

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

CAMPUS PATO BRANCO

BACHARELADO EM QUÍMICA

MARCUS ANDRÉ CARDOSO DE ARAÚJO

**EXTRATO DE MYRISTICA FRAGANS POR DESTILAÇÃO A VAPORA
PARTIR DE UMA MÁQUINA DE CAFÉ EXPRESSO E IDENTIFICAÇÃO
DE MIRISTICINA**

PATO BRANCO

2022

MARCUS ANDRÉ CARDOSO DE ARAÚJO

**EXTRATO DE MYRISTICA FRAGRANS POR DESTILAÇÃO A VAPOR
A PARTIR DE UMA MAQUÍNA DE CAFÉ EXPRESSO E
IDENTIFICAÇÃO DE MIRISTICINA**

**MYRISTICA FRAGRANS EXTRACT BY STEAM DISTILLATION
FROM AN EXPRESS COFFEE MACHINE AND MYRISTICINE
IDENTIFICATION**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Edilson da Silva Ferreira

PATO BRANCO

2022



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Pato Branco

Departamento de Química
Curso de Bacharelado em Química



TERMO DE APROVAÇÃO

EXTRATO DE MYRISTICA FRAGANS POR DESTILAÇÃO A VAPOR A PARTIR
DE UMA MÁQUINA DE CAFÉ EXPRESSO E IDENTIFICAÇÃO DE MIRISTICINA

por

MARCOS ANDRE CARDOSO DE ARAÚJO

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado em 23 de junho de 2022 às 15 horas e 45 minutos como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Química. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho **Aprovado**.

Edilson da Silva Ferreira
Prof. Orientador

Filipe Kallil da Silva Naves
Membro titular

Larissa Macedo dos Santos Tonial
Membro titular

Nota: O Documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se no SEI processo 23064.027686/2022-51 e documento 2792018.

Dedico este trabalho a minha
família e amigos, que
foram essenciais no
desenvolvimento do
mesmo.

AGRADECIMENTOS

Palavras jamais serão suficientes para expressar meus sentimentos e gratidão por todos que, de alguma forma, direta ou indireta, me auxiliaram nessa exaustiva caminhada. Gostaria de mencionar cada um, agradecer e recompensar, porém se torna impossível em tão pouco espaço.

Agradeço então, principalmente, a minha família, por todo apoio financeiro e psicológico.

Aos meus amigos Matheus, Danilo, Nathalia, Filipe, Fernanda, Kamyla, Juliane, Luiz e tantos outros por todo o suporte, conversas, ideias e diversão durante todos esses anos, sem vocês minha realização profissional e social seria impossível. A Edenes, supervisora de estágio e amiga, por toda sabedoria, experiência, empatia e know-how compartilhados.

Ao meu orientador Prof. Dr. Edilson, pelo conhecimento e paciência.

A professora Sirlei, por toda motivação e conhecimento compartilhados.

A UTFPR-PB, pelo espaço e investimentos fornecidos.

Se eu vi mais longe, foi por estar sobre
ombros de gigantes.
(NEWTON, Isaac, 1675)

RESUMO

CARDOSO, Marcus André. **EXTRATO DE *MYRISTICA FRAGRANS* POR DESTILAÇÃO A VAPOR A PARTIR DE UMA MÁQUINA DE CAFÉ EXPRESSO E IDENTIFICAÇÃO DE MIRISTICINA**. 66 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso Bacharelado em Química Industrial - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2022.

Óleos essenciais são utilizados desde as épocas mais remotas e cada vez mais, se faz necessário o desenvolvimento de novas técnicas e metodologias para aproveitar as vantagens trazidas pela natureza. Em busca de aumentar a eficiência, economizar tempo e disseminar conhecimento, faz-se uso de uma máquina de café expresso como instrumento para extração de óleo essencial de noz-moscada, que possui vasta aplicabilidade, além do potencial terapêutico.

Palavras-chave: Noz-moscada. Óleo essencial. Miristicina. Extração. Máquina de café expresso. Potencial terapêutico.

ABSTRACT

CARDOSO, Marcus André. **MYRISTICA FRAGRANS EXTRACT BY STEAM DISTILLATION FROM AN EXPRESS COFFEE MACHINE AND MYRISTICINE IDENTIFICATION**. 66 pages. Trabalho de Conclusão de Curso Bacharelado em Química Industrial - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2022.

Essential oils are used since most remote eras, which increasingly makes it necessary to develop new methodologies and techniques to make the best out of natural resources. Seeking to improve efficiency, save time and disseminate knowledge, a espresso coffee machine is utilized to extract essential oils from nutmeg, which holds a vast applicability, including therapeutic use.

Keywords: Nutmeg. Essential Oil. Myristicin. Extract. Espresso Coffe Machine. Therapeutic potential.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|---|----|
| Figura 1: Isopreno | 9 |
| Figura 2: Estrutura do β -caroteno, representada a ligação 4-4..... | 9 |
| Figura 3: R-Limoneno e S-Limoneno..... | 9 |
| Figura 4: Lanosterol (lanosta-8,24-dien-3-ol)..... | 10 |
| Figura 5: Isopentenil difosfato e Dimetilalil difosfato, respectivamente | 10 |
| Figura 6: Exemplos de Sesquiterpenos alifáticos, mono e bicíclicos, hidrogenados e oxigenados | 11 |
| Figura 7: Exemplos de monoterpenos alifáticos, mono e bicíclicos, hidrogenados e oxigenados | 12 |
| Figura 8: Estrutura do Mirceno, exemplificando uma ligação (1-4)..... | 13 |
| Figura 9: Fruto da Moscadeira..... | 14 |
| Figura 10: Safrol, eugenol e miristicina, respectivamente..... | 16 |
| Figura 11: Estrutura 2D da Elemicina | 16 |
| Figura 12: Estrutura 3D da Miristicina..... | 17 |
| Figura 13: Vias metabólicas propostas da miristicina | 20 |
| Figura 14: Vias metabólicas propostas da 1'-hidroximiristicina..... | 21 |
| Figura 15: Partes de um cromatografo a gás..... | 28 |
| Figura 16: Noz-moscada moída | 38 |
| Figura 17: Solução obtida após extração | 39 |
| Figura 18: Amostra armazenada em vial..... | 40 |
| Figura 19: Amostra de OE de noz-moscada em placa de sílica | 42 |
| Figura 20: CCD do OE em tolueno:acetato de etila..... | 43 |
| Figura 21: Amostra de OE em placa com excesso de revelador | 44 |
| Figura 22: Espectro de absorção da amostra de OE..... | 45 |
| Figura 23: Cromatograma com picos integrados da amostra de OE de Noz Moscada | 46 |
| Figura 24: Espectro de massas do composto 2..... | 47 |
| Figura 25: Espectro de massa e IA para propor o composto 2..... | 48 |

| | |
|---|----|
| Figura 26: Espectro de massas do composto 3..... | 48 |
| Figura 27: Espectro de massas e IA para propor o composto 3 | 49 |
| Figura 28: Espectro de massas do composto 4..... | 49 |
| Figura 29: Espectro de massas e IA para propor o composto 4 | 50 |
| Figura 30: Rearranjo de McLafferty | 51 |
| Figura 31: Proposta de fragmentação m/z 73..... | 51 |
| Figura 32: Proposta de fragmentação m/z 129..... | 52 |
| Figura 33: Proposta de várias fragmentações de maneira generalizada | 52 |
| | |
| Fluxograma 1: Classificação dos Métodos Cromatográficos em Coluna | 28 |
| Fluxograma 2: Procedimento de obtenção do extrato | 32 |
| Fluxograma 3: Processo de Limpeza do Equipamento..... | 35 |

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Classificação quanto ao número de unidades de isopreno..... | 10 |
| Tabela 2: Classificação sensorial do óleo obtido..... | 41 |
| Tabela 3: Dados para identificação dos compostos | 46 |
| Tabela 4: Dados dos padrões..... | 47 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----------|
| INTRODUÇÃO | 3 |
| 2 OBJETIVOS | 5 |
| 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 5 |
| 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 6 |
| 3.1 ESPECIARIAS | 6 |
| 3.2 ÓLEO ESSENCIAL | 6 |
| 3.2.1 Mercado Mundial de OE's | 7 |
| 3.2.2 Composição | 7 |
| 3.2.3 Terpenos | 8 |
| 3.2.3.1 Mono e sesquiterpenos | 11 |
| 3.2.3.2 Regra do Isopreno | 13 |
| 3.2.3.3 Química do cheiro | 13 |
| 3.3 NOZ-MOSCADA | 14 |
| 3.3.1 Origem, História e Características | 14 |
| 3.3.2 Composição | 15 |
| 3.4 MIRISTICINA | 17 |
| 3.4.1 Estrutura e Identificação | 17 |
| 3.4.2 Aplicações | 18 |
| 3.4.3 Toxicidade | 19 |
| 3.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS | 22 |
| 3.5.1 Destilação por Arraste a Vapor | 23 |
| 3.5.2 Extração por Solvente | 23 |
| 3.5.2.1 Extração líquido-líquido (ELL) | 23 |
| 3.5.3 Extração com Fluido Supercrítico | 24 |
| 3.5.4 Extração em Máquina de Café Expresso | 24 |
| 3.5.4.1 Extração com água quente pressurizada (PHWE) | 25 |
| 3.5.4.2 Eficiência | 26 |

| | |
|---|-----------|
| 3.6 METÓDOS DE SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO | 27 |
| 3.6.1 Cromatografia | 27 |
| 3.6.2 Cromatografia em Óleos Essenciais | 29 |
| 3.6.3 Cromatografia em Camada Delgada..... | 30 |
| 3.6.4 Espectrometria UV-Vis..... | 30 |
| 3.6.5 Espectrometria de Massas..... | 31 |
| 4 MATERIAL E MÉTODOS..... | 32 |
| 4.1 COLETA DE AMOSTRA | 33 |
| 4.2 PREPARO DE SOLUÇÕES | 33 |
| 4.3 SOLVENTE DE EXTRAÇÃO | 33 |
| 4.4 EXTRAÇÃO | 34 |
| 4.5 SEPARAÇÃO DO SOLVENTE | 34 |
| 4.6 LIMPEZA DA MÁQUINA..... | 35 |
| 4.7 ANÁLISES | 35 |
| 4.7.1 CCD | 36 |
| 4.7.2 Espectroscopia UV-Vis | 36 |
| 4.7.3 Cor, Odor e Solubilidade..... | 37 |
| 4.7.4 Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas..... | 37 |
| 4.8 INTERPRETAÇÃO..... | 37 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO | 38 |
| 5.1 PREPARO DA AMOSTRA | 38 |
| 5.2 EXTRAÇÃO | 38 |
| 5.3 SEPARAÇÃO DO SOLVENTE | 39 |
| 5.4 IDENTIFICAÇÃO | 41 |
| 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 54 |
| REFERÊNCIAS | 55 |

INTRODUÇÃO

No século XV, com o início da expansão marítima europeia, muitos buscavam por novas rotas comerciais que levariam às especiarias, importantes para a época, visto seu potencial aromático, conservante e condimentar. Uma dessas especiarias era a noz-moscada, uma semente proveniente da moscadeira (*Myristica fragans*) e nativa das ilhas Molucas, na Indonésia (STEIN, U., 2001; UCHIBAYASHI, M., 2001).

Na produção de alimentos, em casa ou industrialmente, a noz-moscada é utilizada na melhora sensorial e na conserva, sendo estes efeitos devidos a presença de óleos essenciais. Estes óleos representam de 30 à 55% da semente e são divididos em dois tipos, óleo essencial (volátil) sendo de 5 à 15% e óleo fixo, de 24 à 40% da composição (FAO, 2000).

Industrialmente, óleos essenciais (OE) são um importante grupo de matérias-primas, principalmente para a indústria farmacêutica, por suas propriedades assépticas, digestivas, sedativas e analgésicas, na indústria de cosméticos são utilizados na composição de sabonetes, cremes e perfumes, e na indústria de alimentos como melhorador de sabores e aromas. Estes óleos geralmente são utilizados em seu estado natural, diluídos ou misturados (CRAVEIRO, A.; QUEIROZ, D., 1993).

Uma característica importante destes óleos é a sua volatilidade, visto que, os principais processos de obtenção a partir do material vegetal como flores, folhas, sementes e raízes, são baseados na utilização de arraste por vapor de água ou solventes orgânicos. Também podem ser utilizados gases densos na extração, porém, industrialmente é inviável devido ao alto custo de instalação de uma planta, que opere com altas pressões (SPRICIGO, C. B., 1999).

Estudos identificaram no OE da semente de noz-moscada, diversos componentes que são precursores metabólicos de moléculas como a MDA (metilendioxi Anfetamina), ou seja, a ingestão de grandes quantidades de noz-moscada pode levar o consumidor a sentir efeitos psicoativos e alucinógenos. Estes componentes podem ser convertidos "in vivo" para formas amínicas, que, semelhante ao consumo de anfetaminas, podem gerar dependência química (LEE, JEONG TC, JEONG HK, 1998).

Porém, observando o mercado de OE em geral, e tomando os EUA como exemplo, as importações no período de 2004-2007, totalizaram cerca de US\$ 9.400 milhões, de acordo com os dados da FAS (*Foreign Agriculture Service*) de 2008. Tendo como principais exportadores no mesmo período a Índia, França, Argentina, Brasil e alguns outros, respectivamente (BIZZO, H. R.; HOVELL, A. N. C.; REZENDE, C. .M, 2009).

Economicamente, o Brasil tem pouca participação no mercado de óleos essenciais. Em 2007 foram produzidos apenas 3% da totalidade utilizada. Em 2007, o Brasil já contribuía com 5% do total de OE, principalmente os cítricos. Nos últimos 10 anos, o Brasil exportou um total de 22 tipos de óleos essenciais, aproximadamente 25.000 toneladas, sendo a maioria de OE de eucalipto (*Eucalyptus urograndis*) e limão (*citrus limon*). Um bom exemplo do potencial econômico de OE é o preço do óleo de laranja petitgrain, que é base para o perfume Channel n° 5, sendo o quilo vendido a R\$ 300,00 (BIESKI, 2022; BIZZO, H. R.; HOVELL, A. N. C.; REZENDE, C. .M, 2009).

Sabendo que o custo da construção de uma planta de extração de OE com pressão elevada é alto, o presente trabalho tem como propósito encontrar metodologias de baixo custo que possam ser utilizadas na extração de OE de diversos vegetais de forma rápida e eficiente. Para este trabalho foi utilizado a semente de noz-moscada para extrair OE que contém majoritariamente, a miristicina, uma molécula de grande importância econômica na indústria de cosméticos, bem como a sua identificação por cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia gasosa acoplada à espectrometro de massas (CG/EM), espectroscopia UV-Vis. Este trabalho também por indicar uma forma mais rápida de extração, utilizando os solventes “verdes” sendo este extrato utilizado para outros estudos científicos.

2 OBJETIVOS

O presente trabalho tem como objetivo aperfeiçoar uma técnica, diminuindo o tempo de extração por arraste a vapor, aliada a pressões elevadas, com auxílio de uma máquina de café expresso.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair óleo essencial de noz-moscada empregando uma máquina de café doméstica;
- Separar a fração contendo miristicina por cromatografia em coluna
- Identificar os compostos obtidos por meio da utilização de técnicas e equipamentos como CG/EM, espectrometro UV-Vis, CCD;
- Fornecer material para desenvolvimento de novas pesquisas.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 ESPECIARIAS

Por definição, especiaria é um produto de origem vegetal obtido a partir de diversas partes de plantas específicas, como raízes, cascas, folhas, flores, frutos e sementes. Elas tornam os alimentos mais saborosos e estimulam o apetite, pois fazem com que as glândulas digestivas secretem (GERHARDT, U., 1975; HIRASA, K., TAKEMASA, M., 2002).

É de conhecimento geral que, desde a antiguidade, especiarias são utilizadas não somente em alimentos, mas também em cerimônias e rituais, além de alguns óleos aplicados no embalsamento. Naquela época, por não haver provas científicas, acreditava-se que os condimentos possuíam efeitos mágicos, ou até mesmo que eram divinos, porém estes efeitos se dão pela presença de OE's (RAFOLS, W., 1963).

3.2 ÓLEO ESSENCIAL

OE's são substâncias que exalam odor e de grande volatilidade, geralmente presente em plantas. Devido a estas características, alguns processos podem ser aplicados de modo a separar tais substâncias, com a destilação por arraste de vapor, por exemplo (RÍOS, J-L, 2016).

Existem várias formas de definir um OE, a mais simples infomra que eles são o diz que óleos essenciais são resultado de uma mistura de produtos, formados no citoplasma e geralmente se apresentam na forma de gotículas entre as células. Sendo voláteis e aromáticos (SONWA, M. M., 2000).

Este tipo de produto, é utilizado em diversas indústrias mundiais, apresentando então, grande importância econômica. Utilizado como aromatizante na indústria alimentícia e na farmacêutica, além das propriedades medicinais amplamente exploradas, devido ao conhecimento de gerações no uso de plantas medicinais (PIRES, V. P., 2017).

3.2.1 Mercado Mundial de OE's

De acordo com o COMTRADE (*United Nations Commodity Trade Statistics Database*), uma base de dados americana, os maiores destinos de exportações de OE no mundo, no ano de 2020, são a Irlanda, com aproximadamente \$9,774 milhões de dolares no ano, seguida dos Estados Unidos com \$7,352 milhões de dolares e Alemanha, França, Suíça, dentre outros. O mercado mundial gira em torno de \$62337 milhões de dólares ao ano (COMTRADE, 2022).

Segundo a EUROSTAT (<https://ec.europa.eu/eurostat/>), em 2006, o Brasil exportou para a Europa 12.526 toneladas de óleo de laranja, onde 46% deste total foi para a Holanda, 20% para a Alemanha e 19% para o Reino Unido. Considerando a produção mundial de OE's, o Brasil se destaca como um dos 4 grandes produtores, assim como a China, Indonésia e a Índia. Os óleos produzidos aqui são, no geral, subprodutos da indústria de sucos (BIZZO, H. R.; HOVELL, A. N. C.; REZENDE, C. M., 2009).

A indústria de cosméticos, principalmente o setor de perfumes finos, é, além de um mercado global multibilionário, uma forte investidora no desenvolvimento científico e de inovação. Na década de 50, muitas pesquisas começaram a ser desenvolvidas, o que ocasionou uma revolução no mercado de fragrâncias. Curiosamente, na mesma época em que a atriz Marilyn Monroe fez uma declaração afirmando que “para dormir, entre ela e os lençóis só havia Channel N°5.” (SPEZIALI, M. G., 2012).

3.2.2 Composição

Estes óleos são compostos de metabólitos vegetais secundários lipofílicos e altamente voláteis. Nas primeiras caracterizações, foram identificados terpenos, principalmente mono e sesquiterpenos, porém, com o tempo, foram identificados outros compostos, como alil e isoalil fenóis. Além destes, também foram descobertos diferentes terpenos com maior número de carbonos, como os diterpenos (RÍOS, J-L, 2016).

Outros compostos também foram identificados em óleos essenciais, obtidos por destilação, visto que muitos outros metabólitos vegetais, como gorduras, cumarinas e alguns alcalóides são destiláveis

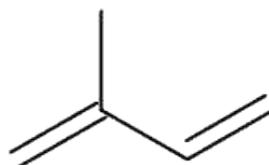
3.2.3 Terpenos

Terpenos são moléculas compostas por carbono, hidrogênio e oxigênio, e os mesmos formam um grupo de moléculas orgânicas produzidas como metabólitos secundários, ou seja, não estão envolvidos diretamente no processo de crescimento, desenvolvimento e reprodução. Sendo assim, principalmente em plantas, são utilizados como forma de evitar potenciais danos causados por predadores, ou outros agentes externos, como temperatura ou perda de água (CORREIA *et al.*, 2008; VIEGAS, J. C., 2003)

Quimicamente falando, são moléculas orgânicas com uma variação estrutural muito grande, atualmente mais de 35.000 são conhecidos. Alguns apresentam estrutura linear, cíclica, hidrogenados ou oxigenados. Os que apresentam hidrocarbonetos, são chamados de “terpenos” e contém duplas ligações carbono-carbono (MCMURRY, J., 2010).

No OE de noz-moscada, encontramos alguns terpenos como o α -pineno, β -pineno, sabineno, limoneno e 4-terpineol (SPRICIGO, C. B. *et al.*, 1999). A denominação “terpenoide” vem da modificação de um terpeno, onde grupos metila são rearranjados ou substituídos por oxigênio, podendo então, apresentar várias funções químicas, como álcoois, ácidos, cetonas, dentre outros (SADTLER, SP., 1918)

Basicamente, os terpenos são constituídos de unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno), evidenciado na figura 1, de formula geral C_5H_8 , apresentando variações na estrutura e na forma como as unidades se ligam, podendo apresentar ligações 1-4, que caracteriza a “Regra do Isopreno”, ou ligações 4-4, sendo este último chamado de “terpeno irregular”, como é o caso do β -caroteno, representado na figura 2. Alguns apresentam forma cíclica, como o limoneno, mostrado na figura 3, e também podem apresentar variações em suas ligações (FELIPE, L.; BICAS, J., 2017).



(2-metil-1,3-butadieno)

Figura 1: Isopreno

Fonte: Autoria Própria/ChemSketch

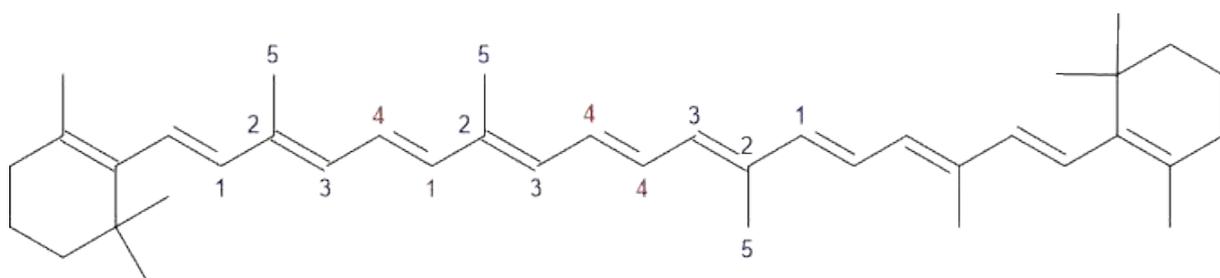
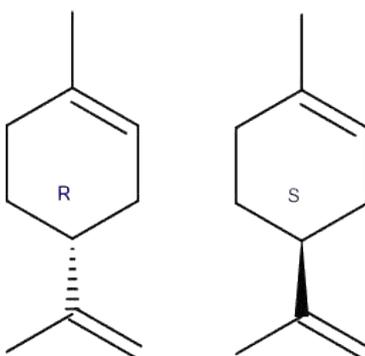


Figura 2: Estrutura do β -caroteno, representada a ligação 4-4

Fonte: Autoria Própria/ChemSketch



(1-metil-4-prop-1-en-2-il-ciclohexeno)

Figura 3: R-Limoneno e S-Limoneno

Fonte: Autoria Própria/ChemSketch

Outra forma de classificar terpenos é quanto ao número de unidades de isopreno, como sugere a tabela 1:

Tabela 1: Classificação quanto ao número de unidades de isopreno

| Terpenos | Unidades | Átomos de Carbono |
|----------------|----------|-------------------|
| Monoterpenos | 2 | 10 |
| Sesquiterpenos | 3 | 15 |
| Diterpenos | 4 | 20 |
| Sesterpenos | 5 | 25 |
| Triterpenos | 6 | 30 |
| Carotenóides | 8 | 40 |
| Borracha | 100+ | 500+ |

Fonte: Organic Chemistry 8th edition, John McMurry

Mono e sesquiterpenos são encontrados principalmente em plantas, porém, os de estrutura maior ocorrem em plantas e animais. Por exemplo, o lanosterol (lanosta-8,24-dien-3-ol), presente na figura 4, é um triterpenoide (C₃₀) e é o composto precursor de todos os hormônios esteroides (MCMURRY, J., 2010)

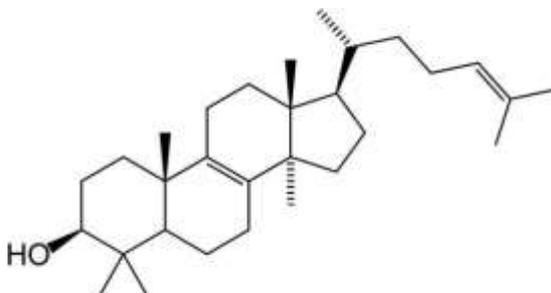


Figura 4: Lanosterol (lanosta-8,24-dien-3-ol)
Fonte: Wikipedia/en.wikipedia.org

Porém, o isopreno não é a origem bioquímica dos terpenoides. Existem dois compostos na natureza que são os responsáveis, isopentenil pirofosfato e seu isômero dimetilalil pirofosfato, presentes na figura 5, onde a partir de duas rotas metabólicas diferentes, dão origem aos terpenoides (MCMURRY, J., 2010).

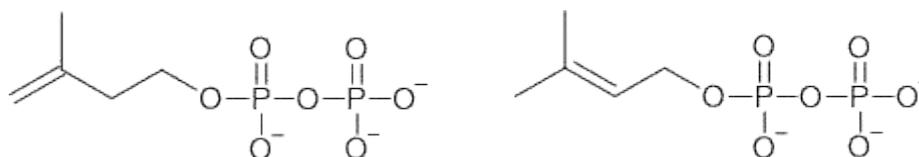


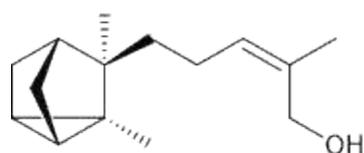
Figura 5: Isopentenil difosfato e Dimetilalil difosfato, respectivamente
Fonte: Autoria Própria/ChemSketch

3.2.3.1 Mono e sesquiterpenos

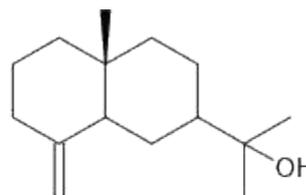
Os mono e sesquiterpenos podem ser hidrogenados ou oxigenados, mas também podem ser derivados de compostos alifáticos, alicíclicos ou aromáticos (RÍOS, J-L, 2016).

Exemplos de exemplos de sesquiterpenos são apresentados na figura 6:

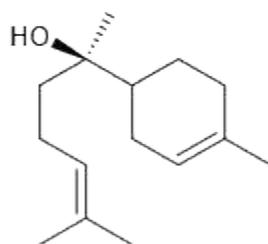
- Santalol (2-metil-5-(2-metil-3-metilideno-2-biciclo[2.2.1]heptanil)pent-2-en-1-ol).
- Bisabolol ((2R)-6-metil-2-[(1R)-4-metilciclohex-3-en-1-il]hept-5-en-2-ol
- Zingiberol(2-[(2R,4aR)-4a-metil-8-metilideno-1,2,3,4,5,6,7,8a-octahidronaftalen-2-il] propan-2-ol)
- Farseno ((3E, 6E)-3,7,11-trimetildodeca-1,3,6,10-tetraeno)



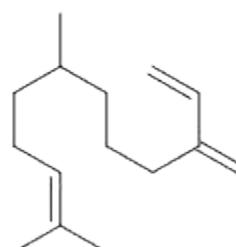
Santalol
Sandaló
(Santalum Album)



Zingiberol
Gengibre
(Zingiber Officinali)



Bisabolol
Camomila
(Matricaria Recutita)



Farnesol
Camomila-do-campo
(Artemisia annua)

Figura 6: Exemplos de Sesquiterpenos alifáticos, mono e bicíclicos, hidrogenados e oxigenados

Fonte: Autoria Própria/ChemSketch

Alguns exemplos de monoterpenos na figura 7:

- α -pineno e β -pineno ((1S,5S)-2,6,6-Trimetil-biciclo[3.1.1]hept-2-ano e 6,6-dimetil-2-metilenobiciclo-[3.1.1]-heptano) respectivamente;
- Geraniol (3,7-dimetil-oct-2,6-dien-1-ol);
- Terpinen-4-ol (4-metil-1-propan-2-ilciclohex-3-en-1-ol);
- Linalol (3,7-dimethylocta-1,6-dien-3-ol);
- Mentol ((1R,2S,5R)-2-isopropil-5-metilciclohexanol)
- Cineol (1,3,3-Trimetil-2-oxabicyclo[2.2.2]octano)

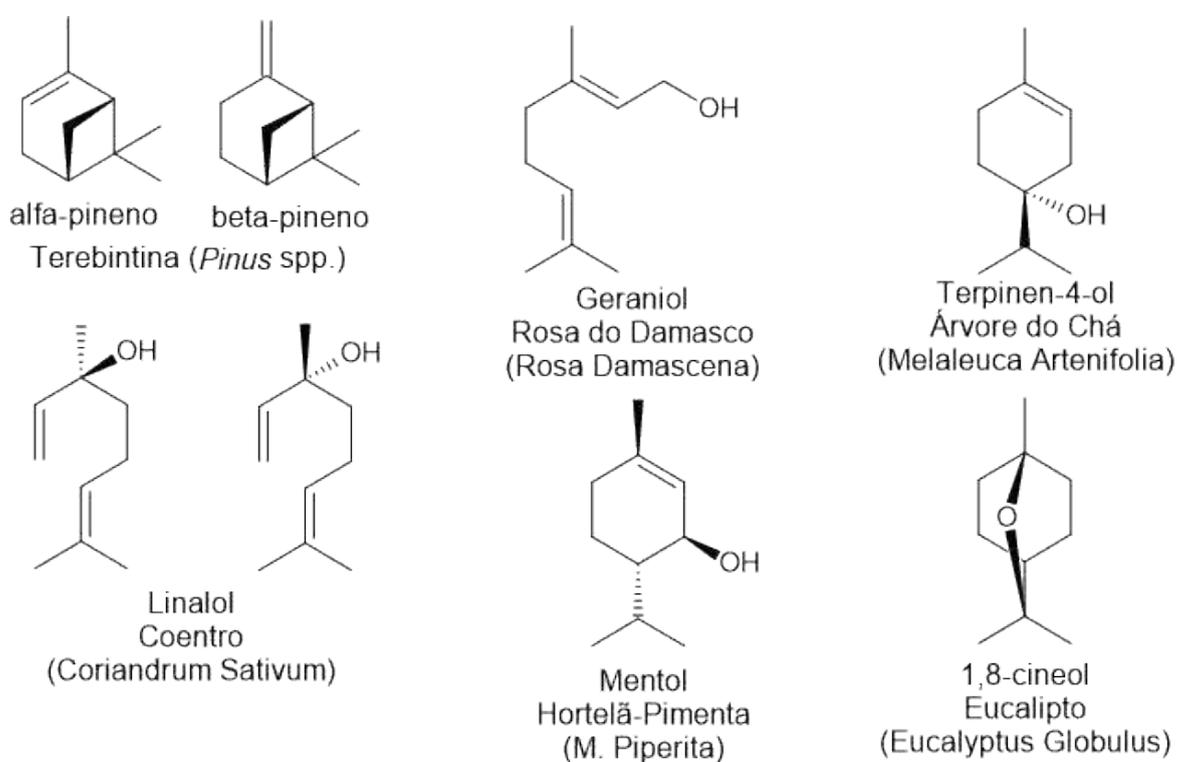


Figura 7: Exemplos de monoterpenos alifáticos, mono e bicíclicos, hidrogenados e oxigenados

Fonte: Autoria Própria/ChemSketch

3.2.3.2 Regra do Isopreno

O Isopreno é um hidrocarboneto volátil, alifático (de cadeia aberta) e incolor com duas ligações duplas conjugadas, podendo ser representado na forma $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{C}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2$. Sendo então, a base estrutural dos terpenos. Por polimerização, são obtidos alguns tipos de borracha sintética. Apesar de haver diferenças estruturais, todos os terpenos são estruturados em blocos de 5 carbonos ligados na ordem “cabeça-a-cauda”, ou seja, ligações entre o carbono 1 e o carbono 4 (1-4), como mostra a figura 8 (LOOMIS, W. D., CROTEAU, R., 2014; ESCHENMOSER, A., ARIGONI, D., 2005). Conforme a figura 8.

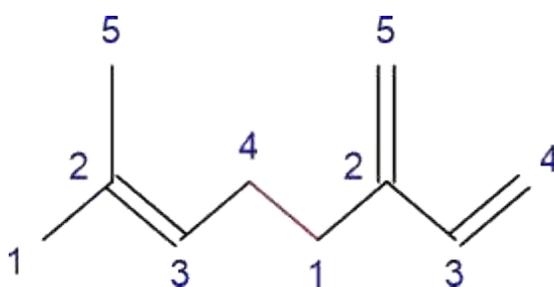


Figura 8: Estrutura do Mirceno, exemplificando uma ligação (1-4)
Fonte: Autoria Própria/ChemSketch

3.2.3.3 Química do cheiro

Os terpenos são, na maioria das vezes, os responsáveis pelo aroma característico de flores, frutas, cascas e principalmente dos óleos essenciais. Sendo estes, explorados comercialmente pela indústria alimentícia, e de perfumes (KUTYNA, D., BORNEMAN, A., 2018).

Monoterpenos como o limoneno e o linalol, são utilizados para conferir aroma de limão a bebidas, já o aroma de manga, vem de terpenos como terpinoleno, cariofileno, dentre outros (HAUSCH, B., *et al.* 2015; LI, *et al.* 2017).

Ecologicamente, os aromas são importantes, pois servem para atrair polinizadores e ganharam o interesse humano, pois são fragrâncias agradáveis e um mercado com muito potencial para ser explorado (RAGUSO, R., 2016).

Existe ainda, a aromaterapia, que consiste no uso de óleos essenciais no tratamento de doenças, tanto psicológicas, quanto físicas. O óleo é inalado, onde, uma vez transportado pelas vias aéreas e em contato com cílios olfativos, causa uma reação, que é transformada em um estímulo elétrico, sendo transportado até o cérebro. No cérebro, é desencadeado uma sequência de reações que uma restauração do equilíbrio, podendo então, reduzir sintomas (ANDREI, P., COMUNE, A. P. 2005).

3.3 NOZ-MOSCADA



Figura 9: Fruto da Moscadeira
Fonte: Santosh Varghese / shutterstock.com

3.3.1 Origem, História e Características

A *Myristica fragrans*, sempre foi amplamente utilizada no preparo de alimentos e de chás medicinais pelos povos antigos e atualmente pelas indústrias farmacêutica e de alimentos. Os efeitos promovidos por ela vão desde curar sintomas patológicos do aparelho respiratório e digestório à efeitos psicoativos pelo consumo excessivo. Já no caso do preparo de alimentos, atua como conservante (antioxidante e antimicrobiano) (OLIVEIRA, G. F. T., FURLONG, E. B. 2007).

Originária da Indonésia, mais precisamente das ilhas Molucas, a noz-moscada veio para o Ocidente em navios de mercadores na época das Grandes Navegações, já que era de extrema importância (STEIN, U., 2001; UCHIBAYASHI, M., 2001).

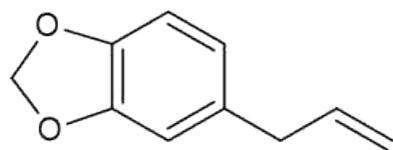
O termo "noz-moscada" se refere a especiaria que é obtida a partir da semente do fruto de uma árvore de grande porte, chamada popularmente de "Moscadeira" (*Myristica fragans*). Por se adaptar bem ao clima tropical, passou a ser cultivada também em países como Índia, Singapura, Colômbia, algumas ilhas do Caribe e no Brasil. O fruto é vermelho e quando madurece, libera a semente que se encontra protegida por uma membrana avermelhada denominada "macis". Possui sabor adocicado e picante. Comercialmente, a semente é extraída e passa por um processo de secagem, podendo ser vendida inteira ou em pó (RAFOLS, W., 1963; SPRICIGO, C. B., 1999).

3.3.2 Composição

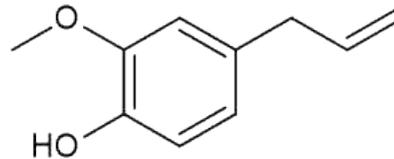
Sendo a composição química variável devido a condições bióticas e abióticas, como clima, composição do solo, época do plantio, forma de colheita e armazenamento, encontra-se na literatura uma composição centesimal média de 9% de umidade, 2,5% de cinzas, 27% de amido, 33% de lipídios, 4,5% de óleos essenciais, 9,6% de compostos nitrogenados e 14,5% de compostos não nitrogenados (MORGAN, R., 1994).

As sementes são utilizadas na produção de uma emulsão, comumente denominada "manteiga", contendo cerca de 40% de matéria extraída. A emulsão é obtida por pressão, resultando em gordura, de coloração amarela e odor característico, onde seu principal componente é o triglicerídeo de ácido mirístico, chegando a 75% de sua totalidade (RAFOLS, W., 1963; GERHARDT, U., 1975).

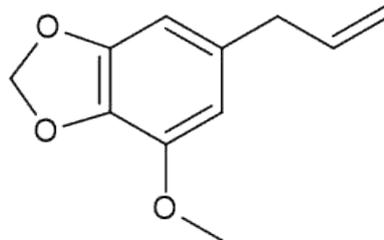
Analogamente a composição centesimal, os componentes presentes nos óleos essenciais também variam com a origem, clima e solo. Destes óleos, cerca de 80% é composto por terpenos (moléculas formadas por carbono, hidrogênio e oxigênio). Tão importante quanto os terpenos, são os compostos aos quais se atribuem os efeitos psicoativos, conservadores e aromáticos, tendo as estruturas representadas nas figuras 10 e 11, são eles a miristicina (6-alil-4-metoxi-1,3-benzodioxol), o safrol (5-alil-1,3-benzodioxol), o eugenol (4-alil-2-metoxifenol), e a elemicina (5-alil-1,2,3-trimetoxi-benzeno), dentre estes, a miristicina é a responsável pelo odor típico (ARCHER, A. W., 1988).



(5-alil-1,3-benzodioxol)

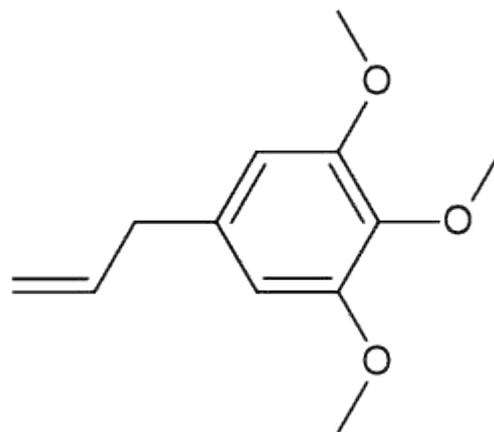


(4-alil-2-metoxifenol)



(6-alil-4-metoxi-1,3-benzodioxol)

Figura 10: Safrol, eugenol e miristicina, respectivamente
Fonte: Aatoria Própria/ChemSketch



(5-alil-1,2,3-trimetoxibenzeno)

Figura 11: Estrutura 2D da Elemicina
Fonte: Aatoria Própria/ChemSketch

Considerando a noz-moscada antes de qualquer extração, encontra-se a miristicina representando até 2,9% do peso total e o safrol, cerca de 0,3%, já nas amostras de OE, a miristicina varia entre 3,9 a 12,8% e o safrol de 0,53 a 3,42% (ARCHER, A. W., 1988).

3.4 MIRISTICINA

Líquido incolor oleoso, com baixíssima solubilidade em água, pouco solúvel em etanol e muito solúvel em éter e benzeno, apresentando um aroma balsâmico-amadeirado (PUBCHEM, 2021). A miristicina é amplamente utilizada em suplementos alimentares e alimentos aromatizados, como o óleo de endro, por exemplo, que apresenta cerca de 7%, noz-moscada seca, com aproximadamente 4% e cenoura fresca com 0,003% de Miristicina na sua composição (ZHU, X. *et al.*, 2019).

Esta molécula também se faz presente em diversas plantas medicinais em todo o mundo, como por exemplo, a *Piper mullesua*, *Pseudorlaya minúscula*, *Pseudorlaya pumila*, e *Daucus glochidiatus* (HARBORNE, J. B., 1969).

3.4.1 Estrutura e Identificação

A molécula denominada pela IUPAC como 4-metoxi-6-prop-2-enil-1,3-benzodioxol, que é apresentada na figura 12, possui fórmula molecular $C_{11}H_{12}O_3$, sendo então seu peso molecular igual à 192,21 g/mol, ponto de ebulição em 276,5°C e ponto de fusão em -20°C (PUBCHEM, 2021).

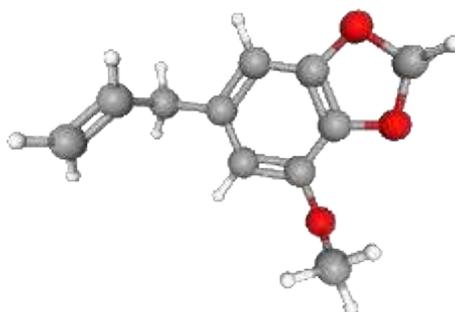


Figura 12: Estrutura 3D da Miristicina
Fonte: PubChem

3.4.2 Aplicações

Como as propriedades do OE de noz-moscada já eram conhecidas pela medicina tradicional (baseada nas teorias, crenças e experiência de diversos povos e culturas), despertou-se um interesse por parte das indústrias farmacêutica, de alimentos e cosméticos, pois apresentava muitos usos, principalmente medicamentosos, visto que apresenta poder anti-inflamatório, antiflatulento, antidiarréico, antitrombótico, e é também um agente hipolipemiante (que controla os níveis de colesterol) e afrodisíaco (OZAKY, Y., *et al.*, 1989; JANSSENS, J., *et al.*, 1990; RAM, A., *et al.*, 1996; OLAJIDE, OA., *et al.*, 1999; TAJUDDIN *et al.*, 2003)

Foi testada a atividade inseticida em larvas *Spilarctia obliqua*, aplicada topicamente, resultando na morte eficiente após 24 h, sendo a dose letal para eliminar 50% da população (LD50) igual a 104mg larva⁻¹. No entanto, quando aplicada em uma dieta, resultou em baixa mortalidade (SRIVASTAVA, S., *et al.*, 2008).

Foi investigado também, o potencial de causar apoptose (morte celular programada) em células K562 (relacionadas a Leucemia). Os resultados obtidos apontam que, no geral, a miristicina pode induzir apoptose, definida por alterações no potencial da membrana mitocondrial, fragmentação de DNA, liberação de citocromo C, dentre outras características avaliadas (MARTINS, C., *et al.*, 2014).

Na indústria de alimentos, nota-se o uso do óleo, devido ao aroma típico que provém da presença de miristicina, em substituição à noz-moscada, já que é mais marcante sensorialmente, além de evitar a presença de partículas em bebidas e alimentos. Sendo então, muito aplicada na produção de comidas, xaropes e doces, bebidas não alcoólicas e cremes dentais (FAO, 2000; YUN, C-H., *et al.*, 2003). Os principais efeitos psicoativos e farmacológicos são atribuídos a presença de miristicina (metil iso-eugenol) e a elemicina (metoxy eugenol) (FAO, 2000; STEIN, U., 2001).

3.4.3 Toxicidade

Apesar de toda a aplicabilidade, o mecanismo de toxicidade permanece incerto. Vários estudos apenas apontam que elevados níveis de Miristicina na noz-moscada, foram responsáveis por intoxicações (STEIN, U., 2001; BEYER, J., 2006).

Em um estudo desenvolvido, por meio de incubação microssomal em fígado de rato, dois metabólitos da miristicina foram produzidos e identificados na urina dos mesmos, sendo eles o 5-alil-1-metoxi-2,3-dihidroxibenzeno e 1'-hidroximiristicina. Verificou-se que os citocromos CYP3A4 e CYP1A2, foram os que mais contribuíram para a formação do 5-alil-1-metoxi-2,3-dihidroxibenzeno a partir da Miristicina (LEE *et al*, 1998; YUN, C-H., *et al*, 2003).

Baseado no estudo anterior, foi realizado um estudo sendo e identificados e caracterizados, 10 metabólitos da Miristicina e 11 da 1'-hidroximiristicina, *in vivo* e *in vitro*, por meio de análise UPLC-QTOF-MS/MS (ZHU, X., *et al* 2019). Os metabólitos representados nas figuras 13 e 14, a seguir:

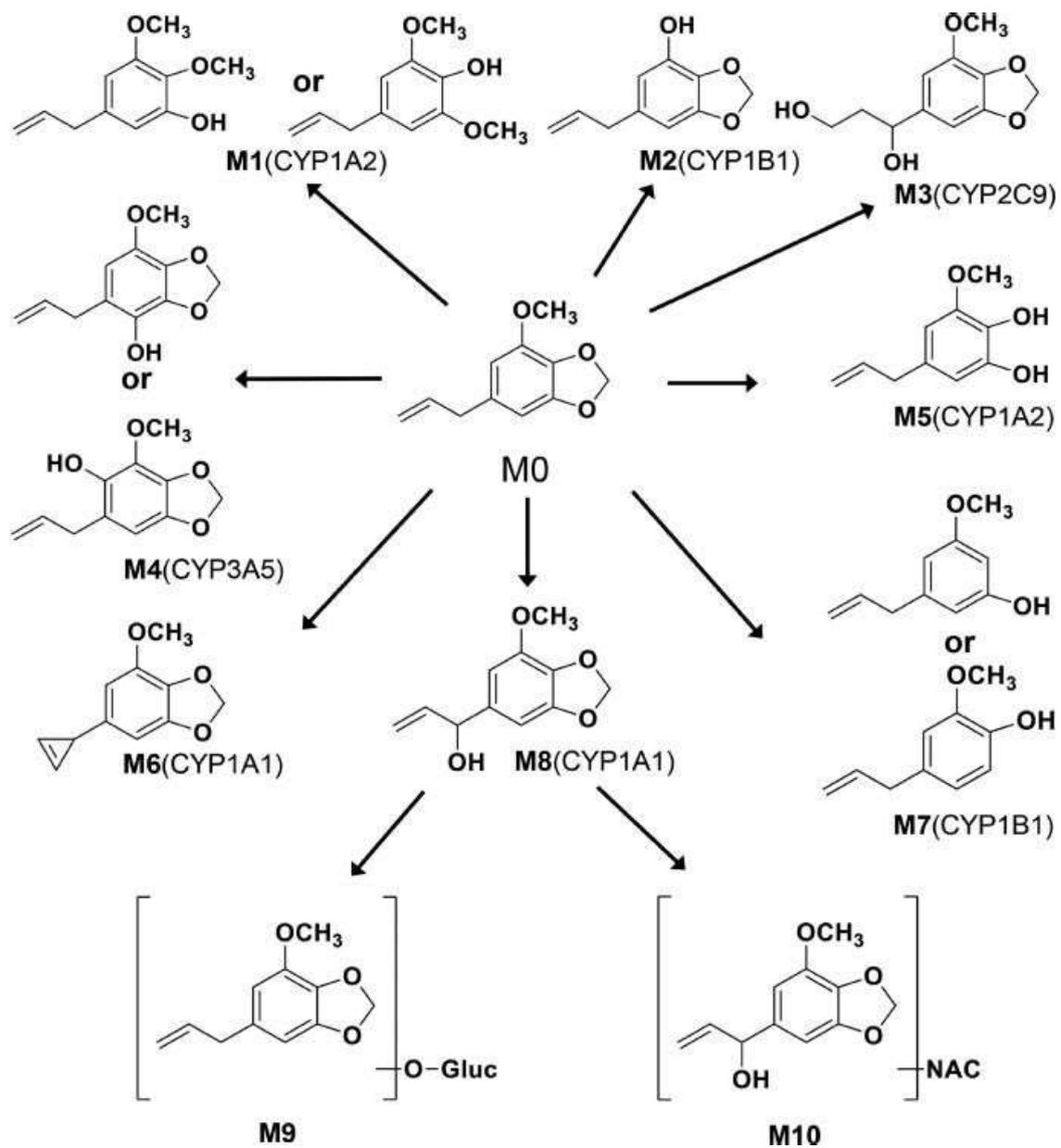


Figura 13: Vias metabólicas propostas da miristicina
 Fonte: Journal of Agricultural and Food Chemistry. (Zhu, X., et al, 2019).

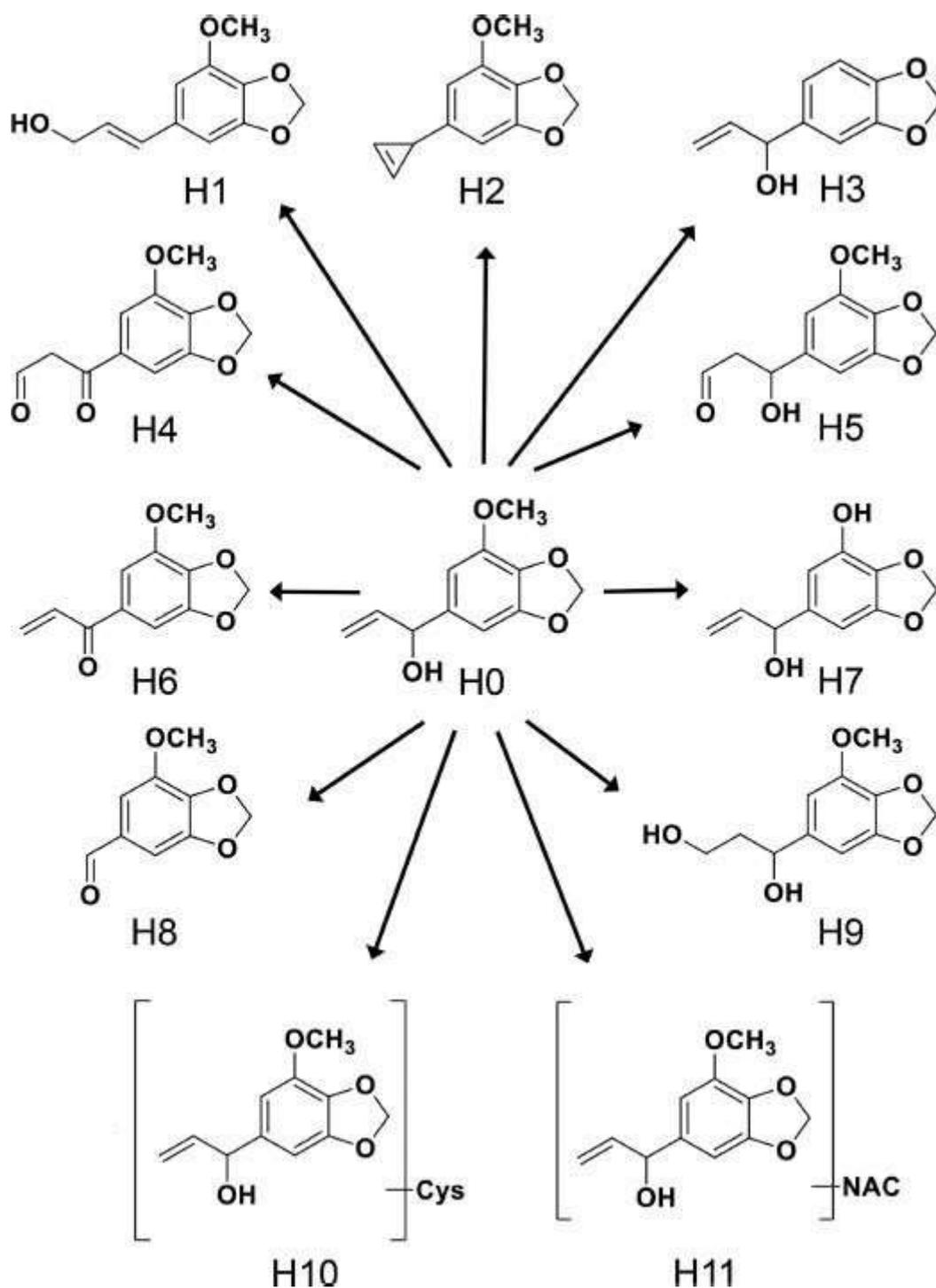


Figura 14: Vias metabólicas propostas da 1'-hidroximiristicina
 Fonte: *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* (Zhu, X., et al, 2019).

As reações metabólicas da Miristicina, na primeira fase, incluíram desidratação, hidroxilação e abertura do anel de dioxolano e na segunda fase, continham N-Acetilcisteína (NAC) e ácido glucurônico conjugado. Já as reações da 1'-hidroximiristicina, na primeira fase envolveram hidroxilação, desmetilação,

desidrogenação e desidratação, na segunda fase, apresentaram cisteína (Cys) e NAC conjugados (ZHU, X., 2019.)

A literatura demonstra que, a ingestão de, aproximadamente, 20 g de noz-moscada, após 1-7 h, é capaz de provocar efeitos psicoativos como delírios, convulsões, desorientação temporal, letargia, alucinação e euforia. Ao mesmo tempo que podem ocorrer náuseas, dor de cabeça, excitação, boca seca, midríase ou miose (dilatação e contração da pupila), taquicardia, angústia e tontura. A intensidade dos efeitos diminui após 24 h (FARNSWORTH, N. R., 1968; ABERNETHY, M. K., BECHER, L. B., 1992; HALLSTROM, H., THUVANDER, A. A., 1997; STEIN, U., 2001).

A dose letal (LD) da miristicina em ratos é de 2600 mg kg⁻¹, em camundongos é de 4620 mg kg⁻¹ e em hamsters 6000 mg kg⁻¹. Em humanos, há apenas relatos, onde por exemplo, uma criança de 8 anos ingeriu duas nozes, que ocasionou no falecimento da mesma e um homem de 55 anos, também faleceu por suspeita de envenenamento agudo por noz-moscada, posteriormente, foram encontrados 4,0 µg ml⁻¹ em seu sangue (HOLSTEGE, C. P., 2005)

3.5 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

A extração de óleos vegetais pode ser realizada por métodos como a prensagem, considerada o mais “natural” pois produz um óleo de boa qualidade e por não gerar resíduos tóxicos. Ou também, por métodos químicos, utilizando solventes orgânicos, que possuem a desvantagem de gerar resíduos tóxicos e necessitar realizar a separação do solvente no extrato (ECYCLE, 2021).

Já a extração de óleos essenciais é realizada por processos químicos como a hidrodestilação, destilação por arraste a vapor, extração por solvente, sendo dividida em duas, extração líquido-líquido (ELL) e extração sólido-líquido, ou com fluido supercrítico.

3.5.1 Destilação por Arraste a Vapor

A destilação por arraste a vapor se baseia na diferença de temperatura que compostos específicos volatilizam, e se faz vantajosa no quesito de ser relativamente simples e econômica, já que possibilita o uso de quantidades grandes de matéria-prima (STEFFANI, E., 2003).

Este processo é bem parecido com a hidrodestilação, porém o solvente é evaporado em uma caldeira, passa pelo destilador onde está a amostra, arrastando juntamente o OE, após passa por um condensador que o faz retornar para a fase líquida e segue para o coletor, onde será separado por diferença de polaridade (STEFFANI, E., 2003).

3.5.2 Extração por Solvente

Alguns óleos específicos podem ser sensíveis à temperatura, necessitando da utilização de solventes orgânicos para serem extraídos, sendo alguns exemplos de solvente o hexano, metanol, propanol, etanol e acetona (FILIPPIS, F. M., 2001).

A escolha do solvente se dá pela avaliação da polaridade, sendo escolhido geralmente solventes apolares, com seletividade e baixo custo, além de ser quimicamente inerte e possuir baixa temperatura de ebulição (FÜLLER, T. N., 2008; BIASI, L. A., DESCHAMPS, C., 2009).

3.5.2.1 Extração líquido-líquido (ELL)

É o método utilizado para transferir um ou mais componentes de uma mistura para outra fase líquida, baseado na diferença de solubilidade entre os dois líquidos, que geralmente são água e um solvente orgânico (FOUST, S., *et al*, 1982).

É uma técnica básica em laboratórios químicos, em que as substâncias desejadas se dissolvem preferencialmente em um solvente, realizado em funil de separação, onde há separação de fases e as fases podem ser separadas de forma mecânica (COULSON, M., *et al*, 1968).

3.5.3 Extração com Fluido Supercrítico

Qualquer substância em uma temperatura e pressão acima do seu ponto crítico é chamada de Fluido Supercrítico, pois acima daquele ponto, a separação das fases líquida e gasosa não é visualmente perceptível, além de adotar comportamentos como efluir através de sólidos, como um gás, e dissolver substâncias, como um líquido. Comumente utilizado na extração de compostos bioativos, é vantajoso devido ao melhor rendimento e pureza obtidos e também, pela facilidade em separar soluto do solvente, direcionando a mesma, apenas controlando temperatura e pressão (ARAÚJO, J. M. A., 2011).

3.5.4 Extração em Máquina de Café Expresso:

Um trabalho foi desenvolvido com intuito de facilitar o entendimento sobre extrações, isolamento de moléculas orgânicas, espectroscopia, cromatografia e aspectos da química medicinal. Utilizando-se de uma máquina de café expresso doméstica e não modificada para desenvolver um experimento baseado em extrair e separar eugenol de cravos por destilação a vapor (JUST, J., *et al.*, 2015).

Os experimentos de extração são relativamente simples, porém demandam diversos equipamentos, entre vidrarias e chapas ou mantas de aquecimento, e o processo é lento, se dá por concluído em algumas horas. Com auxílio da máquina de café expresso, o tempo do procedimento reduz para minutos e o equipamento necessário é a própria máquina e seus componentes.

O processo utilizado pela máquina de café é parecido com a extração por água quente pressurizada (PHWE), onde o solvente aquecido é forçado a passar por uma capsula contendo café a pressões de aproximadamente 9 bar. Existem 4 princípios básicos para uma boa extração do café, sendo:

- I) Dissolução dos compostos solúveis;
 - II) Dissolução de compostos menos solúveis facilitada por pressão;
 - III) Degradação térmica aprimorando a solubilidade;
 - IV) Presença de fase móvel para remoção física dos compostos da planta.
- (ZHANG, C., 2012).

3.5.4.1 Extração com água quente pressurizada (PHWE)

Esta técnica se tornou popular, por ser considerada um método “verde”, ou seja, não traz malefícios ao meio ambiente, e por ser eficiente para diferentes tipos de matrizes. Também pode ser aplicado no preparo de amostras, visto que, a metodologia é capaz de extrair contaminantes orgânicos utilizados na análise de segurança alimentar e de solos (TEO, C., *et al.*, 2010)

Os parâmetros fundamentais que influenciam na seletividade e eficiência desta extração são, principalmente, a temperatura, pressão, tempo de extração, vazão e adição de modificadores (ANDERSSON, T., *et al.*, 2003).

A temperatura se torna o principal fator que influencia na eficiência e seletividade, visto que é capaz de mudar as propriedades físico-químicas da água e ocasionar decomposição térmica do analito. Nesta técnica, a temperatura alta de extração, que geralmente está acima do ponto de ebulição do fluido utilizado, aliado a pressões, atinge vantagens como alta difusão, baixa viscosidade e baixa tensão superficial (SMITH, R. M., 2002).

3.5.4.2 Eficiência

A extração tradicional de compostos bioativos é baseada no poder de extração de diferentes solventes e aplicação de aquecimento e/ou agitação. Contudo, algumas de suas principais desvantagens são o elevado tempo, solventes tóxicos e decomposição de compostos termolábeis (GIL-CHAVES, G. *et al.*, 2013; AZMIR, J. *et al.*, 2013).

Paralelo as tradicionais formas de extração, existem métodos promissores como a extração assistida por micro-ondas (MAE), extração assistida por ultrassom (UAE), extração por solvente pressurizado (PSE), dentre outros. Sendo então as principais vantagens, a significativa redução no consumo de solventes e no tempo de análise, porém, o uso de um equipamento específico e a necessidade de manutenção, podem tornar o processo caro (ZOUAGH, M. *et al.*, 2004; PLAZA, M., TURNER, C., 2015)

Apesar de todo o esforço e avanços obtidos com as técnicas mencionadas anteriormente, a busca pela metodologia de extração mais eficiente, rápida e de baixo custo ainda continua (MARTINEZ-SENA, M. *et al.*, 2017).

No campo da extração de terpenos, a partir de produtos naturais, foi proposto a utilização de uma máquina de café expresso para a extração qualitativa de eugenol de cravo (JUST, J. *et al.*, 2015).

Um erro associado a utilização da máquina de café expresso, é a contaminação cruzada, devido a reutilização das cápsulas recicláveis, podendo ser evitado aplicando uma etapa de limpeza entre as extrações, ou trocando de cápsula (MARTINEZ-SENA, M. *et al.*, 2017).

A metodologia proposta é uma alternativa aos procedimentos comuns, pois apresenta menor custo e maior rapidez, custando cerca de 60 euros, aproximadamente 400 reais, e obtendo tempos de 20 a 30 segundos para cada extração. Sendo assim, a metodologia pode ser facilmente adotada de forma global, fomentando a pesquisa e desenvolvimento, mesmo com poucos recursos (MARTINEZ-SENA, M. *et al.*, 2017).

3.6 MÉTODOS DE SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO

Existem diversas técnicas de separação analítica, como por exemplo, a separação por precipitação, por destilação, extração orgânica ou inorgânica, podendo ser sólido-líquido ou líquido-líquido, e as cromatográficas. Atualmente, dentre as técnicas de separação, a que mais se destaca é a cromatografia, visto sua ampla aplicabilidade tanto na separação, quanto na identificação e determinação de compostos (SKOOG, D. A., *et al.*, 2006).

3.6.1 Cromatografia

A cromatografia é uma técnica onde, a partir de uma mistura, é possível separar os componentes baseado nas diferenças de velocidades de eluição, obtidas a partir da passagem através de uma fase estacionária, por uma fase móvel líquida ou gasosa (SKOOG, D. A., *et al.*, 2006).

Um cromatógrafo a gás, como sugere a figura 15, é constituído por:

- 1) Fase Móvel (F.M), que elui pelo sistema arrastando o analito;
- 2) Bomba, que garante pressão constante e força a passagem da F.M.;
- 3) Injetor, que injeta a amostra no sistema e garante a repetibilidade;
- 4) Coluna (Fase Estacionária, F.E), que separa os componentes da amostra por interações intramoleculares;
- 5) Detector, que recebe e gera os sinais posteriormente interpretados por um software específico.

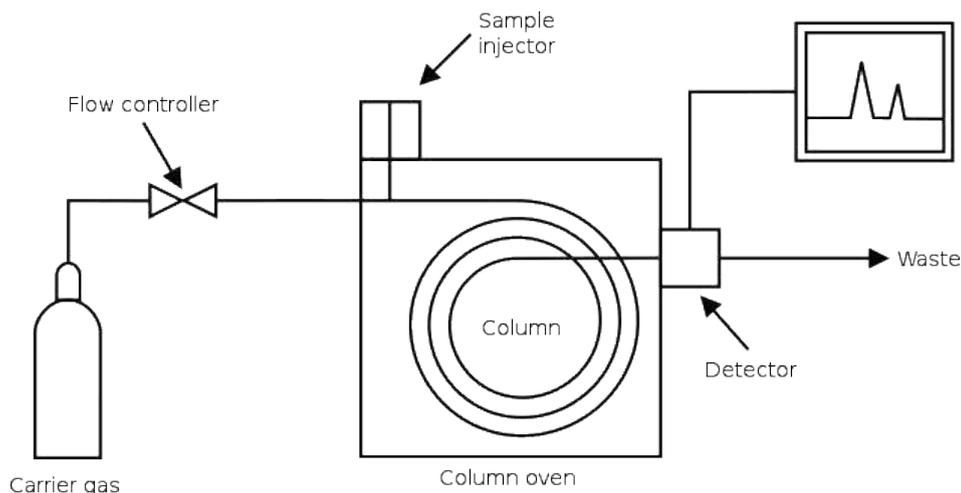
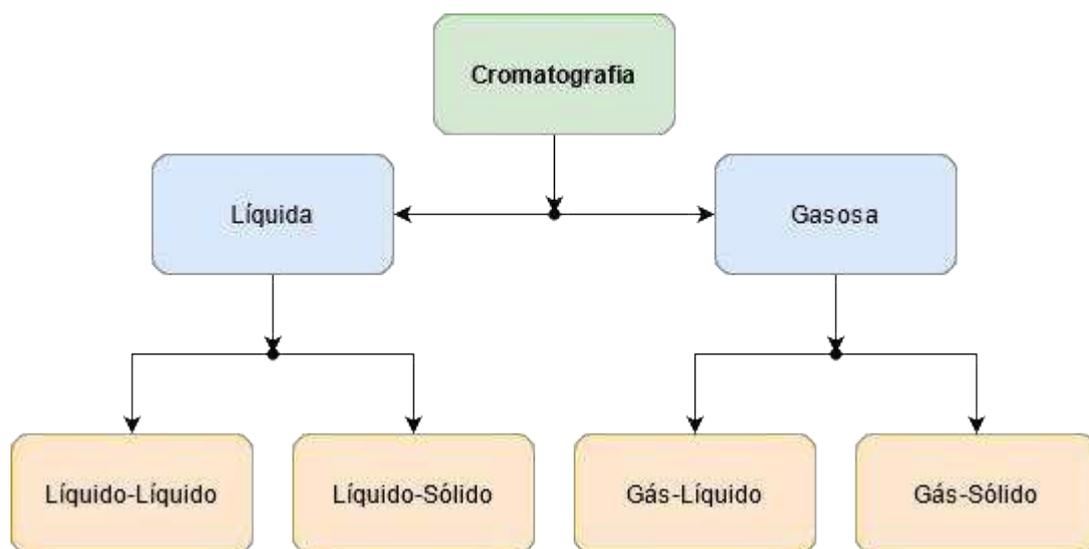


Figura 15: Partes de um cromatografo a gás
 Fonte: en.wikipedia.org / Autor: Offnfopt

Quanto a divisão dos métodos, são dois tipos básicos, a cromatografia planar (CCD), onde a fase estacionária usa uma placa plana ou papel poroso como suporte, para que a fase móvel elua (se desloque), por capilaridade ou por influência da gravidade e a em coluna, onde a fase estacionária fica dentro de um tubo estreito e a fase móvel se desloca devido a uma pressão aplicada (SKOOG, D. A., et al., 2006).

Também é possível dividir os métodos cromatográficos em coluna como mostra o fluxograma 1, apresentado abaixo:



Fluxograma 1: Classificação dos Métodos Cromatográficos em Coluna
 Fonte: Autoria Própria

3.6.2 Cromatografia em Óleos Essenciais

CG é o método de análise para misturas, onde o analito deve ser termicamente estável e de fácil volatilização, que é o caso dos óleos essenciais. Nesta metodologia, utiliza-se como fase móvel um gás inerte, geralmente Hélio (He), já que sua função é exclusivamente de transporte. O método GC (gás-sólido), conta com uma fase estacionária sólida e o analito fica adsorvido na mesma, porém este tipo é pouco utilizado. O método GC (gás-líquido), conta com a divisão do analito entre a fase móvel e a fase líquida imobilizada na superfície de um sólido inerte (SKOOG, D. A., *et al.*, 2002).

Gases ou moléculas orgânicas podem ser separadas devido as interações que farão com a coluna (fase estacionária), enquanto são arrastadas pelo gás inerte (fase móvel). Os compostos que interagem pouco com a F.E serão eluídos primeiro, até o detector, gerando um sinal, em seguida os que possuem mais afinidade. A análise em si é rápida, porém alguns analitos podem exigir preparo prévio (BARTLE, 2002).

Ainda pode-se dividir a técnica em duas, cromatografia gasosa (CG) e cromatografia gasosa de alta resolução (CGAR), a diferença se dá no fato de que na CGAR, a coluna é maior em comprimento e menor em diâmetro, além disso, possui uma fase líquida aplicada como “filme” (camada muito fina), nas paredes do tubo da coluna, sendo então mais eficiente quando comparada ao CG comum (DEGANI; A.; CASS, Q.; VIEIRA, P. 1998.)

A CGAR tem capacidade para alta resolução, porém este fator depende, principalmente da eficiência e da seletividade da coluna, e esta eficiência está diretamente ligada ao número de pratos teóricos (COLLINS, C.; BRAGA; G.; BONATO, P. 2006).

3.6.3 Cromatografia em Camada Delgada

Apesar de existirem outras técnicas analíticas, como CG ou a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a CCD ainda permanece sendo o método mais útil, rápido e de baixo custo para separação e identificação de misturas complexas de matrizes vegetais (WAGNER, H., BLADT, S. 1996).

São utilizadas placas de sílica, visto que as mesmas são muito eficientes na absorção de compostos. Quando salas especiais para realização deste tipo de metodologia não estão disponíveis, as análises podem ser realizadas em capela à temperatura ambiente. É importante salientar que esta técnica se faz muito útil, quando há repetibilidade nas condições adotadas e os detalhes necessários podem ser encontrados em farmacopeias e livros (WAGNER, H., BLADT, S. 1996).

3.6.4 Espectrometria UV-Vis

Ao emitir radiação contínua em um material, uma parte dessa radiação pode ser absorvida, pois está associada as transições eletrônicas, resultando em um espectro, geralmente registrado como uma função de absorbância vs comprimento de onda. Nesta absorção, um elétron passa de um estado de energia mais baixo, para um estado de energia mais alto (PAVIA, D. *et al.* 2010).

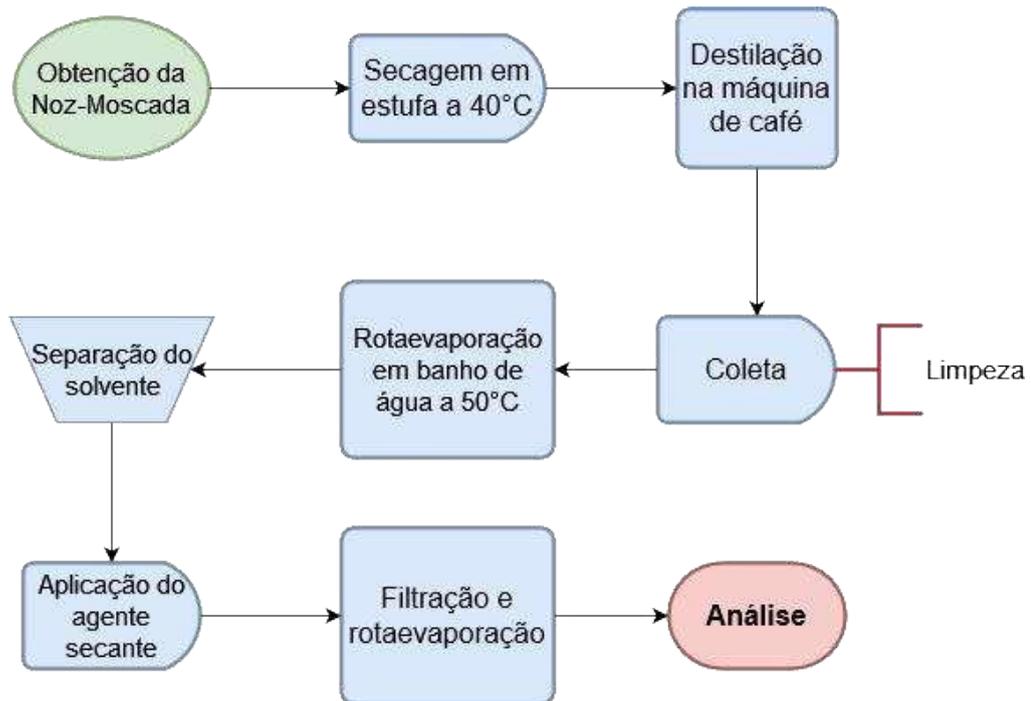
No caso de moléculas, por haverem muitos modos excitados de vibração e rotação, a absorção de radiação UV se dá numa ampla faixa de comprimentos de onda, sendo assim, o espectro UV das mesmas geralmente se dá por uma banda larga, centralizada no ponto onde há maior absorção (PAVIA, D. *et al.* 2010).

3.6.5 Espectrometria de Massas

Esta técnica é baseada na formação e detecção de íons, de acordo com sua massa e carga. O sinal gerado é convertido em um gráfico de massa x abundância. Existem diversas formas de produzir estes íons, a mais comum é denominada impacto de elétrons, onde uma amostra sob alto vácuo é bombardeada com um feixe de elétrons. O impacto faz com que a molécula perca 1 elétron, assim ficando com carga +1 e um elétron não compartilhado, adquirindo então a denominação “íon molecular” (SOLOMONS, T. W. G., 2009).

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho visou aprimorar uma técnica, diminuindo o tempo de extração do OE de noz-moscada, a partir da utilização de uma máquina de café expresso. Seguindo o fluxograma 2, que mostra o procedimento adotado.



Fluxograma 2: Procedimento de obtenção do extrato
Fonte: Autoria Própria

4.1 COLETA DE AMOSTRA

Em um supermercado próximo, foi adquirido aproximadamente 100 g de noz-moscada in natura e moída, suficiente para a extração.

4.2 PREPARO DE SOLUÇÕES

Solução aquosa de etanol 25%:

O preparo da solução iniciou-se a partir de 250 mL de etanol P.A, medidos em proveta, em seguida transferidos para balão volumétrico de 1 L, onde foi avolumado com adição de água destilada e após, armazenado de forma adequada.

Solução de NaOH 2 mol L⁻¹:

Esta solução foi preparada pesando 40 g de hidróxido de sódio em micropérolas, que foram transferidos cuidadosamente, aos poucos, para balão volumétrico de 500 mL em banho de gelo (devido ao processo ser muito exotérmico, o NaOH pode fundir no fundo do balão). Após avolumado com água destilada, foi armazenado adequadamente.

Solução de HCl 10 mol L⁻¹:

Em balão volumétrico de 100 mL, foi adicionado um pouco de água destilada, logo após, foram mensurados 82,86 mL de HCl P.A, em pipetas de 10 e 5 mL e transferidos para o balão, então foi avolumado com água destilada e armazenado adequadamente.

4.3 SOLVENTE DE EXTRAÇÃO

O solvente foi preparado a partir da diluição de etanol P.A em água destilada, seguindo a proporção 25% (v/v), ou seja, em um balão volumétrico de 1 L foi adicionado 250 mL de etanol P.A, 750 mL de água destilada com auxílio de uma proveta.

4.4 EXTRAÇÃO

Para realizar a extração do OE, primeiro foi realizada a secagem da amostra em estufa até peso constante. Então, em posse da máquina de café expresso, foi realizada um processo de limpeza, externo e interno (função do próprio equipamento).

Após adicionado 2 g de amostra em uma cápsula reutilizável e o solvente despejado no reservatório da máquina, a mesma é ligada e aquecida.

Para cada amostra, a noz-moscada em pó foi submetida a passagem de aproximadamente 200 mL de solvente aquecido à ~ 75 °C, sendo esta passagem dividida em 4, resultando em coletas de aproximadamente 50 mL, com intervalos de 30 s entre cada passagem, retiradas em béquer.

Ao final da coleta foi realizado o procedimento de limpeza da máquina, sendo uma passagem com etanol P.A e duas com água, para garantir que não haja resquícios de outra amostra.

4.5 SEPARAÇÃO DO SOLVENTE

Foi realizada rota evaporação por aproximadamente 10 minutos em vácuo (~ 600 mmHg) e banho de água a 50 °C com o objetivo de retirar o etanol presente na mistura.

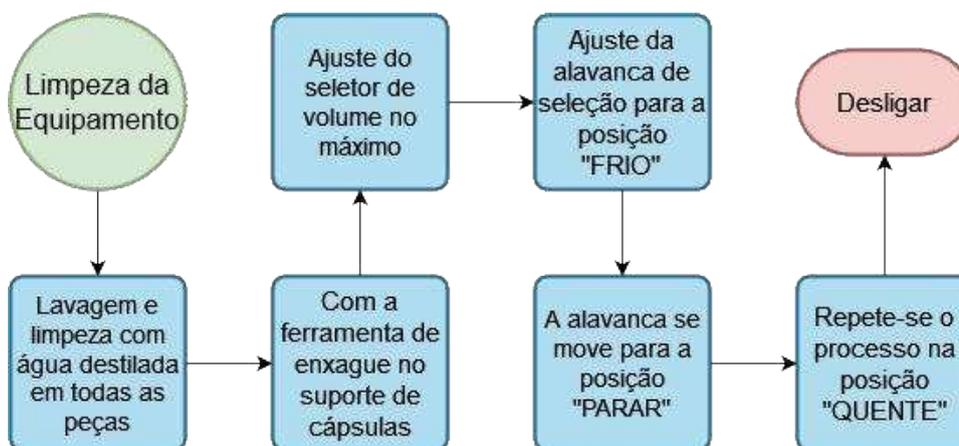
À fase aquosa resultante, foi adicionado 150 mL de diclorometano P.A (CH_2Cl_2), sendo uma dose de 50 mL por vez (3x50 mL). Então, de modo a extrair seletivamente a miristicina na fase aquosa, foi preparado em um balão volumétrico de 500 mL, em banho de gelo, a partir de 40 g de NaOH (99% de pureza) em pérolas, uma solução 2 mol dm^{-3} , em seguida esta solução foi adicionada em 3 doses de 30mL (3x30mL).

Aos extratos de hidróxido de sódio, foi adicionado uma solução aquosa de HCl 10 mol dm^{-3} , preparado a partir de 82,86 mL diluídos em balão volumétrico de 100 mL, calculados com base em HCl P.A, 37% de pureza e densidade igual a $1,19 \text{ g cm}^{-3}$, até pH 1, onde se observa a formação de uma emulsão. Novamente foi adicionado CH_2Cl_2 , porém em 3 doses de 20 mL. Foi adicionado sulfato de magnésio à mistura obtida, em seguida a mesma foi filtrada e novamente rota evaporada com o objetivo de concentrar mais a amostra.

4.6 LIMPEZA DA MÁQUINA

Para garantir os resultados obtidos, evitar contaminações e garantir a durabilidade do equipamento, foi realizado um processo de limpeza, utilizando água destilada e etanol P.A. O equipamento conta com uma função específica para limpeza do mesmo.

Após realizado o procedimento padrão do equipamento, descrito no fluxograma 3, o mesmo procedimento foi repetido, porém utilizando apenas etanol P.A no reservatório e a alavanca de seleção apenas na posição "FRIO", logo após, com apenas água destilada no reservatório e as duas posições da alavanca de seleção, nesta ordem.



Fluxograma 3: Processo de Limpeza do Equipamento
Fonte: Manual de Instruções da máquina utilizada

4.7 ANÁLISES

Se fez necessária a adição de diclorometano (CH_2Cl_2) para coleta e armazenamento da amostra em vial, visto que, a quantidade de óleo obtida após a etapa de concentração foi muito baixa, então, foram realizadas 5 lavagens com aproximadamente 1 mL de CH_2Cl_2 , o conteúdo foi transferido para um vial limpo e seco, e estocado em geladeira com ausência de luz e temperatura aproximada de 5 °C, de modo a evitar ao máximo a degradação da amostra.

4.7.1 CCD

Para esta análise, realizada em capela, utilizou-se a fase móvel tolueno:acetato de etila (93:7) e fase estacionária Sílica Gel 60F₂₅₄ (Merk, Germany). O agente revelador utilizado foi o Anisaldeído Sulfúrico, que foi preparado da seguinte forma: A uma mistura à 0 °C de ácido acético (5 mL) e etanol absoluto (465 mL) é adicionado o anisaldeído (12,5 mL), seguida pela adição lenta de ácido sulfúrico concentrado (17,5 mL). Por ser sensível a luz, o armazenamento deve ser feito em frasco âmbar, envolto em papel alumínio e estocado em geladeira.

A cuba cromatográfica foi improvisada em um béquer de 500 mL, onde adicionou-se 10 mL da fase móvel e juntamente uma folha de papel filtro para verificar o momento em que o ambiente estiver completamente saturado, todo o conjunto se manteve tampado.

Em posse da placa com as marcações devidamente feitas, com auxílio de um capilar, realizou-se 3 aplicações rápidas em cima do mesmo ponto, de modo a fornecer material suficiente para separação, porém controlando o tamanho do mesmo.

A placa foi inserida na cuba e aguardou-se a eluição da fase móvel até a distância desejada. Após a completa eluição, com aparato adequado, aplicou-se o agente revelador e levou-se a placa até uma estufa previamente aquecida a 110 °C e lá se manteve por 10 minutos.

4.7.2 Espectroscopia UV-Vis

O espectrofotômetro utilizado foi o modelo UV-VIS DUPLO FEIXE IL-0082-Y, da marca KASUAKI, que opera na faixa de comprimentos de onda de 190 ~ 1100 nm, possui monocromador óptico de duplo feixe, largura de banda espectral de 2 nm, lâmpada de deutério/tungstênio e detector de fotodiodo de silício. Foi utilizada cubeta de vidro.

O equipamento foi configurado para medir na faixa de 190 ~ 500 nm. Para calibrar o “blank” (branco), a matriz utilizada foi diclorometano, já que era o solvente em que a amostra estava diluída. Após adicionar a amostra em outra cubeta, necessitou-se completar o volume com mais diclorometano, para garantir a passagem correta da radiação. O espectro obtido foi salvo em pen-drive e os dados plotados no software Origin 8.5.

4.7.3 Cor, Odor e Solubilidade

Sensorialmente, foi possível destacar a cor e o odor da amostra. Para testar a solubilidade, uma amostra foi dividida em 2 béqueres, adicionado água no primeiro e etanol no segundo, observou-se a ocorrência de separação de fases no primeiro.

4.7.4 Cromatografia Gasosa acoplada a espectrometria de massas

O equipamento utilizado foi um CG-EM da marca Shimadzu, modelo GC-2010 Plus, acoplado a detector de massas em tandem do tipo quadrupolo modelo TQ8040 e injetor automático modelo AOC-5000 Plus. Sendo então a coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (5% difenil + 95% dimetil polissiloxano) com 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm.

Nas configurações de fluxo igual a 1,02 mL min⁻¹ de gás Hélio, no modo Split 1:90, temperatura de 250 °C no injetor e 70 eV no sistema de ionização. Sendo injetado 1 µL e em rampa de aquecimento, na temperatura inicial de 60 °C até 250 °C, com aquecimento de 3 °C min⁻¹.

4.8 INTERPRETAÇÃO

Para interpretação dos resultados obtidos, foi feita a identificação baseada no índice aritmético (IA), determinado a partir da injeção de uma série homologa de hidrocarbonetos lineares saturados contendo de C7 - C34 átomos de carbono, nas mesmas condições cromatográficas da amostra. Estes índices são calculados utilizando os tempos de retenção obtidos e comparados com a literatura e seus espectros de massas.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PREPARO DA AMOSTRA

Para o preparo da amostra, percebeu-se que a noz-moscada moída industrialmente é muito fina e, quando entra em contato com o solvente, forma uma massa que impede a passagem do mesmo, logo, para contornar o problema, utilizou-se da noz in natura, moída com auxílio de almofariz e pistilo, peneirada e seca em estufa a 40 °C. A figura 16 mostra a noz moída antes de ser peneirada.



Figura 16: Noz-moscada moída
Fonte: Autoria Própria

5.2 EXTRAÇÃO

Com aproximadamente 800 mL de etanol 25% no tanque da máquina de café e a amostra adicionada e devidamente vedada na capsula reutilizável, o seletor de volume na posição mínima (~50 mL), após alguns segundos de aquecimento, a passagem do solvente é iniciada quando o seletor de temperatura é posto na posição “quente”. O procedimento demora em média 5 minutos. A figura 17 demonstra a solução obtida após esta etapa.



Figura 17: Solução obtida após extração
Fonte: Autoria Própria

Após transferir o extrato para um balão esmerilhado e rotaevaporar por 10 minutos, sob vácuo (~ 650 mmHg) e a temperatura de 50 °C constantes, obtêm-se uma diminuição no volume do extrato em um balão e um pequeno volume (~ 35 mL) no outro, com odor e cor característicos de etanol, tendo em vista que este era o objetivo.

5.3 SEPARAÇÃO DO SOLVENTE

Na etapa de separação do solvente, com o extrato transferido para um funil de separação e adicionado as 3 doses de diclorometano, seguindo a metodologia, onde se faz necessária a agitação e liberação de gases, observa-se a formação de duas fases. Sendo então coletada a fase de diclorometano, a fase orgânica restante foi armazenada para posterior tratamento de descarte.

A utilização desta técnica é eficiente, pois considera-se que o soluto se distribui entre os dois solventes e a substância alvo apresenta melhor solubilidade no solvente diclorometano.

Ao extrato de diclorometano, ainda em funil de separação, é adicionado, em 3 doses de 30 mL, hidróxido de sódio, em seguida, aproximadamente 20 mL de HCl, onde a solução atinge pH = 1, logo, formam-se mais duas fases, sendo a fase superior, aquosa, e a inferior composta por diclorometano. Coletada a fase de diclorometano, é adicionado, também em 3 doses, 60 mL de diclorometano puro, de modo a garantir a completa separação da fase aquosa. Toda a solução aquosa é coletada e armazenada para posterior tratamento e descarte.

À solução resultante é adicionado sulfato de magnésio anidro, um agente secante, com a finalidade de retirar toda a água que ainda poderia estar presente na amostra, que é separado mecanicamente por filtração e o líquido coletado é novamente rotaevaporado, sob vácuo, por aproximadamente 10 min a uma temperatura de 40 °C. Logo após as lavagens com diclorometano, a amostrada é armazenada em vial, como representado na figura 18.



Figura 18: Amostra armazenada em vial
Fonte: Autoria Própria

5.4 IDENTIFICAÇÃO

A primeira análise feita foi a sensorial, visto que, por se tratar de um OE, existem características específicas que podem ser facilmente notadas, como por exemplo, a cor, odor e intensidade do odor, dentre outras. Como sugere a tabela 2, as características notadas foram:

Tabela 2: Classificação sensorial do óleo obtido

| Característica | Análise |
|-----------------------|----------------|
| Odor Picante | |
| Intensidade do Odor | Forte |
| Cor Amarelo Claro | |

Fonte: Autoria Própria

A cor do OE de noz-moscada foi avaliada em duas regiões, alguns países do continente Americano, e alguns países do sudeste asiático. Foi constatado que na primeira região (Américas) a cor era sempre amarelo pálido e na segunda região variava de incolor e amarelo. (GOPALAKRISHAN, M. 1992).

Quanto ao sabor, todos os óleos essenciais são caracterizados por um possuir um sabor doce, adstringente e picante. (VENTURELLA, V. 2000). A solubilidade também foi verificada e percebeu-se que o óleo obtido era insolúvel em água, porém solúvel em etanol. Conforme a literatura, insolúvel em água, pouco solúvel em etanol e muito solúvel em éter ou benzeno. (PUBCHEM, 2021)

A segunda análise realizada foi a CCD, visto que: As “fingerprints” (célula resultante da separação em placa) de cada molécula, e o detalhamento da composição química característica de cada extrato, são uma fonte rápida e confiável de se identificar e verificar a pureza do material. (WAGNER, H., BLADT, S. 1996).

A partir da fase móvel tolueno-acetato de etila (93:7) e tomando como agente revelador anisaldeído sulfúrico, obtivemos o resultado apresentado pela figura 19:



Figura 19: Amostra de OE de noz-moscada em placa de sílica
Fonte: Autoria Própria

Percebe-se a presença de 4 pontos, sendo “1” a origem da amostra. Calculando os R_f 's, obtemos o valor de 0,96 para o ponto “4”.

De acordo com o estudo de AL-JUMAILY, E. *et al.* (2012), que testou amostras de diferentes formas de extração do OE em questão, todas continham Miristicina, que aparecia como uma área marrom, na parte superior da placa apresentando $R_f = 0,9$, conforme mostra a figura 20:

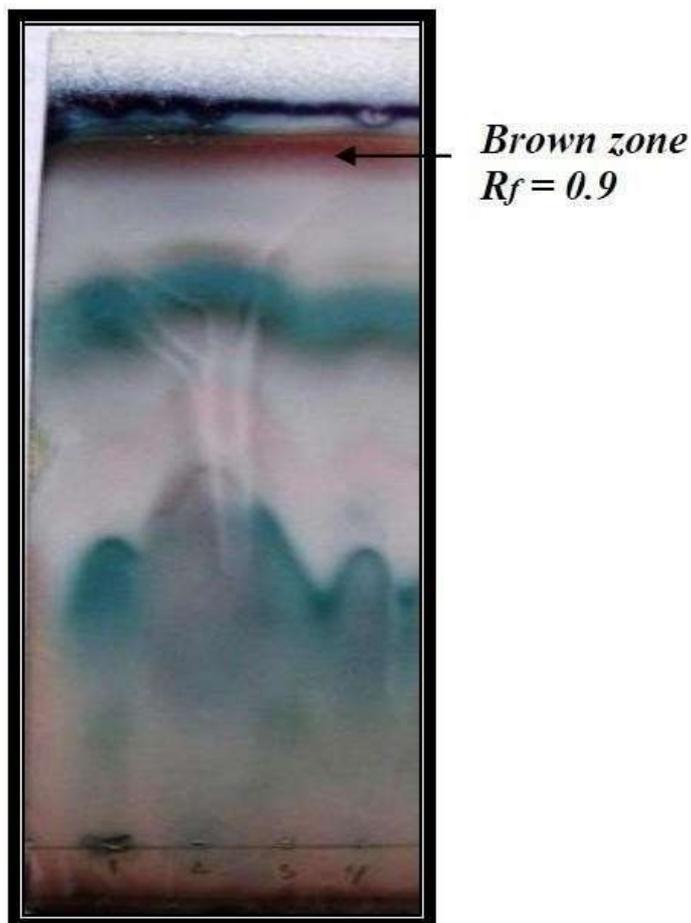


Figura 20: CCD do OE em tolueno:acetato de etila
Fonte: AL-JUMAILY, E. et al., Journal of Al-Nahrain University, 2012.

A análise de compostos de material vegetal obtido comercialmente muitas vezes apresenta zonas adicionais na parte de baixo da placa, ou seja, apresentam R_f baixo. Estas áreas surgem devido a resinificação, impurezas ou produtos de decomposição. (WAGNER, H., BLADT, S., 1996).

É facilmente notável a diferença entre os resultados, considerando os processos aplicados e a CCD apresentada na literatura, é possível propor que ocorreu uma boa separação e há bons indicativos da presença de mirsiticina.

Após considerar as afirmações acima, foi adicionado o agente revelador em excesso, de modo a tentar melhorar a visibilidade das “manchas” na placa de sílica, como mostra a figura 21:

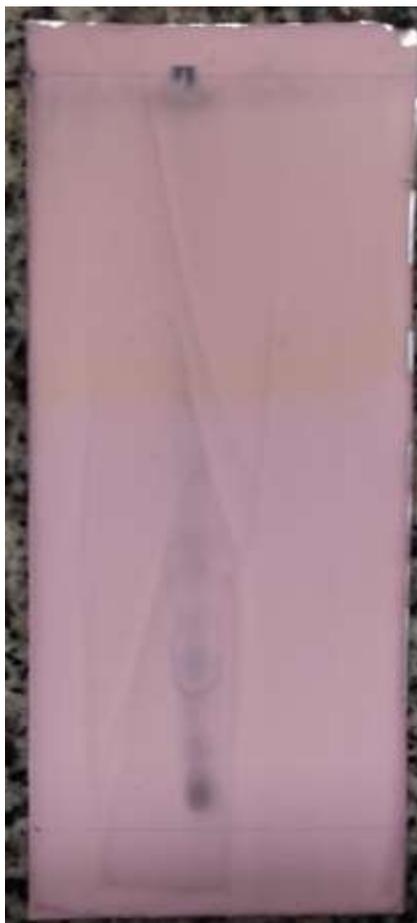


Figura 21: Amostra de OE em placa com excesso de revelador

Desta forma, fica melhor evidenciado os pontos onde encontram-se as substâncias analisadas.

A terceira análise realizada foi a espectroscopia UV-Vis, pois sabe-se que, espectros de absorção, assim como as células na CCD, são “impressões digitais” dos compostos, ou seja, caracterizam a presença dos mesmos, o espectro obtido é apresentado na figura 22:

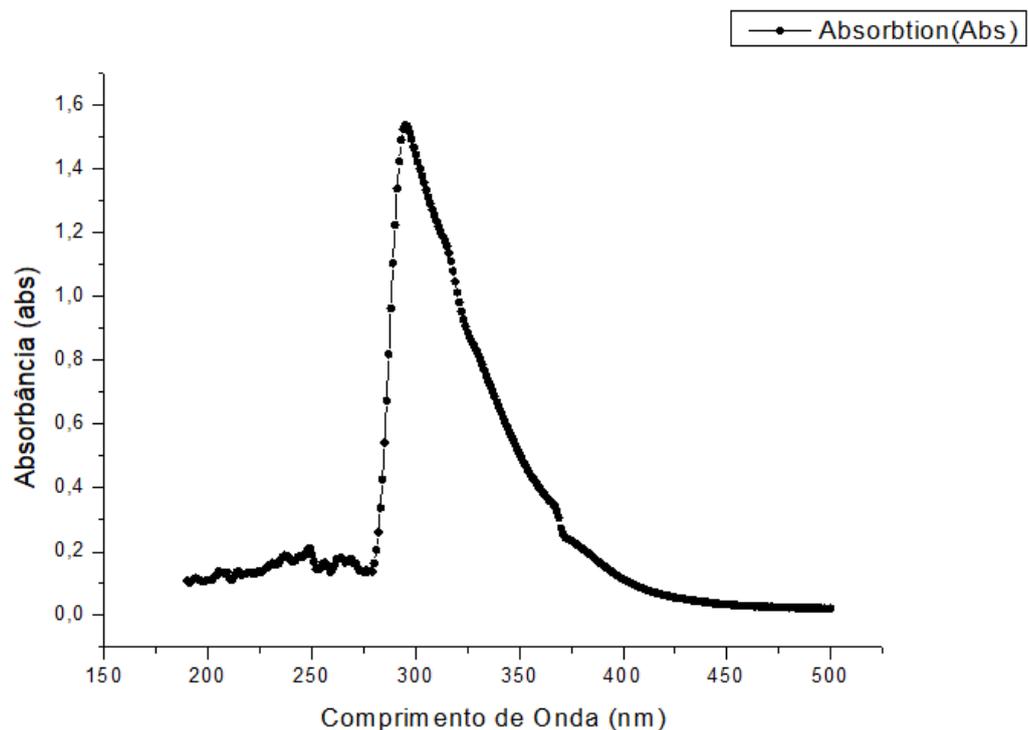


Figura 22: Espectro de absorção da amostra de OE

Pode-se observar no espectro de absorção apresentado, uma banda na região de 275 ~300 nm. Conforme o “Case report” escrito por STEIN, U. *et al.* (2001). Em um caso fatal de uma mulher de 55 anos, causado por intoxicação por abuso na ingestão de noz-moscada, a miristicina, pela primeira vez foi identificada no “*post mortem serum*” com auxílio de espectroscopia UV-Vis e CCD. No espectro obtido pelo UV-Vis, a banda de absorção máxima se apresenta na região de 280 nm.

Sementes em pó de noz-moscada obtidas em diferentes locais, foram analisadas, de modo a identificar e quantificar miristicina e safrol. Os comprimentos de onda de absorção máxima ficaram entre 210 e 290 nm. (DIGHE, V.; CHAREGAONKAR, G. 2009).

Sendo assim, a quarta análise realizada foi a CG/EM, que resultou no cromatograma apresentado na figura 23:

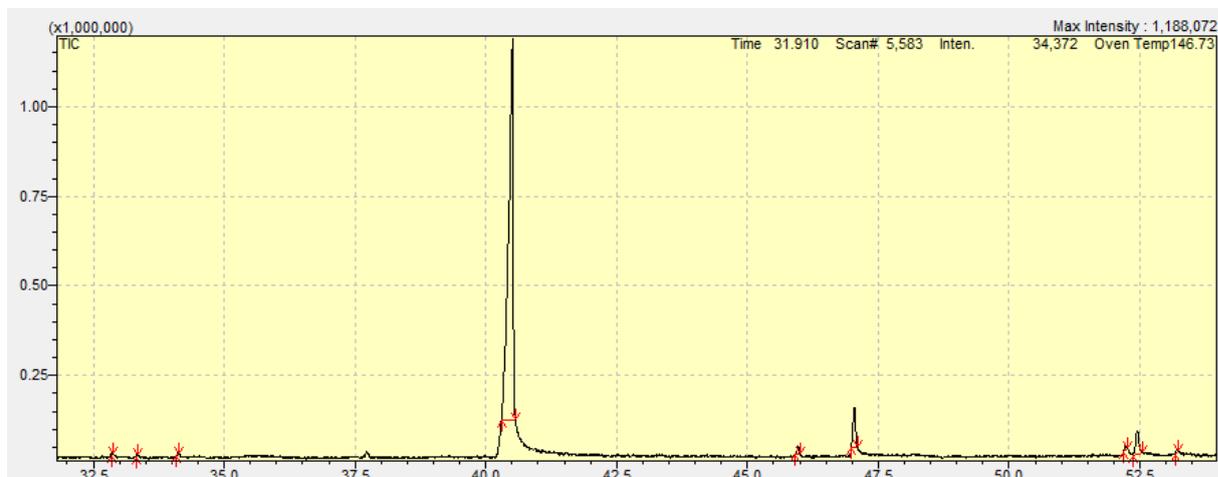


Figura 23: Cromatograma com picos integrados da amostra de OE de Noz Moscada

Utilizado o software LabSolutions™ da Shimadzu, foi feita a integração dos picos do cromatograma da amostra, de forma manual, com o intuito de diferenciar melhor os sinais gerados e obter uma integração mais precisa. Os padrões tiveram os picos integrados de forma automática, visto que seus resultados já são conhecidos e bem definidos, porém foram selecionados, com base nos tempos de retenção, apenas aqueles que poderiam ser comparados com a amostra.

De maneira a facilitar a visualização dos compostos identificados, assim como seus tempos de retenção, porcentagem em área e índices aritméticos, foi elaborada a tabela 3:

Tabela 3: Dados para identificação dos compostos

| Composto | TR | IA | % |
|----------|------------|----------|-----------|
| 1 | 32,86 6 | 135 8 | 0,15 |
| 2 | 33,34 0 | 137 0 | 0,11 |
| 3 | 34,11 3 | 139 0 | 0,09 |
| 4 | 40,50 8 | 156 3 | 88,7 1 |
| 5 | 45,96 5 | 172 4 | 0,86 |
| 6 | 47,04 8 | 175 7 | 5,42 |
| 7 | 52,23 0 | 192 4 | 0,47 |
| 8 | 52,45 5 | 193 1 | 3,75 |
| 9 | 53,21 5 | 195 7 | 0,41 |

Para os cálculos do índice aritmético, foram utilizados os tempos de retenção para os padrões de n-alcenos indicados na tabela 4, a seguir:

Tabela 4: Dados dos padrões

| n- alcano | TR |
|----------------------|---------------|
| 13 | 30,584 |
| 14 | 34,519 |
| 15 | 38,258 |
| 16 | 41,805 |
| 17 | 45,199 |
| 18 | 48,431 |
| 19 | 51,529 |
| 20 | 54,489 |
| 21 | 57,330 |

Torna-se notável que as porcentagens que representam a quantidade do composto na amostra, são quase insignificantes com exceção de uma, porém todos os IA's foram comparados com a literatura. Sendo identificados então, apenas 3 deles.

Para o composto 2, com TR = 33,340 e IA = 1370, temos o espectro de massas apresentado na figura 24:

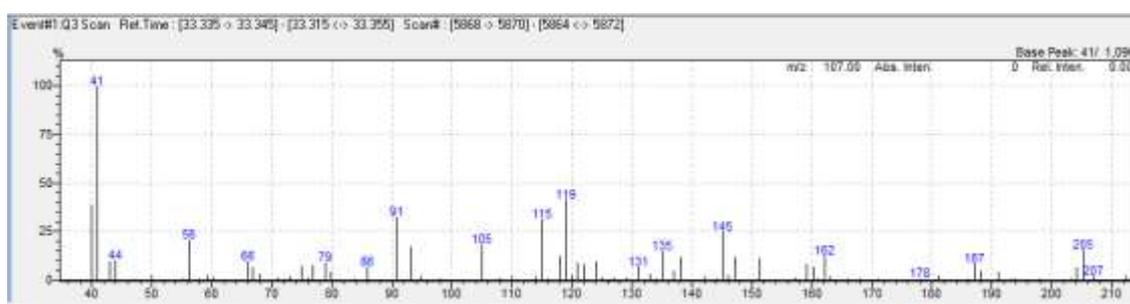


Figura 24: Espectro de massas do composto 2

Comparado aos IA's propostos por ADAMS, 2007., numa faixa que varia entre 10 unidades acima e abaixo do IA calculado, tem-se o resultado demonstrado na figura 25:

RT: 23.08 AI: 1365 KI: 1367 Caryyl acetate <cis->
 CAS#: 1205-42-1 MF: C₁₂H₁₈O₂ FW: 194 MSD LIB#: 369
 CN: 2-cyclohexen-1-ol, 2-methyl-5-(1-methylethenyl)-, acetate, cis-
 Synonyms: p-mentha-6,8-dien-2-ol, acetate, cis-
 Source: SCM Chem. ex H. Hills; 2.00% *Mentha spicata*, Perf. Flav. 5:6(1980);
 0.87% *Abies ernestii*; 0.50% *Cistus ladaniferus*

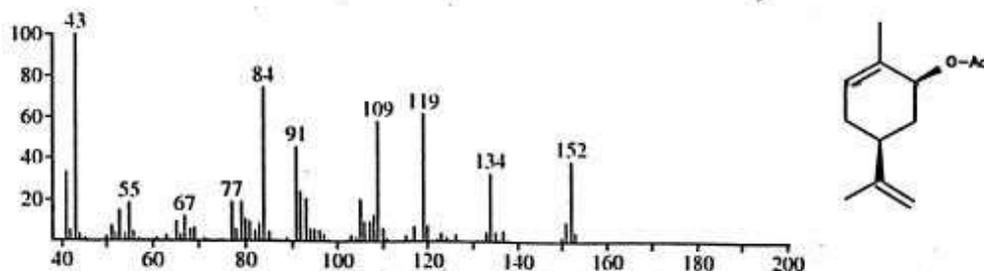


Figura 25: Espectro de massa e IA para propor o composto 2
 Fonte: ADAMS, 2007

Observando o perfil de fragmentação da amostra, nota-se o pico base em m/z 41 e alguns picos relevantes em m/z 91, 105, 119 e 135, já na literatura, o pico base está próximo, em m/z 43 e apresenta os fragmentos m/z 91, 109, 119 e 135, logo, propomos que ambos tem o mesmo perfil de fragmentos. Para o composto 3, com TR = 34,113 e IA = 1390, obtivemos o espectro de massas apresentado na figura 26:

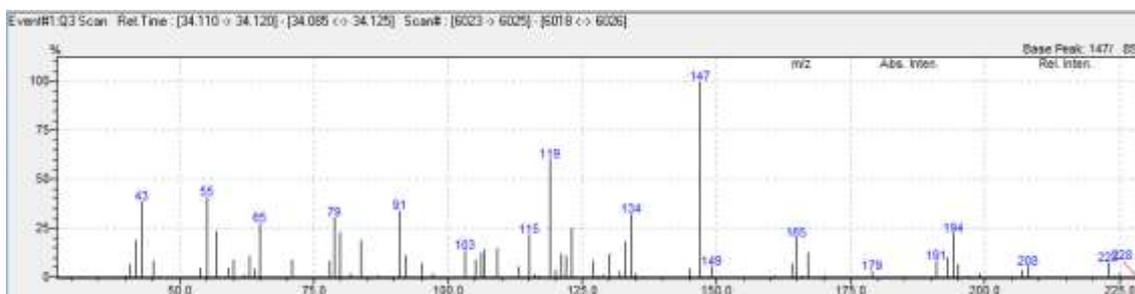


Figura 26: Espectro de massas do composto 3

Como anteriormente, comparado a literatura, temos o espectro exposto na figura 27:

RT: 23.74 Al: 1380 Kl: 1381 Anisole <p-but-(1E)-enyl->
CAS#: 18657-09-5 MF: C11 H14 O FW: 162 MSD LIB#: 1859
CN: benzene, 1-(1E)-1-butenyl-4-methoxy-
Synonyms: Anisole, p-1-butenyl-, (E)-
Source: *Anomum uliginosum* ex JJ Brophy

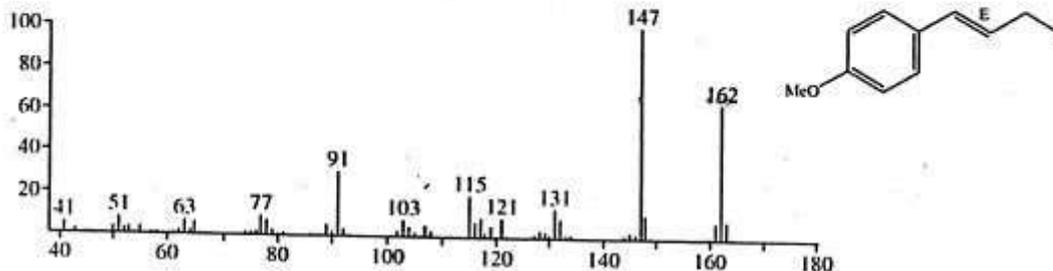


Figura 27: Espectro de massas e IA para propor o composto
3Fonte: ADAMS, 2007.

Observando novamente o perfil de fragmentação da amostra, nota-se o pico base em m/z 147 e fragmentos relevantes em m/z 91, 103, 115 e 134, já na literatura, o pico base é o m/z 147 e apresenta os picos m/z 91, 103, 115 e 131, logo, propomos que ambos tem o mesmo perfil de fragmentação.

No composto 4, onde há maior intensidade, TR = 40,508 e IA = 1563, o resultado é evidenciado na figura 28:

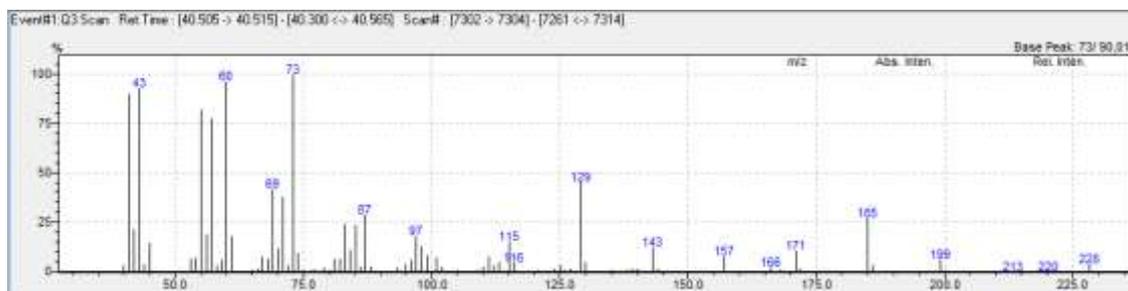


Figura 28: Espectro de massas do composto 4

Sendo sugerido pela literatura a figura 29:

RT: 31.47 AI: 1565 KI: 1566 **Dodecanoic acid**
CAS#: 143-07-7 MF: C12 H24 O2 FW: 200 MSD LIB#: 625
CN: dodecanoic acid
Synonyms: lauric acid
Source: ref. epd. ex E von Rudloff; 24.26% *Psidium guajava*, FFJ 6:233(1991);
15.64% *Zizyphus guajava*; 9.00% *Machilus bombycina*

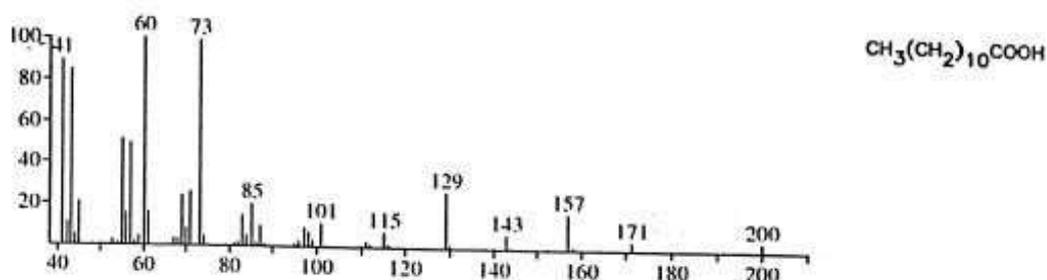


Figura 29: Espectro de massas e IA para propor o composto 4
Fonte: ADAMS, 2007.

Pelo cálculo do IA, a literatura sugere que o composto seja o ácido dodecanóico, CH₃(CH₂)₁₀COOH ou ácido láurico. Porém, observando o espectro de massas e conhecendo a possível composição da amostra, nota-se o pico m/z 228, que corresponde a massa molar do ácido tetradecanóico, CH₃(CH₂)₁₂COOH ou ácido mirístico, o que faria sentido propor.

Então, de modo a ter melhores indícios da presença do ácido mirístico, foi proposto o mecanismo de fragmentação do mesmo, e comparado os resultados com os picos m/z do espectro de massas.

O pico do íon-molecular de um ácido monocarboxílico de cadeia linear é fraco, porém fácil de identificar, visto que sua característica mais forte é a presença do pico m/z 60, resultado do rearranjo de McLafferty (Silverstein, 2005), apresentado na figura 30:

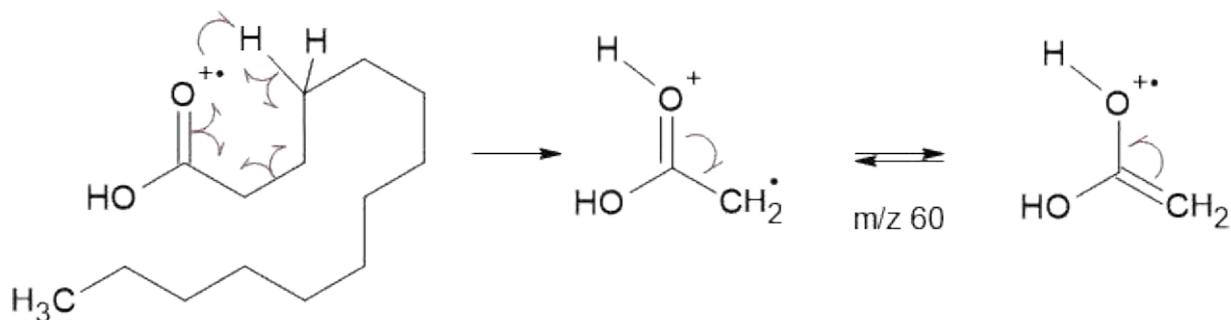


Figura 30: Rearranjo de McLafferty
Fonte: Silverstein, 2005. / Desenho: Autoria Própria/ChemSketch

Além deste rearranjo, Silverstein, propõe que para cadeias longas, o espectro consiste basicamente em duas séries, resultantes da clivagem de ligações C-C com retenção de carga no fragmento contendo oxigênio ($m/z = 45, 59, 73, 87\dots$) ou no fragmento alquil ($43, 57, 71, 85\dots$).

Logo, propondo a fragmentação da molécula de ácido tetradecanóico para o pico base em $m/z 73$, proposto na figura 31:

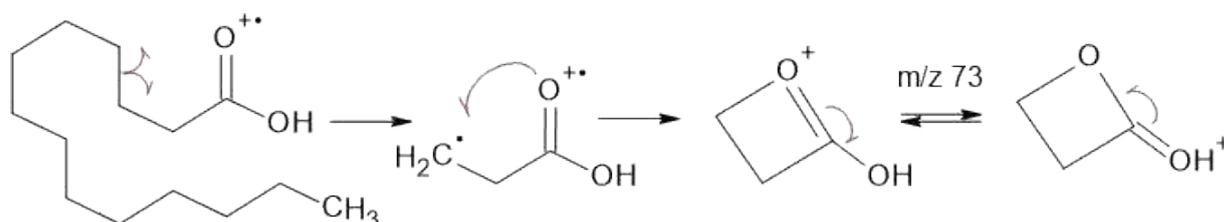


Figura 31: Proposta de fragmentação $m/z 73$
Fonte: Autoria Própria/ChemSketch

Outro pico importante é o do fragmento 129, visto sua intensidade e elevada razão m/z, sendo proposto na figura 32:

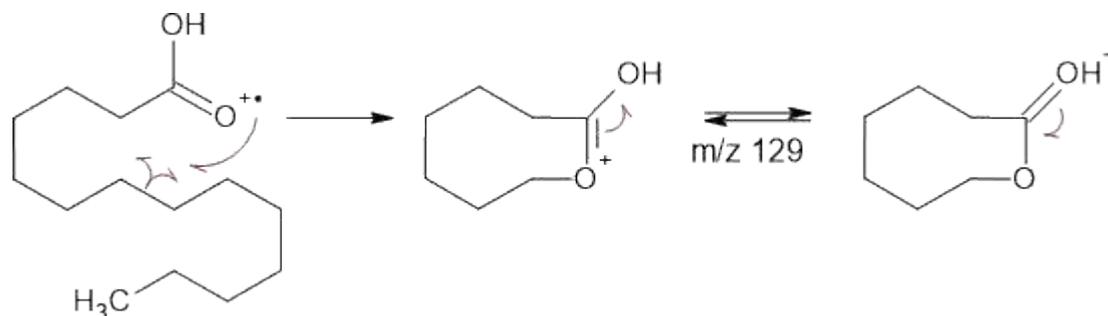


Figura 32: Proposta de fragmentação m/z 129
 Fonte: Autoria Própria/ChemSketch

As demais fragmentações mais comuns e muito presentes são evidenciadas na figura 33:

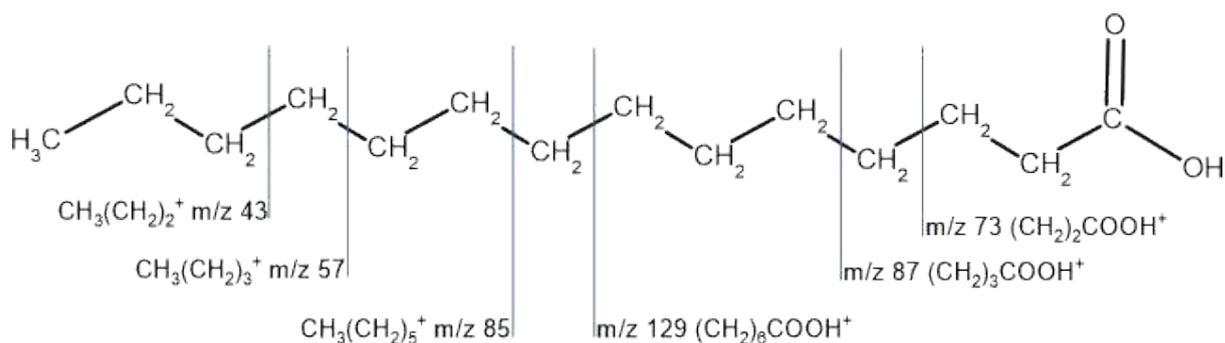


Figura 33: Proposta de várias fragmentações de maneira generalizada
 Fonte: Autoria Própria/ChemSketch

Logo, após considerar os dados, resultados e fragmentações obtidos, podemos supor que o principal composto extraído da Noz Moscada a partir da máquina de café foi o ácido mirístico.

Considerando que o ácido tetradecanóico é um ácido graxo, ou seja, faria parte dos óleos fixos, o objetivo de obter OE (volátil) não teria sido alcançado. Porém, como afirmam Hirasa e Takemasa, 2002; McKee, *et al.* 1993., para extratos hidroalcolócos, o rendimento em óleos essenciais ficaria na faixa de 4,5 a 5,6%. Já Oliveira e Furlong, 2007., obteve rendimentos inferiores a este.

Hirasa. e Takemasa, 2002.; Soliman e Badeaa, 2002.; Tomaino, *et al.* 2005., evidenciam também, a grande variação que pode ocorrer nos extratos de vegetais aromáticos que geralmente são utilizados como condimento, visto que, fatores como condições de cultivo, coleta, preparo e armazenamento, são intrínsecos à composição dos mesmos, além da metodologia de determinação.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com os resultados obtidos, fica claro que mesmo a tecnologia utilizada no dia-a-dia, pode auxiliar no ensino, pesquisa e desenvolvimento de mais tecnologia. Diversos trabalhos tem confirmado que máquinas de café expresso são ferramentas valiosas na extração de compostos, já que são uma alternativa rápida e bem mais barata que os equipamentos comuns, além de diminuir muito os tempos de extração.

Esta metodologia é facilmente adaptável e permite a democratização do ensino de química, mesmo em laboratórios modestos ou em escolas, que na grande maioria das vezes não tem um laboratório.

No presente trabalho, infelizmente não foi possível identificar a molécula inicialmente desejada, porém obtivemos resultados satisfatórios, além de muito aprendizado, visto todas as dificuldades enfrentadas e superadas, logo, fica evidenciado que metodologias alternativas podem e devem ser empregadas, de modo a disseminar conhecimento.

Acredita-se que, em razão dos erros analíticos associados, sejam eles pela falta de equipamentos ou de cuidados adequados, em questão de controle de temperatura, vácuo, pH, preparo e armazenamento de reagentes e amostras, ocorreram perdas ou transformações indesejadas, de modo que o resultado obtido não foi completamente esperado. Porém sabe-se que a pesquisa científica é feita principalmente de tentativa e erro, logo, todo resultado é válido.

REFERÊNCIAS

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

ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 4 ed. **Allured Publishing Corporation**, 2007.

AL-JUMAILY, E., AL-AMIRY, M. Extraction and Purification of Terpenes from Nutmeg (*myristica fragrans*). **Journal of Al-Nahrain University**. Department of Biotechnology, Genetic Engineering and Biotechnology Institute for Post Graduate, Baghdad University. Baghdad, Iraq. Vol 15, p. 151-160. 2012.

ANDERSSON, T.; PIHTSALMI, T.; HARTONEN, K.; HYÖTYLÄINEN, T.; RIEKKOLA, M-L. Effect of extraction vessel geometry and flow homogeneity on recoveries of polycyclic aromatic hydrocarbons in pressurised hot water extraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 376, p. 1081-1088, 2003.

ANDREI, P.; COMUNE, A. P.; Aromatherapy and its applications. **Centro Universitário São Camilo**, São Paulo. 2005.

ARAÚJO, J.M.A. **Química de alimentos: teoria e prática**. Viçosa: UFV, 601f, 2011.

ARCHER, A. W. Determination of safrole and myristicin in nutmeg and mace by high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 438, n. C, p. 117-121, 1 jan. 1988.

AZMIR, J., ZAIDUL, I., RAHMAN, M., SHARIF, K., MOHAMED, A., SAHENA, F., OMAR, A. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*, 117, 426-436, 2013.

BEYER, J.; EHLERS, D.; MAURER, H. H. Abuse of nutmeg (*Myristica fragrans* 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 Drug Monitoring**. 2006, 28 (4), 568-575.

BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. Plantas aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial. 1. ed. Curitiba, PR : **Layer Studio Gráfico e Editora Ltda**, 2009. 160 p.

BIESKI, I. G. C.; SANTOS, J. L. U.; FERREIRA, M. L.; GARCIA, P. C.; DOURADO, S. H.A.; JANUARIO, A. B.; MESSIAS, T. E.; APOLINÁRIO, J. M. S. S. **Potencial econômico e terapêutico dos óleos essenciais mais utilizados no Brasil**. *Revista Fitos*, Feb. 2022.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. N. C.; REZENDE, C. M. Oleos essenciais no brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L., Introdução aos Métodos Cromatográficos, 2 ed., Editora **UNICAMP**, Campinas, 1987.

CONHEÇA AS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE ÓLEOS VEGETAIS. **Ecycle**. Disponível em <https://www.ecycle.com.br/extracao-de-oleos-vegetais> (acesso em 02/05/2021).

CORREIA, S. J.; DAVID, J. M.; DA SILVA, E. P.; DAVID, J. P.; LOPES, L. M. X.; GUEDES, L. M. S. Flavonóides, noriso-prenóides e outros terpenos das Folhas de *Tapirira guianensis*. **Química Nova**. v. 31, n° 8, p. 2056-2059, 2008.

COULSON, J.M.; RICHARDSON, J.F. Tecnologia Química: Operações unitárias. Trad. C.R. Carlos. 2º ed. Lisboa: Fundação **Calouste Gulbenkian**, 1968.

CRAVEIRO, A.; QUEIROZ, D. Óleos Essenciais e Química Fina. **Quimica Nova**, 1993.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic approach, **John Wiley e Sons Ltda**, United Kingdom, 2 ed., 2002.

DIGHE, V. CHAREGAONKAR, G. HPTLC Analysis of Myristicin and Safrole in Seed Powder of *Myristica fragrans* Houtt. **Journal of Planar Chromatography**. Budapest. 2009.

ESCHENMOSER, A., ARIGONI, D. Revisited after 50 Years: The "Stereochemical Interpretation of the Biogenetic Isoprene Rule for the Triterpenes." **Helvetica Chimica Acta**. v. 88, n° 12, p. 3011-3050, 2005.

EWING, G.W.; Métodos Instrumentais de Análise Química, **Blücher**, São Paulo.

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

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química Nova na Escola**, v. 39, n. 2, p. 120-30, 2017.

FOUST, A. S.; WENZEL, L. A.; CLUMP, C. W.; MAUS, L.; ANDERSEN, L. B. 2ed. Princípios das operações unitárias. Rio de Janeiro: **Guanabara Dois/LTC**, 670p. 1982.

FÜLLER, T. N. **Caracterização fenotípica, fitoquímica e molecular de populações de Elionurus SP. Humb. & Bompl ex Willd (capim-limão)**. Porto Alegre: [s.n.].

GERHARDT, U. **Espicias y Condimentos**. Ed. Acribia, Zaragoza, España, 1975.

GIL-CHAVEZ, G., VILLA, J., AYALA-ZAVALA, J., HEREDIA, J., SEPULVEDA, D., YAHIA, E., & GONZALEZ-AGUILAR, G. A. Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceuticals and food ingredients: An overview. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 12, 5-23, 2013.

GOPALAKRISHAN, M. Chemical composition of nutmeg and mace. **Journal of Spices and Aromatic Crops**. 1992

HALLSTROM, H.; THUVANDER, A. A Toxicological evaluation of myristicin. **Natural Toxins**, 5(5):182-92, 1997.

HARBORNE, J. B.; HEYWOOD, V. H.; WILLIAMS, C. A. Distribution of myristicin in seeds of the Umbelliferae. **Phytochemistry**, 1969, 8 (9), 1729–1732.

HARRIS, D.C.; Análise Química Quantitativa, 6 ed., **Livros Técnicos e Científicos**, Rio de Janeiro, 2005.

HAUSCH, B., LORJAROENPHON, Y, CADWALLADER, K. Flavor chemistry of lemon-lime carbonated beverages. **J Agric Food Chem**, 63:112-119, 2015.

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

HOLSTEGE, C. P. Encyclopedia of Toxicology: Nutmeg. Second Edition, **Elsevier**, p. 276-277, 2005.

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.

JUST, J.; BUNTON, G.; DEANS, B.; MURRAY, N.; BISSEMBER, A.; SMITH, J. Extraction of Eugenol from Cloves Using an Unmodified Household Espresso Machine: An Alternative to Tradicional Steam-Distillation. **Journal of Chemical Education**. School of Physical Sciences-Chemistry, Tasmania, Australia, 2015.

KUTYNA, D., BORNEMAN, A. Heterologous production of flavour and aroma compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genes (Basel)** 9:326-341. 2018

LEE, H. S.; JEONG, T. C.; KIM, J. H. In vitro and in vivo metabolism of myristicin in the rat. **Journal of Chromatography B: Biomedical Applications**, v. 705, n. 2, p. 367-372, 13 fev. 1998.

LI, L., MA, X., ZHAN, R. Profiling of volatile fragrant components in a mini-core collection of mango germplasms from seven countries. **PLoS One**. 2017.

LOOMIS, W. D.; CROTEAU, R. In: STUMPF, P. K. (ed). *Biochemistry of Terpenoids. Lipids: Structure and Function: The Biochemistry of Plants*. Elsevier, 2014. Volume 4, Chap.13, p. 364-410.

MARTINEZ-SENA, M.; GUARDIA, M.; ESTEVE-TURRILLAS, F.; ARMENTA, S. Hard cap espresso extraction and liquid chromatography determination of bioactive compounds in vegetables and spices. **Department of Analytical Chemistry, University of Valencia**, 50th Dr. Moliner St., 46100 Burjassot, Spain, 2017.

MARTINS, C. *et al.* Myristicin from nutmeg induces apoptosis via the mitochondrial pathway and down regulates genes of the DNA damage response pathways in human leukaemia K562 cells. **Chemico-Biological Interactions**, v. 218, p. 1-9, 25 jul. 2014.

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.

MCMURRY, J. *Organic Chemistry*, 8^o edition, **Cengage Learning**, 2010.

MOLARDI DE FILIPPIS, F. **Extração com CO2 Supercrítico de Óleos Essenciais de Hon-sho e Ho-sho – Experimentos e Modelagem**. Porto Alegre: [s.n.].

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

MYRISTICIN. **PubChem**. Disponível em <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/4276#section=UNII> (ACESSO EM 12/02/2021, ÀS 11H16).

NUTMEG PROCESSING AND MARKETING IN GRENADA. **FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations**. Report No. 1. Disponível em: www.fao.org (acesso em 05/06/2021).

OHLWEILLER, O.A.; *Fundamentos de Análise Instrumental*, **Livros Técnicos e Científicos**, São Paulo, 1981.

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.

OLIVEIRA, G. F. T. DE; FURLONG, E. B. **NOZ-MOSCADA, Myristica Fragans, Houtt: UM ESTUDO DE COMPOSIÇÃO E EFEITO DO CONSUMO CRÔNICO NO COMPORTAMENTO DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO**. Rio Grande: [s.n.].

OZAKY, 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.

PACIEVITCH, Thais. Noz Moscada. **InfoEscola**, 2011. Disponível em <https://www.infoescola.com/plantas/noz-moscada/> (ACESSO EM 07/02/2021, ÀS 15H32)

PAVIA, D., LAMPMAN, G., KRIZ, G., VYVYAN, J. Introdução a Espectroscopia. Tradução da 4ª edição norte americana. **Cengage Learning**. 2010.

PINHEIRO, A. L. **Produção de óleos Essenciais**, Viçosa: CPT, 2003.

PIRES, V. P. Processo de extração de óleo essencial de *achyrocline satureioides* (lam) dc. por arraste a vapor: modelagem, análise do potencial aromático e retificação de compostos. **Porto Alegre**: [s.n.].

PLAZA, M., & TURNER, C. (2015). Pressurized hot water extraction of bioactives. **Trends in Analytical Chemistry**, 71, 39-54, 2015.

PRODUÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS EXIGE ORGANIZAÇÃO. **Folha de Londrina**, 2007. Disponível em <https://www.folhadelondrina.com.br/folha-rural/producao-de-oleos-essenciais-exige-organizacao-609244.html> (ACESSO EM 01/03/2020, ÀS 18H50).

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

RAGUSO, R. More lessons from linalool: insights gained from a ubiquitous floral volatile. **Curr Opin Plant Biol** 32:31-36. 2016

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.

RÍOS, J-L. Essential Oils: What They Are and How the Terms Are Used and Defined. **University of Valencia**, Department of Pharmacology, Valencia, Spain, 2016.

SADTLER, SP. Chemistry: A Text-Book of Chemistry Intended for the Use of Pharmaceutical and Medical Students, Ed. **Cornell University Library**, 1918

SARTOR, R. B. **MODELAGEM, SIMULAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE UMA UNIDADE INDUSTRIAL DE EXTRAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS POR ARRASTE A VAPOR**. Porto Alegre, RS: [s.n.].

SERAFINI, L.A.; SANTOS, A.C.A.; TOUGUINHA, L.A.; AGOSTINI, G.; DALFOVO, V. 2002. **Extrações e aplicações de óleos essenciais de plantas aromáticas e medicinais**. Caxias do Sul: EDUCS.

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

SILVA, M. G. F. DA. **ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA IN VITRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS HIDROALCÓOLICOS DE MANJERONA (*Origanum majorana* L.) E MANJERICÃO (*Ocimum basilicum* L.)**. [s.l.] Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2 dez. 2011.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. Spectrometric Identification of Organic Compounds, 7 ed., **Wiley**, 2005.

SKOOG, D.A.; WEST, D.M.; HOLLER, F.J.; CROUCH, S.R.; Fundamentos de Química Analítica, 8 ed., **Thomson**, São Paulo, 2006.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A; Princípios de Análise Instrumental, 5 ed., **Bookman**, São Paulo, 2002.

SMITH, R. M. Extractions with superheated water. **Journal of Chromatography A**, v. 975, p. 31-46, 2002.

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

SOLOMONS, T. W. G., FRYHLE, C. B. Organic Chemistry, 10 ed. **Wiley**, 2009.

SONWA, M.M., 2000. **Isolation and Structure Elucidation of Essential Oil Constituents. Comparative Study of the Oils of *Cyperus alopecuroides*, *Cyperus papyrus*, and *Cyperus rotundus***. Ph.D. degree, University of Hamburg, Germany.

SPEZIALI, M. G., De aromas e perfumes, o mercado da indústria do "cheiro". **Química Nova**, v. 35, n. 34, p. 861-864, 2012.

SPRICIGO, C. B. Extração De Óleo Essencial De Noz Moscada Com Dióxido De Carbono a Altas Pressões. **Journal of Supercritical Fluids**, 1999.

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

SRIVASTAVA, S. *et al.* Insecticidal activity of myristicin from piper mullesua. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, n. 3, p. 226-229, 2001.

STEFFANI, E. **Modelagem Matemática do Processo de Extração Supercrítica de Óleo Essencial de Ho-Sho (Cinnamomum camphora Nees & Eberm var. linaloolifera Fujita) Utilizando CO₂**. Florianópolis: [s.n.].

TAJUDDIN; AHMAD, S; LATIF, A; 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.

TEO, C.; TAN, S.; YONG, J.; HEW, C.; ONG, E. Pressurized hot water extraction (PHWE). **Journal of Chromatography A**, 1217(16), 2484-2494, 2010.

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.

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

VALENTE, V. M. M. **VÂNIA MARIA MOREIRA VALENTE CARACTERIZAÇÃO DE ANTIFÚNGICOS EM ÓLEO ESSENCIAL DE NOZ-MOSCADA (*Myristica fragans*)**. [s.l.] Universidade Federal de Viçosa, 30 set. 2005.

VENTURELLA, V. Natural products In: Remington: The science and practice of pharmacy. **20th ed. Lippincott, Williams and Wilkins**. USA. 2000.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**. v. 26, n° 3, p. 390-400, 2003.

VOGEL, A.I.; *Análise Inorgânica Quantitativa*, **Guanabara Dois**, Rio de Janeiro, 1984.

WAGNER, H., BLADT, S. *Plant Drug Analysis, A Thin Layer Chromatography Atlas*. 2° edition, **Springer**, 1996.

WILLARD, H.; MERRITT, L.; DEAN, J.; *Análise Instrumental*, **Fund. Gulbenkian**, Lisboa, 1979.

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.

ZHANG, C.; LINFORTH, R.; FISK, I. Cafestol extraction yield from different coffee brew mechanisms. **Food Reserach International**, v. 49, p. 27-31, 2012.

ZHU, X., WANG, Y., YANG, X-N., XIAO, X., ZHANG, T., YANG, X-W., QIN, H-B., LI, F. Metabolic Activation of Myristicin and Its Role in Cellular Toxicity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 2019, 67 (15), 4328-4336.

ZOUGAGH, M., VALCÁRCEL, M., & RÍOS, A. Supercritical fluid extraction: A critical review of its analytical usefulness. **Trends in Analytical Chemistry**, 23, 399-405, 2004.