



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
MESTRADO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

NOZ-MOSCADA, *Myristica Fragans*, Houtt:
UM ESTUDO DE COMPOSIÇÃO
E EFEITO DO CONSUMO CRÔNICO NO
COMPORTAMENTO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Guiomar Francisca Teixeira de Oliveira

Prof^a. Dr^a. Eliana Badiale Furlong

Orientadora

Rio Grande, RS

AGOSTO, 2007

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
MESTRADO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS

NOZ-MOSCADA, *Myristica Fragans*, Houtt:
UM ESTUDO DE COMPOSIÇÃO
E EFEITO DO CONSUMO CRÔNICO NO
COMPORTAMENTO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO

Dissertação apresentada
para obtenção do título
de Mestre em Engenharia
e Ciência de Alimentos.

Guiomar Francisca Teixeira de Oliveira
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Eliana Badiale Furlong

Rio Grande, agosto de 2007.

AGRADECIMENTOS

Ao meu filho, Gabriel Ricardo, pelas ausências que teve que viver e pela confiança e carinho que me fortaleceram.

À Prof^a Dr^a Eliana Badiale Furlong, minha orientadora, sempre incansável, pela imensa sabedoria e disposição segura para multiplicar conhecimentos, além da sua serenidade, estímulo e grande amizade, o meu agradecimento mais profundo.

À Prof^a Dr^a Ana Luiza Muccillo Baisch, o meu agradecimento caloroso pela atenciosa acolhida, pelo aporte de saber e amizade dispendidas para a execução deste trabalho.

Às colegas de atividades, junto ao Laboratório de Micotoxinas, Itiara, Charlene, Giniani, Jaque, Melissa; junto ao Laboratório de Produtos Naturais, Geanni, Odila, Sandro, além de todas as demais meninas que, de alguma forma, colaboraram para o desenvolvimento deste estudo.

A todos os professores deste Curso de Pós-Graduação, os quais brindaram a todos nós com seus conhecimentos e condução segura para o término de nossas tarefas.

Às funcionárias do Departamento de Química, Islanda e Maria de Jesus, pela amizade, apoio, descontração e bom humor, sempre demonstrados.

Aos meus colegas, professores do Departamento de Ciências Fisiológicas e em especial aos colegas da disciplina de Farmacologia, pelo estímulo, amizade, confiança e colaboração.

As funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas pela colaboração e amizade sempre estimulantes.

A todas as colegas do Curso de Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos, pela amizade e alegria, durante a convivência que tivemos.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS E TABELAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
RESUMO	8
ABSTRACT	9
CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	10
1 INTRODUÇÃO	11
CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	33
CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL	42
CAPÍTULO III. 1 - Caracterização físico - química e determinação de miristicina em noz moscada (<i>Myristica fragans</i>, Houtt)	44
1. INTRODUÇÃO	46
2. MATERIAL E MÉTODOS	48
2.1 Amostragem e Preparo das amostras	48
2.2 Composição Centesimal.....	48
2.3 Determinação de miristicina	49
2.3.1 Estabelecimento de condições para cromatografia gasosa.....	49
2.3.2 Determinação de miristicina em extrato hidrotérmico da noz moscada.....	50
2.3.3 Determinação de miristicina em extrato hidrotérmico da fração lipídica das sementes de noz moscada.	50
2.3.4 Determinação de miristicina na fração aquosa de sementes de noz Moscada.....	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
3.1 Composição Centesimal das amostras de noz moscada.....	52
3.2 Óleos essenciais de noz moscada	55
3.3 Determinação de miristicina	57
4. CONCLUSÕES	62
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
CAPÍTULO III. 2 – EFEITOS DE INFUSÕES DA <i>Myristica fragans</i>, Houtt., SOBRE O COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS TRATADOS CRONICAMENTE	65
1. INTRODUÇÃO	67
2. MATERIAL E MÉTODOS	68
2.1. Preparação dos extratos.....	68
2.2. Animais	68
2.3. Teste da toxicidade aguda DL50	69
2.4 Estudo da toxicidade crônica em camundongos.....	69
2.5 Estudos comportamentais	69
2.5.1 Campo aberto.....	69
2.5.2 Labirinto em cruz elevado (Elevated Plus Maze)	70
2.6. Análise estatística.....	70
3. RESULTADOS	71
3.1 Toxicidade aguda	71

3.2 Efeitos da administração crônica oral do extrato da <i>Myristica fragans</i> , Houtt sobre o peso corporal e a mortalidade	71
3.3 Efeitos da administração crônica oral do extrato da <i>Myristica fragans</i> , Houtt a sobre o peso dos órgãos	72
3.4 Efeitos da administração crônica oral do extrato da miristicina sobre o comportamento animal	75
3.4.1 Teste do campo aberto	75
3.4.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE).....	79
4. DISCUSSÃO	82
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
CAPÍTULO IV - OUTRAS ATIVIDADES AVALIADAS	87
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIOXIDANTE DA NOZ – MOSCADA.....	89
1. Atividade antifúngica	89
2. Determinação da Atividade Antioxidante	90
3. Determinação do Índice de Acidez	90
4. Determinação do Índice de Peróxido	91
5. Resultados	91
CAPÍTULO V - CONCLUSÃO GERAL	95
CAPÍTULO VI –	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS	97

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Capítulo III. 1

Quadro 1 – Amostras utilizadas e suas respectivas características de comercialização	53
Quadro 2 - Composição centesimal das amostras de sementes de noz-moscada.....	54
Quadro 3 – Conteúdo de óleos essenciais e índice de refração de amostras de noz-moscada.....	56
Quadro 4 – Características do método para determinação de miristicina em cromatografia gasosa em diferentes frações de noz-moscada	58
Quadro 5 – Conteúdo de miristicina em amostras de noz-moscada.....	60

Capítulo III. 2

Tabela 1 – Mudanças no peso corporal dos camundongos após tratamento crônico oral com extrato de <i>Myristica fragans</i> , Houtt.....	72
Tabela 2 – Efeito do extrato aquoso de <i>Myristica fragans</i> , Houtt sobre o peso dos órgãos vitais.....	73
Tabela 3 – Relação entre peso dos órgãos vitais/peso corporal, após tratamento crônico com extrato aquoso de <i>Myristica fragans</i> , Houtt.....	74
Tabela 4 – Efeitos do extrato aquoso de <i>Myristica fragans</i> no teste de campo aberto.....	76
Tabela 5 - Efeitos do extrato aquoso de <i>Myristica fragans</i> no teste de campo aberto.....	78
Tabela 6 - Efeitos do extrato aquoso de <i>Myristica fragans</i> Houtt sobre o comportamento de camundongos no teste do labirinto em cruz elevado.....	79
Tabela 7 – Efeitos do tratamento com extrato aquoso de <i>Myristica fragans</i> Houtt sobre o comportamento de camundongos no teste de labirinto em cruz elevado.....	81

Capítulo IV

Tabela 1 – Dados obtidos para a atividade antifúngica pelo método de crescimento radial.....	92
Tabela 2 – Matriz do planejamento experimental completo.....	93
Tabela 3 – Valores dos níveis codificados no planejamento experimental.....	93
Tabela 4 – Dados obtidos a partir do planejamento experimental.....	94

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figura 1 – Noz-moscada, <i>Myristica fragans</i> , Houtt.....	17
Figura 2 - Componentes do óleo essencial de noz-moscada.....	20
Figura 3 – Estrutura molecular dos componentes bioativos do óleo essencial de noz-moscada.....	21
Figura 4 – Biotransformação da miristicina em MMDA (3-metoxi-4,5-metilenodioxianfetamina), uma amina psicoativa, substância derivada anfetamínica.....	23
Figura 5 - Estrutura molecular das aminas psicoativas	24
Figura 6 – Substância psicoativa ingerida penetra no sistema nervoso central (SNC).	25

CAPÍTULO III – 1

Figura 1- Estrutura da miristicina	47
Figura 2 – Organograma das etapas da determinação de miristicina em preparados de noz-moscada.....	52
Figura 3 – Cromatograma a partir de infusão de noz-moscada	59

RESUMO

A especiaria noz-moscada, *Myristica fragans*, Houtt, é amplamente utilizada desde tempos remotos no preparo doméstico de alimentos e chás curativos e modernamente pela indústria farmacêutica e de alimentos. Este produto está relacionado a diversos efeitos controversos, podendo promover a cura de sintomas patológicos do aparelho digestório e respiratório ou causar efeitos psicoativos por consumo abusivo. No preparo de alimentos é empregada por seu sabor picante e caráter conservador (antimicrobiano e antioxidante). Este trabalho teve como objetivo caracterizar físico-quimicamente a semente, enfatizando a determinação de miristicina, principal composto ao qual se atribui os efeitos danosos, e estudar o efeito de infusões consumidas cronicamente no comportamento de animais de laboratório. Para desenvolvimento do trabalho foram coletadas amostras de noz-moscada comercializadas na forma de semente e pó em duas regiões do país. Para caracterização físico-química foram adotados os procedimentos descritos pela AOAC (2000) para determinação de umidade, proteína, extrato etéreo, cinza e demais componentes por diferença. Foi adaptada uma metodologia para determinar miristicina em cromatografia gasosa. Para os seis lotes avaliados foram encontrados valores médios de 9,5%(±1,5); 2,1%(±0,5); 8,5%(±2,5); 31,9%(± 9,3) e 49,9 (±10,6) respectivamente para umidade, proteína, extrato etéreo e outros componentes. A miristicina foi determinada no extrato hidroalcoólico das sementes; da fração lipídica extraída a frio e da infusão. Os teores encontrados variaram entre 6,6 a 14 mg/g de semente no extrato hidroalcoólico e na infusão preparada, o que sugere que o maior risco de dano crônico de miristicina esta associado ao consumo de chás para diferentes fins. Numa segunda etapa foram estudados os efeitos crônicos do extrato aquoso, preparado com 0,5; 1,0 e 2,0% (p/v) de noz-moscada. Estas infusões das sementes foram avaliadas quanto a sua atividade psicoativa, administrando-se oralmente, *ad libitum*, durante 90 dias, aos animais. Os grupos tratados exibiram atividade ansiogênica no teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e no teste de campo aberto (CA). Estes resultados sugerem e corroboram com efeitos centrais atribuídos ao consumo abusivo do vegetal.

Palavras-chave: noz-moscada; *Myristica fragans*; miristicina; atividade ansiogênica, labirinto em cruz elevado; campo aberto.

ABSTRACT

Nutmeg, *Myristica fragans*, Houtt., is a specialty used to cook and to prepare and healing teas since the most remote times and more recently it started to be used in pharmaceutical and the food industry. This product is involved by controversial effects, since healing pathological symptoms of the stomach and the respiratory system or causing psychoactivity alteration due to its over use. Nutmeg is used as a spice due to its hot flavor and conservative characteristics (antimicrobial and antioxidant). This paper has as a objective characterizing physico-chemically the seed, giving emphasis to the determination of miristicyn, compound that causes the biggest damages, and studying its effects in lab animals with a diet rich in miristicyn. To develop the work samples of nutmeg seeds or powder were collected from two different regions of the country. For the physico-chemical characterization two procedures described by AOAC (2000) were adopted for the determination of humidity, protein, ether extract, ash and other compounds by difference. A methodology was adapted to determine miristicyn in gas chromatography. The medium values for the six samples were; 9,5% (+/- 1,5) humidity, 2,1% (+/- 2,5) ash, 8,5% (+/- 2,5) protein, 31,9% (+/- 9,3) ether extract and 49,9% (+/- 10,6) of other compounds. The miristicyn was determined in hydroalcoholic extract from the seeds; from the cold lipid extracted portion and from the effusion. The found levels ranged from 6,6 to 14 mg/g seed in the prepared effusion hydroalcoholic extract, which suggests a higher chronic damage to be associated to the use of multipurpose teas. In a second stage the chronic effects of a liquid solution prepared with 1,0 to 2,0% (p/v) of nutmeg. The seed effusions were evaluated for its psycho activity when ingested orally *ad libitum* through 90 days in animals. The treated groups showed ansiogenic activity in the elevated plus maze (EPM) and in the open field test (OF). This results suggest and agree with central effects attributed to the abusive consume of this product.

Key-words: Nutmeg, *Myristica fragans*, miristicyn, ansiogenic activity, elevated plus maze, open field.

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A partir do séc. XV, as viagens de descobrimento procuravam por novas rotas marítimas que levassem às especiarias, apreciadas por suas qualidades aromáticas, condimentares e conservantes. Dentre estas especiarias destacou-se a noz – moscada. Originalmente, a moscadeira (*Myristica fragans* Houtt), árvore produtora da semente denominada noz-moscada, crescia nas ilhas Molucas e Banda, na Indonésia (STEIN, 2001; UCHIBAYASHI, 2001).

As tradicionais medicina oriental e ocidental, conheciam suas qualidades, o que abriu caminho para o interesse das modernas indústrias de alimentos, farmacêutica e de cosméticos. Seu uso como medicamento abrange um largo espectro, pois apresenta ações antiinflamatórias, antidiarréicas, carminativas, hipolipidêmica, antitrombótica, antiagregante plaquetária e afrodisíaca (OZAKI et al., 1989; JANSSENS et al., 1990; RAM et al., 1996; OLAJIDE et al., 1999; TAJUDDIN et al., 2003). Ao lado destas propriedades curativas a literatura registra propriedades também tóxicas, que podem ocorrer de modo acidental ou intencional, (KRESANEK et al, 2005). Constam também registros do uso destas sementes, desde tempos remotos para provocar inebriação e aborto (PAYNE,1963;), podendo conduzir a intoxicações, potencialmente letais, com quadros excitatórios e também depressores, alucinatórios e distúrbios no aparelho digestório, como os mais freqüentes. (FARNSWORTH, 1968; LEE, 1998; KELLY e GAVIN, 2000; STEIN, 2001; SONAVANE, 2002; IPCSINTOX, 2004).

O uso de noz-moscada na produção de alimentos, em nível industrial e doméstico, objetiva melhorar as características sensoriais dos mesmos, atribuindo-se o seu potencial conservador à presença de óleos essenciais. Em termos de composição química a noz-moscada é constituída por cerca de 30-55% de óleos, 45-60% de matéria sólida, incluindo celulose e que estes óleos são de dois tipos: óleo essencial ou volátil, 5-15%, e óleo fixo, 24-40% (FAO, 2000).

O óleo essencial que mantém o aroma típico da noz-moscada, odor creditado à presença de miristicina, é usado pela indústria em substituição à própria noz-moscada, devido a suas qualidades sensoriais mais marcantes e pelo fato de evitar a presença de partículas em alimentos e bebidas, destacando-se o uso na produção de bebidas não alcoólicas, doces, comidas, xaropes e, também, cremes dentais (FAO,

2000; YUN, et al., 2003). Entre outros componentes do óleo essencial desta semente, destaca-se a miristicina (metil iso-eugenol) e a elemicina (metoxy eugenol), às quais se atribui as principais ações farmacológicas e efeitos psicoativos conhecidos (FAO, 2000; STEIN, 2001).

Segundo Shulgin (1966) e Kalbhen (1971), a myristicina e a elemicina, respectivamente, sofrem biotransformação, produzindo MMDA (3-metoxi-4,5-metilenodioxianfetamina) e TMA (3,3,5-trimetoxianfetamina), que desencadeiam um efeito alucinogênico superior ao da mescalina (FARNSWORTH, 1968). Sobre a formação de derivados anfetamínicos, em alimentos preparados, Idle (2005) credita sua geração à ação do calor do cozimento, dos assados e dos fornos utilizados.

Estudos recentes também vêm apontando aos componentes dos óleos essenciais de noz-moscada, especialmente a miristicina, um papel ativador da glutathiona peroxidase, podendo, assim, inibir a tumorigênese (LEE et al., 1998 e YUN et al 2003; JANNU et al., 1991).

Considerando que este condimento, possuidor de componentes com atividades tão controversas, sendo empregado no preparo de diversas formulações alimentícias, incluindo refrigerantes (LEE, et al., 1993; MORGAN; 1994; HOFFMANN, et al., 2000; DE VICENZI et al., 2004, www.qmc.ufsc.br, 2007), que podem ser consumidas associadas a outras fontes naturais de miristicina e, eventualmente, com o acréscimo do uso de cigarros flavorizados indianos (bidi cigarettes) (STANFILL, 2006), que também apresentam este componente, seria interessante avaliar o risco/benefício do consumo crônico e/ou subcrônico de noz-moscada nas diferentes formas em que pode aparecer na dieta. Mesmo não havendo registros de danos agudos pelo consumo não intencional, através da ingestão destas fontes, também convém destacar que não estão disponíveis informes sobre os efeitos crônicos e/ou subcrônicos do consumo dos componentes desta semente.

Com o propósito de contribuir para futuras avaliações de propriedades benéficas e tóxicas da noz-moscada nas formas usuais de seu emprego, o objetivo deste trabalho foi caracterizar físico – quimicamente e determinar os teores de miristicina em sementes, óleo essencial e infusão aquosa de noz moscada e avaliar o efeito do seu extrato aquoso, preparado como infusão, no comportamento de animais de laboratório.

A estratégia adotada para a realização do trabalho consistiu em caracterizar físico-quimicamente amostras de noz – moscada na forma como são comercializadas; padronizar um procedimento para determinação de miristicina e realizar experimento biológico avaliando o comportamento de camundongos aos quais se administrou crônicamente infusão de noz – moscada, contendo quantidades conhecidas de miristicina.

Os dados colhidos serviram para compor, ao lado daqueles constantes da literatura e das informações públicas das quantidades deste condimento contidas em produtos industrializados, subsídios para uma futura estimativa de risco, deste consumo, sobre a saúde da população.

CAPÍTULO II - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Especiarias

Especiarias são definidas como partes de certas plantas (raízes, rizomas, cascas, bulbos, folhas, caules, flores, frutos e sementes) em estado natural, secas e/ou objeto de elaboração mecânica que por seu sabor ou aroma característicos dão sabor aos alimentos para consumo humano. As especiarias se incorporam aos alimentos em pequenas quantidades e os tornam mais saborosos. Também estimulam o apetite ao favorecer a secreção das glândulas digestivas. Tudo isso influencia no maior aproveitamento dos alimentos pelo organismo (GERHARDT, 1973; HIRASA & TAKEMASA, 2002).

A maioria das especiarias são conhecidas desde a mais remota antiguidade, e não eram somente empregadas para dar sabor aos alimentos. É fato que foram usadas em cerimônias e rituais e seus óleos eram utilizados para o embalsamamento de cadáveres. Por isso, não é de se estranhar o uso para fins profiláticos e curativos para doenças conhecidas ou não. O homem acreditava que as especiarias possuíam efeitos curativos mágicos e os sacerdotes consideravam-nas divinas por não encontrarem argumentos racionais para justificar seus efeitos curativos e conservadores (RAFOLS,1963).

Convém salientar que as especiarias, como partes de uma planta, são constituídas por fibra, açúcar, proteína, cinzas, gomas, óleos essenciais e outros componentes. Os óleos essenciais, constituídos por vários compostos químicos, conferem aroma particular, um flavor específico, os quais motivam o seu uso na composição dos alimentos. O balanço entre os componentes químicos dos óleos essenciais é que confere as características próprias de cada tipo de especiaria, mesmo que sejam provenientes da mesma família botânica, as proporções podem ser bastante distintas.

1.2 Noz-moscada

A noz – moscada é produzida pela planta denominada moscadeira, *Myristica fragans*, Houtt., pertencente à família das Miristicáceas (**Fig. 1**), que atinge na maturidade até 12 m de altura. A fruta é redonda amarelo esverdeada com diâmetro de aproximadamente 5 cm e consiste de pericarpo e semente. Ao amadurecer a parte carnosa se divide em dois, descobrindo a semente. A semente é revestida por um anel, de cor vermelho brilhante e que se chama macis ou “flor de macis”. Estas duas partes são usadas como especiarias. A semente também é chamada de noz-moscada, denominação incorreta segundo a botânica, já que não se trata de uma noz. Estas podem pesar até 10g e formam a maior parte do fruto (RAFOLS, 1963; CHOO et al. 1999).

O cultivo da moscadeira, *Myristica fragans*, Houtt., é difícil, pois requer solo rico, úmido, bem drenado, quente, livre de sol e de ventos fortes. Apesar disto os britânicos conseguiram introduzir a noz – moscada em Cingapura e no Caribe. Atualmente, os maiores produtores de noz – moscada são Indonésia, Sri Lanka e a ilha caribenha de Granada (SPRICIGO, 1999; WEIL, 2001). No Brasil o cultivo da moscadeira encontra condições climáticas no sul da Bahia, cuja produção atende parte da demanda nacional da indústria farmacêutica e alimentícia, além do consumo a varejo para as preparações domésticas.



Figura 1 – Noz-moscada, *Myristica fragans*, Houtt.

Fonte: <http://nl.wikipedia.org/wiki/Afbeelding:Koeh-097>. From: Koehler's Medicinal-Plants 1887.

1.3 Considerações histórico-políticas sobre a noz-moscada

Gerhardt (1973) e Uchibayashi (2001) apresentaram aspectos históricos do uso de especiarias e suas conseqüências na política mundial, fatos também divulgados em mídia eletrônica (www.qmc.ufsc.br, 2007; www.nozmoscada.com.br, 2007; www.emedis.com.br, 2007).

A noz-moscada é originária das lendárias “Ilhas das Especiarias” ou Molucas, atualmente, província da Indonésia de Maluku. A árvore da noz-moscada só crescia nas ilhas de Banda, um grupo isolado de sete ilhas no mar de Banda. Durante muitos séculos os habitantes das ilhas sobreviveram do comércio desta e do cravo da Índia, abundantes na região.

Os negociantes venezianos foram os primeiros a estabelecer uma rota comercial para abastecer a Europa Ocidental e países do leste com estes produtos, que ao chegarem ao destino atingiam alto valor comercial, em decorrência, também, de seu caráter conservador de alimentos (CULÍKOVÁ, 2000). Atraídos pelo interessante comércio, os portugueses, em 1512, estabeleceram o seu monopólio superando os venezianos, sendo em seguida superados pelos holandeses (STEIN, 2001; UCHIBAYASHI, 2001). Estes para manter o monopólio sobre o comércio de noz – moscada e outras especiarias, preferiram abrir mão de seus direitos sobre a ilha de Manhattan (Nova York). A luta pelo monopólio das especiarias continuou entre os europeus e só deixou de ser interessante com o advento da refrigeração, que superou a eficiência destas como conservadores.

Estes condimentos, hoje, são usados mais por suas características organolépticas e curativas e não constituem mais um motivo de disputas políticas. No entanto, com o advento da era dos alimentos funcionais, estas especiarias voltaram ao centro da atenção da ciência (NGUYEN, 2000). Destacam-se, neste interesse, a busca de propriedades antimicrobianas, antifúngicas e antioxidantes destes compostos, inclusive para a noz – moscada, sendo este tema estudado por vários autores (OZAKI et al., 1989; JANSSENS et al, 1990; IMARK et al., 2002; SOLIMAN & BADEAA, 2002; NGUEFACK, et al., 2004; TOMAINO et al., 2005).

1.4 Propriedades físico-químicas da noz-moscada

A maioria dos dados disponíveis na literatura enfocam a composição da noz-moscada enfatizando o seu conteúdo em óleo, na faixa entre 25 e 40%, destes, 5-15% de óleo volátil (essencial), 3,5% de gordura, 2% de resina, pequenas quantidades de ácidos e 8,5% de matéria insaponificável (RAFOLS, 1963; GIACOMETTI, 1989; WEIL, 2001). A grande ênfase em estudos tecnológicos está na busca de condições

de processo que não alterem o balanço entre os componentes dos óleos essenciais ou acarretem nas suas perdas, para não descaracterizar o flavor característico desta especiaria (McKEE et al, 1993; SPRICIGO et al, 1999).

A composição química da noz –moscada é influenciada por variáveis bióticas e abióticas, sendo sua composição centesimal média de 9% de umidade; 9,6% de compostos nitrogenados; 33% de lipídios; 4,5% de óleos essenciais; 27% de amido; 14,5% de extratos não nitrogenados e 2,5% de cinzas (MORGAN, 1994; www.nozmoscada.com.br, 2007).

As sementes deterioradas são utilizadas para a fabricação de manteiga de noz-moscada, que contém de 38 a 43% de matéria extraída, incluindo óleos essenciais e uma pequena quantidade de resina, além de uma parte insaponificável e alguns glicerídeos (RAFOLS, 1963). A manteiga é obtida por pressão que resulta em gordura, de cor amarela e odor aromático característico. O mais importante componente da manteiga é o triglicerídeo de ácido mirístico, que chega a 75% do total (GERHARDT, 1973).

Dentre os componentes químicos dos óleos essenciais, os principais são terpenos, compostos formados por carbono, hidrogênio e oxigênio, sendo os mais abundantes os monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos. Estas estruturas são sintetizadas pelos tecidos vegetais como forma de proteção contra animais herbívoros, insetos, fungos e bactérias. Todos estes compostos são inseticidas naturais, cujas moléculas possuem flavor picante característico e, em decorrência disso, seu consumo natural por humanos está limitado a pequenas doses, o que permite aos mecanismos de detoxificação uma atuação de forma eficiente, dentro de uma lógica de sustentabilidade dos organismos (LEE, 1998).

Da mesma forma que a composição centesimal, o conteúdo de óleos essenciais da noz – moscada varia com a origem, solo e clima o que resulta na ampla faixa entre 5 e 15%. Destes óleos essenciais, cerca de 80% é composto por terpenos, ver **Figura 2**, tais como o α pineno, β pineno, γ pineno, sabineno, limoneno e 4 – terpineol (SPRICIGO et al.1999). Outros componentes importantes são aqueles aos quais se atribui os efeitos aromáticos, conservadores e psicoativos, característicos da noz-moscada, sendo: a elemicina (1-alil-3,4,5 trimetoxi benzeno), a miristicina (4-metoxi-6-(2-propenil -1,3-benzodioxole), o safrol (5-2-propenil-3-benzodioxole) e o eugenol (4-alil-2-metoxifenol), destes, é a miristicina a responsável pelo odor típico

desta semente (ARCHER, 1988; SPRICIGO et al.1999; WEIL, 2001; TAJUDDIN et al., 2003; www.nozmoscada.com.br, 2007, www.qmc.ufsc.br, 2007).

α pineno
β pineno
γ pineno
sabineno
limoneno
4 – terpineol
eugenol
Elemicina (1-alil-3,4,5 trimetoxi benzeno)
Miristicina (4-metoxi-6-(2-propenil-1,3-benzodioxole)
Safrol (5-2-propenil-3-benzodioxole)

Figura 2 - Componentes do óleo essencial de noz-moscada.
(80% de terpenos).

A miristicina encontra-se entre 2,1 a 2,9% do peso total da noz-moscada, e o safrol, cerca de 0,3 a 0,4% enquanto que, nas amostras de óleo essencial de noz-moscada, a miristicina encontra-se entre 3,9 a 12,8%, o safrol, cerca de 0,53 a 3,42% e a elemicina 0,02 a 2,4% (FARNSWORTH, 1968; ARCHER, 1988; RANDERATH, et al., 1993; WANG et al, 2004; YUAN et al, 2006). A miristicina é quimicamente semelhante a outros três compostos aromáticos: eugenol, isoeugenol e safrol (JANSSENS et al, 1990; WEIL, 2001).

No trabalho de Al-Khatib et al. (1988), os extratos a éter de petróleo, a partir da noz-moscada, apresentam em sua composição o sitosterol, campesterol e lanosterol, sendo o desmosterol o componente em menor quantidade (ISOGAI et al., 1973; JANSSEN e LAEKEMAN, 1990; HALLSTROM e THUVANDER, 1997; SPRICIGO, 1999). Verifica-se que a miristicina, composto de propriedades pouco usuais e controversas foi também encontrado em outros vegetais de uso rotineiro, tais como cenoura, pimenta preta e em óleos essenciais de diferentes agentes flavorizantes, provenientes de outras especiarias (HALLTROM e THUVANDER, 1997; LEE, 1998; HOFFMANN et al., 2000; HIRASA e TAKEMASA, 2002).

Na **Figura 3** estão as estruturas da elemicina, miristicina e safrol, componentes do óleo essencial, mais estudados por seus efeitos conservadores, aromatizantes e psicoativos (BEYER, et al., 2006; YUAN, et al., 2006).

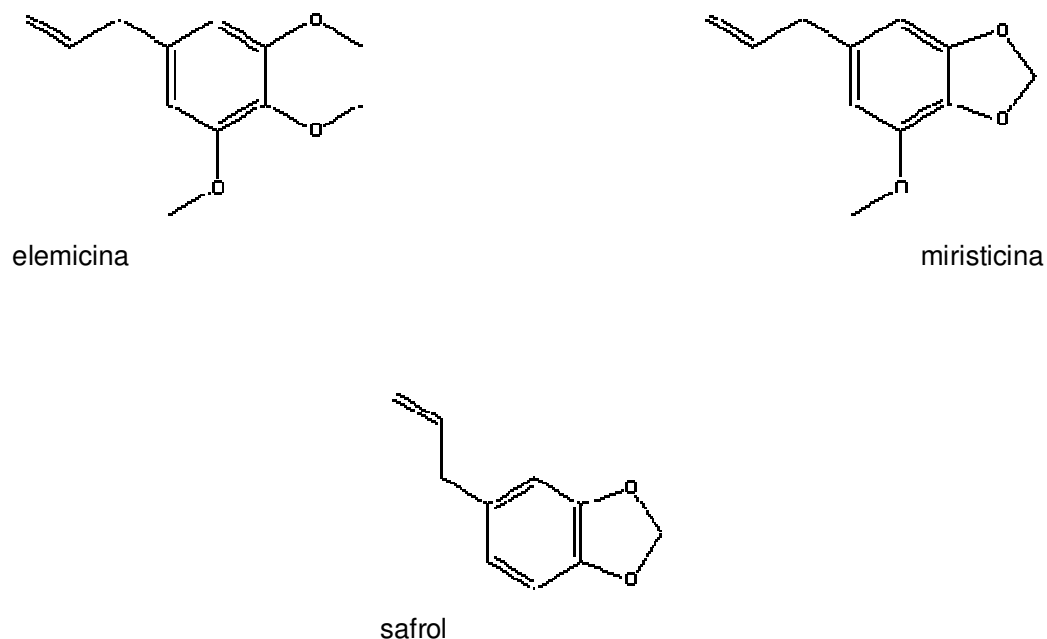


Figura 3 – Estrutura molecular dos componentes bioativos do óleo essencial de noz – moscada.

1.5 Propriedades biológicas e efeitos comportamentais dos componentes essenciais da noz-moscada

A noz-moscada é utilizada mundialmente como condimento e conservante devido às suas propriedades sensoriais (FAO, 2000; YUN, 2003) e como medicamento tradicional na medicina oriental chinesa e indiana (medicina Ayurvédica e medicina Unani) (STEIN, 2001;TAJUDDIN, 2005; MUKHERJEE, 2007) e na medicina ocidental, bem como pela cultura popular devido às suas ações que atingem, sobretudo, o sistema digestório, o sistema reprodutor feminino e masculino e o sistema circulatório (GROVER et al, 2002). Além de isso, são atribuídos ao chá desta semente, propriedades abortivas, afrodisíacas, narcóticas e alucinógenas (FARNSWORTH, 1968; PCEYSKI et al, 1981; MILLER et al, 1983; BRENNER et al., 1993; LEE, et al. 1998 CHOO et al. 1999; KELLY e GAVIN, 2000; STEIN, 2001; SONAVANE, 2002; TAJUDDIN, 2003; TAJUDDIN, 2005; IPCSINTOX, 2004).

Dados coletados, a partir de intoxicações, revelam que 5-30 g de noz-moscada são usados para provocar, após 1-7 h de ingestão, efeitos psicoativos tais como, euforia, delírios, alucinação, desorientação temporal ou letargia, convulsões. Podem ocorrer sensação de estomago pesado, náuseas, com ou sem vômitos, desassossego, dor de cabeça, excitação, bôca sêca, midríase ou miose, taquicardia, opressão, sensação de angústia e tontura, diminuindo a intensidade das manifestações após 24 horas (FARNSWORTH, 1968; ABERNETHY e BECKER, 1992; HALLTROM e THUVANDER, 1997; STEIN, 2001). Os dados encontrados demonstram que os efeitos tóxicos da noz-moscada, em especial a atividade alucinogênica, provém do óleo essencial, cuja atividade é 1,8 vezes superior à do álcool absoluto (TRUITT et al, 1961; RAFOLS, 1963; FARNSWORTH, 1968; PANYOTOPOULOS e CHISHOLM, 1970; HALLTROM e THUVANDER, 1997; SANGALLI e CHIANG, 2000; KELLY e GAVIN, 2003).

Outros efeitos tóxicos da ingestão de noz-moscada, como condimento, podem causar espasmos em pessoas hipersensíveis a ela, estes sinais são corroborados pelos achados de Lis-Balchin, 1997, que registrou efeitos contráteis do óleo essencial de noz-moscada sobre o músculo diafragmático de ratos e efeitos espasmogênicos sobre músculo liso de íleo de cobaias.

Farnsworth, (1968); Lee, et al. (1998) e Yun et al. (2003), apontam para a evidência de que o óleo essencial da semente de noz-moscada contém vários componentes, precursores metabólicos de compostos do tipo derivados anfetamínicos, responsáveis pelo efeito psicoativo, que ocorre em doses elevadas. Segundo estes autores, além de Shulgin (1966) e Stein (2001), 20 gramas de noz moscada, contém, aproximadamente, 210 mg de miristicina (potencial MMDA, 3-metoxi-4,5-metilenodioxianfetamina) (ver **Figura 4**), 70 mg de elemicina (potencial TMA, 3,3,5-trimetoxianfetamina) e 39 mg de safrol (potencial MDA, metilenodioxianfetamina), que podem ser convertidos, *in vivo*, respectivamente, para as formas amínicas, derivadas da anfetamina, MMDA, um precursor da droga de abuso denominada “ecstasy”, TMA e MDA (www.qmc.ufsc.br; 2007; www.ildue.it; 2007). Idle (2005) propõe que a melhora do humor e a alegria peculiar que cerca as comemorações natalinas, no inverno do hemisfério norte, têm sua origem nos derivados anfetamínicos, produzidos durante o cozimento dos pratos típicos condimentados com noz-moscada.

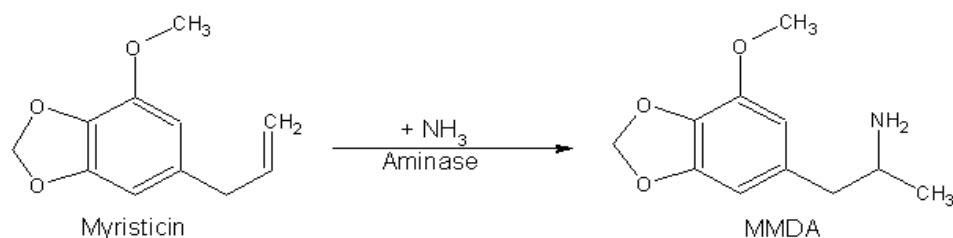


Figura 4 - Biotransformação da miristicina em MMDA (3-metoxi-4,5-metilenodioxianfetamina), uma amina psicoativa, substância derivada anfetamínica.

Estes compostos, classificados como derivados anfetamínicos, são potencialmente causadores de dependência química, de modo semelhante ao

causado pelo consumo de anfetaminas, ver **Figura 5**, cujas estruturas moleculares são semelhantes àsquelas dos componentes do óleo essencial de noz-moscada.

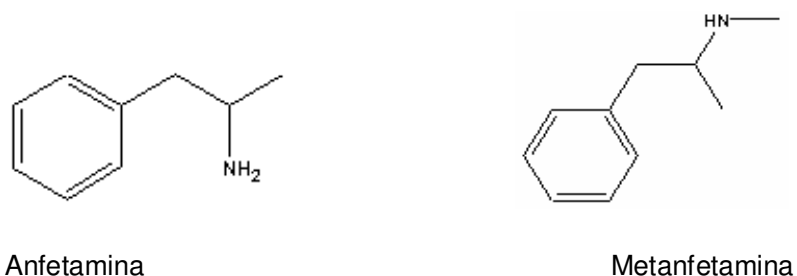


Figura 5 - Estrutura molecular das aminas psicoativas.

Usualmente, os casos de intoxicação aguda, em humanos, estão associados ao uso abusivo intencional da semente de noz-moscada, devido a ação psicoativa de seus componentes, assim capacitados a penetrar no sistema nervoso central (SNC) (ver **Figura 6**) e provocar, além de prazer, através da via dopaminérgica, efeitos alucinógenos, eufóricos ou disfóricos (depressores). A maioria das publicações sobre casos de intoxicação, após ingestão desta semente, referem-se ao emprego por parte de presidiários, estudantes e adolescentes, dependentes químicos ou não (ABERNETHY e BECKER, 1992; STEIN, 2001; STAHL, 2002; KELLY e GAVIN, 2003). Casos de envenenamento, registrados pelo Centro Texano de Venenos, foram descritos por Forrester (2005) e relatam situações decorrentes da ingestão de noz-moscada, das quais 65% envolviam uso intencional. Neste estudo verifica-se que homens (67%) são os maiores consumidores e destes 55% eram adolescentes. Tanto na América do Norte, junto ao Centro de Controle de Venenos de Utah, como no leste europeu, junto ao Centro de Informação Toxicológica da Eslováquia, os registros apontam igualmente para o aumento deste uso entre colegiais e adolescentes e entre aqueles que procuram uma experiência eufórica ou alucinogênica que envolva aquisição de material legal e/ou que seja de origem natural, como consequência da

facilidade de obtenção desta semente, seu baixo custo e à rápida propagação de informações através da internet (STEIN, 2001; UPCC, 2003; www.erowid.org/plants/nutmeg, 2004; FORRESTER, 2005; KRESANEK, 2005).

Averiguando ações sobre o sistema nervoso central (SNC), Messiha e Zaki (1984) realizaram estudos experimentais com camundongos, e os resultados sugeriram uma ação depressora do extrato aquoso de noz-moscada sobre o SNC. Sherry et al. (1982), verificaram um aumento significativo na duração do sono leve e profundo, em frangos, sob ação do extrato etéreo de noz-moscada. Enquanto Grover et al. (2002), trabalhando com extrato de noz-moscada a éter de petróleo, demonstrou significativa ação sedativa, sendo capaz de potenciar o efeito de indução do sono provocada pelo fenobarbital e pentobarbital.

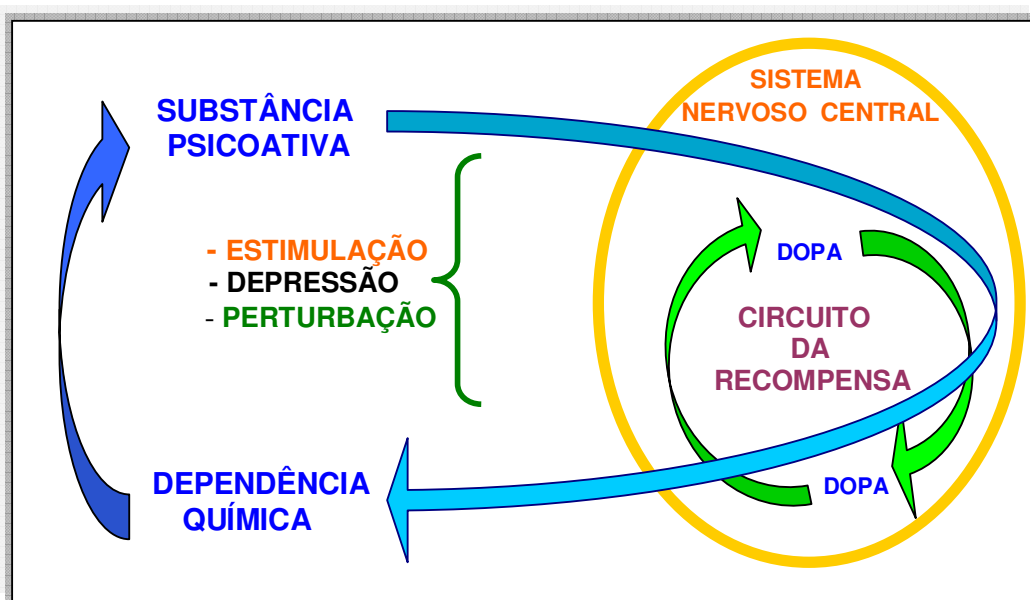


Figura 6 - A substância psicoativa ingerida penetra no SNC, libera dopamina (DOPA) no circuito da recompensa, gera bem-estar ou euforia, enquanto estimula, deprime ou perturba a ação geral do SNC, podendo levar à dependência química, com conseqüente retorno à utilização da substância psicoativa original ou outra.

Moreira et al (2000), verificaram que o óleo essencial da *Piper solmsianum*, que possui como maior componente o sarisan, um análogo da miristicina, administrado a camundongos sob a forma de emulsão, demonstrou ser capaz de provocar efeitos excitatórios e depressores, os quais podem ser induzidos, simultaneamente, no estágio final da ansiedade. Sonavane (2002), verificou que a trimiristicina, também presente no óleo de noz-moscada, foi capaz de inibir a atividade ansiolítica do ondansetron (antagonista do receptor 5-HT3), buspirona (agonista do receptor 5-HT1A) e do diazepam (agente do receptor GABA A), parecendo apresentar uma atividade ansiogênica não específica.

Randerath et al. (1993) estudando o efeito de constituintes de bebidas do tipo cola salientaram que a ocorrência de alterações no DNA de preparados de fígado de animais, podia ser decorrente da presença de óleos essenciais empregados como flavorizantes. Entre os compostos identificados estavam presentes safrol e metileugenol que formavam alterações similares às formadas por miristicina ou extratos de noz – moscada e macis (cobertura das sementes da *Myristica fragans*).

Contraopondo estes efeitos, experimentos realizados ministrando miristicina a animais de laboratório, para avaliar a formação de alterações de DNA do fígado, demonstraram um efeito indutor da glutathione S-transferase, abrindo a perspectiva de ação anti-tumorigênese quando administrado *in vivo* (LEE et al, 1998 e YUN et al 2003). Estes achados concordam com os resultados que mostraram proteção diante da indução ao câncer uterino, por metilcolantrene, em camundongos (HUSSAIN e RAO, 1991).

Também Jannu et al. (1991), verificaram a ação protetora do macis que, introduzida na dieta de camundongos albinos, na proporção de 1%, reduziu em 50% o aparecimento de papilomas de pele, enquanto os resultados obtidos por Lee et al. (2005) demonstram que a miristicina é capaz de induzir citotoxicidade em células de neuroblastoma humano (SK-N-SH cell line), *in vitro*.

Estes indicativos de que os componentes de óleos essenciais poderiam apresentar efeitos protetores contra tumorigênese e outras doenças crônico-degenerativas, levaram a estudos específicos sobre o efeito metabólico da noz – moscada ou dos componentes do seu óleo essencial, com grande ênfase para a elemicina e miristicina (GROOVE et al. 2002; YUN et al. 2003; DE VICENZI et al., 2004).

O metabolismo da miristicina, em animais de laboratório, foi estudado determinando a excreção pela urina e pelo tratamento de preparados de microsomo de fígado humano. A etapa oxidativa pelo citocromo P 450, foi identificada, ficando demonstrado que o maior metabólito formado foi o 5 alil-3,4 metilenodioxi – 2,3 dihidroxibenzeno que se formava numa velocidade de 0,176 $\mu\text{M}/\text{minuto}/\mu\text{g}$ proteína quando não estavam presentes outros compostos que usam esta via metabólica (YUN et al., 2003).

1.6 Uso industrial de noz-moscada

De acordo com Hirasa e Takemasa (2002) as especiarias apresentam efeitos variados quando acrescentadas aos alimentos, não só conferindo flavor agradável mas, também, mascarando odores desagradáveis, induzindo sabores picantes e conferindo cores características e atrativas aos alimentos. Além disso, possuem propriedades antioxidantes, antimicrobianas e nutritivas, o que as torna alvo para o uso industrial (PARLE et al., 2004; NARASIMHAN e DHAKE, 2006).

A noz-moscada, se encaixa nestas características e é amplamente utilizada na indústria de alimentos, muito mais do que o macis. As formas de uso são como particulados das sementes, óleos essenciais ou manteiga. Estes são empregados em produtos de panificação, em todo tipo de massas doces. A noz-moscada complementa a canela e pode ser encontrada combinada com esta especiaria (RAFOLS, 1963; HIRASA e TAKEMASA, 2002). Outro exemplo muito abundante do uso da noz-moscada é na indústria de produtos cárneos processados, associada a pimentas diversas. Muitos embutidos devem seu aroma a noz-moscada e a seus óleos essenciais, de modo que o componente aromático mais abundante na salsicha tipo Viena e na mortadela é a noz-moscada (RAFOLS, 1963; TATEO, 1999; DE VICENZI, 2004).

A preparação de bebidas, especialmente as de tipo cola e também algumas bebidas fermentadas, preconizam a utilização de especiarias picantes para a composição do flavor característico que apresentam e, entre estas, encontra-se com frequência o óleo essencial de noz – moscada (RANDERATH et al, 1993; HALLSTRÖM & THUVANDER, 1998; HOFFMANN & HEIDEN, 2000; TATEO, 2000;

DE VICENZI, 2004). A culinária popular emprega a noz-moscada sob a forma de particulados para aromatizar coquetéis, molhos doces e salgados, bolos e outros produtos de confeitaria (HIRASA e TAKEMASA, 2002; DE VICENZI, 2004; www.nozmoscada.com.br, 2007).

Determinação de óleos essenciais em noz- moscada

A década de 90, com os conhecimentos científicos aportados pela disponibilização de instrumentação analítica, colocou no foco de estudos científicos uma série de compostos-traços dos alimentos, aos quais a sabedoria popular atribuía efeitos funcionais. Assim, os óleos essenciais provenientes das especiarias, que haviam sido relegados a um papel secundário, com o advento da refrigeração, passaram ao centro das atenções (OZAKI et al., 1989; JANSSENS et al, 1990; SOLIMAN & BADEAA, 2002; NGUEFACK, et al. 2004; TOMAINO et al.; 2005).

Em vista da diversidade de componentes de óleos essenciais os métodos mais adequados para a sua determinação são os cromatográficos, especificamente a cromatografia gasosa, beneficiada pela volatilidade destes compostos. Previamente são necessários cuidados para a preparação da amostra, visto que a volatilidade destes óleos, por outro lado, dificulta inclusive o processo de moagem da amostra. (MCKEE et al, 1993). A extração dos óleos essenciais é frequentemente realizada por extração hidroalcoólica (arraste a vapor) que também pode ocasionar perdas ou alterações nas estruturas químicas dos componentes essenciais em função das temperaturas e tempos de destilação (TOMAINO et al., 2005).

A quantificação e identificação dos óleos extraídos das sementes ou de outras matrizes são usualmente realizadas empregando cromatografia gasosa acoplada a detectores universais de ionização de chama ou de massas. O número de compostos identificados, variam entre 6 e 17 e são decorrentes da performance dos métodos adotados (MCKEE et al, 1993; HOFFMANN et al, 2000; TOMAINO et al., 2005).

Uma interessante alternativa para este problema foi estudada por Spricigo et al. (1999) propondo a extração supercrítica por dióxido de carbono, porém este

método ainda não está implantado como rotina analítica, sendo pouco freqüentes as citações envolvendo este tipo de extração para esta especiaria.

Extração de óleos essenciais de noz- moscada, em matrizes alimentícias, frequentemente são descritas para estudos em bebidas e pouco para outros alimentos, possivelmente decorrente da interferência de matrizes mais complexas (RANDERATH et al., 1993; HOFFMANN et al, 2000).

1.8 Índice de refração

A medida do índice de refração tem sido usada para a identificação de compostos desconhecidos, fazendo-se comparação com valores divulgados pela literatura. Este índice é muito usado na análise qualitativa de óleos e gorduras, sendo capaz de levar à identificação do produto analisado (CECCHI, 2003).

Na análise do óleo, extraído pelo método de Bligh e Dyer (1959), a partir de amostra moída de noz moscada, após extração hidrotérmica dos voláteis, utilizando-se destilador de Clevenger, o material condensado foi mantido em frasco escuro, sendo padronizado pelo índice de refração, medido em refratômetro tipo Abbé. Os índices de refração foram colhidos, visando obter um indicativo da uniformidade das condições de destilação e da coleta do destilado.

1.9 Cromatografia gasosa

A cromatografia é uma técnica analítica, útil para efetuar a separação de componentes de uma dada amostra, sendo especialmente sofisticada ao tratarmos de cromatografia gasosa. Esta, devido a sua alta sensibilidade, permite que se analise pequenas quantidades de amostra, de modo rápido, com alto poder de separação e resolução (CECCHI, 2003). Tal equipamento apresenta aplicação somente na análise de compostos voláteis, de modo que a amostra de noz-moscada, sendo um óleo essencial, volátil, apresenta a característica necessária para poder ser avaliada por instrumental deste tipo.

1.10 Testes de Toxicidade

Estes testes visam determinar um limite de segurança, em termos de quantidade de material a ser utilizado, a dose adequada, representada por miligramas do produto, concentração ou percentual, por quilo de peso vivo, em relação a uma dada substância desconhecida que se pretenda estudar, dentro de um protocolo experimental. Procede-se a uma investigação, sobre as interações tóxicas que possam existir entre a substância em avaliação e os organismos vivos disponíveis para tal. Trata-se de um estudo prévio e orientador de estratégias para o trabalho científico.

1,10.1 Tratamento agudo - DL 50

O valor DL50 define um valor numérico médio, como uma estimativa estatística do número de miligramas de uma substância por quilogramas de peso vivo requerido para provocar a morte 50% de uma população de animais de experimentação. Procede-se a uma única administração do material em estudo aos animais, através de uma via de administração adequada, e mantém-se os animais sob observação, registrando-se todos os eventos ou sinais e sintomas que venham a apresentar. Os animais são observados imediatamente após a aplicação da substância, durante toda a primeira hora seguinte à aplicação e após 6, 24, 48, 72 e 96 horas e ao término de 14 dias após esta exposição.

1.10.2 Tratamento crônico

A substância em estudo é investigada através de sua administração a animais de experimentação, durante um período de tempo pré-determinado, denominando-se como tratamento crônico. Procede-se a observações diárias dos animais, visando detectar as interações tóxicas da substância em avaliação, através de sinais e sintomas, bem como o registro de alterações de comportamento. Durante estes trabalhos os animais são alojados e mantidos segundo as normas ditadas pelo COBEA (1992).

1.11 Psicoatividade: Testes comportamentais

Os relatos existentes sobre os efeitos tóxicos da noz-moscada são unânimes em descrever efeitos significativos sobre o sistema nervoso central, decorrentes da ação psicoativa dos componentes do seu óleo essencial, os quais podem agir isoladamente, sendo apontadas a miristicina e a elemicina como agentes mais importante, ou como um conjunto de compostos em sinergia (FARNSWORTH, 1968; ABERNETHY e BECKER, 1992; HALLTROM e THUVANDER, 1997; STEIN, 2001).

Os efeitos psicoativos induzidos pela noz-moscada são muitos variados, visto que os níveis dos constituintes do óleo essencial também variam em função da qualidade apresentada pela semente que foi usada, o que leva a uma variabilidade de efeitos que são comparados, com freqüência, com os efeitos provocados pela maconha (*Cannabis sativa*) ou pelo LSD (dietilamida do ácido lisérgico) (FARNSWORTH, 1968; WEIL, 2001).

Na busca para verificar efeitos funcionais nos compostos alimentícios, estudos são montados para verificar seus efeitos sobre o comportamento de animais e humanos, ao consumi-los. Em relação às especiarias, em especial, a noz-moscada não é mencionada. Entre outras necessidades aportadas por estes conhecimentos chama a atenção a falta de estudos sobre o efeito crônico e subcrônico decorrentes do consumo freqüente de alimentos diversos e bebidas contendo esta especiaria. Deve-se considerar que os efeitos diretos sofridos pelos condimentos, submetidos a tratamentos térmicos e em associação com outros componentes, durante o preparo dos alimentos, pode resultar em efeitos complexos e secundários que dificilmente seriam atribuídos a ingredientes adicionados em tão pequenas quantidades e que podem ser salientados em testes crônicos (IDLE, 2005).

Para o estudo do comportamento animal, os modelos experimentais envolvendo o estudo do sistema nervoso central (SNC) surgiram a partir da metade do século XX. Neste campo de estudo, investiga-se as interações entre substâncias químicas, extratos de plantas, fármacos ou drogas de abuso e respostas comportamentais, de modo que se possa inferir relações entre os vários comportamentos manifestados e o respectivo suporte neurobiológico (LAPA et al, 2003).

1.11.1 Teste de atividade locomotora espontânea – Teste de Campo Aberto (Open field)

Hall (1941) e Bruhwylar (1991) descreveram o teste, que deve ser realizado em ambiente climatizado. O campo aberto quadrangular, adaptado para camundongos, mede: 25x30x25 cm, dividido em 12 quadrados iguais, com uma parede de vidro para permitir a visualização do animal, testado pelo período de 5 minutos, com auxílio de cronômetros para o registro: 1) deslocamento pelos quadrados periféricos, como signo de atividade exploratória; 2) pelos quadrados centrais, como atividade ansiolítica; 3) o levantar-se sobre as patas traseiras (“rearing”); 4) a auto-limpeza (“grooming”); 5) a imobilização do animal (“freezing”) e 6) a defecação (bolos fecais eliminados), como índices de emocionalidade.

A taxa de ambulação e a defecação verificadas durante este tipo de teste, são válidas porque estão relacionadas a alterações fisiológicas associadas à emocionalidade, pois animais expostos ao estresse ou a novos estímulos têm aumentados os níveis de secreção de esteróides, situação confirmada por Levine et al (1967). Verifica-se associação entre estresse ou novos estímulos e aumento na secreção de esteróides, o que provoca menores taxas de ambulação e altas taxas de defecação, caracterizando a denominação proposta por Denenberg (1969), de animal emocional. Não havendo alteração do estado emocional, os níveis de esteróides são baixos, a ambulação é alta e a defecação é baixa. Deste modo, este aparelho tradicionalmente tem sido utilizado para medir emocionalidade, sendo útil para avaliar a ansiedade, com o auxílio de substâncias ansiolíticas ou ansiogênicas, além de possibilitar o estudo da atividade locomotora e exploratória (BRUHWYLER et al, 1991; XAVIER, 1999).

O número de vezes em que o animal faz exploração do ambiente, levantando-se sobre as patas traseiras (rearing), é uma resposta muito comum entre os roedores, tendo sido proposta por Lat (1963) (apud BIRKE e ARCHER, 1983) e desde então tem sido utilizada para mensurar o nível de excitabilidade e que também se correlaciona com os procedimentos de auto-limpeza (grooming).

1.11.2 Testes de ansiedade - Teste do Labirinto em Cruz Elevado (Elevated Plus-Maze)

Este teste foi proposto em 1985, por Pellow et al. e em 1990 foi revisto por Lister, devendo ser realizado em ambiente climatizado e em semi-obscuridade, utilizando o equipamento denominado labirinto em cruz elevado que apresenta uma plataforma central (5x5 cm) ligando os dois braços abertos (30 x 5 x 2 cm) e os dois braços fechados (30 x 5 x 25 cm), estando elevado a 45 cm do chão. Cada animal, a ser testado, permanece durante 5 minutos, e deve ser colocado na arena central, com a cabeça voltada para um dos braços fechados, registrando-se: 1) a frequência de entrada nos braços abertos e nos fechados; 2) o tempo de permanência nos braços abertos e nos fechados; 3) a frequência de levantar sobre as patas traseiras ("rearing"). Um aumento dos parâmetros relativos aos braços abertos indica um efeito ansiolítico, enquanto um efeito ansiogênico é apontado por uma redução nos valores registrados para estes mesmo parâmetros. Segundo Rodgers et al. (1997) o número de entradas nos braços fechados apresenta correlação positiva com a atividade locomotora dos animais.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERNETHY, M.K., BECHER, L.B. Acute nutmeg intoxication. **The American Journal of Emergency Medical**, 10(5):429-430, 1992.

AL-KHATIB, I.M.H., MOURSI, S.A.H., MEDÍ, A.W.R. e AL-SHABIBI, M.M. Gas-liquid chromatographic determination of fatty acids and sterols of selected Iraqi foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, 1(1): 59-64, 1988.

ARCHER, A.W. Determination of safrole and myristicin in nutmeg and mace by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, 438: 117-121, 1988.

ASSOCIATION of OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNACIONAL. AOAC. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. Editora Arlinton, 17 th, Washington, DC, 2000.

BEYER, J.; EHLERS, D.; MAURER, H.H. Abuse of nutmeg (*Myristica fragans* Houtt.): studies on the metabolism and the toxicologic detection of its ingredients elemicin, myristicin, and safrole in rat and human urine using gas chromatography/mass spectrometry. **Therapeutic and Drug Monitoring**. 28(4):568-75, 2006.

BIANCHI, JD, DECKER, MW, SULLIVAN JP The pharmacology of nicotine and novel cholinergic channel modulators. **Advents of Pharmacology**, 37:153-214, 1999.

BIRKE, L.I.A. & ARCHER, J. Some issues and problems in the study of animal exploration. In BIRKE, L.I.A. & ARCHER, J. **Exploration in animals and humans**. University Press, Cambridge, 279 p. 1983.

BLIGH, E.G., DYER, W. J. A. Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. 1959; 37 (8): 911-917.

BRENNER, N, FRANK, OS, KNIGHT, E. Chronic nutmeg psychosis. **Journal of Real Society of Medical**, 86:179-180, 1993.

BRUHMYLER, J.; CHLEIDE, E.; LIÉGEOIS, J-F; DELARGE, J. & MERCIER, M. Effects of specific dopaminergic agonists and antagonists in the opens field test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 39: 367-371, 1991.

CARVALHO, H.H., JONG, E.V.; BELLÓ, R.M.; SOUZA, R.B.; TERRA, M.F. **Alimentos: Métodos Físicos e Químicos de Análise**. Editora da Universidade, UFRGS, Porto Alegre, 2002.

CECCHI, H.M. **Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos**. Ed. UNICAMP, Campinas, SP, 2ª ed., 2003.

CHOO, L.C. , WONG, S.M., LIEW, K.Y. Essential oil of nutmeg pericarp. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 79:1954-1957, 1999.

CULÍKOVÁ, V. Assortment of the plants in the Medieval diet in Czech countries (based on archeobotanical finds). **Acta Universia Carol Medicka**. 41(1-4):105-18, 2000.

DENENBERG, V.H. Open-field behavior in the rat: what does it mean? **Annual of New York Academy of Science**, 159:852-859, 1969.

DE VICENZI, M, DE VICENZI, A, SILANO, M. Constituents of aromatic plants: elemicin. **Fitoterapia**, 75:615-618, 2004.

DINAKAR, HS. Acute psychosis associated with nutmeg toxicity. **Medical Times**, 105:63-64, 1977.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Report No. 1: Nutmeg processing and marketing in Grenada**. By Daniel, D. in – www.fao.org – acessado em agosto/2004.

FARNSWORTH, N.R. Hallucinogenic plants. **Science**, 162:1086-1092, 1968.

FORRESTER, M.B. Nutmeg intoxication in Texas, 1998-2004. **Human & Experimental Toxicology**. 24(11):563-6, 2005.

GERHARDT, U. **Especias y Condimentos**. Ed. Acibia, Zaragoza, España, 1975.

GIACOMETTI, D.C. Ervas condimentares e Especiarias. Ed. Nobel, São Paulo, 113 p., 1989.

GROVER, JK; KHANDKAR, S; VATS, V; DHUNNOO, Y and DAS, D. Pharmacological studies on *Myristica fragans* – antidiarrheal, hypnotic, analgesic and hemodynamic (blood pressure) parameters. **Methods and Finding Experimental Clinical Pharmacology**, 24(10):675-80, 2002.

HALL, C.S. Temperament: A survey of animal studies. **Psychology Bulletin**. 38:909-943, 1941.

HALLSTROM, H, THUVANDER, A. Toxicological evaluation of myristicin. **Natural Toxins**, 5(5):186-92, 1997.

HODGSON, E, RYU, D-Y, ADAMS, N and LEVI, PE Biphasic reponses in synergistic interactions. **Chemical Mixtures and Quantitative Risk Assessment**, 105(2-3):211-216, 1995.

HOFFMANN, A.; HEIDEN, A.; PFANNKOCH, E. Flavor profiling of beverages by stir bar sorptive Extraction (SBSE) and thermal desorption GC/MS/PFPD. **Global analytical solutions- AppNote**, 4:15 p., 2000.

HUSSAIN, S.P.; RAO, A.R. Chemopreventive action of mace (*Myristica fragans*, Houtt) on methylcholanthrene-induced carcinogenesis in the uterine cervix in mice. **Cancer Letters**, 56(3):231-4, 1991.

IDLE, J.R. Christmas gingerbread (Lebkuchen) an Christmas cheer – review of the potential role of mood elevating amphetamine-like compounds formed in vivo an in furno. **Prague Medical Reports**, Republica Tcheca, 106(1):27-38, 2005.

IPCS-INTOX The International Programme on Chemical Safety - **Canadian Center for Occupational Health and Safety** – in www.intox.org. – consulta em setembro/2004.

JANSSENS, J, LAEKEMAN, GM, PIETERS, LAC, TOTTE, J, HERMAN, AG and VLIETINCK, AJ. Nutmeg oil: Identification and quantitation of its most active constituents as anhibitors of platelet aggregation. **Journal of Ethnopharmacology**, 29(2):179-188, 1990.

JANNU, L.N. HUSSAIN, S.P. and RAO, A.R. Chemopreventive action of mace (*Myristica fragans*, Houtt) on DMBA-induced papillomagenesis in the skin of mice. **Cancer Letters**, 56(1):59-63, 1991.

KELLY, B.D. & GAVIN, B.E. Nutmeg and Psychosis. **Schizophrenia Research**,60:95-96, 2003.

KENJI, H. & TAKEMASA, M. **Ciencia y Tecnologia de las Especies**. Ed. Acribia Zagoza (Espana), 241p., 2002.

KRESANEK, J.; PLACKOVA, S.; CAGANOVA, B.; KLOBUSICKA, Z. Drug abuse in Slovak Republic. **Przegl Lek**. 62(6):357-60; 2005.

LAPA, A.J.; SOUCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; CASTRO, M.S.de A.; LIMA, T.C.M. **Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Mediciniais**. Soc Bras. Plantas Mediciniais. São Paulo. 2003.

LEE, BK, KIM,JH, JUNG, JW, CHOI,JW, HAN,ES, LEE, SH, KO,KH and RYU, JH Myristicin-induced neurotoxicity in human neuroblastoma SK-N-SH cells, **Toxicology Letters**, 153:310-18, 2005.

LEE, HS, JEONG, TC, JEONG, HK In vitro and in vivo metabolism of myristicin in the rat. **Journal of Chromatography B**, 705:367-372, 1998.

LEVINE, S.; HALTMEYER, G.C.; KARAS, G.G. & DANENBERG, V.H. Physiological behavioral effects of infantile stimulation. **Physiology and Behavior**, 2:55, 1967.

LIS-BALCHIN, M.; HART, S. A preliminary study of the effect of essential oils on skeletal and smooth muscle in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, 58:183-7, 1997.

LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology and Therapeutic**.46:321-340, 1990.

MCKEE, L.H., THOMPSON, L.D. E HARDEN, M.L. Effect of three grinding methods on some properties of nutmeg. **Lebensm Wiss Technology**. 26:121-125, 1993.

MESSIHA, FS and ZAKI, NN Effect of nutmeg on ethanol and d-amphetamine-produced alteration of locomotor activity in the mouse. **Veterinary and Human Toxicology**, 26(2):17-20, 1984.

MOREIRA, AL, SOUZA, PO, KAPLAN, MAC, PEREIRA, NA, CARDOSO, GL and GUIMARÃES, EF. Effect of leaf essential oil from *Piper solmsianum* C.DC. in mice behaviour. **Anuário da Academia Brasileira de Ciências**, 73(1):122-27, 2000.

MORGAN, R. **Enciclopédia das Ervas e Plantas Medicinais**, Ed. Hemus, 1 ed., São Paulo, SP, 1994.

MUKHERJEE, P.K.; KUMAR, V.; HOUGHTON, P.J. Screening of Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Phytotherapeutic Research**, 2007. in press.

NARASIMHAN, B.; DHAKE, A.S. Antibacterial principles from *Myristica fragans* seeds. **Journal of Medical and Food**. 9(3): 395-9, 2006.

NGUEFACK, J.; LETH, V.; AMVAM ZOTTO, P.H. e MATHUR, S.B.. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Camerom for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **International Journal of Food Microbiology**, 94: 329-334, 2004.

NGUYEN, D. V.; TAKÁCSOVÁ, M.; DANG, M.N. AND KRISTIÁNOVÁ, K. Stabilization of rapeseed oil with allspice, clove and nutmeg extracts. **Nahrung** 44(4):281-282, 2000.

OLAJIDE, OA, AJAYI, FF, EKHELAR, AI, AWE, SO, MAKINDE, JM and ALADA, AR. Biological effects of *Myristica fragans* (nutmeg) extract. **Phytotherapeutic Research**, 13(4):344-5, 1999.

OZAKI, Y, SOEDIGDO, S WATTIMENA, YR and SUGANDA, AG. Antinflammatory effect of mace, aril of *Myristica fragans* Houtt., and its active principles. **Japanese Journal of Pharmacology**, 49(2):155-63, 1989.

PAYNE, R.B. Nutmeg intoxication. **New England Journal of Medical**. 269:36-38, 1963.

PANAYOTOPOULOS, DJ, CHISHOLM, DJ. Hallucinogenic effect of nutmeg. **British Medical Journal**, 1:754, 1970.

PARLE, M.; DHINGRA, D.; KULKARNI, S.K. Improvement of mouse memory by *Myristica fragans* seeds. **Journal of Medical Food**, 7(2):157-61, 2004.

PECEŸSKI, J, SAVKOVIC, N, RADVOJEVIC, D and VUKSANOVIC, L. Effect of oil of nutmeg on the fertility and induction on meiotic chromosome rearrangements in mice and their first generation. **Toxicology Letters**, 7(3):239-244, 1981.

PELLOW, S. Anxiolytic and anxiogenic drug effects in a novel test of anxiety: a exploratory model of anxiety in rodents valid? **Methods and Findings in Experimental Clinical Pharmacology**. 8:557-565, 1986.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E. & BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**. 14(#):149-67, 1985.

PELLOW, S. e FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 24:525-529, 1986.

RAM, A.; LAURIA, P.; GUPTA, R.; SHARMA, V.N. Hypolipidaemic effect of *Myristica fragans* fruit extract in rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**, 55:49-53, 1996.

RANDERATH, K. ; PUTMAN K.L. and RANDERATH, E. Flavor constituents in cola drinks induce hepatic DNA adducts in adult and fetal mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 192(1):61-68, 1993.

- RAFOLS, W. **Aprovechamiento Industrial de los Productos Agrícolas**. Salvat Editores S.A., Barcelona, España, 1963.
- RODGERS,R.J.;CAO,B.J.;DALVI, A. & HOLMES,A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medicine and Research**. 30:289-304. 1997.
- SANGALLI, B.C.; CHIANG, W. Toxicology of nutmeg abuse. **Journal of Toxicology and Clinical Toxicology**. 38(6):671-8. 2000.
- SERRY, CJ; RAY, LE and HERON, RE. The pharmacological effects of the ligroin extract of nutmeg (*Myristica fragans*). **Journal of Ethnopharmacology**, 6(1):61-6, 1982.
- SHULGIN, A. Possible implication of myristicin as a psychotropic substance. **Nature**, 210(5034):380-4, 1966.
- SOLIMAN, K.M. ; BADEAA, R.I. 2003, Effect of extracted from some medicinal plants on differen mycotoxigenic fungi, **Food and Chemical Toxicology**, 40: 1669-1675.
- SONAVANE, GS; SARVEIYA, VP; KASTURE, VS and KASURE, SB. Anxiogenic activity of *Myristica fragans* seeds. **Pharmacology Bichemistry and Behavior**, 71:247-252, 2002.
- SPRICIGO, CB; PINTO, LT; BOLZAN,A e NOVAIS, AF. Extraction of essencial oil and lipids from nutmeg by liquid carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, 15:253-259, 1999.
- STAHL, S.M. **Psicofarmacologia – Base Neurocientífica e Aplicações Práticas**. Ed. Médica e Científica, 2ª ed., Rio de Janeiro, RJ, 2002.
- STANFILL, SB; BROWN CR; YAN, XJ; WATSON,CH; ASHLEY,DL. Quantification of flavor-related compounds in the unburned contents of bidi and clove cigarettes. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, 54(22):8580-8, 2006.
- STEIN, U, GREYER, H, HENTSCHEL, H. Numeg (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.

TAJUDDIN; AHMAD, S; LATIF, A. and QASMI, I.A. Aphrodisiac activity of 50% ethanolic extracts of *Myristica fragans* Houtt. (nutmeg) and *Syzygium aromaticum* (L) Merr. & Perry. (clove) in male mice: a comparative study. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 3(1):6, 2003.

TAJUDDIN; AHMAD, S; LATIF, A; QASMI, I.A. and AMIN, K.M.Y. An experimental study of sexual function improving effect of *Myristica fragans*, Houtt. (nutmeg). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 5:16, 2005.

TATEO, F.; BONONI, M.; MARTELLO, S.; COMMISSATI, I. Identificazione di safrolo, metil-eugenolo, miristicina, elemicina per GC/MS e GC/HRMS in bevande "cola". **Industria delle Bevande**, 29(2):14-20, 2000.

TATEO, F.; BONONI, M.; LUBIAN, E.; MARTELLO, S.; FASAN, S. Prodotti a base di carne aromatizzati con macis e noce moscata determinazione analitica di safrolo e safrolo-simili. **Industrie Alimentari**, 38(9):941-945; 1999.

TOMAINO, A., CIMINO, F., ZIMBALATTI, VENUTI, A.A.; DE PASQUALE, A.; SAIJA, A.. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. , **Food Chemistry**, 40: 1669-1675, 2002.

TRUITT, E.B.; CALLAWAY, E.; BRAUDE, M.C.; KRANTZ, J.C. The pharmacology of myristicin; a contribution to the psychopharmacology of nutmeg. **Journal of Neuropsychiatry**. 2: 205-10.1961

UCHIBAYASHI, M. The nutmeg story. **Yakushigaku Zasshi**, 36(1):76-9, 2001.

UPCC – UTAH POISON CONTROL CENTER - **Utox Update**, 5:4; 2003 - <http://unhsc.utah.edu/poisonon> - acessado em agosto/2004.

VIARENGO A, BURLANDO, B CVALETTO, M, MARCHI, B, PNZANO, E, and BLASCO, J. Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **American Journal of Physiology**, 46:R1612-R1619, 1999.

XAVIER, G.F. (org.) **Técnicas para o estudo do sistema nervoso**. São Paulo. Ed Plêiade, 1999.

YUAN,Z.M.; WANG, J.; LV, J. , JIA, T.Z. Comparing analysis of components in volatile oils of nutmeg and prepared nutmeg by GC-MS. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**. 31(9):737-9, 2006.

YUN, C-H, LEE, HS, LEE, H-Y, YIM, S-K, KIM, K-H, KIM, E, YEA, S-S, Guengerich, FP. Roles of human liver cytochrome P450 3A4 and 1A2 enzymes in the oxidation of myristicin. **Toxicology Letters**, 137:143-150, 2003.

WANG, Y, Cheng, C and LI, B. Direct identification of *Myristica fragans* and *Myristica* sp. By FTIR. **Zhong Yao Cai**, 26(1):14-5, 2003.

WANG, Y.; YANG, X.W.; TAO, H.Y.; LIU, H.X. GC-MS analysis of essential oils from seeds of *Myristica fragans* in Chinese market. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**. 29(4):339-42, 2004.

WEIL, A.T. The use of nutmeg as a psychotropic agent. Harvard Medical School. Massachusetts, USA 16 pgs, 2001. in <http://leda.lycaeum.org> - consulta em agosto/2004.

www.emedis.com.br/fit/nozmoscada - consulta em 17/06/2007.

www.erowid.org/plants/nutmeg, consulta em 12/10/2004.

www.ildue.it - consulta em 10/06/2007.

www.nozmoscada.com.br - consulta em 17/06/2007.

www.qmc.ufsc.br - consulta em 17/06/2007.

CAPÍTULO III - DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL

Este capítulo está composto por dois artigos que apresentam os resultados experimentais obtidos no desenvolvimento desta dissertação:

1. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO - QUÍMICA E DETERMINAÇÃO DE MIRISTICINA EM NOZ - MOSCADA (*Myristica fragans*, Houtt).

2. EFEITOS DA INFUSÃO DE *Myristica fragans*, Houtt SOBRE O COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS TRATADOS CRONICAMENTE.

**CAPÍTULO III. 1 - Caracterização físico -
química e determinação de miristicina em
noz- moscada (*Myristica fragans*, Houtt.).**

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E DETERMINAÇÃO DE MIRISTICINA EM NOZ- MOSCADA (*Myristica fragans*, Houtt)

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo caracterizar físico-quimicamente e determinar o conteúdo de miristicina em noz-moscada comercializada para preparo de alimentos. Foram coletadas amostras em semente e em pó, em duas regiões distintas. Os procedimentos da AOAC (2000) foram adotados para determinar: umidade, extrato etéreo, proteína e cinzas. A miristicina foi determinada por Cromatografia Gasosa em extrato hidroalcoólico das sementes, da fração lipídica e da infusão. Foram encontrados valores médios de 9,45 (±1,5); 2,1 (±0,46); 8,5 (±2,5); 31,9 (±9,3); 49,9(±10,6) para os percentuais de umidade, cinza, proteína, extrato etéreo e outros, respectivamente. A miristicina variou de 8,0 mg/g a 37,4 mg/g de amostra nas frações estudadas, sugerindo que em infusões aquosas os teores consumidos podem vir a ser maiores do que quando se emprega a semente sólida no preparo de alimentos.

Palavras-chave: miristicina, noz-moscada, cromatografia gasosa, caracterização físico-química.

1. INTRODUÇÃO

A noz-moscada, *Myristica fragans*, Houtt, é uma planta originalmente cultivada no oriente para fins medicinais. Em meados da idade média a semente desta planta passou a ser utilizada no ocidente como condimento em preparações domésticas e industriais de alimentos doces, salgados e bebidas. A indústria farmacêutica emprega também os óleos essenciais desta semente para formulação de medicamentos para tratamento de infecções respiratórias e danos do aparelho digestório, enquanto a indústria de cosméticos emprega-os na aromatização de cosméticos (CULÍKOVÁ, 2000; HIRASA & TAKEMASA, 2002).

A cultura popular atribui ao chá da semente propriedades curativas de distúrbios do aparelho digestório e respiratório, além de potente atividade estimulante, sob determinadas condições de preparo e atividade calmante em outras. A ingestão da semente ou extratos concentrados de noz-moscada provoca demonstrada atividade psicoativa, sendo por isso empregada por dependentes químicos, que ingerem em média 20 g para obterem os efeitos alucinatórios da droga. A ingestão deste condimento, em quantidades não usuais, de modo acidental ou intencional, tem levado à intoxicações, potencialmente letais, caracterizadas por quadros excitatórios, alucinatórios e distúrbios no aparelho digestório, como os mais freqüentes (MORGAN, 1994; www.qmc.ufsc.br, 2007)

Farnsworth, (1968); Lee, et al. (1998) e Yun et al. (2003) relataram que o óleo essencial da semente de noz-moscada contém vários compostos precursores metabólicos de compostos do tipo MDA (melienodioxianfetamina), responsáveis pelo efeito psicoativo que ocorre em doses elevadas. Segundo Lee et. al, (1998) 20 gramas de noz moscada, que contém, aproximadamente, 210 mg de miristicina (potencial MDMA: 3-metoxi-4,5-metilenodioxianfetamina), 70 mg de elemicina (potencial TMA: 3-metoxi-4,5-metilenodioxianfetamina) e 39 mg de safrol (potencial MDA), que podem ser convertidos, in vivo, para as formas amínicas isto é, MDA, MDMA e TMA. Estes compostos são potencialmente causadores de dependência química semelhante a causada pelo consumo de anfetaminas (SHULGIN, 1966; STEIN, 2001).

As características flavorizantes e o caráter conservador (antimicrobiano e antioxidante), anticancerígeno bem como o efeito tóxico da semente são atribuídos aos óleos essenciais que a constituem (MCKEE et al, 1993; RANDERATH et al, 1993; MORGAN, 1994; TOMARINO et al, 2005; www.qmc.ufsc.br, 2007).

Em experimentos realizados ministrando miristicina (5-alil-1-metilenodioxibenzeno) (Figura 1), em animais de laboratório, para avaliar alterações de DNA de fígado, foi verificado um efeito indutor da glutathione S-transferase abrindo a perspectiva de ação anti tumorigênese (LEE et al, 1998 e YUN et al 2003).

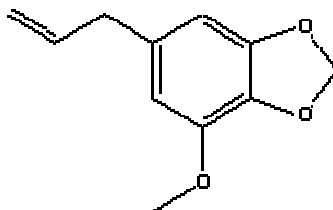


Figura 1: Estrutura da miristicina (5-alil-1-metilenodioxibenzeno).

Este composto, de propriedades pouco usuais e controversas, é também encontrado em outros vegetais, tais como, cenoura, pimenta preta e em óleos essenciais de diferentes agentes flavorizantes. Também foi detectada sua presença em refrigerantes do tipo cola e em outras bebidas fermentadas (HOFFMANN et al, 2000; HIRASA e TAKEMASA, 2002).

Considerando o emprego deste condimento no preparo de diversas formulações alimentícias, incluindo refrigerantes (LEE, et al. 1993; MORGAN; 1994; HOFFMANN, et al. 2000; DE VICENZI et al. 2004, www.qmc.ufsc.br, 2007), associados a outras fontes naturais de miristicina, seria interessante avaliar o risco/benefício do consumo crônico deste composto nas diferentes formas em que pode aparecer na dieta. Especialmente, considerando-se as controvérsias sobre o seu potencial benéfico, tóxico, psicoativo, cancerígeno e inibidor de tumorigênese (RANDERATH et al. 1993 e LEE et al. 1998).

No entanto, não é usual a literatura tratar o estudo da miristicina sob a ótica da ciência de alimentos e determinar o conteúdo deste composto nas diferentes formas que poderiam estar disponíveis para consumo. Até porque as quantidades empregadas não são claramente definidas nas formulações utilizadas.

Com propósito de contribuir para futuras avaliações de propriedades benéficas e tóxicas da noz- moscada nas formas usuais de seu emprego, o objetivo deste trabalho foi caracterizar físico – químicamente e determinar os teores de miristicina em sementes, óleo essencial e infusão aquosa de noz moscada, nas formas como estão disponíveis para serem empregados em formulações alimentícias e chás medicinais para preparo industrial e doméstico.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Amostragem e Preparo das amostras

As amostras foram adquiridas em estabelecimentos comerciais da cidade de Rio Grande e Pelotas (RS) e Piracicaba (SP). Foram compostos seis lotes com as amostras coletadas nas diferentes regiões, sendo três de noz-moscada inteiras e três de noz-moscada moída, agrupados por similaridade de marca comercial.

As sementes foram trituradas em moinho de facas da Marca Tecnal durante 40 segundos a 1200 g e armazenadas em frascos escuros, evacuados sob atmosfera de nitrogênio e guardados em ambiente fresco e ao abrigo da luz.

2.2. Composição Centesimal

A composição centesimal das amostras preparadas foi determinada conforme os procedimentos recomendados pela AOAC (2000). As determinações foram: umidade em estufa com circulação de ar a 60°C até peso constante; cinzas em mufla a 550° C durante 3 horas; extrato etéreo obtido em sistema Soxhlet após refluxo de 6

horas com hexano; proteína pelo micrométodo de Kjeldahl empregando o fator 6,25 para conversão do percentual de nitrogênio em proteína.

2.3. Determinação de miristicina

2.3.1. Estabelecimento de condições para cromatografia gasosa

A solução estoque de miristicina foi preparada dissolvendo 100 mg de padrão, adquirido da Sigma Chemical Company, em 10 mL de polietilenoglicol. A solução padrão foi preparada diluindo 1 mL de solução estoque em 25 mL de hexano homogeneizando a mistura em banho-ultra sônico por 5 minutos. A partir dela foram preparadas soluções contendo 50, 100, 200, 300, 400 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ para comporem as concentrações da curva analítica a serem injetadas em cromatógrafo gasoso (1 μL para cada diluição).

As condições cromatográficas padronizadas foram: injetor split/splitless a 250°C, detector de ionização de chama a 300°C, gás de arraste hidrogênio 1 mL/minuto, coluna cromatográfica DB-17 de 30m, com 0,25mm de diâmetro interno; programação da coluna de 50°C/1minuto, aumentando 8°C/minuto até 180°C totalizando 25 minutos. A identificação da miristicina foi realizada por comparação do tempo de retenção com padrão e confirmação por co-cromatografia. Para quantificação da miristicina nas amostras foi empregada padronização externa com uma curva analítica de miristicina que variou nas concentrações de 10 ng a 250 ng/ μL .

O limite de quantificação foi determinado diluindo-se o extrato hidrotérmico de cada preparação até que o pico observado tivesse área equivalente ao da menor diluição da miristicina na curva analítica.

A recuperação do procedimento foi testada empregando adição de solução de miristicina em três níveis (1; 2 e 3 mg. g^{-1} de noz-moscada moída) seguindo-se o procedimento padronizado para cada condição de preparo.

2.3.2. Determinação de miristicina em extrato hidrotérmico da noz- moscada

Para obtenção do extrato hidrotérmico de noz moscada foram utilizadas amostras moídas (no momento da coleta ou como forma de preparo no laboratório), das quais foram pesadas 15 g que foram submetidas a destilação por arraste a vapor em destilador de Clevenger. O destilado foi coletado padronizando-se o volume coletado e monitorando o índice de refração, em refratômetro tipo Abbé, à temperatura de 55°C. O extrato foi avolumado a 25 mL, sendo que 5 mL foram submetidos a partição com hexano (3 partições de 10 mL) Os eluidos foram evaporados e guardados sob atmosfera de N₂ até o momento do uso.

2.3.3. Determinação de miristicina em extrato hidrotérmico da fração lipídica das sementes de noz moscada

A fração lipídica das amostras foi extraída a frio empregando o método de Bligh-Dyer (1959), cujo procedimento consistiu em: pesar 5g de amostra moída às quais foi adicionada de uma mistura de 30mL de solução metanol : clorofórmio : água (2:1:0,8). O volume de água acrescentado na mistura levou em consideração a proporção de solventes e conteúdo de umidade da amostra.

A mistura foi homogeneizada em erlenmeyer com tampa por 30 minutos em agitador horizontal. Foram adicionados 7,5 mL de clorofórmio e 7,5 mL de água destilada seguindo-se a homogeneização por mais 30 minutos. Os sólidos foram separados por centrifugação. O sobrenadante foi submetido a três partições com 10 mL de clorofórmio. As frações clorofórmicas separadas nas diferentes lavagens foram avolumadas a 50 mL, dos quais 10 mL foram coletados e secos em cápsula de porcelana previamente taradas em estufa à 70°C. A massa obtida após a secagem foi utilizada para estimar o percentual de lipídios na amostra.

O restante do óleo extraído foi colocado em balão próprio do destilador de Clevenger para extração hidrotérmica dos óleos essenciais. O material condensado foi coletado em frasco escuro, sendo no volume coletado monitorado o índice de refração em refratômetro tipo Abbé, à temperatura de 55°C . A fração destilada também foi

pesada e avolumada a 50 mL e armazenada em refrigerador, sendo 5 mL submetido a 3 partições com 10 mL de hexano. Este foi evaporado e guardado sob nitrogênio e, no momento do uso, era ressuspenso em 2 mL.

2.3.4. Determinação de miristicina na fração aquosa de sementes de noz-moscada.

Os extratos aquosos foram preparados considerando a elaboração doméstica do chá de noz-moscada. A 10 g de pó de noz moscada foram adicionados 250 mL de água fervente mantendo a temperatura por 5 minutos em banho-maria. Depois o extrato foi resfriado e agitado em agitador horizontal por 60 minutos com o balão tampado, após o que foi filtrado em papel de filtro. Foram tomados 10 mL de filtrado e efetuadas 3 partições com hexano que foram juntados e evaporados sob nitrogênio. No momento da determinação cromatográfica o extrato seco foi ressuspenso com 1 mL de hexano.

A **Figura 2** apresenta o organograma do procedimento adotado para obtenção de cada fração estudada.

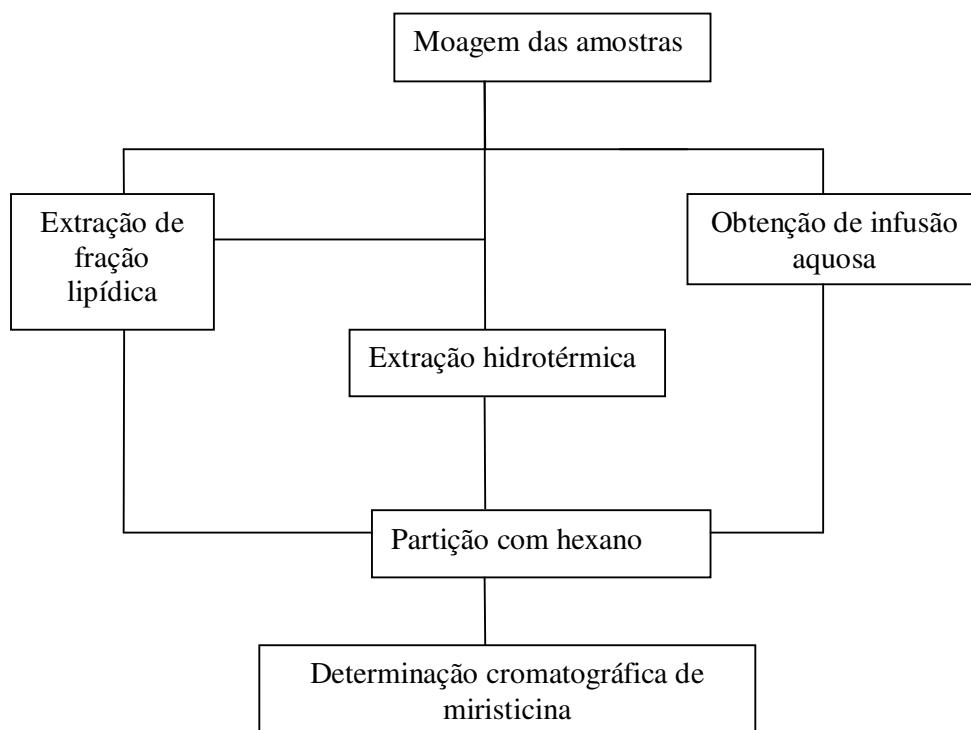


Figura 2- Organograma das etapas da determinação de miristicina em preparados de noz-moscada.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Composição Centesimal das amostras de noz- moscada

O **Quadro 1** apresenta as amostras utilizadas para a determinação da composição centesimal e suas respectivas características de venda, incluindo estabelecimento e preço.

Quadro 1 - Amostras de noz-moscada utilizadas e suas respectivas características de comercialização.

Amostras	Apresentação comercial	Marcas	Conteúdo das embalagens (g)	Custo em R\$	Custo em R\$/ grama
1	Pó	A	70	10,59	0,15
2	Pó	A	50	6,99	0,14
3	Pó	A	30	5,95	0,20
4	Sementes	B	5	1,60	0,32
5	Sementes	A	15	6,69	0,45
6	Sementes	A	8	1,59	0,20

A, B= marcas;

No **Quadro 1** encontram-se os valores médios da matéria-prima coletada nas diferentes regiões amostradas. Independente da região da coleta pode ser observado que, apenas uma empresa comercializa noz-moscada na forma de pó em ampla distribuição e que o preço do grama na forma de pó é três vezes inferior ao da semente. O fato sugere que o produto pode ser constituído por sementes que não apresentavam aparência adequada para o padrão de comercialização, provenientes de longo período de armazenamento ou misturado a outros materiais, especialmente considerando-se que a moagem constitui-se numa operação que poderia agregar valor e não baratear uma produção.

Em vista da observação dos dados anteriores foi avaliada a composição centesimal usualmente empregada para caracterizar matrizes de alimentos, cujos resultados estão na **Quadro 2**, separados pelos lotes formados durante as diferentes coletas.

Quadro 2 – Composição centesimal das amostras de sementes de noz-moscada.

Amostras	% de umidade (CV%)	% de cinzas (CV%)	% proteínas (CV%)	% extrato etéreo (CV%)	% outros
1 (pó)	10,3 (15%) ^a	2,5 (13%) ^a	5,9 (11%) ^a	36,0 (14%) ^a	45,3
2 (pó)	9,3 (17%) ^b	2,8 (17%) ^a	9,5 (6,9%) ^b	26,9 (13,2%) ^b	63,6
3 (pó)	6,7 (9%) ^c	1,9 (11%) ^b	12,9 (9,5%) ^c	15,2 (6,0%) ^c	63,3
4 (noz)	10,4 (12%) ^a	1,6 (7,8%) ^c	7,7 (5,0%) ^d	38,0 (13,6%) ^a	42,3
5 (noz)	9,0 (15%) ^b	2,0 (6,5%) ^b	8,3 (6,3%) ^e	37,2 (14,2%) ^a	43,3
6 (noz)	11,0 (16,4%) ^d	1,8 (9%) ^b	6,8 (6,2%) ^f	38,6 (15,0%) ^a	41,8

Letras diferentes= diferenças significativas em nível de 95%.

CV%= coeficiente de variação de 6 determinações.

A observação do **Quadro 2** mostra que os teores de umidade e extrato etéreo são os que apresentam os maiores coeficientes de variação para a mesma marca e conseqüentemente diferiram significativamente entre os lotes. As diferenças observadas entre as amostragens são conseqüências da variabilidade das amostras ou decorrentes do erro inerente das determinações analíticas.

Os resultados da determinação de matéria nitrogenada das amostras comercializadas sob a forma de pó diferiram significativamente entre si, sendo que a variação entre os teores chegava ao dobro. Este fato corrobora com a possibilidade de emprego de sementes de características diferentes do padrão ou de adição de outros particulados para a formulação do produto. Na fração cinza, esta mesma tendência foi verificada, pois seus teores, nas amostras comercializadas como pó, foram superiores aos das sementes inteiras (noz).

Para determinações de qualidade em condimentos e especiarias as informações disponíveis na literatura observam os procedimentos da “Official Analytical Methods of American Spice Trade Association” (ASTA) o que dificulta a comparação com os dados obtidos neste trabalho. Neste caso a maior diferença em

termos de recomendação metodológica é para a fração umidade, cujo procedimento recomendado pela ASTA é a determinação por destilação. Mc Kee et al. (1993) determinando umidade de sementes de noz-moscada moída sob diferentes condições encontrou valores em torno de 6,8% e menciona que estes resultados foram inferiores ao de Lewis, que reporta 7,7% de umidade. Os valores obtidos neste trabalho foram superiores a estes e estão acima dos 8% recomendados pela FDA, e isto pode ser atribuído à evaporação de voláteis, mesmo à temperatura de 60°C.

Mc Kee et al. (1993) empregaram extrator de Soxhlet e acetona para extrair as resinas das sementes de noz-moscada submetidas à diferentes processos de moagem e obtiveram valores percentuais entre 22 e 46%, atribuindo esta variação aos efeitos das temperaturas de moagem das amostras e à própria variabilidade das sementes nos diferentes lotes estudados. Os resultados apresentados no **Quadro 2** ficaram dentro desta faixa, mesmo empregando hexano como solvente, sendo a exceção um lote de amostras comercializadas sob a forma de particulados. À semelhança dos autores mencionados, o processo de moagem poderia ter sido o responsável pela diferença, ou a matéria-prima é que seria a causa do valor duas vezes inferior ao dos demais lotes estudados.

3.2. Óleos essenciais de noz-moscada

Após a caracterização da composição dos diferentes lotes de amostras de noz-moscada, em pó e sementes, todos os de mesma marca foram homogeneizados antes da continuação das determinações, visto que se pretendia padronizar uma metodologia que permitisse avaliar a distribuição da miristicina nas amostras, sob diferentes formas de consumo em formulações (moída, óleo essencial e infusão). A amostra B, encontrada apenas em uma amostragem, não foi empregada para compor um lote, não foi avaliada por não ter sido mais encontrada nos locais de coleta, durante o período de realização da amostragem.

Os óleos essenciais das frações de noz-moscada foram obtidos por extração hidroalcoólica das amostras sob a forma de pó e do óleo extraído pelo método de Bligh & Dyer. Os resultados das determinações encontram-se no **Quadro 3**, bem

como os índices de refração empregados como indicativo de uniformidade de condições de destilação.

Quadro 3 - Conteúdo de óleos essenciais e índice de refração de amostras de noz- moscada.

Determinações	Noz-moscada moída	Sementes de Noz-moscada
% de óleo no EH	0,6 (CV= 5,3%)	1 (CV= 7,0%)
$\eta^{55^{\circ}\text{C}}$ EH	1,3411 (CV = 1,3%)	1,3631 (CV = 1,5%)
% de óleo B&D	19,1 (CV= 16%)	32,6 (CV= 13,5%)
$\eta^{55^{\circ}\text{C}}$ do óleo B&D	1,4516 (CV =1,4%)	1,4612 (CV = 1,5%)
% de óleo EH da fração lipídica	3,6 (CV=7%)	8,1 (CV=5%)
$\eta^{55^{\circ}\text{C}}$ do óleo EH da fração lipídica	1,3623 (CV= 1,2%)	1,3717 (CV= 1,4%)

EH: extrato hidroalcoólico; η : índice de refração;

CV = coeficiente de variação; B&D: método de Bligh & Dyer, 1959.

Estes resultados mostram que a extração hidroalcoólica, diretamente das amostras moídas, apresentou baixo rendimento para os óleos essenciais, sendo consideravelmente inferiores aos mencionados 4,5 e 5,6% da literatura (www.nozmoscada.com.br,2007; HIRASA e TAKEMASA, 2002 e MCKEE et al. 1993). Possivelmente, isto se deva ao fato de que mesmo uma destilação realizada por tempos superiores a 60 minutos não resolveu a dificuldade inerente do vapor extrair os voláteis do interior da matriz sólida, pois que o índice de refração se manteve constante por 3 horas de destilação. Chama atenção, novamente, a tendência já verificada das sementes comercializadas na forma de pó apresentarem rendimentos em média 40% menores do que as sementes inteiras.

A extração da fração lipídica pelo método de Bligh & Dyer, 1959, resultou em menores teores de lipídios que os encontrados por extração contínua a quente, mas a tendência de que os valores para as amostras de sementes moídas comercializadas fosse menor se manteve e as faixas de óleo obtidas ainda são comparáveis aos teores mencionados por Mc Kee et al. (1993) e aos 33% mencionados em www.nosmoscada.com.br, (2007).

O extrato hidroalcoólico apresentou rendimentos em óleos essenciais em torno de 8% para as sementes de noz- moscada, portanto superior aos dados de literatura 4,5 e 5,6%. Autores como Soliman & Badeaa (2002); Hirasa e Takemasa, (2002) e Tomaino et al. (2005) salientaram a grande variabilidade no conteúdo de óleos essenciais em vegetais aromáticos empregados como condimento, atribuindo o fato às condições de cultivo, preparo e armazenamento do material, além da variabilidade inerente da metodologia de determinação. Situação confirmada neste trabalho. As sementes comercializadas moídas apresentaram os menores rendimentos em óleos essenciais.

3.3. Determinação de miristicina

As características do método padronizado para determinação de miristicina estão apresentados no **Quadro 4**.

Quadro 4 - Características do método para determinação de miristicina em Cromatografia Gasosa em diferentes frações de noz-moscada.

Características	EH sementes	Fração lipídica	EH óleo bruto	Infusão
T retenção (min)	15,6 (CV= 2,6%)	15,4 (CV=2,2%)	15,8 (CV= 2,9%)	15,3 (Cv=2%)
LD (ng)	10	10	10	10
LQ (mg/g am)	6	6	3	8
Recup. média (%)	66	85	88	79
Repetibilidade (CV %)	16	10	9	12

T retenção: tempo de retenção; LD: limite de detecção; LQ: limite de quantificação
CV: coeficiente de variação; EH: extrato hidrotérmico.

Para determinar os tempos de retenção da miristicina nas condições cromatográficas adotadas foram injetados seis repetições de padrão na concentração de 200ng/μL, sendo encontrado o tempo médio de 15,56 minutos (CV= 0,6%).

A confirmação deste tempo de retenção foi avaliada injetando três repetições das concentrações estabelecidas inicialmente para comporem a curva padrão (50 a 400 ng/μL). Foi verificado que a última concentração não apresentava variação linear de área detectada, o que levou a diminuição das concentrações de padrão injetadas para 10 ng/μL a 250 ng/μL, para estabelecer a linearidade da curva analítica de miristicina.

Quando foi injetado o extrato hidrotérmico obtido diretamente das amostras moídas a estimativa dos níveis de recuperação, da repetibilidade e do limite de quantificação da miristicina apresentaram respectivamente os menores e maiores valores, o que torna a determinação nestas formas mais susceptível a erros analíticos. Tal situação era previsível, pois que o rendimento em óleos essenciais foi muito baixo,

o que dificilmente permitiria a recuperação, a menos que se empregassem maiores massas iniciais para a destilação, as quais poderiam saturar a capacidade extratora do equipamento utilizado.

Nos cromatogramas dos extratos hidrotérmicos da fração lipídica e da infusão foram detectados seis picos. O pico correspondente a miristicina foi confirmado por co-cromatografia com o padrão puro, **Figura 3**. As variações no tempo de retenção apresentadas no **Quadro 4** mostram que havia diferenças nos tempos de retenção dos extratos, mais um indicativo de que é possível quantificar a miristicina pela metodologia adotada. No extrato hidrotérmico da fração lipídica das sementes moídas, das sementes inteiras e na infusão a área do pico da miristicina correspondia a 2,2%; 3,32% e 2,4% respectivamente. Estes resultados são similares aos mencionados por Choo et al., (1999).

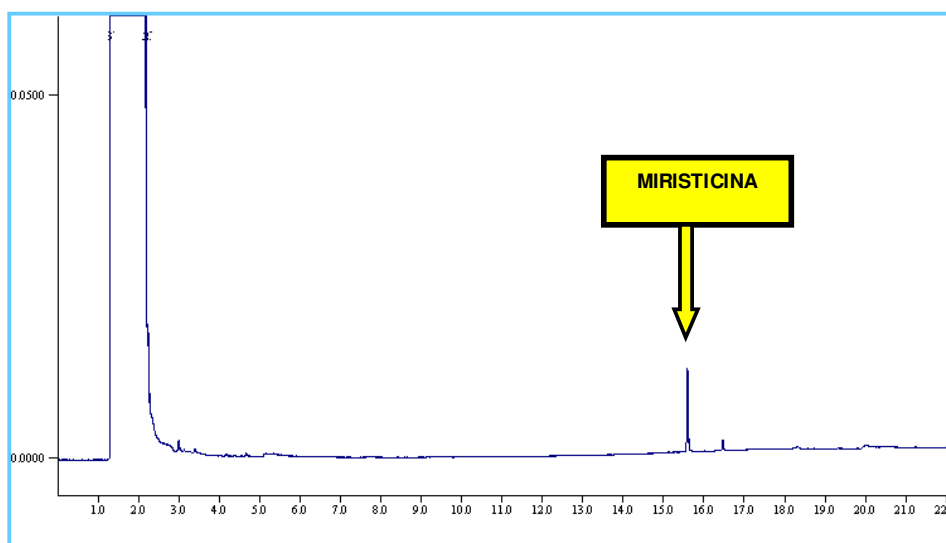


Figura 3 - Cromatograma a partir de infusão de noz-moscada. Tretenção= 15,56 min.

Os resultados dos **Quadros 3** e **4** nortearam as estratégias analíticas adotadas para determinar miristicina nas amostras de sementes de noz moscada comercializadas e preparadas sob diferentes formas. A miristicina foi determinada no extrato hidrotérmico das amostras secas, da fração lipídica das sementes comerciais moídas, sementes inteiras e infusão aquosa e os resultados estão mostrados no

Quadro 5, separados e quantificados por cromatografia gasosa, expressas em mg/g de semente de noz-moscada.

Tomaino et al. (2005) separaram óleo essencial de noz-moscada por cromatografia gasosa, sendo detectados 7 picos correspondentes ao α pineno, β pineno, sabineno, δ terpineno; terpinen-4-ol, safrol e miristicina que correspondia a 35% do total, quando o óleo essencial era submetido 3 horas a 180°C. Em temperaturas variando entre 80 e 120°C os valores médios foram 10,2%. Estas comparações mostram que o procedimento que emprega a extração da miristicina da fração lipídica é o que melhor reflete o conteúdo deste composto em noz-moscada, sem o risco de ter seu rendimento afetado pelas condições de extração.

Quadro 5 – Conteúdo de miristicina em amostras de noz-moscada.

Fração noz-moscada	$\mu\text{g/mL}$ de extrato	mg/g de amostra
EH particulados	12,0	8,0
EH sementes	21,0	14,0
FL particulados	27,0	18,0
FL sementes	37,5	25,0
EH/B&D particulados	12,4	22,4
EH/B&D sementes	36,3	37,4
Infusão	4,0	10,0

EH: extrato hidrotérmico; FL: fração lipídica; B&D: método de Bligh & Dyer, 1959.

Dos resultados pode-se concluir que o emprego de noz-moscada para o preparo de chás propicia um aporte razoável de miristicina para o consumidor, de aproximadamente 1/3 dos valores encontrados a partir dos extratos hidrotérmicos da fração lipídica extraída pelo procedimento de Bligh & Dyer, 1959. Os valores dispostos neste Quadro indicam que o uso de óleos essenciais como flavorizante de bebidas tipo cola pode, neste caso, ser avaliado pelos níveis obtidos nos extratos hidrotérmicos da fração lipídica extraída pelo procedimento de Bligh & Dyer, 1959. Estes dados também emitem um alerta para o risco de consumo crônico de miristicina pelo consumidor, podendo ser estimado pelos valores detectados na fração lipídica e seus respectivos extratos hidrotérmicos. Os teores de miristicina encontrados no extrato hidrotérmico das sementes inteiras, analisadas neste trabalho, foram ligeiramente superiores aos mencionados por Lee et al. (1998) (10,1 mg/g amostra).

Considerando-se que a média de uma semente de noz moscada usada para preparo de chás possui em média 8 g que são preparadas em uma xícara de 200 mL, este consumo acarretaria um aporte considerável de miristicina para o consumidor (80 mg).

Yun et al. (2003) estudando o metabolismo oxidativo de enzimas dos microsomas de fígado humano mostraram que 0,176 μM de miristicina foram oxidados por minuto por μM de enzima resultando no principal metabolito 5-alil-1-metoxi- 2,3 dihidroxybenzeno que pode ser excretado pela urina. Os autores salientam que uma série de compostos da dieta empregam esta mesma via de oxidação para excreção e que o acúmulo de miristicina pode ocorrer em caso de efeitos competitivos resultando em transtornos psicoativos. No caso de consumo da infusão o organismo teria para metabolizar 583 μM .

O uso de noz-moscada em preparo de molhos e doces não pode ser estimado, devido à diversidade de componentes empregados. De Vicenzi (2004) apresenta os níveis de utilização de óleos essenciais de noz-moscada para produtos de panificação: docinhos de forma, 75,22 ppm; produtos cárneos, 148 ppm; temperos prontos, 20,61 ppm; balas, 18,94 ppm e bebidas, 14,5 ppm. Sendo assim, a forma mais aproximada de estimativa seria através do teor encontrado nas sementes e determinadas diretamente no extrato hidrotérmico. Isto faz supor que o aporte através de alimentos não acarretaria riscos de efeitos psicoativos agudos, mas um

estudo de efeito crônico seria interessante especialmente para os indivíduos jovens que consomem com frequência refrigerantes do tipo cola, isoladamente ou em associação com bebidas alcoólicas ou, ainda, em paralelo com maconha (*Cannabis sativa*).

4. CONCLUSÕES

1- As sementes de noz moscada comercializadas na forma de pó apresentam maior variabilidade em sua composição centesimal, especialmente demonstrada pelo teor de nitrogênio (5,9 a 12,9%) e extrato etéreo (15,2 a 36%).

2- O procedimento proposto para determinar miristicina mostrou a melhor performance quando foi realizado no extrato hidrotérmico da fração lipídica extraída a frio, especificamente representados por 88% de recuperação, coeficiente de variação 9% e limite de quantificação de 3 mg. g⁻¹ de amostra.

3- A miristicina pode ser detectada em maiores quantidades no extrato hidrotérmico da fração lipídica das sementes inteiras (37,4 mg. g⁻¹ de amostra) e na fração lipídica obtida de sementes (25,0 mg. g⁻¹ de amostra).

4- Em razão dos teores de miristicina encontrados nas preparações estudadas, seria recomendável que se avaliasse o efeito crônico do consumo de infusões e de bebidas que incluem noz-moscada ou seus óleos essenciais em sua composição.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASSOCIATION of OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNACIONAL. AOAC. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. Editora Arlinton, 17 th, Washington, DC, 2000.

BLIGH, E.G., DYER, W. J. A. Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. 1959; 37 (8): 911-917

CHOO, L.C. , WONG, S.M., LIEW, K.Y. Essential oil of nutmeg pericarp. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 79:1954-1957, 1999.

DE VICENZI, M., VICENZI, A. de, SILANO, M. C., Constituents of aromatic plants: elemicin. **Fitoterapia**, 75: 615-618, 2004.

HIRASA, K. & TAKEMASA, M. **Ciencia y Tecnologia de las Especies**. Ed. Acribia Zagoza (España), 2002, 241p

HOFFMANN, A. ; HEIDEN, A.; PFANNKOCH, E. Flavor profiling of beverages by stir bar sorptive extraction (SBSE) and thermal desorption GC/MS/PFPD, **Global Analytical**, 4:1-15, 2000.

LEE, H.Y.; JEONG, T.C.; JEONG, H.K. . In vitro and in vivo metabolism of myristicin in the rat, **Journal of Chromatography B**, 367-272, 1998.

MOREIRA, AL, SOUZA, PO, KAPLAN, MAC, PEREIRA, NA, CARDOSO, GL and GUIMARÃES, EF Effect of leaf essential oil from Piper solmsianum C.DC. in mice behaviour. **Anuário da Academia Brasileira de Ciências**, 73(1):122-27, 2000.

MORGAN, R. **Enciclopédia das Ervas e Plantas Mediciniais**, Ed. Hemus, 1 ed., São Paulo, SP, 1994.

MCKEE, L.H.; THOMPSON L.D. e HARDEN, M.I.,. Effect of three grinding methods on some properties of Nutmeg, Lebersm. **Wiss u Technology**, 74: 121-125, 1993.

NGUEFACK, J.; LETH, V.; AMVAM ZOTTO, P.H. e MATHUR, S.B.. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Camerom for controlling food spoilage and mycotoxin producin fungi. International **Journal of Food Microbiology**, 94: 329-334, 2004.

RANDERATH, K. ; PUTTMAN, K.L.; RANDERATH, T.H. Flavor constituents in cola drinks induce hepatic DNA aducts in adult and fetal mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 192 (1): 61-68, 1993.

SOLIMAN, K.M. ; BADEAA, R.I. Effect of extracted from some medicinal plants on differen mycotoxigenic fungi, **Food and Chemical Toxicology**, 40: 1669-1675, 2003.

TOMAINO, A., CIMINO, F., ZIMBALATTI, VENUTI, A.A.;DE PASQUALE, A.; SAIJA, A.. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. , **Food Chemistry**, 40: 1669-1675, 2002.

YUN, C.H.; LEE, H.S.; LEE, H.Y. LEE, YIM, S.K., KIM, H., KIM, E., YEA, S.S., GUENGERICH, P. Roles of human liver cytochrome P450 3A4 and IA2 enzymes in the oxidation of myristicin. **Toxicology Letters**, 137: 133 -150, 2003.

www.nozmoscada.com.br – acessado em maio/2007.

**CAPÍTULO III. 2 – EFEITOS DE INFUSÕES
DA *Myristica fragans*, Houtt., SOBRE O
COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS
TRATADOS CRONICAMENTE.**

EFEITOS DE INFUSÕES DA *Myristica fragans*, Houtt., SOBRE O COMPORTAMENTO DE CAMUNDONGOS TRATADOS CRONICAMENTE.

RESUMO

Neste estudo os extratos aquosos de sementes de noz-moscada, *Myristica fragans*, Houtt., foram avaliados quanto a sua atividade ansiogênica. Os extratos (0,5, 1,0 e 2,0%) administrados via oral, *ad libitum*, em tratamento crônico de 90 dias, a camundongos (*Mus musculus*), exibiram atividade ansiogênica no teste do labirinto em cruz elevado (LCE) (Elevated Plus Maze) e no teste do campo aberto (CA) (Open Field). Estes resultados corroboram os efeitos centrais encontrados nos casos de intoxicação e confirmam parte dos efeitos verificados com o consumo abusivo da noz-moscada.

Palavras-chave: noz-moscada; *Myristica fragans*; atividade ansiogênica; labirinto em cruz elevado; campo aberto; camundongo.

1. INTRODUÇÃO

As plantas possuem múltiplas ações farmacológicas por conterem numerosos componentes de natureza química diversa, sendo justificado assim o fato de que algumas constituem fontes importantes de medicamentos. No Brasil algumas plantas das famílias das Piperáceas e Miristicaceae são empregadas como condimentos e popularmente são indicadas para o tratamento de diversas doenças (CORRÊA, 1984). No entanto, o uso medicamentoso de plantas medicinais pressupõe a ingestão de doses elevadas, que podem ocasionar efeitos tóxicos acidentais.

A noz-moscada, semente da *Myristica fragans*, Houtt (família Miristicácea), empregada principalmente como condimento alimentar, contém 25 a 40% de óleo fixo e 8 a 15% de óleo volátil, onde se encontram os componentes miristicina, elemicina e safrol, apontados como responsáveis pelos efeitos tóxicos e psicoativos que compõe o quadros de intoxicação, descritos na literatura (ROBBERS et al., 1997; FORRESTER, 2005; BEYER et al., 2006). Estudos têm demonstrado que sementes de *Myristica fragans*, Houtt são psicotomiméticas, sendo igualmente capazes de apresentar tanto ações estimulantes como depressoras (FARNSWORTH, 1968; ISOGAI et al., 1973; JANSSEN e LACKMAN, 1990).

Vários são os relatos de intoxicação acidental ocasionada principalmente pela ingestão das sementes (ABERNETHY e BECKER, 1992; DEMETRIADES et al., 2000; KELLY E GAVIN, 2003). O consumo de quantidades em torno de 20 g, correspondente a aproximadamente 2 a 3 sementes, ocasiona o aparecimento de efeitos alucinógenos (TRUITT et al., 1961) muito reputado entre detentos/reclusos e adolescentes (ROBBERS et al., 1997; KRESANEK et al., 2005).

Trabalho recente, com o extrato n-hexânico de *Myristica fragans*, Houtt., mostrou atividade ansiogênica (SONAVANE et al., 2002). Em vista destes antecedentes e do largo uso industrial e popular desta especiaria no preparo de alimentos e como tratamento de vários sintomas digestórios e respiratórios, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade farmacológica sobre o comportamento, a partir da forma popular de consumo de plantas medicinais, o chá, ou infusão das sementes de noz-moscada, administrado em tratamento crônico. Também foi avaliada a toxicidade aguda, por meio de administração intraperitoneal e a toxicidade crônica através da administração oral.

A atividade ansiogênica foi investigada através de diferentes modelos animais de ansiedade, baseados no comportamento exploratório.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparação dos extratos

As sementes de noz-moscada foram obtidas de fontes comerciais. Após moagem, quantidades de 2,5; 5 e 10 g que, individualmente, receberam 250 ml de água destilada quente (100^o C), permanecendo em repouso por período de 10 minutos. A seguir, foram acrescentados 250 ml de água destilada fria e submetidos à agitação por 4 horas. Desta forma foram obtidas três concentrações de extrato aquoso de *Myristica fragans*, Houtt, de 0,5; 1,0 e 2,0%, os quais foram utilizados nos diferentes protocolos experimentais. Nestes extratos foi determinado os teores de miristicina por cromatografia gasosa da partição hexânica.

O extrato aquoso da *Myristica fragans* foi administrado diariamente por via oral aos grupos de camundongos (n = 10) nas concentrações de I (0%), II (0,5%), III (1,0%) e IV (2,0%). Os animais foram pesados a cada 45 dias. Os dados expressam a média ± S.E.M.; diferenças significativas para cada grupo em cada tempo versus o pré-tratamento (D0) são: *P < 0,05 vs dia zero e ** P<0,05 vs 45 dias; ANOVA e Tukey.

2.2. Animais

Foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) machos com idade entre 5 e 6 semanas, pesando entre 30 e 40 gramas. Os animais, procedentes do Biotério Central da FURG, foram mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, em condições controladas de temperatura (21±3°C), umidade (51%) e foto período (12h claro/12h escuro). Os animais foram alimentados com ração para animais de laboratório e água *ad libitum*, exceto para os grupos tratados que, durante o período, receberam o extrato de *Myristica fragans*, Houtt., no lugar de água. Todos

os procedimentos obedeceram as normas éticas ditadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1992).

2.3. Teste da toxicidade aguda DL50

O extrato de *Myristica fragans*, Houtt., foi administrado nas concentrações de 1,0; 2,5; 5,0; 10,0 e 15,0%, via intraperitoneal, a cinco grupos de animais tratados (n=9) e grupo controle (n=10). O comportamento geral dos animais foi verificado continuamente durante a primeira hora, depois, após 6 horas, 24, 48, 72 e 96 horas. Foram também observados quanto ao aparecimento de sintomas tardios de intoxicação no 14^o dia.

2.4 Estudo da toxicidade crônica em camundongos

Os camundongos selecionados foram mantidos dentro das condições já descritas. Foram divididos em grupos de 10 indivíduos, acomodados em gaiolas próprias e com lotação de 5 animais, tratados com o extrato (infusão) de *Myristica fragans*, Houtt., nas concentrações de 2,0; 1,0 e 0,5% p/v, durante 90 dias. As manifestações de toxicidade e a mortalidade foram monitoradas diariamente e as mudanças do peso corporal foram registradas.

Ao final do período de 90 dias os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e o fígado, pulmão, coração, baço e rins foram cuidadosamente dissecados e pesados. Uma parte destes órgãos foi fixada em formalina para a verificação histopatológica.

2.5 Estudos comportamentais

2.5.1 Campo aberto (Open Field)

O teste do campo aberto consistiu em utilizar uma arena de 30x22 cm, cujo piso é dividido em 12 quadrado (3x3cm). Os animais foram colocados individualmente dentro da arena, em um dos cantos e observados quanto a sua mobilização

espontânea (número de quadrados cruzados com as quatro patas, entre as divisões do campo), na periferia (atividade exploratória) e no centro (atividade ansiolítica e/ou sedativa). O número de comportamentos de levantar-se ou colocar-se na posição bípede (rearing), comportamentos de auto-limpeza (grooming) bem como o comportamento em que permanece parado (freezing) e a sua defecação (índice de emocionalidade) foram também registrados. O número de rearing, grooming, freezing, bolus fecais e quadrados cruzados foram contados durante um período de 5 minutos de observação.

Os animais foram submetidos aos testes antes, durante e ao término do tratamento com as infusões de noz-moscada.

2.5.2 Labirinto em cruz elevado (Elevated Plus Maze)

O labirinto em cruz elevado (LCE) usado neste estudo foi modificado por Lister (1987). O aparelho consiste em dois braços abertos (34x34cm), um em face do outro, e dois braços fechados (34x34cm) com o teto aberto e as paredes com 26cm de altura. No teste, as seguintes medidas foram realizadas durante um período de 5min, após a colocação de cada animal no centro do labirinto: 1) o número de entradas em cada tipo de braço; 2) o tempo de ocupação em cada tipo de braço. O número total de entradas nos braços consistiram na medida da atividade geral dos animais de experimentação. Os animais receberam os mesmos tratamentos que o protocolo anterior.

2.6. Análise estatística

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. As diferenças significativas entre os tempos de tratamento em cada grupo foram verificadas através da análise de variância seguida do teste *post hoc* de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas para $P < 0,05$.

3. RESULTADOS

3.1 Toxicidade aguda

Logo após a administração do extrato, morreu um animal do grupo que recebeu o extrato de *Myristica fragans*, Houtt., na concentração de 5% e dois animais do grupo de concentração de 15%. Nas primeiras 6 horas de observação os animais apresentaram comportamento agressivo, o que ocasionou lesões com sangramento nas caudas dos animais. A partir destes dados a DL_{50} foi estipulada em 62,4%, para a concentração utilizada.

3.2 Efeitos da administração crônica oral do extrato de *Myristica fragans*, Houtt., sobre o peso corporal e a mortalidade

No tratamento crônico os animais receberam o extrato de *Myristica fragans*, Houtt., nas concentrações de 0,5; 1,0 e 2,0%. Todos os tratamentos foram bem tolerados e não houve ocorrência de mortalidade em nenhum dos grupos tratados. Todos os grupos ganharam peso ao longo do tempo. A **Tabela 1** apresenta os resultados da verificação do peso corporal antes (DO, dia zero) e durante a exposição às diferentes concentrações do extrato de *Myristica fragans*, Houtt., aos 45 e 90 dias.

Tabela 1- Mudanças no peso corporal dos camundongos após tratamento crônico oral com o extrato de *Myristica fragans*, Houtt.

Dia	Grupo I – 0,0% (% de ganho)	Grupo II – 0,5% (% de ganho)	Grupo III – 1,0% (% de ganho)	Grupo IV – 2,0% (% de ganho)
D0 (zero)	27,5±0,8 g	26,0±0,7 g	37,0±1,5 g	39,5±0,9 g
D45	57,0±1,3* g (208±4,4)	52,5±2,5* g (202,3±9,3)	56,0±1,8* g (152,5±2,8)*	49,5±1,4* g (125,5±28)*#
D90	60,0±2,0* g (219±7,3)	55,5±2,3* g (214±8,9)	57,5±2,0* g (156,3±4,2)*	50,5±1,4* g (128±2,6)*#

DO= antes do tratamento; D45= após 45 dias de tratamento;

D90= após 90 dias de tratamento.

A tabela mostra também a porcentagem do ganho de peso comparada ao início dos tratamentos e ao longo do período de exposição. Conforme pode ser visto houve uma significativa redução no ganho ponderal, dose e tempo dependentes, principalmente nos grupos de animais tratados com as concentrações de 1,0 e 2,0%.

3.3 Efeitos da administração crônica oral do extrato de *Myristica fragans*, Houtt., sobre o peso dos órgãos

A **Tabela 2** mostra os efeitos dos extratos de *Myristica fragans*, Houtt., sobre o peso de alguns órgãos vitais no camundongo. A administração crônica do extrato não provocou nenhuma diferença significativa no peso dos pulmões e rins entre os grupos tratados e o grupo controle. Por outro lado houve uma diminuição dose-dependente no peso do fígado para todas as concentrações do extrato comparadas

com o grupo controle. Quanto ao peso do coração, também encontra-se uma diminuição para as concentrações de 1,0 e 2,0% comparadas com o grupo controle.

Tabela 2 - Efeito do extrato aquoso de *Myristica fragans*, Houtt., sobre o peso dos órgãos vitais^a.

Órgãos	Peso dos órgãos (g)			
	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Coração	0,24±0,02	0,21±0,01	0,18±0,01*	0,17±0,01*
Pulmão	0,36±0,07	0,28±0,05	0,21±0,01	0,20±0,02
Fígado	2,91±0,15	2,37±0,12*	2,30±0,06*	2,18±0,07*
Baço	0,12±0,01	0,12±0,01	0,13±0,01	0,09±0,00 [#]
rins	0,64±0,02	0,55±0,02	0,55±0,03	0,60±0,02
mortalidade (%)	Zero	Zero	Zero	Zero

^a Valores representam média ± S.E.M. (n = 10). As comparações foram feitas entre os grupos I (controle) com os grupos II, III e IV (extrato aquoso de *Myristica fragans* Houtt, 0,5%, 1,0% e 2,0%, respectivamente). * P < 0,05 vs controle

A **Tabela 3** mostra a relação entre o peso corporal e o peso dos respectivos órgãos vitais dos camundongos após 90 dias de tratamento crônico, visualizando-se uma redução de massa tecidual, em relação ao coração e pulmão, nos grupos III e IV.

Tabela 3 – Relação entre o peso dos órgãos vitais/peso corporal, após tratamento crônico com extrato aquoso de *Myristica fragans*, Houtt.

Peso dos órgãos				
(g)				
Órgãos	Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Coração	0,0040	0,0037	0,0031*	0,0033*
Pulmão	0,0060	0,0050	0,0036*	0,0039*
Fígado	0,048	0,042	0,040	0,043
Baço	0,0020	0,0021	0,0022	0,0017
rins	0,010	0,0099	0,0095	0,0118

Valores representam média (n = 10). As comparações foram feitas entre os grupos I (controle) com os grupos II, III e IV (extrato aquoso de *Myristica fragans* Houtt, 0,5%, 1,0% e 2,0%, respectivamente). * P < 0,05 vs controle

3.4 Efeitos da administração crônica oral do extrato de *Myristica fragans* sobre o comportamento animal

3.4.1 Teste do campo aberto

Em todos os grupos, os animais evidenciaram o mesmo comportamento de colocar-se na posição bípede (número de rearings). Observamos valores de $50,4 \pm 2,2$; $45,1 \pm 5,5$ e $51,3 \pm 4,0$ respectivamente para os grupos tratados com 0,5; 1,0 e 2,0%, antes do início dos tratamentos. A exposição dos animais as diferentes concentrações dos extratos de *Myristica fragans*, Houtt., embora tenha reduzido o número de rearings de maneira dose-dependente, esta diminuição não foi significativa. Os dados podem ser vistos na **Tabela 4**.

Tabela 4. Efeitos do extrato de *Myristica fragans* no teste do campo aberto.

Grupos	Nº cruzados centro	Nº cruzados ^a periferia	Nº cruzamentos	Total	Nº rearing ^a	Nº bolus fecais
EA 0,5%						
Zero dia	7,2±1,4	107,1±5,3	114,3±5,7		50,4±2,2	3,6±0,9
45 dias	8,1±1,6*	79,9±14,6	58,7±12,4		50,4±5,7	1,5±0,5
90 dias	5,7±0,9*#	46,3±5,6*	52,0±6,4		47,0±5,5	3,4±0,8
EA 1,0%						
Zero dia	8,4±1,0	77,7±5,3	86,1±9,1		45,1±5,5	2,9±0,9
45 dias	8,9±1,5*	59,0±7,9	67,9±9,1		37,7±3,7	2,8±0,2
90 dias	2,8±0,5*#	31,8±3,3*	34,6±10,9		31,6±3,3	4,2±0,8
EA 2,0%						
Zero dia	9,0±1,2	86,3±7,4	93,3±7,9		51,3±4,0	4,0±0,9
45 dias	4,8±0,8	67,4±4,8	72,2±5,1		50,0±3,9	0,9±0,3*
90 dias	3,3±0,9*#	29,7±3,9*	33,0±4,6		32,7±5,0	1,2±0,5*

0,5%; 1,0% e 2,0% = concentrações do extrato aquoso de noz-moscada;

EA= extrato aquoso; *# = p<0,05 vs controle e 45 dias.

Números expressos como média ± SEM.

Uma redução significativa e dose-dependente da atividade ambulatoria ou locomoção dos animais foi produzida pelo extrato de *Myristica fragans*, Hoult, evidenciada através da redução do número de quadrados atravessados no intervalo

de tempo de 5 minutos. A **Tabela 4** mostra o número total de quadrados cruzados assim como o número de quadrados cruzados na periferia e no centro do campo aberto. Foi registrada uma diminuição do número total de quadrados cruzados para todas as concentrações testadas, a partir do 45º dias de exposição e tendo sua ação máxima aos 90 dias para todas as concentrações. Ainda na mesma **Tabela 4** pode-se observar o número de quadrados cruzados na periferia e no centro do campo aberto bem como o número total de quadrados.

Quanto ao número de comportamentos de auto-limpeza (grooming), de imobilizações (freezing) e de bolus fecais, não foram observadas diferenças significativas dentro de cada grupo ao longo do tempo de exposição ao extrato (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Efeitos do extrato de *Myristica fragans* no teste do campo aberto.

Grupos	rearing ^a	grooming ^a	freezing ^a	fezes ^a (nº bolos fecais)
EA 0,5%				
Zero dia	50,4±2,2	0,6±0,2	0,4±0,2	3,6±0,9
45 dias	50,4±5,7	1,2±0,4	4,7±1,5	1,5±0,5
90 dias	47,0±5,5	1,1±0,3	2,3±0,7	3,4±0,8
EA 1,0%				
Zero dia	45,1±5,5	6,6±2,7	10,2±5,4	2,9±0,9
45 dias	37,7±3,7	1,4±0,2	3,2±2,0	2,8±0,2
90 dias	31,6±3,3	1,9±0,3	1,3±0,4	4,2±0,8
EA 2,0%				
Zero dia	51,3±4,0	0,5±0,2	1,0±0,4	4,0±0,9
45 dias	50,0±3,9	1,1±0,3	2,9±0,7	0,9±0,3*
90 dias	32,7±5,0*	1,4±0,3	2,0±1,5	1,2±0,5*

0,5%; 1,0% e 2,0% = concentrações do extrato aquoso de noz-moscada;

^a números expressos como média ± SEM; EA= extrato aquoso.

3.4.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado (LCE)

A administração crônica do extrato aquoso de *Myristica fragans*, Houtt., nas três concentrações testadas, reduziu o número de entradas em ambos os braços aberto e fechado. Estas observações estão apresentadas na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Efeitos do extrato de *Myristica fragans*, Houtt., sobre o comportamento de camundongos no teste do labirinto em cruz elevado.

Tratamentos	Nº entradas braço Aberto ^a	Nº entradas braço Fechado ^a
EA 0,5%		
Zero dia	14,0±1,1	11,4±1,2
45 dias	8,0±1,1	13,1±1,2
90 dias	6,2±1,3	11,5±1,1
EA 1,0%		
Zero dia	13,0±1,0	10,2±0,9
45 dias	11,6±1,6	12,8±0,9
90 dias	6,5±1,6*#	11,3±1,0
EA 2,0%		
Zero dia	12,9±1,1	12,5±1,7
45 dias	8,8±0,9*	12,9±1,0
90 dias	7,7±1,0*	13,0±0,9

0,5%; 1,0% e 2,0% = concentrações do extrato aquoso de noz-moscada;

^aCada valor representa a média ± SEM; *P<0,05 vs o tempo zero (ANOVA e teste *post hoc* de Tukey).

O tempo de permanência também foi modificado pela exposição crônica dos animais ao extrato. Foi registrado para todas as concentrações testadas uma diminuição da permanência no braço aberto, tempo e dose dependente. Por outro lado, houve um aumento progressivo, que acompanhou o tempo de exposição, do tempo de permanência dos animais dentro do braço fechado. Estes resultados podem ser vistos na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Efeitos do tratamento com extrato aquoso de *Myristica fragans*, Hout., sobre o comportamento de camundongos no teste do labirinto em cruz elevado.

tempo de duração	Dose %	N	Tempo de permanência no braço aberto (seg)	Tempo de permanência no braço fechado (seg)	% do tempo de permanência no braço aberto
D0			156,1±5,4	125,3±9,3	55,9±1,9
45º dia	0,5	10	65,9±9,4*	168,2±17,4	29,5±4,9*
90º dia		10	56,4±8,9*	171,6±15,8	25,6±3,7*
D0		10	156,3±10,7	80,6±11,7	66,4±4,2
45º dia	1,0		82,3±10,4*	114,3±16,6	43,5±5,9*
90º dia		10	65,3±14,1*	186,7±18,4*#	26,5±5,9*
D0		10	140,9±10,7	107,9±8,6	56,5±2,7
45º dia	2,0		70,7±8,4*	126,2±10,7	36,2±4,1*
90º dia		10	62,4±7,1*	151,8±9,4*	28,9±2,8*

		10			
		10			
		10			

D0= dia zero

4. DISCUSSÃO

Ao analisarem-se os resultados obtidos neste estudo com o teste do campo aberto, observa-se uma diminuição do número de comportamentos bípede e uma redução do número de cruzamentos efetuados, reflexo de uma diminuição da atividade de locomoção. Resultados semelhantes foram obtidos por Sonavane et al (2002) com o extrato n-hexânico de *Myristica fragans*, Houtt., e com o composto puro trimiristina, no modelo do campo aberto, onde também ficou evidenciada uma diminuição da locomoção e do número de comportamentos bípedes, a favor de um efeito ansiogênico, porém o estudo destes autores avaliou o efeito de dose aguda.

Substâncias reconhecidamente ansiogênicas como o meta-cloro fenil piperazina diminuem o número de cruzamentos no teste do campo aberto e as substâncias como o diazepam e o ondasentron, ao contrário, aumentam o número de cruzamentos. Esta diminuição pode ser interpretada como um indicativo de diminuição da transmissão dopaminérgica secundária aos aumentos dos níveis de serotonina provocados pelo agente ansiogênico (JONES et al., 1992; KAHN et al., 1988).

Com o teste do LCE, a diminuição da ocupação dos braços abertos e/ou a redução no número de entradas no braço aberto em relação ao número total de entradas oferece uma medida da inibição da atividade exploratória induzida pelo medo, considerando-se que os roedores tendem a evitar locais altos e abertos. Os agentes ansiolíticos atenuam esta tendência e os ansiogênicos a aumentam (PELLOW et al., 1985; PELLOW e FILE, 1986; PELLOW et al., 1987).

Neste estudo se evidenciou uma diminuição do tempo de permanência nos braços abertos e a redução no número de entradas nos mesmos braços, sugerindo atividade ansiogênica do extrato aquoso da *Myristica fragans*, Houtt, sem no entanto caracterizar o mecanismo da ação ansiogênica.

O efeito ansiolítico do extrato n-hexânico da *Myristica fragans* Houtt e do composto trimiristina foi recentemente sugerido (SONAVANE et al., 2002). Os autores encontraram diminuição do tempo de permanência e do número de entradas no braço aberto, utilizando o teste do LCE, tanto para o extrato quanto para o composto trimiristina.

Várias são as drogas ansiolíticas que podem ser empregadas nos estudos do LCE. O diazepam (benzodiazepínico) atua sobre o receptor GABA A, a buspirona, um agonista do receptor serotoninérgico 5-HT_{1A} e o ondansetron, um antagonista do receptor serotoninérgico 5-HT₃. A trimiristina foi capaz de reverter o efeito ansiolítico de drogas como o diazepam, buspirona e ondansetrom (SONAVANE et al., 2002).

Neste trabalho, as diferenças encontradas na avaliação do número de entradas nos braços abertos e no tempo de ocupação dos mesmos e os resultados obtidos (SONAVANE et al., 2002) com as substâncias ansiolíticas diazepam, ondasetron e buspirona, sugerem a natureza não específica da ansiedade (gerada também pelo extrato da *Myristica fragans*, Houtt.) ou a multiplicidade de ação dos componentes químicos presentes no extrato. Seus compostos foram separados durante a determinação cromatográfica dos extratos aquosos.

Os efeitos do sarisan, um análogo da miristicina, composto presente no óleo essencial da *Myristica fragans*, Houtt, foi testado sobre o comportamento de camundongos (MOREIRA et al., 2001). Com o teste do sono induzido por barbitúrico, os autores evidenciaram inicialmente (após 5 minutos da administração i.p.) um comportamento excitante seguido por um período de ataxia e sono. Efeitos psicofarmacológicos já haviam sido identificados para a miristicina, promovendo depressão do sistema nervoso central e indução do sistema P-450 (SHULGIN, 1966; HALLSTROM e THUVANDER, 1997).

Quanto ao tratamento crônico, ele foi bem tolerado e não foi encontrada nenhuma ocorrência de mortalidade com as concentrações empregadas. Todos os animais de experimentação ganharam peso ao longo do tempo. As mudanças de peso corporal têm sido usadas como um indicador de efeitos adversos de drogas e extratos

de plantas (TOFOVIC and JACKSON, 1999). Neste estudo observa-se que embora todos tenham ganhado peso, a porcentagem do aumento do peso foi significativamente diferente, principalmente nos animais que receberam as maiores doses (1,0 e 2,0%). É possível que o efeito ansiogênico evidenciado pelos testes comportamentais possa explicar estes efeitos sobre o ganho ponderal. Os animais, tendo diminuída a sua atividade locomotora, podem ter assim reduzido o seu acesso a comida. Além disso, a miristicina é um óleo volátil compreendendo uma mistura de derivados alilbenzenos e terpenos (terpines). A miristicina tem uma fraca atividade inibidora da MAO e com a elemicina pode ser metabolizada em um composto do tipo anfetamina com efeitos alucinogênicos similares ao ácido lisérgico (SHULGIN, 1966; STEIN, 2001) o que poderia também explicar os efeitos sobre o ganho de peso.

Analisando o peso dos órgãos, não foram evidenciadas alterações macroscópicas e nem diferenças significativas com exceção de uma diminuição no peso dos fígados.

A administração crônica do extrato não provocou nenhuma diferença significativa no peso dos pulmões e rins entre os grupos tratados e o grupo controle. Por outro lado, houve uma diminuição dose-dependente no peso do fígado para todas as concentrações do extrato comparadas com o grupo controle. Quanto ao peso do coração, também encontrou-se uma diminuição para as concentrações de 1% e 2% comparadas com o grupo controle. A relação entre peso do órgão e peso corporal mostrou que os grupos das concentrações de 1% e 2%, apresentaram redução desta relação, quando comparados com o grupo controle.

Em conclusão estes resultados comprovam os efeitos psicotrópicos do extrato da noz-moscada em favor de um efeito ansiogênico. Neste estudo não ficou evidenciado o mecanismo da ação ansiogênica, porém os diversos tipos de ansiedade e os diferentes agentes ansiolíticos falam a favor de um mecanismo misto. Interessante observar que estes efeitos foram decorrentes de tratamento crônico e, de alguma forma, foram similares aos danos agudos já registrados em humanos, para o consumo desta semente.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABERNETHY, M. K., BECKER, L.B. Acute nutmeg intoxication. **American Journal of Emergency in Medical** 10:429-430, 1992.

BEYER, J.; EHLERS, D.; MAURER, H.H. Abuse of nutmeg (*Myristica fragans* Houtt.): studies on the metabolism and the toxicologic detection of its ingredients elemicin, myristicin, and safrole in rat and human urine using gas chromatography/mass spectrometry. **Therapeutic and Drug Monitoring**. 28(4):568-75, 2006.

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. **Os Princípios Éticos da Experimentação Animal**. São Paulo (SP): 1992. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/etica.htm#3>. Acessado em: 02 oct 2006.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**, Vol V, Ed. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, 1984.

DEMETRIADES, A. K., WALLMAN, P. D., GUINNESS, A. Mc., GAVALAS, M. C. Low cost, high risk: accidental nutmeg intoxication. 2000.

FARNSWORTH, N.R. Hallucinogenic plants. **Science**, 162:1086-1092;1968.

FORRESTER, M.B. Nutmeg intoxication in Texas, 1998-2004. **Human & Experimental Toxicology**. 24(11):563-6, 2005.

HALLSTROM, H., THUVANDER, A. Toxicological evaluation of myristicin. **Natural Toxins**; 5:186-92, 1997.

ISOGAI, A., SUZUKI, A., TAMURA, S. Structure of dimeric phenylpropanoids from *Myristica fragans*. **Agriculture and Biology Chemistry**.; 37:193-4, 1973.

JANSSENS, J, LAEKEMAN, GM, PIETERS, LAC, TOTTE, J, HERMAN, AG and VLIETINCK, AJ Nutmeg oil: Identification and quantitation of its most active constituents as inhibitors of platelet aggregation. **Journal of Ethnopharmacology**, 29(2):179-188; 1990.

JONES, G. H., HERNANDEZ, T. D., KENDALL, D. A. MARSDEN, C. A., ROBBINS, T. W. Dopaminergic and serotonergic function following rearing in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**; 43:17-35 1992.

- KAHN, R. S., VAN PRAAG, H. M., WIZLER, S., ASNIS, G. M., BARR, G. Serotonin and anxiety revisited. **Biology Psychiatry**; 23:189-208, 1988.
- KELLY, B.D. & GAVIN, B.E. Nutmeg and Psychosis. **Schizophrenia Research**,60:95-96, 2003.
- KRESANEK, J.; PLACKOVA, S.; CAGANOVA, B.; KLOBUSICKA, Z. Drug abuse in Slovak Republic. **Przegl Lek.** 62(6):357-60; 2005.
- LISTER, R. G. The use of plus-maze to measure anxiety in the mouse. *Psychopharmacology* 1987; 10:145-51.
- MOREIRA, D. L., SOUZA, O. P., KAPLAN, M. A. C., PEREIRA, N. P., CARDOSO, G. L., GUIMARÃES, E. E. Effects of leaf essential oil of from *Piper solmsianum* C.DC. in mice behavior. **An Acad Bras Ci**; 73(1):33-7, 2001.
- PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.
- ROBBERS, J. E., SPEEDIE, M. K., TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. Williams & Wilkins, Baltimore, MA, USA. 1997.
- SONAVANE, G. S., SARVEIYA, V. P., KASTURE, V. S., KASTURE, S. B. Anxiogenic activity of *Myristica fragans* seeds. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**; 71:247-252, 2002.
- SHULGIN, A. Possible implication of myristicin as a psychotropic substance. **Nature**; 210 (5034):380-4, 1966.
- TOFOVIC SP, JACKSON EK. Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**; 33(3):360-6, 1999.
- TRUITT, E. B., CALLAWAY, E., BRAUDE, M. C., KRANTZ, J. C. The pharmacology of myristicin; a contribution to the psychopharmacology of nutmeg. **Journal of Neuropsychiatry**; 2:205-10, 1961.

CAPÍTULO IV - OUTRAS ATIVIDADES AVALIADAS

Em vista das tendências atuais de atribuir atividades funcionais aos óleos essenciais neste trabalho foram realizados também alguns experimentos que visaram avaliar as atividades antifúngicas, antioxidantes e citotóxicas dos óleos essenciais de noz-moscada. Este capítulo descreve os procedimentos adotados e os resultados

obtidos que serão posteriormente redimensionados e reavaliados quanto a sua validade.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIOXIDANTE DA NOZ – MOSCADA

1. Atividade antifúngica

1.1. Procedimento 1

O fungo utilizado para a atividade antifúngica foi o *Aspergillus oryzae*, sendo proveniente de uma cultura pura do microrganismo armazenado entre 4° a 10°C. O microrganismo foi replicado para um erlenmayer contendo ágar BDA utilizando-se solução 0,2% tween sendo inoculado a 25°C para crescimento durante 5 dias. O material necessário para o teste (placas, ágar, óleo essencial e etc) foi preparado e a inoculação dos esporos foi feita em câmara de fluxo laminar utilizando ágar BDA estéril e contendo os volumes de óleo essencial respectivamente de 0,1mL, 0,2 mL,

0,5mL e 1mL, além de um branco e um padrão de crescimento do microrganismo somente com ágar e água. A solução de esporos com o microrganismo foi obtida por extração dos mesmos do meio utilizando-se solução 0,2% tween 80. A contagem dos esporos se fez em câmara de Neubauer. E a solução de esporos (1mL) nas placas preparadas espalhando-se com alça de Drigalski até a absorção pelo ágar. Após 5 dias de incubação a 25°C foi avaliado o crescimento e a formação de micélio comparando-se com o padrão.

1.2. Procedimento 2

O procedimento de preparo do microrganismo foi o mesmo que no procedimento 1. A diferença foi na forma de colocar o inóculo nas placas preparadas para o experimento. Inoculou-se a solução de esporos (5µL) no centro das placas preparadas. Ao final de 5 dias a 25°C foram medidos os diâmetros médios dos halos descritos comparando-se com o padrão.

2. Determinação da Atividade Antioxidante

2.1. Procedimento

Foi utilizado o óleo de oliva extra virgem para determinação da atividade antioxidante do óleo essencial de noz-moscada, tendo-se como ferramenta o planejamento experimental. Foram estudados três parâmetros em dois níveis: concentração de óleo essencial no óleo de oliva (1% e 5%), comprimento da luz UV (260 e 354 nm) e tempo de exposição (5 e 15 min). Como resposta foram empregados o índice de peróxido e o índice de acidez. Foram preparadas as soluções de óleo de oliva com as concentrações determinadas acima, das quais foram aplicadas 20mL em cada placa de Petry. Estas foram expostas a radiação UV nos comprimentos e tempos determinados. Após, foram retiradas 5g de cada placa para a determinação do índice de acidez e 5g para determinação do índice de peróxido.

3. Determinação do Índice de Acidez

Definido como o número de mg de hidróxido de sódio necessário para neutralizar os ácidos livres de uma grama da amostra.

3.1. Procedimento:

Pesar 5g da amostra em erlenmeyer e adicionar 50mL de uma solução álcool-éter etílico (1:2) e indicador fenolftaleína 0,1% (em torno de 4 gotas). Titular com solução de NaOH 0,1N padronizada até o aparecimento da cor rósea por 30s.

4. Determinação do Índice de Peróxido

Determina substâncias que oxidam o iodeto de potássio. Essas são conhecidas como sendo peróxidos ou produtos similares provenientes da oxidação de gorduras.

4.1. Procedimento:

Pesar 5g de amostra em erlenmeyer, adicionar 30mL de solução de ácido acético-clorofórmio (3:2) e agitar até completa dissolução. Adicionar 0,5mL de solução de iodeto de potássio saturada e agitar novamente, permanecendo em repouso por 1min no escuro. Após adicionar 30mL de água e 0,5mL de solução de amido solúvel 1% agitar novamente. Titular com tiosulfato de sódio 0,001N padronizado agitando constantemente até o desaparecimento da cor azul.

5. Resultados

5.1. Atividade antifúngica

Foram utilizadas placas contendo 5mL/L, 10mL/L, 25mL/L, 50mL/L (óleo essencial por litro de ágar), além de um branco e um padrão. Nenhuma concentração testada inibiu o crescimento do fungo. Isto mostra que o óleo essencial de noz-moscada, na forma preparada, não possui atividade antifúngica, nesta condição de extração e nas concentrações estudadas.

Na **tabela 1** encontram-se os resultados obtidos pelo método de crescimento radial para a determinação da atividade antifúngica.

Tabela 1 - Dados obtidos para a atividade antifúngica pelo método de crescimento radial.

Concen.	Placa 1	Placa 2	Placa 3	Média (cm)
0,5	3,0	2,9	2,9	2,93
0,3	3,0	3,1	2,8	2,97
0,1	3,0	3,0	3,3	3,10
padrão	3,0	2,9	3,1	3,00

Não foi observada inibição quanto ao crescimento do fungo, quando comparadas às colônias contendo o extrato hidrotérmico e o padrão. Isto confirma que o óleo essencial de noz-moscada não possui atividade antifúngica, nesta condição de extração e nas concentrações estudadas.

5.2. Determinação da Atividade Antioxidante

Foi utilizado o planejamento experimental 2^3 , com os parâmetros descritos no item 3.9.1. com a matriz apresentada na **Tabela 2**.

Tabela 2- Matriz do planejamento experimental completo.

Ensaio	Tempo de exposição á radiação UV	Comprimento de onda de radiação UV	Concentração de óleo essencial (%)
1	+1	+1	+1
2	+1	+1	-1
3	+1	-1	+1
4	+1	-1	-1
5	-1	+1	+1
6	-1	+1	-1
7	-1	-1	+1
8	-1	-1	-1

A **Tabela 3** apresenta os valores dos níveis codificados na matriz do planejamento experimental.

Tabela 3 - Valores dos níveis codificados usados no planejamento experimental.

Níveis Codificados	Tempo de exposição à radiação UV (min)	Comprimento de onda de radiação UV	Concentração de óleo essencial (%)
-1	5	250nm	1
+1	15	354nm	5

A **Tabela 4** apresenta as respostas médias encontradas para cada experimento.

Os parâmetros estudados, concentração de óleo essencial e tempo de exposição, nas condições descritas não apresentaram diferença significativa ao nível de confiança de 95%. O parâmetro comprimento da radiação UV mostrou que quando este se encontra no nível mais baixo (250nm), o índice de peróxido tende a aumentar, verificando-se que há o maior oxidação. O índice de Acidez não apresentou nenhuma diferença com os parâmetros estudados.

Tabela 4 - Dados obtidos a partir do planejamento experimental.

experimento	Índice Acidez (mg de KOH/g óleo)	Índice Peróxido (mEq/g)
1	0,05	3,59
2	0,053	4,28
3	0,053	4,55
4	0,05	4,42

5	0,053	3,59
6	0,05	3,45
7	0,053	4,83
8	0,056	5,24

CAPÍTULO V - CONCLUSÃO GERAL

CONCLUSÃO GERAL

Considerando-se a hipótese estudada neste trabalho que o consumo em doses crônicas de compostos psicoativos contidos na noz moscada, comercializada para preparos industriais e domésticos, poderia acarretar danos no comportamento de animais de experimentação em função de sua composição química as conclusões foram:

A noz-moscada apresenta diferenças significativas na composição química e conteúdo de óleos essenciais se comercializada na forma de semente ou de pó. Neste caso o teor de compostos nitrogenados e o conteúdo de voláteis sugerem a não homogeneidade da composição.

A miristicina encontra-se em níveis detectáveis no extrato hidroalcoólico das sementes, no extrato hidroalcoólico dos óleos essenciais e nas infusões na faixa de 8,0 a 37,4 mg/g amostra.

O estudo dos efeitos biológicos comportamentais do consumo crônico de infusão de noz-moscada mostraram efeitos psicotrópicos (ansiogênicos) semelhantes aos observados pelo consumo agudo, em humanos e registrados na literatura.

CAPÍTULO VI –
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

6.1. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ABERNETHY, M.K., BECHER, L.B. Acute nutmeg intoxication. **The American Journal of Emergency Medical**, 10(5):429-430, 1992.

AL-KHATIB, I.M.H., MOURSI, S.A.H., MEDÍ, A.W.R. e AL-SHABIBI, M.M. Gas-liquid chromatographic determination of fatty acids and sterols of selected Iraqi foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, 1(1): 59-64, 1988.

ARCHER, A.W. Determination of safrole and myristicin in nutmeg and mace by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, 438: 117-121, 1988.

ASSOCIATION of OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNACIONAL. AOAC. **Official Methods of Analysis of the AOAC**. Editora Arligton, 17 th, Washington, DC, 2000.

BEYER, J.; EHLERS, D.; MAURER, H.H. Abuse of nutmeg (*Myristica fragans* Houtt.): studies on the metabolism and the toxicologic detection of its ingredients elemicin, myristicin, and safrole in rat and human urine using gas chromatography/mass spectrometry. **Therapeutic and Drug Monitoring**. 28(4):568-75, 2006.

BIANCHI, J.D.; DECKER, M.W.; SULLIVAN J.P. The pharmacology of nicotine and novel cholinergic channel modulators. **Advents of Pharmacology**, 37:153-214, 1999.

BIRKE, L.I.A. & ARCHER, J. Some issues and problems in the study of animal exploration. In BIRKE, L.I.A. & ARCHER, J. **Exploration in animals and humans**. University Press, Cambridge, 279 p. 1983.

BLIGH, E.G., DYER, W. J. A. Rapid Method of Total Lipid Extraction and Purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**. 1959; 37 (8): 911-917

BRENNER, N, FRANK, OS, KNIGHT, E. Chronic nutmeg psychosis. **Journal of Real Society of Medical**, 86:179-180, 1993.

BRUHMYLER, J.; CHLEIDE, E.; LIÉGEOIS, J-F; DELARGE, J. & MERCIER, M. Effects of specific dopaminergic agonists and antagonists in the opens field test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 39: 367-371, 1991.

CARVALHO, H.H., JONG, E.V.; BELLÓ, R.M.; SOUZA, R.B.; TERRA, M.F. **Alimentos: Métodos Físicos e Químicos de Análise**. Editora da Universidade, UFRGS, Porto Alegre, 2002.

CECCHI, H.M. **Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos**. Ed. UNICAMP, Campinas, SP, 2ª ed., 2003.

CHOO, L.C. , WONG, S.M., LIEW, K.Y. Essential oil of nutmeg pericarp. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 79:1954-1957, 1999.

COBEA-Colégio brasileiro de experimentação animal. Os princípios éticos da experimentação animal. São Paulo (SP): 1992. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/etica.htm#3> Acessado em: 02 oct 2006.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**, Vol V, Ed. Ministério da Agricultura, Rio de Janeiro, 1984.

DEMETRIADES, A. K., WALLMAN, P. D., GUINNESS, A. Mc., GAVALAS, M. C. Low cost, high risk: accidental nutmeg intoxication. 2000.

CULÍKOVÁ, V. Assortment of the plants in the Medieval diet in Czech countries (baseb on archeobotanical finds). **Acta Universia Carol Medickal**. 41(1-4):105-18; 2000.

- DENENBERG, V.H. Open-field behavior in the rat: what does it mean? **Annual of New York Academy of Science**, 159:852-859, 1969.
- DE VICENZI, M, DE VICENZI, A, SILANO, M Constituents of aromatic plants: elemicin. **Fitoterapia**, 75:615-618, 2004.
- DINAKAR, HS. Acute psychosis associated with nutmeg toxicity. **Médical Times**, 105:63-64, 1977.
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Report No. 1: Nutmeg processing and marketing in Grenada**. By Daniel, D. –www.fao.org – acessado em agosto/2004.
- FARNSWORTH, N.R. Hallucinogenic plants. **Science**, 162:1086-1092;1968.
- FORRESTER, M.B. Nutmeg intoxication in Texas, 1998-2004. **Human & Experimental Toxicology**. 24(11):563-6, 2005.
- GERHARDT, U. **Especias y Condimentos**. Ed. Acribia, Zaragoza, España, 1975.
- GROVER, JK, KHANDKAR, S VATS, V, DHUNNOO, Y and DAS, D Phamacological studies on Myristica fragans – antidiarrheal, hypnotic, analgesic and hemodynamic (blood pressure) parameters. **Methods and Finding Experimental Clinical Pharmacology**, 24(10):675-80, 2002.
- HALL, C.S. Temperament: A survey of animal studies. **Psychology Bulletin**. 38:909-943,1941.
- HALLSTROM, H, THUVANDER, A Toxicological evaluation of myristicin. **Natural Toxins**, 5(5):186-92, 1997.
- HIRASA, K. & TAKEMASA, M. **Ciencia y Tecnologia de las Especies**. Ed. Acribia Zagoza (España), 2002, 241p.
- HODGSON, E, RYU, D-Y, ADAMS, N and LEVI, PE Biphasic reponses in synergistic interactions. **Chemical Mixtures and Quantitative Risk Assessment**, 105(2-3):211-216; 1995.
- HOFFMANN, A.; HEIDEN, A.; PFANNKOCH, E. Flavor profiling of beverages by stir bar sorptive Extraction (SBSE) and thermal desorption GC/MS/PFPD. **Global analytical solutions- AppNote**, 4:15 p., 2000.

HUSSAIN, S.P.; RAO, A.R. Chemopreventive action of mace (*Myristica fragans*, Houtt) on methylcholanthrene-induced carcinogenesis in the uterine cervix in mice. **Cancer Letters**, 56(3):231-4, 1991.

IDLE, J.R. Christmas gingerbread (Lebkuchen) an Christmas cheer – review of the potential role of mood elevating amphetamine-like compounds formed in vivo an in furno. **Prague Medical Reports**, Republica Tcheca, 106(1):27-38; 2005.

IPCS-INTOX The International Programme on Chemical Safety - **Canadian Center for Occupational Health and Safety** – www.intox.org. – consulta em setembro/2004.

ISOGAI, A., SUZUKI, A., TAMURA, S. Structure of dimeric phenylpropanoids from *Myristica fragans*. **Agriculture and Biology Chemistry**; 37:193-4. 1973.

JANSSENS, J, LAEKEMAN, GM, PIETERS, LAC, TOTTE, J, HERMAN, AG and VLIETINCK, AJ Nutmeg oil: Identification and quantitation of its most active constituents as anhibitors of platelet aggregation. **Journal of Ethnopharmacology**, 29(2):179-188; 1990.

JANNU, L.N. HUSSAIN, S.P. and RAO, A.R. Chemopreventive action of mace (*Myristica fragans*, Houtt) on DMBA-induced papillomagenesis in the skin of mice. **Cancer Letters**, Nova Delhi,; 56(1):59-63, 1991.

JONES, G. H., HERNANDEZ, T. D., KENDALL, D. A. MARSDEN, C. A., ROBBINS, T. W. Dopaminergic and serotonergic function following rearing in rats. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**; 43:17-35 1992.

KAHN, R. S., VAN PRAAG, H. M., WIZLER, S., ASNIS, G. M., BARR, G. Serotonin and anxiety revisited. **Biology Psychiatry**; 23:189-208, 1988.

KELLY, B.D. & GAVIN, B.E. Nutmeg and Psychosis. **Schizophrenia Research**,60:95-96, 2003.

KRESANEK, J.; PLACKOVA, S.; CAGANOVA, B.; KLOBUSICKA, Z. Drug abuse in Slovak Republic. **Przegl Lek**. 62(6):357-60; 2005.

LAPA, A.J.; SOUCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; CASTRO, M.S.de A.; LIMA, T.C.M. **Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Medicinais**. Soc Bras. Plantas Medicinais. São Paulo. 2003.

LEE, B.K.; KIM, J.H.; JUNG, J.W.; CHOI, J.W.; HAN, E.S.; LEE, S.H.; KO, K.H. and RYU, J.H. Myristicin-induced neurotoxicity in human neuroblastoma SK-N-SH cells, **Toxicology Letters**, 153:310-18; 2005.

LEE, H.S.; JEONG, T.C.; JEONG, H.K. In vitro and in vivo metabolism of myristicin in the rat. **Journal of Chromatography B**, 705:367-372; 1998.

LEVINE, S.; HALTMEYER, G.C.; KARAS, G.G. & DANENBERG, V.H. Physiological behavioral effects of infantile stimulation. **Physiology and Behavior**, 2:55, 1967.

LIS-BALCHIN, M.; HART, S. A preliminary study of the effect of essential oils on skeletal and smooth muscle in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, 58:183-7, 1997.

LISTER, R.G. Ethologically-based animal models of anxiety disorders. **Pharmacology and Therapeutic**.46:321-340;1990.

MCKEE, L.H., THOMPSON, L.D. E HARDEN, M.L. Effect of three grinding methods on some properties of nutmeg. **Lebensm Wiss Technology**. 26:121-125; 1993.

MESSIHA, FS and ZAKI, NN Effect of nutmeg on ethanol and d-amphetamine-produced alteration of locomotor activity in the mouse. **Veterinary and Human Toxicology**, 26(2):17-20; 1984.

MOREIRA, AL, SOUZA, PO, KAPLAN, MAC, PEREIRA, NA, CARDOSO, GL and GUIMARÃES, EF (2000). Effect of leaf essential oil from *Piper solmsianum* C.DC. in mice behaviour. **Anuário da Academia Brasileira de Ciências**, 73(1):122-27.

MORGAN, R. **Enciclopédia das Ervas e Plantas Medicinais**, Ed. Hemus, 1 ed., São Paulo, SP, 1994.

MUKHERJEE, P.K.; KUMAR, V.; HOUGHTON, P.J. Screening of Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. **Phytotherapeutic Research**, 2007. in press.

NARASIMHAN, B.; DHAKE, A.S. Antibacterial principles from *Myristica fragans* seeds. **Journal of Medical and Food**. 9(3): 395-9, 2006.

NGUEFACK, J.; LETH, V.; AMVAM ZOTTO, P.H. e MATHUR, S.B.. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Camerom for controlling food spoilage and

mycotoxin producín fungi. **International Journal of Food Microbiology**, 94: 329-334, 2004.

NGUYEN, D. V.; TAKÁCSOVÁ, M.; DANG, M.N. AND KRISTIÁNOVÁ, K. Stabelization of rapeseed oil with allspice, clove and nutmeg extracts. **Nahrung** 44(4):281-282;2000.

OLAJIDE, OA, AJAYI, FF, EKHELAR, AI, AWE, SO, MAKINDE, JM and ALADA, AR (1999). Biological effects of *Myristica fragans* (nutmeg) extract. **Phytotherapeutic Research**, 13(4):344-5.

OZAKI, Y.; SOEDIGDO, S.; WATTIMENA, Y.R. and SUGANDA, A.G. Antinflammatory effect of mace, aril of *Myristica fragans* Houtt., and its active principles. **Japanese Journal of Pharmacology**, 49(2):155-63, 1989.

PAYNE, R.B. Nutmeg intoxication. **New England Journal of Medical**. 269:36-38, 1963.

PANAYOTOPOULOS, DJ, CHISHOLM, DJ (1970). Hallucinogenic effect of nutmeg. **British Medical Journal**, 1:754.

PARLE, M.; DHINGRA, D.; KULKARNI, S.K. Improvement of mouse memory by *Myristica fragans* seeds. **Journal of Medical Food**, 7(2):157-61, 2004.

PECEŸSKI, J, SAVKOVIC, N, RADVOJEVIC, D and VUKSANOVIC, L (1981). Effect of oil of nutmeg on the fertility and induction on meiotic chromosome rearrangements in mice and their first generation. **Toxicology Letters**, 7(3):239-244.

PELLOW, S. Anxiolytic and anxiogenic drug effects in a novel test of anxiety: a exploratory model of anxiety in rodents valid? **Methods and Findings in Experimental Clinical Pharmacology**. 8:557-565; 1986.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S.E. & BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in a n elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**. 14(#):149-67; 1985.

PELLOW, S. e FILE, S.E. Anxiolytic and anxiogenic drug effects on exploratory activity in elevated plus-maze: a novel test of anxiety in the rat. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 24:525-529; 1986.

RAM, A.; LAURIA, P.; GUPTA, R.; SHARMA, V.N. Hypolipidaemic effect of *Myristica fragans* fruit extract in rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**, 55:49-53, 1996.

RANDERATH, K. ; PUTMAN K.L. and RANDERATH, E. Flavor constituents in cola drinks induce hepatic DNA adducts in adult and fetal mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 192(1):61-68, 1993.

RAFOLS, W. **Aprovechamiento Industrial de los Productos Agrícolas**. Salvat Editores S.A., Barcelona, España, 1963.

RODGERS, R.J.; CAO, B.J.; DALVI, A. & HOLMES, A. Animal models of anxiety: an ethological perspective. **Brazilian Journal of Medicine and Research**. 30:289-304; 1997.

SANGALLI, B.C.; CHIANG, W. Toxicology of nutmeg abuse. **Journal of Toxicology and Clinical Toxicology**. 38(6):671-8. 2000.

SERRY, C.J.; RAY, L.E. and HERON, R.E. The pharmacological effects of the lignoin extract of nutmeg (*Myristica fragans*). **Journal of Ethnopharmacology**, 6(1):61-6, 1982.

SHULGIN, A. Possible implication of myristicin as a psychotropic substance. **Nature**,; 210(5034):380-4, 1966.

SOLIMAN, K.M. ; BADEAA, R.I. , Effect of extracted from some medicinal plants on differen mycotoxigenic fungi, **Food and Chemical Toxicology**, 40: 1669-1675, 2003.

SONAVANE, G.S.; SARVEIYA, V.P.; KASTURE, V.S. and KASURE, S.B. Anxiogenic activity of *Myristica fragans* seeds. **Pharmacology Bichemistry and Behavior**, 71:247-252, 2002.

SPRICIGO, C.B.; PINTO, L.T.; BOLZAN, A. e NOVAIS, A.F. Extraction of essencial oil and lipids from nutmeg by liquid carbon dioxide. **Journal of Supercritical Fluids**, 15:253-259, 1999.

STEIN, U.; GREYER, H.; HENTSCHEL, H. Numeq (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.

TAJUDDIN; AHMAD, S.; LATIF, A. and QASMI, I.A. Aphrodisiac activity of 50% ethanolic extracts of *Myristica fragans* Houtt. (nutmeg) and *Syzygium aromaticum* (L) Merr. & Perry. (clove) in male mice: a comparative study. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 3(1):6, 2003.

TAJUDDIN; AHMAD, S; LATIF, A; QASMI, I.A. and AMIN, K.M.Y. An experimental study of sexual function improving effect of *Myristica fragans*, Houtt. (nutmeg). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, 5:16, 2005.

TATEO, F.; BONONI, M.; MARTELLO,S. e COMMISSATI, I. Identificazione di safrolo, metil-eugenolo, miristicina, elemicina per GC/MS e GC/HRMS in bevande "cola". **Industria delle Bevande**, 29(2):14-20; 2000.

TATEO, F.; BONONI, M.; LUBIAN, E.; MARTELLO, S.; FASAN, S. Prodotti a base di carne aromatizzati con macis e noce moscata determinazione analitica di safrolo e safrolo-simili. **Industrie Alimentari**, 38(9):941-945; 1999.

TOFOVIC SP, JACKSON EK. Effects of long-term caffeine consumption on renal function in spontaneously hypertensive heart failure prone rats. **Journal of Cardiovascular Pharmacology**; 33(3):360-6, 1999.

TOMAINO, A., CIMINO, F., ZIMBALATTI, VENUTI, A.A.;DE PASQUALE, A.; SAIJA, A.. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. , **Food Chemistry**, 40: 1669-1675, 2002.

TRUITT, E. B., CALLAWAY, E., BRAUDE, M. C., KRANTZ, J. C. The pharmacology of myristicin; a contribution to the psychopharmacology of nutmeg. **Journal of Neuropsychiatry**; 2:205-10, 1961.

UCHIBAYASHI, M. The nutmeg story. **Yakushigaku Zasshi**, 36(1):76-9; 2001

UPCC – UTAH POISON CONTROL CENTER - **Utox Update**, 5:4; 2003 - <http://unhsc.utah.edu/poisonon> - acessado em agosto/2004.

VIARENGO A, BURLANDO, B CAVALETTO, M, MARCHI, B, PNZANO, E, and BLASCO, J (1999). Role of metallothionein against oxidative stress in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. **American Journal of Physiology**, 46:R1612-R1619.

XAVIER, G.F. (org.) **Técnicas para o estudo do sistema nervoso**. São Paulo. Ed Plêiade,1999.

YUAN,Z.M.; WANG, J.; LV, J. , JIA, T.Z. Comparing analysis of components in volatile oils of nutmeg and prepared nutmeg by GC-MS. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**. 31(9):737-9; 2006.

YUN, C-H, LEE, HS, LEE, H-Y, YIM, S-K, KIM, K-H, KIM, E, YEA, S-S, Guengerich, FP. Roles of human liver cytochrome P450 3A4 and 1A2 enzymes in the oxidation of myristicin. **Toxicology Letters**, 137:143-150, 2003.

WANG, Y, Cheng, C and LI, B (2003). Direct identification of *Myristica fragans* and *Myristica* sp. By FTIR. **Zhong Yao Cai**, 26(1):14-5.

WANG, Y.; YANG, X.W.; TAO, H.Y., LIU, H.X. GC-MS analysis of essential oils from seeds of *Myristica fragans* in Chinese market. **Zhongguo Zhong Yao Za Zhi**. 29(4):339-42;2004.

WEIL, AT (2000). The use of nutmeg as a psychotropic agent. Harvard Medical School. Massachusetts, USA 16 pgs - <http://leda.lycaeam.org> - consulta em agosto/2004.

www.emedis.com.br/fit/nozmoscada - consulta em 17/06/2007.

www.erowid.org/plants/nutmeg, consulta em 12/10/2004.

www.ildue.it - consulta em 10/06/2007.

www.nozmoscada.com.br - consulta em 02/05/2007 e 17/06/2007.

www.qmc.ufsc.br - consulta em 17/06/2007.

