formação de anéis aromáticos. Em R2, frequentemente tem-se átomos de hidrogênio ligados ao nitrogênio, sendo que poucas são as espécies de plantas que produzem compostos contendo ligantes diferentes para este radical. O radical R3 é uma posição importante para as *N*-alquilamidas, uma vez que, diferentes classificações para estes metabólitos irão ocorrer de acordo com o do tipo de substituinte encontrado. Ao todo, são sete subdivisões descritas na literatura:

isobutilamidas, 2-metil-butilamidas, fenetiletilamidas, piperidina e pirrolidinamidas, espermidinamidas e putrecinamidas, capsaicinoides e triptaminamidas (KUMAR KUMAR; BHATT, 2018; BOONEN *et al.*, 2012).

As *N*-alquilamidas podem ser encontradas em 35 distintas famílias de espécies vegetais, dentre as quais, as mais importantes são: *Asteraceae* (tribo Anthemideae, gêneros *Achillea*, *Anacyclus*, *Artemisia*; tribo Heliantheae, gêneros *Acmella*, *Spilanthes*), *Annonaceae*, *Amaranthaceae*, *Fabaceae* (tribo Aeschynomeneae, gêneros *Arachis*, *Echinaceae*, *Helianthus*, *Heliopsis*), *Lauraceae*, *Piperaceae* (gênero *Piper*) e *Rutaceae* (gênero *Zanthoxylum*) e *Solanaceae* (KUMAR; BHATT, KUMAR., 2018). Sua função biológica ocorre principalmente por regular e atuar no crescimento da planta, havendo uma correlação entre o alastramento da raiz e acúmulo de alcaloides, na defesa contra herbívoros, entre outras funções não completamente elucidadas (DIAS *et al.*, 2012).

A rota de biossíntese das *N*-alquilamidas difere entre as famílias botânicas quanto à derivação da cadeia longa ou aminoácido precursor da amida. No caso das *Asteráceas*, a porção da cadeia alifática em R1 ocorre através dos ácidos graxos ácido oleico ($\omega 3$), linoleico ($\omega 6$) e crepênico, derivados da rota policetídica, por meio de sucessivas reações de β -oxidação e oxidação, encurtando a cadeia lipídica. A inserção de ligações duplas e triplas é realizada por enzimas denominadas desnaturases e desidrogenases. A porção amida provém por catálise enzimática dos aminoácidos valina, isoleucina, fenilalanina, tirosina e leucina, subsequenciando a terminação da cadeia em isobutilamidas, 2-metil-butilamidas, fenetiletilamidas, 4-hidroxi-fenetiletilamidas e isopentilamidas, respectivamente, conforme ilustra a Figura 2. Tanto a posição quanto o número de insaturações presentes na molécula são considerados marcadores quimiotaxonômicos para determinadas famílias de plantas, como por exemplo, em *N*-alquilamidas produzidas pelas espécies da família *Asteraceae*, tribos *Heliantheae* e *Anthemideae*, conferindo a formação de exclusiva de alcaloides (RIOS; OLIVO, 2014; BOONEN *et al.*, 2012).

O uso tradicional de espécies vegetais contendo metabólitos pertencentes à classe das *N*-alquilamidas varia conforme a cultura regional de cada local. De maneira geral, as plantas são utilizadas em preparações culinárias devido ao realce conferido ao paladar pela pungência, picância e efeito sialagogo em países com clima tropical e subtropical, como México, Brasil, Tailândia, Índia, Malásia. As

alcamidas também são utilizadas pelas propriedades medicinais no alívio da dor de dente pelas propriedades analgésicas, sendo também descritas as propriedades inseticida, antisséptica, estimulante e anti-inflamatória (KUMAR; BHATT, KUMAR, 2018). Ao todo, mais de 400 metabólitos distribuídos entre as diferentes famílias já foram descritos e elucidados (WYNENDAELE *et al.*, 2018).

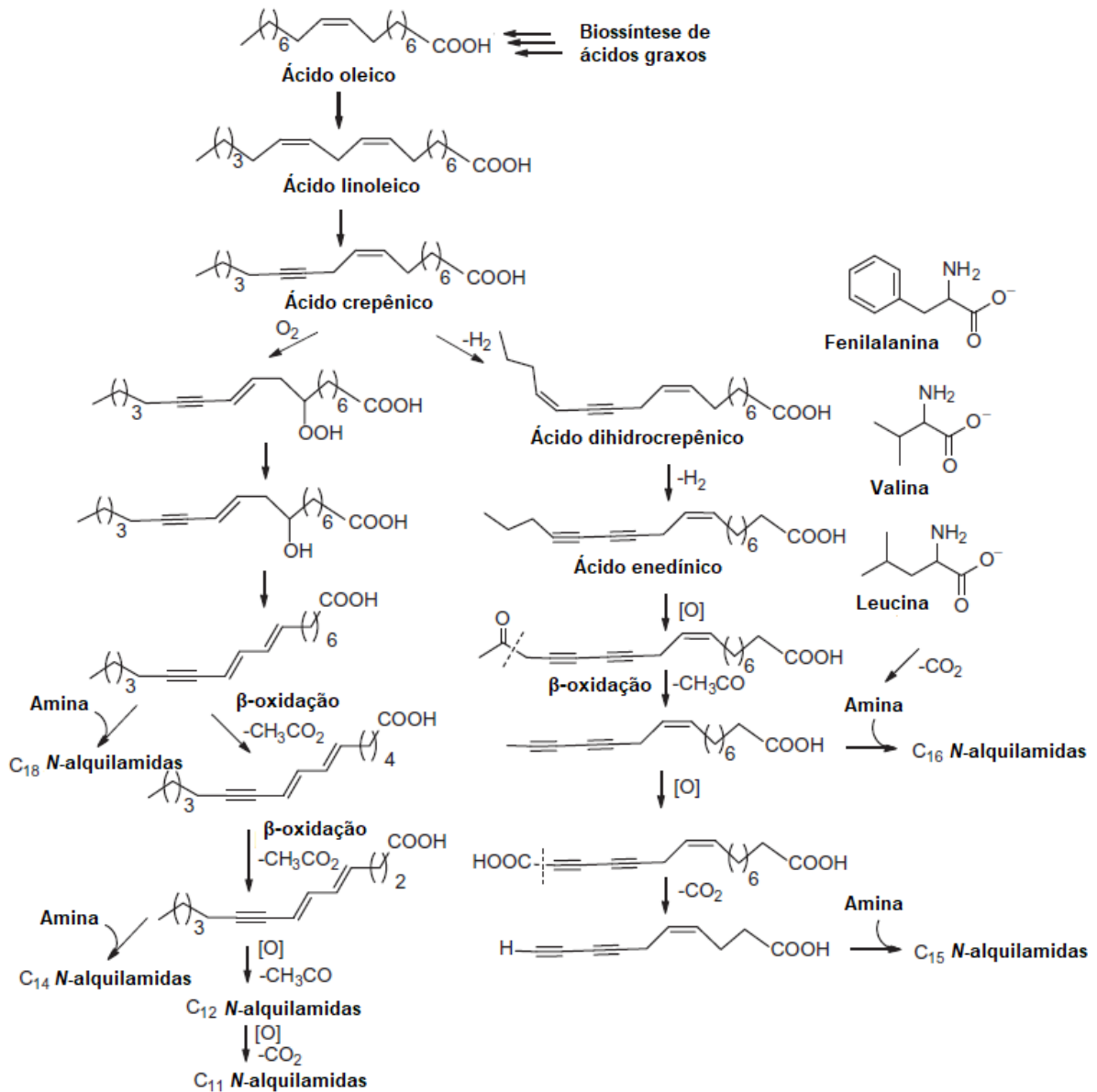


Figura 2. Rota de biossíntese de *N*-alquilamidas pertencentes a espécies da família Asteraceae. (adaptado de RIOS e OLIVO, 2014).

Na indústria farmacêutica, diversos produtos flavorizantes, cosméticos ou mesmo medicamentos são produzidos a partir de diferentes formulações contendo

extratos brutos, enriquecidos em *N*-alquilamidas ou até mesmo de produtos isolados. Wynendaele e colaboradores (2018) realizaram uma revisão sobre os produtos disponíveis no mercado apresentando *N*-alquilamidas em sua composição. As plantas mais utilizadas foram: *Spilanthus oleracea* (sin. *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen) (jambu), *Anacyclus pyrethrum* Maire (“akarkara”), *Echinacea purpurea* (L.) Moench (equinácea), *Heliopsis longipes* (A. Gray) S. F. Blake (chilcuague), *Piper longum* Linn. (pimenta-longa) e *Achillea millefolium* L. (mil-folhas).

Os produtos farmacêuticos mais descritos e com maior emprego contendo estes metabólitos são os cosméticos contendo propriedades antirugas e antienvhecimento, seguido de flavorizantes para mascarar sabores desagradáveis de alimentos e bebidas. Além destes, medicamentos, nas formas de xarope, pastilha para garganta, tinturas anti-inflamatórias, antissépticos bucais e cremes dentais para alívio da dor e problemas como gengivite também foram identificados (WYNENDAELE *et al.*, 2018)

Dentre os metabólitos mais estudados da classe, pode-se citar capsaicina, e dihidrocapsaicina (Solanaceae) (MAZOUREK *et al.*, 2009), pelitorina e derivados shanshools (Rutaceae) (TANTAPAKUL *et al.*, 2012), peperina e piperovatina (Piperaceae) (RHO *et al.*, 2007; LEE *et al.*, 2008), espilantol e ácido-2E,4E,8Z,10E-dodecatetraenoico (Asteraceae), demonstrados como exemplares de diferentes classificações de *N*-alquilamidas (Figura 4). Outras alcanoides presentes em espécies como *Anacyclus pimpinella* (também chamada de “akarkara”), *Nigella sativa* (“aliprive”), *Ferula gummosa* (“gálbano”) e *Pimpinella anisium* (“erva-doce”), em conjunto com as moléculas supracitadas, apresentam altos índices de permeação através da mucosa intestinal, oral, bem como barreira hematoencefálica, de forma a contribuir para atividades farmacológicas com ação anticonvulsivante, mio relaxante e imunológica contra inflamação (VERYSER *et al.*, 2016). Além outras atividades com ação antifúngica, antibiótica (MOLINA-TORRES *et al.*, 2004), anestésica (CHOI *et al.*, 2006; PAPOIU; YOSIPOVITCH, 2010; CARIÑO-CORTÉS *et al.*, 2010; CECH *et al.*, 2010; BOONEN *et al.*, 2012), antiviral (SHARMA *et al.*, 2010), diurética (RATNASOORIYA *et al.*, 2004) e cicatrizante (ZHAI *et al.*, 2009).

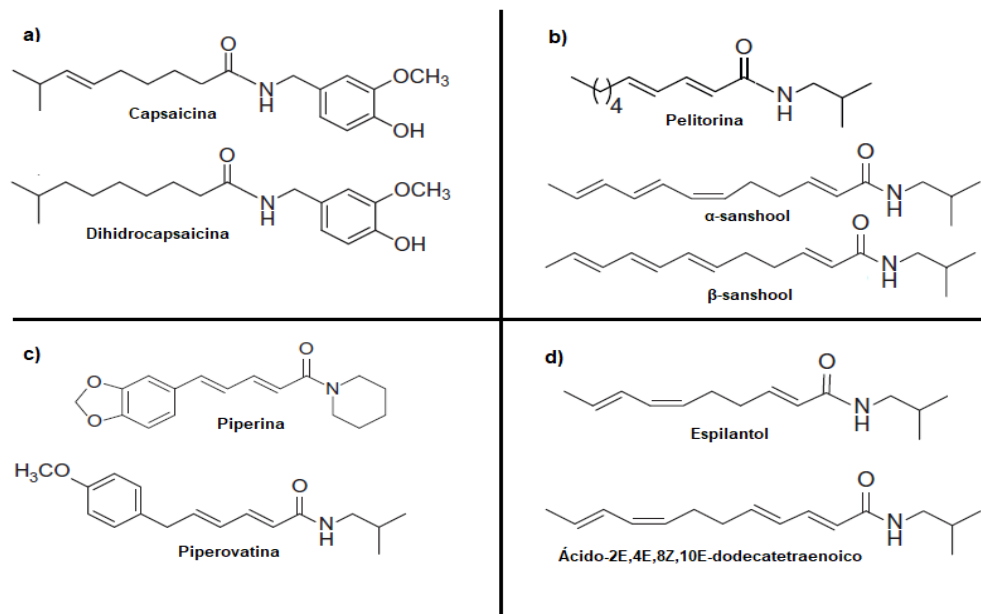


Figura 3. *N*-alquilamidas subdivididas conforme sua classificação botânica com seus principais exemplos. (a) alcamidas pertencentes ao gênero *Capsicum* (Solanaceae), (b) alcamidas presentes ao gênero *Zanthoxylum* (Rutaceae), (c) alcamidas do gênero *Piper* (Piperaceae) e (d) alcamidas presentes no gênero *Spilanthes* (Asteraceae).

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

Acmella oleracea (família Asteraceae), popularmente conhecida pelos nomes de jambu, agrião-do-Pará ou agrião-do-Brasil, é considerada uma planta herbácea anual, e possui de 20 a 40 cm de altura, levemente ereta e rasteira ao solo. Apesar de *A. oleracea* ser uma planta naturalizada da África do Sul, seu país de origem não está claramente definido, devido a diversos relatos de herbários armazenarem informações divergentes. Através de cruzamento de dados, alguns autores acreditam que a planta possa ter sua origem no Brasil ou Peru pelo cruzamento de dados (JANSEN, 1985; HIND e BIGGS, 2003). Sua raiz principal é pivotante com grande número de ramificações. As folhas são verdes, compostas e pecioladas com limbo dentado e ápice agudo e em formato oval de 53 a 106 mm de comprimento e 40 a 79 mm de largura. Também, apresenta pequenas flores amarelas na fase jovem e com cálice de cor púrpura nos estágios de colheita, dispostas em terminais globosos com diâmetro aproximadamente de 10 mm (Figura 4), com capacidade de florescimento e conservação das flores por semanas (HIND e BIGGS, 2003).

Sua distribuição geográfica ocorre em torno da linha do equador, em regiões tropicais e subtropicais, como Peru, norte do Brasil, Índia, África do Sul, Haiti, entre outros, pois necessita de calor e umidade para seu desenvolvimento apropriado. Locais ensolarados na encosta de lagos são ideais para o seu cultivo.



Figura 4. Aspectos morfológicos para as partes aéreas da espécie *Acmella oleracea* (L) R.K. Jansen (retirado de Hind e Biggs, 2003).

Acmella oleracea (L.) R.K. Jansen possui grande quantidade de sinônimas, as quais são atribuídos os nomes de *Spilanthus acmella* var. *oleracea* (L.) Baker, *Spilanthus acmella* var. *oleracea* (L.) C.B. Clarke ex Hook. f., tendo como basônimo (nomenclatura principal entre as sinônimas) *Spilanthus oleracea* L.. Em 1981 o pesquisador Robert K. Jansen, através de estudos morfológicos e cromossômicos atribuiu tais espécies, por questões evolutivas, pertencentes ao gênero *Acmella* (JANSEN, 1985).

Os usos tradicionais de *A. oleracea* são diversificados, e relacionados às propriedades organolépticas e medicinais encontradas na planta. O sabor pungente e estimulante de suas folhas é utilizado em pratos típicos por todo mundo onde a planta possui tradição, no caso do Brasil (Pará e Amazônia). As flores do jambu, por conterem grande pungência devido à concentração de metabólitos, são utilizadas em bebidas, licores, entre outras preparações caseiras ou semi-industrializadas (SHINOHARA *et al.*, 2014).

Culturalmente, preparações contendo partes aéreas do jambu são utilizadas para aliviar dores de dente. Além destes, seus relatos podem ser subdivididos em usos evidenciados pela literatura e não evidenciados. Para relatos de uso não

afirmados na literatura, encontram-se os usos para dor de garganta, estomatite e diurético na forma de infusão e decocção de folhas. Para os usos evidenciados, são utilizadas partes aéreas da planta na forma de tintura para dor de dente, atividade analgésica, antibacteriana, antifúngica, sialagoga (salivante) e odontálgica (FAVORETO e GILBERT, 2010). Algumas espécies podem ser correlacionadas com o uso tradicional de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen para dor de dente, estomatites e sialagogo, conforme demonstram *Spilanthes acmella* var. *uligiosa* (Sw.) Baker e *Spilanthes calva* (D.C) R.K. Jansen, onde a característica diferencial pode ser visualizada por suas folhas mais lanceoladas e flores com cabeça em formato radial e discóide (JANSEN, 1985).

3.3.1 Aspectos químicos de *Acmella oleracea*

Os metabólitos secundários encontrados em *A. oleracea* pertencem a diversas classes químicas, sendo os principais descritos os triterpenos (α e β -amirina), fitoesteróis (β -sitosterol, estigmasterol e álcool mirístico), óleos essenciais (limoneno, β -cariofileno, (*Z*)- β -ocimeno, germacreno-D e mirceno), ésteres de ácidos graxos (ácidos láurico, mirístico, linoleico e linolênico), ácidos hidroxicinâmicos (ácido *trans*-ferúlico e *trans*-isoferúlico), cumarinas (escopoletina), flavonoides, taninos e saponinas. No entanto a principal porção de metabólitos secundários descritas pertence à classe das *N*-alquilamidas, representando até 9% do total de componentes presentes em extratos destas espécies (FAVORETO & GILBERT, 2010; DUBEY *et al.*, 2013).

As *N*-alquilamidas presentes estão distribuídas entre isobutilamidas, 2-metilbutilaminas e feniletilamidas. Outras *N*-alquilamidas foram identificadas e isoladas, apresentando pequenas alterações entre as moléculas elucidadas, como por exemplo, o número de insaturações, tipo ou a posição dentro da cadeia alifática. O ácido *2E,6Z,8E-N*-2-metil-butyl-2,6,8-decatrienóico (*m/z* 236), denominado *homoespilantol* e o ácido *2E,4E,8Z,10Z-N*-isobutyl-2-4-8-10-dodecatetraenóico (*m/z* 248) são alcâmidas bastante empregadas em estudos farmacológicos com a espécie *A. oleracea* (HERNÁNDEZ *et al.*, 2009; BOONEN *et al.*, 2012).

As *N*-alquilamidas presentes em *Acmella oleracea* estão indistintamente distribuídas entre folhas, flores e talos, sendo descrita algumas vezes a ocorrência

de determinados compostos somente em um órgão específico do vegetal. Ao todo, foram identificadas dezessete *N*-alquilamidas em *A. oleracea*, conforme demonstra a Tabela 1 trazendo informações químicas de acordo com os respectivos trabalhos.

Tabela 1. *N*-alquilamidas encontradas em partes aéreas de *A. oleracea*.

Nº	m/z [M+H ⁺]	Fórmula molecular	Classificação	Molécula	Nomenclatura	Referência
1	222,1857	C ₁₄ H ₂₃ NO	Isobutilamida		(2E,6Z,8E)- <i>N</i> -isobutil-2,6,8-decatrienamida	RAMZEWAK <i>et al.</i> , 1999
2	236,2014	C ₁₅ H ₂₅ NO	2-metil-butilamida		(2E,6Z,8E)- <i>N</i> -(2-metilbutil)-2,6,8-decatrienamida	BOONEN <i>et al.</i> , 2010
3	236,2014	C ₁₅ H ₂₅ NO	Isobutilamida		(2E,6Z,8E)- <i>N</i> -isobutil-2,6,8-undecatrienamida	RAMZEWAK <i>et al.</i> , 1999
4	248,2014	C ₁₆ H ₂₅ NO	Isobutilamida		(2E,4E,8Z,10Z)- <i>N</i> -isobutil-dodeca-2,4,8,10-tetraenamida	BOONEN <i>et al.</i> , 2010
5	246,1857	C ₁₆ H ₂₃ NO	2-metil-butilamida		(2E)- <i>N</i> -(2-metilbutil)-2-undeceno-8,10-dienamida	NAKATANI e NAGASHIMA 1992
6	232,1701	C ₁₅ H ₂₁ NO	Isobutilamida		(2E)- <i>N</i> -isobutil-2-undeceno-8,10-dienamida	RAMZEWAK <i>et al.</i> , 1999
7	230,1544	C ₁₅ H ₁₉ NO	Isobutilamida		(2E,4Z)- <i>N</i> -isobutil-2,4-undecadiena-8,10-dienamida	BOONEN <i>et al.</i> , 2010
8	224,2014	C ₁₄ H ₂₅ NO	Isobutilamida		(2E,7Z)- <i>N</i> -isobutil-2,7-decadienamida	BOONEN <i>et al.</i> , 2010
9	258,1857	C ₁₇ H ₂₅ NO	Isobutilamida		(2E,7Z)- <i>N</i> -isobutil-2,7-tridecadiena-10,12-dienamida	NAKATANI e NAGASHIMA 1992
10	204,1388	C ₁₃ H ₁₇ NO	Isobutilamida		(2Z)- <i>N</i> -isobutil-2-nenona-6,8-dienamida	BOONEN <i>et al.</i> , 2010
11	268,1337	C ₁₇ H ₁₇ NO ₂	Feniletilamida		<i>N</i> -feniletil-2,3-epoxi-6,8-nonadienamida	BOONEN <i>et al.</i> , 2010
12	252,1388	C ₁₇ H ₁₇ NO	Feniletilamida		(2Z)- <i>N</i> -feniletil-2-neneno-6,8-dienamida	SHARMA <i>et al.</i> , 2011
13	260,2014	C ₁₇ H ₂₅ NO	Isobutilamida		(7Z)- <i>N</i> -isobutil-7-tridecena-10,12-dienamida	NAKATANI e NAGASHIMA 1992
14	m/z [M+Na ⁺] 278,1732	C ₁₄ H ₂₅ NO ₃	Isobutilamida		(2E,7Z)- <i>N</i> -isobutil-6,9-hidroxi-2,7-decadienamida	SIMAS <i>et al.</i> , 2013
15	m/z [M+Na ⁺] 278,1732	C ₁₄ H ₂₅ NO ₃	Isobutilamida		(2E,6Z)- <i>N</i> -isobutil-8,9-hidroxi-2,6-decadienamida	SIMAS <i>et al.</i> , 2013
16	266,1544	C ₁₈ H ₁₉ NO	Feniletilamida		(2Z)- <i>N</i> -feniletil-2-deceno-6,8-dienamida	SIMAS <i>et al.</i> , 2013
17	220,1701	C ₁₄ H ₂₁ NO	Isobutilamida		Não identificada	BOONEN <i>et al.</i> , 2010

3.3.2 Espilantol

O espilantol (Figura 5) (ácido 2E,6Z,8E-*N*-isobutil-2,6,8-decatrienóico, *m/z* 222), também conhecido por afinina é o metabólito mais abundante encontrado nas

espécies *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, *Spilanthes ciliata* Kunth, *S. oppositifolia* var. *oppositifolia* (Lam.) R.K. Jansen, *S. radicans* Schrad. ex Dc., entre outras, e também em grande quantidade nas raízes de *Heliopsis longipes* (Asteraceae) (CARIÑO-CORTÉS *et al.*, 2010; WILLIG *et al.*, 2019). Possui massa molecular de 221,1738 g/mol e pode alcançar um teor máximo de até 88,2% dentre todas as amidas presentes em *A. oleracea* (DUBEY *et al.*, 2013). Seu aspecto físico é oleoso com certa viscosidade de cor levemente verde-amarelada. É conhecido também por suas sensações organolépticas de pungência, salivação e formigamento intenso (PAULRAJ *et al.*, 2013).

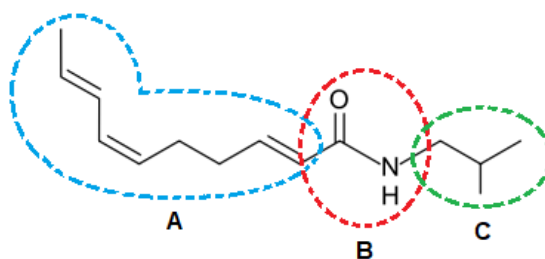


Figura 5. Estrutura molecular do espilantol, com destaque para seu radical alifático A, grupamento amida B e radical isobutila C.

O efeito de formigamento, popularmente chamado de “treme-treme” se dá pela ligação do espilantol aos canais dependentes de potássio com poro duplo, distribuídos por diversas células, responsáveis por controlar o potencial de repouso na excitabilidade celular. Muitos fármacos anestésicos se ligam nestes canais iônicos (PAULRAJ *et al.*, 2013; WYNENDAELE *et al.*, 2018). O aumento da intensidade do formigamento está diretamente relacionado com o maior número de insaturações duplas e triplas, bem como o encurtamento da cadeia alifática, encontrada em algumas *N*-alquilamidas (BOONEN *et al.*, 2012).

A respeito de apresentações comerciais contendo espilantol em sua formulação, Silveira e colaboradores (2018) realizaram um estudo de revisão relatando o registro para os seguintes produtos: Buccaldol[®], apresentado na forma de gel e spray bucal produzido pela empresa Alphamega na França, Indolphar[®], na forma de gel bucal produzido pela empresa ID Phar na Bélgica, e Spilanthes[®], uma tintura de *Acmella oleracea* (etanol a 67%) com indicação para infecções tópicas, produzida por A. Vogel, também na Bélgica. A *European Food Safety Authority*

estipula o consumo máximo diário de 24 µg per capita de espilantol como uma medida segura, pois apesar de baixa toxicidade demonstrada em estudos pré-clínicos, há ausência de ensaios clínicos que estabeleçam doses maiores (RIOS; OLIVO, 2014).

Em uma revisão de patentes já depositadas entre os anos de 1996 e 2016 envolvendo produtos e processos relacionados com as palavras-chave “spilanthol” e “affinin”, Silveira e colaboradores (2018) relataram 1.444 depósitos, sendo divididas entre cosméticos refrescantes, metodologias de síntese, semissíntese e isolamento, aditivos para alimentos ou relatos de ação farmacológica. Grande parte das patentes se destina ao uso do espilantol como um aditivo alimentar, e uma pequena parcela de 32 depósitos analisados ao longo dos anos se trata de aplicações farmacológicas, tendo a analgesia como foco. A empresa brasileira Natura foi a única no país a desenvolver um cosmético antirrugas (Spilol[®]) em 2016, porém sua produção foi descontinuada.

De acordo com a *World International Property Organization* (WIPO, 2020), por intermédio de sua base de dados Patentscope, foram encontrados seis registros para 2018 e cinco para 2019, de depósitos patentários empregando-se os termos de busca “spilanthol” e “affinin”. Uma das patentes registradas foi desenvolvida pela Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP em 2018, abordando metodologia para síntese de espilantol e análogos. Quanto a estratégias de síntese e semissíntese para o espilantol, diversas rotas alternativas para obtenção do espilantol foram descritas, tendo como justificativas a dificuldade de isolamento da molécula a partir de extratos obtidos da espécie (ALONSO *et al.*, 2018).

Devido ao seu caráter anfifílico, os processos de extração e isolamento do espilantol requerem o uso de solventes como metanol, etanol, acetona, diclorometano, acetato de etila, clorofórmio e hexano, de forma a obter essa molécula em maior quantidade, quando comparado à métodos de hidroddestilação (FRANÇA *et al.*, 2016). Um estudo realizado por Dias e colaboradores (2012) descreveu a extração de espilantol através de hidroddestilação, extração por soxhlet em etanol e fluido supercrítico com o uso de dióxido de carbono (CO₂), com fins comparativos. A extração por soxhlet obteve 2,85% de rendimento, a extração aquosa resultou em 0,035% e a extração por fluido supercrítico resultou em 4,82%,

superior à hidrodestilação na ordem de 150 vezes, demonstrando a afinidade por solventes de caráter mais apolar.

3.3.3 Aspectos farmacológicos de *Acmella oleracea* e espilantol

Diversos estudos desenvolvidos em modelos pré-clínicos tanto *in vivo*, como *in vitro* utilizando partes aéreas obtidas na forma de extratos ou produtos isolados de *A. oleracea* foram realizados. As propriedades até então estudadas estão relacionadas com a ação biológica contra carrapatos (ANHOLETO *et al.*, 2017; MARCHESINI *et al.*, 2018), contra insetos (pragas agrícolas) (BINELLI *et al.*, 2019; GOUVÊA *et al.*, 2019), contra larvas da dengue (SIMAS *et al.*, 2013; ARAÚJO *et al.*, 2018), antimalárico (SPELMAN *et al.*, 2012), antibiótico (FRANÇA *et al.*, 2016), atividade anti-obesidade (HUANGb; PENG, 2019), imunomodulatória e anti síndrome de fadiga crônica (NIPATE; TIWARI, 2018), gastroprotetora (NASCIMENTO *et al.*, 2013), diurética (GERBINO *et al.*, 2016), afrodisíaca (SHARMA *et al.*, 2011; ROCHA *et al.*, 2018), inibição de tirosinase (BARBOSA *et al.*, 2016), analgesia (NOMURA *et al.*, 2013; DALLAZEN *et al.*, 2018; DALLAZEN *et al.*, 2019), além de ensaios relacionados aos processos inflamatórios e mediadores envolvidos.

Um dos primeiros estudos envolvendo a atividade anti-inflamatória em modelos animais para a espécie *A. oleracea*, foi realizado por Chakraborty e colaboradores (2004), utilizando um extrato aquoso de *Acmella oleracea* no edema de pata induzido por carragenina em ratos. Neste estudo o extrato aquoso inibiu o edema nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, administradas via oral, em um percentual de 52, 54 e 56%, respectivamente. Neste mesmo trabalho, foram realizadas as atividades de contorções abdominais, onde os resultados demonstraram redução das contorções em 46, 51 e 65% nas mesmas doses usadas para o edema e aumento do tempo de latência a partir de 30 minutos para o teste de placa quente com retirada de cauda (*tail flick test*). Hernández e colaboradores (2009) evidenciaram uma redução de edema induzido em orelha de camundongos, utilizando o extrato etanólico de *Heliopsis longipes* (A. Gray) Blake (rico em *N*-alquilamidas, principalmente espilantol), espilantol isolado e uma amida sintética, denominada *N*-isobutildecanamida, administrados topicamente, anteriores à indução

do edema com ácido araquidônico (AA) e forbol-12-miristato-13-acetato (PMA). Tanto o extrato como o espilantol inibiram a formação do edema, alcançando um DE₅₀ (dose efetiva 50%) de 0,8 e 1,2 mg/orelha para o agente AA e de 2,0 e 1,3 mg/orelha para o agente PMA, respectivamente.

A atividade anti-inflamatória *in vitro* para o espilantol foi inicialmente descrita por Wu e colaboradores (2008) em cultura celular de macrófagos (linhagem RAW 264.7) e avaliação da expressão de citocinas pró-inflamatórias e de óxido nítrico. Extratos obtidos de flores de *A. oleracea* e frações enriquecidas em *N*-alquilamidas evidenciaram importante atividade antioxidante no modelo de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) na concentração de 1,38 µM equivalente a vitamina C e ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) na concentração de 3,32 µM de Trolox (análogo da vitamina E), referindo-se à partição hexânica como melhor resultado. Os extratos particionados com hexano e clorofórmio, com maiores teores de espilantol, reduziram a produção de NO para 28% e 15%, respectivamente, na concentração de 80 µg/mL, gerado através de estímulo com o LPS (1 µg/mL). O espilantol isolado foi testado na concentração de 180 µM sendo capaz de reduzir a expressão das citocinas IL-1β em 34%, IL-6 em 84% e TNF-α em 20%, na fase latente da inflamação, além de inibir a enzima iNOS em mais de 80% e COX tipo 2 em aproximadamente 50%. A comprovação do efeito anti-inflamatório se deu pelo mecanismo de supressão de mRNA (RNA mensageiro) para as enzimas iNOS e COX-2. Já a redução das citocinas se justifica pela supressão do fator nuclear kappa beta (NF-κβ), devido à subunidade fosforilada (p-Iκβ) estar em pequena quantidade. Também, a IL-8 foi inibida de 50% a 90% por concentrações variadas entre 10 e 150 µM de espilantol em linhagem de macrófagos RAW 264.7 (BLANCO *et al.*, 2018; BAKONDI *et al.*, 2019).

Dias e colaboradores (2012), demonstraram atividade anti-inflamatória por meio de inibição de lipoxigenase (LOX) *in vitro* com a adição do substrato ácido linoleico ou ômega 6 (ω6) em placas contendo a enzima, juntamente do acréscimo de extratos de flores, talos e folhas de *A. oleracea* obtidos por hidrodeslilação, soxhlet e fluido super-crítico, nas concentrações de 5, 10 e 20 mg/mL. Todos os extratos demonstraram inibir a enzima LOX em 72% de forma proporcional à quantidade de espilantol, sendo a maior atividade para o extrato de flores obtido por fluido supercrítico, indicando possível atividade anti-inflamatória pela via de

leucotrienos. Além disso, foram confirmadas outras propriedades anti-inflamatórias de extratos contendo folhas e talos de *Spilanthes acmella* (sin *Acmella oleracea*) por meio da inibição de NO e prostaglandina E2 (PGF₂), reduzindo sua produção para menos de 10% do total, comparado ao grupo controle negativo (LPS 1 µg/mL), através da supressão de NF-κβ em diferentes tipos de células, reduzindo por conseguinte a expressão de genes pró-citocinas inflamatórias (CHO *et al.*, 2017).

Apesar de apresentar evidência na ação anti-inflamatória, a espécie *A. oleracea* foi submetida a testes de toxicidade por Chakraborty e colaboradores (2010), onde um ensaio de toxicidade aguda foi realizado com base na dose de 3.000 mg/kg, administrada via oral em ratos Wistar adultos, através do extrato aquoso das partes aéreas de *Spilanthes acmella*. O estudo preliminar não demonstrou mortalidade de animais no período de 24 h de observação. Outro estudo abrangendo variação de doses com extrato etanólico das partes aéreas de *A. oleracea*, realizado por Nomura e colaboradores (2013), observou toxicidade aguda durante um período de 7 dias, com administrações diárias do extrato, nas doses de 5, 500 e 5.000 mg/kg via intraperitoneal em camundongos. As doses de 5 e 500 mg/kg foram bem toleradas pelos camundongos, já a dose de 5.000 provocou problemas respiratórios, bem como convulsões, levando ao LD₅₀ de 889,14 mg/kg. Neste mesmo estudo foi realizado um ensaio de locomoção em campo aberto com camundongos, não resultando em alterações motoras para as doses de 10, 30 e 100 mg/kg administradas via intraperitoneal. Estes estudos promoveram determinada segurança na utilização de extratos da espécie *A. oleracea*, possibilitando a expansão de ensaios envolvendo atividade anti-inflamatória.

3.4 INFLAMAÇÃO E PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é um processo fisiológico necessário que envolve uma série de fatores benéficos ao organismo. Seu dinamismo e complexidade estão relacionados diretamente à severidade, o local e do tipo dano ocorrido, podendo variar entre agentes causadores químicos (ácidos, bases, formalina, carragenina, etc.), físicos (frio, calor, trauma, eletricidade, radiação ultravioleta e ionizante, fratura, etc.), biológicos (vírus, bactérias, parasitas, etc.) ou somáticos (fatores emocionais e

estresse), subdividida pela periodicidade e extensão da lesão: resposta aguda por curtos períodos ou resposta crônica por longos períodos (CONTI *et al.*, 2018).

A resposta aguda da inflamação ocorre em função de um estímulo inespecífico, mediante um conjunto de alterações bioquímicas e imunológicas, sinalizando os sintomas clássicos: calor e rubor, provocados pelo aumento da permeabilidade sanguínea e vasodilatação; edema, caracterizado pela exsudação de fluidos; e dor e prurido, por compressão das terminações nervosas e sensibilização de quimiocinas e aminas vasoativas (RIOS *et al.*, 2009). Como última etapa no tem-se a perda da função evidenciada na alteração da fase aguda do processo para inflamação crônica (FRANCISCHETTI *et al.*, 2010).

Os mediadores atuantes no ciclo de dor e na ativação de células pró e anti-inflamatórias são classificados nas mais diversas formas. Pode-se citar: agentes imunológicos, células originadas dos progenitores linfóide e mieloide da medula óssea; citocinas (interleucinas, quimiocinas, interferon, fatores de necrose tumoral (TNF) e crescimento (TGF) e fatores de estimulação de colônia), liberadas e produzidas por células imunológicas entre outras; mediadores lipídicos ou eicosanóides (leucotrienos, tromboxano, endocanabinoides e prostaglandinas), derivados do processamento do ácido araquidônico e ácidos graxos polinsaturados; sistema complemento, formado por peptídeos e proteínas relacionadas com padrões moleculares associados à patógenos (PMAPs); fatores de transcrição NF- κ B (fator de transcrição nuclear kappa beta), transdutor de sinal e ativador de transcrição (STAT) e fator indutivo de hipóxia (HIF); e espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), também chamados de radicais livres (TASNEEN *et al.*, 2019; AGARWAL; NAKARA; SHANMUGAM, 2019; MADJENE *et al.*, 2019).

A extensão do processo inflamatório agudo acarreta as mais variadas formas e gravidades de doenças encontradas na sociedade. A dor é uns dos principais fatores agravantes levando ao uso de medicamentos (DALAZEN *et al.*, 2018). Entre as formas tópicas, intravenosas e orais comercialmente encontradas, os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) são os mais utilizados pela população mundial, devido ao baixo preço e grande disponibilidade de acesso (YATOO *et al.*, 2018). Dentre outras classes utilizadas de anti-inflamatórios, têm-se os corticosteroides, ou anti-inflamatórios esteroidais (AIES), fármacos opioides e outros

com função secundária voltada para redução inflamação ou dor (FRANCISCHETTI *et al.*, 2010; KISHORE *et al.*, 2019).

Desde a criação do anti-inflamatório não esteroidal ácido acetilsalicílico ou Aspirina[®], derivado sintético da salicina extraída das cascas de espécies do gênero *Salix* (salgueiro), o avanço no desenvolvimento de estudos levaram à gênese de outros AINES como, indometacina, ácido mefenâmico e diclofenaco, popularizando o uso clínico da classe. Posteriormente com o surgimento de diferentes derivados, como ibuprofeno e naproxeno, o efeitos anti-inflamatórios foram sendo ampliados, bem como estudos por mecanismo de ação mais complexos, abrangentes e causando menor número de efeitos adversos (YATOO *et al.*, 2018; XIE *et al.*, 2019).

Apesar da elevada popularidade dos AINES, os mesmos também são conhecidos por seus efeitos lesivos sobre a mucosa gástrica, dispepsias, ulcerações, riscos de eventos cardiovasculares, e anomalias cardíacas (DIAS *et al.*, 2012; WATANABE; FUJIWARA; CHAN, 2019), além da variação que ocorre na terapêutica por individualidade dos pacientes. Sabe-se que o mecanismo conhecido pela inibição da enzima ciclooxigenase (COX) proporciona estes efeitos em maior ou menor grau, de acordo com a seletividade do fármaco pelo tipo de enzima a qual terá sua ação bloqueada. Primordialmente as prostaglandinas (PG) produzidas por meio de ação da COX do tipo I, favorecem a produção de muco protetivo das células parietais, já a COX do tipo II, presente em condições patológicas, está associada com a geração de PG relacionada aos sintomas de inflamação (RANG & DALE, 2016).

Medicamentos mais específicos para a inibição de COX-II, como nimesulida, cetoprofeno, meloxicam, piroxicam, celecoxibe foram desenvolvidos objetivando trazer maior segurança nas terapias devido sua seletividade. No entanto, estes representantes não deixaram de provocar os efeitos adversos habituais nas situações em que a clínica requisitasse longos períodos de tratamento, deixando uma lacuna atual para novos agentes (YATOO *et al.*, 2018).

3.4.1 Mediadores imunológicos

Apesar da grande variedade de fármacos disponíveis no mercado para o auxílio e tratamento da inflamação, os mecanismos de ação não impedem a por

completo o processo inflamatório. Por ter uma resposta adaptativa inteligente, as células imunológicas não foram compreendidas como parte isolada dos processos inflamatórios e sua inibição total ou parcial deve ser cuidadosamente avaliada, visto que o sistema de defesa é um processo fisiológico, dinâmico e necessário ao indivíduo, logo, os efeitos acarretados na clínica podem trazer um desequilíbrio entre o peso de benefícios e malefícios (COOK *et al.*, 2018).

Inicialmente, os neutrófilos (40 a 70%) são os primeiros mediadores nos casos de inflamação aguda, gerando os sinais clássicos através da liberação de TNF- α e IL-8, recrutando mais neutrófilos para o local da inflamação (BLANCO *et al.*, 2018). Posteriormente, há a prevalência de linfócitos (20 a 50%), macrófagos ou monócitos ativados (5 a 10%), eosinófilos (1 a 6%), e basófilos (<1%), mastócitos, entre outros agentes, produzindo mediadores inflamatórios/nociceptivos, como interleucinas, serotonina, histamina, eicosanóides (PG e leucotrienos), os quais conduzirão o organismo a sucessivas injúrias gerando doenças inflamatórias, na tentativa de um reparo persistente estimulado por lesão de origem inespecífica (TASNEEM *et al.*, 2019).

Dentre as principais células imunes relacionadas com os mais diversos processos inflamatórios, os mastócitos, células granulares (10 a 30 μ m de diâmetro) descobertas em meados de 1800 por Paul Ehrlich, são considerados células sentinelas do sistema imunológico (GULLEDGE *et al.*, 2018; CONTI *et al.*, 2018). Estão presentes majoritariamente no tecido conjuntivo, mucosa e pele, mas sua distribuição pelo organismo se dá por todos os locais e órgãos que possuem contato imediato externo, ou seja, sistema gastrointestinal e vias aéreas. Além de participar da homeostase, há relatos do envolvimento direto de mastócitos em doenças como câncer, processos alérgicos, febre urticária, doença de Crohn, oncogênese de forma geral e distúrbios gastrointestinais. Sua função se baseia em regular o estado de estruturas celulares e não-celulares, estando intensamente relacionado com a inflamação crônica nos locais de sua prevalência (REBER; FROSSARD, 2014).

Em diversas reações fisiológicas, como alergia e inflamação, a liberação dos grânulos dos mastócitos ocorre de acordo com o tipo de tecido sob influência da injúria, do receptor estimulado através de ligação de imunoglobulinas, especificamente a imunoglobulina E (IgE), quimiocinas, toxinas (lipopolissacarídeo, por exemplo, e sinalização de citocinas. As proteases são um dos principais

componentes liberados na degranulação de mastócitos. Elas podem ser classificadas como específicas (quimase, triptase e carboxipeptidase A3) – e não-específicas (catepsinas lisossomais, granzima B, renina, calicreína, metaloproteinases de matriz-MMP). Dentre elas, a quimase possui grande relevância na participação de reações no ambiente metabólico, podendo ser considerada como um marcador para monitoramento ou alvo farmacológico de terapias em certas condições patológicas (POWELL *et al.*, 2019).

Os efeitos observados na presença de inflamação são também atribuídos às citocinas, fortemente relacionadas com a liberação, indução e mobilização de células de defesa para o local inflamado. Dentre as principais, encontram-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), as interleucinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-15, IL-17, IL-18 e IL-23) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13 e IL-37). As citocinas também participam dos processos de mobilização e produção de ROS e RNS, que são importantes agentes nos processos inflamatórios, porém sua produção em larga escala dentro de longos períodos torna-os nocivos ao organismo (COOK *et al.*, 2018; TASNEEM *et al.*, 2019).

As ROS estão envolvidas em funções de defesa do organismo, adaptação celular, expressão gênica e apoptose (FRANCISCETTI *et al.*, 2010), formadas por intermédio de reações de redução de moléculas de O₂ acumulado, gerando ânions superóxido (O₂^{•-}) e peróxido (O₂^{•2-}), radicais hidroxila (OH[•]), peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ácido hipocloroso (HOCl). No entanto, o acúmulo destes radicais provoca o chamado estresse oxidativo, ocasionando degradação de proteínas, lipídeos de membrana e DNA. O contrabalanço para o excesso de ROS no organismo é feito por meio das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH), tioredoxinas e peroxiredoxinas, restaurando a homeostase (TASNEEM *et al.*, 2019).

Por fim, juntamente com as ROS, as RNS são derivados nitrogenados produzidos através de uma série de etapas enzimáticas. As RNS contemplam o dióxido de nitrogênio (NO₂), peroxinitrito (NO₃⁻), dentre outras formas sintetizadas com a união de ROS e RNS. O óxido nítrico (NO) é produzido como um sinalizador celular por meio da enzima óxido nítrico síntase (NOS) presente em três isoformas: nNOS por célula neuronal, eNOS3 através de célula endotelial, e iNOS, denominada

óxido nítrico sintase indutiva, presente em células imunológicas e ativada na presença de processos inflamatórios (CONTI *et al.*, 2018).

3.4.2 Quimase

De acordo com o conteúdo presente nos mastócitos, as proteases quimase, triptase e carboxipeptidase A3, de modo geral, são produzidas no retículo endoplasmático e no complexo de Golgi. A transcrição pró-granular se inicia em levemente ácido (pH 6.0) e sua maturação ocorre em pH 5.5, com a atuação de bombas de prótons no mastócito. Posteriormente, entrando em uma das três espécies de secretoma (conjunto de glicosaminoglicanos, triptase e carboxipeptidase A3), onde ficarão em repouso. A quimase intracelular não possui atividade enzimática, ou seja, não degranulada permanece inerte. Sua atividade se inicia em pH 7 a 9, após estimulada sua liberação (DUDECK *et al.*, 2019).

Conforme ocorre a degranulação dos mastócitos, suas vesículas (30 a 150 nm de diâmetro), secretomas individuais ou secretomas conjuntos de histamina e complexos de glicosaminoglicanos, são liberados de forma direta, degranulados em processo anafilático (em grande quantidade) ou liberados por exocitose de compostos. Os mecanismos de estimulação da formação e liberação de quimase não foram completamente elucidados, porém alguns dados, como tempo de meia-vida plasmática e tecidual, foram determinados, resultando em vários dias podendo se estender à semanas, estando livre para exercer sua atividade enzimática e biológica (POWELL *et al.*, 2019).

Quando as proteases de mastócitos são liberadas no plasma sofrem processo de degradação por inibidores endógenos, como α -1 antiqumiotripsina, α -2 macroglobulina e α -1 inibidor de proteinase. A quimase é a única protease a exercer sua ação de forma independente nos tecidos, diferentemente da triptase, que requer uma ligação com heparina. No entanto, complexada com moléculas de heparina, a quimase permanece estável por semanas sem ser afetada por seus inibidores naturais. Desta forma, a quimase pode exercer suas atividades biológicas tendo afinidade por ANG I, fibronectina, albumina sérica, protocollagenase, IL-1 β , procolágeno 1 α , fator de célula-tronco, fator de crescimento de hepatócito,

apolipoproteínas, metaloproteases (MMP), pro-IL-18 e componentes extracelulares da matriz (MIYAZAKI *et al.*, 2006).

A atividade biológica da quimase está relacionada principalmente com o potente efeito relacionado à hidrólise de ANG I em ANG II, sendo responsável pela síntese de cerca de 80 a 90% do total de ANG II no tecido cardíaco (LI *et al.*, 2018). Este peptídeo, além de contribuir para o aumento da pressão arterial, participa dos processos de indução de angiogênese, regeneração e remodelamento tecidual. Outras das ações envolvendo quimase, conforme demonstradas na Figura 6, estão relacionadas com a inflamação na liberação e estimulação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-18 e TGF- β , promovendo a liberação de radicais livres, provocados pela atração de neutrófilos, monócitos, eosinófilos, linfócitos e basófilos (MIYAZAKI *et al.*, 2006).

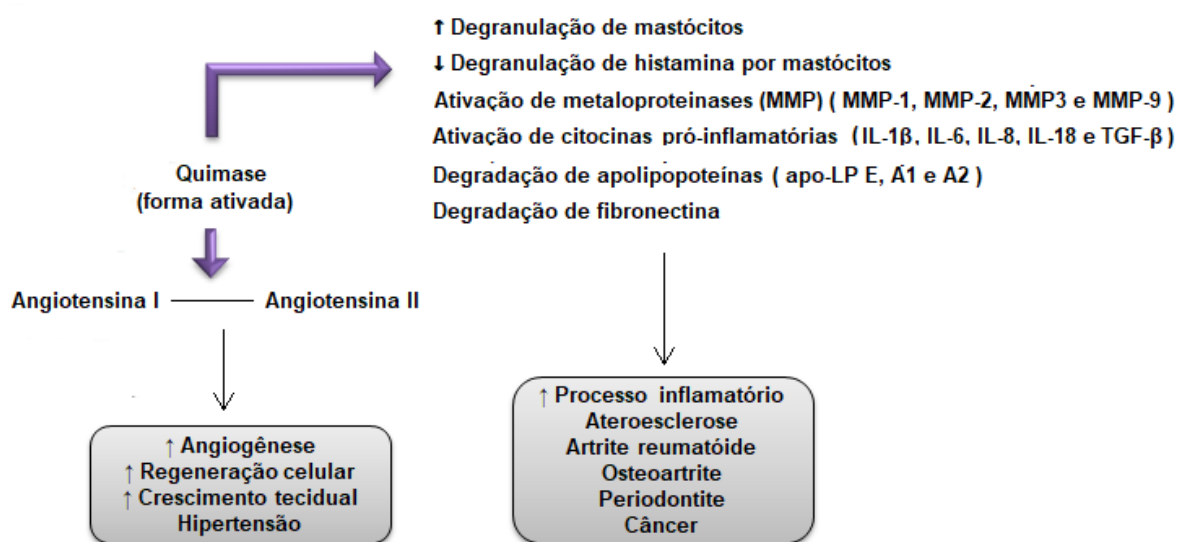


Figura 6. Esquema contendo as principais atividades biológicas descritas para a enzima quimase e envolvimento em processos que contribuem para a instalação de inflamação crônica e patologias associadas.

Estudos conduzidos com o uso de inibidores de quimase constataram redução da manifestação de hipertensão pulmonar e redução da hipertrofia do ventrículo direito, melhorando a circulação e impedindo o avanço de fibrose nos interstícios (KOSANOVIC *et al.*, 2015; ATIYAKSHIN; BUCHWALOW; TIEMANN, 2019). Outros investigadores relacionaram o aumento da atividade da quimase com o desenvolvimento de tumores por angiogênese em câncer de pulmão, estômago e mamas (SUTTLE; HARVIMA, 2015; DUDECK *et al.*, 2019). A atividade da enzima

está relacionada com o aumento de casos de dermatoses, em função da degradação ocorrida entre o epitélio e a membrana basal da pele, facilitando a permeação de muco e aumento de colesterol em função da degradação de lipoproteínas (APOE, APO-A1 e APO-A2), presentes na membrana da lipoproteína de alta densidade (HDL). De maneira geral, desordens patológicas associadas com pulmão, sistema venoso, sistema cardíaco, articulações, rins, pele, desordens metabólicas e agravamento de úlceras apresentaram envolvimento com a atividade da quimase, corroborando a possibilidade desta enzima como um possível alvo para novos fármacos (POWELL *et al.*, 2019).

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Reagentes utilizados

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho foram de grau de pureza pró-análise (PA), e a água para o preparo das soluções foi destilada e deionizada (Milli-Q), com exceção da obtenção de extratos brutos que utilizou etanol anidro (99%), com a intenção de mimetizar a produção de tinturas ou concentrados possíveis de se fazer de modo caseiro, se aproximando do resultado obtido com métodos empírico tradicionais.

Para o isolamento de espilantol, foram utilizados sílica gel de granulometria 60 (obtido de Sigma Aldrich, 230-400 mesh), solventes *n*-hexano (99%) e acetato de etila (98,5%). As análises cromatográficas por CLAE utilizaram acetonitrila (J.T. Baker), e ácido fórmico (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil)

Os testes com a linhagem A7r5 necessitaram dos seguintes reagentes: sulfanilamida (SULF), cloridrato de vanádio (III) (VCl₃), dicloridrato de *N*-(-1-naftil)-etilenodiamina (NEDD), bromidrato de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-dofeniltetrazólio (MTT), substrato cromogênico para quimase e quimiotripsina (Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida), tripsina (*N*-benzoil-DL-Arg-*p*-nitroanilida), elastase (N-succinil-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilida), trombina (H-D-Phe-Pip-Arg-*p*-nitroanilida) e plasmina (H-D-Val-Leu-Lys-*p*-nitroanilida), meio Eagle's modificado por Dulbecco's (DMEM), soro fetal bovino (FCS) adquiridos de Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EUA).

Para os ensaios *in vivo*, foram utilizados polissorbato 80 (Tween 80) (Neon São Paulo), formalina obtida de Sigma-Aldrich (Saint Louis, Missouri, EUA), anticoagulante citrato de sódio (obtido de Labtest, Minas Gerais). Para a anestesia dos animais, foram empregados cetamina e xilazina, obtidas de Syntec (São Paulo, Brasil). As análises bioquímicas foram realizadas por meio de kits para ureia (URE), creatinina (CRE), transaminase oxalacética (TGO ou AST) transaminase pirúvica (TGP ou ALT) obtidos de Labtest, Minas Gerais. Por fim, o corante hematoxilina e eosina (H&E) foram obtidos também de Labtest, Minas Gerais.

4.1.2 Animais

Os experimentos para a avaliação da atividade anti-inflamatória em modelo *in vivo* foram conduzidos com ratos machos da raça Wistar (4 a 6 semanas de idade pesando entre 120 e 200 g), cedidos pelo biotério do Departamento de bioquímica da UFRGS. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno sob ambiente com temperatura, umidade e ciclos claro/escuro controlados (12/12 h, temperatura de 22 ± 1 °C), com livre acesso a água potável e ração. Os procedimentos experimentais ocorreram pela aprovação de protocolo ético pelo Comitê Institucional de Ética no uso de Animais (CEUA/UFRGS), de número 37119/2019.

4.1.3 Material Vegetal

Partes aéreas de *Acmella oleracea* foram adquiridas em fevereiro de 2018 através do Mercado Ver-o-Peso (norte do Brasil) na cidade de Belém-do-Pará, estado do Pará. A planta teve suas partes separadas e envoltas em papel de jornal para a secagem do material ao abrigo da luz, sendo posteriormente congeladas em freezer até a obtenção dos extratos. A espécie foi identificada pelo botânico Prof. Dr. Sérgio Augusto de Loreto Bordignon (Centro Universitário La Salle, UNILASSALE), e um exemplar completo, contendo talo, folhas e flores foi armazenado cuidadosamente para a produção de exsicata. O voucher (ICN 197504) foi depositado no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

4.2 AVALIAÇÃO QUÍMICA E ISOLAMENTO

4.2.1 Obtenção dos extratos

As flores (796 g) e folhas (160 g) foram submetidas separadamente ao processo de maceração etanólica à temperatura ambiente, protegido ao abrigo de luz por meio de quatro ciclos de extração durante sete dias até seu esgotamento. As soluções obtidas foram concentradas por meio de rotaevaporador com temperatura controlada (45 °C), sendo posteriormente liofilizadas para obtenção de extratos secos. Os extratos, ***Acmella oleracea* extrato etanólico – flores** (AOEE-F) e

***Acmella oleracea* extrato etanólico - folhas (AOEE-L)**, foram armazenados sob temperatura de - 30 °C até a realização de análises químicas, ensaios biológicos ou farmacológicos. As amostras foram posteriormente solubilizadas em água Milli-Q com auxílio de polisorbato 80% (Tween 80) em uma concentração máxima de 3% para os ensaios *in vivo* e em dimetil sulfóxido (DMSO) em uma concentração menor de 1% para os ensaios com células.

4.2.2 Processo de isolamento do espilantol

Uma alíquota do extrato AOEE-F (500 mg) foi fracionada em coluna cromatográfica de 20 mm de diâmetro utilizando sílica gel como fase estacionária na medida de 1g de sílica para cada 50 mg do extrato. Foi realizado um gradiente de eluição entre os solventes *n*-hexano e acetato de etila, iniciando-se em 100% de hexano e gradativamente incorporando e elevando a concentração de acetato de etila a cada 2% (até 50%), conforme demonstra a Tabela 2.

Tabela 2. Gradiente de solventes empregado para o isolamento de espilantol.

Fração	Proporção	
	<i>n</i> -Hexano	AcOEt
1	100%	--
2	95%	5%
3	90%	10%
4	88%	12%
5	86%	14%
6	84%	16%
7	82%	18%
8	80%	20%
9	70%	30%
10	60%	40%
11	50%	50%

Neste processo, o espilantol pode ser isolado em maiores concentrações dentro da faixa de eluição iniciada com 86% de *n*-hexano, conforme dados previamente obtidos pela literatura (Pachayasittikul *et al.*, 2009). As frações foram coletadas separadamente e monitoradas por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) revelando-se o ponto de interesse de cor púrpura ($R_f \sim 6,7$) com

auxílio de anisaldeído sulfúrico aplicado na forma de spray sobre as placas, seguido de aquecimento. Após o isolamento do espilantol, uma alíquota de 10 mg foi reservada para análise de ressonância magnética nuclear (RMN), realizada no Instituto de Química da UFRGS, auxiliado por Grace Gosmann, Cesar Hoffmann, Thais Fernandes e Diego Defferrari. O conteúdo reservado foi ressuspenso com clorofórmio deuterado (CDCl_3) em tubo apropriado para o equipamento (Bruker Avance III, 400 a 298 K), e submetido à análise. Os deslocamentos químicos (δ) foram relatados em partes por milhão (ppm), tendo relação com o padrão interno utilizado, trimetilsilano (TMS).

4.2.3 Análise cromatográfica com o uso da técnica de CLAE-ESI-MS/MS

As análises ocorreram no Instituto de Ciência e Tecnologia dos Alimentos (ICTA/UFRGS), sob a coordenação do Prof. Dr. Eliseu Rodrigues e Luana Mallmann. Os extratos obtidos a partir das partes aéreas da *Acmella oleracea* (AOEE-F e AOEE-L) foram analisadas por aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) (Shimadzu, Kyoto, Japão) com o intuito de verificar os perfis químicos pela presença de *N*-alquilamidas relatadas na literatura. O equipamento consistiu dos seguintes itens: sistema binário de bombas (modelo LC-20AD), um degaseificador online (modelo DGU-20A), injetor automático (modelo SIL20AHT), um forno para coluna (modelo CTO-20A) acoplado em série com detector de matriz de diodo (DAD SPD-M20A) e espectrometro de massas (MS) do tipo quadrupolo com analisador em tempo de voo (QTOF) e ionização por eletrospray (ESI) (Bruker Daltonics, micrOTOF-Q III model, Bremer, Alemanha).

Para o processo analítico, foram injetados 10 μL de extratos na concentração de 1 mg/mL, solubilizados em solução de etanol e água Milli-Q em proporções iguais, eluídos através de coluna Phenomenex C18 (250 mm x 4.6 mm) com empacotamento de 4 μm e eluição de 0,7 mL/min. O sistema de solventes foi composto por: (A) solução aquosa em 0,1% de ácido fórmico e (B) acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico. O gradiente de eluição na corrida foi na ordem: (B) 5%, seguido de 80% de 10 a 25 min, retornando aos 5% em 28 min até 33 min. A fonte ESI teve as condições: modo positivo – tensão de 3.000 V; scan de detecção de massas na relação m/z 50 para 1.000; temperatura seca e fluxo de gás (N_2) de 310

°C e 8 mL/min, respectivamente; nebulizador com 4 bar de pressão. Os espectros de massa MS² foram obtidos no modo Auto-MS² (aquisição data-dependente) e a energia de colisão foi estimada dinamicamente baseada em valores apropriados para a relação massa/carga *m/z* com escala adequada para geração de boa fragmentação. Uma solução de formiato de sódio a 10 mM foi utilizada como agente calibrador externo. As *N*-alquilamidas foram identificadas com base na detecção UV e fragmentos de massa já encontrados na literatura (NAKATANI; NAGASHIMA, 1992; RAMSEWAK; ERICKSON; NAIR, 1999; SHARMA *et al.*, 2011; MONROE *et al.*, 2016).

4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VITRO*

4.3.1 Cultura de células vasculares de músculo liso (VSMC)

Os ensaios *in vitro* foram realizados no laboratório de Bioquímica Farmacológica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, auxiliados pelos professores Dr. Markus Berguer e Dr. Paula Barros Terraciano. Para o ensaio de cultivo celular foram utilizadas células vasculares de músculo liso, derivadas da aorta de ratos, linhagem A7r5 (ATCC[®] CRL-1.444), obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As células foram cultivadas em meio DMEM contendo 5 mM de glicose, 10% FCS, 50 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As culturas foram incubadas em atmosfera de ar úmido contendo 5% de CO₂ a 37 °C de temperatura. As células foram passadas para confluência nas garrafas e após foram dissociadas com solução de tripsina/EDTA (0,1%/0,01%) e repicadas em novos frascos.

4.3.2 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT

O ensaio de viabilidade celular foi realizado através do método de formação de cristais de formazan, por meio da reação com MTT. Neste método, ocorre mudança da pigmentação do composto (amarelo para azul) em contato com enzimas mitocondriais, apenas presentes em células viáveis, que clivam e reduzem sais de MTT formando sais de formazan que então são lidos em espectrofotômetro (KUMARb; NAGARAJAN; UCHIL, 2018). Para tal, as células VSMC (1 x 10⁴

células/poço) foram semeadas a 37 °C em placas de 96 poços contendo meio DMEM e 10% de FCS. As células foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS) e o meio foi repostado por DMEM contendo 1% de FCS, com a adição dos extratos AOEE-L e AOEE-F (150, 100, 50 e 25 µg/mL) e espilantol (200, 150, 100, 50 e 25 µM) durante o período de 24 h. Após este período, os tratamentos foram removidos e a solução de MTT (brometo de [3(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio]) a 0.5 mg/mL foi adicionada, sendo incubada durante 4 h. Os cristais de formazan formados foram extraídos com DMSO e a solução lida em espectrofotômetro (modelo SpectraMAX 190, Sunnyvale, Califórnia, EUA) a 565 nm de absorvância. Os resultados foram expressos na forma de porcentagem em comparação com o controle (células tratadas apenas com veículo)

4.3.3 Triagem para avaliação *in vitro* de extratos e espilantol frente a diferentes proteases

O potencial inibitório para os extratos de *A. oleracea* e espilantol foi investigado a partir de ensaios frente a diferentes proteases envolvidas no processo inflamatório, objetivando determinar atividade prévia dos extratos AOEE-F, AOEE-L e espilantol quanto a uma possível ação de inibição destas enzimas. Para tal procedimento, os extratos AOEE-F e AOEE-L (100 µg/mL) e espilantol (100 µM), previamente solubilizados em água Milli-Q com adição de DMSO (0,5%) foram incubados em placas de 96 poços durante 20 min a 37 °C com as proteases quimase, quimiotripsina, tripsina, elastase, trombina e plasmina presentes a uma concentração de 100 nM. Após este processo inicial, foram adicionados os seguintes substratos, a 2 mM: Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida (quimase e quimiotripsina), H-D-Phe-Pip-Arg- *p*-nitroanilida (trombina), *N*-succinil-Ala-Ala-Ala-*p*-nitroanilida (elastase), H-D-Val-Leu-Lys- *p*-nitroanilida (plasmina) e *N*-benzoil-DL-Arg- *p*-nitroanilida (tripsina). A cinética de formação do composto *p*-nitroanilida foi monitorada a 405 nm em intervalos de 14 s, durante 30 min e lida por espectrofotômetro (modelo SpectraMAX 190, Sunnyvale, Califórnia, EUA). A atividade residual enzimática foi expressa em mOD/min por mg de proteína.

4.3.4 Determinação do efeito inibitório dos extratos e espilantol para a enzima quimase

A habilidade de inibição de quimase pelos extratos de folhas e flores de *Acmella oleracea* e espilantol em meio hiperglicêmico foi testada. Para tal, foram semeadas alíquotas de $1,0 \times 10^6$ VSMC em placas de 96 poços com meio DMEM contendo 5 mM de glicose e 10% FCS). As células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas em meio normoglicêmico (5 mM de glicose) ou hiperglicêmico (25 mM de glicose) contendo 1% de FCS. Os tratamentos foram os seguintes: (i) veículo (DMSO 0,5%); (ii) AOEE-L (25, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$); (iii) AOEE-F (25, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$); e (iv) espilantol (50, 100 e 200 μM). Após 24 h de incubação a 37 °C em atmosfera contendo 5% CO_2 , as células foram lavadas com PBS e a extração da enzima quimase foi realizada por meio da maceração das células em 50 mM de Tris-HCl, pH 8,0, contendo solução 2 M de NaCl. A determinação da atividade da quimase foi feita diretamente no extrato de VMSC, com a adição do substrato cromogênico Ala-Ala-Pro-Phe-*p*-nitroanilida (2 mM) em 96 poços. A cinética de formação do derivado *p*-nitroanilida foi monitorada a 405 nm, em intervalos de 14 s de um total de 30 minutos de reação utilizando espectrofotômetro (modelo SpectraMAX 190, Sunnyvale, Califórnia, EUA). O índice de produção de quimase foi expresso na forma de mOD/min por mg de proteína apresentado em cada poço.

4.3.5 Determinação da produção de nitratos e nitritos em VSMC

Os níveis totais de nitratos e nitritos foram determinados como um indicativo da produção de NO pelas células após estímulo hiperglicêmico (MIRANDA; ESPEY; WINK, 2001). Para tanto, as células foram previamente estimuladas ou não (controle negativo) em meio hiperglicêmico (25 mM), seguido da incubação com os extratos (AOEE-L e AOEE-F) e espilantol, nas concentrações de 25, 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 50, 100 e 200 μM , respectivamente. Após 24 h, o homogenato resultante das células coletadas desproteinizado pela adição de etanol 1:1 (v/v) e mantido a 4 °C. Após centrifugação a $1.500 \times g$ durante 10 min, o sobrenadante foi homogeneizado na presença de VCl_3 (8 mg/mL) e a leitura da atividade foi realizada em placa de 96 poços. O reagente de Griess, composto por uma solução contendo sulfanilamida a

2% e dicloreto de *N*-(1-naftil)etilenodiamina a 0,1%, foi adicionado às células e a leitura do diazocomposto gerado foi realizada em 540 nm após 30 min de incubação protegida de luz. Os valores das amostras foram comparados a partir de uma curva padrão obtida com valores conhecidos (1 – 200 µM) de nitrato de sódio.

4.3.6 Avaliação da produção do radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

A produção de superóxido foi estimada em homogenatos celulares de VSMC baseada no ensaio de redução de NBT (nitroblue tetrazólium) (HOHMANN *et al.*, 2013). As células previamente estimuladas ou não por meio hiperglicêmico e tratadas com AOEE-L e AOEE-F, e espilantol, foram testadas nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL e 50, 100 e 200 µM, respectivamente. Aos homogenatos celulares obtidos, posteriormente foi adicionada uma solução de NBT (0,1%), sendo incubados em placa de 96 poços por 1 h a 37 °C. A mistura aquosa foi cuidadosamente removida dos poços e os cristais de formazan formados, dissolvidos em DMSO contendo uma solução de hidróxido de potássio a 2M. A absorbância foi mensurada em 600 nm e os resultados expressados através da redução de NBT (OD a 600 nm).

4.3.7 Avaliação da atividade da enzima CAT

A atividade da catalase foi avaliada por meio de homogenados de VSMC seguido do decaimento da absorbância em 25 °C e 240 nm pela decomposição de péxido de hidrogênio (H_2O_2). Para tal procedimento, foram adicionados às células VSMC estimuladas ou não por meio hiperglicêmico (25 mM) em placa de 96 poços, extratos AOEE-L e AOEE-F, e espilantol, nas concentrações de 25, 50 e 100 µg/mL e 50, 100 e 200 µM, respectivamente, incubadas durante 24 h. Transcorrido esse tempo, os homogenatos celulares foram obtidos conforme metodologia descrita anteriormente, e adicionados como meio reagente, composto por 10 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,0, Triton X-100 a 0,1% e 20 mM de H_2O_2 . Um decréscimo na cinética de absorbância pôde ser observado após 10 min de incubação pela leitura em espectrofotômetro (modelo SpectraMAX 190, Sunnyvale, Califórnia, EUA). A atividade da catalase foi expressada em mOD/min por mg de proteína do poço.

4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA *IN VIVO*

4.4.1 Modelo de formação de edema em pata de ratos por formalina

Os ensaios *in vivo* foram realizados com o auxílio de Walter Beys-da-Silva e Markus Berguer na própria Universidade. A atividade anti-inflamatória de extratos de folhas e flores de *A. oleracea* (AOEE-F e AOEE-L) e do espilantol foi avaliada através da prevenção de inflamação local induzida por formalina nas patas traseiras de ratos. O modelo utilizado consistiu na administração prévia dos tratamentos, através de via intraperitoneal (i.p.), seguido da indução do edema em uma das patas do animal 30 min após os tratamentos. O edema de pata ocorre em duas fases: a fase aguda, observada do tempo zero até 1,5 h da administração do indutor do edema e perdura por mais 3,5 a 5,5 horas, denominada fase de latência. Nestes períodos é possível observar um aumento no volume das patas induzidas ao edema tendo seu pico até o término da fase aguda, decrescendo de tamanho ao longo do término da fase de latência (LEE; JEONG, 2002).

4.4.2 Tratamentos e indução do edema

Para este ensaio, os animais foram divididos em oito grupos ($n = 6$), sendo eles: controle negativo (solução de NaCl 0,9% contendo Tween 80 a 3%, 1 mL/kg, i.p.), controle positivo com indometacina (10 mg/kg, i.p.), AOEE-F (10, 30 e 100 mg/kg, i.p.), AOEE-L (10, 30 e 100 mg/kg, i.p.) e espilantol (6,2 mg/kg, i.p.) em uma dose equimolar, comparando-se as massas moleculares entre espilantol (221,17 g/mol) e indometacina (357,77 g/mol). Nesse sentido, o valor da dose de espilantol foi adequado proporcionalmente à dose de indometacina, reduzindo desta maneira o número de animais utilizados, em caso de uma curva de doses.

Transcorridos 30 min após a administração dos tratamentos, os animais receberam uma injeção de formalina a 2% na superfície plantar da pata traseira direita (100 μ L/pata, i.pl.) e salina na pata traseira esquerda (100 μ L/pata, i.pl.). O espessamento da pata produzido a partir da formação de edema foi medido por meio de pletismômetro (Insight, São Paulo, Brasil) durante os tempos 0, 30, 60, 120,

180 e 240 min decorrentes da administração de formalina. Todas as medidas foram realizadas apenas pelo mesmo operador objetivando a redução de erros. O edema foi avaliado pela capacidade de retenção de exsudado nas patas dos animais após a administração dos extratos, comparando-se com o grupo controle, a fim de se verificar se houve habilidade de modulação da inflamação.

4.4.3 Avaliação de parâmetros bioquímicos plasmáticos

Após o experimento, foram coletadas alíquotas de sangue dos animais tratados (AOEE-F, AOEE-L na dose de 100 mg/kg, espilantol 6,2 mg/kg e indometacina 10 mg/kg) para a avaliação dos parâmetros bioquímicos, com o intuito de se verificar possíveis lesões renais ou hepáticas causadas pelos tratamentos. Para o procedimento, os animais foram sacrificados após anestesia com uma mistura de cetamina: xilazina (120 mg/kg: 10 mg/kg, i.p.), de forma que a coleta dos animais foi realizada através de punção cardíaca. As amostras foram coletadas em eppendorfs contendo anticoagulante (citrato de sódio a 100 mol/L), e então centrifugadas (10 minutos a 3.000 rpm), sendo coletado o plasma. As amostras livres de hemólise foram armazenadas a -80 °C para a posterior avaliação bioquímica, sendo realizados os testes para avaliar a formação de nitritos/nitratos (NO_2^-), alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), creatinina (CRE) e uréia (URE). A análise bioquímica ocorreu por meio de kits comerciais contendo as enzimas (obtidos de Labtest, Minas Gerais).

4.4.4 Avaliação histológica

A avaliação histológica foi realizada no laboratório de Patologia Veterinária da UFRGS, auxiliado por Bianca Santana Cecco e David Driemeier. Para a análise foram utilizadas patas traseiras dos animais dos grupos tratados com os extratos (apenas na concentração de 100 mg/kg), espilantol (6,2 mg/kg), indometacina (10 mg/kg) e controle, com o objetivo de se analisarem as condições inflamatórias estabelecidas, bem como sinais teciduais marcados pela presença migratória de mastócitos, linfócitos e macrófagos. Desta forma, as patas dos animais sacrificados foram removidas com o auxílio de uma tesoura e armazenadas em solução salina

tamponada contendo 10% de formalina, pH 7,2. Foram realizados dois cortes em cada pata, sendo que o primeiro corte continha pele da região do calcanhar, e o segundo, um corte transversal no osso, músculo, ligamentos e pele. O segundo corte foi mantido em solução de ácido nítrico (HNO₃) a 8% durante 24 h, sendo lavada após com água corrente durante 5 min. Todos os tecidos foram desidratados em álcool e lavados com xileno. As amostras foram então embebidas em parafina, e foram realizados cortes de 3-5 µm, corados posteriormente com hematoxilina e eosina (H&E). O material foi examinado em microscópio para uma análise qualitativa da resposta celular inflamatória.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística de todos os ensaios foi feita através do teste de ANOVA de duas vias, seguido do teste de Turkey's *post hoc*, utilizando-se o software SPSS, versão 14.0 (SPSS, Inc.) instalado em computador compatível. Os dados foram representados pela média ± SEM (média de erro padrão). Um valor de *p* menor que 0.05 foi considerado significativo.

O texto completo sobre os resultados obtidos que nesta dissertação ocupa o intervalo entre as páginas 75 – 91, foi suprimido por tratar-se de um conteúdo submetido à processo patentário. Os resultados foram descritos desde a análise da composição química encontrada nos extratos, resultados dos ensaios com avaliação da ação anti-inflamatória e antioxidante *in vitro* com células da linhagem A7r5, e resultados dos ensaios *in vivo* mensurando a ação anti-inflamatória de *A. oleracea*, frente à indução de edema por formalina em patas traseiras de camundongos.

O texto completo sobre a discussão dos resultados obtidos que nesta dissertação ocupa o intervalo entre as páginas 95 – 105, foi suprimido por tratar-se de um conteúdo submetido à processo patentário. A discussão dos resultados gerados foi descrita desde a análise da composição química encontrada nos extratos, ensaios com avaliação da ação anti-inflamatória e antioxidante *in vitro* com células da linhagem A7r5, e ensaios *in vivo* mensurando a ação anti-inflamatória de *A. oleracea*, frente à indução de edema por formalina em patas traseiras de camundongos.

Quanto à avaliação química:

- Os extratos de folhas e de flores de *Acmella oleracea* são uma importante fonte de *N*-alquilamidas, especialmente àquelas pertencentes à classe das *N*-isobutilamidas;
- Em termos quantitativos, tem-se em AOEE-F uma maior quantidade de *N*-isobutilamidas (92,8%), quando comparado ao AOEE-L (68,3%);
- O extrato de flores de *Acmella oleracea* possui um teor de espilantol aproximadamente 12 vezes maior quando comparado ao extrato de folhas;
- O método de CLAE-ESI-MS/MS demonstrou ser uma ferramenta útil para a análise e quantificação destes compostos;

Quanto à atividade anti-inflamatória *in vitro*:

- Os extratos (AOEE-F e AOEE-L) e espilantol demonstraram importante atividade inibitória sobre proteases pró-inflamatórias, especialmente aquelas pertencentes à classe das serino-proteases;
- Espilantol demonstrou um importante efeito inibitório sobre a atividade da enzima quimase, redução da produção de NO, e efeitos antioxidantes pela supressão da atividade do radical anion superóxido e aumento na expressão da catalase.
- As semelhanças nas atividades biológicas demonstradas para AOEE-F e AOEE-L evidenciam o possível envolvimento de outros compostos presentes no extrato para o efeito anti-inflamatório, além do espilantol;

Quanto à atividade anti-inflamatória *in vivo*:

- AOEE-F demonstrou maior atividade quanto à redução do edema em pata de ratos no modelo de inflamação induzido pela formalina;
- O espilantol possui importante efeito anti-inflamatório *in vivo* conforme evidenciado pela completa prevenção da formação do processo edematogênico;
- A administração dos extratos e de espilantol nos animais não induziu efeitos tóxicos significativos nas doses testadas, conforme evidenciado pelos parâmetros bioquímicos;
- O mecanismo de ação para a atividade anti-inflamatória parece envolver em conjunto a inibição da enzima quimase, redução nos níveis de óxido nítrico e atividade antioxidante.

1. A SZALLASI, P. Researchers discover new flavor in an ancient spice. **Trends In Pharmacological Sciences**, [s.l.], p.437-439, 25 jul. 2005.

2. ABEYSIRI, G.; DHARMADASA, R. M.; ABEYSINGHE, D. C.; SAMARASINGHE, K. Screening of phytochemical, physico-chemical and bioactivity of different parts of *Acmella oleraceae* Murr. (Asteraceae), a natural remedy for toothache. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 50, p.852-856, out. 2013.

3. AGARWAL, H.; NAKARA, A.; SHANMUGAM, V. K. Anti-inflammatory mechanism of various metal and metal oxide nanoparticles synthesized using plant extracts: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 109, p.2561-2572, jan. 2019.

4. AHMAD, S.; SIMMONS, T.; VARAGIC, J.; MONIWA, N.; CHAPPELL, M. C.; FERRARIO, C. M. Chymase-Dependent Generation of Angiotensin II from Angiotensin-(1-12) in Human Atrial Tissue. **Plos One**, [s.l.], v. 6, n. 12, p.1-9, 13 dez. 2011.

5. ALONSO, I. G.; YAMANE, L. T.; FREITAS-BLANCO, V. S.; NOVAES, L. F. T.; FRANZ-MONTAN, M.; PAULA, E. de; RODRIGUES, M. V. N.; RODRIGUES, R. A. F.; PASTRE, J. C. A new approach for the total synthesis of spilanthol and analogue with improved anesthetic activity. **Tetrahedron**, [s.l.], v. 74, n. 38, p.5192-5199, set. 2018.

6. ANHOLETO, L. A.; OLIVEIRA, P. R. de.; RODRIGUES, R. A. F.; SPINDOLA, C. S. dos; LABRUNA, M. B.; PIZANO, M. A.; CASTRO, K. N. C. de; CAMARGO-MATHIAS, M. I. Potential action of extract of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen to control *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) ticks. **Ticks And Tick-borne Diseases**, [s.l.], v. 8, n. 1, p.65-72, jan. 2017.

7. ARAÚJO, L. F. de; ARAÚJO, P. H. F. de; FERREIRA, R. M. A.; SENA, I. D. S.; LIMA, A. L.; CARVALHO, J. C. T.; FERREIRA, L. M.; SOUTO, R. N. P. Larvicidal effect of hydroethanolic extract from the leaves of *Acmella oleracea* L. R. K. Jansen in *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **South African Journal Of Botany**, [s.l.], v. 117, p.134-140, jul. 2018.

8. ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E. M.; LINDER, T.; WAWROSCHE, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E. H.; ROLLINGER, J. M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J. M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M. D.; KOPP, B.; DIRSCH, V. M.; STUPPNER, H.; BAUER, R. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, [s.l.], v. 33, n. 8, p.1582-1614, dez. 2015.

9. ATIASHIN, D.; BUCHWALOW, I.; TIEMANN, M. Mast cell chymase: morphofunctional characteristics. **Histochemistry And Cell Biology**, [s.l.], v. 152, n. 4, p.253-269, 8 ago. 2019.

10. AZAB, A.; NASSAR, A.; AZAB, A. Anti-Inflammatory Activity of Natural Products. **Molecules**, [s.l.], v. 21, n. 10, p.1-19, 1 out. 2016.

11. BAKONDI, E.; SINGH, S. B.; HAJNÁDY, Z.; NAGY-PÊNZES, M.; REGDON, Z.; KOVÁCS, K.; HEGEDUS, C.; MADÁCSY, T.; MALÉTH, J.; HEGYI, P.; DEMÉNY, M. A.; NAGY, T.; KÉKI, S.; SZABÓ, E.; VIRÁG, L.. Spilanthal Inhibits Inflammatory Transcription Factors and iNOS Expression in Macrophages and Exerts Anti-inflammatory Effects in Dermatitis and Pancreatitis. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 20, n. 17, p.1-18, 3 set. 2019.
12. BARBOSA, A. F.; SILVA, K. C. B.; OLIVEIRA, M. C. C. de; CARVALHO, M. G. de; SABAA-SRUR, A. U. O. S. Effects of *Acmella oleracea* methanolic extract and fractions on the tyrosinase enzyme. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.321-325, maio 2016.
13. BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. de; AUGUSTO, O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o quê aprendemos com animais transgênicos e nocautes?. **Química Nova**, [s.l.], v. 29, n. 6, p.1352-1360, dez. 2006.
14. BARNES, P. J. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture 2005. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 148, n. 3, p.245-254, 29 jan. 2009.
15. BENELLI, G.; PAVELI, R.; DRENAGGI, E.; MAGGI, F. Insecticidal efficacy of the essential oil of jambú (*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen) cultivated in central Italy against filariasis mosquito vectors, houseflies and moth pests. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 229, p.272-279, jan. 2019.
16. BLANCO, V. S. F. de; MICHALAK, B.; ZELIOLI, I. A. M.; OLIVEIRA, A. S. S. da; RODRIGUES, M. V. N.; FERREIRA, A. G.; GARCIA, V. L.; CABRAL, F. A.; KISS, A. K.; RODRIGUES, R. A. F. Isolation of spilanthal from *Acmella oleracea* based on Green Chemistry and evaluation of its in vitro anti-inflammatory activity. **The Journal Of Supercritical Fluids**, [s.l.], v. 140, p.372-379, out. 2018.
17. BOONEN, J.; BAERT, B.; BLONDEEL, P.; SAEGER, S. de; SPIEGELEER, B. de. LC-MS profiling of N-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bio-active spilanthal. **Journal Of Pharmaceutical And Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 53, n. 3, p.243-249, nov. 2010.
18. BOONEN, J.; BRONSELAER, A.; NIELANDT, J.; VERYSER, L.; TRÉ, G. de; SPIEGELEER, B. de. Alkamid database: Chemistry, occurrence and functionality of plant N-alkylamides. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 142, n. 3, p.563-590, ago. 2012.
19. BORGES, W. de S.; BERLINCK, R. G. S.; SCOTTI, M. T.; VIEIRA, P. C. A Química de Produtos Naturais do Brasil no Século XXI. **Química Nova**, [s.l.], p.706-710, 3 jul. 2017.
20. BOY, H. I. A.; RUTILLA, A. J. H.; SANTOS, K. A.; TY, A. M. T.; YU, A. I.; MAHBOOB, T.; TANGPOONG, J.; NISSAPATOM, V. Recommended Medicinal Plants as Source of Natural Products: A Review. **Digital Chinese Medicine**, [s.l.], v. 1, n. 2, p.131-142, jun. 2018.

21. BRANDÃO, P. F.; DUARTE, A. C.; DUARTE, R. M. Comprehensive multidimensional liquid chromatography for advancing environmental and natural products research. **Trac Trends In Analytical Chemistry**, [s.l.], v. 116, p.186-197, jul. 2019.
22. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **1º Suplemento do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. 2018.
23. BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia Brasileira**, 6ª ed. 2019.
24. BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. 2006.
25. BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Interministerial nº 2.960, de 9 de Dezembro de 2008. Aprova o **Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos** e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Diário Oficial da União.
26. BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais**. 2020.
27. BRASIL. Ministério da Saúde. **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. 2009.
28. BRASIL. Presidência da República. Decreto nº 5.813, de 22 de Junho de 2006. Aprova a **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos** e dá outras providências. Diário Oficial da União.
29. CARIÑO-CORTÉS, R.; GAYOSSO-DE-LUCIO, J. A.; ORTIZ, M. I.; SÁNCHEZ-GUTIÉRREZ, M.; GARCIA-REYNA, P. B.; CILIA-LOPEZ, V. G.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, N.; MORENO, E.; PONCE-MONTER, H. Antinociceptive, genotoxic and histopathological study of *Heliopsis longipes* S.F. Blake in mice. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 130, n. 2, p.216-221, jul. 2010.
30. CECH, N. B.; KANDHI, V.; DAVIS, J. M.; HAMILTON, A.; EADS, D.; LASTER, S. M. Echinacea and its alkylamides: Effects on the influenza A-induced secretion of cytokines, chemokines, and PGE2 from RAW 264.7 macrophage-like cells. **International Immunopharmacology**, [s.l.], v. 10, n. 10, p.1268-1278, out. 2010.
31. CHAKRABORTY, A.; DEVI, R. K. B.; RITA, S.; SHARATCHANDRA, K.; SINGH, T. I. Preliminary studies on antiinflammatory and analgesic activities of *Spilanthes acmella* in experimental animal models. **Indian Journal of Pharmacology**, [s.l.], v. 36, p.148-150, jun. 2004.
32. CHAKRABORTY, A.; DEVI, B. R. K.; SANJEBAM, R.; KHUMBONG, S.; THOKCHOM, I. S. Preliminary studies on local anesthetic and antipyretic activities of *Spilanthes acmella* Murr. in experimental animal models. **Indian Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 42, n. 5, p.277-280, 2010.

33. CHENG, Y.; LIU, R.; HO, M.; WU, T.; CHEN, C.; LO, I.; HOU, M.; YUAN, S.; WU, Y.; CHANG, F. Alkylamides of *Acmella oleracea*. **Molecules**, [s.l.], v. 20, n. 4, p.6970-6977, 16 abr. 2015.
34. CHO, Y. BACH, T. T.; KIM, B. R.; VUONG, H. L.; CHO, S. *Spilanthes acmella* inhibits inflammatory responses via inhibition of NF- κ B and MAPK signaling pathways in RAW 264.7 macrophages. **Molecular Medicine Reports**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.339-346, jan. 2017.
35. CHOI, S. H.; KOZUKUE, E.; SUH, B. S.; KOZUKUE, N.; LEVIN, C. E.; FRIEDMAN, M. Analysis of the Contents of Pungent Compounds in Fresh Korean Red Peppers and in Pepper-Containing Foods. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 54, n. 24, p.9024-9031, nov. 2006.
36. CONTI, P.; CARAFFA, A.; MASTRANGELO, F.; TETTAMANTI, L.; RONCONI, G.; FRYDAS, L.; KRITAS, S. K.; THOHARIDES, T. C. Critical role of inflammatory mast cell in fibrosis: Potential therapeutic effect of IL-37. **Cell Proliferation**, [s.l.], v. 51, n. 5, p.1-8, 30 jul. 2018.
37. CONTI, P.; D'OVIDIO, C.; CONTI, C.; GALLENGA, C. E.; LAURITANO, D.; CARAFFA, A.; KRITAS, S. K.; RONCONI, G. Progression in migraine: Role of mast cells and pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 844, p.87-94, fev. 2019.
38. COOK, A. D.; CHRISTENSEN, A. D.; TEWARI, D.; MCMAHON, S. B.; HAMILTON, J. A. Immune Cytokines and Their Receptors in Inflammatory Pain. **Trends In Immunology**, [s.l.], v. 39, n. 3, p.240-255, mar. 2018.
39. DALLAZEN, J. L.; MARIA-FERREIRA, D.; LUZ, B. B. da; NASCIMENTO, A. M.; CIPRIANI, T. R.; SOUZA, L. M. de; GLUGOSKI, L. P.; SILVA, B. J. G.; GEPPETTI, P.; WERNER, M. F. P. de. Distinct mechanisms underlying local antinociceptive and pronociceptive effects of natural alkylamides from *Acmella oleracea* compared to synthetic isobutylalkyl amide. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 131, p.225-235, nov. 2018.
40. DALLAZEN, J. L.; MARIA-FERREIRA, D.; LUZ, B. B. da; NASCIMENTO, A. M.; CIPRIANI, T. R.; SOUZA, L. M. de; GLUGOSKI, L. P.; SILVA, B. J. G.; NASSINI, R.; WERNER, M. F. P. de. Pharmacological potential of alkylamides from *Acmella oleracea* flowers and synthetic isobutylalkyl amide to treat inflammatory pain. **Inflammopharmacology**, [s.l.], v. 28, n. 1, p.175-186, 20 maio 2019.
41. DAVISON, E. K; A BRIMBLE, M. Natural product derived privileged scaffolds in drug discovery. **Current Opinion In Chemical Biology**, [s.l.], v. 52, p.1-8, out. 2019.
42. DIAS, A. M. A.; SANTOS, P.; SEABRA, I. J.; JÚNIOR, R. N. C.; BRAGA, M. E. M., SOUZA, H. C. de. Spilanthal from *Spilanthes acmella* flowers, leaves and stems obtained by selective supercritical carbon dioxide extraction. **The Journal Of Supercritical Fluids**, [s.l.], v. 61, p.62-70, jan. 2012.

43. DUBEY, S.; MAITY, S.; SINGH, M.; SARAF, S. A.; SAHA, S. Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology of *Spilanthes acmella*: A Review. **Advances In Pharmacological Sciences**, [s.l.], v. 2013, p.1-9, 2013.
44. DUDECK, A.; KÖEBERLE, M.; GOLDMANN, O.; MEYER, N.; DUDECK, J.; ING, D.; LEMMENS, S.; ROHDE, M.; ROLDÁN, N. G.; DIETZE-SCHWONBERG, K.; ORINSKA, Z.; MEDINA, E.; HENDRIX, S.; METZ, M.; ZENCLUSSEN, A. C.; STEBUT, E. V.; BIEDERMANN, T. Mast cells as protectors of health. **Journal Of Allergy And Clinical Immunology**, [s.l.], v. 144, n. 4, p.4-18, out. 2019.
45. DUENGEN, H.; KIM, R. J.; ZAHGER, D.; ORVIN, K.; KORNOWSKI, R.; ADMON, D.; KETTNER, J.; SHIMONY, A.; OTTO, C.; BECKA, M. Effects of the chymase inhibitor fulacimstat on adverse cardiac remodeling after acute myocardial infarction – Results of the CHIARA MIA 2 trial. **American Heart Journal**, [s.l.], p.1-33, jan. 2020.
46. DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, [s.l.], v. 112, p.4-29, out. 2016.
47. FAVORETO, R.; GILBERT, B. *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen (Asteraceae) – **Jambu. Revista Fitos**, v.5, nº 01, 2010.
48. FRANCA, J. V.; QUEIROZ, M. S. R.; AMARAL, B. P. do; SIMAS, N. K.; SILVA, N. C. B. da; 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**, [s.l.], v. 89, p.781-789, nov. 2016.
49. FRANCISCHETTI, I.; MORENO, J. B.; SCHOLZ, M.; YOSHIDA, W. B. Os leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperfusão. **Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular**, [s.l.], v. 25, n. 4, p.575-584, dez. 2010.
50. GERBINO, A.; SCHENA, G.; MILANO, S.; MILELLA, L.; BARBOSA, A. F.; ARMENTANO, F.; PROCINO, G.; SVELTO, M.; CARMOSINO, M. Spilanthol from *Acmella Oleracea* Lowers the Intracellular Levels of cAMP Impairing NKCC2 Phosphorylation and Water Channel AQP2 Membrane Expression in Mouse Kidney. **Plos One**, [s.l.], v. 11, n. 5, p.1-22, 23 maio 2016.
51. GOULART, A. C.; CORREIA, F. A. dos S.; SOUSA, S. C. O. M. de; LUZ, J. G. de C. Study of the inflammatory process induced by injection of carrageenan or formalin in the rat temporomandibular joint. **Brazilian Oral Research**, [s.l.], v. 19, n. 2, p.99-105, jun. 2005.
52. GOUVÊA, S. M.; CARVALHO, G. A.; FIDELIS, E. G.; RIBEIRO, A. V.; FARIAS, E. S.; PICANÇO, M. C. Effects of paracress (*Acmella oleracea*) extracts on the aphids *Myzus persicae* and *Lipaphis erysimi* and two natural enemies. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 128, p.399-404, fev. 2019.

53. GULLEDGE, T. V.; COLLETTE, N. M.; MACKEY, E.; JOHNSTONE, S. E.; MOAZANI, Y.; TODD, D. A.; MOESER, A. J.; PIERCE, J. G.; CECH, N. B.; LASTER, S. M. Mast cell degranulation and calcium influx are inhibited by an *Echinacea purpurea* extract and the alkylamide dodeca-2E,4E-dienoic acid isobutylamide. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 212, p.166-174, fev. 2018.
54. HERNÁNDEZ, I.; MÁRQUEZ, L.; MARTÍNEZ, I.; DIEGUEZ, R.; DELPORTE, C.; PRIETO, S.; MOLINA-TORRES, J.; GARRIDO, G. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract and alkamides-derived from *Heliopsis longipes* roots. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 124, n. 3, p.649-652, jul. 2009.
55. HIND, N.; BIGGS, N. *Acmella Oleracea* Compositae. **Curtis's Botanical Magazine**, [s.l.], v. 20, n. 1, p.31-39, fev. 2003.
56. HOHMAN, M. S. N.; CARDOSO, R. D. R.; PINHO-RIBEIRO, F. A.; CRESPIJIO, J.; CUNHA, T. M.; ALVES-FILHO, J. C.; SILVA, R. V. da; PINGE-FILHO, P.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; CASAGRANDE, R.; VERRI JR, W, A. 5-Lipoxygenase deficiency reduces acetaminophen induced hepatotoxicity and lethality. *Biomed Res. Int.* 2013.
57. HUANG, W.; WU, L.; HU, S.; WU, S. Spilanthol Inhibits COX-2 and ICAM-1 Expression via Suppression of NF- κ B and MAPK Signaling in Interleukin-1 β -Stimulated Human Lung Epithelial Cells. **Inflammation**, [s.l.], v. 41, n. 5, p. 1934-1944, 30 jun. 2018.
58. HUANG, W.; HUANG, C.; HU, S.; PENG, H.; WU, S. Topical Spilanthol Inhibits MAPK Signaling and Ameliorates Allergic Inflammation in DNCB-Induced Atopic Dermatitis in Mice. **International Journal Of Molecular Sciences**, [s.l.], v. 20, n. 10, p.1-13, 20 maio 2019.
59. HUANGb, W.; PENG, H.; HU, S.; WU, S. Spilanthol from Traditionally Used *Spilanthes acmella* Enhances AMPK and Ameliorates Obesity in Mice Fed High-Fat Diet. **Nutrients**, [s.l.], v. 11, n. 5, p.1-15, 30 abr. 2019.
60. JANSEN, R. K. The Systematics of *Acmella* (Asteraceae - Heliantheae). **Systematic Botany Monographs**, [s.l.], v. 8, p.1-115, 1985.
61. JIN, D.; TAKAI, S.; NONAKA, Y.; YAMAZAKI, S.; FUJIWARA, M.; NAKAMURA, Y. A Chymase Inhibitory RNA Aptamer Improves Cardiac Function and Survival after Myocardial Infarction. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, [s.l.], v. 14, p.41-51, mar. 2019.
62. KIM, K. H.; KIM, E. J.; KWUN, M. J.; LEE, J. Y.; BACJ, T. B.; EUM, S. M.; CHOI, J. Y.; CHO, S.; KIM, S.; JEONG, S.; JOO, M. Suppression of lung inflammation by the methanol extract of *Spilanthes acmella* Murray is related to differential regulation of NF- κ B and Nrf2. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 217, p.89-97, maio 2018.
63. KISHORE, N.; KUMAR, P.; SHANKER, K.; VERMA, A. K. Human disorders associated with inflammation and the evolving role of natural products to

overcome. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, [s.l.], v. 179, p.272-309, out. 2019.

64. KOSANOVIC, D.; LUITEL, H.; DAHAL, B. K.; CORNITESCU, T.; JANSSEN, W.; DANSER, A. H. J.; GARRELD, I. M.; MEY, J. G. R. de; FAZZI, G.; SCHIFFERS, P.; IGLARZ, M.; FISCHLI, W.; GHOFRANI, H. A.; WEISSMANN, N.; GRIMMINGER, F.; SEEGER, W.; REISS, I.; SCHERMULY, R. T. Chymase: a multifunctional player in pulmonary hypertension associated with lung fibrosis. **European Respiratory Journal**, [s.l.], v. 46, n. 4, p.1084-1094, 25 jun. 2015.

65. KUMAR, V.; BHATT, V.; KUMAR, N. Amides From Plants: Structures and Biological Importance. **Studies In Natural Products Chemistry**, [s.l.], p.287-333, 2018.

66. KUMAR, P.; NAGARAJAN, A.; UCHIL, P. D. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. **Cold Spring Harbor Protocols**, [s.l.], v. 2018, n. 6, p.1-4, jun. 2018.

67. LAVRENTYEV, E. N.; ESTES, A. M.; MALIK, K. U. Mechanism of high glucose-induced angiotensin II production in rat vascular smooth muscle cells. *Circ. Res.* 101, 455–464, 2007.

68. LEE, I. O.; JEONG, Y. S. Effects of Different Concentrations of Formalin on Paw Edema and Pain Behaviors in Rats. **Journal Of Korean Medical Science**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.81-85, 2002.

69. LEE, S. W.; KIM, Y. K.; KIM, K.; LEE, H. S.; CHOI, J. H.; LEE, W. S.; JUN, C.; PARK, J. H.; LEE, J. M.; RHO, M. Alkamides from the fruits of *Piper longum* and *Piper nigrum* displaying potent cell adhesion inhibition. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [s.l.], v. 18, n. 16, p.4544-4546, ago. 2008.

70. LI, T.; ZHANG, X.; CHENG, H.; ZHANG, Z.; AHMAD, S.; VARAGIC, J.; LI, W.; CHENG, C. P.; FERRARIO, C. M. Critical role of the chymase/angiotensin-(1–12) axis in modulating cardiomyocyte contractility. **International Journal Of Cardiology**, [s.l.], v. 264, p.137-144, ago. 2018.

71. MADJENE, L. C.; DANELLI, L.; DAHDAH, A.; VIBHUSHAN, S.; BEX-COUDRAT, J.; PACREAU, E.; VEUGIER, C.; CLAVER, J.; ROLAS, L.; PONS, M.; MADERA-SALCEDO, I. K.; BEGHADADI, W.; ELHGONEIMI, A.; BENHAMOU, M.; LAUNAY, P.; ABRINK, M.; PEJLER, G.; MOURA, I. C.; CHARLES, N.; DAUGAS, E.; PERIANIN, A.; BLANK, U. Mast cell chymase protects against acute ischemic kidney injury by limiting neutrophil hyperactivation and recruitment. **Kidney International**, [s.l.], p.1-40, out. 2019.

72. MARCHESINI, P.; BARBOSA, A. F.; FRANCO, C.; NOVATO, T.; SANCHES, M. N. G.; CARVALHO, M. G. de; FABRI, R. L.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M. O. Activity of the extract of *Acmella oleracea* on immature stages of *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, [s.l.], v. 254, p.147-150, abr. 2018.

73. MARMITT, D. J.; REMPEL, C.; GOETTERT, M. I.; SILVA, A. C. Plantas Mediciniais da RENISUS Com Potencial Anti-inflamatório: Revisão Sistemática Em Três Bases de Dados Científicas. **Revista Fitos**, [s.l.], v. 9, n. 2, p.1-16, 2015.
74. MATHEUS, M. E.; FERNANDES, Si. B. de O.; SILVEIRA, C. S.; RODRIGUES, V. P.; MENEZES, F. de S.; FERNANDES, P. D. Inhibitory effects of *Euterpe oleracea* Mart. on nitric oxide production and iNOS expression. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 107, n. 2, p.291-296, set. 2006.
75. MAZOUREK, M.; PUJAR, A.; BOROVSKY, Y.; PARAN, I.; MUELLER, L.; JAHN, M. M. A Dynamic Interface for Capsaicinoid Systems Biology. **Plant Physiology**, [s.l.], v. 150, n. 4, p.1806-1821, 24 jun. 2009.
76. MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric oxide* 5, 62-71, 2001.
77. MIYAZAKI, M.; TAKAI, S.; JIN, D.; MURAMATSU, M. Pathological roles of angiotensin II produced by mast cell chymase and the effects of chymase inhibition in animal models. **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 112, n. 3, p.668-676, dez. 2006.
78. MOLINA-TORRES, J.; SALAZAR-CABRERA, C. J.; ARMENTA-SALINAS, C.; RAMIREZ-CHÁVEZ, E. Fungistatic and Bacteriostatic Activities of Alkamides from *Heliopsis longipes* Roots: Affinin and Reduced Amides. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 52, n. 15, p.4700-4704, jul. 2004.
79. MONROE, D.; LUO, R.; TRAN, K.; RICHARDS, K. M.; BARBOSA, A. F.; CARVALHO, M. G. de; SABAA-SRUR, A. U. O.; SMITH, R. E. LC-HRMS and NMR Analysis of Lyophilized *Acmella oleracea* Capitula, Leaves and Stems. **The Natural Products Journal**, [s.l.], v. 6, n. 2, p.116-125, 19 maio 2016.
80. MONTEIRO, E. C. A.; TRINDADE, J. M. F. de; DUARTE, A. L. B. P.; CHAHADE, W. H. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). **O reumatologista revista**. Temas de traumatologia clínica, v. 9, mai. 2008.
81. NAKATANI, N.; NAGASHIMA, M. Pungent Alkamides from *Spilanthes acmella* L. var. *oleracea* Clarke. **Bioscience, Biotechnology, And Biochemistry**, [s.l.], v. 56, n. 5, p.759-762, jan. 1992.
82. NASCIMENTO, A. M.; SOUZA, L. M. de; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. P. de; MARIA-FERREIRA, D.; SILVA, L. M. da; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; LACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 85, p.137-142, jan. 2013.
83. NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal Of Natural Products**, [s.l.], v. 79, n. 3, p.629-661, 7 fev. 2016.

84. NIPATE, S. S.; TIWARI, A. H. Antioxidant and immunomodulatory properties of *Spilanthes oleracea* with potential effect in chronic fatigue syndrome infirmity. **Journal Of Ayurveda And Integrative Medicine**, [s.l.], p.1-7, nov. 2018.
85. NOMURA, E. C. O.; RODRIGUES, M. R. A.; SILVA, C. F. da; HAMM, L. A.; NASCIMENTO, A. M.; SOUZA, L. M. de; CIPRIANI, T. R.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. P. de. Antinociceptive effects of ethanolic extract from the flowers of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen in mice. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 150, n. 2, p.583-589, nov. 2013.
86. OZAWA, S.; TAKAHASHI, M.; YAMAOTSU, N.; HIRONO, S. Structure-based virtual screening for novel chymase inhibitors by in silico fragment mapping. **Journal Of Molecular Graphics And Modelling**, [s.l.], v. 89, p.102-108, jun. 2019.
87. PAPOIU, A. D.; YOSIPOVITCH, G. Topical capsaicin. The fire of a 'hot' medicine is reignited. **Expert Opinion On Pharmacotherapy**, [s.l.], v. 11, n. 8, p.1359-1371, 6 maio 2010.
88. PASSOS, G. F.; FERNANDES, E. S.; CUNHA, F. M. da; FERREIRA, J.; PIANOWSKI, L. F.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B.. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 110, n. 2, p.323-333, mar. 2007.
89. PATWARDHAN, B. Ethnopharmacology and drug discovery. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 100, n. 1-2, p.50-52, ago. 2005.
90. PAULRAJ, J.; GOVINDARAJAN, R.; PALPU, P. The Genus *Spilanthes* Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Pharmacological Properties: A Review. **Advances In Pharmacological Sciences**, [s.l.], v. 2013, p.1-22, 2013.
91. PEJLER, G.; ABRINK, M.; RINGVALL, M.; WERNERSSON, S. Mast Cell Proteases. **Advances In Immunology**, [s.l.], p.167-255, 2007.
92. POWELL, P. C.; WEI, C.; FU, L.; PAT, B.; BRADLEY, W. E.; COLLAWN, J. F.; DELL'ITALIA, L. J. Chymase uptake by cardiomyocytes results in myosin degradation in cardiac volume overload. **Heliyon**, [s.l.], v. 5, n. 4, p.1-27, abr. 2019.
93. PRACHAYASITTIKUL, S.; SUPHAPONG, S.; WORACHARTCHEEWAN, A.; LAWUNG, R.; RUCHIRAWAT, S.; PRACHAYASITTIKUL, V. Bioactive Metabolites from *Spilanthes acmella* Murr. **Molecules**, [s.l.], v. 14, n. 2, p.850-867, 19 fev. 2009.
94. RAMSEWAK, R.; ERICKSON, A. J.; NAIR, M. G. Bioactive N-isobutylamides from the flower buds of *Spilanthes acmella*. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 51, n. 6, p.729-732, jul. 1999.
95. RANG; DALE. Farmacologia. 8. ed. Elsevier: Rio de Janeiro, 2016.

96. RAO, T.; TAN, Z.; PENG, J.; GUO, Y.; CHEN, Y.; ZHOU, H.; OUYANG, D. The pharmacogenetics of natural products: A pharmacokinetic and pharmacodynamic perspective. **Pharmacological Research**, [s.l.], v. 146, p.1-17, ago. 2019.
97. RATNASOORIYA, W. D.; PIERIS, K. P. P.; SAMARATUNGA, U.; JAYAKODY, A. Diuretic activity of *Spilanthes acmella* flowers in rats. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 91, n. 2-3, p.317-320, abr. 2004.
98. RATNASOORIYA, W.; PIERIS, K. Attenuation of Persistent Pain and Hyperalgesia by *Spilanthes acmella* Flowers in Rats. **Pharmaceutical Biology**, [s.l.], v. 43, n. 7, p.614-619, jan. 2005.
99. REBER, L. L.; FROSSARD, N. Targeting mast cells in inflammatory diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, [s.l.], v. 142, n. 3, p.416-435, jun. 2014.
100. RHO, M.; LEE, S. W.; PARK, H. R.; CHOI, J.; KANG, J. Y.; KIM, K.; LEE, H. S.; KIM, K. ACAT inhibition of alkamides identified in the fruits of *Piper nigrum*. **Phytochemistry**, [s.l.], v. 68, n. 6, p.899-903, mar. 2007.
101. RIOS, J.; RECIO, M. C.; ESCANDELL, J. M.; ANDÚJAR, I. Inhibition of Transcription Factors by Plant-Derived Compounds and their Implications in Inflammation and Cancer. **Current Pharmaceutical Design**, [s.l.], v. 15, n. 11, p.1212-1237, 1 abr. 2009.
102. RIOS, M. Y.; OLIVO, H. F. Natural and Synthetic Alkamides. **Studies In Natural Products Chemistry**, [s.l.], p.79-121, 2014.
103. ROCHA, C. F. da; LIMA, Y. M. S.; CARVALHO, H. O.; PINTO, R. C.; FERREIRA, I. M.; CASTRO, A. N.; LIMA, C. S.; CARVALHO, J. C. T. Action of the hydroethanolic extract of the flowers of *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen on the reproductive performance of Wistar females rats: A popular female aphrodisiac from the Amazon. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 214, p.301-308, mar. 2018.
104. RODEIRO, I.; DONATO, M. T.; JIMENEZ, N.; GARRIDO, G.; MOLINATORRES, J.; NENENDEZ, R.; CASTELL, J. V.; GOMEZ-LECHÓN, M. J. Inhibition of human P450 enzymes by natural extracts used in traditional medicine. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 23, n. 2, p.279-282, fev. 2009.
105. SANTOS-OLIVEIRA, R.; COULAUD-CUNHA, S.; COLAÇO, W. Revisão da *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, Celastraceae. Contribuição ao estudo das propriedades farmacológicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 19, n. 2, p.650-659, jun. 2009.
106. SHARMA, V.; BOONEN, J.; CHAUHAN, N. S.; THAKUR, M.; SPIEGELEER, B. D.; DIXIT, V. K. *Spilanthes acmella* ethanolic flower extract: LC-MS alkylamide profiling and its effects on sexual behavior in male rats. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 18, n. 13, p.1161-1169, out. 2011.

107. SHINOHARA, N. K. S.; VELOSO, R. R.; BORCKMANS, M. V. L.; ALEXANDRE, E. F.; PADILHA, M. R. F. Macaxeira na cultura alimentar pernambucana. *Revista Eletrônica Diálogos Acadêmicos*. v. 07, nº 2, p. 86-102, 2014.
108. SILVEIRA, N.; SANDJO, L. P.; BIAVATTI, M. W. Spilanthol-containing products: A patent review (1996–2016). ***Trends In Food Science & Technology***, [s.l.], v. 74, p.107-111, abr. 2018.
109. SIMAS, N. K.; DELLAMORA, E. C. L. da; SCHRIPSEMA, J.; LAGE, C. L. S.; FILHO, A. M. O. de; WESSJOHANN, L.; PORZEL, A.; KUSTER, R. M. Acetylenic 2-phenylethylamides and new isobutylamides from *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen, a Brazilian spice with larvicidal activity on *Aedes aegypti*. ***Phytochemistry Letters***, [s.l.], v. 6, n. 1, p.67-72, fev. 2013.
110. SPELMAN, K.; DEPOIX, D.; MCCRAY, M.; MOURAY, E.; GRELLIER, P. The Traditional Medicine *Spilanthes acmella*, and the Alkylamides Spilanthol and Undeca-2E-ene-8,10-diyonic Acid Isobutylamide, Demonstrate *In Vitro* and *In Vivo* Antimalarial Activity. ***Phytotherapy Research***, [s.l.], v. 25, n. 7, p.1098-1101, 20 jan. 2011.
111. STAKE-NILSSON, K.; HULTCRANTZ, R.; UNGE, P.; WENGSTRÖM, Y. Complementary and alternative medicine used by persons with functional gastrointestinal disorders to alleviate symptom distress. ***Journal Of Clinical Nursing***, [s.l.], v. 21, n. 5-6, p.800-808, 17 dez. 2011.
112. STOCKLER-PINTO, M. B.; MALM, O.; MORAES, C.; FARAGE, N. E.; SILVA, W. S.; COZZOLINO, S. M. F.; MAFRA, D. A Follow-up Study of the Chronic Kidney Disease Patients Treated with Brazil Nut: Focus on Inflammation and Oxidative Stress. ***Biological Trace Element Research***, [s.l.], v. 163, n. 1-2, p.67-72, 14 nov. 2014.
113. SUTTLE, M.; HARVIMA, I. T. Mast cell chymase in experimentally induced psoriasis. ***The Journal Of Dermatology***, [s.l.], v. 43, n. 6, p.693-696, 24 dez. 2015.
114. TAKAI, S.; JIN, D.; MIYAZAKI, M. Multiple Mechanisms for the Action of Chymase Inhibitors. ***Journal Of Pharmacological Sciences***, [s.l.], v. 118, n. 3, p.311-316, 2012.
115. TANTAPAKUL, C.; PHAKHODEE, W.; RITTHIWIGROM, T.; YOSSATHERA, KULSIRI.; DEACHATHAI, S.; LAPHOOKHIEO. Antibacterial compounds from *Zanthoxylum rhetsa*. ***Archives Of Pharmacal Research***, [s.l.], v. 35, n. 7, p.1139-1142, jul. 2012.
116. TASNEEM, S.; LUI, B.; LI, B.; CHOUDHARY, M. I.; WANG, W. Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents. ***Pharmacological Research***, [s.l.], v. 139, p.126-140, jan. 2019.
117. TOMIMORI, Y.; MANNO, A.; TANAKA, T.; FUTAMURA-TAKAHASHI, J.; MUTO, T.; NAGAHIRA, K. ASB17061, a novel chymase inhibitor, prevented the development of angiotensin II-induced abdominal aortic aneurysm in apolipoprotein

E-deficient mice. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 856, p.1-7, ago. 2019.

118. VERYSER, L.; TAEVERNIER, L.; JOSHI, T.; TATKE, P.; WYNENDAELE, E.; BRACKE, N.; STALMANS, S.; PEREMANS, K.; BURVENICH, C.; RISSEEUW, M.; SPIEGELEER, B. D. Mucosal and blood-brain barrier transport kinetics of the plant N-alkylamide spilanthol using in vitro and in vivo models. **Bmc Complementary And Alternative Medicine**, [s.l.], v. 16, n. 1, p.1-12, 13 jun. 2016.

119. VIEIRA, A. S.; BEIJAMINI, V.; MELCHIORS, A. C. The effect of isotretinoin on triglycerides and liver aminotransferases. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, [s.l.], v. 87, n. 3, p.382-387, jun. 2012.

120. WATANABE, T.; FUJIWARA, Y.; CHAN, F. K. L. Current knowledge on non-steroidal anti-inflammatory drug-induced small-bowel damage: a comprehensive review. **Journal Of Gastroenterology**, [s.l.], p.1-15, 21 dez. 2019.

121. WILLIG, J. B.; SALOMÓN, J. L. O.; VIANNA, D. R. B.; MOURA, S.; PILGER, D, A.; BUFFON, A.; KONRATH, E. L. *Heliopsis longipes* S.F. Blake (Asteraceae) extract causes cell cycle arrest and induces caspase dependent apoptosis against cancer cell lines. *South African Journal of Botany*, 2019.

122. WIPO - Word International Patent Organization (2020). Patentscope. Disponível em <https://patentscope.wipo.int/search/en/search.jsf>. Acessado em janeiro de 2020.

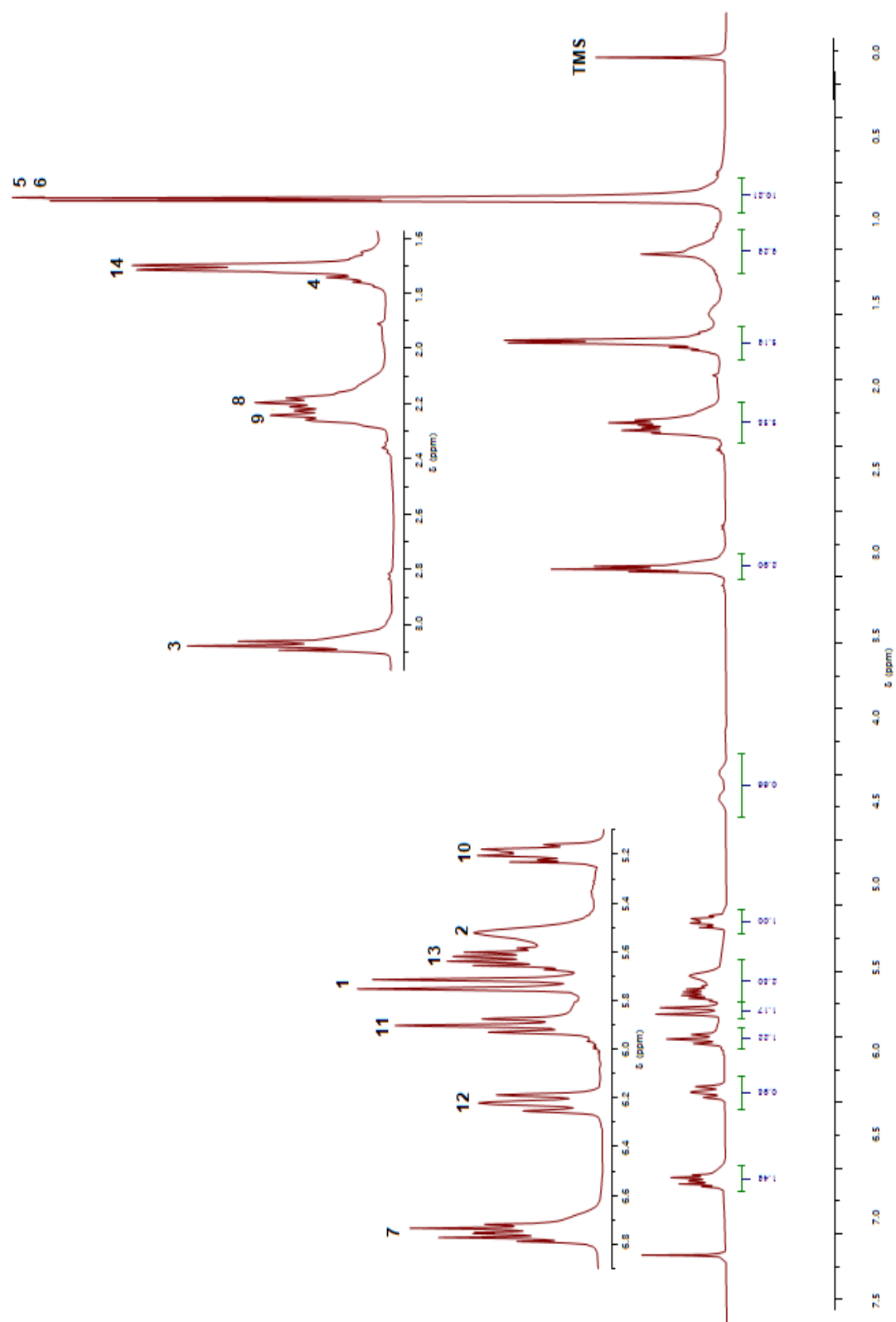
123. WU, L.; FAN, N.; LIN, M.; CHU, I.; HUANG, S.; HU, C.; HAN, S. Anti-inflammatory Effect of Spilanthol from *Spilanthes acmella* on Murine Macrophage by Down-Regulating LPS-Induced Inflammatory Mediators. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 56, n. 7, p.2341-2349, abr. 2008.

124. WYNENDAELE, E.; SPIEGELEER, B. D.; GAVAERT, B.; JANSSENS, Y.; SULEMAN, S.; CATTOOR, S.; SAUNDERS, J. H.; VERYSER, L. Regulatory status of N-alkylamide containing health products. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, [s.l.], v. 98, p.215-223, out. 2018.

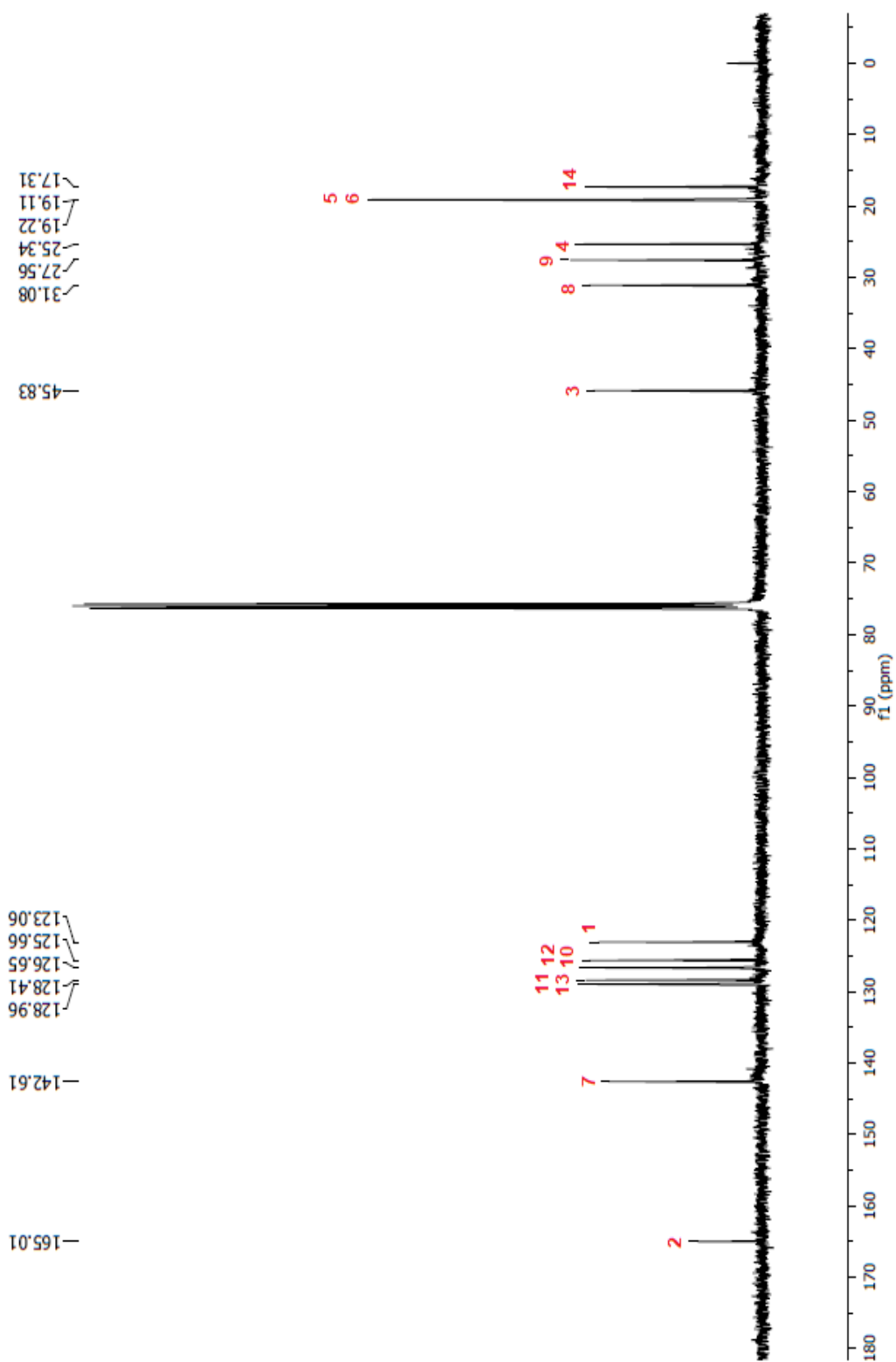
125. XIE, Y.; PAN, M.; GAO, Y.; ZHANG, L.; GE, W.; TANG, P. Dose-dependent roles of aspirin and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in abnormal bone remodeling and skeletal regeneration. **Cell & Bioscience**, [s.l.], v. 9, n. 1, p.1-11, dez. 2019.

126. YATOO, M. I.; GOPALAKRISHNAN, A.; SAXENA, A.; PARRAY, O. R.; TUFANI, N. A.; CHAKRABORTY, S.; TIWARI, R.; DHAMA, K.; IQBAL, H. M. Anti-Inflammatory Drugs and Herbs with Special Emphasis on Herbal Medicines for Countering Inflammatory Diseases and Disorders - A Review. **Recent Patents On Inflammation & Allergy Drug Discovery**, [s.l.], v. 12, n. 1, p.39-58, 21 ago. 2018.

127. ZHAI, Z.; HANEY, D. M.; WU, L.; SOLCO, A. K.; MURPHY, P. A.; WURTELE, E. S.; KOHUT, M. L.; CUNNICK, J. E. Alcohol extract of *Echinacea pallida* reverses stress-delayed wound healing in mice. **Phytomedicine**, [s.l.], v. 16, n. 6-7, p.669-678, jun. 2009.



Espectro de RMN- ^1H para espilantol (CDCl_3 , 400 MHz, tetrametil silano (TMS) utilizado como padrão interno).



Espectro de RMN-¹³C para espilantol (CDCl₃, 100 MHz, tetrametil silano (TMS) utilizado como padrão interno).