

VÂNIA MARIA MOREIRA VALENTE

UFV	BIBLIOTECA	BBT	OBRA
	CLASSIFICACAO		
TITULO			
			
194456BBT			

**CARACTERIZAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS EM ÓLEO
ESSENCIAL DE NOZ-MOSCADA (*Myristica fragans*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

T
547.71
V154C
2005

BIBLIOTECA CENTRAL - UFV - DOAÇÃO
194456
13/07/06

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2005

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

V154c
2005

Valente, Vânia Maria Moreira, 1976-

Caracterização de antifúngicos em óleo essencial de
noz-moscada (*Myristica fragans*) / Vânia Maria Moreira
Valente. – Viçosa : UFV, 2005.

xv, 93f. : il. ; 29cm.

Orientador: Gulab Newandram Jham.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 90-93.

1. Essências e óleos essenciais - Composição.
 2. Fungicidas. 3. Análise cromatográfica.
 4. *Myristica fragans*. I. Universidade Federal de Viçosa.
- II. Título.

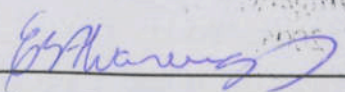
CDD 22.ed. 547.71

VÂNIA MARIA MOREIRA VALENTE

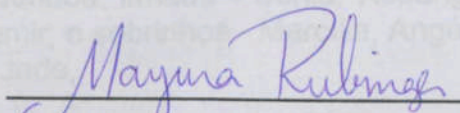
**CARACTERIZAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS EM ÓLEO
ESSENCIAL DE NOZ-MOSCADA (*Myristica fragans*)**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

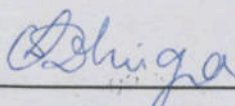
APROVADA: 30 de Setembro de 2005.



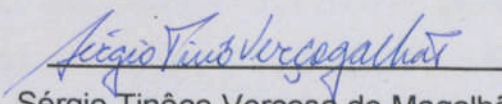
Elson Santiago de Alvarenga
(Conselheiro)



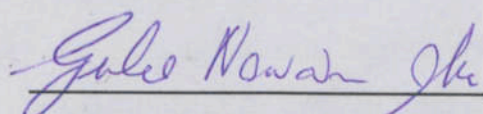
Mayura Marques Magalhães Rubinger



Onkar Dev Dhingra
(Conselheiro)



Sérgio Tinôco Verçosa de Magalhães



Gulab Newandram Jham
(Orientador)

Ao meu querido esposo Antônio, companheiro e amigo de todas as horas, pela dedicação, paciência, apoio, incentivo e amor, especialmente nos momentos difíceis;

À minha filha Patrícia, razão de alegria perene;

Aos meus pais Arlindo (in memória) e Zilda, especialmente minha mãe que venceu dificuldades e obstáculos monumentais para que eu tivesse uma educação exemplar,

DEDICO Deus, companheiro de todos os dias.

A Universidade Federal de Viçosa - UFV - MG, por intermédio dos Departamentos de Química e Fitopatologia, pela oportunidade de realização deste trabalho.

A Capes pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Gulab Newandram Jham pela orientação e confiança depositada em mim durante o período de realização deste trabalho.

Ao técnico Eduardo Rezende pelo apoio e incentivo constantes, pela paciência nos ensinamentos pertinentes ao laboratório, pela contribuição para a minha formação profissional e pelo companheirismo durante todo o período de nosso convívio diário.

Aos conselheiros Prof. Antônio Carlos de Oliveira e Prof. Carlos Roberto de Oliveira, pelas sugestões decisivas e valores no momento certo.

Ao Prof. Ion Ghivriga da "University of Florida - Gainesville - USA" pela colaboração com as análises das amostras por ressonância magnética nuclear.

A coordenação da pós-graduação em Agroquímica na pessoa do professor Luiz Cláudio de Almeida Barbosa, e aos demais professores pelos valiosos ensinamentos que contribuíram para a minha formação.

Aos amigos Júlio, Carolina e Mônica pelo companheirismo e amizade desde o começo dessa etapa da minha vida.

A secretária da pós-graduação em Agroquímica, Marisa, pelo pronto atendimento, ajuda e principalmente pelo carinho, dedicação e alegria contagiante em todos os momentos.

A todos amigos, que de uma forma ou outra, muito contribuíram para a realização desse sonho, em especial meus queridos: irmãos - Sônia, Rosângela, José, Milza e Ademir; e sobrinhos - Marcília, Angélica, Jânio, Jackson e Jade,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

A Deus, companheiro de todos os dias.

À Universidade Federal de Viçosa – UFV – MG, por intermédio dos Departamentos de Química e Fitopatologia, pela oportunidade de realização deste trabalho.

À Capes pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Gulab Newandram Jham pela orientação e confiança depositada em mim durante o período de realização deste trabalho.

Ao técnico Eduardo Rezende pelo apoio e incentivo constantes, pela paciência nos ensinamentos pertinentes ao laboratório, pela contribuição ímpar à minha formação profissional e finalmente pelo companheirismo em todas as horas de nosso convívio diário.

Aos conselheiros Prof. Elson Santiago de Alvarenga e Prof. Onkar Dev Dhingra, pelas sugestões decisivas e valiosas no momento certo.

Ao Prof. Ion Ghiviriga da “University of Florida - Gainesville - USA” pela colaboração com as análises das amostras por ressonância magnética nuclear.

À coordenação da pós-graduação em Agroquímica na pessoa do professor Luiz Cláudio de Almeida Barbosa, e aos demais professores pelos valiosos ensinamentos que contribuíram para a minha formação.

Aos amigos Júlio, Carolina e Mônica pelo companheirismo e amizade desde o começo dessa etapa da minha vida.

À secretária da pós-graduação em Agroquímica, Marisa, pelo pronto atendimento, ajuda e principalmente pelo carinho, dedicação e alegria contagiante em todos os momentos.

Aos funcionários da Clínica de Doenças de Plantas José Orlando, Osvaldo e Henrique pela atenção e amizade a mim dispensada durante a realização desse trabalho.

Aos estudantes pós-graduandos em Fitopatologia Daniel, David e Maria Luiza pelo apoio, colaboração e disponibilidade em abrir e fechar a Clínica de Doenças de Plantas para que eu pudesse trabalhar depois do expediente.

Aos colegas funcionários do Departamento de Biologia Vegetal, pela amizade e incentivo, especialmente as professoras Renata e Marília.

Aos estudantes pós-graduandos em botânica, em especial o doutorando Bruno pelo incentivo, apoio e colaboração.

Ao doutorando em Fitotecnia Evander pela colaboração com as fotos.

Aos amigos Patrícia, Willian e Lincoln pelas tardes de orgânica avançada, química de produtos naturais e métodos na biblioteca. Rosimeire, pela valiosa contribuição e opinião, Marcelo, Fernanda, Wallace, José Luís, Kelly e Luis Gustavo pela amizade cultivada.

Aos meus queridos pais e demais familiares.

Enfim, a todos que de algum modo contribuíram para a realização deste trabalho.

2.7.3. Identificação da fração antifúngica do óleo essencial de noz-moscada	13
2.7.4. Identificação do composto responsável pela atividade antifúngica do óleo essencial de noz-moscada	13
CONTEÚDO	
LISTA DE ABREVIACÕES	ix
RESUMO	xii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO GERAL	1
OBJETIVOS	4
CAPÍTULO 1 - Estudo da atividade antifúngica de compostos do óleo essencial de noz-moscada (<i>Myristica fragans</i>) contra <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus ochraceus</i>	7
1. INTRODUÇÃO	7
2. MATERIAIS E MÉTODOS	8
2.1. Equipamentos, solventes e reagentes	8
2.2. Extração do óleo essencial	9
2.3. Fracionamento do óleo essencial por cromatografia em camada delgada (CCD)	9
2.4. Purificação dos compostos presentes na fração ativa do óleo essencial de noz-moscada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	10
2.5. Identificação dos compostos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio 1 e carbono 13 (^1H -RMN e ^{13}C -RMN)	11
2.6. Quantificação dos compostos isolados e identificados na fração antifúngica do óleo essencial de noz-moscada	11
2.7. Avaliação da atividade antifúngica	12
2.7.1. Aquisição dos fungos	12
2.7.2. Efeito do óleo essencial de noz-moscada sobre os fungos	12
delgada (CCD)	51

2.7.3. Identificação da fração antifúngica do óleo essencial de noz-moscada	13
2.7.4. Identificação do composto responsável pela atividade antifúngica do óleo essencial de noz-moscada	13
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
3.1. Extração e fracionamento do óleo essencial por cromatografia em camada delgada (CCD)	14
3.2. Purificação dos compostos presentes na fração ativa do óleo essencial de noz-moscada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	15
3.3. Identificação dos compostos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e por ressonância magnética nuclear	16
3.4. Quantificação dos compostos isolados da fração ativa do óleo essencial de noz-moscada	21
3.5. Avaliação da atividade antifúngica	22
3.5.1. Efeito do óleo essencial de noz-moscada sobre os fungos	22
3.5.2. Identificação da fração antifúngica do óleo essencial de noz-moscada	24
3.5.3. Identificação do composto antifúngico do óleo essencial de noz-moscada	25
4. CONCLUSÕES	29
ANEXOS	30
CAPÍTULO 2 - Composição e atividade antifúngica do óleo essencial de <i>Myristica fragans</i> contra fungos dos gêneros <i>Aspergillus</i>, <i>Colletotrichum</i> e <i>Fusarium</i>	48
1. INTRODUÇÃO	48
2. MATERIAIS E MÉTODOS	50
2.1. Equipamentos, solventes e reagentes	50
2.2. Extração do óleo essencial	51
2.3. Fracionamento do óleo essencial por cromatografia em camada delgada (CCD)	51

2.4. Purificação dos compostos presentes nas frações do óleo essencial de noz-moscada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)	52
2.5. Identificação dos compostos por Índice de Retenção de Kováts através de cromatografia gasosa, análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) e/ou ressonância magnética nuclear (RMN)	52
2.6. Quantificação dos compostos isolados e/ou identificados no óleo essencial de noz-moscada	53
2.7. Avaliação da atividade antifúngica	54
2.7.1. Aquisição dos fungos	54
2.7.2. Efeito do óleo essencial de noz-moscada sobre os fungos	54
2.7.3. Identificação da fração antifúngica do óleo essencial de noz-moscada	55
2.7.4. Identificação de compostos antifúngicos do óleo essencial de noz-moscada	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
3.1. Extração e fracionamento do óleo essencial por cromatografia em camada delgada	56
3.2. Purificação dos compostos presentes nas frações do óleo essencial de noz-moscada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR)	57
3.3. Identificação do composto isolado através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) e ressonância magnética nuclear (RMN)	58
3.4. Identificação dos compostos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e Índice de Retenção de Kováts por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama	60
3.5. Quantificação dos compostos isolados e/ou identificados no óleo essencial de noz-moscada por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama	66

3.6. Avaliação da atividade antifúngica	69
3.6.1. Efeito do óleo essencial de noz-moscada sobre os fungos	69
3.6.2. Identificação da fração antifúngica do óleo essencial de noz-moscada	71
3.6.3. Identificação dos compostos antifúngicos do óleo essencial de noz-moscada	75
4. CONCLUSÕES	79
ANEXOS	80
CONCLUSÕES GERAIS	88
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90

A. niger - *Aspergillus niger*

A. ochraceus - *Aspergillus ochraceus*

B. D. - batata, dextrose e ágar

C. C. - Célula

C. C. - Célula Celsius

C. C. - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

C. G. - *Colletotrichum gloeosporioides*

C. M. - *Colletotrichum musae*

C. G. - Cromatografia em camada delgada

C. D. - clorofórmio deuterado

C. G. - cromatografia gasosa

C. G. I. C. - cromatografia gasosa com detector de ionização em chama

C. G. E. M. - cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

C. L. A. E. - cromatografia líquida de alta eficiência

C. L. A. E. - R. P. - cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa

cm - centímetro

¹³C-RMN - ressonância magnética nuclear de carbono 13

D. I. C. - detector de ionização em chamas

δ - deslocamento químico

E. - eugeni

EM - espectrometria de massas

eV - elétrons volt

LISTA DE ABREVIações

- AB - acetato de bornila
AD - acetato de diidrocarvila
AG - acetato de geranila
A.f - *Aspergillus flavus*
A.g - *Aspergillus glaucus*
A.n - *Aspergillus niger*
A.o - *Aspergillus ochraceus*
BDA - batata, dextrose e ágar
C - carbono
°C - grau Celsius
Capes - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
C.g - *Colletotrichum gloeosporioides*
C.m - *Colletotrichum musae*
CCD - cromatografia em camada delgada
CDCl₃ - clorofórmio deuterado
CG - cromatografia gasosa
CG/DIC - cromatografia gasosa com detector de ionização em chama
CG/EM - cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-FR - cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
cm - centímetro
¹³C-RMN - ressonância magnética nuclear de carbono 13
DIC - detector de ionização em chamas
δ - deslocamento químico
E - eugenol
EM - espectrometria de massas
eV - elétrons volt

F1 - fração 1
 F2 - fração 2
 F3 - fração 3
 F4 - fração 4
 F5 - fração 5
 F6 - fração 6
 F7 - fração 7
 F8 - fração 8
 FA - fração ativa
 F.o - *Fusarium oxysporum*
 F.s - *Fusarium semitectum*
 H - hidrogênio
 h - hora
¹H-RMN - ressonância magnética nuclear de hidrogênio 1
 HMBC - Heteronuclear Multiple Bond Connectivity
 HMQC - Heteronuclear Multiple Quantum Connectivity
 J - constante de acoplamento
 KI - índice de retenção de Kováts
 LC - linha de chegada
 LP - linha de partida
 µm - micrômetro
 µL - microlitro
 M - miristicina
 M⁺ - íon molecular
 ME - metileugenol
 mg - miligrama
 mg/g - miligrama por grama
 mg/mL - miligrama por mililitro
 MHz - megahertz
 mL - mililitro
 mm - milímetro

mL/min - mililitro por minuto

nm - nanômetro

m/z - massa por carga

R_f - fator de retenção

RMN - ressonância magnética nuclear

S - safrol

SAEG - sistema de análises estatísticas em genética

T - α -terpineol

Te - testemunha

t_r - tempo de retenção

TMS - trimetilsilano

UV-VIS - ultravioleta - visível

v/v - volume por volume

W_b - largura longitudinal

RESUMO

Vânia Maria Moreira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Setor de Química, Departamento de Química Orgânica, Caixa Postal 271, 36561-900, Viçosa, Minas Gerais, Brasil. Orientador: Giulio Newandram Jham, Orientador: Onkar Dev Dhangra e Elson Santiago de Alvarenga.

O óleo essencial da noz-moscada (*Myristica fragans*), obtido por destilação a vapor, foi analisado por cromatografia gasosa (GC) e apresentou um teor de 7,1% e avaliado através de ensaio "poison food" contra fungos. O óleo essencial foi fracionado por cromatografia em camada delgada preparativa (silica gel), utilizando diclorometano:hexano (8:2, v/v) como solvente e apresentou cinco frações. As frações foram analisadas por atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus*, *A. glaucus*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *Trichoderma reesei* e *C. gloeosporioides*. O óleo bruto foi fracionado por cromatografia em camada delgada preparativa (silica gel), utilizando diclorometano:hexano (8:2, v/v) como solvente e apresentou cinco frações. As frações foram analisadas por atividade antifúngica contra *A. flavus* e *A. ochraceus*, com fator de retenção (R_f) correspondente a 0,80, sendo constituída de dois compostos. Submeteu-se essa fração (1,2 g) à cromatografia líquida de alta eficiência preparativa em fase normal, coluna LC-Si e diclorometano:hexano (9:1, v/v), sendo os compostos safrol (30 mg) e miristicina (800 mg) isolados e identificados através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (¹H e ¹³C). A fração antifúngica é a miristicina isolada foram avaliadas através do ensaio "poison food" a 0,1% contra os mesmos fungos e não houve diferença significativa entre os resultados dos dois ensaios. Dessa forma, a atividade antifúngica do óleo essencial de noz-moscada contra *A. flavus* e *A. ochraceus* foi atribuída à miristicina. Não foram realizados ensaio "poison food" com o safrol purificado devido à sua pequena quantidade na fração ativa, comparada à da miristicina. As porcentagens relativas (por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama) no óleo bruto foram 26,6% de

RESUMO

VALENTE, Vânia Maria Moreira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, Setembro de 2005. **Caracterização de antifúngicos em óleo essencial de noz-moscada (*Myristica fragans*)**. Orientador: Gulab Newandram Jham. Conselheiros: Onkar Dev Dhingra e Elson Santiago de Alvarenga.

O óleo essencial de noz-moscada (*Myristica fragans*), obtido por hidrodestilação (rendimento de 7,1%) e avaliado através de ensaio "poison food" (0,1; 0,3 e 0,5%) apresentou atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. glaucus*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *Colletotrichum musae* e *C. gloeosporioides*. O óleo bruto foi fracionado por cromatografia em camada delgada preparativa (sílica gel), utilizando diclorometano:hexano (8:2, v/v) como solvente e apresentou cinco frações ao ser revelado sob luz ultravioleta. Foram feitos dois ensaios com as cinco frações. No primeiro experimento, através do ensaio "TLC bioautography", verificou-se apenas uma fração com atividade antifúngica contra *A. flavus* e *A. ochraceus*, com fator de retenção (R_f) correspondente a 0,80; sendo constituída de dois compostos. Submeteu-se essa fração (1,2 g) à cromatografia líquida de alta eficiência preparativa em fase normal, coluna LC-Si e diclorometano:hexano (9:1, v/v), sendo os compostos safrol (30 mg) e miristicina (800 mg) isolados e identificados através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (^1H e ^{13}C). A fração antifúngica e a miristicina isolada foram avaliadas através do ensaio "poison food" a 0,1% contra os mesmos fungos e não houve diferença significativa entre os resultados dos dois ensaios. Dessa forma, a atividade antifúngica do óleo essencial de noz-moscada contra *A. flavus* e *A. ochraceus* foi atribuída à miristicina. Não foram realizados ensaio "poison food" com o safrol purificado devido à sua pequena quantidade na fração ativa, comparada à da miristicina. As percentagens relativas (por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama) no óleo bruto foram 26,6% de

miristicina e 3,5% de safrol, respectivamente. Em um segundo experimento, as cinco frações foram avaliadas pela técnica "poison food" a 0,1% contra *A. niger*, *A. glaucus*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *Colletotrichum musae* e *C. gloeosporioides*. Todas as frações foram ativas. Os compostos do óleo essencial bruto e das cinco frações foram identificados por cromatografia gasosa através do índice de retenção de Kováts (KI), sendo identificados 28 compostos no óleo essencial, com eugenol, acetato de diidrocarvila, metileugenol, α -terpineol, safrol, acetato de bornila e acetato de geranila sendo identificados também através de padrões. Estes padrões e miristicina isolados foram submetidos ao ensaio "poison food". Eugenol inibiu (100%) os seis fungos avaliados. Metileugenol, α -terpineol e miristicina também exibiram bons resultados, inibindo parcialmente o desenvolvimento dos fungos, sendo que α -terpineol inibiu 100% o crescimento de *A. glaucus*, *A. niger*, *C. musae* e *F. semitectum*; metileugenol inibiu 100% o crescimento de *C. musae* e *A. glaucus* e miristicina apresentou inibição média entre 73 e 88% para todos os fungos, com exceção de *A. glaucus* (27%). Elemicina foi isolada de uma das frações (fração 2, $R_f = 0,46$ e $W_b = 0,7$ cm) através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa e identificada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio 1 e carbono 13.

ABSTRACT

VALENTE, Vânia Maria Moreira, M.S., Universidade Federal de Viçosa, September, 2005. **Characterization of antifungals in nutmeg (*Myristica fragans*) essential oil.** Adviser: Gulab Newandram Jham. Committee members: Onkar Dev Dhingra and Elson Santiago de Alvarenga.

Nutmeg (*Myristica fragans*) essential oil obtained by hydro-distillation (yield 7.1%) was submitted to poison food assay (0.1; 0.3 and 0.5%). The crude oil presented antifungal activity against *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. glaucus*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *Colletotrichum musae* and *C. gloeosporioides*. The crude oil was fractionated by preparative thin layer chromatography (silica-gel), using dicloromethane: hexane (8:2) as the solvent. Five fractions were observed on UV exposure. In the first experiment, only one fraction ($R_f = 0.80$ e $W_b = 1.4$ cm) presented antifungal activity against *A. flavus* and *A. ochraceus* with TLC bioautography assay. This fraction (1.2 g) was purified by normal phase preparative high performance liquid chromatography using dicloromethane: hexane (9:1) as the elution solvent. Two compounds, safrole (30 mg) and miristicine (800 mg) were isolated and identified using gas chromatography-mass spectrometry and nuclear magnetic resonance (1H and ^{13}C). This isolated antifungal fraction and standard miristicine were evaluated by the poison food assay at 0.1% against the same fungi. Since no significant difference was found between the two assays, the antifungal activity of the oil was attributed to miristicine against *A. flavus* and *A. ochraceus*. The relative % of miristicine and safrole (gas chromatography with flame ionization detector) in the crude oil was 26.6% and 3.5%, respectively. In the second experiment, the five fractions were evaluated by the assay poison food against *A. niger*, *A. glaucus*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *Colletotrichum musae* and *C. gloeosporioides*, at a concentration of 0.1%. All fractions were active. The compounds of the crude

essential oil and five fractions were identified by gas chromatography using Kováts Index (KI). Twenty-eight compounds were identified in the crude essential oil with eugenole, dihydrocarvyl acetate, methyl-eugenole, α -terpineol, safrole, bornyl acetate, and geranyl acetate being identified also with standards. These standards and isolated miristicine were submitted to the poison food assay. Eugenole inhibited (100%) the six fungi evaluated. Methyl-eugenole, α -terpineol and miristicine also showed good results, partially inhibiting the development of the fungi, α -terpineol inhibited 100% the growth of *A. glaucus*, *A. niger*, *C. musae* and *F. semitectum*; methyl-eugenole inhibited 100% the growth of *C. musae* and *A. glaucus* and miristicine presented medium inhibition between 73 and 88% for all fungi, except for *A. glaucus* (27%). In addition, elemicine was isolated from one of the fractions (fraction 2, $R_f = 0.46$ and $W_b = 0.7$ cm) using high performance liquid chromatography by reverse-phase and identified by nuclear magnetic resonance (^1H and ^{13}C).

INTRODUÇÃO GERAL

A presença de importantes micotoxinas em cereais é atribuída a fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Claviceps* e *Fusarium*, sendo *Fusarium* responsável pela produção de micotoxinas tricotecenos (Schrödter, 2004; Edwards, 2004).

Em alguns casos, *Fusarium* sp. é o principal causador de perdas durante o armazenamento (Morse *et al.*, 2000). *Fusarium oxysporum* é o agente causal da doença vascular que provoca murcha em banana, conhecida como mal do Panamá, uma das mais sérias ameaças mundiais às colheitas de banana. Contudo, não há fungicidas efetivos disponíveis para o controle desta doença (Borges *et al.*, 2004).

Aspergillus flavus (Arrus *et al.*, 2005; Dorner e Cole, 2002) e *A. ochraceus* (Pardo *et al.*, 2005) são responsáveis pela contaminação de diversos gêneros alimentícios armazenados pelas micotoxinas aflatoxinas e ochratoxinas, respectivamente.

Colletotrichum é um gênero de fungo patogênico de plantas importante em todo o mundo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. O gênero causa doenças que levam a perdas econômicas significativas em grãos, cereais, legumes, vegetais e frutas. Os sintomas são conhecidos como antracnose, e geralmente envolvem a formação de lesão negra com depressão subcircular e erupção cor rósea devido ao desenvolvimento de esporos de fungos (Bailey e Jeger, 1992). Antracnose é uma doença pós-colheita que se desenvolve durante armazenamento e amadurecimento, sendo causada, em bananas, pelo fungo patogênico *Colletotrichum musae* (Chillet *et al.*, 2000). Em mamão é provocada por *C. gloeosporioides*, trazendo sérios problemas quando encontra em frutos destinados à exportação, mesmo recebendo tratamento térmico e químico, condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento e resistência a

fungicidas sintéticos (Bautista-Baños *et al.*, 2003). *C. gloeosporioides* é o agente causal de antracnose em uma diversa gama de hospedeiros, tendo sido associado a 470 gêneros de plantas. É uma das principais doenças pós-colheita, gera perdas significativas a mercadistas e consumidores, atingindo todas as regiões produtoras de banana em diversas partes do mundo. Seu controle envolve diversas etapas, incluindo aplicação de fungicidas. Os principais fungicidas utilizados por países exportadores são thiabendazole, imazalil e prochloraz (Zambolim *et al.*, 2002).

Antracnose é o problema mais freqüente na cultura da pupunha no Estado do Paraná, com ocorrência de manchas foliares, causando danos principalmente nas fases de desenvolvimento das mudas em viveiros e nos primeiros seis meses após o transplante das mudas para o campo. Na região noroeste do Paraná, pulverizações preventivas com fungicidas têm sido empregadas com freqüência por viveiristas e produtores em anos em que ocorre excesso de chuvas no inverno e primavera, acompanhada de temperaturas amenas. A antracnose ocorre tanto em viveiros de produção de mudas como em plantios definitivos e tem sido a principal doença do Estado do Paraná. As lesões provocadas por *C. gloeosporioides* servem como porta de entrada para patógenos secundários e, com isso, agravam o quadro sintomatológico da doença. As medidas profiláticas recomendadas são irrigação e adubação adequadas, remover e queimar as folhas ou plantas doentes, e aplicação de fungicidas. *Fusarium* sp. causa a podridão da medula (ou coração do palmito). Como sintoma reflexo ocorre a clorose, o murchamento e a seca das folhas devido à podridão da base. Pelo lado interno da bainha das folhas pode-se observar um mofo branco, constituído pelo micélio de *Fusarium* sp., que é disseminado pela chuva, pelo vento e por insetos. Como medida de controle da podridão da medula causada por *Fusarium*, recomenda-se irrigação e adubação adequadas, remoção e queima das plantas doentes (Embrapa, 2001). *Fusarium* sp. também ataca soja, trigo, arroz, feijão, sorgo e algodão, sendo combatido ainda na semente com o fungicida Thiram (Zambolim e Vale, 2002). A acerola (*Malpighia emarginata*) é atacada por fusariose (*Fusarium oxysporum*) e antracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) (Almeida *et al.*, 2003).

A aplicação de pesticidas em grãos tem trazido vários problemas, incluindo o desenvolvimento de resistência e surgimento de novas pestes (Huang *et al.*, 1997). Apesar de haver no mercado um grande número de compostos para controlar os mais diversos fungos, existe uma demanda crescente por novos produtos, uma vez que os organismos desenvolvem resistência aos princípios ativos após certo tempo de contato com eles (Barbosa, 2004).

Alguns óleos essenciais de plantas medicinais e temperos apresentam atividade fungicida (Soliman e Badeaa, 2002; Alvarez-Castellanos *et al.*, 2001; Sridhar *et al.*, 2003). Temperos são considerados relativamente inofensivos a humanos. A noz-moscada é um tempero comum derivado da fruta de *Myristica fragrans* Houtt (Myristicaceae), espécie arbórea originária da Indonésia. Possui atividade inseticida (Huang *et al.*, 1997) e bactericida (Takikawa *et al.*, 2002), além de uso medicinal (Newman, 1943). A composição da noz-moscada tem sido investigada por diversos autores (Forrest e Heacock, 1972; Shenk e Lamparsky, 1981; Currò *et al.*, 1987; Archer, 1988; Pino e Borges, 1999; Choo *et al.*, 1999; Sanford e Heinz, 1971). Os hidrocarbonetos monoterpenos representam cerca de 60% dos compostos presentes no óleo essencial de noz-moscada, álcoois monoterpenos 29%, hidrocarbonetos sesquiterpenos 1%, ésteres aromáticos 7% e ésteres 1% (Choo *et al.*, 1999).

OBJETIVOU-SE NESTE TRABALHO:

1. Avaliar a ação antifúngica do óleo essencial de noz-moscada (*Myristica fragans*) contra *Aspergillus flavus*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. glaucus*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *Colletotrichum musae* e *C. gloeosporioides*;
2. Isolar os principais compostos do óleo, por cromatografia em camada delgada (CCD) seguida de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e identificar o(s) composto(s) isolado(s) através de índice de retenção de Kováts (KI), cromatografia gasosa (CG), espectrometria de massas (EM) e ressonância magnética nuclear (RMN);
3. Identificar o(s) composto(s) envolvido(s) na atividade antifúngica do óleo essencial;
4. Identificar e quantificar os compostos presentes no óleo essencial.

Este trabalho está dividido em duas partes:

Na primeira parte (capítulo 1)

O óleo essencial de noz-moscada (*Myristica fragans*) foi obtido por hidrodestilação (rendimento de 7,1%) e submetido ao ensaio "poison food" (0,1; 0,3 e 0,5%), apresentando atividade fungicida contra *Aspergillus flavus* e *A. ochraceus*, com a utilização do meio de cultura em placas de Petri. Após o fracionamento por cromatografia em camada delgada preparativa (sílica gel), utilizando diclorometano:hexano (8:2, v/v) como solvente e análise através do ensaio "TLC bioautography", verificou-se apenas uma fração antifúngica com fator de retenção (R_f) correspondente a 0,80 e largura longitudinal (W_b) de 1,4 cm constituída de dois compostos. Submeteu-se essa fração (1,2 g) à cromatografia líquida de alta eficiência preparativa em fase normal, coluna LC-Si e diclorometano:hexano (9:1, v/v), sendo os compostos safrol (30 mg) e miristicina (800 mg) isolados e identificados através de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e ressonância magnética nuclear (^1H -RMN e ^{13}C -RMN). A fração antifúngica e a miristicina isolada foram avaliadas através do ensaio "poison food" a 0,1%, não havendo diferença significativa entre os resultados dos dois ensaios. Dessa forma, atribuiu-se a atividade antifúngica do óleo essencial de noz-moscada à miristicina. Não foram realizados ensaio "poison food" com o safrol purificado devido à sua pequena quantidade na fração ativa, comparada à da miristicina. A quantidade relativa de safrol e miristicina encontrados no óleo essencial bruto, analisado através cromatografia gasosa com detector de ionização em chama, foi 26,6% de miristicina e 3,5% de safrol, ou seja, uma concentração de 266 mg/g e 35 mg/g de óleo, respectivamente.

Na segunda parte (capítulo 2)

O óleo essencial de noz-moscada (*Myristica fragans*) obtido por hidrodestilação (rendimento de 7,1%) apresentou atividade fungicida contra *Aspergillus niger*, *A. glaucus*, *Fusarium oxysporum*, *F. semitectum*, *Colletotrichum musae* e *C. gloeosporioides*, quando submetido ao ensaio "poison food" a concentrações de 0,1; 0,3 e 0,5%. O óleo foi fracionado por cromatografia em camada delgada preparativa (sílica gel 60 GF₂₅₄, diclorometano:hexano 8:2 v/v). Sob luz ultravioleta, cinco frações foram reveladas, sendo posteriormente recuperadas e avaliadas pela técnica "poison food" a 0,1% (v/v), também mostrando capacidade de redução do crescimento micelial desses fungos. Elemicina foi isolada de uma das frações (fração 2, R_f = 0,46 e W_b = 0,7 cm) através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa e identificada por ressonância magnética nuclear de hidrogênio 1 e carbono 13. Os compostos do óleo essencial bruto e das frações foram identificados por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama através de índice de retenção de Kováts (KI), sendo encontrados 28 compostos no óleo essencial. Os compostos eugenol (padrão), miristicina (isolada), acetato de diidrocarvila (padrão), metileugenol (padrão), α -terpineol (padrão), safrol (isolado), acetato de bomila (padrão) e acetato de geranila (padrão), identificados nas frações, foram submetidos à técnica "poison food" a 0,1% (v/v). Eugenol inibiu 100% o desenvolvimento dos seis fungos avaliados. Metileugenol, α -terpineol e miristicina também exibiram bons resultados, inibindo parcialmente o desenvolvimento dos fungos, sendo que α -terpineol inibiu 100% o crescimento de *A. glaucus*, *A. niger*, *C. musae* e *F. semitectum*; metileugenol inibiu 100% o crescimento de *C. musae* e *A. glaucus* e miristicina apresentou inibição média entre 73 e 88% para todos os fungos, com exceção de *A. glaucus* (27%).

CAPÍTULO 1

Estudo da atividade antifúngica de compostos do óleo essencial de noz-moscada (*Myristica fragans*) contra *Aspergillus flavus* e *A. ochraceus*

1- INTRODUÇÃO

A aplicação de pesticidas em grãos tem trazido vários problemas, incluindo o desenvolvimento de resistência e surgimento de novas pestes (Huang *et al.*, 1997). Apesar de haver no mercado um grande número de compostos para controlar os mais diversos fungos, existe uma demanda crescente por novos produtos, uma vez que os organismos desenvolvem resistência aos princípios ativos após certo tempo de contato com eles (Barbosa, 2004).

Alguns óleos essenciais compostos por coquetel natural de monoterpenos, diterpenos e hidrocarbonetos com variados grupos funcionais apresentam atividades antimicrobial e fungicida (Sridhar *et al.*, 2003). Alguns óleos essenciais de plantas medicinais e temperos apresentam atividade fungicida (Soliman e Badeaa, 2002; Alvarez-Castellanos *et al.*, 2001; e Sridhar *et al.*, 2003). Temperos são considerados relativamente inofensivos a humanos. A noz-moscada é um tempero comum derivado da fruta de *Myristica fragrans* Houtt (Myristicaceae), espécie arbórea originária da Indonésia. Possui atividade inseticida (Huang *et al.*, 1997) e bactericida (Takikawa *et al.*, 2002), além de uso medicinal (Newman, 1943).

A composição da noz-moscada tem sido investigada por diversos autores (Forrest e Heacock, 1972; Shenk e Lamparsky, 1981; Currò *et al.*, 1987; Archer, 1988; Pino e Borges, 1999; Choo *et al.*, 1999; Sanford e Heinz, 1971). Os hidrocarbonetos monoterpenos representam cerca de 60% dos compostos presentes no óleo essencial de noz-moscada, álcoois monoterpenos 29%,

hidrocarbonetos sesquiterpenos 1%, ésteres aromáticos 7% e ésteres 1% (Choo *et al.*, 1999). Entretanto, não há na literatura um estudo sistemático da atividade fungicida da noz-moscada e seus constituintes. Assim, este trabalho visou avaliar a ação antifúngica do óleo essencial de noz-moscada contra *Aspergillus flavus* e *A. ochraceus*, produtores de micotoxinas nos produtos agrícolas e alimentos armazenados, bem como isolar e identificar o(s) composto(s) envolvido(s) na atividade antifúngica.

2- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1- Equipamentos, solventes e reagentes:

Espectros de massas foram obtidos em um espectrômetro de massas acoplado a um cromatógrafo a gás Shimadzu (Kyoto, Japan, Model QP 5000), equipado com injetor automático (Shimadzu, AOC-17), biblioteca Wiley 229, sistema coletor de dados (computador Pentium 133), coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm di x 0,25 µm filme) revestida com a fase estacionária DB-1 (J & W Scientific, USA) com programação de temperatura inicial de 60 °C (permanência: 5 min), elevação de 8 °C/min até 280 °C (permanência: 9 min); fluxo de gás de arraste (hélio) 1,2 mL/min. Injetor a 260 °C, interface a 280 °C; modo de ionização, impacto de elétrons (70 eV); faixa de massa (m/z), 29–400. Amostra injetada: 1 µL a 1,0 mg/mL em diclorometano, split 1:5. Análise quantitativa dos compostos isolados foram feitas em um cromatógrafo a gás Shimadzu (Kyoto, Japan, Model 17A) equipado com detector de ionização em chama (CG/DIC), auto-injetor (Shimadzu, AOC-17) e sistema coletor de dados (Shimadzu, Kyoto, modelo CBM-101 e computador Pentium 133); coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm di x 0,25 µm filme) revestida com a fase estacionária DB-1 (J & W Scientific, USA), temperatura inicial do forno a 60 °C durante 5 min, aumentada 4 °C/min até 240 °C; fluxo do gás de arraste (N₂) 0,8 mL/min; temperatura do injetor 220 °C; temperatura do detector (DIC) 280 °C; modo de injeção Split 1:5. O isolamento de compostos da fração antifúngica do

óleo foi feito em um cromatógrafo a líquido (Shimadzu, Osaka, Japão, modelo LC-6AD), com detector de UV-VIS (Shimadzu, Osaka, Japão, modelo SP-10AVP) com volumes de células de 7 e 20 μL para CLAE analítica e preparativa, respectivamente. Sistema coletor de dados (Shimadzu, Osaka, Japão, modelo Class 5000) equipado com um injetor de "loops" de 100 e 1000 μL para CLAE analítica e preparativa, respectivamente, colunas Supelcosil LC-Si (250 x 4,6 mm di, 5 μm de tamanho de partícula), Supelcosil LC-Si (250 x 21 mm di, 5 μm); pré-coluna Supelco LC-Si (20 x 4,6 mm di, 5 μm).

Todos solventes foram destilados previamente.

Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em espectrômetro Varian Inova equipado com probe de detecção indireta de 5 mm, operado a 500 MHz para ^1H -RMN e 125 MHz para ^{13}C -RMN. O solvente foi clorofórmio deuterado, a 25 °C e o deslocamento referente ao TMS.

2.2- Extração do óleo essencial:

O óleo essencial foi obtido através de um sistema de destilação simples, adicionando-se 60 g de noz-moscada triturada e 1,2 L de água destilada. O hidrolato (800 mL) foi extraído com diclorometano (duas porções de 150 mL), seco com sulfato de sódio anidro e concentrado em evaporador rotatório. Todo esse procedimento foi repetido por 16 vezes, sendo o óleo armazenado em dois frascos âmbar em freezer.

2.3- Fracionamento do óleo essencial por cromatografia em camada delgada (CCD):

Aplicaram-se 200 mg do óleo por placa de cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa (20 x 20 cm com fase estacionária de um 1 mm de sílica gel 60 GF₂₅₄), fase móvel constituída de diclorometano e hexano (8:2, v/v). Utilizaram-se duas técnicas de revelação para identificar a fração ativa: exposição à luz ultravioleta e "TLC bioautography" (Sridhar *et al.*, 2003; Scher *et al.*, 2004).

Para "TLC bioautography" foi formada uma fina camada de meio de cultura (BDA - batata, dextrose e agar) contendo esporos dos fungos sobre as placas de cromatografia em camada delgada previamente processadas e mantidas a 25 °C. Após 7 dias, as frações dessas placas onde não ocorreu crescimento de fungos foram denominadas frações ativas ou antifúngicas e tiveram seus fatores de retenções (R_f) e larguras longitudinais (W_b) determinados. A revelação das placas por exposição à luz ultravioleta permitiu identificar as frações ativas por comparação dos fatores de retenções e larguras longitudinais determinados através das duas técnicas. As frações assim determinadas foram recuperadas raspando-se a fase estacionária da região antifúngica, que posteriormente foi extraída com diclorometano por 8 h sob agitação magnética, filtrada a vácuo em funil de vidro sinterizado, sendo o solvente eliminado em evaporador rotatório.

2.4- Purificação dos compostos presentes na fração ativa do óleo essencial de noz-moscada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE):

A fração identificada como antifúngica foi recuperada de 46 placas de cromatografia em camada delgada e submetida à purificação por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Utilizou-se coluna Supelcosil LC-Si (250 x 4.6 mm di, 5 μ m) e pré-coluna Supelcosil LC-Si. Os efluentes foram monitorados com detector UV-VIS a 280 nm. Uma eluição isocrática foi conduzida usando-se diclorometano:hexano (9:1, v/v), através de um fluxo de 1,0 mL/min para CLAE analítica e injeção de 20 μ L de amostra em diclorometano a 1 mg/mL. Posteriormente, alíquotas (20) de 60 mg da fração ativa foram injetadas na coluna Supelcosil LC-Si (250 x 21 mm di, 5 μ m), a um fluxo isocrático de 6,0 mL/min. O efluente recolhido foi concentrado em evaporador rotatório e as amostras purificadas novamente submetidas a CLAE analítica, injetando-se 20 μ L em diclorometano a 0,5 mg/mL.

2.5- Identificação dos compostos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio 1 e carbono 13 (^1H -RMN e ^{13}C -RMN):

Os compostos isolados da fração ativa foram identificados por CG/EM e espectrometria de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C) unidimensional e bidimensional (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity - HMBC e Heteronuclear Multiple Quantum Connectivity - HMQC, sendo que ambas as técnicas foram utilizadas com gradiente de campo). As estruturas foram determinadas com base nos dados fornecidos pelo padrão de fragmentação de massas, deslocamentos químicos e acoplamentos.

2.6- Quantificação dos compostos isolados e identificados na fração antifúngica do óleo essencial de noz-moscada:

Os compostos isolados e identificados foram quantificados no óleo essencial usando-se cromatografia gasosa com detector de ionização em chama. A curva de calibração foi obtida injetando-se uma mistura de padrões (isolados) a 1 mg/mL em diclorometano a diferentes razões de split (1:1 - 1:5 - 1:10 - 1:40 - 1:80) para obtenção das áreas relacionadas as seguintes concentrações: 12,34; 24,39; 90,9; 166 e 500 ng/ μL . E 1 μL da amostra de óleo essencial de noz-moscada foi injetada a uma concentração de 1,8 mg/mL (split 1:5). Obtidas as curvas de calibração, as áreas de safrol e miristicina presentes no óleo essencial foram comparadas com suas respectivas curvas de calibração.

2.7- Avaliação da atividade antifúngica:

Os ensaios foram montados em delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, usando-se o programa SAEG - Sistema de Análises Estatísticas em Genética (Euclides, 1983).

A atividade antifúngica foi determinada através de cálculos de percentagem de inibição de crescimento dos fungos em relação ao crescimento apresentado pela testemunha, sendo atribuído à testemunha 100% de crescimento ou 0% de inibição.

2.7.1- Aquisição dos fungos:

Foram utilizados *A. flavus* e *A. ochraceus*, obtidos da micoteca do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

2.7.2- Efeito do óleo essencial de noz-moscada sobre os fungos:

A atividade antifúngica foi avaliada contra os fungos *Aspergillus flavus* e *A. ochraceus*. A metodologia empregada no bioensaio baseou-se na "poison food", utilizando o meio de cultura BDA (batata dextrose ágar) acrescido de sulfato de estreptomicina a 1mg/mL ((Dhingra e Sinclair, 1995; Sridhar *et al.*, 2003).

Para a avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial bruto, nas concentrações 0,1; 0,3 e 0,5% (v/v) foram utilizadas placas de Petri estéreis e descartáveis. O óleo essencial foi previamente dissolvido em metanol (1:1, v/v) e incorporado ao meio de cultura fundido, na concentração desejada. As testemunhas continham o meio de cultura antibiótico e metanol. Os esporos dos fungos foram inoculados no centro das placas.

Todos os testes foram realizados em triplicata para cada concentração e fungo avaliado, sendo as placas vedadas com filme plástico e mantidas em incubadora a 25 °C, por 7 dias. A inibição de crescimento, promovida pelo óleo

essencial foi avaliada medindo o diâmetro da colônia do fungo nas placas contendo o óleo essencial em comparação às placas testemunha. Foram realizadas medidas diariamente.

2.7.3- Identificação da fração antifúngica do óleo essencial de noz-moscada:

A fração antifúngica foi determinada baseando-se na técnica "TLC bioautography" (Sridhar *et al.*, 2003 e Scher *et al.*, 2004). Foram aplicados 200 mg de óleo essencial em uma placa de sílica gel 60 GF₂₅₄ preparativa (20 x 20 cm, com 1 mm de fase estacionária) eluindo-se com diclorometano:hexano (8:2, v/v). Sob câmara de fluxo, despejou-se sobre a placa o meio de cultura BDA fundido (50 mL), acrescido de sulfato de estreptomicina (50 mg) e esporos do fungo a ser avaliado. A placa foi colocada em uma bandeja esterilizada e umedecida com algodão embebido em água autoclavada. Cobriu-se a bandeja com filme plástico, mantendo-a em incubadora por 7 dias, a 25 °C. A metodologia foi aplicada para cada fungo isoladamente.

A região da placa onde o fungo não se desenvolveu foi identificada e denominada fração ativa (antifúngica). Por resultado de "TLC bioautography", aliado à revelação por luz ultravioleta (comprimento de onda, 254 nm), determinou-se o fator de retenção (R_f) e a largura longitudinal (W_b) da fração ativa.

2.7.4- Identificação do composto responsável pela atividade antifúngica do óleo essencial de noz-moscada:

A fração ativa e o composto principal dessa fração foram avaliados a 0,1%, utilizando-se a mesma metodologia descrita para o óleo essencial, seção 2.7.2.

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Extração e fracionamento do óleo essencial por cromatografia em camada delgada (CCD):

Foram obtidos 68,2 g de óleo essencial por extração de 960 g de noz-moscada, resultando num rendimento de 7,1%. Através de cromatografia em camada delgada e exposição sob luz ultravioleta identificaram-se cinco frações de compostos no óleo essencial de noz-moscada (ver capítulo 2). No entanto, apenas a fração cujo fator de retenção foi 0,80 e largura longitudinal 1,4 cm apresentou atividade antifúngica no ensaio "TLC bioautography", sendo somente esta fração ativa recuperada.



Figura 1- Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência. 1- Fração ativa, 2- composto A, 3- composto B, e 4- diclorometano ou branco. Coluna Lo-Sil – 25 cm x 4,6 mm x 5 µm, detector UV-Vis 280 nm, fase móvel diclorometano/tetran (9:1, v/v) a um fluxo de 1 mL/min. Amostras injetadas em diclorometano: fração ativa 20 µL a 1 mg/mL; A e B, 20 µL a 0,5 mg/mL.

Utilizando-se CLAE preparativa foram isolados esses dois componentes. O efuente da coluna foi recolhido, enquanto detectavam-se as saídas dos picos (A e B, figura 1) e concentrado em evaporador rotatório, resultando em amostras líquidas (A = 30 mg e B = 800 mg). Essas amostras foram dissolvidas em diclorometano e novamente analisadas por CLAE analítica, sendo os resultados expressos nos cromatogramas 2 e 3, respectivamente, figura 1. Esses cromatogramas confirmaram a eficiência da purificação, uma vez que houve atividade dos dois compostos identificados na fração antifúngica.

3.2- Purificação dos compostos presentes na fração ativa do óleo essencial de noz-moscada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE):

A análise da fração ativa por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em fase normal analítica registrou a presença de apenas dois compostos nessa fração antifúngica (cromatograma 1, figura 1).

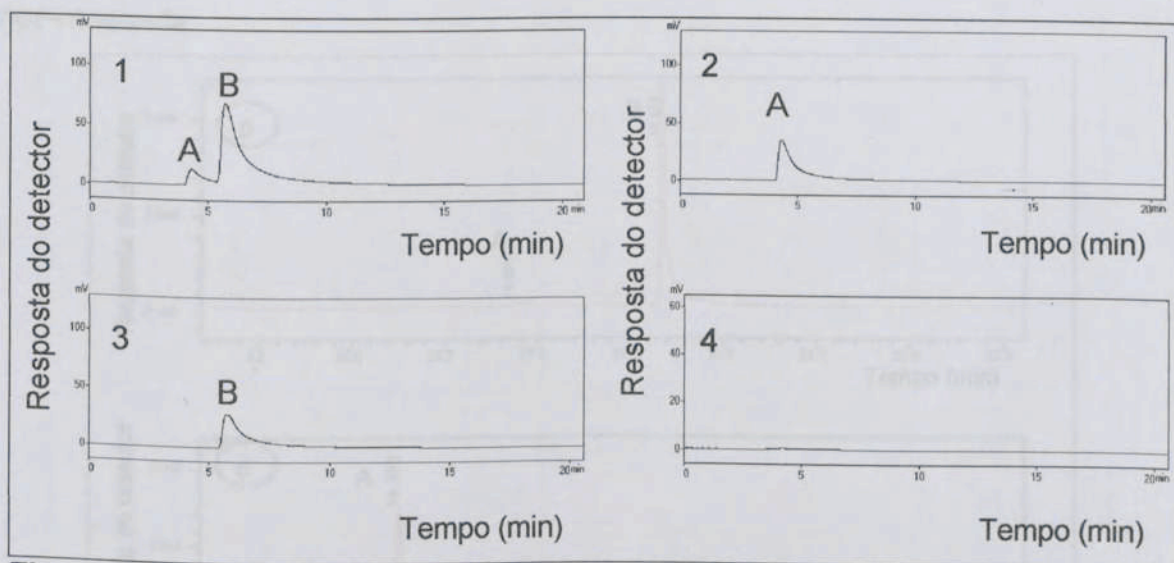


Figura 1: Cromatogramas obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência. 1- Fração ativa, 2- composto A, 3- composto B, e 4- diclorometano ou branco. Coluna Lc-Si – 25 cm x 4.6 mm x 5 μ m, detector UV-Vis 280 nm, fase móvel diclorometano:hexano (9:1, v/v) a um fluxo de 1 ml/min. Amostras injetadas em diclorometano: fração ativa 20 μ l a 1 mg/mL; A e B, 20 μ l a 0,5 mg/mL.

Utilizando-se CLAE preparativa foram isolados esses dois componentes. O efluente da coluna foi recolhido, enquanto detectaram-se as saídas dos picos (A e B, figura 1) e concentrado em evaporador rotatório, resultando em amostras líquidas (A = 30 mg e B = 800 mg). Essas amostras foram dissolvidas em diclorometano e novamente analisadas por CLAE analítica, sendo os resultados expressos nos cromatogramas 2 e 3, respectivamente, figura 1. Esses cromatogramas confirmaram a eficiência da purificação, uma vez que houve isolamento dos dois compostos identificados na fração antifúngica.

3.3- Identificação dos compostos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e por ressonância magnética nuclear:

Analísaram-se a fração antifúngica e seus derivados isolados através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), obtendo-se os cromatogramas totais de íons 5, 6 e 7 (figura 2) e os espectros de massas 1 e 2 (figura 3) para os compostos presentes na fração antifúngica do óleo essencial de noz-moscada.

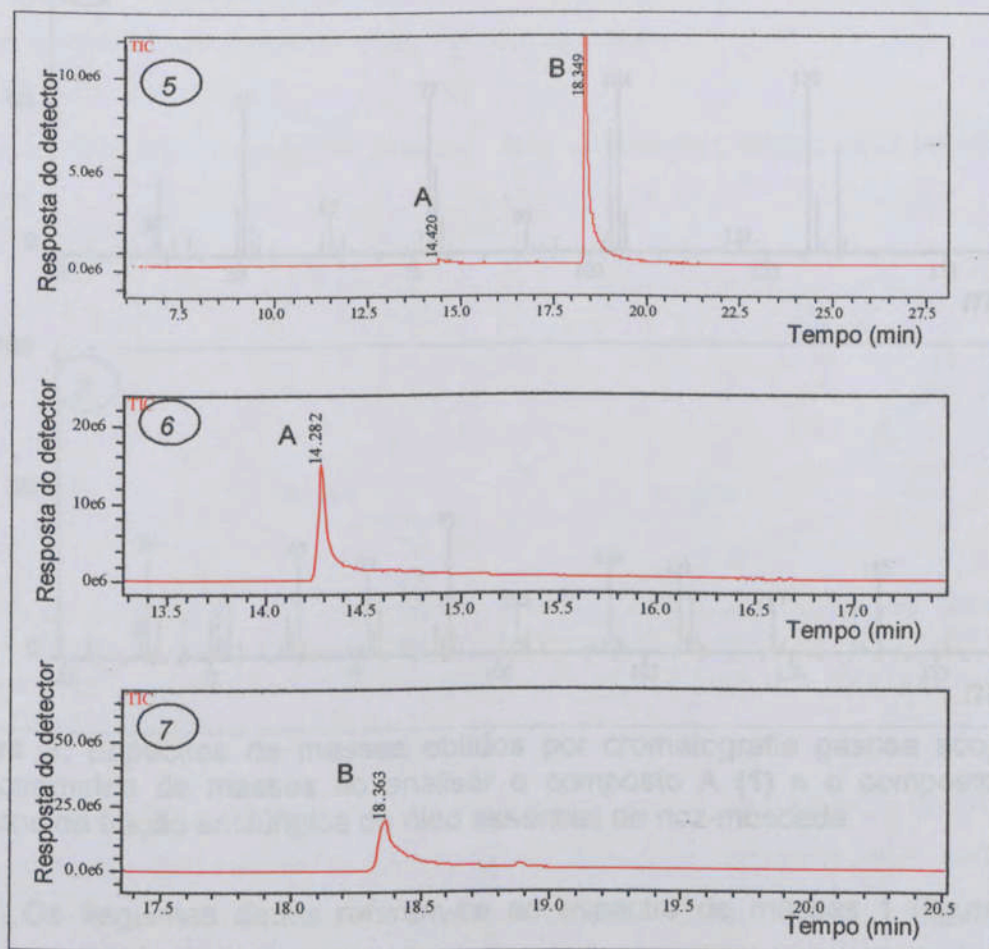


Figura 2: Cromatogramas totais de íons obtidos ao analisar 5 - (Fração antifúngica), 6 - (composto A) e 7 - (composto B) por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (Shimadzu, QP 5000). Coluna BD-1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) com programação de temperatura inicial de 60 °C (permanência: 5 min), elevação de 8 °C/min até 280 °C (permanência: 9 min); fluxo de gás de arraste (hélio) 1,2 mL/min. Injetor a 260 °C, interface a 280 °C; modo de ionização, impacto de elétrons (70 eV); faixa de massa (m/z), 29–400. Amostra injetada: 1 µL a 1,0 mg/mL em diclorometano, split 1:5.

O cromatograma 5 confirmou o resultado da análise inicial por CLAE analítica, ratificando a presença de apenas dois compostos na fração fungicida, enquanto os cromatogramas 6 e 7 foram coerentes com a análise final por CLAE analítica, comprovando o isolamento dos dois compostos dessa fração.

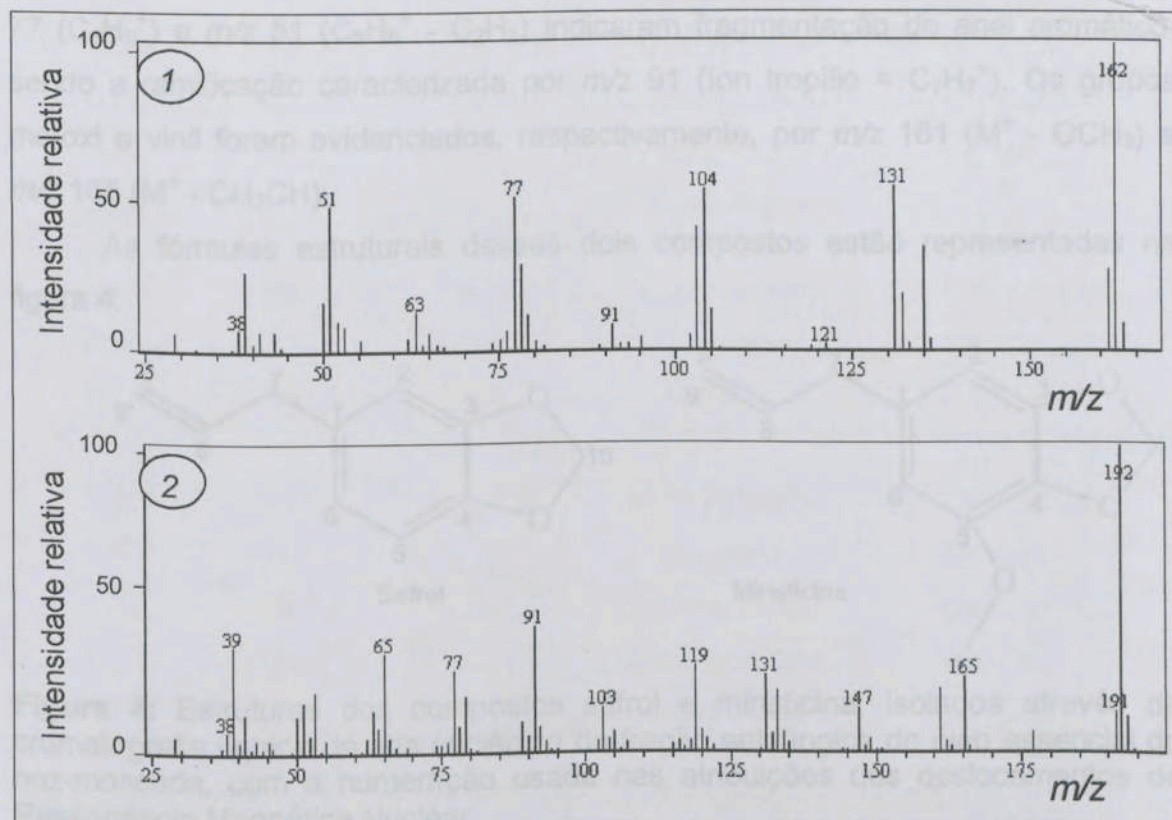


Figura 3: Espectros de massas obtidos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas ao analisar o composto A (1) e o composto B (2), isolados da fração antifúngica do óleo essencial de noz-moscada.

Os seguintes dados referem-se ao espectro de massas 1 (figura 3) do safrol, (composto A): m/z (intensidade relativa) 162[M^+] (100), 135 (34), 131 (65), 104 (81), 91 (9), 77 (84), 65 (12), 51 (78), 39 (46). Este espectro apresentou como pico base o do íon molecular, indicando uma massa molecular igual a 162 g/mol. O m/z 91 (íon tropílio = $C_7H_7^+$) é típico de anel aromático ramificado, sendo a presença de anel aromático certificada pelos fragmentos m/z 77 ($C_6H_5^+$) e m/z 51

($C_6H_5^+ - C_2H_2$). A existência de um grupo vinil foi indicada por $m/z = 135$ ($M^+ - CH_2CH$).

Os dados do espectro de massas 2 (figura 3) da miristicina (composto B) foram: m/z (intensidade relativa) 192 [M^+] (100), 165 (21), 161 (26), 91 (74), 77 (46), 65 (69), 51 (30), 39 (66). O composto B apresentou como pico base o do íon molecular, indicando uma massa molecular igual a 192 g/mol. Os fragmentos m/z 77 ($C_6H_5^+$) e m/z 51 ($C_6H_5^+ - C_2H_2$) indicaram fragmentação de anel aromático, sendo a ramificação caracterizada por m/z 91 (íon tropílio = $C_7H_7^+$). Os grupos metoxi e vinil foram evidenciados, respectivamente, por m/z 161 ($M^+ - OCH_3$) e m/z 165 ($M^+ - CH_2CH$).

As fórmulas estruturais desses dois compostos estão representadas na figura 4.

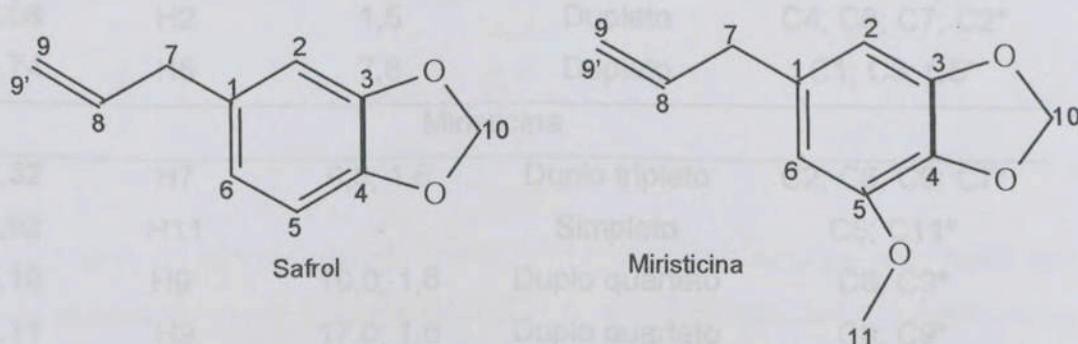


Figura 4: Estruturas dos compostos safrol e miristicina, isolados através de cromatografia líquida de alta eficiência da fração antifúngica do óleo essencial de noz-moscada, com a numeração usada nas atribuições dos deslocamentos de Ressonância Magnética Nuclear.

Os espectros de ressonância magnética nuclear, figuras 9-27 anexos 1-16, forneceram os deslocamentos de hidrogênio e carbono, acoplamentos hidrogênio-hidrogênio e hidrogênio-carbono para os compostos isolados da fração antifúngica relacionados nas tabelas 1 e 2.

Tabela 1: Deslocamentos de ^1H - RMN, constantes de acoplamentos ^1H - ^1H e acoplamentos ^1H - ^{13}C observados nos espectros de ressonância magnética nuclear de safrol e miristicina:

δH	Atribuição	J (Hz)	Multiplicidade	HMBC
Safrol				
3,30	H7	6,8; 1,7	Duplo tripleto	C2; C6; C9; C7*
5,05	H9'	10,1; 1,7	Duplo quarteto	C7; C9*
5,06	H9	17,0; 1,7	Duplo quarteto	C7; C9*
5,92	H10	-	Simpleto	C10*
5,93	H8	17,0; 10,1; 6,8	Duplo duplo tripleto	C1.
6,63	H6	7,8; 1,5	Duplo duplete	C2; C4; C7; C6*
6,68	H2	1,5	Duplete	C4; C6; C7; C2*
6,74	H5	7,8	Duplete	C1; C3; C5*
Miristicina				
3,32	H7	6,8; 1,6	Duplo tripleto	C2; C6; C9; C7*
3,92	H11	-	Simpleto	C5; C11*
5,10	H9'	10,0; 1,6	Duplo quarteto	C8; C9*
5,11	H9	17,0; 1,6	Duplo quarteto	C8; C9*
5,91- 5,96	H8	17,0; 10,0; 6,8	Duplo duplo tripleto	C1; C8*
5,96	H10		Simpleto	C3; C4; C10*
6,38	H6	1,2	Duplete	C2; C4; C7; C6*
6,42	H2	1,2	Duplete	C4; C6; C7; C2*

* J^1 observados no HMBC. Apenas para o safrol esses acoplamentos foram confirmados através de HMQC.

Tabela 2: Deslocamentos químicos de carbono ^{13}C - RMN (125 CDCl_3/TMS) (δ), observados nos espectros de ressonância magnética nuclear de safrol e miristicina:

Carbono	(δ) Safrol	(δ) Miristicina
1	134,0	134,8
2	109,3	102,8
3	147,9	149,0
4	146,3	133,7
5	108,4	143,7
6	121,5	107,9
7	40,1	40,5
8	137,7	137,6
9	115,9	116,2
10	101,1	101,5
11	-	56,7

No safrol, os hidrogênios do grupo vinil foram identificados com base nos seguintes acoplamentos: o hidrogênio de CH (H8; δ 5,93) exibiu um acoplamento de 17,0 Hz com o hidrogênio *trans* (H9; δ 5,06) e outro de 10,1 Hz com o hidrogênio *cis* (H9'; δ 5,05), além de dois acoplamentos de 6,8 Hz com os hidrogênios alílicos (H7; δ 3,3). Foram identificados três sinais de hidrogênios aromáticos, sendo que o sinal em δ 6,63 apresentou acoplamento de 7,8 Hz com hidrogênio *orto* (H5; δ 6,74) e de 1,5 Hz com hidrogênio *meta* (H2; δ 6,68).

Na miristicina, os hidrogênios do grupo vinil foram identificados pelos seguintes acoplamentos apresentados: o hidrogênio de CH (H8; δ 5,96) exibiu um acoplamento de 17,0 Hz com o hidrogênio *trans* (H9; δ 5,11) e outro de 10,0 Hz com o hidrogênio *cis* (H9'; δ 5,10), além de dois acoplamentos de 6,8 Hz com os hidrogênios alílicos (H7; δ 3,32). Foram identificados dois sinais de hidrogênios aromáticos, sendo que o sinal em δ 6,38 apresentou apenas um acoplamento de 1,2 Hz com o hidrogênio *meta* (H2; δ 6,42).

Em ambos os casos foram observados, nos dados de HMQC, os sinais de acoplamentos hidrogênio-carbono com acoplamentos (J) a longa distância (3 ligações ou J^3) e também acoplamento direto (1 ligação ou J^1). Esse último foi confirmado apenas no safrol através de dados de HMQC. As estruturas do safrol e da miristicina foram determinadas observando o conjunto de dados. Por exemplo, o H7 é um hidrogênio alílico que se encontra conectado ao C7 (J^1), está a 2 ligações de C8 (J 6.8 Hz com H8) e 3 ligações de C2, C6 e C9 (J^3).

Foi observado, ao comparar os deslocamentos de carbonos de safrol e miristicina, que seus respectivos valores são muito próximos, exibindo uma variação significativa (diferença no valor do δ superior a 10) apenas nos sinais dos carbonos 4, 5 e 6, que no safrol apresenta, respectivamente, os valores de deslocamentos δ 146,3; 108,4 e 121,5. Na miristicina esses valores correspondem aos deslocamentos δ 133,7; 143,7 e 107,9. Essa variação ocorre em função da presença de uma metoxila ligada ao carbono 5 da miristicina, pois essa metoxila deixa o carbono 5 da miristicina mais desblindado e por isso com maior valor de deslocamento que o carbono 5 do safrol. Simultaneamente, através de efeito mesomérico, essa metoxila deixa os carbonos 4 e 6 da miristicina mais blindados que seus correspondentes no safrol e, portanto, com menores valores de deslocamentos na miristicina.

3.4- Quantificação dos compostos isolados da fração ativa do óleo essencial de noz-moscada:

Compararam-se as áreas dos picos de safrol e miristicina no óleo (figura 28) com suas respectivas curvas de calibração (figura 29), anexo 17. Obteve-se que as concentrações de miristicina e safrol na amostra de óleo essencial injetada corresponderam, respectivamente, a 0,479 mg/mL e 0,062 mg/mL. Considerando a concentração do óleo injetado igual a 1,8 mg/mL, as concentrações de safrol e miristicina no mesmo são respectivamente 266 mg/g e 35 mg/g, indicando um elevado teor de miristicina no óleo (26,6%), se comparado ao safrol (3,5%).

O teor de miristicina encontrado no óleo essencial de noz-moscada foi muito superior aos já registrados na literatura: 0,2-14,6% (Sanford e Heinz, 1970); 3,8% (Forrest e Heacock, 1972); 14% (Shenk e Lamparsky, 1981); 9,73% (Archer, 1988); 0,5-13,5% (Pino e Borges, 1999). Já o de safrol está próximo a valores relatados: 0,3-4,6% (Sanford e Heinz, 1971); 1,9% (Forrest e Heacock, 1972); 3,3% (Shenk e Lamparsky, 1981); 2,46% (Currò *et al.*, 1987); 2,16% (Archer, 1988); 0,1-3,2% (Pino e Borges, 1999). Entretanto, os valores da literatura apresentam-se variados em função do armazenamento (Sanford e Heinz, 1971) e da origem (Pino e Borges, 1999) da noz-moscada.

3.5- Avaliação da atividade antifúngica:

3.5.1- Efeito do óleo essencial de noz-moscada sobre os fungos:

O óleo essencial, avaliado contra *A. flavus* e *A. ochraceus*, inibiu parcialmente o desenvolvimento dos mesmos. Esses fungos foram sensíveis à presença do óleo no meio de cultura nas três concentrações (0,1; 0,3 e 0,5%) analisadas, conforme pode ser observado na figura 30.

Quando expostos à concentração de 0,1%, *A. ochraceus* sofreu maior inibição que *A. flavus*. Entretanto, à medida que se eleva a concentração de óleo para 0,3 e 0,5%, *A. ochraceus* foi menos afetado (sofreu menor inibição) que *A. flavus*. Contudo, os dados obtidos não são suficientes para afirmar que há uma diferença significativa entre as concentrações de óleo para o teste Turkey ao nível de 5% de probabilidade.

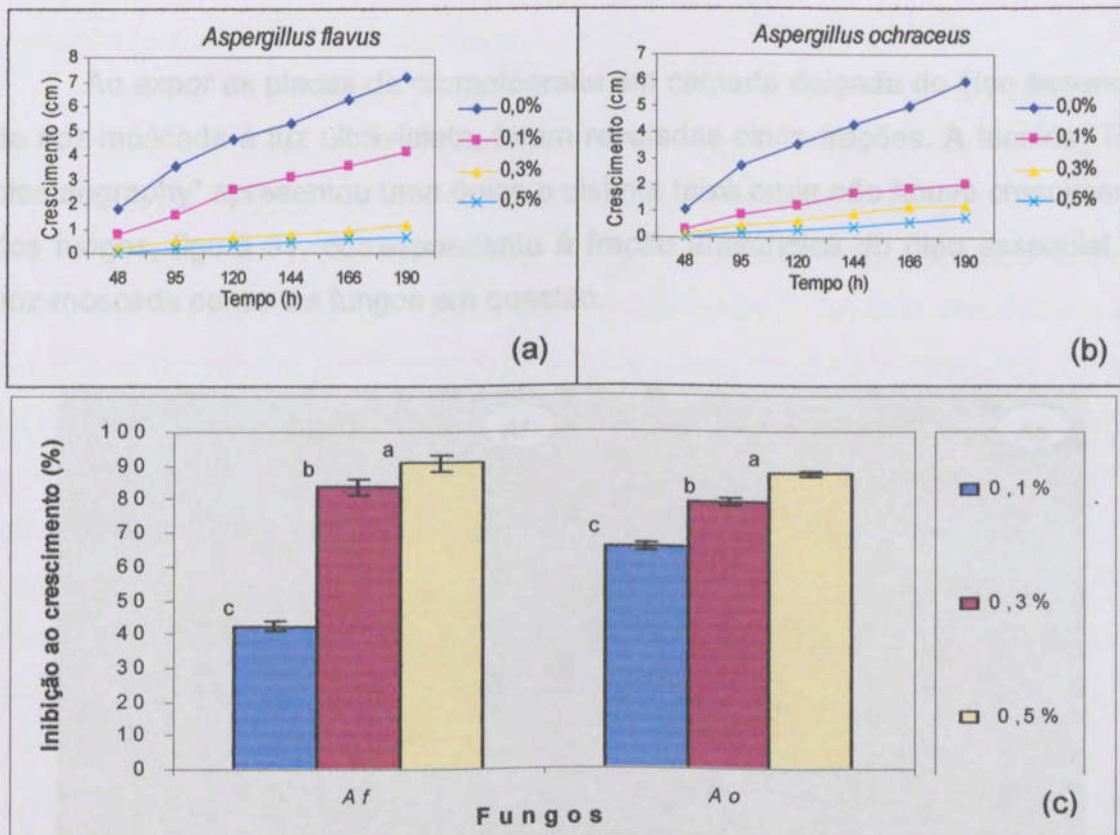


Figura 30: (a) e (b) - Crescimento médio dos fungos no ensaio “poison food” com o óleo essencial de noz-moscada a 0,0 (testemunha); 0,1; 0,3 e 0,5% (v/v). (c) - Inibição ao crescimento radial dos fungos, avaliada no 6º dia para o óleo essencial de noz-moscada a 0,1; 0,3 e 0,5%. Af = *Aspergillus flavus*, Ao = *A. ochraceus*. Para cada fungo, médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$). As barras (I) indicam desvio padrão.

Quando expostos à concentração de 0,1%, *A. ochraceus* sofreu maior inibição que *A. flavus*. Entretanto, à medida que se elevou a concentração do óleo para 0,3 e 0,5%, *A. ochraceus* foi menos sensível (sofreu menor inibição) que *A. flavus*. Contudo, os dados obtidos nos três tratamentos de ambos os fungos apresentaram diferença significativa ao serem submetidos à análise estatística pelo Teste Turkey ao nível de 5% de probabilidade.

3.5.2- Identificação da fração antifúngica do óleo essencial de noz-moscada:

Ao expor as placas de cromatografia em camada delgada do óleo essencial de noz-moscada à luz ultravioleta, foram reveladas cinco frações. A técnica "TLC bioautography" apresentou uma única e distinta faixa onde não houve crescimento dos fungos, figura 31, correspondente à fração antifúngica do óleo essencial de noz-moscada contra os fungos em questão.

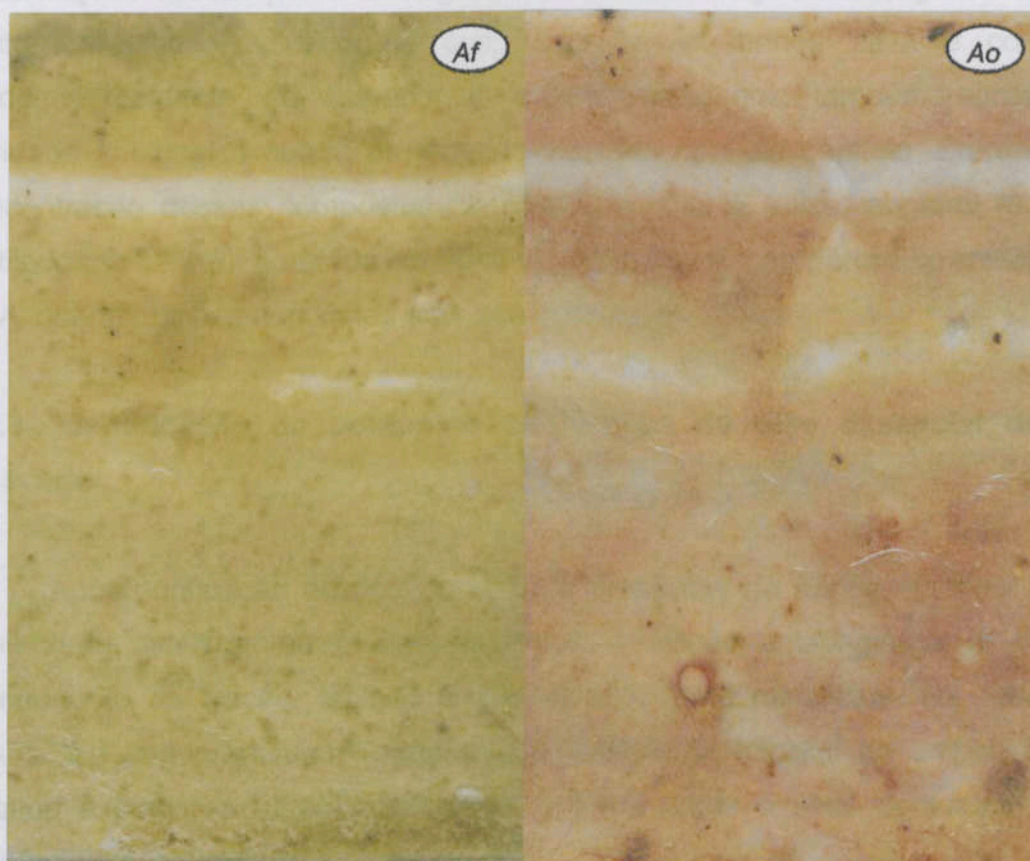


Figura 31: Fotos do ensaio "TLC bioautography" (Af) *Aspergillus flavus* e (Ao) *A. ochraceus*, obtidas 7 dias após aplicação de meio de cultura contendo grande número de esporos dos respectivos fungos, sobre placas de cromatografia em camada delgada preparativa (200 mg de óleo essencial, 1 mm de sílica gel 60 GF₂₅₄ e diclorometano:hexano, 8:2 v/v, como solvente).

A fração antifúngica de ambos os testes apresentou iguais valores de fatores de retenção ($R_f = 0,80$) e larguras longitudinais ($W_b = 1,4$ cm), indicando

que o crescimento de ambos os fungos foi afetado pelos mesmos componentes presentes em uma única fração ativa.

Observa-se na foto do ensaio "TLC bioautography" de *A. ochraceus* uma segunda fração com atividade antifúngica. Essa fração tem fator de retenção $R_f = 0,55$ e largura longitudinal $W_b = 0,9$ cm e possui atividade antifúngica inferior à primeira fração ativa. Nessa segunda fração há crescimento do fungo, e dessa forma sua inibição é parcial. Ao analisar a composição do óleo essencial e das cinco frações obtidas por cromatografia em camada delgada no segundo capítulo desta dissertação, verificou-se que essa fração menos ativa é composta predominantemente de eugenol e metileugenol, que também apresentam atividade antifúngica contra os fungos avaliados naquele capítulo. Entretanto, a concentração desses compostos no óleo essencial é baixa, eugenol (0,5%) e metileugenol (2,6%), podendo ser esse o motivo da inibição parcial ao crescimento de *A. ochraceus* nas condições aqui avaliadas.

3.5.3- Identificação do composto antifúngico do óleo essencial de noz-moscada:

Após purificação de dois compostos presentes na fração ativa por CLAE, novamente avaliaram-se o óleo essencial, a fração antifúngica e o principal componente da fração, isolado e identificado como miristicina. Os resultados (figura 32) sugeriram uma redução do crescimento micelial de ambos fungos, quando expostos ao óleo essencial de noz-moscada e seus derivados (fração antifúngica e miristicina).

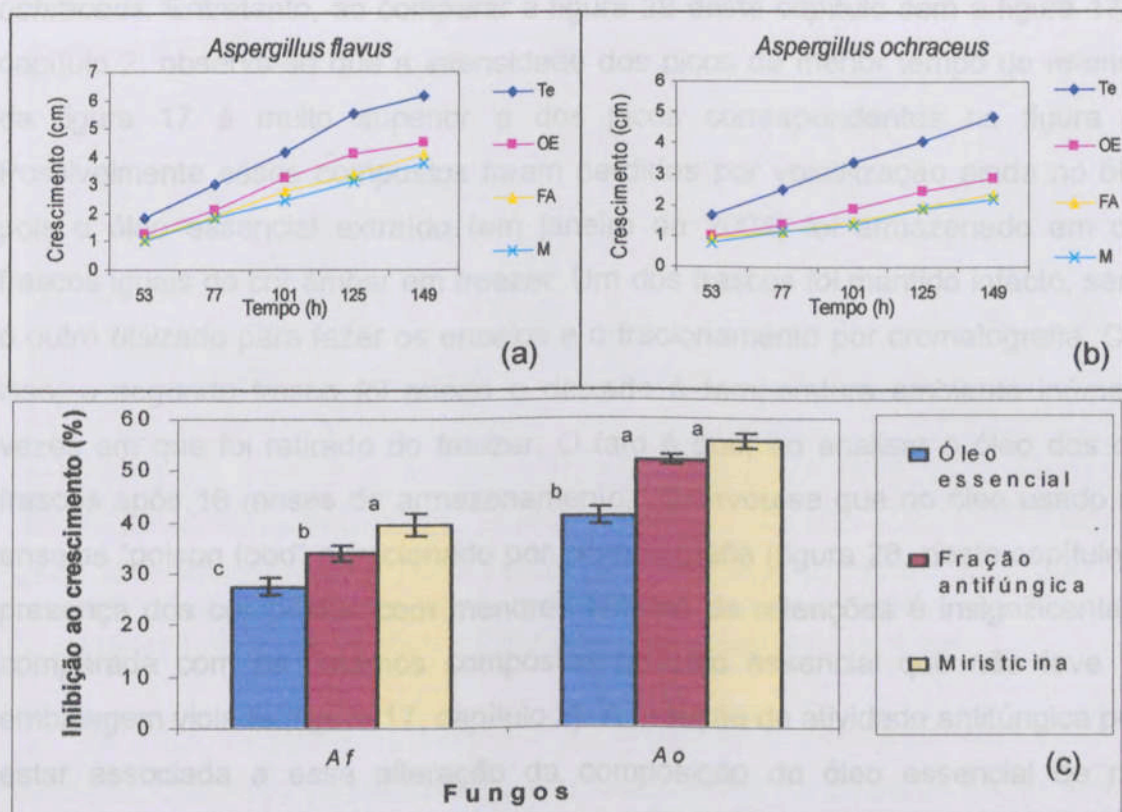


Figura 32: (a) e (b) - Crescimento médio dos fungos no ensaio "poison food" Testemunha (Te), óleo essencial (OE), fração ativa (FA) e miristicina (M) a 0,1%. (c) - Inibição ao crescimento radial dos fungos, avaliada no 6º dia para o óleo essencial e a fração antifúngica de noz-moscada e para a miristicina a 0,1%. Af = *Aspergillus flavus*, Ao = *A. ochraceus*. Para cada fungo, médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$). As barras (l) indicam desvio padrão.

Novamente, observou-se maior inibição do crescimento para *Aspergillus ochraceus* do que *A. flavus*, o que indicou maior suscetibilidade do primeiro fungo e conseqüentemente, maior resistência de *A. flavus* em ser combatido com óleo essencial de noz-moscada ou miristicina.

Os dados obtidos para *A. ochraceus*, quando submetido à fração antifúngica e a miristicina, não apresentaram diferença significativa se comparados pelo Teste Turkey ao nível de 5% de probabilidade.

Também foi observado que a atividade antifúngica do óleo essencial de noz-moscada a 0,1% diminuiu, pois na figura 30 os valores de inibição são 42 e 66%, enquanto na figura 32 são 28 e 41%, respectivamente para *A. flavus* e *A.*

ochraceus. Entretanto, ao comparar a figura 28 deste capítulo com a figura 17 do capítulo 2, observa-se que a intensidade dos picos de menor tempo de retenção da figura 17 é muito superior a dos picos correspondentes na figura 28. Possivelmente esses compostos foram perdidos por volatilização ainda no óleo, pois o óleo essencial extraído (em janeiro de 2004) foi armazenado em dois frascos iguais de cor âmbar em freezer. Um dos frascos foi mantido intacto, sendo o outro utilizado para fazer os ensaios e o fracionamento por cromatografia. Com isso, o segundo frasco foi aberto e deixado à temperatura ambiente inúmeras vezes em que foi retirado do freezer. O fato é que, ao analisar o óleo dos dois frascos após 18 meses de armazenamento, observou-se que no óleo usado nos ensaios “poison food” e fracionado por cromatografia (figura 28, neste capítulo), a presença dos compostos com menores tempos de retenções é insignificante se comparada com os mesmos compostos no óleo essencial que não teve sua embalagem violada (figura 17, capítulo 2). A redução da atividade antifúngica pode estar associada a essa alteração da composição do óleo essencial de noz-moscada, e também, ao intervalo de tempo ocorrido entre os dois ensaios “poison food”, uma vez que os dados da figura 32 foram obtidos oito meses após os dados da figura 30.

4- CONCLUSÕES

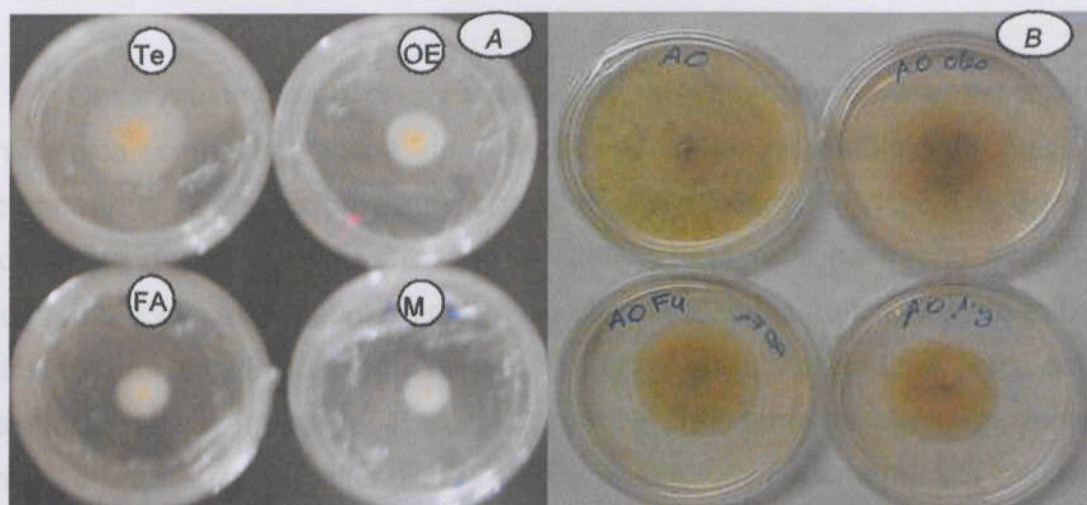


Figura 33: Fotos do ensaio “Poison food” de *Aspergillus ochraceus* no 3º dia (A) e no 10º dia (B), em placas de Petri 6 cm de diâmetro, sendo: (Te) testemunha, (OE) óleo essencial, (FA) fração ativa e (M) miristicina, em ambas as fotos.

As fotos da figura 33 mostram a inibição do crescimento micelial de *A. ochraceus*. Observou-se uma redução no crescimento do diâmetro do micélio do fungo no centro das placas contendo óleo essencial, fração ativa e miristicina, quando comparados ao controle (testemunha), sendo a redução mais evidente e acentuada nas placas tratadas com miristicina.

4- CONCLUSÕES

Observou-se que o óleo essencial de noz-moscada apresentou atividade antifúngica, com capacidade de redução do desenvolvimento dos fungos *A. ochraceus* e *A. flavus* para as concentrações avaliadas (0,1; 0,3 e 0,5%). O isolamento dos compostos miristicina e safrol, presentes na fração antifúngica, mostrou a eficácia das técnicas cromatográficas utilizadas ao longo deste trabalho. Miristicina foi identificada como responsável por essa atividade antifúngica do óleo essencial de noz-moscada. Essa afirmação é perfeitamente plausível, tendo-se em vista que a fração antifúngica é composta predominantemente por miristicina, além de uma pequena quantidade de safrol. Além disso, não houve diferença significativa entre o crescimento micelial médio dos fungos avaliados quanto à presença da fração antifúngica ou da miristicina. Apesar de corresponder a 26,6% do óleo essencial de noz-moscada avaliado e identificada como responsável pela atividade antifúngica, não é seguro produzir e comercializar a miristicina como fungicida devido aos relatos de Stein *et al.* 2001. Segundo esses autores, tanto a miristicina quanto a elemicina, presentes em noz-moscada, sofrem biotransformação em anfetaminas ao serem ingeridas, sendo, portanto, alucinógenas e passíveis de tal exploração.

O isolamento e identificação de miristicina e safrol, bem como a quantificação dos mesmos, mostraram a eficiência dos métodos cromatográficos utilizados.

Figura 2: Espectro de ressonância magnética por 1H do óleo essencial de noz-moscada, com integral de intensidade dos sinais e escala de 0 a 100%.

ANEXO 1

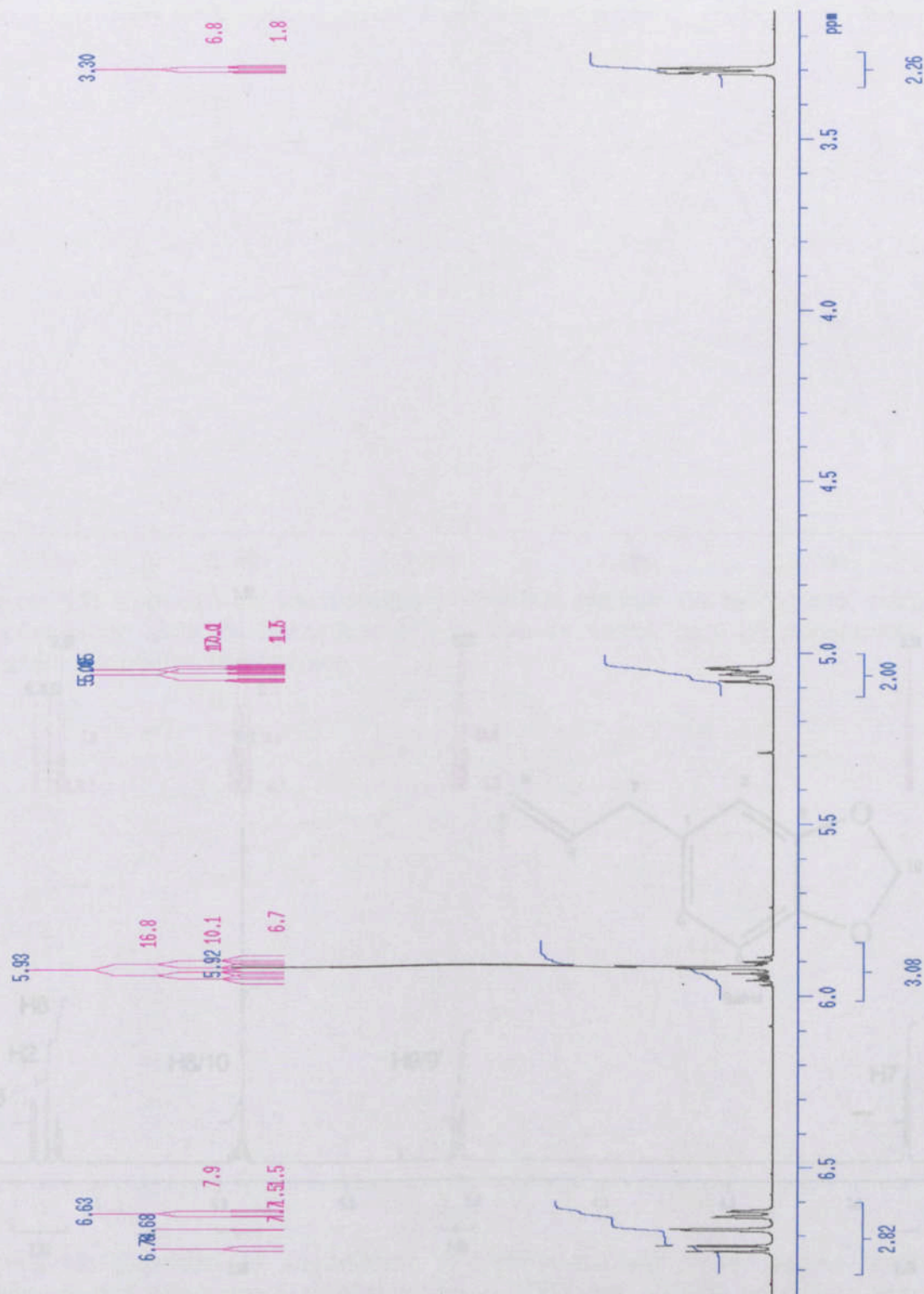


Figura 9: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio para safrol, com integrais de intensidade dos sinais e constantes de acoplamentos ^1H - ^1H .

ANEXO 2

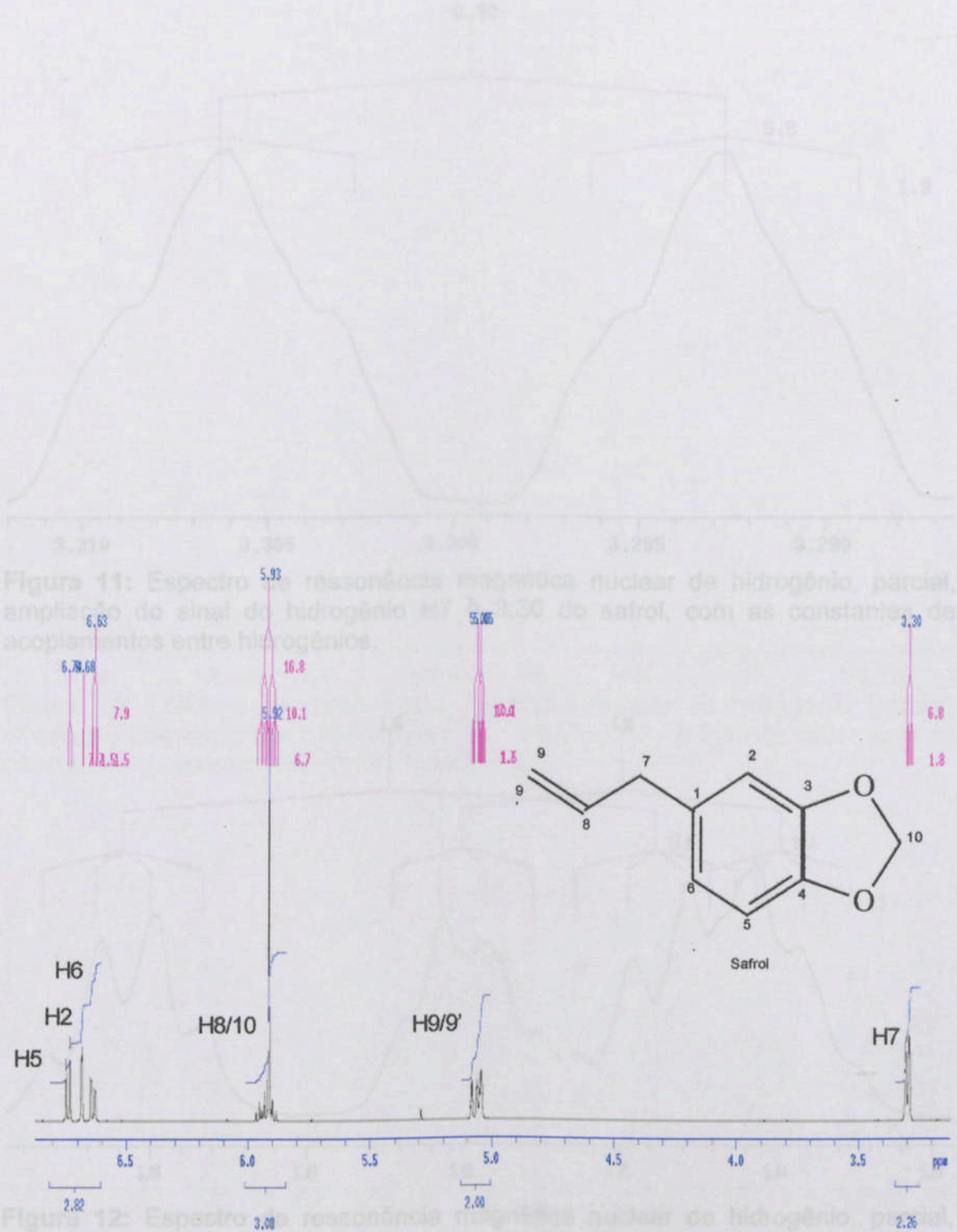


Figura 10: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio para safrol, com as constantes de acoplamentos entre hidrogênios e atribuição dos sinais.

ANEXO 3

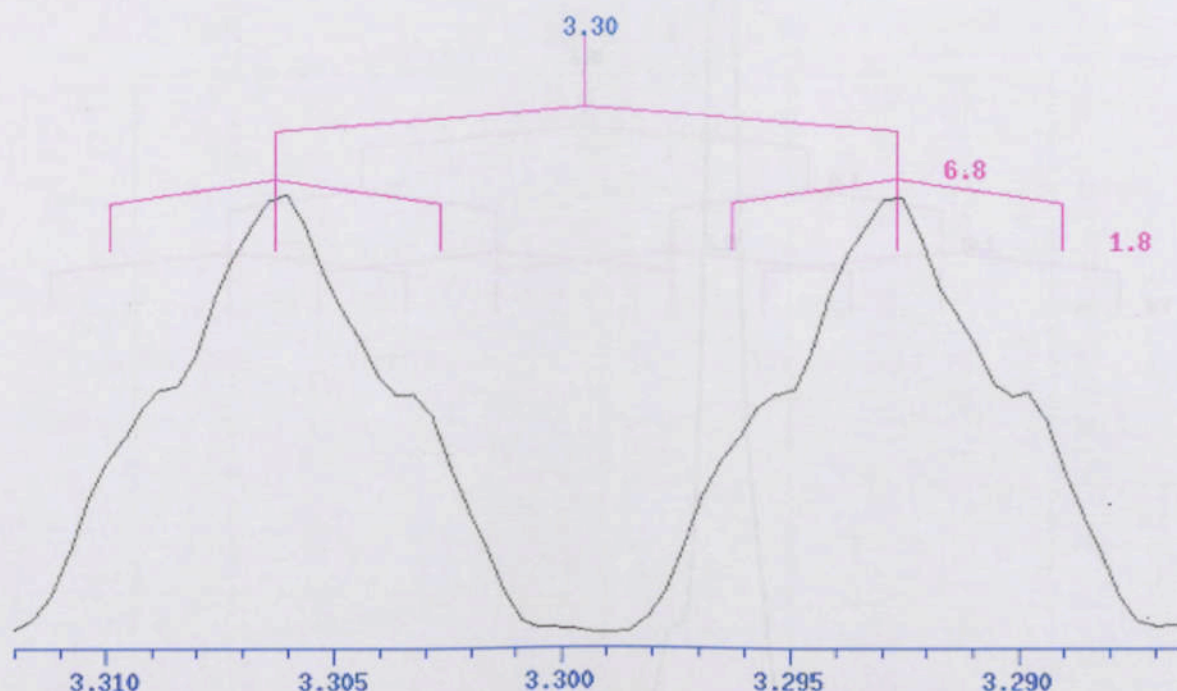


Figura 11: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, parcial, ampliação do sinal do hidrogênio H7 δ 3,30 do safrol, com as constantes de acoplamentos entre hidrogênios.

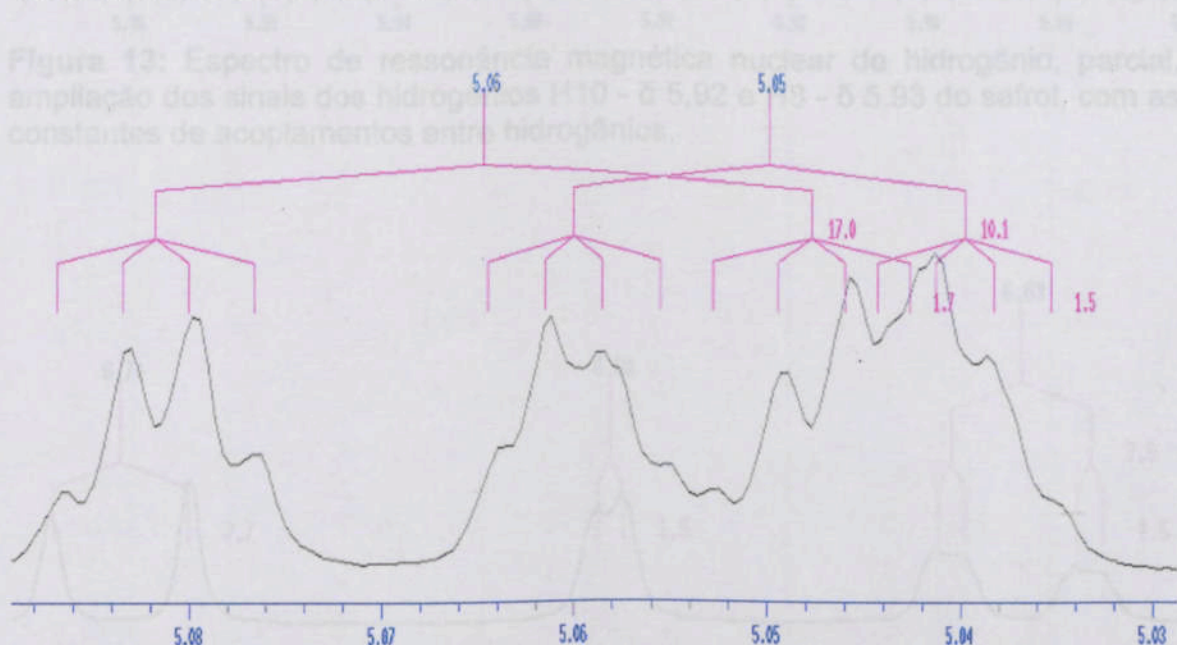


Figura 12: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, parcial, ampliação dos sinais dos hidrogênios H9 - δ 5,05 e H9' - δ 5,06 do safrol, com as constantes de acoplamentos entre hidrogênios.

ANEXO 4

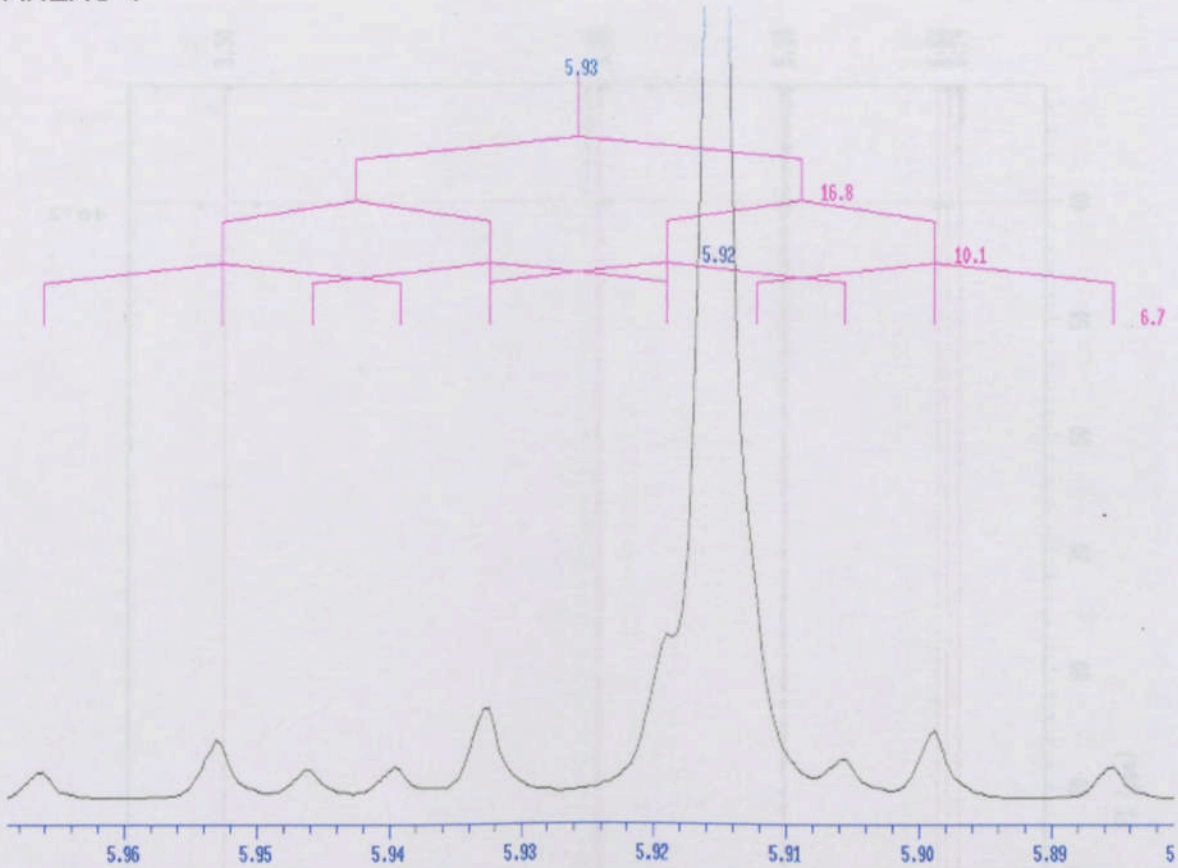


Figura 13: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, parcial, ampliação dos sinais dos hidrogênios H10 - δ 5,92 e H8 - δ 5,93 do safrol, com as constantes de acoplamentos entre hidrogênios.

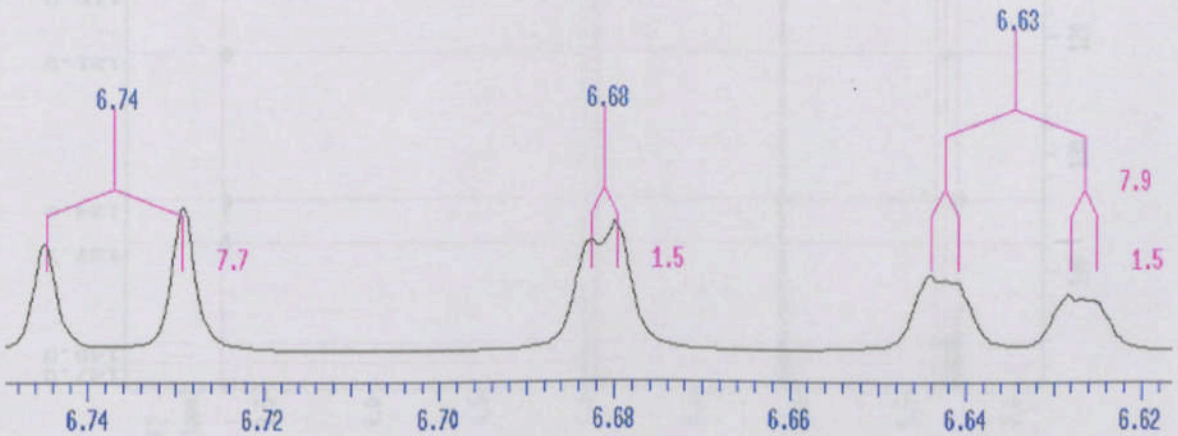


Figura 14: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, parcial, ampliação dos sinais dos hidrogênios H6 - δ 6,63; H2 - δ 6,68 e H5 - δ 6,74 do safrol, com as constantes de acoplamentos entre hidrogênios.

ANEXO 5

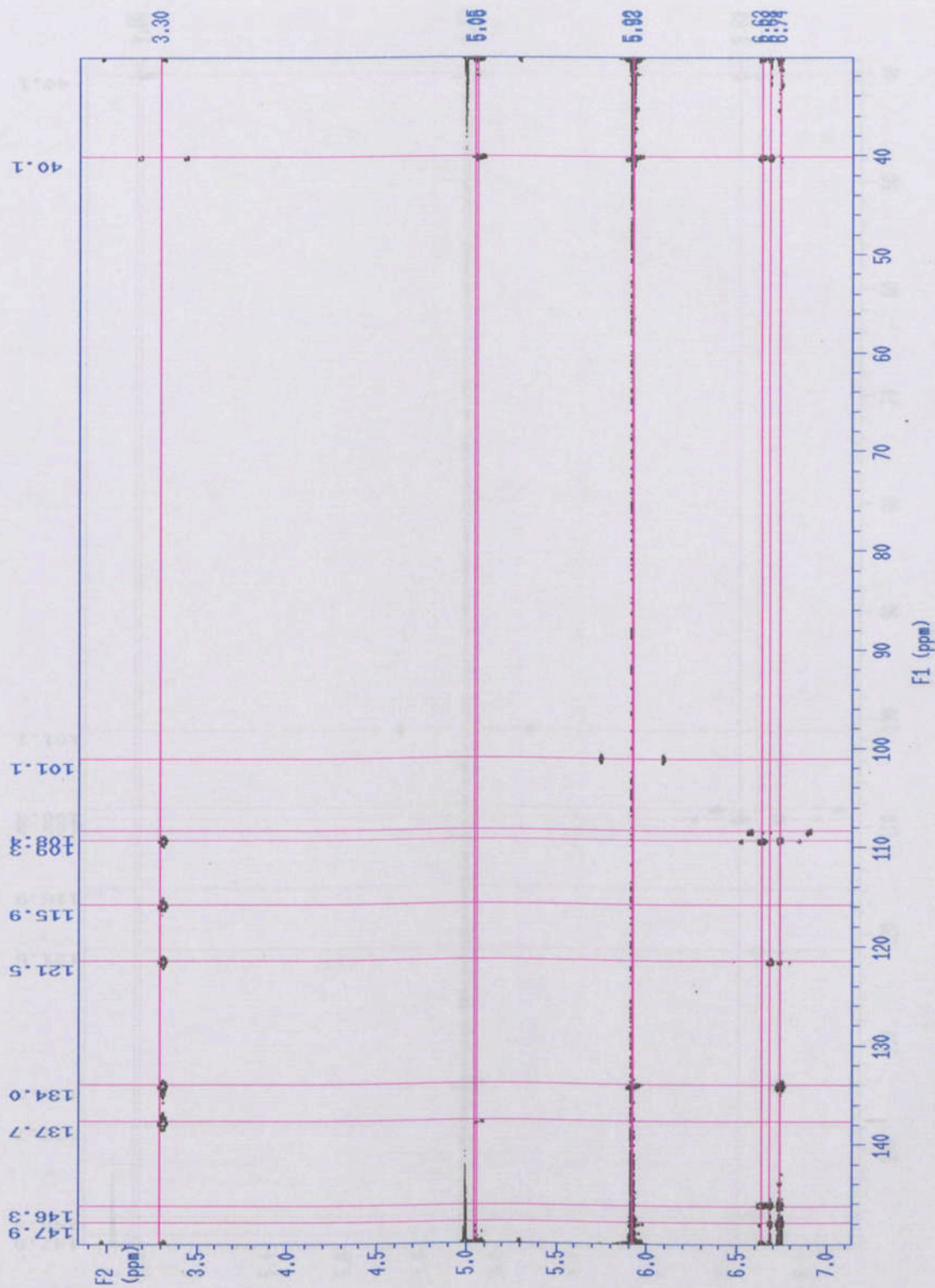


Figura 15: Mapa de contorno de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, HMBC, de safrol, com os deslocamentos e acoplamentos entre hidrogênios e carbonos.

ANEXO 6

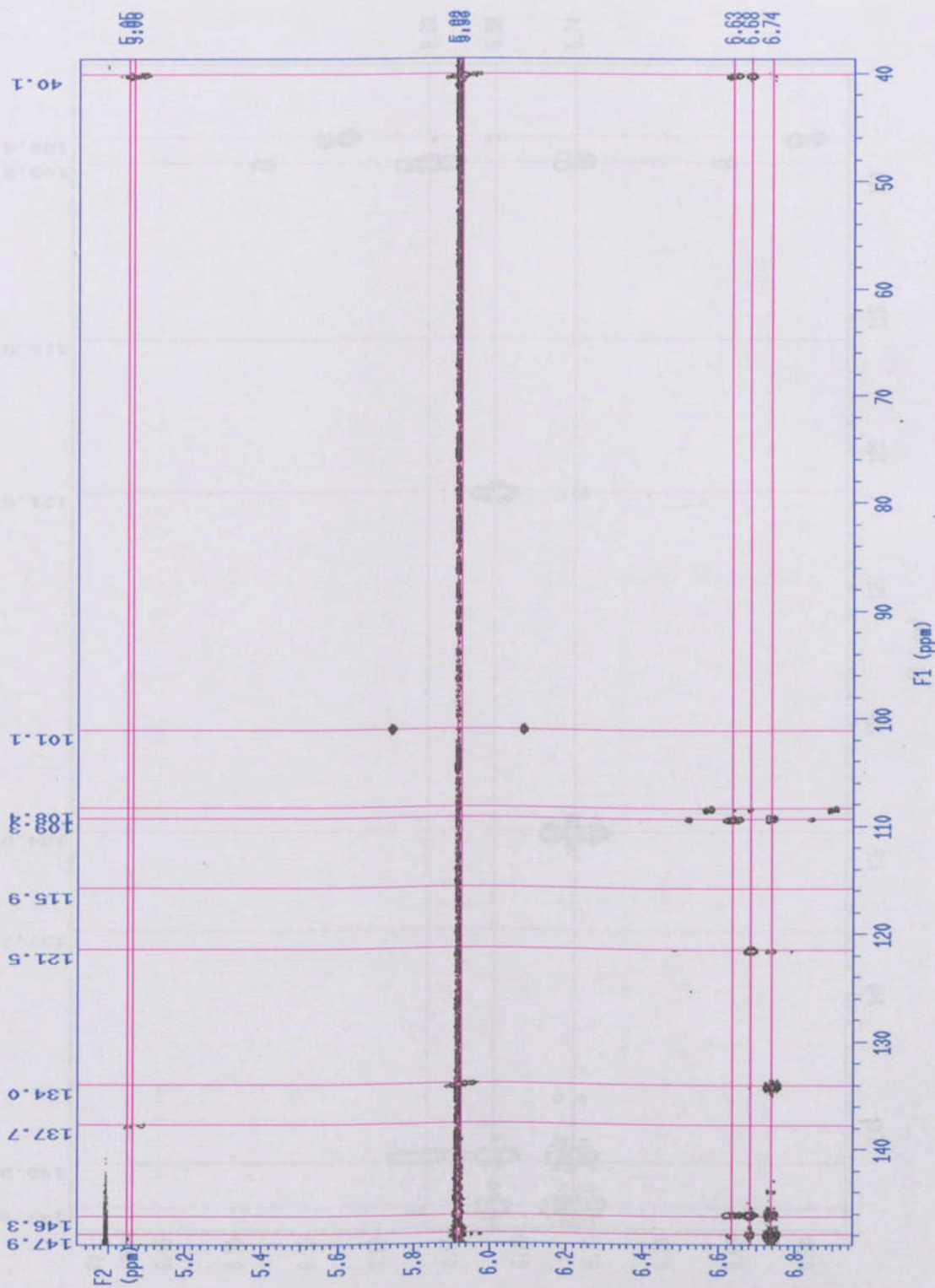


Figura 16: Mapa de contorno de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, HMBC, parcial de safrol, com os deslocamentos e acoplamentos entre hidrogênios e carbonos.

ANEXO 7

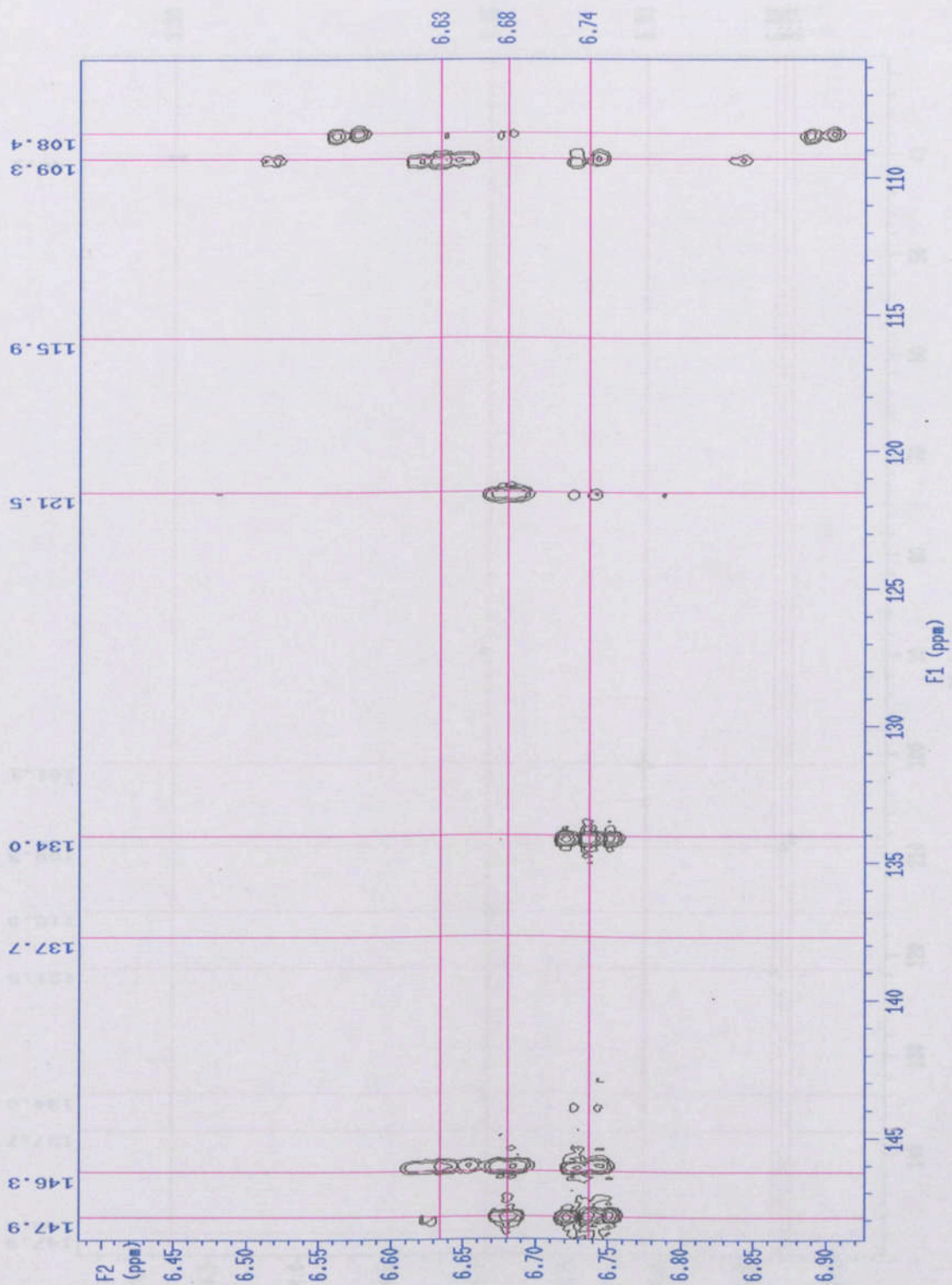


Figura 17: Mapa de contorno de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, HMBC, parcial de safrol, com os deslocamentos e acoplamentos entre hidrogênios e carbonos.

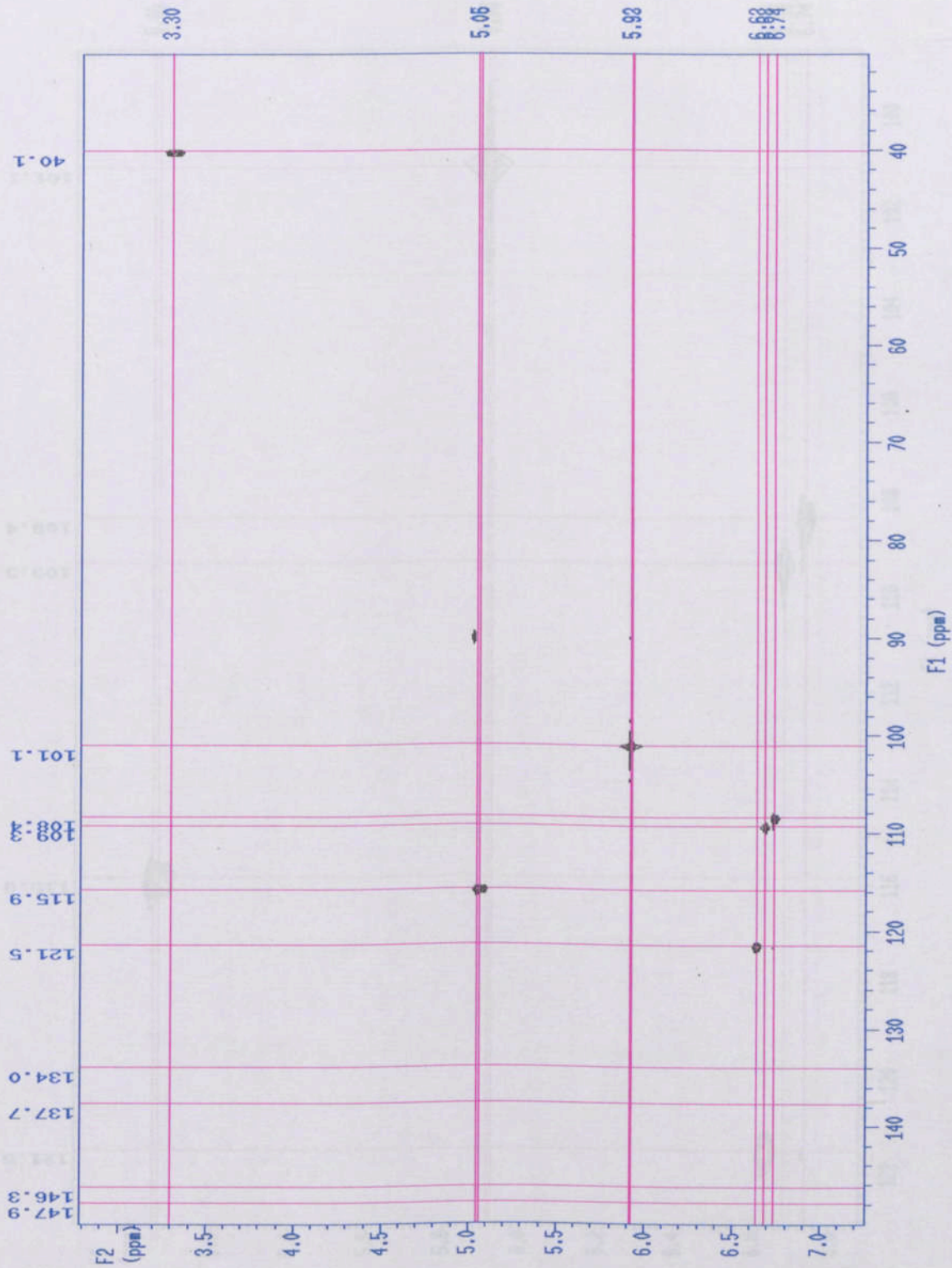


Figura 18: Mapa de contorno de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, HMQC, de safrol, com os deslocamentos e acoplamentos entre hidrogênios e carbonos.

ANEXO 9

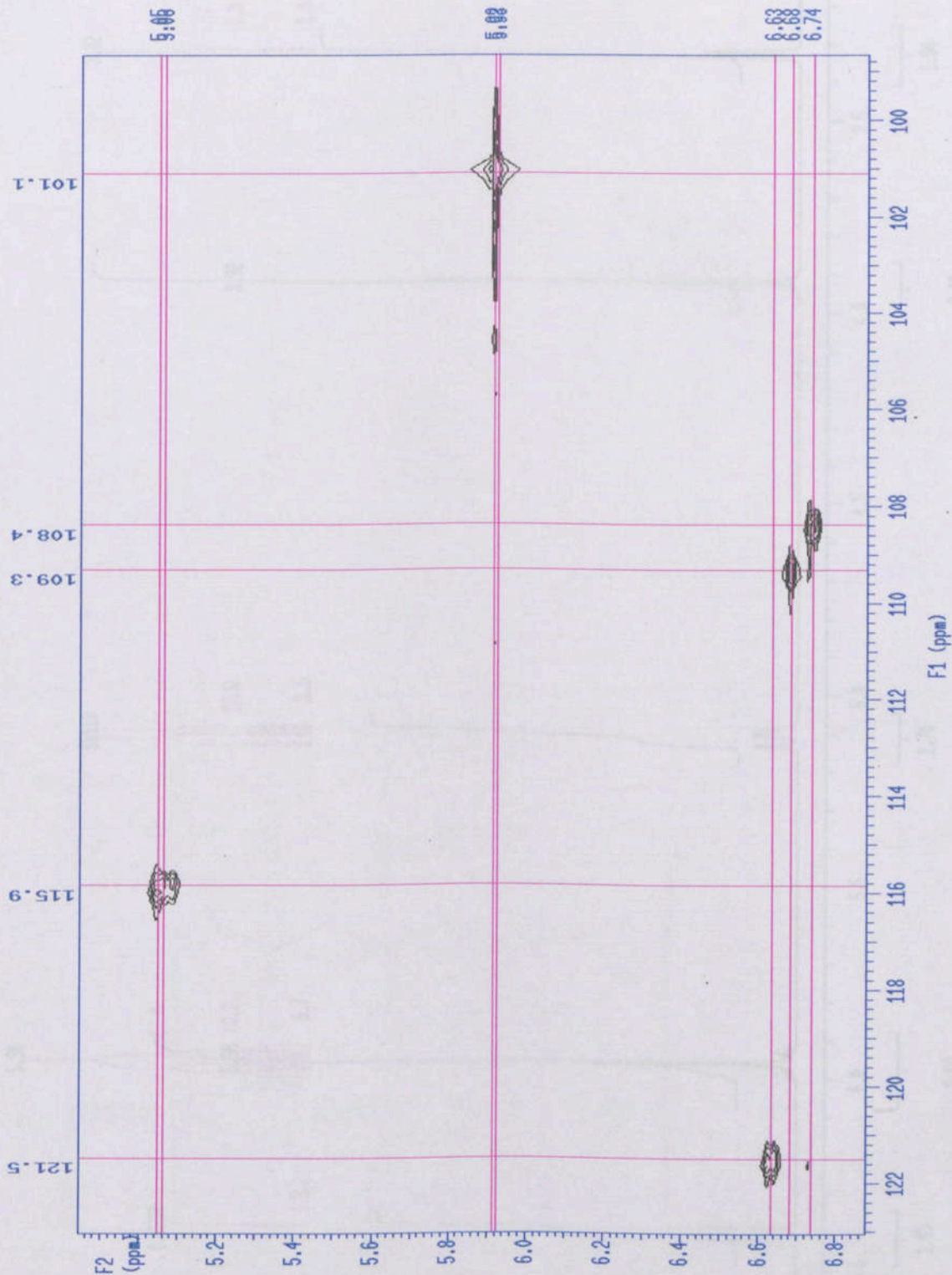


Figura 19: Mapa de contorno de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, HMQC, parcial de safrol, com os deslocamentos e acoplamentos entre hidrogênios e carbonos.

ANEXO 10

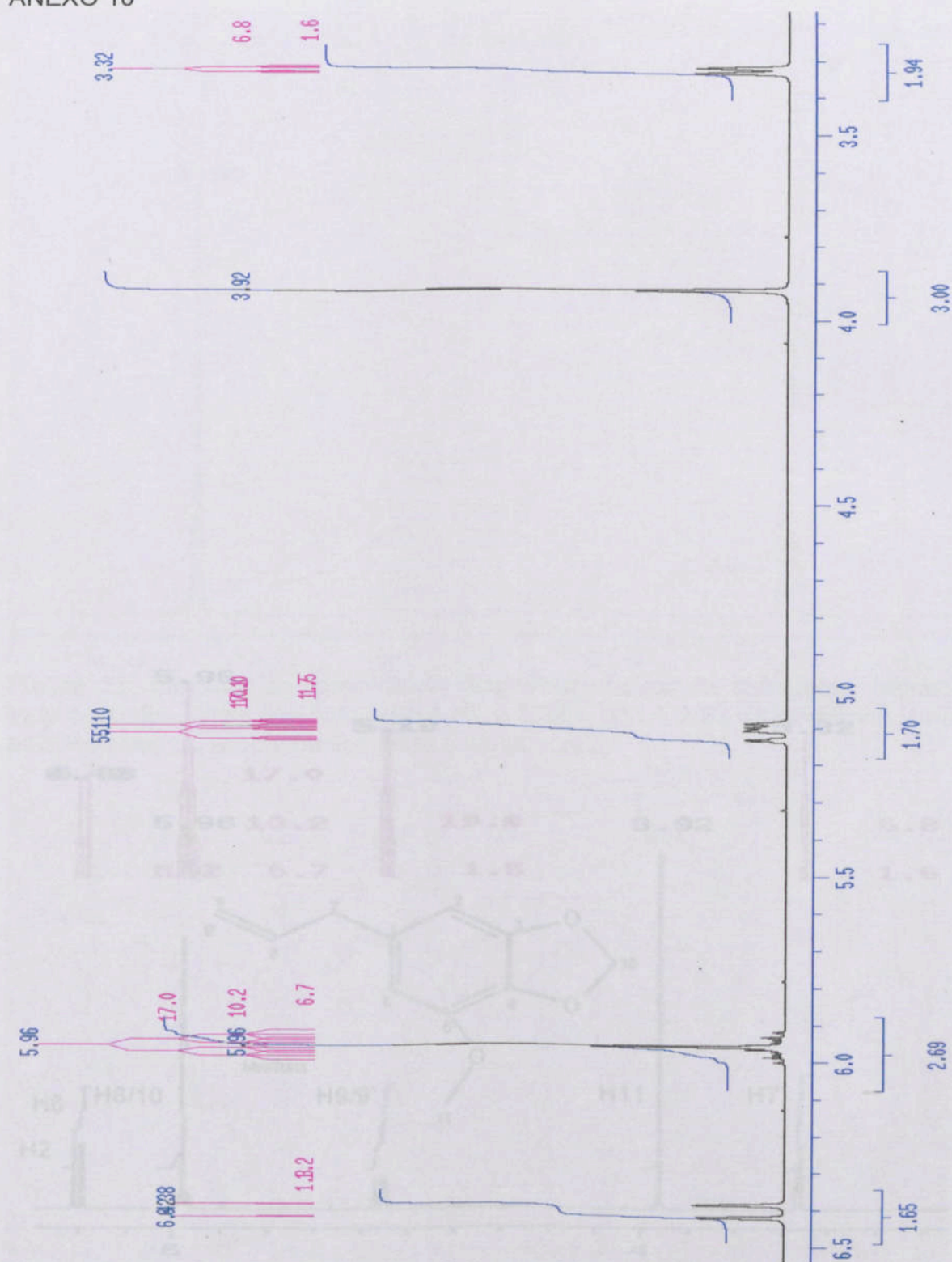


Figura 20: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio da miristicina, com integrais de intensidade dos sinais e constantes de acoplamentos ^1H - ^1H .

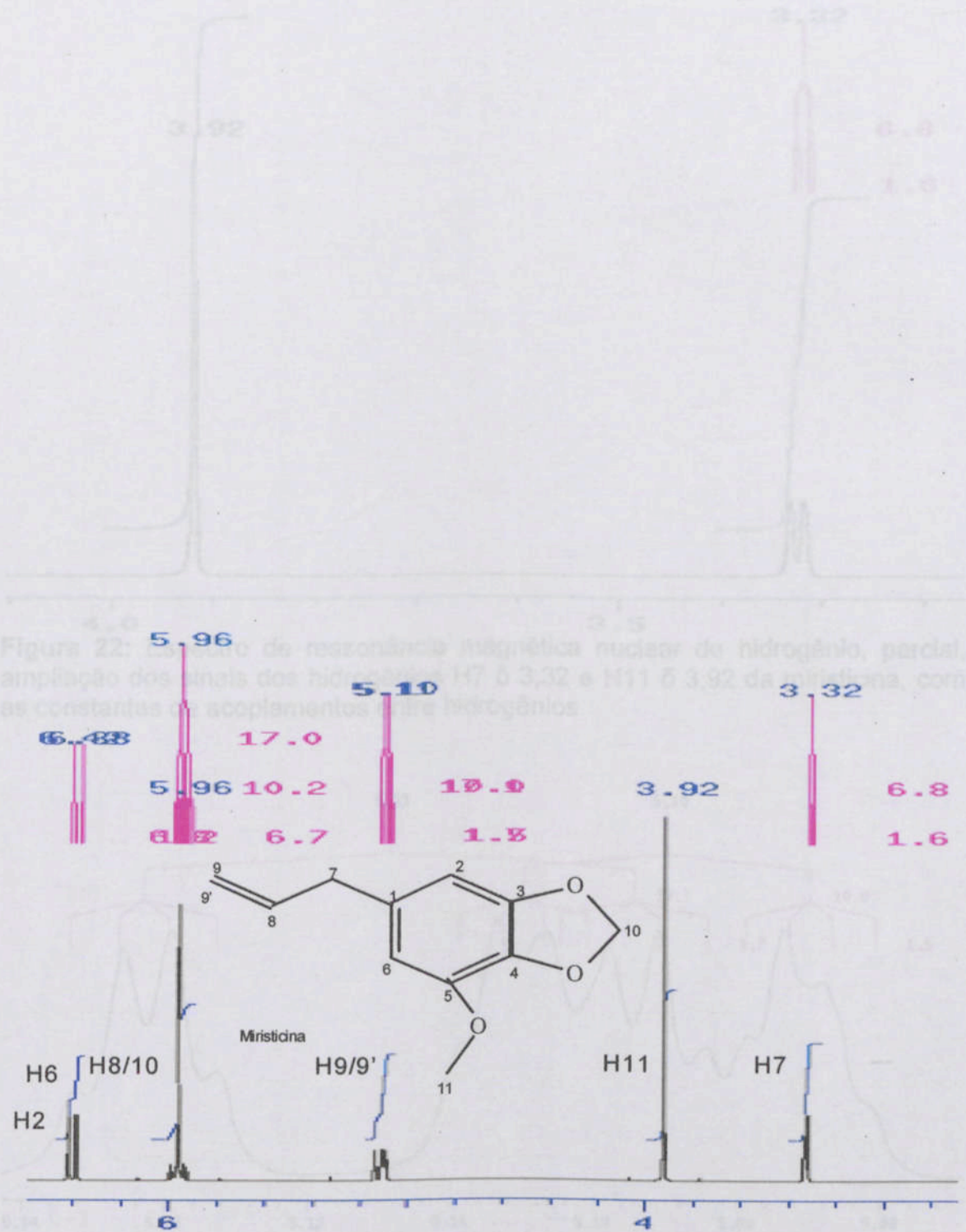


Figura 21: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, da miristicina, com as constantes de acoplamentos entre hidrogênios e atribuição dos sinais.

ANEXO 12

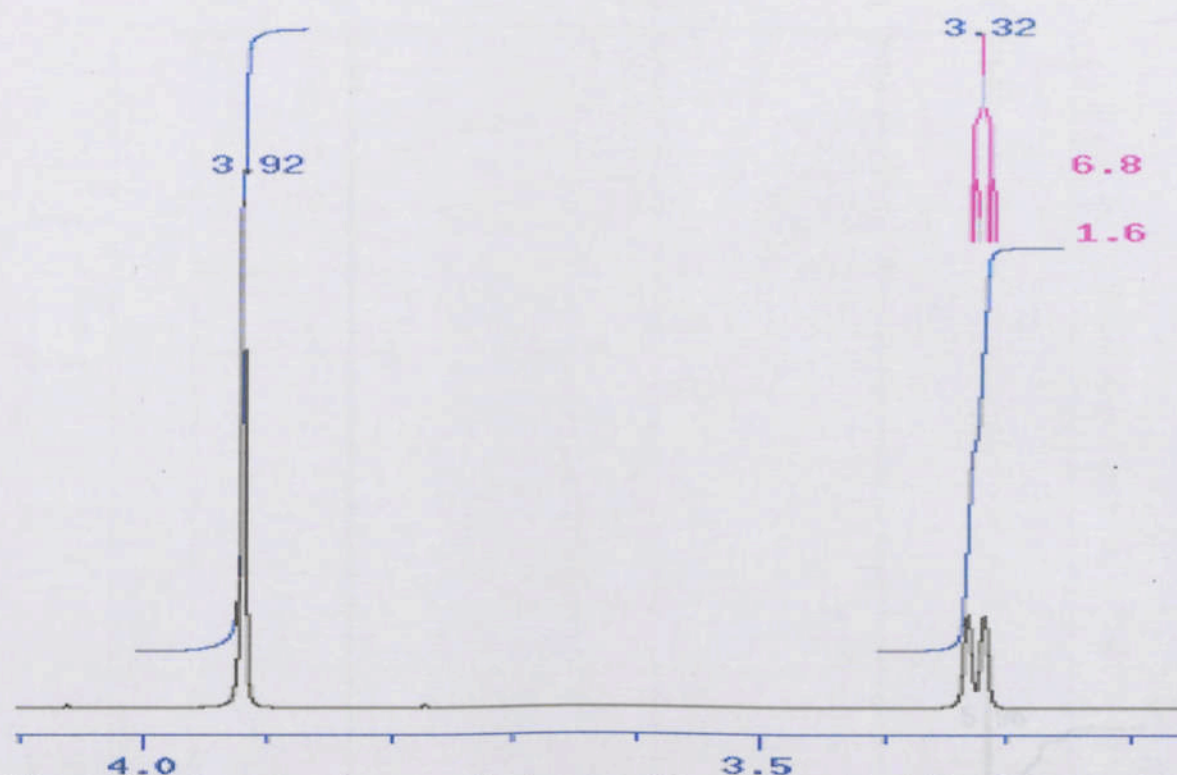


Figura 22: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, parcial, ampliação dos sinais dos hidrogênios H7 δ 3,32 e H11 δ 3,92 da miristicina, com as constantes de acoplamentos entre hidrogênios

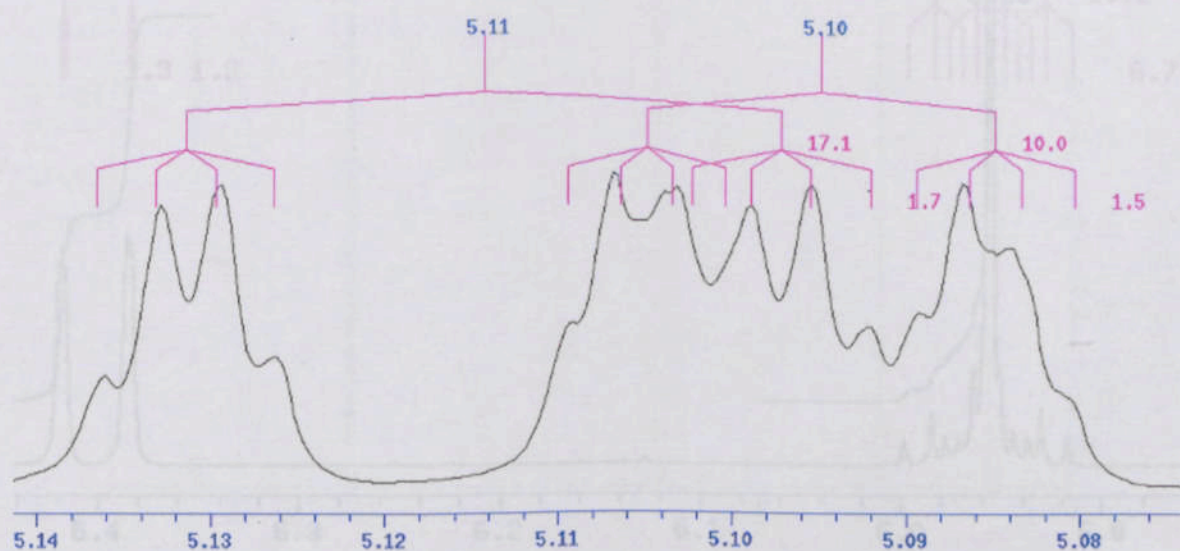


Figura 23: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, parcial, ampliação dos sinais dos hidrogênios H9' δ 5,10 e H9 δ 5,11 da miristicina, com as constantes de acoplamentos entre hidrogênios

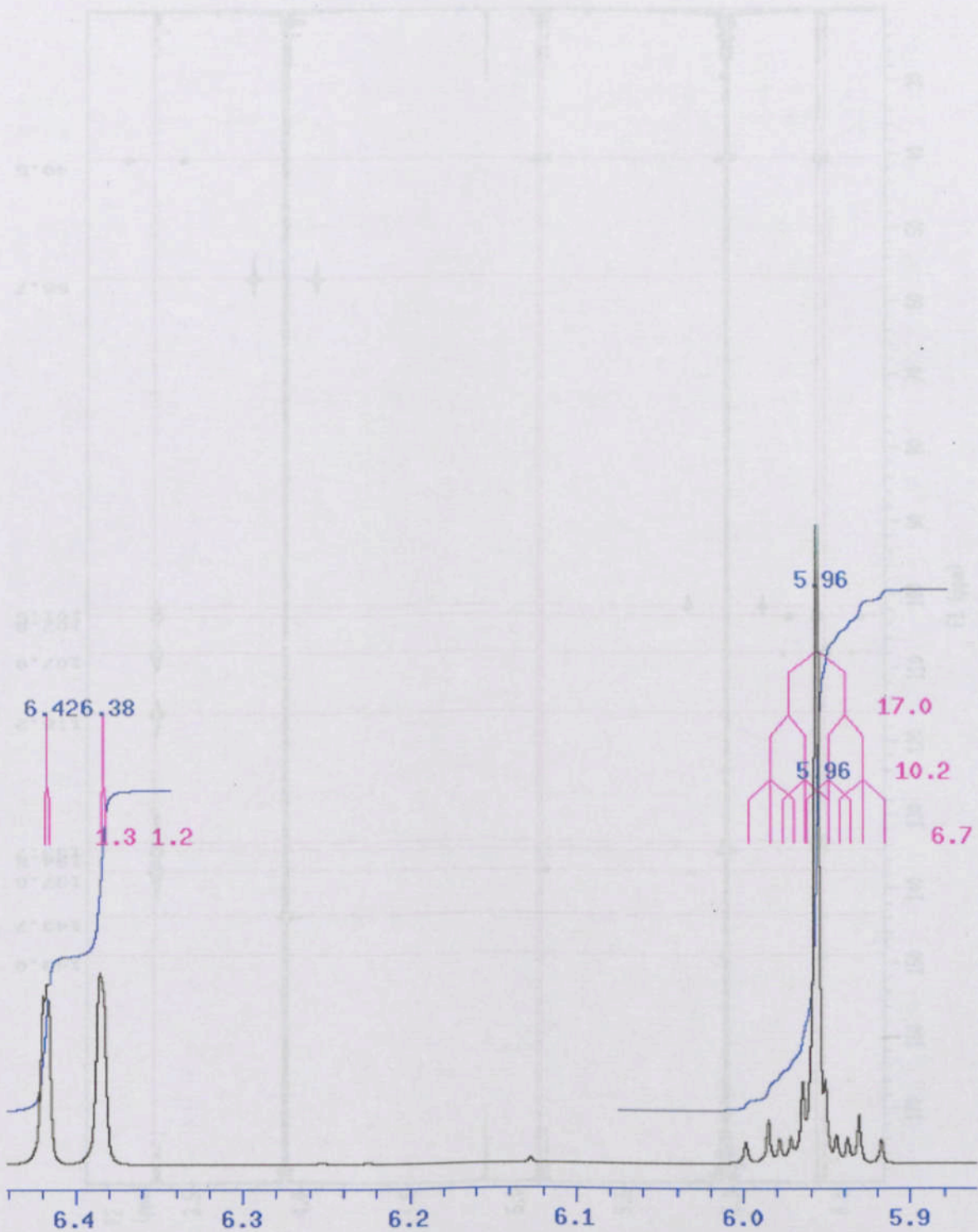


Figura 24: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, parcial, ampliação dos sinais dos hidrogênios H8 δ 5,96; H10 δ 5,96; H6 δ 6,38 e H2 δ 6,42 da miristicina, com as constantes de acoplamentos entre hidrogênios.

ANEXO 14

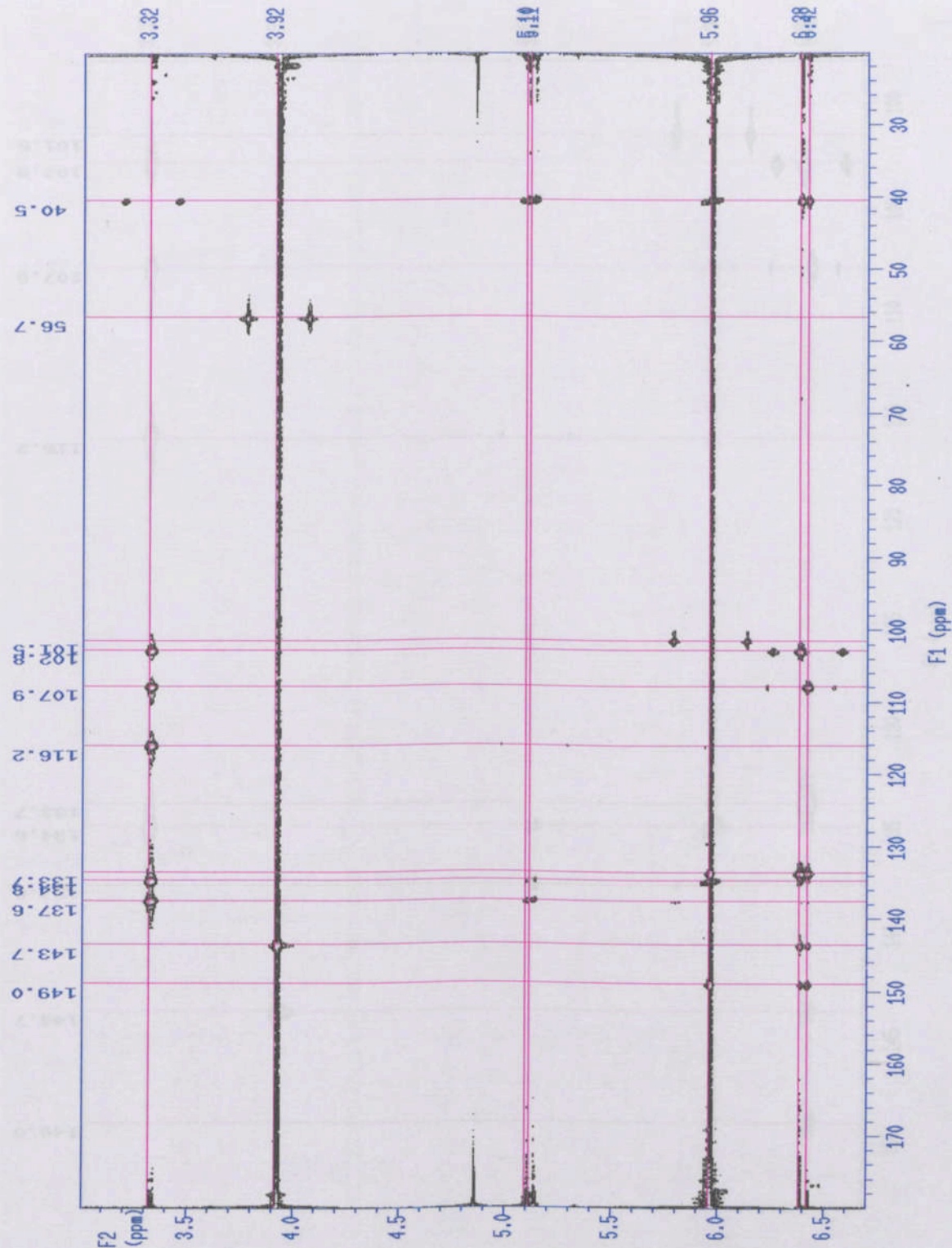


Figura 25: Mapa de contorno de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, HMBC, da miristicina, com os deslocamentos e acoplamentos entre hidrogênios e carbonos.

ANEXO 15

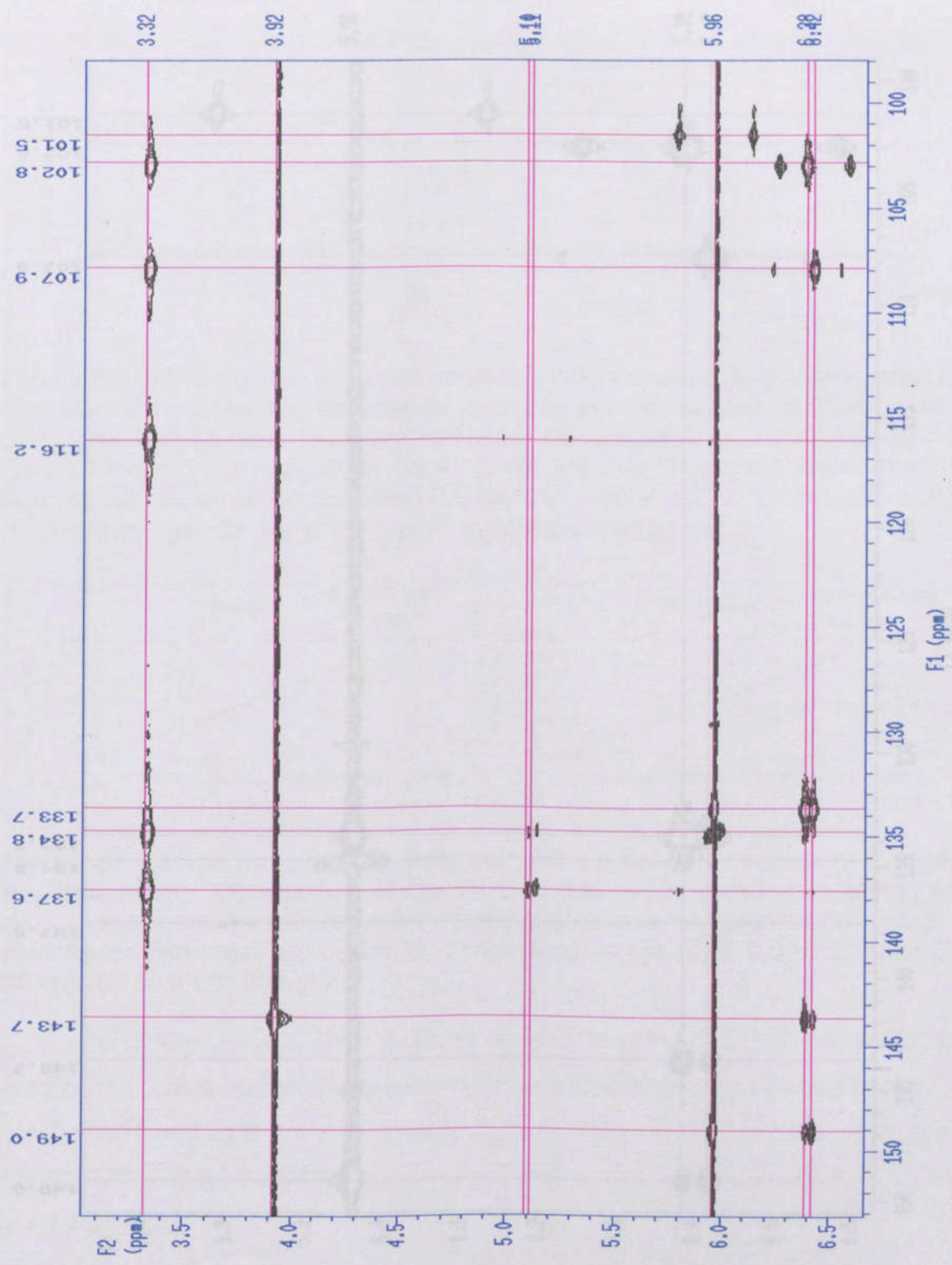


Figura 26: Mapa de contorno de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, HMBC, parcial da miristicina, com os deslocamentos e acoplamentos entre hidrogênios e carbonos.

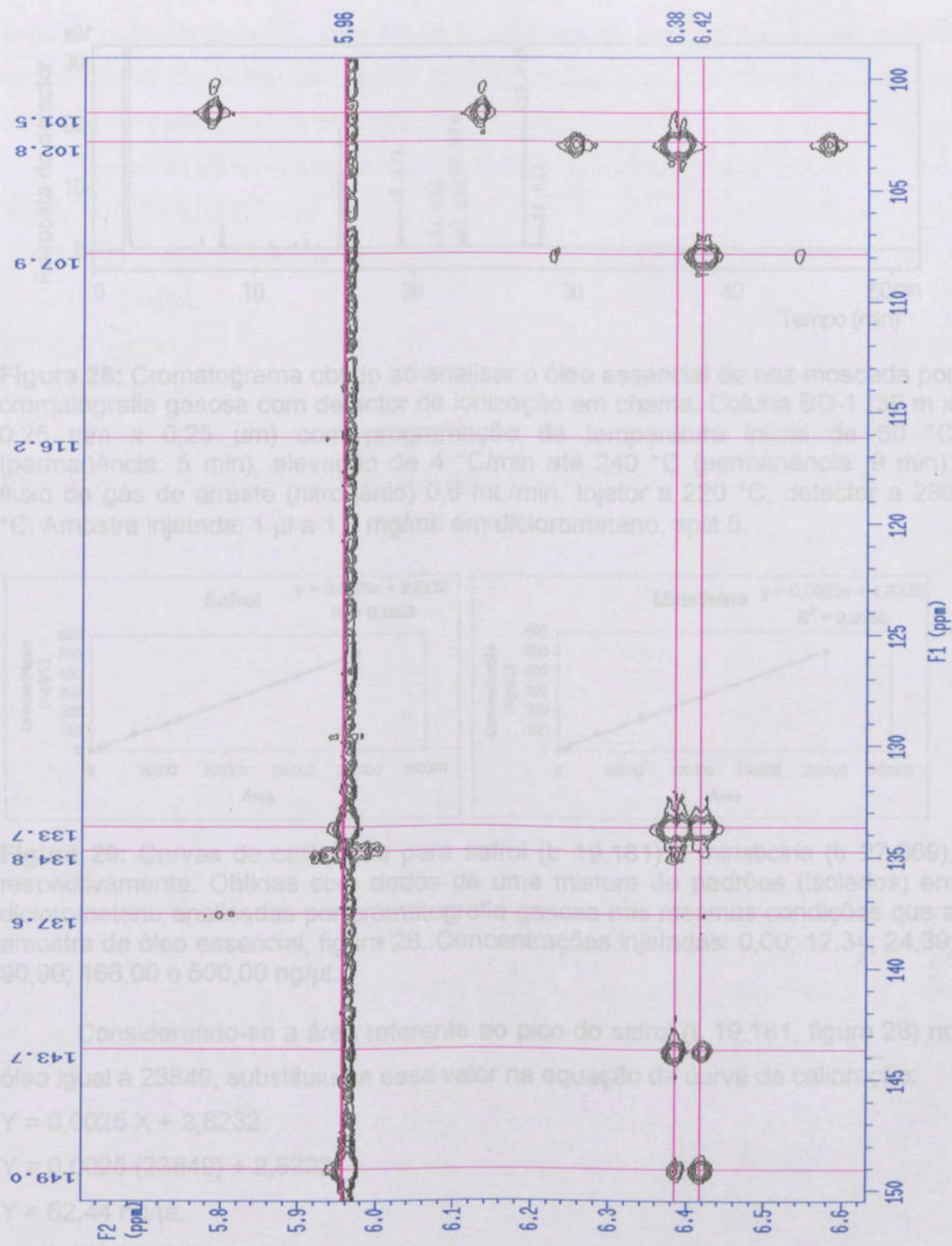


Figura 28: Cromatograma obtido ao analisar o óleo essencial de noz-moscada por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama. Coluna BD-1 (15 m x 0.25 mm x 0.25 µm) com temperatura da lamparina inicial de 100 °C (permanência: 5 min), elevação de 4 °C/min até 240 °C (permanência: 5 min), fluxo de gás de arraste (nitrogênio) 0,8 mL/min. Injetor a 220 °C, detector a 250 °C. Amostra injetada: 1 µl a 1 mg/ml em diclorometano, split 5.

Figura 27: Mapa de contorno de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, HMBC, parcial da miristicina, com os deslocamentos e acoplamentos entre hidrogênios e carbonos.

ANEXO 17

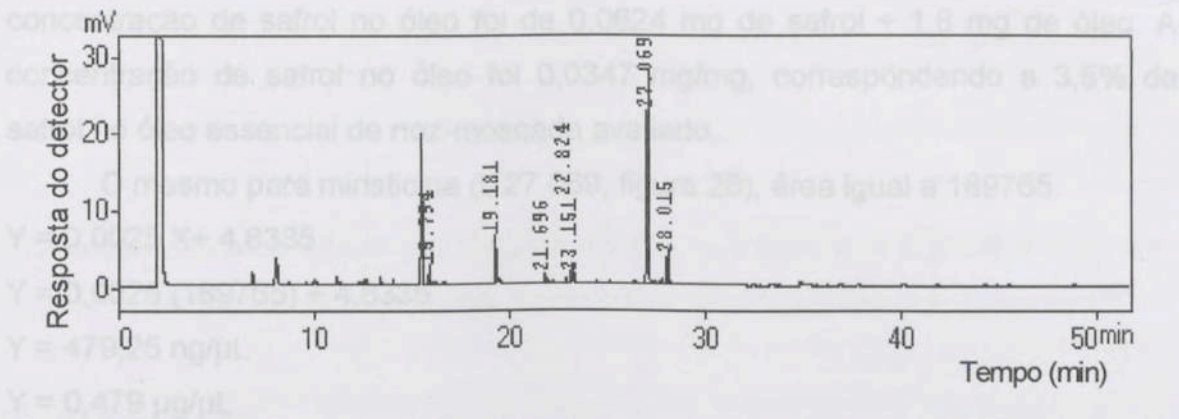


Figura 28: Cromatograma obtido ao analisar o óleo essencial de noz-moscada por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama. Coluna BD-1 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) com programação de temperatura inicial de 60 °C (permanência: 5 min), elevação de 4 °C/min até 240 °C (permanência: 9 min); fluxo de gás de arraste (nitrogênio) 0,8 mL/min. Injetor a 220 °C, detector a 280 °C. Amostra injetada: 1 µl a 1,8 mg/mL em diclorometano, split 5.

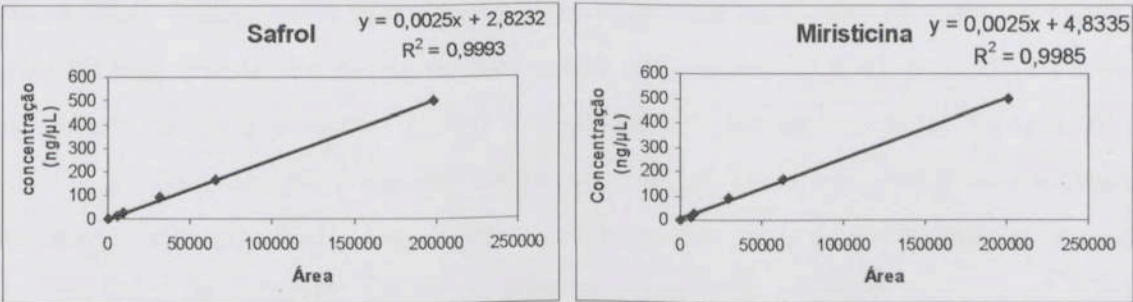


Figura 29: Curvas de calibração para safrol (tr 19.181) e miristicina (tr 27.069), respectivamente. Obtidas com dados de uma mistura de padrões (isolados) em diclorometano analisadas por cromatografia gasosa nas mesmas condições que a amostra de óleo essencial, figura 28. Concentrações injetadas: 0,00; 12,34; 24,39; 90,90; 166,00 e 500,00 ng/µL.

Considerando-se a área referente ao pico do safrol (tr 19.181, figura 28) no óleo igual a 23849, substituiu-se esse valor na equação da curva de calibração:

$$Y = 0,0025 X + 2,8232$$

$$Y = 0,0025 (23849) + 2,8232$$

$$Y = 62,44 \text{ ng/}\mu\text{L}$$

$$Y = 0,0624 \text{ }\mu\text{g/}\mu\text{L}$$

$$Y = 0,0624 \text{ mg/mL}$$

Considerando-se a concentração do óleo analisado igual a 1,8 mg/mL, a concentração de safrol no óleo foi de 0,0624 mg de safrol ÷ 1,8 mg de óleo. A concentração de safrol no óleo foi 0,0347 mg/mg, correspondendo a 3,5% de safrol no óleo essencial de noz-moscada avaliado.

O mesmo para miristicina (t_r 27.069, figura 28), área igual a 189765.

$$Y = 0,0025 X + 4,8335$$

$$Y = 0,0025 (189765) + 4,8335$$

$$Y = 479,25 \text{ ng}/\mu\text{L}$$

$$Y = 0,479 \text{ } \mu\text{g}/\mu\text{L}$$

$$Y = 0,479 \text{ mg/mL}$$

A concentração de miristicina no óleo foi de 0,479 mg ÷ 1,8 mg de óleo. Dessa forma, a concentração de miristicina no óleo foi 0,266 mg/mg, ou 26,6% de miristicina no óleo essencial de noz-moscada avaliado.

CAPÍTULO 2

Composição e atividade antifúngica do óleo essencial de *Myristica fragans* contra fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Colletotrichum* e *Fusarium*

1- INTRODUÇÃO

A contaminação de gêneros alimentícios por micotoxinas prejudiciais à saúde humana tem sido objeto de estudo de vários autores. A presença de importantes micotoxinas em cereais é atribuída a fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Claviceps* e *Fusarium*, sendo *Fusarium* responsável pela produção de micotoxinas tricotecenos (Schrödter, 2004 e Edwards, 2004). Em alguns casos, *Fusarium* sp. é a principal causa de perdas de armazenamento (Morse *et al.*, 2000). *F. oxysporum* é o agente causal da doença vascular que causa murcha em banana, conhecida como mal do Panamá, uma das mais sérias ameaças mundiais às colheitas de banana. Contudo, não há fungicidas efetivos disponíveis para o controle desta doença (Borges *et al.*, 2004).

Colletotrichum é um gênero de fungo patogênico de plantas importante em todo o mundo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais, causando doenças que levam a perdas econômicas significativas em grãos, cereais, legumes, vegetais e frutas. Os sintomas são conhecidos como antracnose e geralmente envolvem a formação de lesão negra com depressão subcircular e erupção cor rósea devido ao desenvolvimento de esporos de fungos (Bailey e Jeger, 1992). Antracnose é uma doença que se desenvolve durante armazenamento e amadurecimento, sendo que em bananas é causada pelo fungo patogênico *C. musae* (Chillet *et al.*, 2000). Em mamão é provocada por *C. gloeosporioides*, tendo causado sérios problemas onde encontra condições

ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento e resistência a fungicidas sintéticos (Bautista-Baños *et al.*, 2003).

A aplicação de pesticidas em grãos tem trazido vários problemas ambientais, além do desenvolvimento de resistência e surgimento de novas pestes (Huang *et al.*, 1997). Apesar de haver no mercado um grande número de compostos para controlar os mais diversos fungos, existe uma demanda crescente por novos produtos, uma vez que os organismos desenvolvem resistência a tais compostos após certo tempo de contato com eles. Resíduos de pesticidas podem ser encontrados não só no produto agrícola em estado natural, mas também em alimentos processados (Barbosa, 2004). Alguns óleos essenciais compostos por um coquetel natural de monoterpenos, diterpenos e hidrocarbonetos com variados grupos funcionais apresentam atividades antimicrobial e fungicida (Sridhar *et al.*, 2003). Alguns óleos essenciais de plantas medicinais e temperos apresentam atividade fungicida (Soliman e Badeaa, 2002; Alvarez-Castellanos *et al.*, 2001; e Sridhar *et al.*, 2003).

A noz-moscada é um tempero comum derivado da fruta de *Myristica fragrans* Houtt (Myristicaceae). Possui atividade inseticida (Huang *et al.*, 1997) e bactericida (Takikawa *et al.*, 2002), além de seu uso medicinal (Newman, 1943). A composição da noz-moscada tem sido investigada por diversos autores (Sanford e Heinz, 1971; Forrest e Heacock, 1972; Shenk e Lamparsky, 1981; Currò *et al.*, 1987; Archer, 1988; Pino e Borges, 1999; Choo *et al.*, 1999). Entretanto, não encontramos na literatura um estudo sistemático completo sobre a atividade fungicida da noz-moscada. Assim, este trabalho visou avaliar a ação fungicida do óleo essencial de noz-moscada contra *A. niger*, *A. glaucus*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *C. musae* e *C. gloeosporioides*, bem como isolar e identificar o(s) composto(s) envolvido(s) na atividade antifúngica.

2- MATERIAIS E MÉTODOS

2.1- Equipamentos, solventes e reagentes:

A análise da composição do óleo essencial foi feita em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu (Kyoto, Japan, Model QP 5000), equipado com injetor automático (Shimadzu, AOC-17), biblioteca Wiley 229, sistema coletor de dados (computador Pentium 133), coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm di x 0,25 μ m filme) revestida com a fase estacionária DB-5 (J & W Scientific, USA); temperatura inicial de 60 °C mantida por 1 min, aumentada a 3 °C/min até atingir 240 °C, onde foi mantida por 9 min; fluxo do gás de arraste (hélio) 1,33 mL/min; temperatura do injetor 220 °C; temperatura da interface 240 °C; Split 1:5; modo de ionização: Impacto de elétrons (70 eV); faixa de massa varrida (m/z): 29 – 400. Foram determinados os índices de retenção de Kováts dos compostos do óleo essencial através de um cromatógrafo a gás Shimadzu (Kyoto, Japan, Model 17A) equipado com detector de ionização em chama (CG/DIC), auto-injetor (Shimadzu, AOC-17) e sistema coletor de dados (Shimadzu, Kyoto, modelo CBM-101 e computador Pentium 133); coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm di x 0,25 μ m filme) revestida com a fase estacionária DB-5 (J & W Scientific, USA), temperatura inicial de 60 °C mantida por 1 min, aumentada a 3 °C/min até atingir 240 °C, onde foi mantida por 9 min; fluxo do gás de arraste (Nitrogênio) 1,33 mL / min; temperatura do injetor 220 °C; temperatura do detector (FID) 240 °C; modo de injeção Split 1:1.

O isolamento foi feito em um cromatógrafo a líquido (Shimadzu, Osaka, Japão, modelo LC-6AD), com detector UV-VIS (Shimadzu, Osaka, Japão, modelo SP-10AVP) com volumes de células de 7 e 20 μ L para CLAE analítica e preparativa, respectivamente, sistema coletor de dados (Shimadzu, Osaka, Japão, modelo Class 5000) equipado com um injetor de "loops" de 100 e 1000 μ L para CLAE analítica e preparativa, respectivamente. Colunas: Supelco LC-18 (250 x 4,6 mm di, 5 μ m), LC-8 (20 x 21 mm di, 5 μ m). Pré-coluna: LC-18 (20 x 4,6 mm di, 5 μ m).

Espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos em espectrômetro Varian Inova equipado com probe de detecção indireta de 5 mm, operado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C . O solvente foi clorofórmio deuterado, sendo o deslocamento baseado no TMS a 25 °C.

Todos solventes foram destilados previamente. A água utilizada para análise cromatográfica foi purificada por um sistema MilliQ (Waters, USA).

2.2- Extração do óleo essencial:

O óleo essencial foi obtido através de um sistema de destilação simples, adicionando-se 60 g de noz-moscada triturada e 1,2 L de água destilada. O hidrolato (800 mL) foi extraído com diclorometano (duas porções de 150 mL), seco com sulfato de sódio anidro, concentrado em evaporador rotatório e pesado. Todo esse procedimento foi repetido por 16 vezes, sendo o óleo armazenado em dois frascos âmbar em freezer.

2.3- Fracionamento do óleo essencial por cromatografia em camada delgada (CCD):

Aplicaram-se 200 mg de óleo por placa de cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa (20 x 20 cm, 1 mm de sílica gel 60 GF₂₅₄ MERK), fase móvel constituída de diclorometano e hexano (8:2, v/v). Utilizou-se luz ultravioleta para revelar frações de compostos presentes no óleo. Todas as frações observadas sob luz ultravioleta foram recuperadas através da raspagem da fase estacionária e posterior extração com diclorometano por 8 h, sob agitação magnética, seguida de filtração a vácuo, sendo o solvente eliminado em evaporador rotatório.

2.4- Purificação dos compostos presentes nas frações do óleo essencial de noz-moscada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR):

As frações do óleo essencial de noz-moscada, obtidas por cromatografia em camada delgada (CCD), foram submetidas à cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) para o isolamento de seus componentes. Para a CLAE analítica utilizou-se a coluna Supelco LC-18 (250 x 4.6 mm di, 5 µm) com pré-coluna Supelco LC-18 (20 x 4.6 mm di, 5 µm), fase móvel composta de acetonitrila:água (1:1, v/v) a um fluxo de 1.0 mL/min. O efluente foi monitorado pelo detector UV-VIS a 230 nm, em eluição isocrática. A coluna Supelco LC-8 (250 x 21 mm di, 5 µm) com pré-coluna Supelco LC-18 (20 x 4.6 mm di, 5 µm) foi utilizada para injeções de 40 mg de amostra, com a mesma fase móvel a fluxo de 4.0 mL/min, sendo as injeções feitas através de "loops" de 100 e 1000 µL para CLAE-FR analítica e preparativa, respectivamente. O efluente recolhido foi liofilizado e a amostra purificada novamente submetida a CLAE-FR analítica, injetando-se 20 µL a 0,5 mg/mL.

2.5- Identificação dos compostos por Índice de Retenção de Kováts através de cromatografia gasosa, análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) e/ou ressonância magnética nuclear (RMN):

Todos os compostos do óleo essencial foram identificados através de índice de retenção de Kováts, sendo injetadas amostras de óleo essencial, frações do óleo essencial obtidas por cromatografia em camada delgada e padrões de hidrocarbonetos saturados (com cadeias de 5 a 26 átomos de carbono), a uma concentração de 1mg/mL e razão split de injeção de 1:1. O índice de retenção de Kováts calculado pela equação 1 foi comparado com a literatura (Adams, 1995).

O índice de Kováts é um índice de retenção que descreve o comportamento de retenção do composto de interesse comparativamente ao de uma mistura de

hidrocarbonetos saturados de diferentes números de átomos de carbono. Este índice de retenção fornece informação sobre a sequência de eluição do composto e varia em função da fase estacionária e da temperatura, sendo independente das condições experimentais.

Equação 1:

$$KI = 100 Z + \frac{100 [(\log t'_{RX}) - (\log t'_{RZ})]}{(\log t'_{RZ} + 1) - (\log t'_{RZ})}$$

Onde:

X é o composto de interesse;

t'_{RX} é o tempo de retenção ajustado de X;

Z é o número de carbonos do alcano com tempo de retenção imediatamente inferior ao de X;

t'_{RZ} é o tempo de retenção ajustado de Z;

$t'_{RZ} + 1$ é o tempo de retenção ajustado do alcano com tempo de retenção imediatamente superior ao de X.

Os dados obtidos por espectrometria de massas foram comparados com a biblioteca Wiley 229 e a presença de alguns compostos identificados foi confirmada com o uso de padrões.

Um composto isolado de uma das frações foi analisado e identificado por RMN de hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C) unidimensional e bidimensional (Heteronuclear Multiple Bond Connectivity, com gradiente de campo HMBC).

2.6- Quantificação dos compostos isolados e/ou identificados no óleo essencial de noz-moscada:

Os compostos isolados e/ou identificados foram quantificados no óleo essencial usando-se cromatografia gasosa com detector de ionização em chama, sendo os valores referentes à área relativa dos picos.

2.7- Avaliação da atividade antifúngica:

Os ensaios foram montados em delineamento inteiramente casualizado com 3 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, usando-se o programa SAEG - Sistema de Análises Estatísticas em Genética (Euclides, 1983).

A atividade antifúngica foi determinada através de cálculos de percentagem de inibição de crescimento dos fungos em relação ao crescimento apresentado pela testemunha, sendo atribuído à testemunha 100% de crescimento ou 0% de inibição.

2.7.1- Aquisição dos fungos:

Os fungos *A. niger*, *A. glaucus*, *F. oxysporum*, *F. semitectum*, *C. musae* e *C. gloeosporioides* foram obtidos da micoteca do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa.

2.7.2- Efeito do óleo essencial de noz-moscada sobre os fungos:

A atividade antifúngica foi avaliada contra os fungos *Aspergillus glaucus*, *A. niger*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. musae*, *Fusarium oxysporum* e *F. semitectum*. A metodologia empregada no bioensaio baseou-se na "poison food", utilizando o meio de cultura BDA (batata dextrose ágar) acrescido de sulfato de estreptomicina a 1mg/mL (Dhingra e Sinclair, 1995; Sridhar *et al.*, 2003).

Para a avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial bruto, nas concentrações 0,1; 0,3 e 0,5% foram utilizadas placas de Petri estéreis e descartáveis. O óleo essencial foi previamente dissolvido em metanol (1:1, v/v) e incorporado ao meio de cultura fundido, na concentração desejada. As testemunhas continham o meio de cultura antibiótico e metanol. Os esporos dos fungos foram inoculados no centro das placas.

3- R) Todos os testes foram realizados em triplicata para cada concentração e fungo avaliado, sendo as placas vedadas com filme plástico e mantidas em incubadora a 25 °C, por 7 dias. A inibição de crescimento, promovida pelo óleo essencial foi avaliada medindo o diâmetro da colônia do fungo nas placas contendo o óleo essencial em comparação às placas testemunha. Foram realizadas medidas diariamente.

2.7.3- Identificação da fração antifúngica do óleo essencial de noz-moscada:

Cada fração do óleo essencial, obtida por cromatografia em camada delgada, foi submetida ao ensaio biológico "poison food" a 0,1% utilizando-se a metodologia descrita na seção 2.7.2.

2.7.4- Identificação de compostos antifúngicos do óleo essencial de noz-moscada:

Os compostos α -terpineol, eugenol, metileugenol, acetato de geranila, acetato de diidrocarvila, acetato de bornila, miristicina e safrol, identificados nas frações do óleo essencial, foram submetidos ao ensaio biológico "poison food" a 0,1% (v/v) utilizando-se a metodologia descrita na seção 2.7.2.

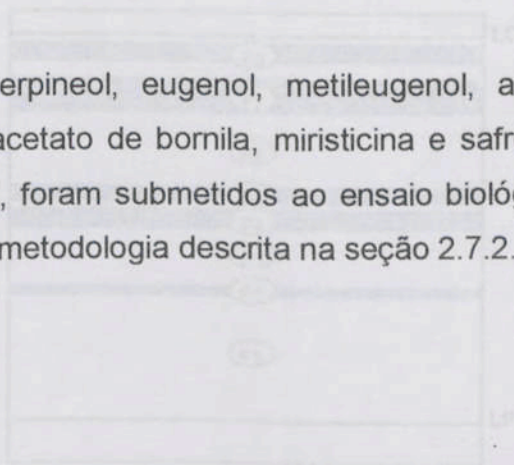


Figura 1: Esquema representativo do fracionamento do óleo essencial de noz-moscada, utilizando cromatografia em camada delgada (200 mg de óleo, 1 mm de espessura gel 60 GF₂₅₄, solvente diclorometano:hexano 8:2, v/v). F1 - fração 1; F2 - fração 2; F3 - fração 3; F4 - fração 4; F5 - fração 5; F6 - fração 6; F7 - fração 7 e F8 - fração 8. LP - linha de partida, correspondente ao ponto de aplicação do óleo essencial. LC - linha de chegada da frente de solvente.

Apenas as cinco frações reveladas sob luz ultravioleta tiveram seus fatores de retenções (R_f) e larguras longitudinais (V_L) determinados, sendo representadas

3- RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1- Extração e fracionamento do óleo essencial por cromatografia em camada delgada (CCD):

A extração de 960 g de noz-moscada produziu 68,2 g de óleo essencial, o que representa um rendimento de 7,1%.

Foram reveladas cinco frações sob luz ultravioleta (F2, F4, F5, F7 e F8), sendo observado através de cromatografia gasosa que o número de compostos no óleo essencial era superior ao encontrado nas cinco frações recuperadas das placas de cromatografia em camada delgada. Devido a isso, também foram recolhidas as regiões da cromatoplaça que não eram reveladas sob luz ultravioleta. Assim foram obtidas oito frações, enumeradas de um a oito, conforme representado na figura 1.

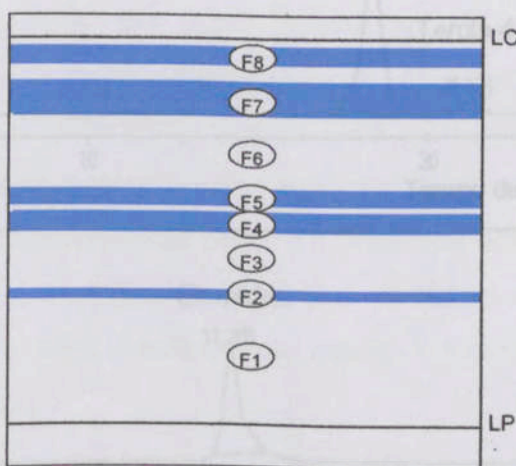


Figura 1: Esquema representativo do fracionamento do óleo essencial de noz-moscada, utilizando cromatografia em camada delgada (200 mg de óleo, 1 mm de sílica gel 60 GF₂₅₄, solvente diclorometano:hexano 8:2, v/v). F1 - fração 1; F2 - fração 2; F3 - fração 3; F4 - fração 4; F5 - fração 5; F6 - fração; F7 - fração 7 e F8 - fração 8. LP - linha de partida, correspondente ao ponto de aplicação do óleo essencial, LC - linha de chegada da frente de solvente.

Apenas as cinco frações reveladas sob luz ultravioleta tiveram seus fatores de retenções (R_f) e larguras longitudinais (W_b) determinados, sendo representadas

na figura 1 por F2 (fração 2 $R_f = 0,46$; $W_b = 0,7$ cm), F4 (fração 4 $R_f = 0,55$; $W_b = 0,9$ cm), F5 (fração 5 $R_f = 0,62$; $W_b = 1,2$ cm), F7 (fração 7 $R_f = 0,80$; $W_b = 1,4$ cm) e F8 (fração 8 $R_f = 0,93$; $W_b = 0,8$ cm).

3.2- Purificação dos compostos presentes nas frações do óleo essencial de noz-moscada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR):

Apenas a fração 2 foi processada por CLAE-FR preparativa, sendo isolado um composto que posteriormente foi identificado como elemicina (dados registrados nos cromatogramas 1 e 2, figura 2).

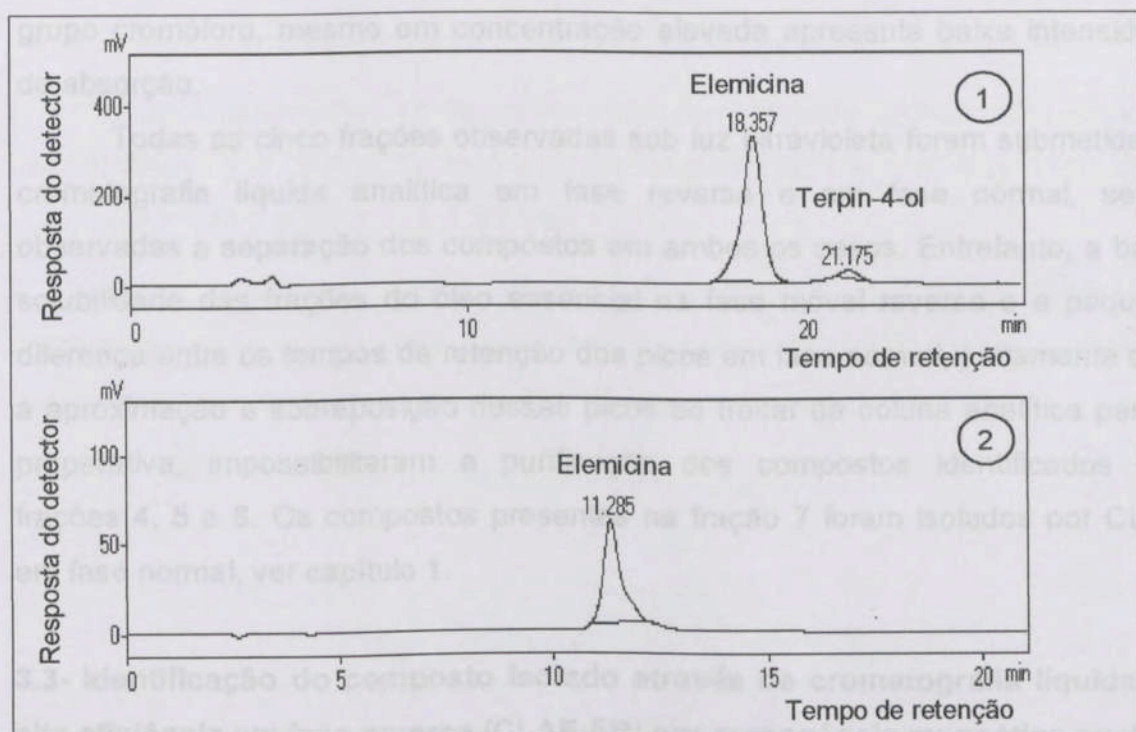


Figura 2: Cromatogramas, obtidos por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, Coluna LC-18, detector UV-VIS 230 nm, eluição isocrática de acetonitrila:água (1:1, v/v); (1) - 20 μ L da fração 2 a 1mg/mL e fluxo 0,8 mL/min. (2) - 20 μ L do composto isolado (elemicina) da fração 2 a 0,5 mg/mL e fluxo de 1,0 mL/min.

O composto recuperado corresponde ao pico principal (mais intenso) do cromatograma 1. No entanto, ao observar o cromatograma F2 da figura 9, verifica-

se que o composto isolado por CLAE-FR está presente nesta fração em menor quantidade do que o composto que não foi isolado. O composto principal desta fração foi identificado como terpin-4-ol e não foi isolado, porque ao trocar a coluna analítica LC-18 pela preparativa LC-8, usando-se a mesma fase móvel, houve uma aproximação dos picos (elemicina e terpin-4-ol) causando parcial sobreposição dos mesmos. Devido a isso foi recolhido devidamente puro apenas o primeiro composto detectado (elemicina). Elemicina é o composto que exibe maior área no cromatograma CLAE-FR porque foi utilizado o detector UV - Visível. Este detector é seletivo a compostos dotados de grupo cromóforo, e por isso, capazes de absorver energia nessa região de comprimento de onda. Elemicina apresenta anel aromático em sua estrutura, o que lhe confere elevada absorção de energia nessa região, mesmo em baixa concentração, enquanto terpin-4-ol, desprovido de grupo cromóforo, mesmo em concentração elevada apresenta baixa intensidade de absorção.

Todas as cinco frações observadas sob luz ultravioleta foram submetidas à cromatografia líquida analítica em fase reversa e em fase normal, sendo observadas a separação dos compostos em ambos os casos. Entretanto, a baixa solubilidade das frações do óleo essencial na fase móvel reversa e a pequena diferença entre os tempos de retenção dos picos em fase normal, juntamente com a aproximação e sobreposição desses picos ao trocar da coluna analítica para a preparativa, impossibilitaram a purificação dos compostos identificados nas frações 4, 5 e 8. Os compostos presentes na fração 7 foram isolados por CLAE em fase normal, ver capítulo 1.

3.3- Identificação do composto isolado através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) por ressonância magnética nuclear (RMN):

Elemicina foi isolada por CLAE-FR e identificada por ressonância magnética nuclear, com base nos dados fornecidos pelos espectros das figuras 3 a 11, anexos 1 a 8, cujos dados de hidrogênio encontram-se na tabela 1.

Tabela 1: Deslocamentos de ^1H , constante de acoplamento $^1\text{H} - ^1\text{H}$ e acoplamentos $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ observados nos espectros de ressonância magnética nuclear:

δ (H)	Atribuição	J (Hz)	Multiplicidade	HMBC	HMQC
3,27	H7	6,8	Dupleto	C4; C6; C9	C7
3,76	H11	-	Simpleto	C2	C11
3,78	H10/H12	-	Simpleto	C1; C3	C10; C12
5,02	H9	9,9	Dupleto	C7	C9
5,05	H9'	16,6	Dupleto	C7	C9
5,89	H8	16,6; 9,9; 6,8	Duplo duplo tripleto	-	-
6,34	H6/H4	-	Simpleto	C2; C4; C6; C7;	C4; C6

Foram observados os seguintes deslocamentos de carbonos no espectro de ^{13}C -RMN: δ = 39,6 (C7); 55,1 (10/12); 59,9 (C11); 104,5 (C4/6); 115,1 (C9); 134,9 (C5); 135,3 (C2); 136,3 (C8); 152,1 (C1/3).

Com base nos dados obtidos, o composto isolado é 5-*alil*-1,2,3-trimetoxibenzeno ou elemicina, cuja fórmula estrutural com a numeração usada nas atribuições dos sinais de RMN encontra-se na figura 12.

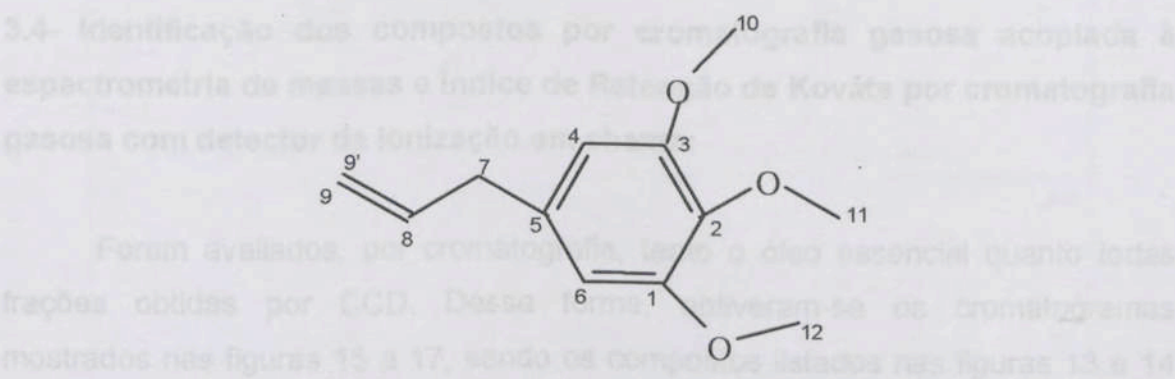


Figura 12: Estrutura da elemicina, identificada por ressonância magnética nuclear de carbono13 e hidrogênio 1; isolada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa da fração 2 obtida do óleo essencial de noz-moscada por cromatografia em camada delgada.

Os hidrogênios do grupo vinila foram identificados com base nos seguintes acoplamentos: o sinal em δ 5,89 (H8) apresentou acoplamentos de 17 Hz com o sinal em δ 5,05 (H9', *trans*), de 10,1 Hz com o sinal em δ 5,02 (H9, *cis*) e de 6,8 Hz vicinal com os hidrogênios alílicos H5, em δ 3,27. Apenas um sinal de hidrogênio aromático (δ em 6,34) foi observado. No entanto, a integral desse sinal indica a presença de dois hidrogênios equivalentes (δ 6,34; H4 e H6), sugerindo uma simetria na fórmula estrutural do composto. Essa simetria é confirmada por um sinal de metoxila aromática com integral de seis hidrogênios (δ 3,78; H10 e H12); foi observado o sinal de uma segunda metoxila aromática (δ 3,76; H11).

Os acoplamentos diretos entre carbono e hidrogênio (J^1) foram registrados por HMQC, enquanto os acoplamentos entre carbono e hidrogênio a longa distância (J^3) foram registrados por HMBC, sendo com esses dados possível determinar a estrutura da elemicina. Analisando os sinais, observou-se a presença de um anel aromático, três metoxilas e um grupo vinila, apenas dois hidrogênios aromáticos e simetria na estrutura. A atribuição dos sinais dos carbonos e hidrogênios foram obtidas relacionando seus sinais de acoplamentos. Por exemplo, o H7 está ligado no C7, tem como vizinho apenas o H8 e está a três ligações dos carbonos C4, C6 e C9, pois apresentou acoplamento $J = 6,8$ Hz (vicinal) com H8, J^1 com C7 (HMQC) e J^3 com C4, C6 e C9 (HMBC).

3.4- Identificação dos compostos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas e Índice de Retenção de Kováts por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama:

Foram avaliados, por cromatografia, tanto o óleo essencial quanto todas frações obtidas por CCD. Dessa forma, obtiveram-se os cromatogramas mostrados nas figuras 15 a 17, sendo os compostos listados nas figuras 13 e 14 identificados nas amostras do óleo essencial e das frações do óleo essencial.

Figura 14: Fórmula estrutural dos compostos identificados nas frações do óleo essencial de *NOZ-MOCCATA*, mas não identificados em 100.

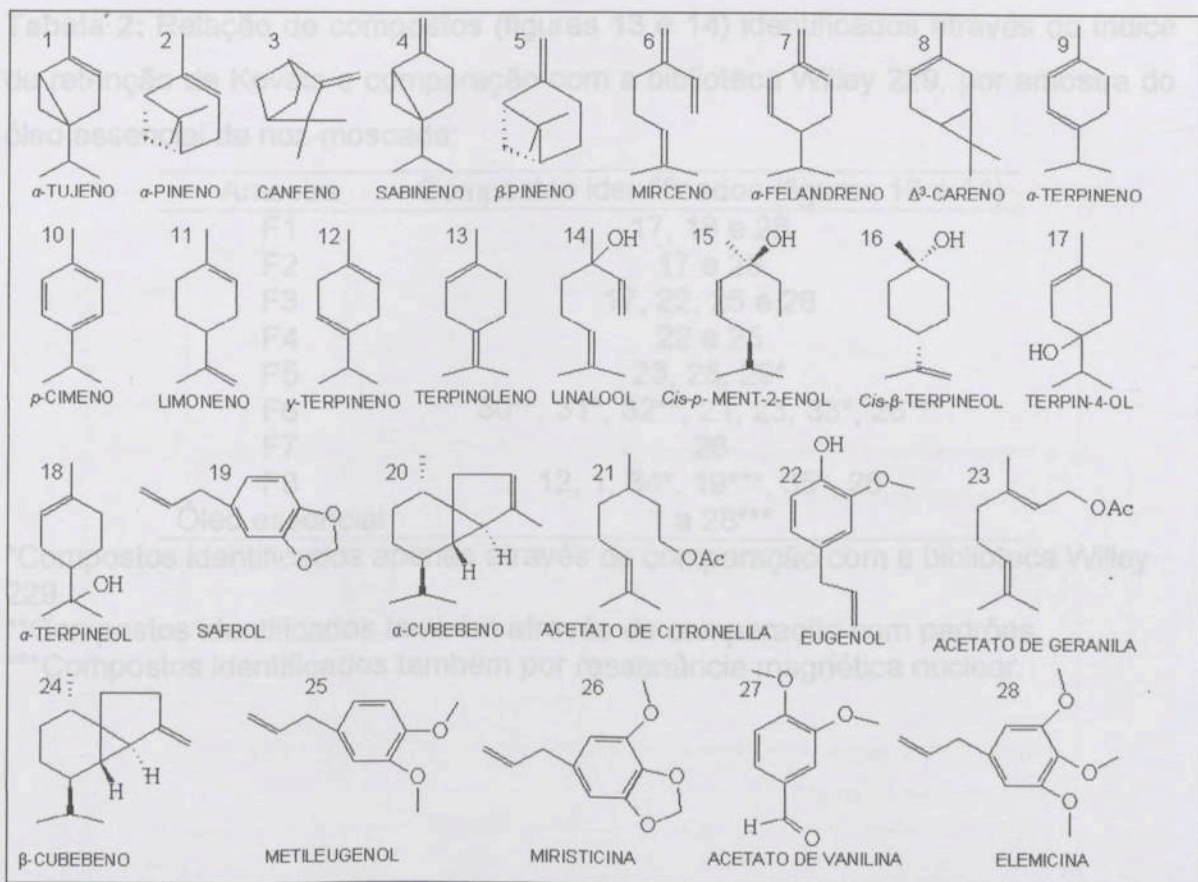


Figura 13: Fórmulas estruturais dos 28 compostos identificados no óleo essencial de noz-moscada.

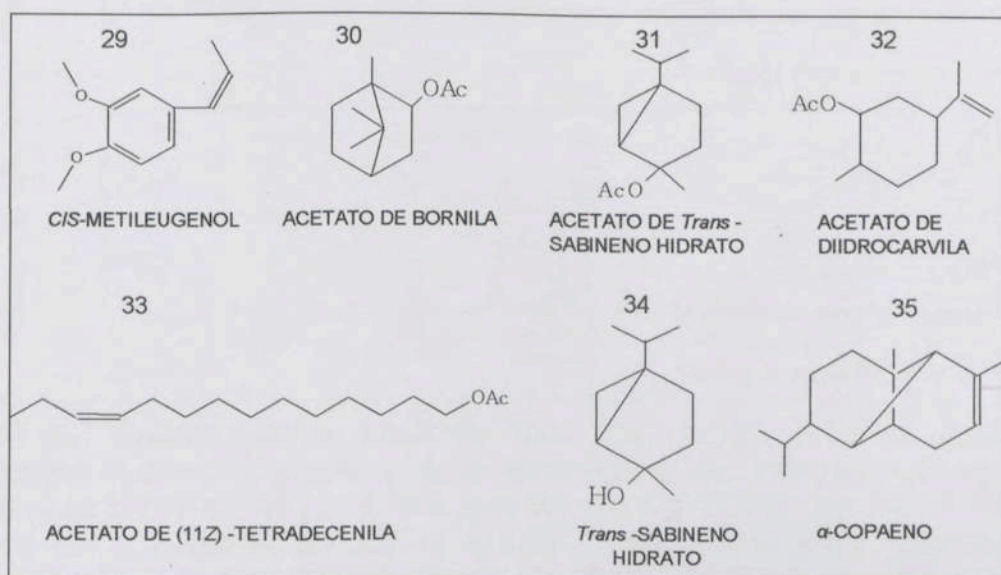


Figura 14: Fórmulas estruturais dos compostos identificados nas frações do óleo essencial de noz-moscada, mas não detectados no óleo.

Tabela 2: Relação de compostos (figuras 13 e 14) identificados através do índice de retenção de Kováts e comparação com a biblioteca Willey 229, por amostra do óleo essencial de noz-moscada:

Amostra	Compostos identificados (figuras 13 e 14)
F1	17, 18 e 28
F2	17 e 28
F3	17, 22, 25 e 28
F4	22 e 25
F5	23, 25, 29*
F6	30**, 31*, 32**, 21, 23, 33*, 26***
F7	26
F8	12, 1, 34*, 19***, 35*, 26
Óleo essencial	1 a 28***

*Compostos identificados apenas através de comparação com a biblioteca Willey 229.

**Compostos identificados também através de comparação com padrões.

***Compostos identificados também por ressonância magnética nuclear.

Figura 18: Cromatogramas totais de ions das frações (1 a 4) obtidos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Coluna DB-5, temperatura inicial 60 °C por 1 min, aumentada a 3 °C/min até 240 °C onde foi mantida por 9 min; fluxo do gás do arraste (hélio) 1,37 mL/min, temperatura do injetor 220 °C; interface 240 °C; modo de injeção Split 1:5. Concentração das amostras 1 µg/mL. Os números sobre os picos referem-se aos compostos listados na figura 13.

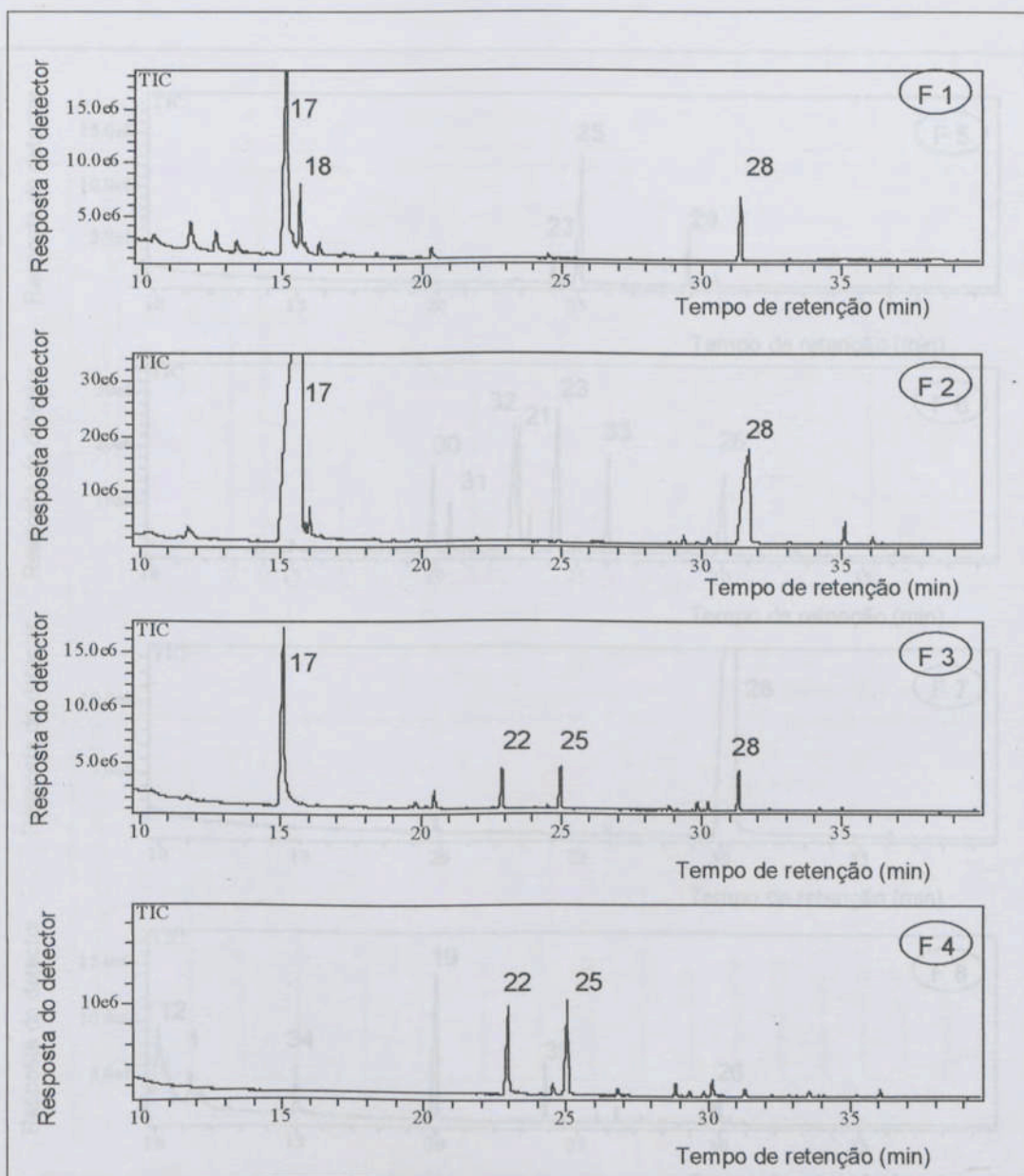


Figura 15: Cromatogramas totais de íons das frações (1 a 4) obtidos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Coluna DB-5, temperatura inicial 60 °C por 1 min, aumentada a 3 °C/min até 240 °C onde foi mantida por 9 min; fluxo do gás de arraste (hélio) 1,33 mL/min; temperatura do injetor 220 °C; interface 240 °C; modo de injeção Split 1:5. Concentração das amostras 1 mg/mL. Os números sobre os picos referem-se aos compostos listados na figura 13.

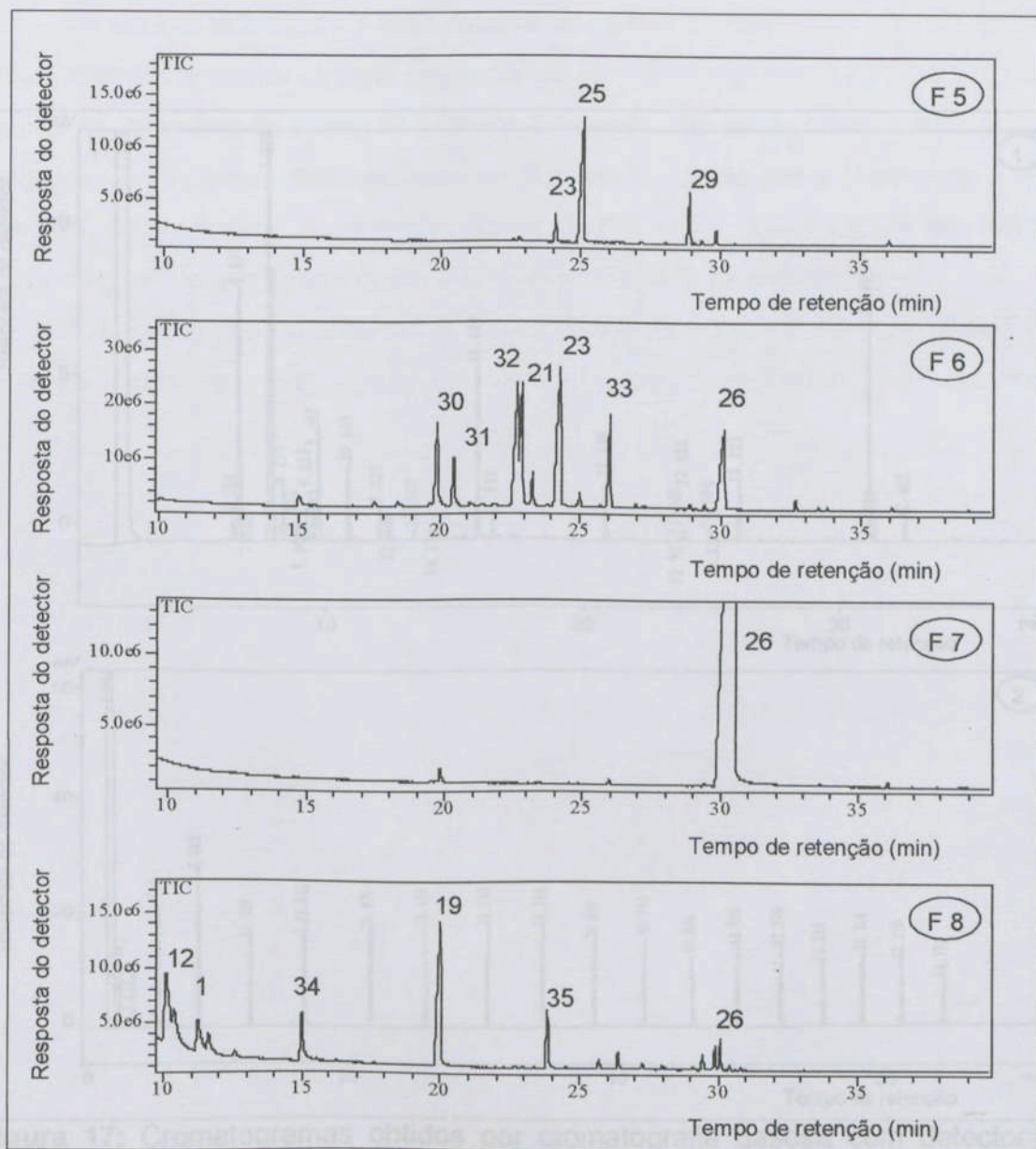


Figura 16: Cromatogramas totais de íons das frações (5 a 8) obtidos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Coluna DB-5, temperatura inicial 60 °C por 1 min, aumentada a 3 °C/min até 240 °C onde foi mantida por 9 min; fluxo do gás de arraste (hélio) 1,33 mL/min; temperatura do injetor 220 °C; interface 240 °C; modo de injeção Split 1:5. Concentração das amostras 1mg/mL. Os números sobre os picos referem-se aos compostos listados nas figuras 13 e 14.

3.5 Quantificação dos compostos isolados e/ou identificados no óleo essencial de *noz-moscada* por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama:

Os valores referentes à área relativa dos picos equivalentes aos respectivos compostos encontrados no óleo essencial de *noz-moscada* foram comparados aos

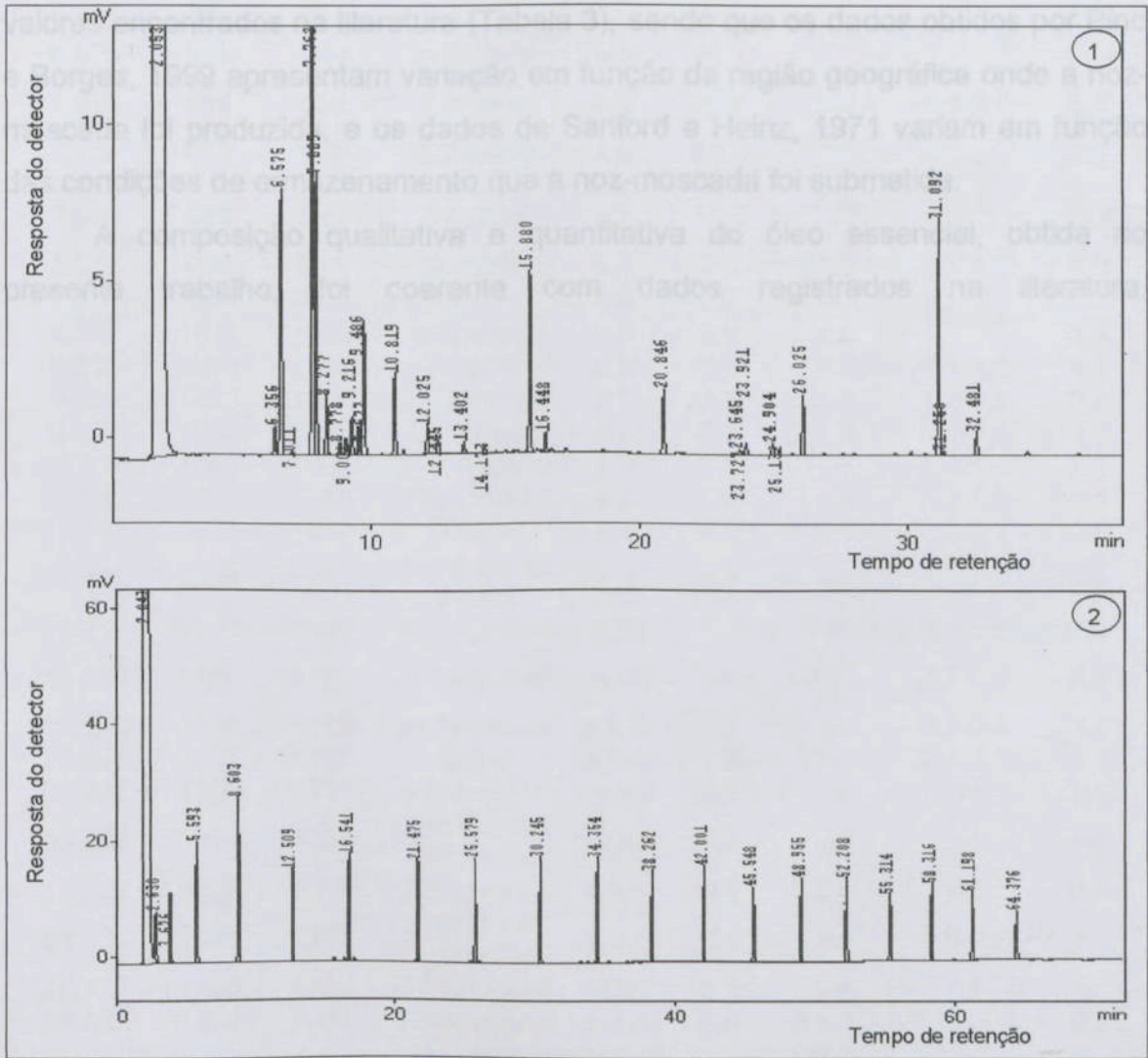


Figura 17: Cromatogramas obtidos por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama. Coluna DB-5, temperatura inicial 60°C por 1 min, aumentada a 3 °C/min até 240 °C por 9 min; fluxo do gás de arraste (N₂) 1,33 mL/min; temperatura do injetor 220 °C; temperatura do detector 240 °C; modo de injeção Split 1:1. Amostras a 1 mg/mL em diclorometano. (1) óleo essencial de *noz-moscada*; (2) padrões de hidrocarbonetos saturados com cadeia carbônica contendo de 5 a 26 átomos de carbonos.

Tabela 3: Compostos detectados no óleo essencial de noz-moscada

3.5- Quantificação dos compostos isolados e/ou identificados no óleo essencial de noz-moscada por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama:

Os valores referentes à área relativa dos picos equivalentes aos respectivos compostos encontrados no óleo essencial de noz-moscada foram comparados aos valores encontrados na literatura (Tabela 3), sendo que os dados obtidos por Pino e Borges, 1999 apresentam variação em função da região geográfica onde a noz-moscada foi produzida, e os dados de Sanford e Heinz, 1971 variam em função das condições de armazenamento que a noz-moscada foi submetida.

A composição qualitativa e quantitativa do óleo essencial, obtida no presente trabalho, foi coerente com dados registrados na literatura.

Índice de retenção			Composto	Método de identificação	Óleo de noz-moscada	Pino e Borges, 1999	Sanford e Heinz, 1971
9.001	1012	1012	α-Careno	a,b	0,2	nq	1,0-0,3
9.216	1016	1016	α-Terpineno	a,b	1,7	0,5-2,5	1,8-1,2
9.488	1027	1026	p-Cimeno	a,b	1,2	0,3-3,2	1,2-0,3
9.677	1032	1031	Limoneno	a,b	6,3	2,7-4,1	5,0-1,1
10.819	1062	1062	γ-Terpineno	a,b	3,4	nq	nd
12.025	1080	1088	Terpinoleno	a,b	1,3	nd	2,0-1,2
12.445	1088	1088	Linalol	a,b	0,6	0,2-0,9	0,3-0,3
13.402	1126	1121	Cis-p-metil-2-enol	a,b	0,5	nd	nd
14.173	1145	1144	β-Terpinenol	a,b	0,3	nq	0,1-nd
15.803	1185	1177	Terpin-4-ol	a,b	7,8	2,0-10,9	2,7-3,6
16.448	1196	1189	α-Terpinolol	a,b,c	0,8	nq	0,2-0,4
20.246	1289	1285	Safrol	a,b,d	2,6	0,1-3,2	2,1-0,3
23.546	1355	1351	α-Cubebeno	a,b	0,2	nq	nd
23.727	1357	1354	Acetato de citronelila	a,b	0,2	nq	nd
23.921	1362	1356	Eugenol	a,b,c	0,5	0,2-0,7	nd
24.604	1385	1383	Acetato de geraniol	a,b,c	0,8	nq	0,5-0,8
25.132	1390	1380	β-Cubebeno	a,b	0,3	nd	nd
26.025	1410	1401	Metileugenol	a,b,c	2,6	0,1-1,2	6,9-15,0
31.092	1522	1520	Mirsikina	a,b,d	10,9	0,5-13,5	12,1-27,1
31.250	1525	1524	Acetato de vanilina	a,b	0,2	nd	nd
32.461	1556	1554	Elemicina	a,b,d	1,0	0,3-4,5	7,2-15,5

a - Índice de relação de Kovats; b - Comparação com biblioteca Wiley 229; c - Comparação com padrões adquiridos da Aldrich; d - Ressonância magnética nuclear; nd - não detectado; nq - não quantificado.

Tabela 3: Compostos detectados no óleo essencial de noz-moscada (cromatograma 1, figura 17).

Tempo de retenção (min)	Índice de Kováts		Composto	Método de identificação	Porcentagem Relativa			
	Calculado	Adams, 1995			Óleo estudado	Pino e Borges, 1999	Sanford e Heinz, 1971	Schenk e Lamparsky, 1981
6,363	931	931	α -Tujeno	a,b	1,5	nq		0,9
6,575	939	939	α -Pineno	a,b	14,1	10,6-21,2	11,2-3,5	17,2
7,011	954	953	Canfeno	a,b	0,24	0,2-0,4	0,1-nd	0,4
7,762	977	976	Sabineno	a,b	25,0	15,4-50,7	28,3-	21,0
7,899	981	980	β -Pineno	a,b	12,4	7,8-17,7	11,0	14,8
8,277	991	991	Mirceno	a,b	2,5	0,7-2,9	4,3-0,4	1,6
8,778	1005	1005	Felandreno	a,b	0,5	0,4-3,8		1,6
9,001	1012	1012	Δ^3 Careno	a,b	0,8	nq	1,6-0,3	1,4
9,216	1019	1018	α -Terpineno	a,b	1,7	0,8-2,5	1,8-1,2	1,4
9,486	1027	1026	<i>p</i> -Cymeno	a,b	1,2	0,3-3,2	1,2-0,3	0,5
9,677	1032	1031	Limoneno	a,b	6,3	2,7-4,1	5,0-1,1	4,1
10,819	1062	1062	γ -Terpineno	a,b	3,4	nq	nd	2,1
12,025	1090	1088	Terpinoleno	a,b	1,3	nd	2,0-1,2	1,0
12,445	1098	1098	Linalool	a,b	0,6	0,2-0,9	0,3-0,3	1,0
13,402	1125	1121	<i>Cis-p</i> -ment-2-enol	a,b	0,5	nd	nd	nd
14,173	1145	1144	β -Terpineol	a,b	0,3	nq	0,1-nd	nq
15,880	1185	1177	Terpin-4-ol	a,b	7,6	2,0-10,9	2,7-3,6	6,3
16,448	1198	1189	α -Terpineol	a,b,c	0,8	nq	0,2-0,4	1,4
20,846	1289	1285	Safrol	a,b,d	2,8	0,1-3,2	2,1-3,3	3,3
23,645	1355	1351	α -Cubebeno	a,b	0,2	nq	nd	nq
23,727	1357	1354	Acetato de citronelila	a,b	0,2	nq	nd	nq
23,921	1362	1356	Eugenol	a,b,c	0,5	0,2-0,7	nd	0,3
24,904	1385	1383	Acetato de geranila	a,b,c	0,6	nq	0,6-0,8	nd
25,132	1390	1390	β -Cubebeno	a,b	0,3	nd	nd	nq
26,025	1410	1401	Metileugenol	a,b,c	2,6	0,1-1,2	6,9-15,0	0,3
31,092	1522	1520	Miristicina	a,b,d	10,9	0,5-13,5	12,1-27,1	14,0
31,250	1525	1524	Acetato de vanilina	a,b	0,2	nd	nd	nd
32,481	1556	1554	Elemicina	a,b,d	1,0	0,3-4,6	7,2-15,5	nq

a - Índice de retenção de Kováts. b - Comparação com biblioteca Willey 229. c - Comparação com padrões adquiridos da Aldrich. d - Ressonância magnética nuclear. nd - não detectado. nq - não quantificado.

3.2.4. Apesar dos elevados teores, os compostos sabineno, α -pineno, β -pineno e limoneno não foram detectados nas frações obtidas por cromatografia em camada delgada, tendo sido possivelmente perdidos por volatilização ainda no óleo, pois o óleo essencial extraído (em janeiro de 2004) foi armazenado em dois frascos iguais de cor âmbar em freezer. Um dos frascos foi mantido intacto, sendo o outro utilizado para fazer os ensaios e o fracionamento por cromatografia. Com isso, o segundo frasco foi aberto e permaneceu à temperatura ambiente inúmeras vezes em que foi retirado do freezer. O fato é que, ao analisar o óleo dos dois frascos após 18 meses de armazenamento (em agosto de 2005), observou-se que no óleo usado nos ensaios “poison food” e fracionamento por cromatografia (representado no cromatograma da figura 28 capítulo 1), a presença dos compostos com menores tempos de retenções é insignificante se comparada com os mesmos compostos no óleo essencial que não teve sua embalagem violada (representado no cromatograma 1 da figura 17, capítulo 2). A hipótese de volatilização está de acordo com os dados de Sanford e Heinz, 1971 (tabela 3), que também registraram decomposição desses compostos na noz-moscada em função do armazenamento da mesma, sendo que o primeiro teor foi obtido no início do armazenamento da noz-moscada e o segundo teor ao final do período de avaliação. Sanford e Heinz também observaram que os teores dos compostos 1 a 16 na noz-moscada diminuem com o tempo de armazenagem, enquanto os compostos 17 a 28 aumentam.

3.6- Avaliação da atividade antifúngica:

3.6.1- Efeito do óleo essencial de noz-moscada sobre os fungos:

O óleo essencial avaliado pela técnica “poison food” inibiu parcialmente o desenvolvimento de todos os seis fungos, ou seja, todos os fungos foram sensíveis à presença do óleo no meio de cultura, em todas as concentrações (0,1; 0,3 e 0,5%) avaliadas. Observou-se um comportamento característico por gênero, sendo a ordem crescente de tolerância: *Colletotrichum*, *Fusarium* e *Aspergillus*. No sexto dia de avaliação os fungos apresentaram a seguinte ordem crescente de resistência, considerando a média de inibição das três concentrações: *C. gloeosporioides*, *C. musae*, *F. semitectum*, *F. oxysporum*, *A. glaucus* e *A. niger*, conforme mostrado na figura 18.

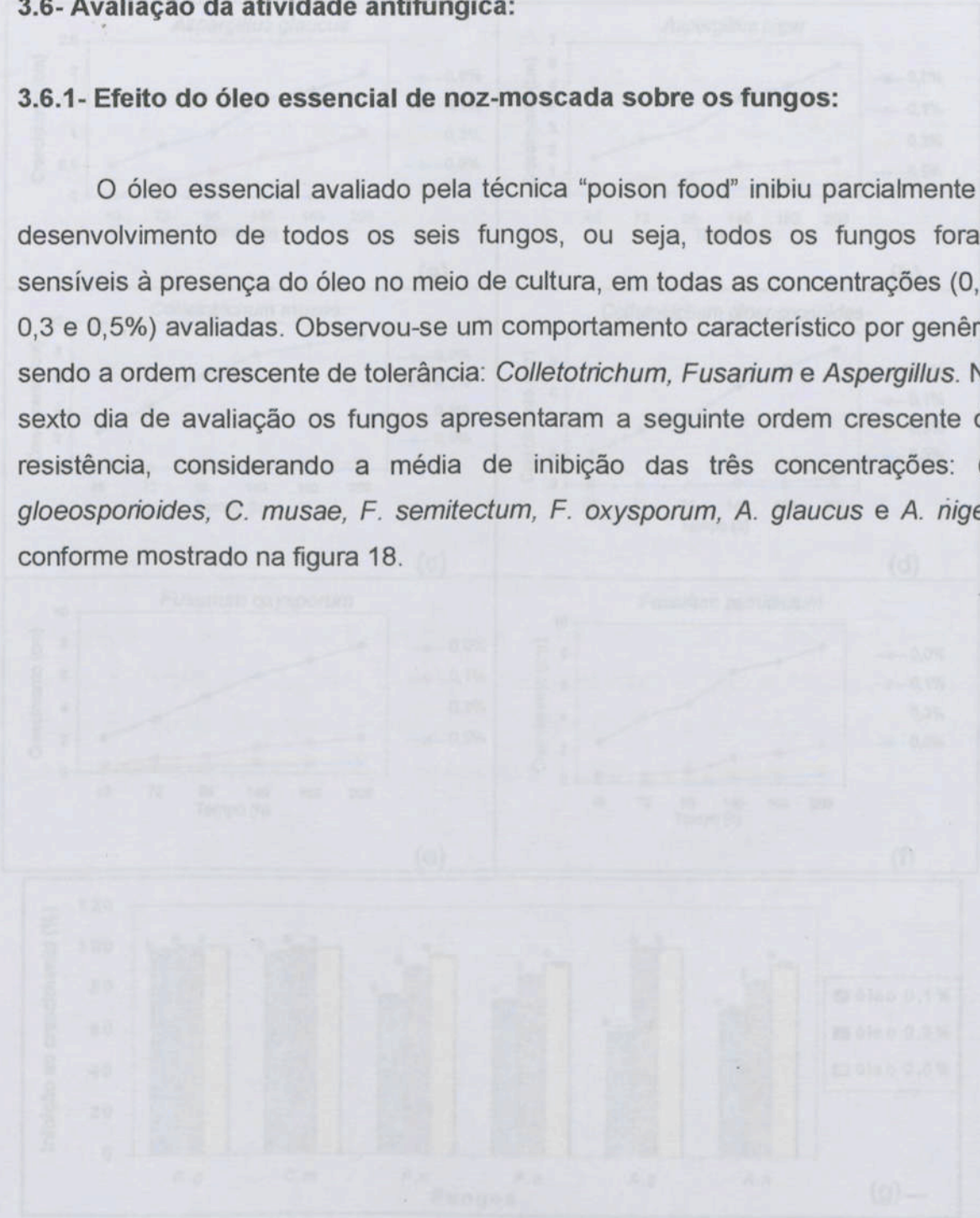


Figura 18: (a), (b), (c), (d), (e) e (f) - Crescimento médio dos fungos no ensaio “poison food” com o óleo essencial a 0,0 (controle); 0,1; 0,3 e 0,5% (v/v). (g) - Inibição ao crescimento radial dos fungos, avaliada no 6º dia para o óleo essencial de noz-moscada a 0,1; 0,3 e 0,5%. Cg = *Colletotrichum gloeosporioides*, Cm = *C. musae*, Fs = *Fusarium semitectum*, Fo = *F. oxysporum*, Ag = *Aspergillus glaucus* e An = *A. niger*. As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$). As barras (f) indicam desvio padrão.

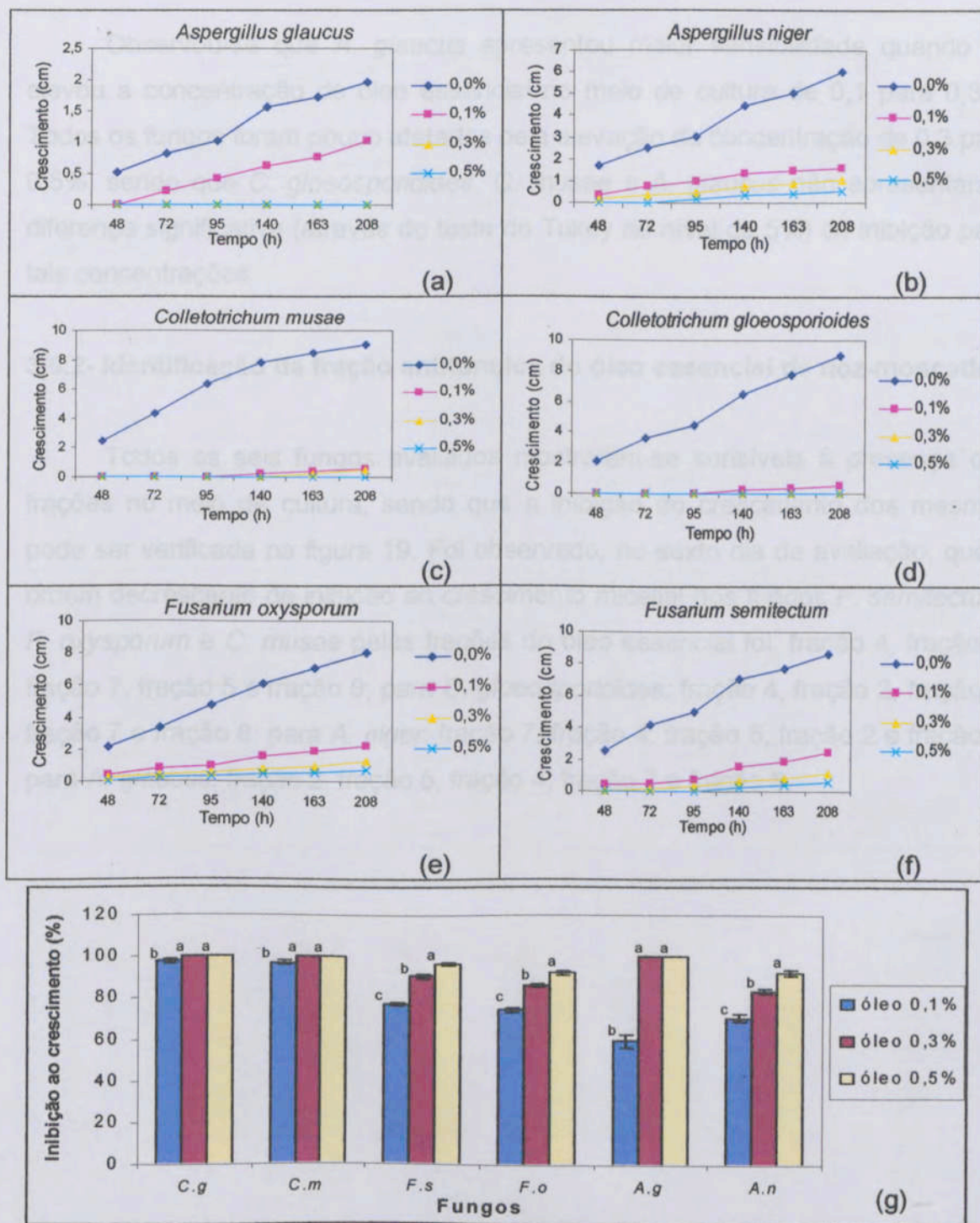


Figura 18: (a), (b), (c), (d), (e) e (f) - Crescimento médio dos fungos no ensaio "poison food" com o óleo essencial a 0,0 (testemunha); 0,1; 0,3 e 0,5% (v/v). (g) - Inibição ao crescimento radial dos fungos, avaliada no 6º dia para o óleo essencial de noz-moscada a 0,1; 0,3 e 0,5%. Cg = *Colletotrichum gloeosporioides*, Cm = *C. musae*, Fs = *Fusarium semitectum*, Fo = *F. oxysporum*, Ag = *Aspergillus glaucus* e An = *A. niger*. As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$). As barras (l) indicam desvio padrão.

Observou-se que *A. glaucus* apresentou maior sensibilidade quando se elevou a concentração de óleo essencial no meio de cultura de 0,1 para 0,3%. Todos os fungos foram pouco afetados pela elevação da concentração de 0,3 para 0,5%, sendo que *C. gloeosporioides*, *C. musae* e *A. glaucus* não apresentaram diferença significativa (através do teste de Tukey ao nível de 5%) de inibição para tais concentrações.

3.6.2- Identificação da fração antifúngica do óleo essencial de noz-moscada:

Todos os seis fungos avaliados mostraram-se sensíveis à presença das frações no meio de cultura, sendo que a inibição ao crescimento dos mesmos pode ser verificada na figura 19. Foi observado, no sexto dia de avaliação, que a ordem decrescente de inibição ao crescimento micelial dos fungos *F. semitectum*, *F. oxysporum* e *C. musae* pelas frações do óleo essencial foi: fração 4, fração 2, fração 7, fração 5 e fração 8; para *C. gloeosporioides*: fração 4, fração 2, fração 5, fração 7 e fração 8; para *A. niger*: fração 7, fração 4, fração 5, fração 2 e fração 8; para *A. glaucus*: fração 2, fração 5, fração 4, fração 7 e fração 8.

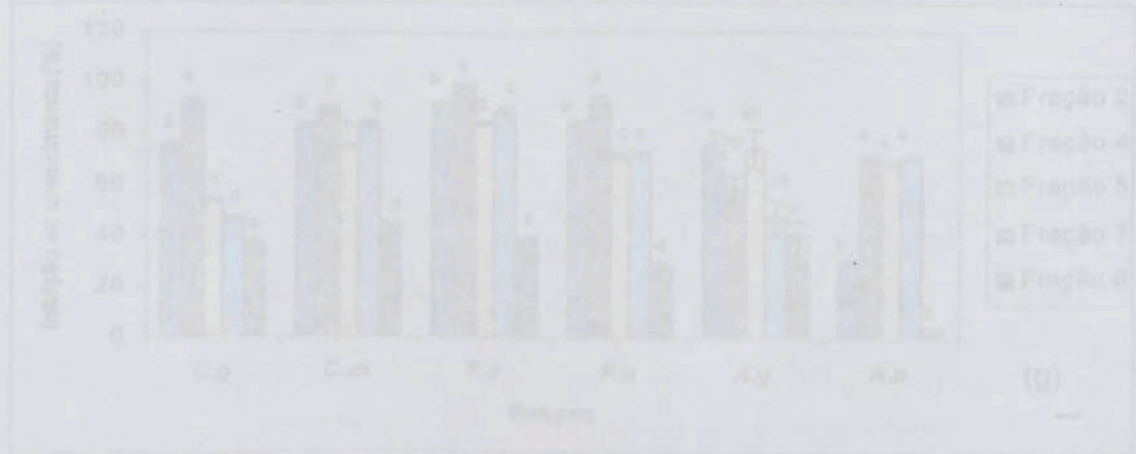


Figura 19: (a), (b), (c), (d), (e) e (f) - Crescimento médio dos fungos no meio "poison food" com as frações 2, 4, 5, 7 e 8 do óleo essencial a 0,1% (v/v) e pela testemunha (Te). (g) - Inibição ao crescimento micelial dos fungos, avaliada no 6º dia para as frações 2, 4, 5, 7 e 8 do óleo essencial de noz-moscada a 0,1%. Cg = *Colletotrichum gloeosporioides*, Cm = *C. musae*, Fs = *Fusarium semitectum*, Fo = *F. oxysporum*, Ag = *Aspergillus glaucus* e An = *A. niger*. As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$). As barras (l) indicam desvio padrão.

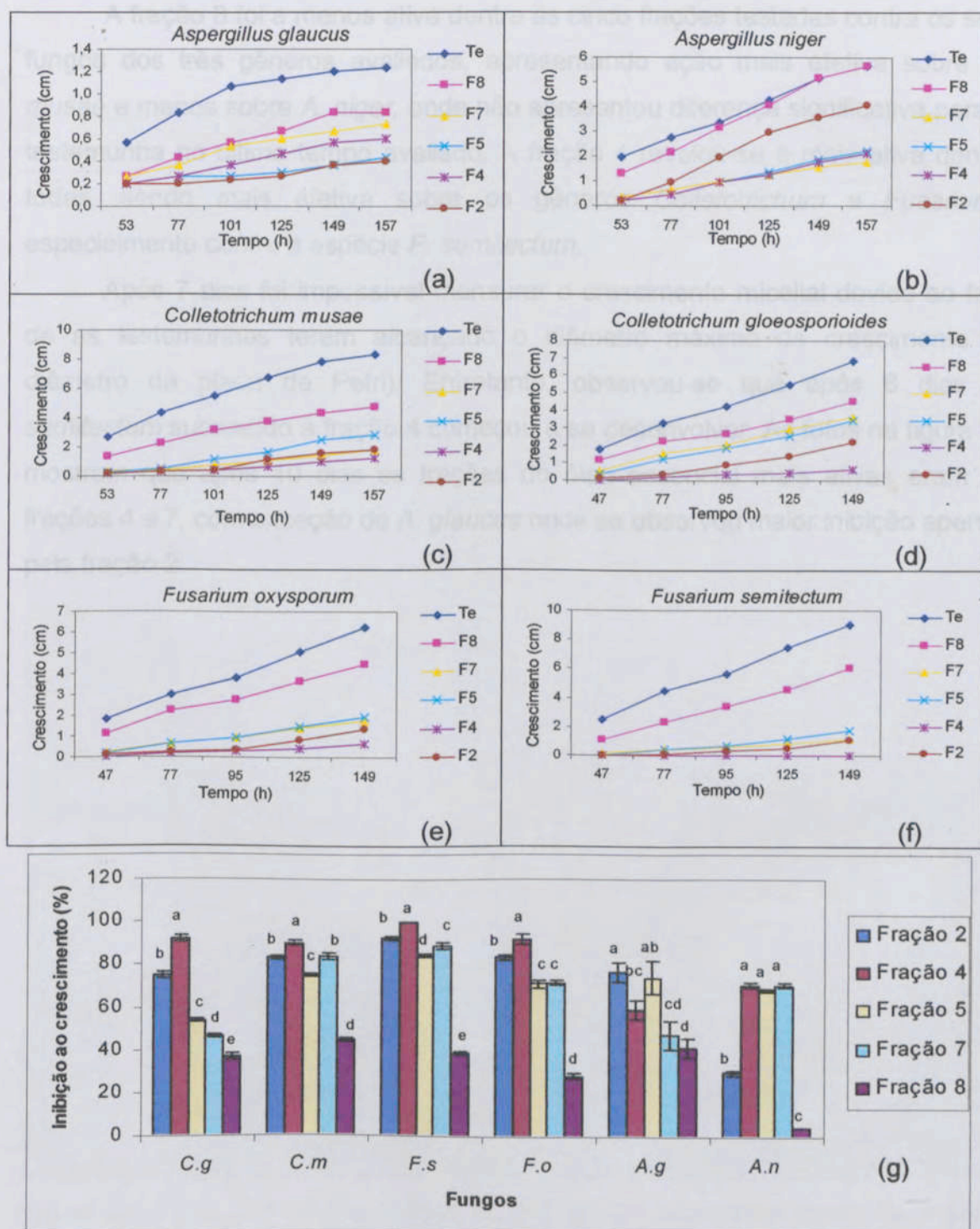


Figura 19: (a), (b), (c), (d), (e) e (f) - Crescimento médio dos fungos no ensaio "poison food" com as frações 2, 4, 5, 7 e 8 do óleo essencial, a 0,1% (v/v) e pela testemunha (Te). (g) - Inibição ao crescimento radial dos fungos, avaliada no 6º dia para as frações 2, 4, 5, 7 e 8 do óleo essencial de noz-moscada a 0,1%. Cg = *Colletotrichum gloeosporioides*, Cm = *C. musae*, Fs = *Fusarium semitectum*, Fo = *F. oxysporum*, Ag = *Aspergillus glaucus* e An = *A. niger*. As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$). As barras (l) indicam desvio padrão.

A fração 8 foi a menos ativa dentre as cinco frações testadas contra os seis fungos dos três gêneros avaliados, apresentando ação mais efetiva sobre *C. musae* e menos sobre *A. niger*, onde não apresentou diferença significativa para a testemunha no último tempo avaliado. A fração 4 revelou-se a mais ativa dentre todas, sendo mais efetiva sobre os gêneros *Colletotrichum* e *Fusarium*, especialmente contra a espécie *F. semitectum*.

Após 7 dias foi impossível mensurar o crescimento micelial devido ao fato de as testemunhas terem alcançado o diâmetro máximo de crescimento (o diâmetro da placa de Petri). Entretanto, observou-se que após 8 dias *F. semitectum* submetido à fração 4 começou a se desenvolver. As fotos na figura 20 mostram que após 10 dias as frações do óleo essencial mais ativas eram as frações 4 e 7, com exceção de *A. glaucus* onde se observou maior inibição apenas pela fração 2.



Figura 20: Fotos dos fungos obtidas no 10º dia de acompanhamento do ensaio "poison food" para as cinco frações do óleo essencial reveladas sob luz ultravioleta, obtidas por cromatografia em camada delgada. Reação entre desenvolvimento dos fungos e frações do óleo essencial no meio de cultura a 0,1%. *A. glaucus* (Ag), *A. niger* (An), *C. musae* (Ca), *C. gloeosporioides* (Cg), *F. oxysporum* (Fo) e *F. semitectum* (Fs). Todas as fotos seguem a seguinte sequência de tratamento: Testemunha (Te); fração 8 (F8); fração 7 (F7); fração 5 (F5); fração 4 (F4) e fração 2 (F2). Sendo as placas grandes de 9 cm de diâmetro e as pequenas 6 cm.

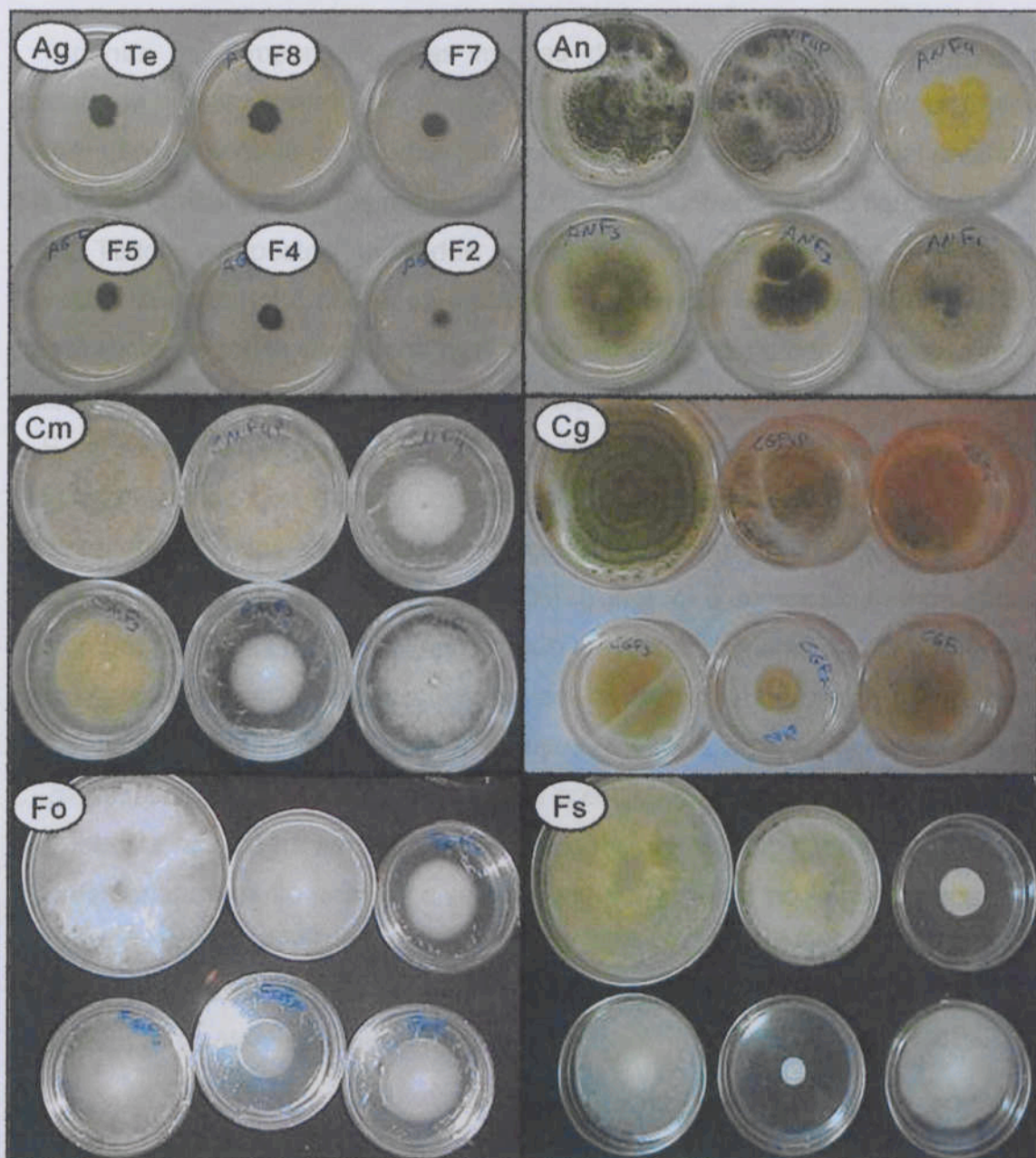


Figura 20: Fotos dos fungos obtidas no 10º dia de acompanhamento do ensaio "poison food" para as cinco frações do óleo essencial reveladas sob luz ultravioleta, obtidas por cromatografia em camada delgada. Relação entre desenvolvimento dos fungos e frações do óleo essencial no meio de cultura a 0,1%: *A. glaucus* (Ag), *A. niger* (An), *C. musae* (Cm), *C. gloeosporioides* (Cg), *F. oxysporum* (Fo) e *F. semitectum* (Fs). Todas as fotos seguem a seguinte seqüência de tratamento: Testemunha (Te); fração 8 (F8); fração 7 (F7); fração 5 (F5); fração 4 (F4) e fração 2 (F2). Sendo as placas grandes de 9 cm de diâmetro e as pequenas 6 cm.

3.6.3- Identificação dos compostos antifúngicos do óleo essencial de noz-moscada:

Apenas os componentes das frações do óleo essencial de noz-moscada acetato de bornila, acetato de diidrocarvila, safrol, miristicina, eugenol, α -terpineol, metileugenol e acetato de geranila foram avaliados quanto ao potencial antifúngico a 0,1% de concentração. Os resultados obtidos encontram-se nas figuras 21 a 23.

Todos compostos avaliados inibiram o crescimento dos seis fungos. Contudo, eugenol foi o que apresentou maior potencial fungicida inibindo 100% o crescimento de todos os fungos avaliados, sendo por isso considerado o melhor antifúngico, seguido por α -terpineol que inibiu 100% *A. glaucus*, *A. niger*, *C. musae* e *F. semitectum*. Além desses, metileugenol e miristicina apresentam-se bons fungicidas, sendo que o primeiro inibiu 100% o crescimento de *C. musae* e *A. glaucus*, e a miristicina apresentou inibição média entre 73 e 88% para todos os fungos, com exceção de *A. glaucus* (27%). Safrol foi o composto menos eficiente no combate aos seis fungos, apresentando crescimento médio na última avaliação para *A. glaucus* e *A. niger* superior ao da testemunha. Acetato de bornila apresentou a menor inibição para *A. glaucus* (3%) e *A. niger* (4%), entretanto para *C. gloeosporioides* suprimiu em 76% seu crescimento. Os acetatos de geranila e diidrocarvila não seguiram um padrão de potencial de inibição, sendo que seus valores variaram muito para os diversos fungos. O menor potencial de acetato de geranila foi contra *A. niger* (7%) e o maior contra *C. gloeosporioides* (87%). No caso do acetato de diidrocarvila, o menor potencial foi contra *A. niger* (7%) e o maior contra *C. gloeosporioides* (85%).

Figura 21: (a), (b), (c), (d), (e), e (f) - Crescimento médio dos fungos no meio "poison food" com os compostos a 0,1% e pela testemunha (Ta); (g) - Inibição ao crescimento radial dos fungos, avaliada no 1º dia para os compostos: acetato de bornila (AB), acetato de diidrocarvila (AD), eugenol (E), acetato de geranila (AG), metileugenol (ME), miristicina (M), safrol (S) e α -terpineol (T), a 0,1%. Cg = *Colletotrichum gloeosporioides*, Cm = *C. musae*, Fs = *Fusarium semitectum*, Fa = *F. cryocorum*, Ag = *Aspergillus glaucus* e An = *A. niger*. As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$). As barras (l) indicam desvio padrão.

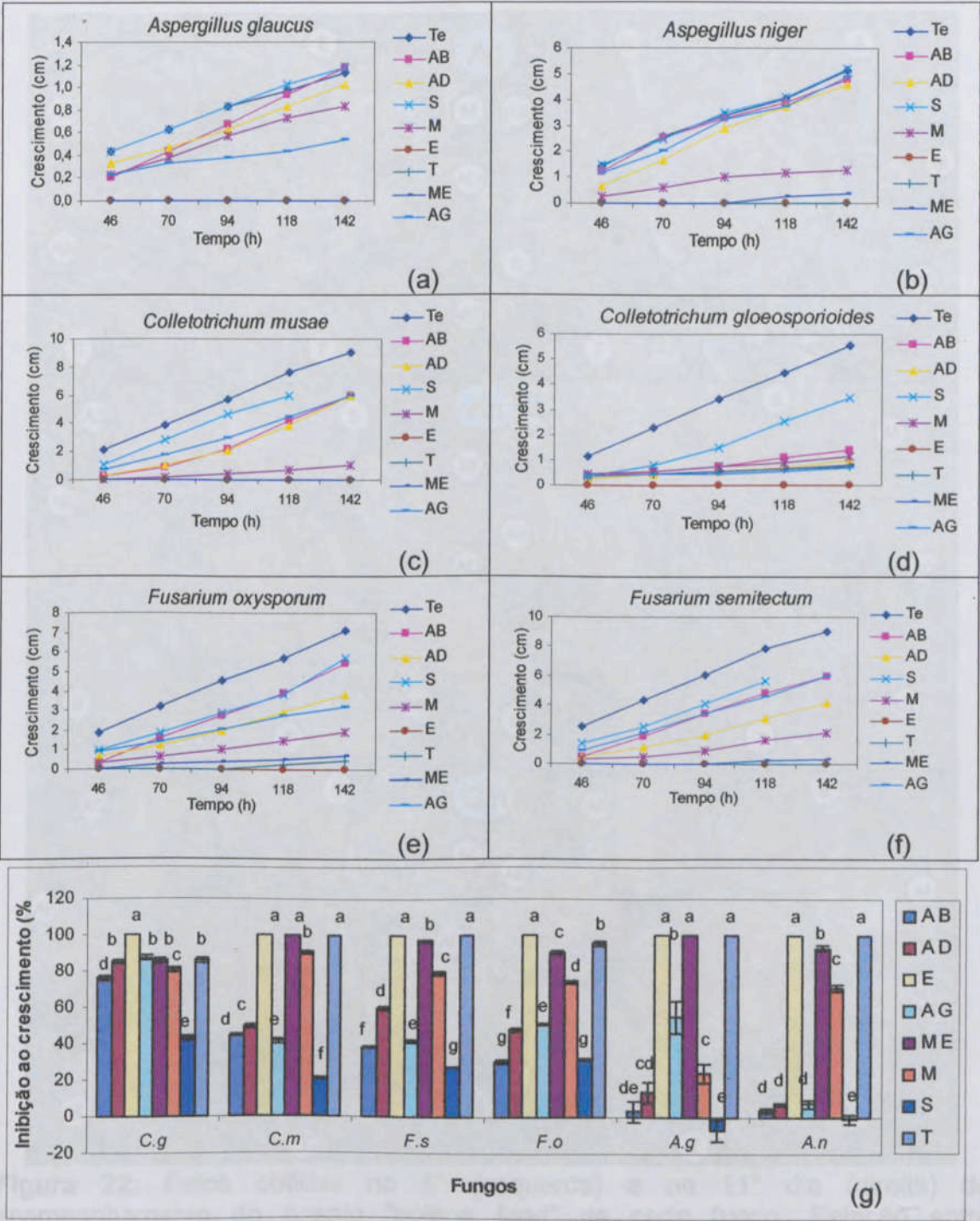


Figura 21: (a), (b), (c), (d), (e) e (f) - Crescimento médio dos fungos no ensaio "poison food" com os compostos a 0,1% e pela testemunha (Te). (g) - Inibição ao crescimento radial dos fungos, avaliada no 5º dia para os compostos: acetato de bornila (AB), acetato de diidrocarvila (AD), eugenol (E), acetato de geranila (AG), metileugenol (ME), miristicina (M), safrol (S) e α -terpineol (T), a 0,1%. Cg = *Colletotrichum gloeosporioides*, Cm = *C. musae*, Fs = *Fusarium semitectum*, Fo = *F. oxysporum*, Ag = *Aspergillus glaucus* e An = *A. niger*. As médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ($P \geq 0,05$). As barras (l) indicam desvio padrão.

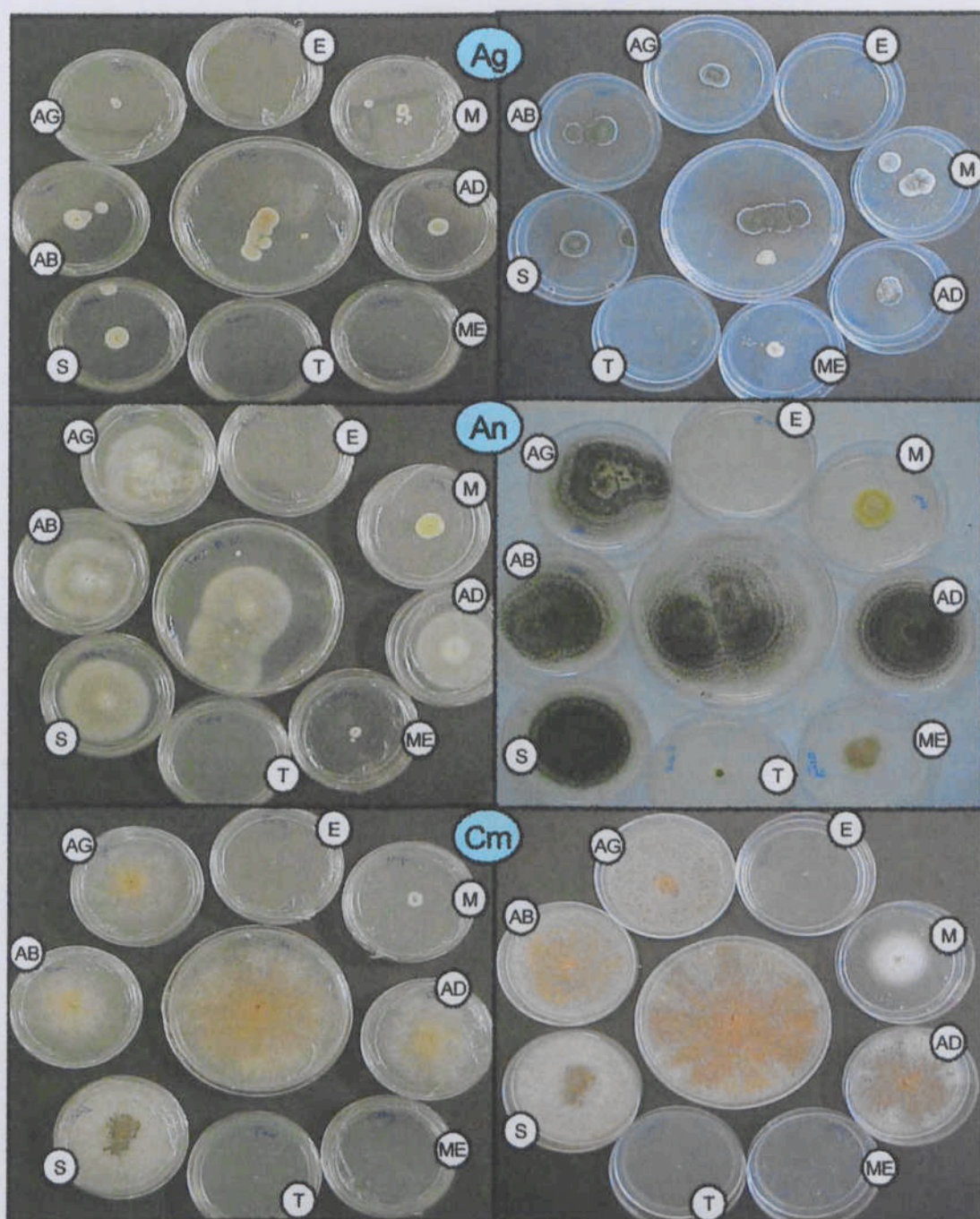


Figura 22: Fotos obtidas no 5º (esquerda) e no 11º dia (direita) de acompanhamento do ensaio "poison food" de cada fungo. Relação entre desenvolvimento dos fungos: (Ag) *Aspergillus glaucus*, (An) *Aspergillus niger*, (Cm) *Colletotrichum musae*, e compostos identificados nas frações de óleo essencial a 0,1%. Sendo as placas grandes de 9 cm de diâmetro e as pequenas 6 cm. A placa central é a testemunha, E = eugenol, M = miristicina, AD = acetato de diidrocarvila, ME = metileugenol, T = α -terpineol, S = safrol, AB = acetato de bornila e AG = acetato de geranila.

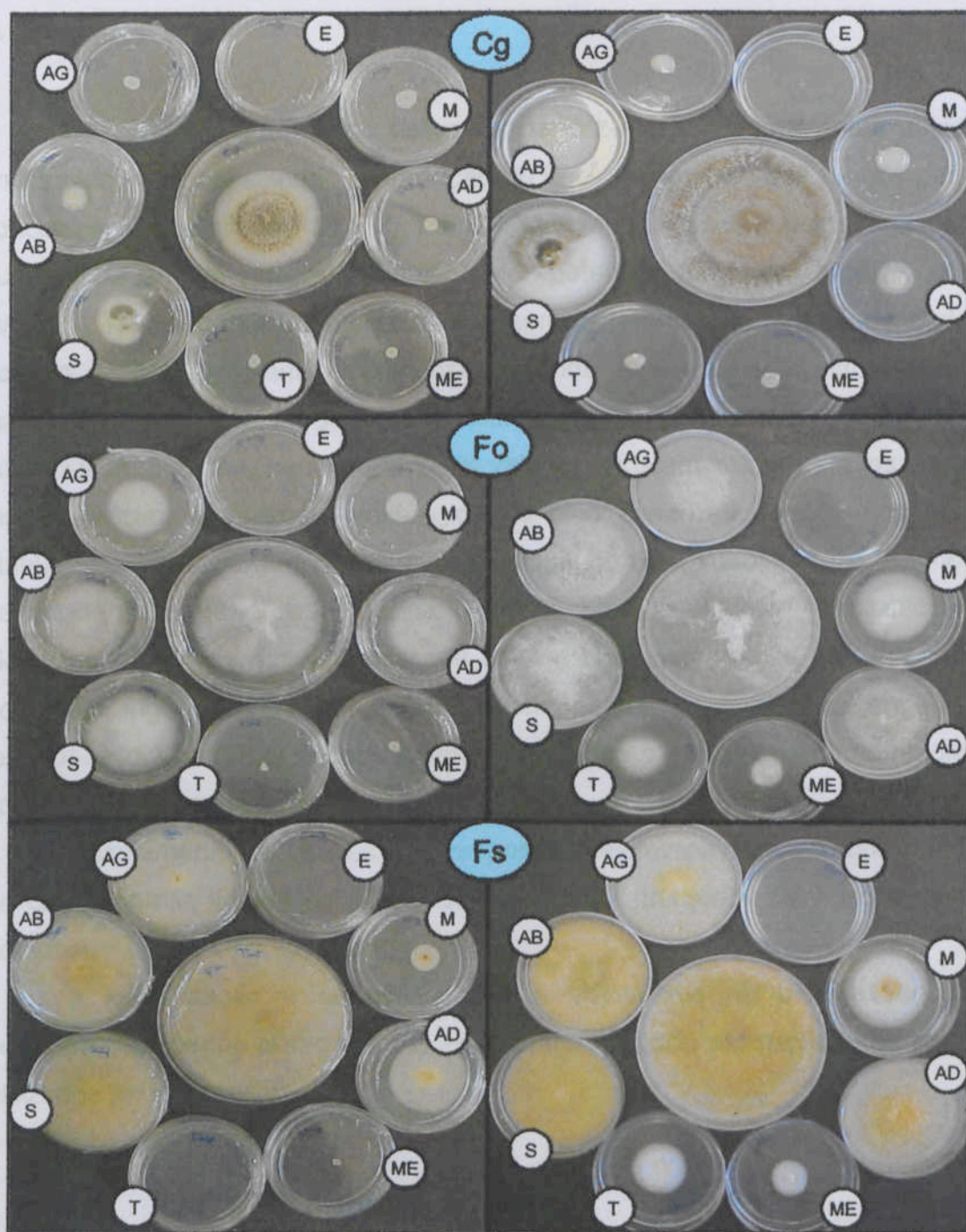


Figura 23: Fotos obtidas no 5º (esquerda) e no 11º dia (direita) de acompanhamento do ensaio "poison food" de cada fungo. Relação entre desenvolvimento dos fungos: (Cg) *Colletotrichum gloeosporioides*, (Fo) *Fusarium oxysporum* e (Fs) *F. semitectum*, e compostos identificados nas frações de óleo essencial a 0,1%. Sendo as placas grandes de 9 cm de diâmetro e as pequenas 6 cm. A placa central é a testemunha, E = eugenol, M = miristicina, AD = acetato de diidrocarvila, ME = metileugenol, T = α -terpineol, S = safrol, AB = acetato de bornila e AG = acetato de geranila.

4- CONCLUSÕES

Observou-se que o óleo essencial de noz-moscada apresentou atividade antifúngica, com capacidade de redução do desenvolvimento dos fungos para as concentrações avaliadas (0,1; 0,3 e 0,5%). Dentre os compostos testados, o eugenol foi aquele que apresentou maior potencial fungicida, seguido por α -terpineol, metileugenol e miristicina, que apresentaram bons resultados. Safrol e acetato de bornila foram os compostos menos eficientes no controle aos seis fungos. Os acetatos de geranila e diidrocarvila não seguiram um padrão de potencial de inibição, sendo que seus valores variaram muito para os diversos fungos. Assim, a atividade antifúngica do óleo essencial de noz-moscada foi atribuída, principalmente, à presença de eugenol, α -terpineol, 4-alil-1,2-dimetoxibenzeno (metileugenol) e miristicina. Segundo Stein *et al.*, 2001, a miristicina e a elemicina presentes em noz-moscada sofrem biotransformação em anfetaminas ao serem ingeridas, sendo, portanto alucinógenas. Logo, apenas eugenol, α -terpineol e metileugenol poderiam ser eficientemente explorados como fungicidas contra os seis fungos aqui avaliados.

O isolamento de apenas um composto, a elemicina, mostrou que a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência não foi adequada para isolamento de compostos desse óleo essencial.

A identificação e quantificação dos compostos no óleo essencial foi coerente com dados já registrados em literatura, sendo satisfatórios os métodos utilizados neste trabalho.

Figura 3: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, com as integrais de intensidade dos sinais e constantes de acoplamento (J), da elemicina isolada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa de ligação 2 obtida do óleo essencial de noz-moscada por cromatografia em camada delgada.

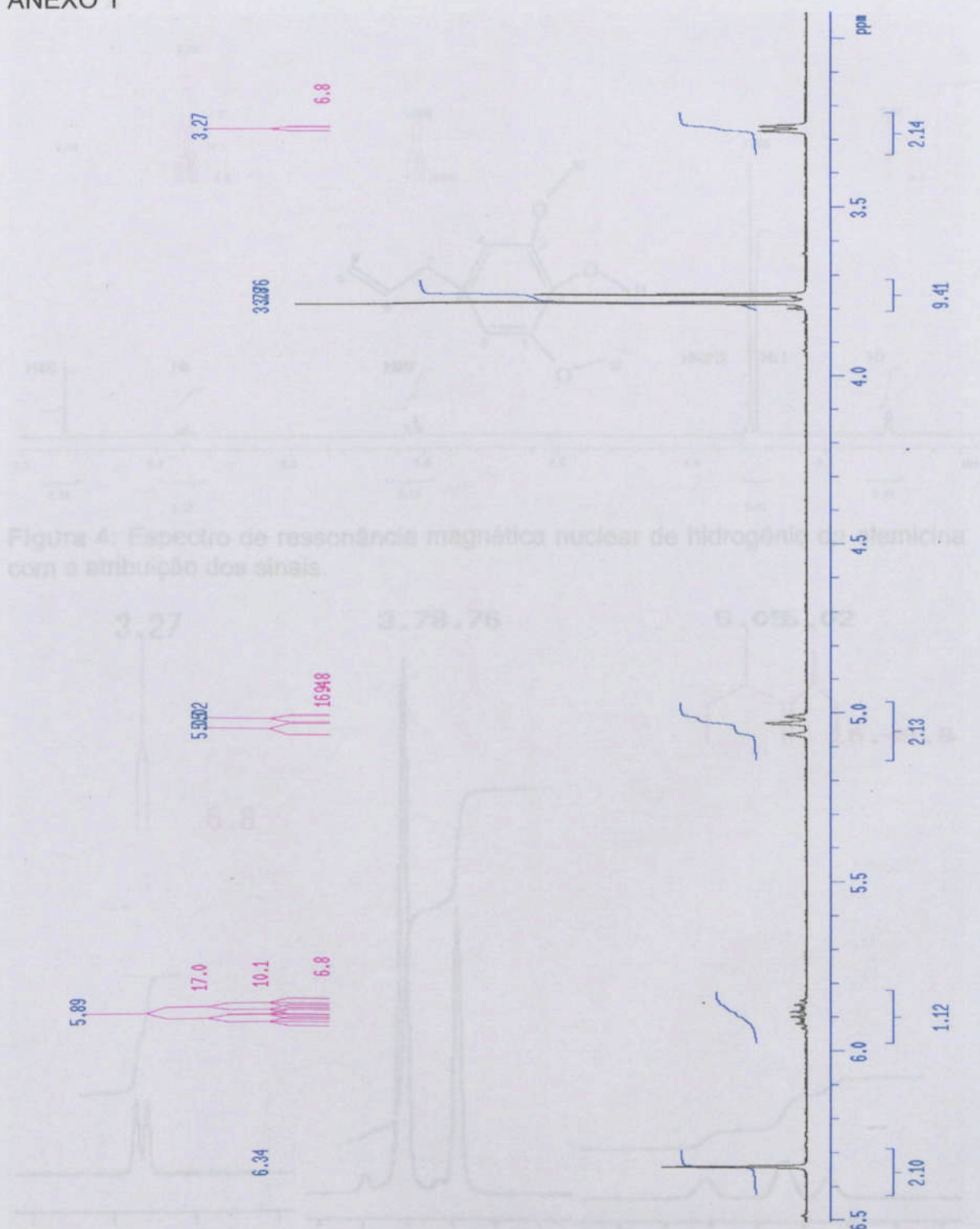


Figura 3: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio, com as integrais de intensidade dos sinais e constantes de acoplamento (J), da elemicina isolada por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa da fração 2 obtida do óleo essencial de noz-moscada por cromatografia em camada delgada.

ANEXO 2

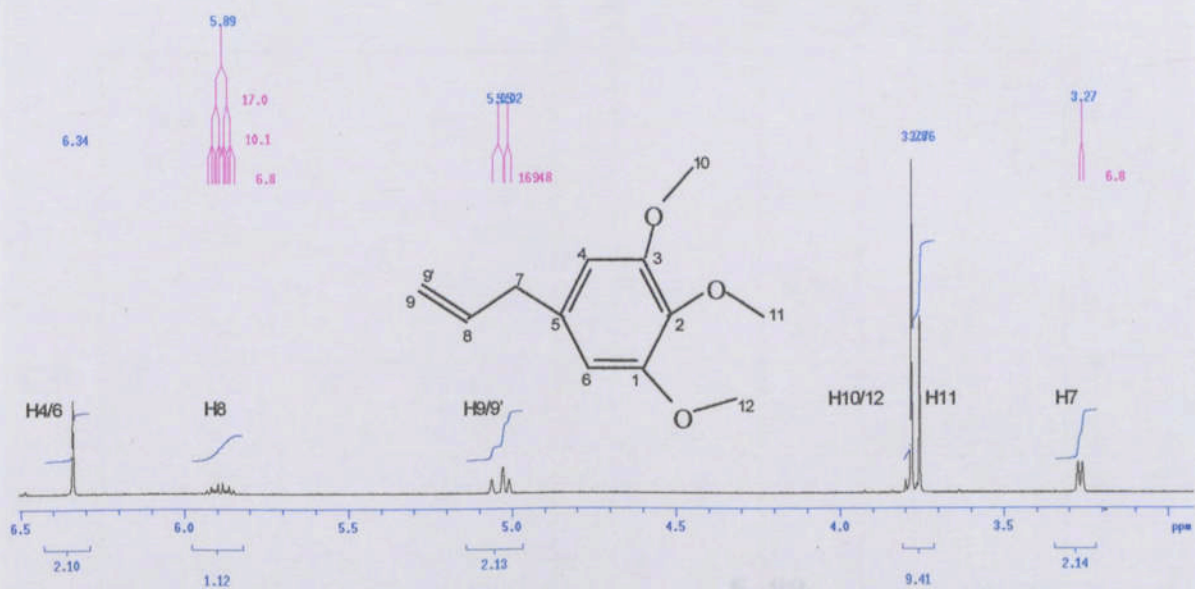


Figura 4: Espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio da elemicina com a atribuição dos sinais.

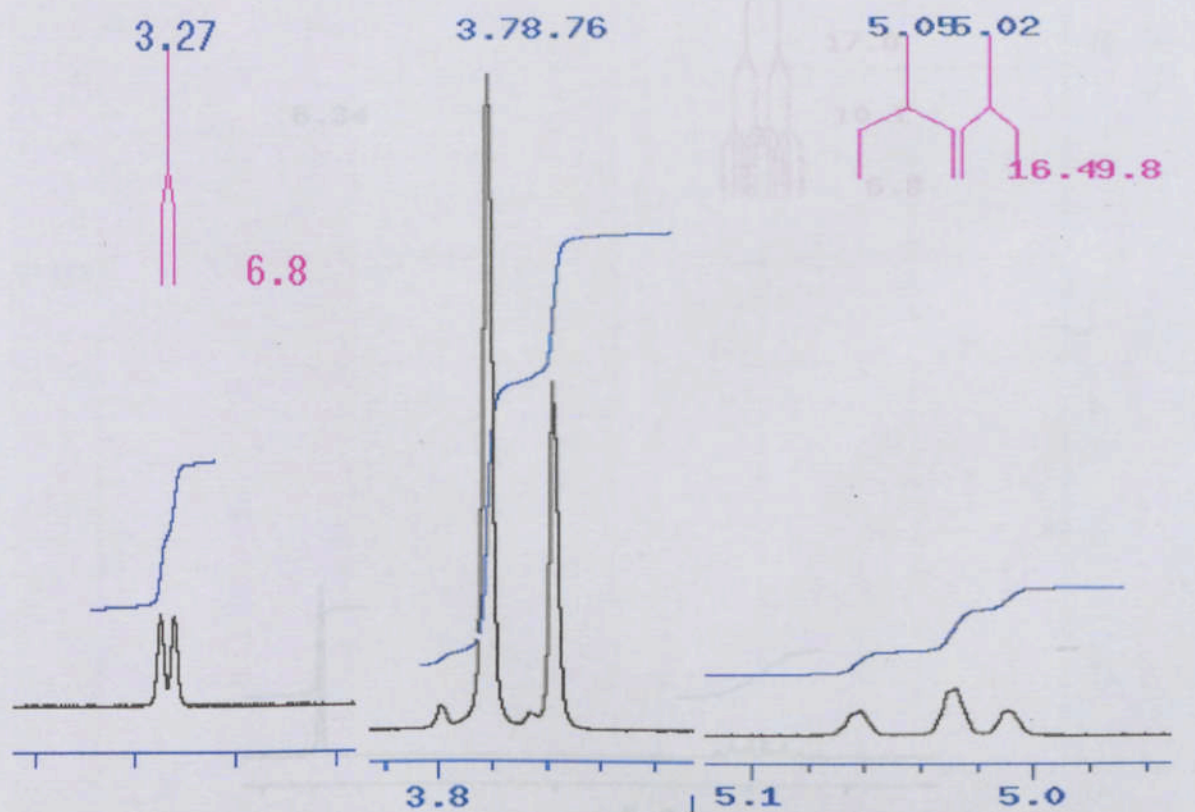


Figura 5: Ampliação dos sinais dos hidrogênios H7 (δ 3,27), H11 (δ 3,76), H10 e H12 (δ 3,78), H9 (δ 5,02) e H9' (δ 5,05) registrados no espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio da elemicina.

ANEXO 3

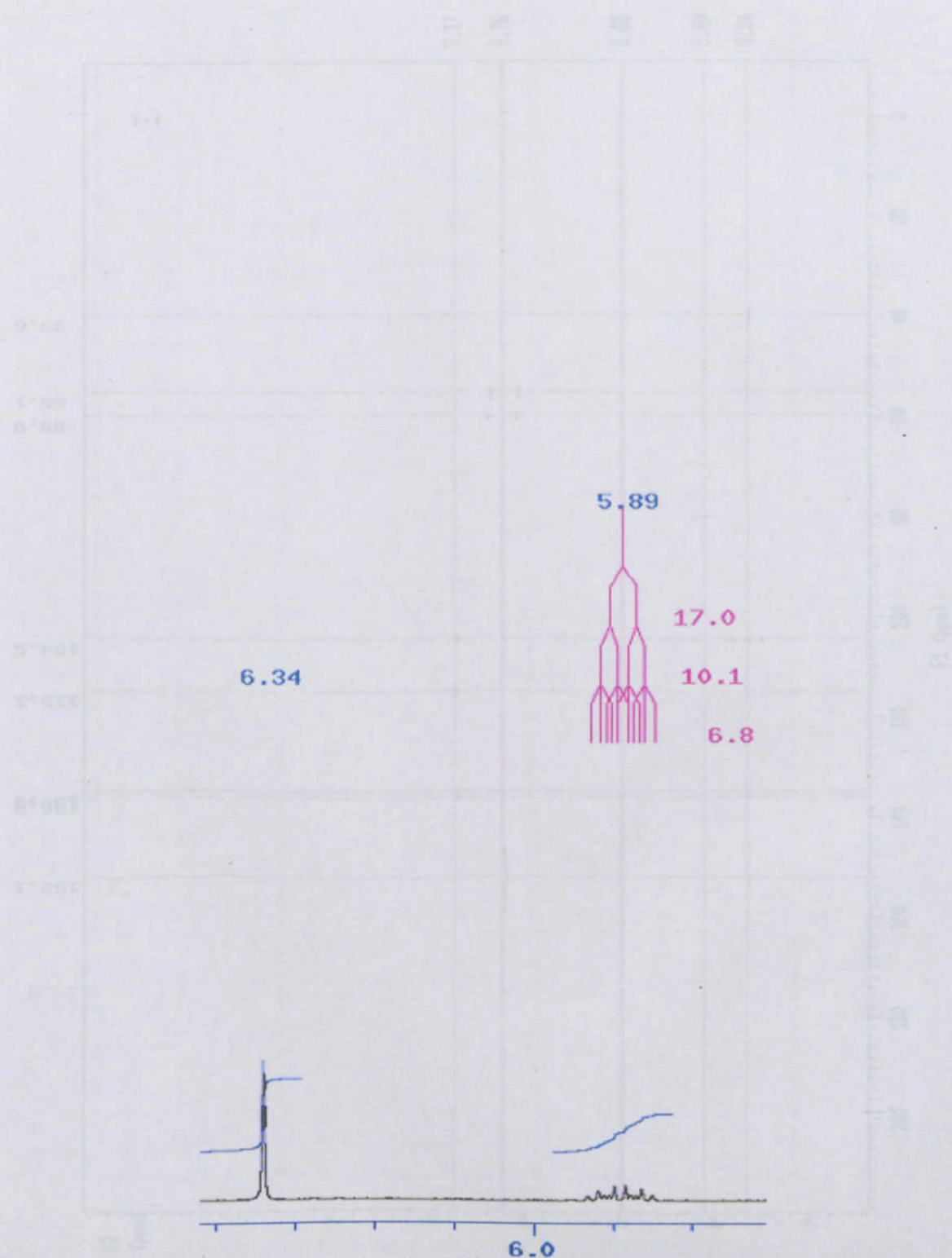


Figura 6: Ampliação dos sinais dos hidrogênios H8 (δ 5,89), H4 e H6 (δ 6,34) registrados no espectro de ressonância magnética nuclear de hidrogênio da elemicina.

ANEXO 4

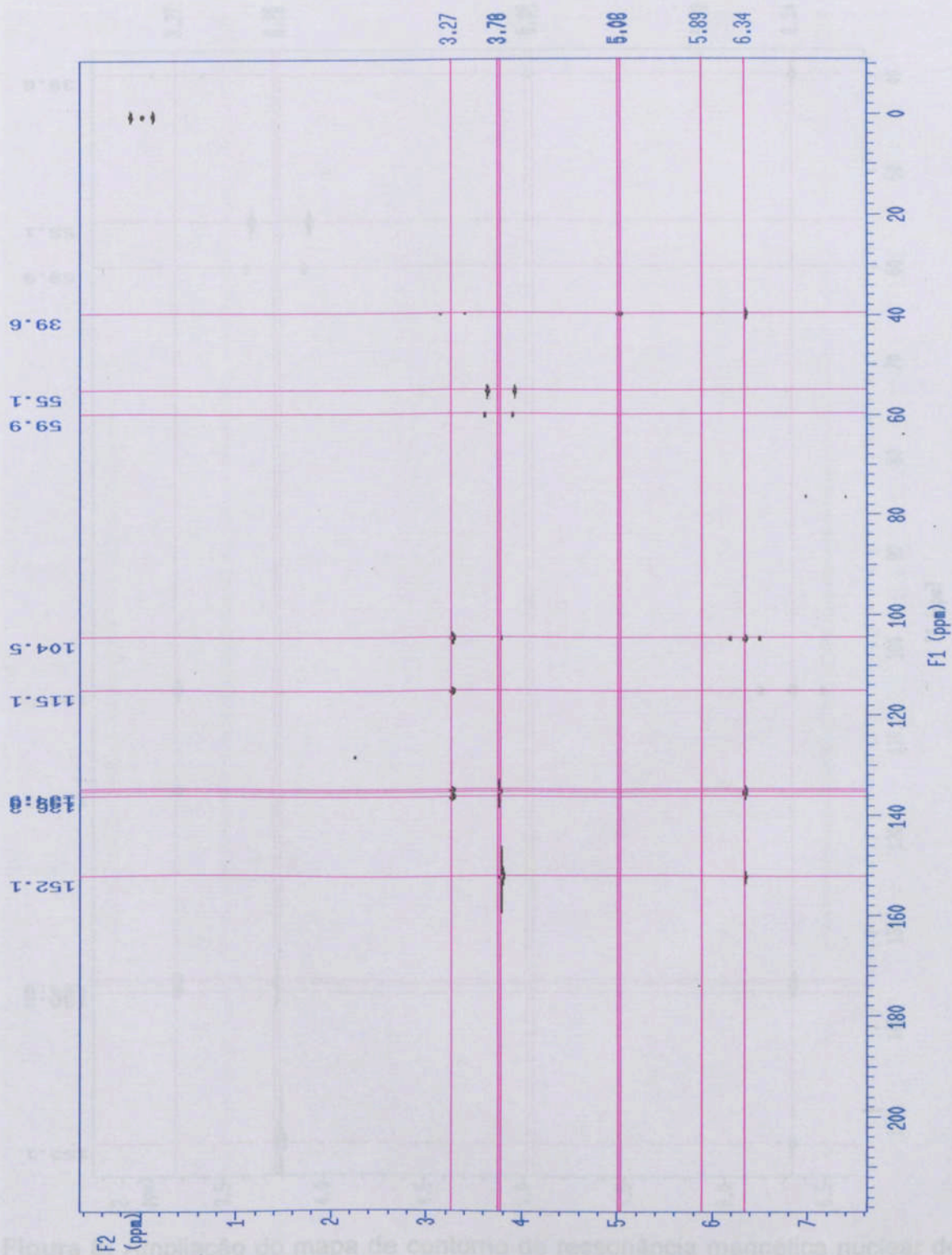


Figura 7: Mapa de contorno de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, HMBC, da elemicina, com os deslocamentos e acoplamentos entre hidrogênios e carbonos.

ANEXO 5

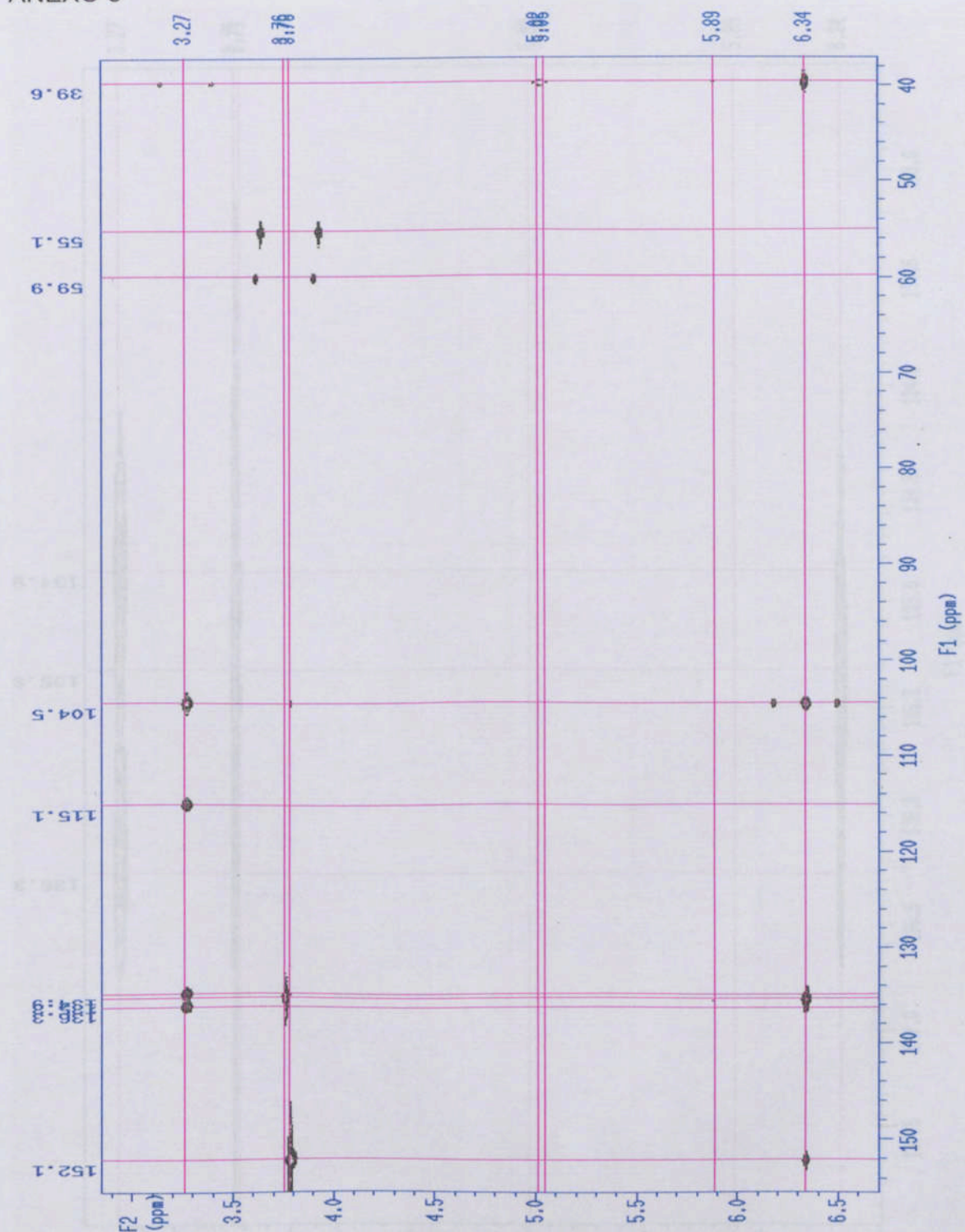


Figura 8: Ampliação do mapa de contorno de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, HMBC, da elemicina, com os deslocamentos e acoplamentos entre hidrogênios e carbonos.

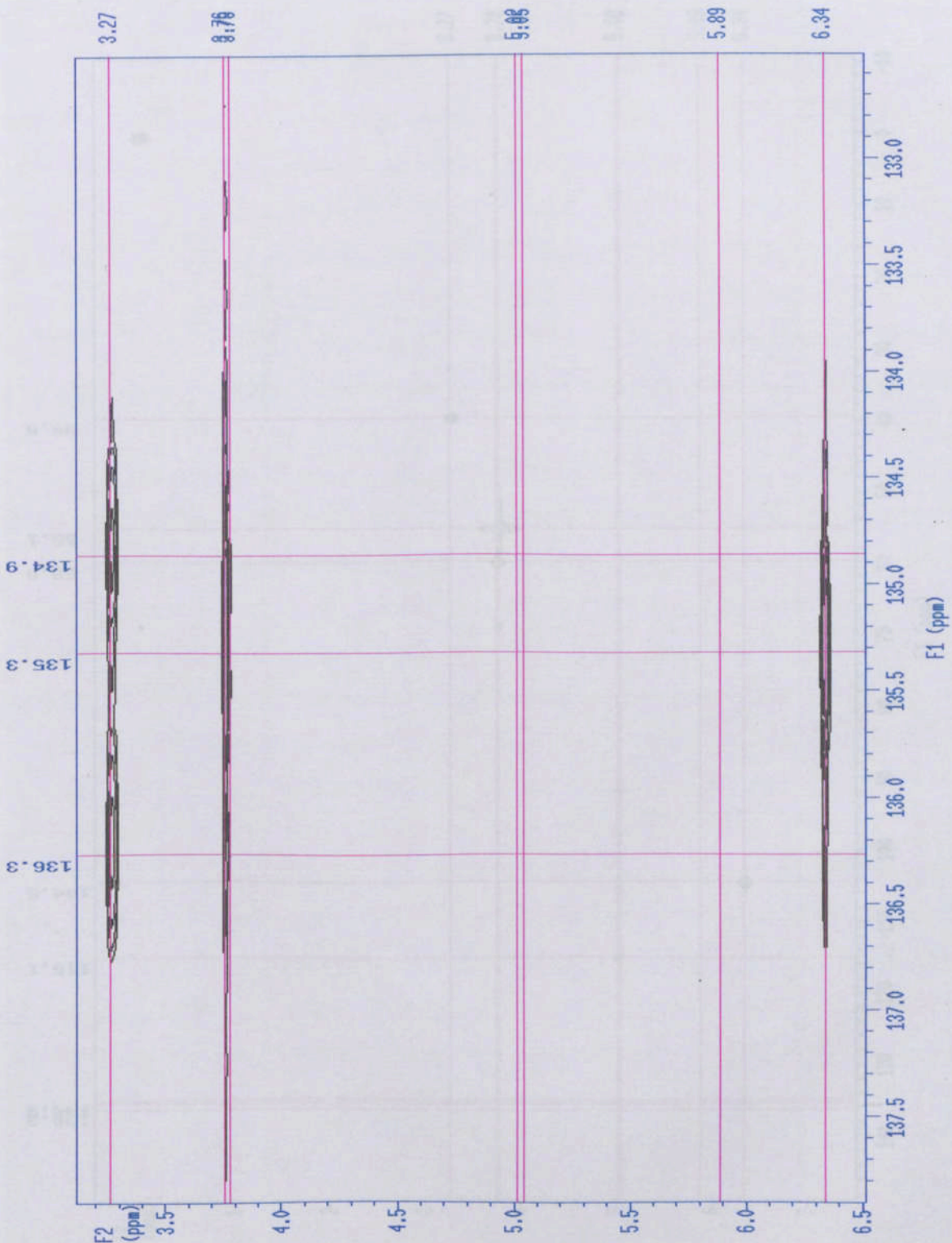


Figura 9: Ampliação parcial de sinais do mapa de contorno de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, HMBC, da elemicina, com os deslocamentos e acoplamentos entre hidrogênios e carbonos.

ANEXO 7

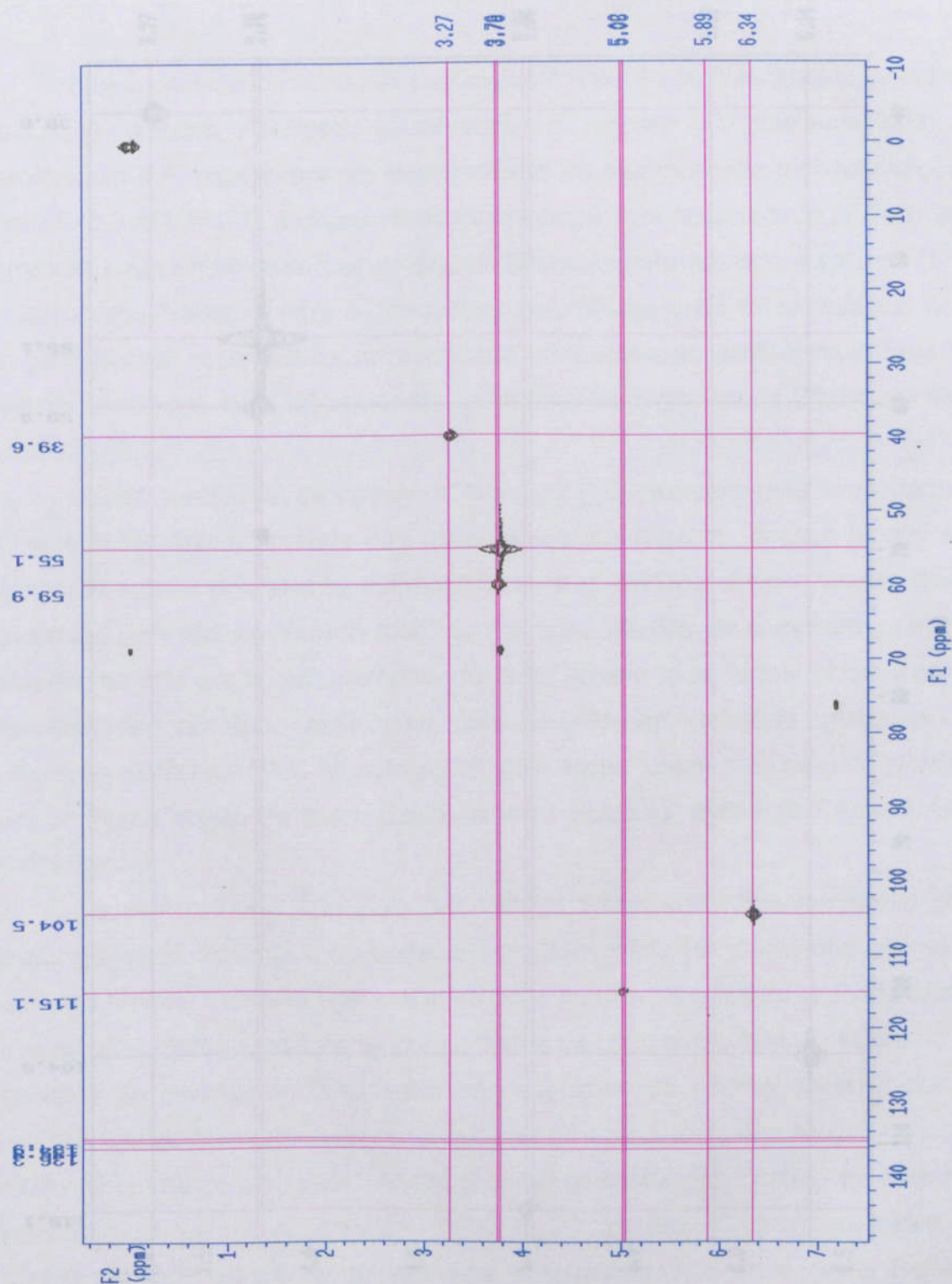


Figura 10: Mapa de contorno de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, HMQC, da elemicina, com os deslocamentos e acoplamentos entre hidrogênios e carbonos.

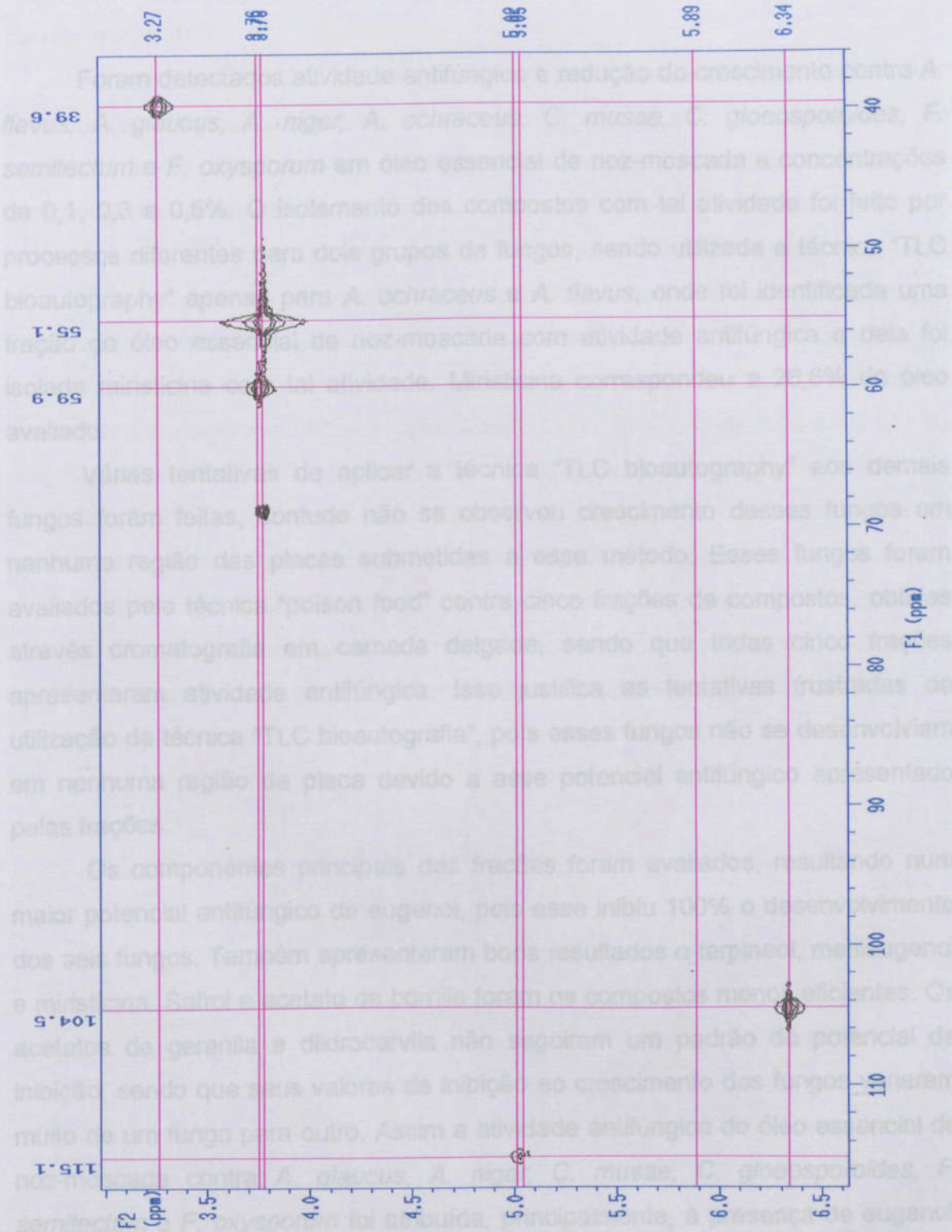


Figura 11: Ampliação parcial do mapa de contorno de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono, HMQC, da elemicina, com os deslocamentos e acoplamentos entre hidrogênios e carbonos.

CONCLUSÕES GERAIS

Foram detectados atividade antifúngica e redução do crescimento contra *A. flavus*, *A. glaucus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *C. musae*, *C. gloeosporoides*, *F. semitectum* e *F. oxysporum* em óleo essencial de noz-moscada a concentrações de 0,1, 0,3 e 0,5%. O isolamento dos compostos com tal atividade foi feito por processos diferentes para dois grupos de fungos, sendo utilizada a técnica "TLC bioautography" apenas para *A. ochraceus* e *A. flavus*, onde foi identificada uma fração do óleo essencial de noz-moscada com atividade antifúngica e dela foi isolada miristicina com tal atividade. Miristicina correspondeu a 26,6% do óleo avaliado.

Várias tentativas de aplicar a técnica "TLC bioautography" aos demais fungos foram feitas, contudo não se observou crescimento desses fungos em nenhuma região das placas submetidas a esse método. Esses fungos foram avaliados pela técnica "poison food" contra cinco frações de compostos, obtidas através cromatografia em camada delgada, sendo que todas cinco frações apresentaram atividade antifúngica. Isso justifica as tentativas frustradas de utilização da técnica "TLC bioautografia", pois esses fungos não se desenvolviam em nenhuma região da placa devido a esse potencial antifúngico apresentado pelas frações.

Os componentes principais das frações foram avaliados, resultando num maior potencial antifúngico de eugenol, pois esse inibiu 100% o desenvolvimento dos seis fungos. Também apresentaram bons resultados α -terpineol, metileugenol e miristicina. Safrol e acetato de bornila foram os compostos menos eficientes. Os acetatos de geranila e diidrocarvila não seguiram um padrão de potencial de inibição, sendo que seus valores de inibição ao crescimento dos fungos variaram muito de um fungo para outro. Assim a atividade antifúngica do óleo essencial de noz-moscada contra *A. glaucus*, *A. niger*, *C. musae*, *C. gloeosporoides*, *F. semitectum* e *F. oxysporum* foi atribuída, principalmente, à presença de eugenol, α -terpineol, metileugenol e miristicina no óleo. Apenas miristicina apresenta uma

quantidade relativamente elevada no óleo, entretanto não é ela o maior fungitóxico da noz-moscada.

Foram identificados 28 compostos no óleo essencial de noz-moscada. Contudo, apenas três compostos, sendo eles miristicina, safrol e elemicina, foram isolados desse óleo por cromatografia em camada delgada seguida de cromatografia líquida de alta eficiência em fase normal e reversa. Essa dificuldade de isolamento dos componentes de óleo essencial por métodos cromatográficos se deve ao fato desses compostos serem quimicamente semelhantes. A exemplo, os compostos isolados neste trabalho são constituídos, basicamente, por um anel aromático e uma ramificação insaturada com três carbonos. Com isso, pode-se dizer que a metodologia utilizada para isolar os componentes do óleo essencial de noz-moscada não foi adequada. Entretanto, a metodologia utilizada na identificação e quantificação dos compostos foi eficiente, uma vez que os resultados obtidos apresentaram-se próximos àqueles já registrados em literatura.

Também foi observado que o óleo essencial de noz-moscada armazenado perde parte de seus componentes, possivelmente por volatilização, sendo que isso pode resultar numa pequena redução da atividade antifúngica do mesmo.

1988.

Amus, K.; Blank, G.; Abramson, D.; Clow, R. e Holley, R.A. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. *Journal of Stored Products Research*, 41, 513-527, 2005.

Bailey, J.A. e Jeger, M.J. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Edited for the British Society for Plant Pathology, 388p, 1992.

Barbosa, L.C.A. Os pesticidas, o homem e o meio ambiente. Editora UFV, Viçosa, 239p, 2004.

Bautista-Baños, S.; Hernández-López, M.; Baezquez-Acuna, E. e Wilson, C.I. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectroscopy**. Allured Publishing Corporation, IL, USA. 1995.
- Almeida, F.A.; Araújo, A.; Gonçalves Junior, H.; Barreto, A.F. e Carvalho, R.A.G. Diagnóstico e quantificação de doenças da acerola no Estado da Paraíba. **Fitopatologia Brasileira**, 28,176-179. 2003.
- Alvarez-Castellanos, P.P.; Bishop, C.D. e Pascual-Villalobos, M.J. Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. **Phytochemistry**, 57, 99-102. 2001.
- Archer, A.W. Determination of safrole e myristicin in nutmeg and mace by high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, 438, 117-121. 1988.
- Arrus, K.; Blank G.; Abramson, D.; Clearc, R. e Holley, R.A. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **Journal of Stored Products Research**, 41, 513-527. 2005.
- Bailey, J.A. e Jeger, M.J. **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. Edited for the British Society for Plant Pathology, 388p. 1992.
- Barbosa, L.C.A. **Os pesticidas, o homem e o meio ambiente**. Editora UFV, Viçosa, 239p. 2004.
- Bautista-Baños, S.; Hernández-López, M.; Bosquez-Molina, E. e Wilson, C.L. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*,

anthracnose levels and quality of papaya fruit. **Crop Protection**, 22, 1087–1092. 2003.

Borges, A.A.; Borges-Pérez, A. e Fernández-Falcón, M. Induced resistance to fusarial wilt of banana by menadione sodium bisulphite treatments. **Crop Protection**, 23, 1245–1247. 2004.

Forrest, J.E. e Hazzok, R.A. Identification of major components of the oil essential

Chillet, M.; Bellaire-Lapeyre, L.; Dorel, M.; Joas, J.; Dubois, C.; Marchal, J. e Perrier, X. Evidence for the variation in susceptibility of bananas to wound anthracnose due to *Colletotrichum musae* and the influence of edaphic conditions. **Scientia Horticulturae**, 86, 33–47. 2000.

Journal of Stored Products Research, 32, 285–292. 1997.

Choo, L. C.; Wong, S. M. e Liew, K.Y. Essential oil of nutmeg pericarp. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 79: 13, 1954–1957. 1999.

Journal of Stored Products Research, 32, 285–292. 1997.

Curro, P.; Micali G. e Lanuzza, F. Determination of β -safrole, safrole, isosafrole and anethole in alcoholic drinks by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, 404, 273–278. 1987.

Journal of Stored Products Research, 32, 285–292. 1997.

Dhingra, O.D. e Sinclair, J.B. **Basic methods in plant pathology**. CRC press, Boca Raton, Florida, 458p. 1995.

Journal of Stored Products Research, 32, 285–292. 1997.

Domer, J.W. e Cole, R.J. Effect of application of nontoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on subsequent aflatoxin contamination of peanuts in storage. **Journal of Stored Products Research**, 38, 329–339. 2002.

Journal of Stored Products Research, 32, 285–292. 1997.

Edwards, S.G. Influence of agricultural practices on fusarium infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. **Toxicology Letters**, 153, 29–35. 2004.

Embrapa. As doenças da Pupunheira (*Bactris gasipaes* Kunth): Antracnose e podridão da medula. **Comunicado Técnico 63**. 2001.

Euclides, R.F. **Manual de utilização do programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas)**. Viçosa - UFV. 1983. 59p.

Forrest, J.E. e Heacock, R.A. Identification of major components of the oil essential of mace. **Journal of Chromatography**, 69, 115-121. 1972.

Huang, Y.; Tan, J.M.W.L.; Kini, R.M. e Ho, S.H. Toxic and antifeedant action of nutmeg oil against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Sitophilus zeamais* Motsch. **Journal of Stored Products Research**, 33, 289-298. 1997.

Morse, S.; Acholo, M.; McNamara, N. e Oliver, R. Control of storage insects as a means of limiting yam tuber fungal rots. **Journal of Stored Products Research**, 36, 37-45. 2000.

Newman, L.F. Some notes on the nutmeg graters used in folk-medicine. **Folklore**, 54; 3, 334-337. 1943.

Pardo, E.; Marin, S.; Sanchis, V. e Ramos, A. J. Impact of relative humidity and temperature on visible fungal growth and OTA production of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* isolates on grapes. **Food Microbiology**, 22, 383-389. 2005.

Pino, J.A. e Borges, P. Los componentes volatiles de las especias. III. Nuez moscada. **Alimentaria**, 301, 55-61. 1999.

Sanford, K.J. e Heinz, D.E. Effects of storage on the volatile composition of nutmeg. **Phytochemistry**, 10, 1245-1250. 1971.

Schenk, H.P. e Lamparsky, D. Analysis of nutmeg oil using chromatographic methods. **Journal of Chromatography**, 204, 391-395. 1981.

Schrödter, R. Influence of harvest and storage conditions on trichothecenes levels in various cereals. **Toxicology Letters**, 153, 47- 49. 2004.

Soliman, K.M. e Badeaa, R.I. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. **Food and Chemical Toxicology**, 40, 1669-1675. 2002.

Sridhar, S.R.; Rapagopal, R.V.; Rajavel, R.; Masilamani, S. e Narasimahn, S. Antifungal activity of some essential oils. **Journal of Food Agricultural and Food Chemistry**, 51, 7596-7599. 2003.

Stein, U.; Greyer, H. e Hentschel, H. Nutmeg (myristicin) poisoning-report on a fatal case and a series of cases recorded by a poison information centre. **Forensic Science International**, 118, 87-90. 2001.

Takikawa, A.; Abe, K., Yamamoto, M.; Ishimaru, S.; Yasui, M.; Okudo, Y. e Yokoigama, K. Antimicrobial activity of nutmeg against *Escherichia coli* O157. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 94, 315-320. 2002.

Zambolim, L. e Vale, F.X.R. **Controle de doenças de plantas: módulo 7.3 - Fungicidas de contato**. Viçosa-UFV. 138p. 2002.

Zambolim, L.; Vale, F.X.R.; Monteiro, A. J. A. e Costa, H. **Controle de doenças de plantas frutíferas, v2**. Viçosa. 1313p. 2002.