

CAROLINA MARANGON JARDIM

COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE
***Chenopodium ambrosioides* L.**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2006

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

T

J37c
2006

Jardim, Carolina Marangon, 1981-

Composição e atividade antifúngica de extratos de
Chenopodium ambrosioides L. / Carolina Marangon
Jardim. – Viçosa : UFV, 2006.
xiv, 67f. : il. ; 29cm.

Orientador: Gulab Newandram Jham.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 59-67.

1. Essências e óleos essenciais. 2. Erva-de-santa-maria
- Composição. 3. Fungicidas. 4. Análise cromatográfica.
5. *Chenopodium ambrosioides*. 6. Produtos naturais.
I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22.ed. 547.71

CAROLINA MARANGON JARDIM

COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATOS DE
***Chenopodium ambrosioides* L.**

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

APROVADA: 23 de fevereiro de 2006.

Elson Santiago de Alvarenga
(Conselheiro)

Onkar Dev Dhingra
(Conselheiro)

Antônio Lelis Pinheiro

Sérgio Tinôco Verçosa de Magalhães

Gulab Newandram Jham
(Orientador)

DEDICO aos meus pais, **Ruy** e **Waléria**.

Os grandes responsáveis pela minha formação pessoal e profissional;

OFEREÇO, a todos que contribuíram para a consolidação desse sonho, em especial minhas irmãs, **Emilia** e **Juliana**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida.

Ao meu orientador, Prof. Ph.D. Gulab Newandram Jham, pela exímia condução da pesquisa, pela confiança em mim depositada e pelos ensinamentos passados durante todo o período de convívio.

Ao professor e conselheiro, Ph.D. Onkar Dev Dhingra, pela participação ativa durante as discussões e pela disponibilidade na realização de experimentos conjuntos.

Ao técnico Eduardo Rezende Pereira, pela amizade, ajuda inestimável durante todo o trabalho, paciência nos ensinamentos e pelo companheirismo.

À Universidade Federal de Viçosa, por meio do Departamento de Química e do Departamento Fitopatologia, pela oportunidade de realização desse trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo.

Aos grandes amigos, Vânia e Marcelo, pelo apoio, sugestões e colaborações ao longo da realização do trabalho.

À Profa. Alice Jham, pelos ensinamentos, amizade e contribuição nesse trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais: Kelly, Rosimeire, Fernanda, Luís Gustavo, Júlio, Larisse, Guilherme e Vagner pelo carinho, apoio, incentivo em momentos distintos e bons momentos de convivência.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pelos valiosos ensinamentos que contribuíram para a minha formação.

Aos colegas e amigos da Clínica de Doenças em Plantas, em especial: Maria Luiza, Daniel, José Orlando, Henrique, Osvaldo e Davi, pelo auxílio em todos os momentos de necessidade.

Aos funcionários do Departamento de Química pelo auxílio prestado e pela atenção, em especial: Onezina, Mariza, José Luis, Sr. Antônio, D. Conceição e Jorge.

Ao Prof. D.S. Paulo Roberto Cecon pela ajuda nos tratamentos estatísticos.

Aos membros da banca avaliadora: Ph.D. Elson Santiago de Alvarenga, D.S. Antônio Lelis Pinheiro e D.S. Sérgio Tinôco Verçosa de Magalhães, pela valiosa contribuição.

Ao Sr. Joaquim e à Aparecida, pela preciosa ajuda na coleta no material vegetal utilizado na pesquisa.

Às minhas irmãs, Emilia e Juliana, pela força, amor, amizade e incentivo em todos os momentos.

Finalmente agradeço aos meus queridos pais, Ruy e Waléria, que jamais pouparam esforços para que eu pudesse ter a melhor educação possível. Desta forma, se hoje estou defendendo essa tese é porque eles lutaram para que eu chegasse até aqui. Acredito que o melhor que posso fazer para retribuir é lutar sempre, com muita garra, a fim de um dia alguém sentir por mim o mesmo orgulho e admiração que sinto por eles.

“Na vida, alguns são influenciados pela busca de riquezas, enquanto outros são dominados pela febre do poder e da dominação. Mas os melhores entre os homens se dedicam à descoberta do significado e do propósito da vida. Eles tentam descobrir os segredos da natureza. Esse tipo de homem eu chamo filósofo, pois embora nenhum homem seja completamente sábio em todos os assuntos, ele pode amar a sabedoria como a chave para os segredos da natureza.”

Pitágoras

LISTA DE ABREVIATURAS

A. flavus – ***A.f.*** – *Aspergillus flavus*

A. glaucus – ***A.g.*** – *Aspergillus glaucus*

A. niger – ***A.n.*** – *Aspergillus niger*

A. ochraceous – ***A.o.*** – *Aspergillus ochraceous*

BDA – Batata dextrose ágar

***C. ambrosioides* L.** – *Chenopodium ambrosioides* Linnaeus

C. gloesporioides – ***C.g.*** – *Colletotrichum gloesporioides*

C. musae – ***C.m.*** – *Colletotrichum musae*

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CCD Bioautografia – Cromatografia em Camada Delgada Bioautografia

CG/DIC – Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização em Chama

CG/EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas

DIC – Detector de Ionização em Chama

EM – Espectrometria de Massas

F. oxysporum – ***F.o.*** – *Fusarium oxysporum*

F. semitectum – ***F.s.*** – *Fusarium semitectum*

KI – Índice de retenção de Kováts

M⁺ – Íon molecular

MSI – Monitoramento Seletivo de Íons

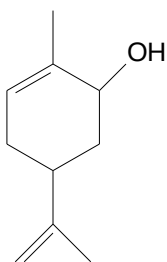
R_f – Fator de retenção

t_R – Tempo de retenção

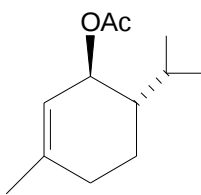
v/v – Volume por volume

W_b – Largura longitudinal

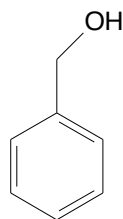
ESTRUTURA DOS COMPOSTOS



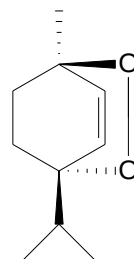
acetato de (Z)-carvil



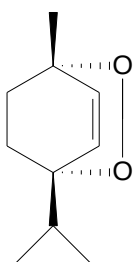
acetato de (E)-piperitol



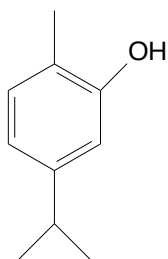
álcool benzílico



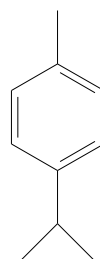
(E)-ascaridol



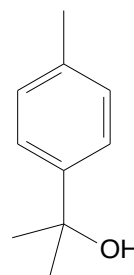
(Z)-ascaridol



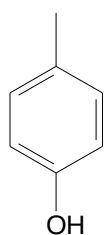
carvacrol



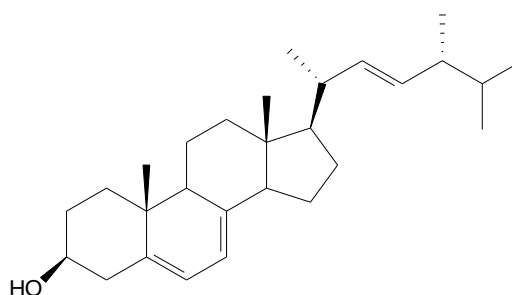
p-cimeno



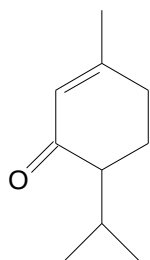
p-cimen-8-ol



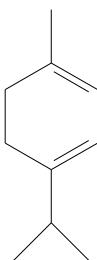
p-cresol



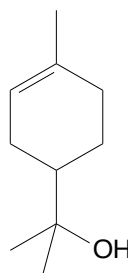
ergosterol



piperitone



α -terpineno



α -terpineol

CONTEÚDO

RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
INTRODUÇÃO GERAL.....	1
OBJETIVOS.....	4
CAPÍTULO 1 – COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.....	5
1. INTRODUÇÃO.....	5
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	7
2.1. Materiais e reagentes.....	7
2.1.1. Material vegetal.....	7
2.2. Obtenção do óleo essencial bruto e fracionado.....	7
2.2.1. Óleo essencial.....	7
2.2.2. Fracionamento do óleo essencial.....	8
2.3. Bioensaios.....	8
2.3.1. Aquisição dos fungos.....	8
2.3.2. Avaliação da atividade antifúngica.....	9
2.3.3. Identificação da fração antifúngica.....	9
2.3.4. Análise estatística.....	10
2.4. Identificação dos compostos.....	10
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	12
3.1. Óleo essencial bruto e fração ativa.....	12
3.2. Atividade antifúngica.....	14
3.3. Composição do óleo essencial bruto e da fração ativa.....	18
4. CONCLUSÕES.....	22

CAPÍTULO 2 – COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO HEXÂNICO DE <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.....	23
1. INTRODUÇÃO.....	23
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
2.1. Materiais e reagentes.....	25
2.1.1. Material vegetal.....	25
2.2. Obtenção do extrato hexânico bruto e fracionado.....	25
2.2.1. Extrato hexânico.....	25
2.2.2. Fracionamento do extrato hexânico.....	26
2.3. Bioensaios.....	26
2.3.1. Aquisição dos fungos.....	26
2.3.2. Avaliação da atividade antifúngica.....	27
2.3.3. Identificação da fração antifúngica.....	27
2.3.4. Análise estatística.....	28
2.4. Identificação dos compostos.....	28
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
3.1. Extrato hexânico bruto e fração ativa.....	30
3.2. Atividade antifúngica.....	31
3.3. Composição do extrato hexânico bruto e da fração ativa.....	35
4. CONCLUSÕES.....	38
 CAPÍTULO 3 – EFEITO DE EXTRATOS DE <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. NO CONTROLE FÚNGICO EM RAÇÃO.....	 39
1. INTRODUÇÃO.....	39
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
2.1. Materiais e reagentes.....	41
2.1.1. Material vegetal e ração.....	41
2.2. Obtenção do extrato hexânico e do óleo essencial.....	41
2.2.1. Extrato hexânico.....	41
2.2.2. Óleo essencial.....	42
2.3. Análise da estabilidade do extrato hexânico e do óleo essencial.....	42
2.4. Quantificação do crescimento fúngico na ração armazenada.	44
2.4.1. Preparo e armazenamento da ração.....	44
2.4.2. Extração do ergosterol.....	44
2.4.3. Quantificação do ergosterol.....	45

2.4.4. Análise estatística.....	46
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	47
3.1. Estabilidade do extrato hexânico e do óleo essencial.....	47
3.2. Quantificação do crescimento fúngico na ração armazenada.	51
4. CONCLUSÕES.....	57
CONCLUSÕES GERAIS.....	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

RESUMO

JARDIM, Carolina Marangon, M.S., Universidade Federal de Viçosa, fevereiro de 2006. **Composição e Atividade Antifúngica de Extratos de *Chenopodium ambrosioides* L.** Orientador: Gulab Newandram Jham. Conselheiros: Onkar Dev Dhingra e Elson Santiago de Alvarenga.

O óleo essencial, obtido por hidrodestilação (rendimento de 0,3%), e o extrato hexânico, adquirido por maceração (rendimento de 1,1%), de partes aéreas de *Chenopodium ambrosioides* L., avaliados pela metodologia “poison food” (0,3; 0,1; 0,05 e 0,3; 0,2; 0,1%; respectivamente), apresentaram atividade antifúngica contra os fitopatógenos *Aspergillus flavus*, *A. glaucus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *Colletotrichum gloesporioides*, *C. musae*, *Fusarium oxysporum* e *F. semitectum*. Exímia atividade antifúngica, variando de 70 a 100%, foi observada em concentração de até 0,2 e 0,1%, para o extrato hexânico e o óleo essencial, respectivamente, dependendo do fungo avaliado. Utilizando cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (CG/DIC) e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM), aliados ao cálculo do índice de retenção de Kováts (KI), estabeleceu-se a composição do extrato e do óleo essencial. No óleo essencial treze compostos foram identificados, correspondendo a 90,22% da sua constituição, sendo os principais: (*Z*)-ascaridol (61,43%), (*E*)-ascaridol (18,62%), carvacrol (3,87%), *p*-cimeno (2,05%) e α -terpineno (0,85%). Os componentes do extrato hexânico são: α -terpineno (11,24%), *p*-cymeno (6,05%), álcool benzílico (0,38%), (*Z*)-ascaridol (53,98%), carvacrol (2,27%), (*E*)-ascaridol (17,25%), correspondendo a 91,17% da sua constituição. Após fracionamento por cromatografia em camada delgada (CCD) (eluição com diclorometano:acetato de etila, 9:1 v/v), bioensaio utilizando a técnica CCD Bioautografia revelou a fração antifúngica do extrato hexânico e do óleo essencial. Uma única fração ativa foi obtida para ambas as amostras, apresentando coeficiente de retenção (R_f) equivalente a

0,89 e largura longitudinal (W_b) de 5,0 cm, sendo os compostos identificados por análise em CG/DIC, CG/EM e cálculo do KI. A fração ativa do extrato hexânico é composta por (*Z*)-ascaridol (53,98%), (*E*)-ascaridol (17,25%), α -terpineno (11,24%) e *p*-cimeno (6,05%) e a do óleo essencial constitui-se por *p*-cimeno (25,40%), (*Z*)-ascaridol (44,35%) e (*E*)-ascaridol (30,25%). Análise, por CG/DIC, da estabilidade do extrato hexânico e do óleo essencial, após o armazenamento dos mesmos por 90 dias, a 4 e 25 °C, apontou decomposição dos compostos α -terpineno, *p*-cimeno, (*Z*)-ascaridol e (*E*)-ascaridol nas amostras. As decomposições foram mais acentuadas quando as amostras foram estocadas a 25 °C. A quantificação de ergosterol, principal esteróide constituinte da membrana celular fúngica, por CG/EM, utilizando modo MSI (Monitoramento Seletivo de Íons), em amostras de ração de suínos armazenadas, tratadas com extrato hexânico (0,2%) e óleo essencial (0,1%), apontou a atividade da espécie *C. ambrosioides* no controle do crescimento fúngico. Frente aos resultados alcançados nota-se o potencial antifúngico do óleo essencial e do extrato hexânico de *C. ambrosioides*, enfatizando os compostos ascaridol (isômeros *Z* e *E*), α -terpineno e *p*-cimeno, que, após estudos sistemáticos, são compostos viáveis a comercialização como agentes no controle de fungos de armazenamento.

ABSTRACT

JARDIM, Carolina Marangon, M.S., Universidade Federal de Viçosa, February, 2006. **Composition and antifungal activity of extracts of *Chenopodium ambrosioides* L.** Adviser: Gulab Newandram Jham. Committee Members: Onkar Dev Dhingra and Elson Santiago de Alvarenga.

Essential oil obtained by hydrodistillation (yield 0.3%), and hexanic extract, obtained by maceration (yield 1.1%), of the aerial parts of *Chenopodium ambrosioides* L., evaluated by the “poison food” methodology (0.3; 0.1; 0.05 and 0.3; 0.2; 0.1%; respectively), presented antifungal activity against the phytopathogens *Aspergillus flavus*, *A. glaucus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *Colletotrichum gloesporioides*, *C. musae*, *Fusarium oxysporum* and *F. semitectum*. Excellent antifungal activity, ranging from 70 to 100%, was observed up to a concentration of 0.2 and 0.1%, for the hexanic extract and essential oil, respectively, depending on the fungus evaluated. Using gas chromatography with flame ionization (GC/FID) and gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC/MS), combined to calculation of the Kováts index of retention (KI), the hexanic extract and essential oil compositions were established. In the essential oil, 13 compounds were identified, corresponding to 90.22% of its constitution, the major ones being: (*Z*)-ascaridole (61.43%), (*E*)-ascaridole (18.62%), carvacrol (3.87%), *p*-cymene (2.05%) and α -terpinene (0.85%). The hexanic extract compounds are: α -terpinene (11.24%), *p*-cymene (6.05%), benzyl alcohol (0.38%), (*Z*)-ascaridole (53.98%), carvacrol (2.27%), (*E*)-ascaridole (17.25%) corresponding to 91.17% of its constitution. Following fractioning by thin layer chromatography (TLC) (elution with dichloromethane: ethyl acetate, 9:1 v/v), a bioassay using TLC Bioautography technique revealed the antifungal fraction of the hexanic extract and essential oil. One single active fraction was obtained for both the samples, presenting retention coefficient (R_f) equivalent to 0.89 and longitudinal width (W_b) of 5.0 cm, with the compounds

being identified by analysis in GC/FID, GC/MS and KI calculation. The active fraction of the hexanic extract is composed of (*Z*)-ascaridole (53.98%), (*E*)-ascaridole (17.25%), α -terpinene (11.24%) and *p*-cymene (6.05%) and that of the essential oil is constituted by *p*-cymene (25.40%), (*Z*)-ascaridole (44.35%) and (*E*)-ascaridole (30.25%). Analysis by GC/FID of hexanic extract and essential oil stability after 90-day storage at 4 and 25 °C, showed decomposition of the compounds α -terpinene, *p*-cymene, (*Z*)-ascaridole and (*E*)-ascaridole in the samples. Decompositions were greater for the samples stored at 25 °C. Quantification of ergosterol, main sterol constituent of the fungic cellular membrane, by GC/MS, utilizing SIM mode (Selective Ion Monitoring), in stored swine ration treated with hexanic extract (0.2%) and essential oil (0.1%) pointed to activity of the species *C. ambrosioides* in fungal growth control. The results obtained indicate the antifungal potential of the essential oil and hexanic extract of *C. ambrosioides*, with emphasis on the compounds ascaridole (*Z* and *E*), α -terpinene and *p*-cymene, which, after further systematic studies, are commercially viable as storage fungi control agents.

INTRODUÇÃO GERAL

Produtos agrícolas são suscetíveis ao ataque de fungos. Os fungos são microrganismos pertencentes ao Reino Fungi, podendo ser encontrados no solo, água, ar, plantas, matéria orgânica em decomposição e crescendo em quase todos os tipos de substratos. A razão da grande proliferação dos fungos deve-se à sua alta taxa de reprodução, através de esporos (BANWART, 1981; CHRISTENSEN e MERONUCK, 1986; SINHA *et al.*, 1991).

Os fungos de armazenamento *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus* e *Mucor* são encontrados em grande número em armazéns, moinhos, silos, moegas, elevadores, equipamentos e lugares onde são armazenados, manuseados e processados produtos agrícolas. Causam danos ao produto somente se as condições de armazenagem forem impróprias à manutenção da qualidade do produto. Os fungos dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium* são os indicadores de deterioração em sementes e grãos causando danos no germe, descoloração, alterações nutricionais, perda da matéria seca e os primeiros estágios da deterioração microbiológica (MILLER, 1995; SINHA *et al.*, 1991).

Alguns fungos associados aos grãos podem produzir substâncias tóxicas, denominadas micotoxinas, que são altamente nocivas à saúde do homem. As aflatoxinas são substâncias produzidas principalmente por *A. flavus* e *A. parasiticus* (DIENER *et al.*, 1987; KURTZMAN *et al.*, 1987).

Colletotrichum é um gênero de fungo patogênico de plantas importante em todo o mundo, especialmente em regiões tropicais e subtropicais. O gênero causa doenças que geram perdas econômicas significativas em produtos agrícolas. Os sintomas são conhecidos como antracnose e geralmente envolvem a formação de lesão negra com depressão subcircular e erupção cor

rósea devido ao desenvolvimento de esporos de fungos (BAILEY e JEGER, 1992).

Fusarium oxysporum é o agente causal da doença vascular que causa murcha em banana conhecida como mal do Panamá. Uma das mais sérias ameaças mundial às colheitas de banana. Contudo, não existem fungicidas efetivos disponíveis para o controle desta doença fatal (BORGES *et al.*, 2004).

A crescente demanda por alimentos isentos de resíduos oriundos de defensivos sintéticos tem alterado o comportamento de produtores na busca de novas formas eficientes de produção, com baixo custo e menor agressividade ao meio ambiente. Como fonte de produtos fungicidas tem-se utilizado diversas plantas e seus produtos, dos quais já foram isolados compostos como flavonóides, cumarinas e terpenóides com atividade fungicida que podem ser utilizados como conservantes naturais em alimentos (DUCK, 1990; PICMAN *et al.*, 1992; YEH *et al.*, 1989; ARISPURO, 1994).

A erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosioides* L., é uma espécie nativa da América tropical, originária, provavelmente, do México. Atualmente, a planta encontra-se vastamente distribuída em regiões de clima tropical, subtropical e temperado. No Brasil é extensa a sua distribuição, com ocorrência em quase todo o território. É uma planta anual ou perene, que se reproduz por sementes. A espécie prefere solos de textura média, com boa fertilidade e suprimento moderado de água, tolerando solos salinos. O desenvolvimento vegetativo é favorecido por boa iluminação e as plantas se tornam mais competitivas em regiões e em épocas de dias longos, sendo o florescimento estimulado por dias curtos. Possuem caule ereto, variando em altura de 0,20 a 1,50 m. Os ramos floríferos são delgados e muito folhosos, de coloração verde-clara ou verde-amarelada (KISMANN, 1991; CORREA, 1984).

Extratos e derivados da planta são usualmente utilizados contra sífilis, sarampo e doenças intestinais (CABANIS *et al.*, 1970; NOUMI e YOMI, 2001). A espécie apresenta-se como potente vermífuga (BOITEAU, 1986). O óleo essencial apresenta propriedade antifúngica (BEGUM *et al.*, 1993; BOURREL *et al.*, 1995; CHAUDHARY *et al.*, 1995; KISHORE *et al.*, 1996; ARISPURO *et*

al., 1997; CASTANEDA *et al.*, 2001; MISHRA *et al.*, 2002; KISHORE e DUBEY, 2002).

A composição química de extratos e óleo essencial de *C. ambrosioides* tem sido alvo de estudos. MUHAYIMANA *et al.*, (1998) identificaram α -terpineno e ascaridol no óleo essencial. ONOCHA *et al.*, (1999) analisaram o óleo essencial de *C. ambrosioides* coletada na Nigéria, identificando 91,2% da sua constituição. Os compostos encontrados majoritariamente foram: α -terpineno (56%), acetato de α -terpenila (15,7%) e *p*-cimeno (15,5%). GUPTA *et al.*, (2002) examinaram a composição do óleo essencial de *C. ambrosioides* da Índia, identificando os compostos: α -terpineno (64%), *p*-cimeno (19%) e ascaridol (7%). PINO *et al.*, (2003) avaliaram a constituição do óleo essencial de *C. ambrosioides* de Cuba, sendo o mesmo constituído principalmente de acetato de α -terpenila (73,9%) e *p*-cimeno (4,3%).

Estudo sistemático da atividade antifúngica de *C. ambrosioides*, aliado à identificação dos compostos, não é retratado na literatura. Vale ressaltar a precariedade em trabalhos envolvendo a espécie no Brasil, sendo inexistente a avaliação contra fitopatógenos. Estudo do potencial antifúngico da espécie em produtos armazenados também não foi explorado.

OBJETIVOS

O presente trabalho tem os seguintes objetivos específicos:

1. Testar a atividade antifúngica do extrato hexânico e do óleo essencial, brutos e fracionados, de *C. ambrosioides* sobre os fitopatógenos *Aspergillus flavus*, *A. glaucus*, *A. niger*, *A. ochraceous*, *Colletotrichum gloesporioides*, *C. musae*, *Fusarium oxysporum* e *F. semitectum*;
2. Identificar os compostos do óleo essencial e do extrato hexânico, bem como caracterizar os constituintes com potencial antifúngico;
3. Avaliar a estabilidade do extrato hexânico e do óleo essencial quanto à constituição química, depois de submetidos a um armazenamento, em temperaturas distintas, por um período determinado;
4. Determinar o potencial antifúngico do extrato hexânico e do óleo essencial em ração de suínos armazenada, através da quantificação de ergosterol como indicador de crescimento fúngico.

CAPÍTULO 1

COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Chenopodium ambrosioides* L.

1. INTRODUÇÃO

A presença de micotoxinas em produtos agrícolas é conferida a fungos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Claviceps* e *Fusarium* (SCHRÖDTER, 2004; EDWARDS, 2004). Aflatoxinas e ochratoxinas são toxinas atribuídas a *Aspergillus flavus* e *A. ochraceus*, respectivamente (ARRUS *et al.*, 2005; PARDO *et al.*, 2005; DORNER e COLE, 2002).

Colletotrichum, um gênero de fungo fitopatogênico, causa doenças que podem gerar perdas econômicas significativas em frutas e verduras frescas. Os sintomas são conhecidos como antracnose, e geralmente envolvem a formação de lesão negra com depressão subcircular e erupção cor rósea devido ao desenvolvimento de esporos de fungos (BAILEY e JEGGER, 1992).

Métodos práticos, de baixo custo e toxicidade, a fim de evitar deterioração de produtos armazenados são necessários. Nesse contexto surge a necessidade do desenvolvimento de produtos/métodos, não tóxicos, que reduzam a deterioração em produtos armazenados.

Óleos essenciais oferecem uma alternativa aos fungicidas tóxicos, utilizados atualmente, no controle da contaminação fúngica em produtos armazenados (WINK, 1993). Alguns óleos essenciais de plantas medicinais e temperos, compostos por um coquetel natural de monoterpenos, diterpenos e hidrocarbonetos, apresentam atividade fungicida (CASTELLANOS *et al.*, 2001; SOLIMAN e BADEAA, 2002; e SRIDHAR *et al.*, 2003).

A espécie *Chenopodium ambrosioides* L., planta nativa da América tropical, originária, provavelmente, do México, encontra-se vastamente distribuída no Brasil, com ocorrência em quase todo o território. É uma planta anual ou perene, que se reproduz por sementes (KISMANN, 1991). O óleo essencial de *C. ambrosioides* apresenta propriedade fungicida (BEGUM *et al.*, 1993; BOURREL *et al.*, 1995; KISHORE *et al.*, 1996). Ascaridol, um dos principais componentes do óleo essencial, possui efeito sedativo e analgésico (OKUYAMA *et al.*, 1993; OLAJIDE *et al.*, 1997).

Frente à ausência de trabalhos sobre a atividade antifúngica, aliados à caracterização química, estudo aprimorado a fim de caracterizar componentes com potencial antifúngico em *C. ambrosioides* tem muito a ser explorado. Vale ressaltar, que no Brasil, *C. ambrosioides* é uma espécie ainda pouco estudada.

Nesse contexto, o presente trabalho relata a composição e atividade antifúngica do óleo essencial de *C. ambrosioides* contra os fungos *Aspergillus flavus*, *A. glaucus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *Colletotrichum gloesporioides*, *C. musae*, *Fusarium oxysporum* e *F. semitectum*, bem como a identificação dos compostos que conferem potencial antifúngico ao óleo essencial.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os estudos foram desenvolvidos na Universidade Federal de Viçosa, no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, do Departamento de Química, e na Clínica de Doenças de Plantas, do Departamento de Fitopatologia, no ano de 2005.

2.1. Materiais e reagentes

Todos os solventes orgânicos utilizados são de grau P.A., da Quimex, sendo os mesmos destilados previamente. Para o fracionamento por cromatografia em camada delgada, utilizou-se sílica gel 60 GF₂₅₄ da Merck. Nos bioensaios foram utilizadas placas de Petri descartáveis (60 x 15 cm e 90 x 15 cm) adquiridas da J.Prolab.

2.1.1. Material vegetal

As partes aéreas da erva-de-santa-maria (*C. ambrosioides*) foram obtidas em Janeiro de 2005, de uma Casa de Vegetação localizada no Departamento de Fitotecnia, na Universidade Federal de Viçosa.

2.2. Obtenção do óleo essencial bruto e fracionado

2.2.1. Óleo essencial

O óleo essencial de *C. ambrosioides* foi obtido por hidrodestilação. A um balão de fundo redondo de 3,0 L foram adicionados 100 g da planta fresca, maceradas manualmente, e 1,5 L de água destilada. Após aquecimento, o hidrolato coletado (1000 mL) foi extraído com diclorometano (duas porções de 300 mL), seco com sulfato de sódio anidro e concentrado em evaporador rotatório. O procedimento foi repetido vinte vezes. O óleo essencial (6 g) obtido foi armazenado a aproximadamente 4 °C.

2.2.2. Fracionamento do óleo essencial

O fracionamento do óleo essencial foi realizado por cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa (placa de vidro de 20 x 20 cm com fase estacionária de 1 mm de sílica gel 60 GF₂₅₄). Foram aplicados 200 mg de óleo essencial por placa e utilizada uma fase móvel constituída de diclorometano e acetato de etila (9:1, v/v). Luz ultravioleta (comprimento de onda, 254 nm) e a técnica CCD Bioautografia, descrita no item 2.3.3, foram os agentes utilizados para a revelação das placas. A fração responsável pela atividade antifúngica foi recuperada raspando-se a fase estacionária da região ativa e extraíndo com diclorometano (sob agitação magnética, a temperatura ambiente, por 8 horas). Filtrou-se a vácuo, em funil de vidro sinterizado, resíduos de água foram suprimidos com sulfato de sódio anidro e o solvente foi eliminado em evaporador rotatório. A fração ativa foi armazenada a aproximadamente 4 °C.

2.3. Bioensaios

2.3.1. Aquisição dos fungos

Utilizaram-se grãos e frutas contaminados por fungos: *Aspergillus flavus*, *A. glaucus*, *A. niger*, *A. ochraceous*, *Colletotrichum gloesporioides*, *C. musae*, *Fusarium oxysporum* e *F. semitectum*. Em uma câmara de fluxo, papel de germinação foi embebido em água autoclavada e colocado no fundo de uma placa gerbox, previamente esterilizada. Grãos e fragmentos de frutas, brandamente lavados com água destilada, foram inseridos em uma solução de álcool etílico 50%, por um minuto, transferidos para uma solução de água sanitária 2%, por um minuto, e finalmente imersos em água destilada por um minuto. Foram transferidos para a placa gerbox, e armazenados em incubadora, a 25 °C, por 6 dias. Após esse período os fungos foram identificados. Esporos de cada fungo, isoladamente, foram transferidos para placas de Petri esterilizadas contendo o meio de cultura BDA (batata dextrose ágar) acrescido de sulfato de estreptomicina. As placas foram vedadas com filme plástico e mantidas em incubadora a 25 °C, por 7 dias.

2.3.2. Avaliação da atividade antifúngica

A atividade antifúngica foi avaliada contra os fungos *Aspergillus flavus*, *A. glaucus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *Colletotrichum gloesporioides*, *C. musae*, *Fusarium oxysporum* e *F. semitectum*. A metodologia empregada no bioensaio baseou-se na “poison food”, utilizando o meio de cultura BDA (batata dextrose ágar) acrescido de sulfato de estreptomicina (DHINGRA e SINCLAIR, 1995; SRIDHAR *et al.*, 2003).

Para a avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial bruto, nas concentrações 0,3; 0,1 e 0,05%, e para a fração ativa, nas concentrações 0,1; 0,05 e 0,03%, foram utilizadas placas de Petri estéreis e descartáveis. O óleo essencial/fração ativa foi previamente emulsificado com metanol (1:1, v/v) e incorporado ao meio de cultura fundido, na concentração desejada. As testemunhas continham o meio de cultura com metanol. Os esporos dos fungos foram inoculados no centro das placas.

Todos os testes foram realizados em triplicata para cada concentração e fungo avaliado, sendo as placas vedadas com filme plástico e mantidas em incubadora a 25 °C, por 6 dias. A inibição de crescimento, promovida pelo óleo essencial/fração ativa foi avaliada medindo o diâmetro da colônia do fungo nas placas contendo o óleo essencial/fração ativa em comparação às placas testemunha. Foram realizadas medidas a cada 24 horas.

2.3.3. Identificação da fração antifúngica

A fração antifúngica foi determinada baseando-se na técnica CCD Bioautografia (SRIDHAR *et al.*, 2003; SCHER *et al.*, 2004). Foram aplicados 70 mg de óleo essencial em uma placa de sílica gel 60 GF₂₅₄ preparativa (20 x 4 cm, com 1 mm de fase estacionária) eluindo-se com diclorometano:acetato de etila (9:1, v/v). Sob câmara de fluxo, despejou-se sobre a placa o meio de cultura BDA fundido, acrescido de sulfato de estreptomicina e esporos do fungo a ser avaliado. A placa foi colocada em uma bandeja esterilizada e umedecida com algodão embebido em água autoclavada. Cobriu-se a bandeja com filme plástico, mantendo-a em incubadora por 7 dias, a 25 °C. A metodologia foi aplicada para cada fungo isoladamente.

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

2.3.4. Análise estatística

Os dados obtidos através da avaliação antifúngica foram submetidos à análise de variância (teste F à 5%) e as médias submetidas a comparação pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade, estando este inserido no programa SAEG - Sistema de Análises Estatísticas em Genética, versão 5.0 (EUCLYDES, 1983).

2.4. Identificação dos compostos

Os compostos do óleo essencial bruto e da fração ativa de *C. ambrosioides* foram identificados através do índice de retenção de Kováts (KI), sendo injetadas amostras do óleo essencial (bruto e fracionado) e padrões de hidrocarbonetos saturados (com cadeias de 7 a 25 átomos de carbono) a 10 mg/mL, em diclorometano.

O índice de Kováts é um índice de retenção que descreve o comportamento de retenção do composto de interesse comparativamente ao de uma mistura de hidrocarbonetos saturados de diferentes números de átomos de carbono. Este índice de retenção fornece informação sobre a seqüência de eluição do composto e varia em função da fase estacionária e da temperatura, sendo independente das condições experimentais. O KI calculado para cada composto foi comparado com valores da literatura (ADAMS, 1995), sendo calculado através da equação 1.

$$KI = 100 Z + \frac{100 [(\log t'_R X) - (\log t'_R Z)]}{(\log t'_R Z + 1) - (\log t'_R Z)} \quad \text{(equação 1)}$$

Onde:

X, é o composto de interesse;

Z, é o número de átomos de carbono do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente anterior ao tempo de retenção de X;

$t'_R X$, é o tempo de retenção ajustado de X;

$t'_R Z$, é o tempo de retenção ajustado de Z;

$t'_R Z+1$, é o tempo de retenção ajustado do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente posterior ao tempo de retenção de X.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás (Shimadzu, CG-17A) com detector de ionização em chama (CG/DIC) a 240 °C; auto-injetor (Shimadzu, AOC-17) a 220 °C; coluna capilar de sílica fundida DB-5 (J&W Scientific) (30 m x 0,25 mm di x 0,25 µm filme), com programação de temperatura inicial de 60 °C (permanência: 1 min), elevação de 3 °C/min até 240 °C (permanência: 9 min); fluxo do gás de arraste (nitrogênio) a 1,33 mL/min; modo de injeção split, 1:20; volume injetado, 1 µL; amostras a 10mg/mL, dissolvidas em diclorometano.

Para a obtenção dos espectros de massas, a fim de uma posterior comparação com a biblioteca Wiley 229 e identificação dos compostos, foram processadas análises em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas, CG/EM, (Shimadzu modelo QP 5000); biblioteca Wiley 229; auto-injetor (Shimadzu, AOC-17) a 220 °C; coluna capilar de sílica fundida Equity-5 (Supelco) (30 m x 0,25 mm di x 0,25 µm filme), com programação de temperatura inicial de 60 °C (permanência: 1 min), elevação de 3 °C/min até 240 °C (permanência: 9 min); fluxo do gás de arraste (hélio) a 1,33 mL/min; temperatura da interface, 240 °C; modo de injeção split, 1:20; modo de ionização, impacto de elétrons (70 eV); faixa de massa (m/z), 40–350; volume injetado, 1 µL, amostras a 10 mg/mL, dissolvidas em diclorometano.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Óleo essencial bruto e fração ativa

A partir de partes aéreas de *C. ambrosioides* obteve-se o óleo essencial bruto, com rendimento de 0,3%. A literatura mostra que esse valor pode sofrer alteração em função da origem do material vegetal coletado. A extração do óleo essencial de *C. ambrosioides* de Rwanda, por destilação em aparelho Clevenger, apresentou um rendimento de 0,3% (MUHAYIMANA *et al.*, 1998), de planta da Nigéria exibiu rendimento de 0,06% (ONOCHA *et al.*, 1999) e, na Índia, 0,25% de rendimento foi encontrado (GUPTA *et al.*, 2002).

Em bioensaio, segundo a técnica de CCD Bioautografia, uma única fração ativa foi observada para todos os fungos avaliados. A figura 1 apresenta fotografias, obtidas após 7 dias de incubação, para os fungos *A. ochraceous* e *C. musae*, respectivamente. Nota-se que os resultados para ambos os fungos foram similares. Foi encontrado para a fração ativa um coeficiente de retenção (R_f) equivalente a 0,89 e uma largura da mancha (W_b) de 5,0 cm. Vale ressaltar que para os demais fungos foram encontrados resultados equivalentes.

Após identificar a porção antifúngica do óleo essencial bruto, o mesmo foi submetido ao fracionamento por CCD preparativa a fim de isolar a fração ativa. Processaram-se 5 placas, obtendo-se 340 mg da fração antifúngica.

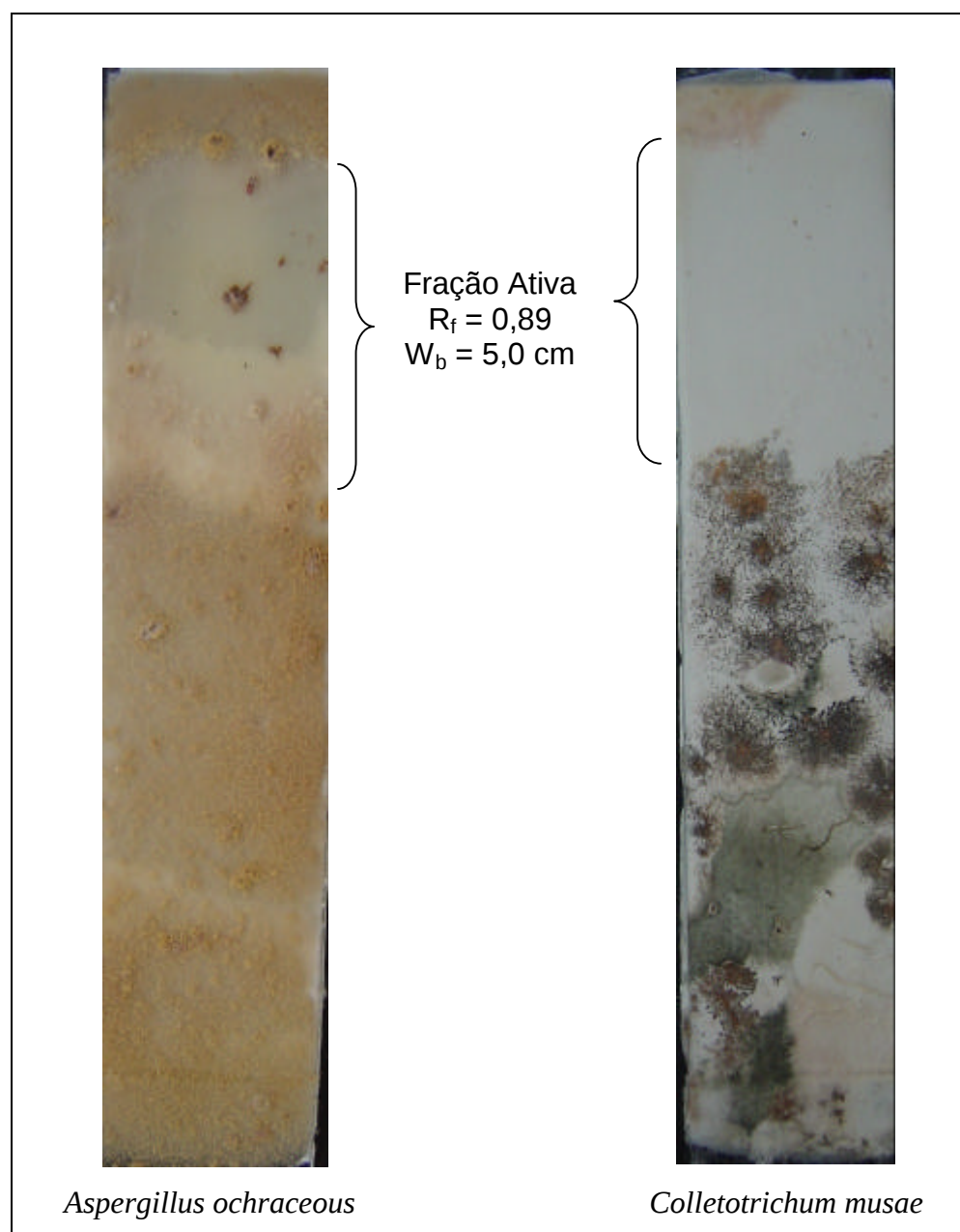


Figura 1: Cromatoplasmas obtidas por Cromatografia em Camada Delgada Bioautografia. Fotografias sete dias após aplicação de meio de cultura BDA (Batata dextrose ágar), contendo esporos dos respectivos fungos, sobre placas de CCD preparativa (placa de vidro 20 x 4 cm, com 1 mm de fase estacionária sílica gel 60 GF₂₅₄, aplicação de 70 mg de óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* e eluídas com diclorometano:acetato de etila, 9:1 v/v).

3.2. Atividade antifúngica

A figura 3 exibe o efeito do óleo essencial, a 0,3; 0,1; 0,05 e 0%, sobre o crescimento radial dos fungos avaliados. A 0,3% ocorreu total inibição ao crescimento radial dos fungos. A 0,1% nota-se expressiva inibição ao crescimento radial, para a maioria dos fungos avaliados.

Na figura 2A, tem-se um gráfico da inibição de crescimento radial dos fungos, avaliada no sexto dia de incubação, para o óleo essencial bruto. A 0,1% aconteceu inibição superior a 90% aos fungos avaliados, exceto para o *F. oxysporum*, com inibição de 69,42%. A 0,05% a inibição não foi totalitária a nenhum dos fungos, havendo apenas inibição parcial, sendo encontrada atividade de 70,01% para o *A. flavus*, 55,74% para o *A. niger*, 52,84% para o *C. gloesporioides* e inibição inferior a 50% para os demais fungos.

Avaliou-se a atividade da fração ativa do óleo essencial, sendo os resultados apresentados nas figuras 4 e 2B. A 0,1% relatou-se total inibição ao crescimento radial dos fungos. Nas concentrações inferiores, 0,05 e 0,03%, a atividade foi moderada, destacam-se as inibições ao *C. gloesporioides* (54,71 e 38,67%, respectivamente) e *C. musae* e *F. semitectum* (37,50%, em ambas as concentrações), em medida realizada no sexto dia de incubação.

Resultados da atividade antifúngica obtidos para o óleo essencial foram satisfatórios se comparados aos resultados reportados na literatura. ARISPURO *et al.*, (1997), avaliaram o efeito do extrato em diclorometano de *C. ambrosioides* na inibição ao crescimento radial dos fungos *A. flavus* e *A. parasitus*, relatando 13% de atividade, em ensaio realizado a 0,05%. CASTANEDA *et al.*, (2001) reportaram uma inibição de 40% do extrato em diclorometano de *C. ambrosioides* sobre o crescimento micelial de *Tilletia indica*, a 0,05%.

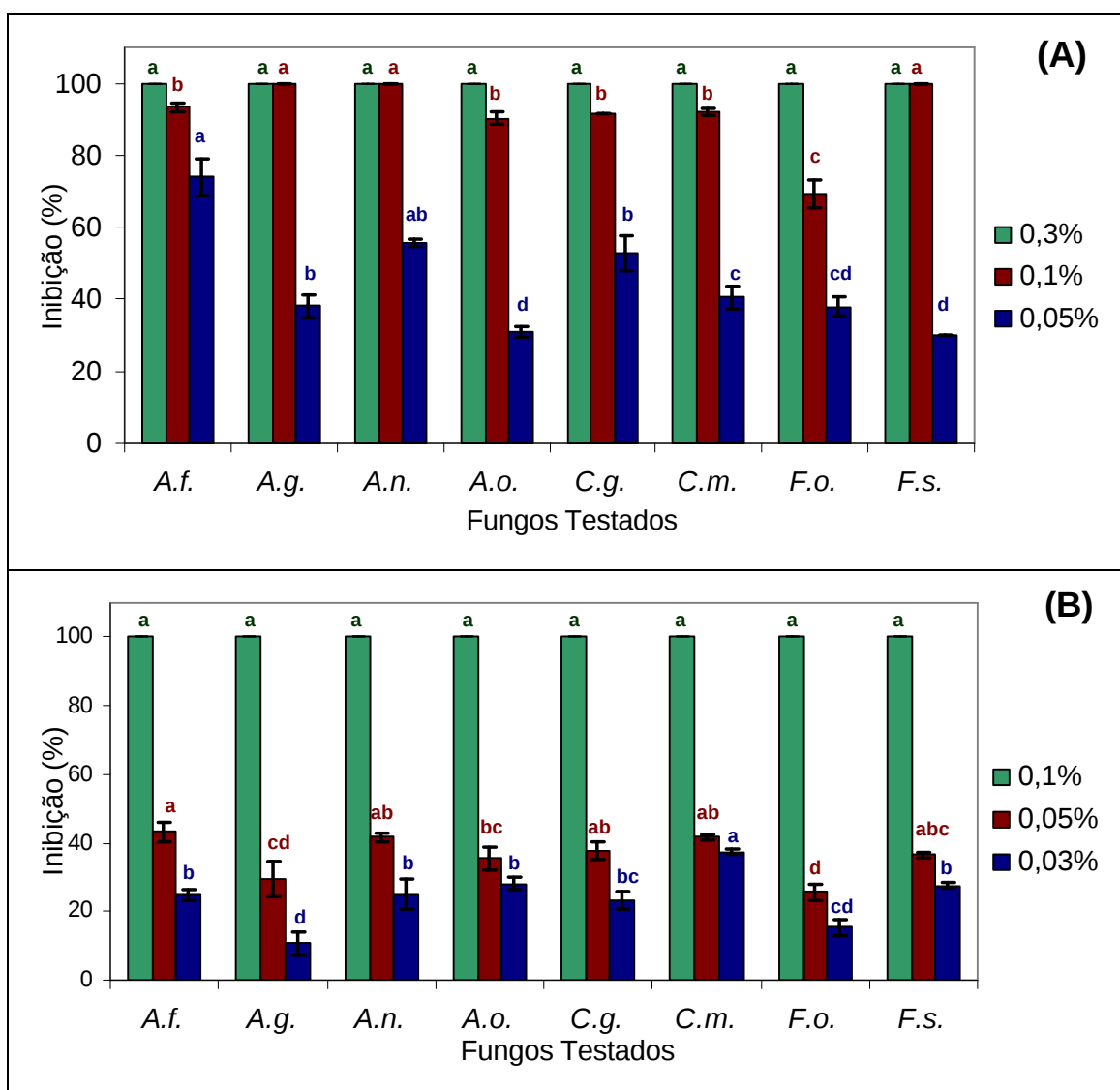


Figura 2: Inibição ao crescimento radial dos fungos, avaliada no 6º dia para o óleo essencial bruto a 0,3; 0,1 e 0,05% **(A)** e no 5º dia para a fração ativa do óleo essencial a 0,1; 0,05 e 0,03% **(B)**, de *Chenopodium ambrosioides*. Sendo: A.f. = *Aspergillus flavus*, A.g. = *A. glaucus*, A.n. = *A. niger*, A.o. = *A. ochraceous*, C.g. = *Colletotrichum gloesporioides*, C.m. = *C. musae*, F.o. = *Fusarium oxysporum* e F.s. = *F. semitectum*. Para cada concentração, médias seguidas pela mesma letra e da mesma cor não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P = 0,05). As barras (I) indicam desvio padrão.

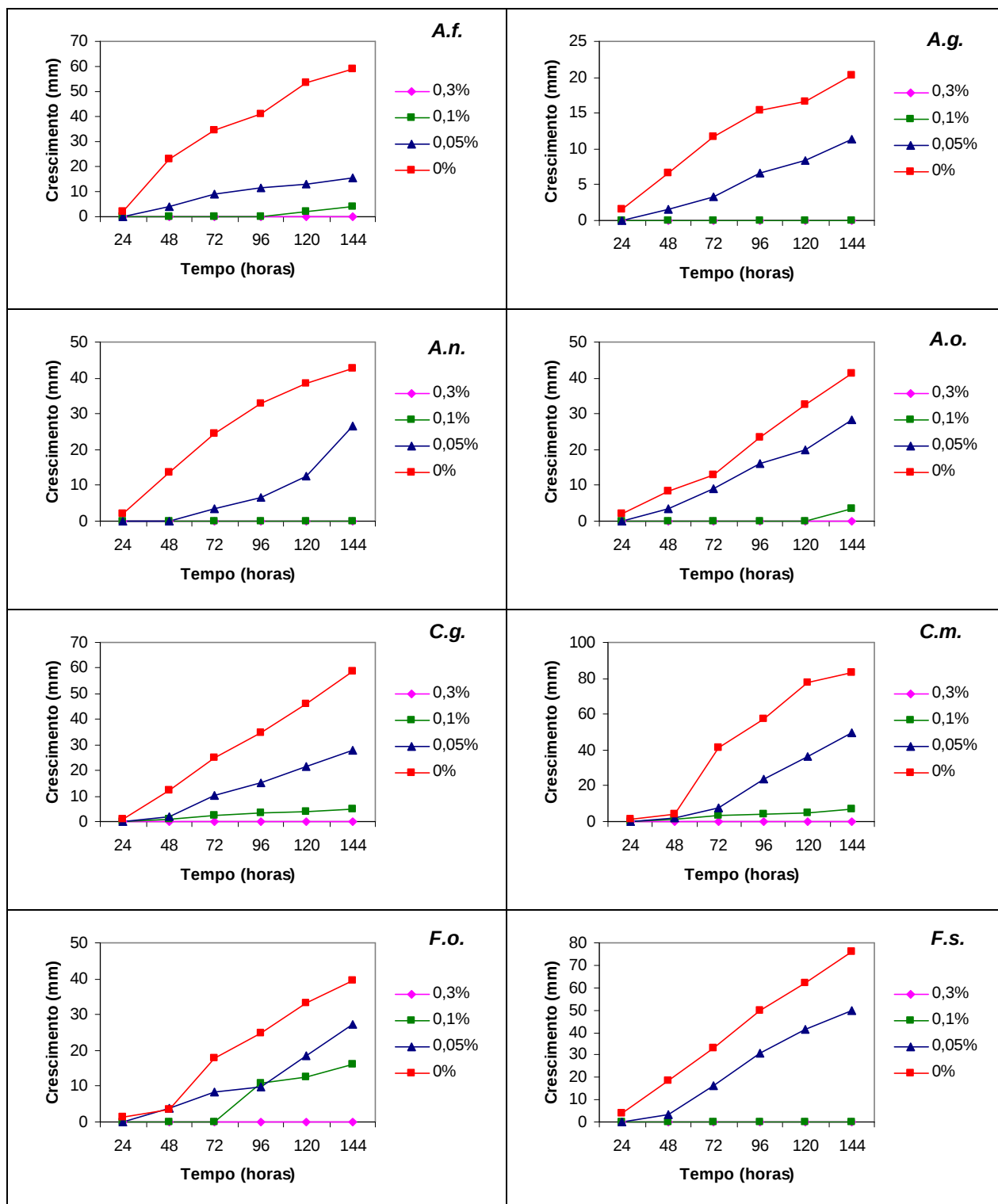


Figura 3: Efeito do óleo essencial bruto de *Chenopodium ambrosioides*, a 0; 0,05; 0,1 e 0,3%, no crescimento radial dos fungos, em função do tempo, com medições realizadas em intervalos de 24 em 24 horas. Sendo: A.f. = *Aspergillus flavus*, A.g. = *A. glaucus*, A.n. = *A. niger*, A.o. = *A. ochraceus*, C.g. = *Colletotrichum gloesporioides*, C.m. = *C. musae*, F.o. = *Fusarium oxysporum* e F.s. = *F. semitectum*.

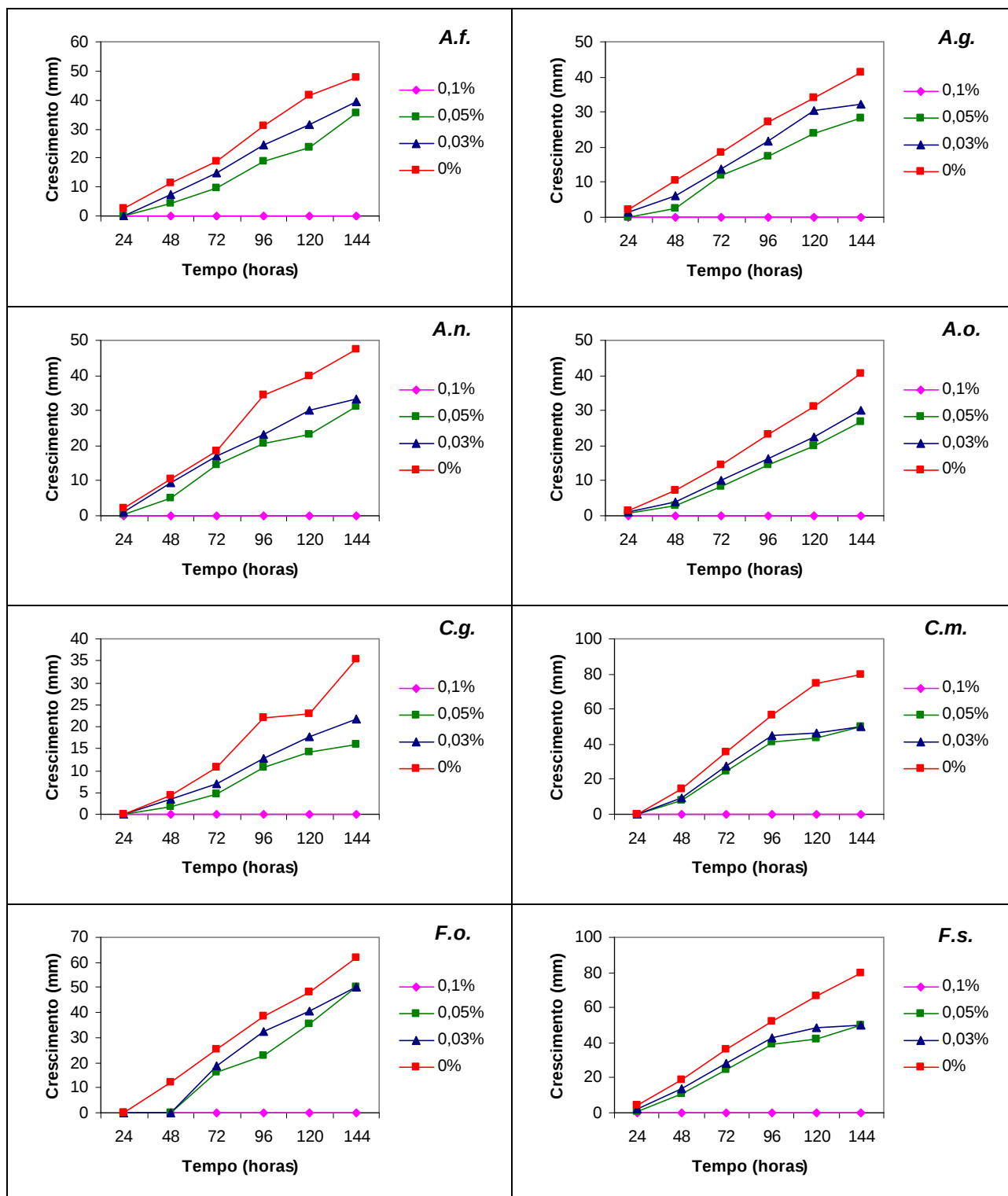


Figura 4: Efeito da fração ativa do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides*, a 0; 0,03; 0,05 e 0,1%, no crescimento radial dos fungos, em função do tempo, com medições realizadas em intervalos de 24 em 24 horas. Sendo: A.f. = *Aspergillus flavus*, A.g. = *A. glaucus*, A.n. = *A. niger*, A.o. = *A. ochraceus*, C.g. = *Colletotrichum gloesporioides*, C.m. = *C. musae*, F.o. = *Fusarium oxysporum* e F.s. = *F. semitectum*.

Trabalhos publicados sobre inibição de fungos aflatoxigênicos com produtos naturais utilizam óleos essenciais (ANSARI e SHRIVASTAVA, 1991; PICMAN *et al.*, 1992; SINHA *et al.*, 1993) sendo muitos destes inibidores efetivos do crescimento devido ao conteúdo de aldeído cinâmico e eugenol. JHAM *et al.*, 2005 estudaram o efeito do extrato hexânico e do óleo essencial de *Cinnamomum vera* (*C. zeylanicum*) sobre fungos de armazenamento (*A. flavus* e *A. ruber*), com total inibição do crescimento micelial a 0,03 e 0,01%, respectivamente. Relataram, ainda, o cinamaldeído, principal componente do óleo essencial, como o composto responsável pela atividade antifúngica.

3.3. Composição do óleo essencial bruto e da fração ativa

A figura 5 apresenta o cromatograma do óleo essencial bruto obtido por CG/EM. Treze compostos foram identificados, representando 90,22% da constituição do óleo essencial (tabela 1). Os compostos, majoritariamente identificados, foram: (Z)-ascaridol (61,43%), (E)-ascaridol (18,62%), carvacrol (3,87%), *p*-cimeno (2,05%) e α -terpineno (0,87%).

A composição química do óleo essencial de *C. ambrosioides* relatada na literatura diverge consideravelmente em relação à porcentagem relativa dos compostos, em função do local de coleta do material vegetal. A tabela 1 exhibe nitidamente a diferença de valores deste parâmetro. O α -terpineno encontra-se como principal composto no óleo essencial de planta da Índia, correspondendo a 63,6% da composição (GUPTA *et al.*, 2002), enquanto o óleo essencial obtido no presente estudo apresentou apenas 0,87% do componente. O *p*-cimeno corresponde a 50% da constituição química do óleo essencial de material coletado em Camarões (TAPONDJOU *et al.*, 2002), já no óleo essencial reportado nesse trabalho encontrou-se um teor de 2,05%. O ascaridol, principal componente do óleo essencial deste estudo, correspondendo a 80,05% (isômeros Z e E), é encontrado em uma porcentagem mínima, de 0,1%, no óleo essencial de plantas da Nigéria (ONOCHA *et al.*, 1999). Carvacrol, cuja composição no óleo essencial estudado é de 3,87%, não é encontrado no óleo essencial de planta da Índia e no óleo essencial comercial fornecido pela Exaflor, da França (GUPTA *et al.*, 2002; CAVALLI *et al.*, 2004).

Tabela 1: Composição do óleo essencial bruto de *Chenopodium ambrosioides* e comparação da porcentagem relativa com dados reportados na literatura.

Pico	Índice de Kováts		Composto	Porcentagem relativa				
	calculado	literatura *		Óleo essencial estudado	ONOCHA <i>et al.</i> , 1999	GUPTA <i>et al.</i> , 2002	TAPONDJOU <i>et al.</i> , 2002	CAVALLI <i>et al.</i> , 2004
1	1018	1018	α -terpineno	0,87	56,0	63,6	37,6	9,7
2	1026	1026	<i>p</i> -cymeno	2,05	15,5	19,5	50,0	16,2
3	1033	1032	álcool benzílico	0,27	- **	-	-	-
4	1075	1072	<i>p</i> -cresol	0,25	-	-	-	-
5	1113	1111	<i>p</i> -mentha-1,3,8-trieno	0,18	-	0,2	-	-
6	1191	1183	<i>p</i> -cimen-8-ol	0,59	-	-	-	0,1
7	1197	1189	α -terpineol	0,45	-	-	-	-
8	1248	1237	(<i>Z</i>)-ascaridol	61,43	0,1 ***	6,2 ***	3,5 ***	41,8 ***
9	1260	1252	piperitone	0,87	-	-	-	-
10	1297	1298	carvacrol	3,87	0,2	-	3,3	-
11	1307	1301	(<i>E</i>)-ascaridol	18,62	-	-	-	-
12	1342	1340	acetato de (<i>E</i>)-piperitol	0,53	-	-	-	-
13	1363	1362	acetato de (<i>Z</i>)-carvil	0,24	-	-	-	-
		Outros		9,78 ****	28,2 *****	10,5 *****	5,6 *****	32,2 *****

* ADAMS, 1995. ** Composto não detectado. *** O isômero correto não foi especificado. **** Compostos que não puderam ser identificados.

***** Compostos não detectados no óleo essencial estudado.

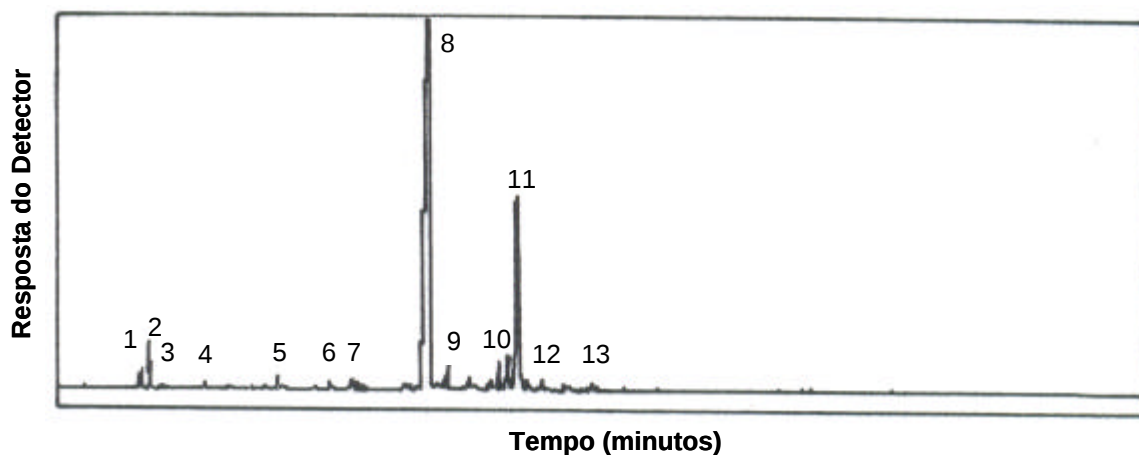


Figura 5: Cromatograma total de íons, representativo, obtido ao analisar o óleo essencial bruto de *Chenopodium ambrosioides* por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (Shimadzu, QP 5000). Coluna Equity-5 (Supelco), com programação de temperatura inicial de 60 °C (permanência: 1 min), elevação de 3 °C/min até 240 °C (permanência: 9 min); fluxo do gás de arraste (hélio) a 1,33 mL/min; temperatura do injetor, 220 °C; temperatura da interface, 240 °C; modo de ionização, impacto de elétrons (70 eV); faixa de massa (m/z), 40–350.

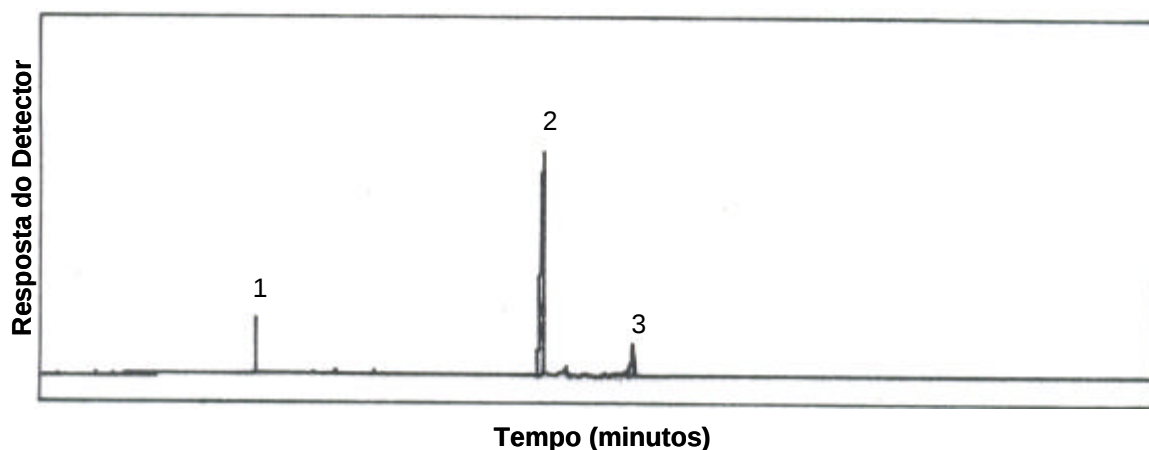


Figura 6: Cromatograma parcial, representativo, obtido ao analisar a fração ativa do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides*, por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (Shimadzu, CG-17A). Coluna DB-5 (J&W Scientific), com programação de temperatura inicial de 60 °C (permanência: 1 min), elevação de temperatura de 3 °C/min até 240 °C (permanência: 9 min); fluxo do gás de arraste (nitrogênio) a 1,33 mL/min; temperatura do injetor, 220 °C; temperatura do detector, 240 °C. Sendo 1, 2, 3 os compostos *p*-cimeno, (*Z*)-ascaridol e (*E*)-ascaridol, respectivamente.

Na figura 6 tem-se o cromatograma, obtido por CG/DIC, da fração ativa do óleo essencial de *C. ambrosioides*, apontando a presença de três componentes. Os compostos identificados foram *p*-cimeno (25,40%), (*Z*)-ascaridol (44,35%) e (*E*)-ascaridol (30,25%), sendo os dados de identificação apresentados na tabela 2.

Tabela 2: Composição da fração ativa do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides*.

Pico	Índice de Kováts		Composto	Porcentagem relativa
	calculado	literatura *		
1	1027	1026	<i>p</i> -cimeno	25,40
2	1248	1237	(<i>Z</i>)-ascaridol	44,35
3	1305	1301	(<i>E</i>)-ascaridol	30,25

* ADAMS, 1995.

Os resultados obtidos, na identificação da fração ativa do óleo essencial, apontam a perspectiva de potencial antifúngico para os compostos *p*-cimeno e ascaridol (isômeros *Z* e *E*).

Dados que estabelecem o composto responsável pela atividade antifúngica de *C. ambrosioides* não são reportados na literatura. No entanto, estudos revelam a toxicidade de óleos voláteis de *C. ambrosioides*, atribuindo-a ao constituinte ascaridol (POLLACK *et al.*, 1990). Os sintomas da intoxicação por ascaridol incluem náuseas, vertigem e fraqueza em humanos (QUARLES, 1992) e ataque ao sistema nervoso em insetos.

4. CONCLUSÕES

Compostos ativos, extraídos de espécies vegetais, são de grande interesse para o controle de fungos de armazenamento. No presente estudo foi relatado um relevante potencial antifúngico do óleo essencial de *C. ambrosioides*, em especial, a fração composta pelo ascaridol (isômeros *Z* e *E*) e o *p*-cimeno. Desta forma, estes componentes podem oferecer perspectiva de utilização como agentes antifúngicos.

CAPÍTULO 2

COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO EXTRATO HEXÂNICO DE *Chenopodium ambrosioides* L.

1. INTRODUÇÃO

Prejuízos decorrentes da contaminação de gêneros alimentícios por fungos, largamente encontrados em diversas etapas de produção e armazenamento, são uma preocupação constante entre agricultores (DORNER e COLE, 2002).

Muitos fungos produzem micotoxinas, compostos que têm atividade mutagênica, carcinogênica e teratogênica. As aflatoxinas são substâncias produzidas principalmente por *Aspergillus flavus* e *A. parasiticus*. Culturas de milho, amendoim, algodão e várias nozes, como castanha-do-pará, são particularmente suscetíveis à contaminação de aflatoxinas (JAY, 1996; DORNER e COLE, 2002).

Antracnose, uma doença que se desenvolve durante o armazenamento e o amadurecimento, em bananas é causada pelo *Colletotrichum musae* (CHILLET *et al.*, 2000). Em mamão é causada por *Colletotrichum gloeosporioides* e tem causado sérios problemas onde encontra condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento e resistência a fungicidas sintéticos (BAÑOS *et al.*, 2003).

A busca por substâncias não tóxicas, que reduzam a deterioração fúngica e prologuem a estocagem de gêneros alimentícios, torna-se importante. Extratos de plantas e óleos essenciais têm mostrado potencial alternativo ao controle de patógenos de armazenamento (WINK, 1993). Extratos de diversas espécies vegetais têm apresentado atividade antifúngica (FERHOUT *et al.*, 1999; DE *et al.*, 1999; PRADEEP *et al.*, 2003).

A erva-de-santa-maria, *Chenopodium ambrosioides* L., uma espécie nativa da América tropical, originária, provavelmente, do México, encontra-se vastamente distribuída em regiões de clima tropical, subtropical e temperado. No Brasil é ampla a distribuição, com ocorrência em quase todo o território (KISMANN, 1991). Extratos de *C. ambrosioides* exibem atividade molucida (HMAMOUCI *et al.*, 2000) e são usados no tratamento de doenças pulmonares (LALL e MEYER, 1999). Extratos da planta apresentam atividade fungicida (ARISPURO *et al.*, 1997; CASTANEDA *et al.*, 2001).

Estudo sistemático da atividade antifúngica de *C. ambrosioides*, aliado à identificação dos compostos, não é retratado na literatura. Vale ressaltar a precariedade em trabalhos envolvendo a espécie no Brasil, sendo inexistente a avaliação contra fitopatógenos. Nesse contexto, o presente trabalho visa identificar compostos com potencial antifúngico no extrato hexânico de *C. ambrosioides*. Não obstante, relata a composição e atividade antifúngica do extrato hexânico bruto.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Os estudos foram desenvolvidos na Universidade Federal de Viçosa, no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, do Departamento de Química, e na Clínica de Doenças de Plantas, do Departamento de Fitopatologia, no ano de 2005.

2.1. Materiais e reagentes

Todos os solventes orgânicos utilizados são de grau P.A., da Quimex, sendo os mesmos destilados previamente. Para o fracionamento por cromatografia em camada delgada, utilizou-se sílica gel 60 GF₂₅₄ da Merck. Nos bioensaios foram utilizadas placas de Petri descartáveis (60 x 15 cm e 90 x 15 cm) adquiridas da J.Prolab.

2.1.1. Material vegetal

As partes aéreas da erva-de-santa-maria (*C. ambrosioides*) foram obtidas em Janeiro de 2005, de uma Casa de Vegetação localizada no Departamento de Fitotecnia, na Universidade Federal de Viçosa.

2.2. Obtenção do extrato hexânico bruto e fracionado

2.2.1. Extrato hexânico

A um Erlenmeyer de 2,0 L foram adicionados 200 g de partes aéreas frescas de *C. ambrosioides*, trituradas manualmente, e 1,0 L de hexano. Após agitação por quatro horas, a temperatura ambiente, procedeu-se uma filtração, sendo o filtrado seco com sulfato de sódio anidro e concentrado em evaporador rotatório. O procedimento foi repetido dez vezes. O extrato hexânico (22 g) obtido foi armazenado a aproximadamente 4 °C.

2.2.2. Fracionamento do extrato hexânico

O fracionamento do extrato hexânico foi realizado por cromatografia em camada delgada (CCD) preparativa (placa de vidro de 20 x 20 cm com fase estacionária de 1 mm de sílica gel 60 GF₂₅₄). Foram aplicados 200 mg de extrato hexânico por placa e utilizada uma fase móvel constituída de diclorometano e acetato de etila (9:1, v/v). Luz ultravioleta (comprimento de onda, 254 nm) e a técnica CCD Bioautografia, descrita no item 2.3.3, foram os agentes utilizados para a revelação das placas. A fração responsável pela atividade antifúngica foi recuperada raspando-se a fase estacionária da região ativa e extraído com diclorometano (sob agitação magnética, a temperatura ambiente, por 8 horas). Filtrou-se a vácuo, em funil de vidro sinterizado, resíduos de água foram suprimidos com sulfato de sódio anidro e o solvente foi eliminado em evaporador rotatório. A fração ativa foi armazenada a aproximadamente 4 °C.

2.3. Bioensaios

2.3.1. Aquisição dos fungos

Utilizaram-se grãos e frutas contaminados por fungos: *Aspergillus flavus*, *A. glaucus*, *A. niger*, *A. ochraceous*, *Colletotrichum gloesporioides*, *C. musae*, *Fusarium oxysporum* e *F. semitectum*. Em uma câmara de fluxo, papel de germinação foi embebido em água autoclavada e colocado no fundo de uma placa gerbox, previamente esterilizada. Grãos e fragmentos de frutas, brandamente lavados com água destilada, foram inseridos em uma solução de álcool etílico 50%, por um minuto, transferidos para uma solução de água sanitária 2%, por um minuto, e finalmente imersos em água destilada por um minuto. Foram transferidos para a placa gerbox, e armazenados em incubadora, a 25 °C, por 6 dias. Após esse período os fungos foram identificados. Esporos de cada fungo, isoladamente, foram transferidos para placas de Petri esterilizadas contendo o meio de cultura BDA (batata dextrose ágar) acrescido de sulfato de estreptomicina. As placas foram vedadas com filme plástico e mantidas em incubadora a 25 °C, por 7 dias.

2.3.2. Avaliação da atividade antifúngica

A atividade antifúngica foi avaliada contra os fungos *Aspergillus flavus*, *A. glaucus*, *A. niger*, *A. ochraceus*, *Colletotrichum gloesporioides*, *C. musae*, *Fusarium oxysporum* e *F. semitectum*. A metodologia empregada no bioensaio baseou-se na “poison food”, utilizando o meio de cultura BDA (batata dextrose ágar) acrescido de sulfato de estreptomicina (DHINGRA e SINCLAIR, 1995; SRIDHAR *et al.*, 2003).

Para a avaliação da atividade antifúngica do extrato hexânico bruto, nas concentrações 0,3; 0,2 e 0,1%, e para a fração ativa, nas concentrações 0,1; 0,075; 0,05 e 0,03%, foram utilizadas placas de Petri estéreis e descartáveis. O extrato hexânico/fração ativa foi previamente emulsificado com metanol (1:1, v/v) e incorporado ao meio de cultura fundido, na concentração desejada. As testemunhas continham o meio de cultura com metanol. Os esporos dos fungos foram inoculados no centro das placas.

Todos os testes foram realizados em triplicata para cada concentração e fungo avaliado, sendo as placas vedadas com filme plástico e mantidas em incubadora a 25 °C, por 6 dias. A inibição de crescimento, promovida pelo extrato hexânico/fração ativa foi avaliada medindo o diâmetro da colônia do fungo nas placas contendo o extrato hexânico/fração ativa em comparação às placas testemunha. Foram realizadas medidas a cada 24 horas.

2.3.3. Identificação da fração antifúngica

A fração antifúngica foi determinada baseando-se na técnica CCD Bioautografia (SRIDHAR *et al.*, 2003; SCHER *et al.*, 2004). Foram aplicados 70 mg de extrato hexânico em uma placa de sílica gel 60 GF₂₅₄ preparativa (20 x 4 cm, com 1 mm de fase estacionária) eluindo-se com diclorometano:acetato de etila (9:1, v/v). Sob câmara de fluxo, despejou-se sobre a placa o meio de cultura BDA fundido, acrescido de sulfato de estreptomicina e esporos do fungo a ser avaliado. A placa foi colocada em uma bandeja esterilizada e umedecida com algodão embebido em água autoclavada. Cobriu-se a bandeja com filme plástico, mantendo-a em incubadora por 7 dias, a 25 °C. A metodologia foi aplicada a cada fungo isoladamente.

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

2.3.4. Análise estatística

Os dados obtidos através da avaliação antifúngica foram submetidos à análise de variância (teste F à 5%) e as médias submetidas a comparação pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade, estando este inserido no programa SAEG - Sistema de Análises Estatísticas em Genética, versão 5.0 (EUCLYDES, 1983).

2.4. Identificação dos compostos

Os compostos do extrato hexânico bruto e da fração ativa de *C. ambrosioides* foram identificados através do índice de retenção de Kováts (KI), sendo injetadas amostras do extrato hexânico (bruto e fracionado) e padrões de hidrocarbonetos saturados (com cadeias de 7 a 25 átomos de carbono) a 10 mg/mL, em diclorometano.

O índice de Kováts é um índice de retenção que descreve o comportamento de retenção do composto de interesse comparativamente ao de uma mistura de hidrocarbonetos saturados de diferentes números de átomos de carbono. Este índice de retenção fornece informação sobre a seqüência de eluição do composto e varia em função da fase estacionária e da temperatura, sendo independente das condições experimentais. O KI calculado para cada composto foi comparado com valores da literatura (ADAMS, 1995), sendo calculado através da equação 1.

$$KI = 100 Z + \frac{100 [(\log t'_R X) - (\log t'_R Z)]}{(\log t'_R Z + 1) - (\log t'_R Z)} \quad \text{(equação 1)}$$

Onde:

X, é o composto de interesse;

Z, é o número de átomos de carbono do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente anterior ao tempo de retenção de X;

$t'_R X$, é o tempo de retenção ajustado de X;

$t'_R Z$, é o tempo de retenção ajustado de Z;

$t'_R Z+1$, é o tempo de retenção ajustado do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente posterior ao tempo de retenção de X.

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás (Shimadzu, CG-17A) com detector de ionização em chama (CG/DIC) a 240 °C; auto-injetor (Shimadzu, AOC-17) a 220 °C; coluna capilar de sílica fundida DB-5 (J&W Scientific) (30 m x 0,25 mm di x 0,25 µm filme), com programação de temperatura inicial de 60 °C (permanência: 1 min), elevação de 3 °C/min até 240 °C (permanência: 9 min); fluxo do gás de arraste (nitrogênio) a 1,33 mL/min; modo de injeção split, 1:20; volume injetado, 1 µL; amostras a 10 mg/mL, em diclorometano.

Para a obtenção dos espectros de massas, a fim de uma posterior comparação com a biblioteca Wiley 229 e identificação dos compostos, foram processadas análises em um cromatógrafo a gás acoplado a um espectrômetro de massas, CG/EM, (Shimadzu modelo QP 5000); biblioteca Wiley 229; auto-injetor (Shimadzu, AOC-17) a 220 °C; coluna capilar de sílica fundida Equity-5 (Supelco) (30 m x 0,25 mm di x 0,25 µm filme), com programação de temperatura inicial de 60 °C (permanência: 1 min), elevação de 3 °C/min até 240 °C (permanência: 9 min); fluxo do gás de arraste (hélio) a 1,33 mL/min; temperatura da interface, 240 °C; modo de injeção split, 1:20; modo de ionização, impacto de elétrons (70 eV); faixa de massa (m/z), 40–350; volume injetado, 1 µL; amostras a 10 mg/mL, dissolvidas em diclorometano.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Extrato hexânico bruto e fração ativa

Pela maceração de partes aéreas de *C. ambrosioides*, no solvente hexano, foi adquirido o extrato hexânico bruto, com rendimento de 1,1%. É importante destacar que fatores externos, como condições do solo, luz, clima, representam uma função no rendimento e composição de extratos vegetais.

Utilizando a técnica CCD bioautografia identificou-se uma única faixa onde não houve desenvolvimento micelial dos fungos avaliados, sendo designada fração ativa do extrato hexânico de *C. ambrosioides*. A figura 1 apresenta uma fotografia, obtida após 7 dias de incubação, para o fungo *Fusarium oxysporum*. Uma mesma fração ativa foi observada para todos os fungos, apresentando um coeficiente de retenção (R_f) equivalente a 0,89 e uma largura longitudinal (W_b) de 5,0 cm.

Diante do conhecimento da fração ativa, o extrato hexânico bruto foi fracionado, por CCD, objetivando recuperação da mesma. Processaram-se 15 placas sendo obtidas 1,2 g da fração antifúngica.

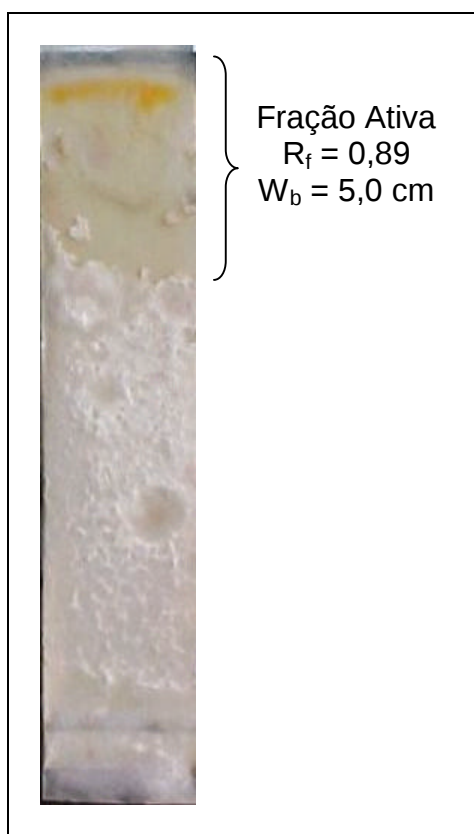


Figura 1: Cromatoplaça obtida por Cromatografia em Camada Delgada Bioautografia. Fotografia sete dias após aplicação de meio de cultura contendo esporos do fungo *Fusarium oxysporum*, sobre a placa de CCD (placa de vidro 20 x 4 cm, com 1 mm de fase estacionária sílica gel 60 GF₂₅₄, aplicação de 70 mg de extrato hexânico de *Chenopodium ambrosioides* e eluída com diclorometano:acetato de etila, 9:1 v/v).

3.2. Atividade antifúngica

As figuras 3 e 4 apresentam o efeito do extrato hexânico bruto e da fração ativa de *C. ambrosioides*, respectivamente, sobre o crescimento dos fungos avaliados. Nota-se significativo potencial antifúngico do extrato hexânico bruto até uma concentração de 0,2%, para a maioria dos fungos. Para a fração ativa nota-se total inibição ao crescimento radial a 0,1%, para todos os fungos testados.

A figura 2A apresenta a inibição de crescimento radial dos fungos promovida pelo extrato hexânico bruto, avaliada no sexto dia. A 0,3%, nota-se total inibição para a maioria dos fungos, exceto as espécies *C. gloesporioides* e *C. musae*, que apresentaram 94,32 e 96,39%, respectivamente. A 0,2% ocorre inibição superior a 65% para todos os fungos, destacando-se total inibição aos fungos *A. glaucus*, *A. niger* e *F. semitectum*. A 0,1% acontece uma redução de atividade para *A. ochraceous*, *C. musae*, *F. oxysporum* e *F. semitectum*, sendo 27,45; 46,99; 13,64 e 35,47%, respectivamente. A atividade para os demais fungos é superior a 60%, destacando-se total inibição ao *A. niger*.

A figura 2B aponta a porcentagem de inibição de crescimento radial dos fungos promovida pela fração ativa do extrato hexânico no sexto dia de avaliação. A 0,1% nota-se total inibição para todos os fungos avaliados. A 0,075% verifica-se inibição superior a 60% para a maioria das espécies, exceto *C. musae*, que apresenta 40,48%. A 0,05% a atividade antifúngica para as espécies *A. glaucus* e *A. niger* são 60,0 e 100,0%, respectivamente, e valores inferiores a 51% para as demais. A 0,03% as inibições são inferiores a 50% para todos os fungos avaliados.

Existem poucas informações na literatura reportando a atividade antifúngica de extratos de *C. ambrosioides*. Em estudos com o extrato em diclorometano de *C. ambrosioides* ARISPURO *et al.*, (1997) relataram atividade de 13% sobre o crescimento micelial do fungo *A. flavus*, a uma concentração de 0,05%. CASTAÑEDA *et al.*, (2001) apontaram uma inibição ao crescimento de *Tilletia indica* de 40%, a 500 µg/mL. Estes estudos, no entanto, não investigaram os componentes responsáveis pela atividade antifúngica.

Na literatura, a maioria dos trabalhos sobre o controle de fungos aflatoxigênicos é relatada com a utilização de óleos essenciais (ANSARI e

SHRIVASTAVA, 1991; PICMAN *et al.*, 1992; SINHA *et al.*, 1993) sendo muitos destes inibidores efetivos do crescimento devido ao conteúdo de aldeído cinâmico e eugenol. SRIDHAR *et al.*, (2003) relataram total inibição do óleo essencial das espécies *Tachyspermum copticum* e *Cymbopogon martini* sobre o crescimento micelial de *A. flavus* e *A. niger*, a 0,1%.

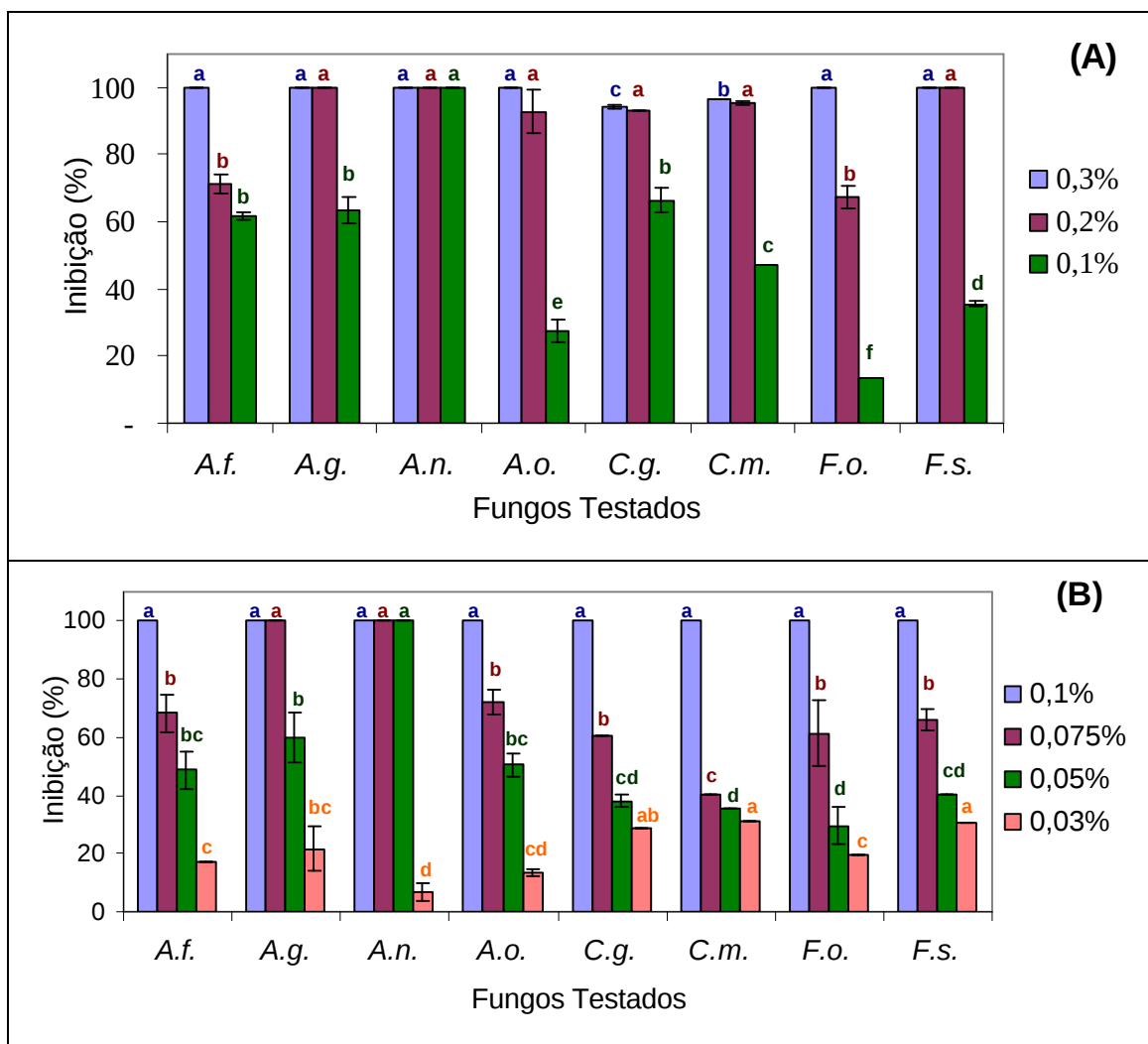


Figura 2: Inibição ao crescimento micelial dos fungos, avaliada no sexto dia de incubação para o extrato hexânico bruto a 0,3; 0,2 e 0,1% **(A)** e a fração ativa do extrato hexânico a 0,1; 0,075; 0,05 e 0,03% **(B)** de *Chenopodium ambrosioides*. Sendo: A.f. = *Aspergillus flavus*, A.g. = *A. glaucus*, A.n. = *A. niger*, A.o. = *A. ochraceous*, C.g. = *Colletotrichum gloesporioides*, C.m. = *C. musae*, F.o. = *Fusarium oxysporum* e F.s. = *F. semitectum*. Para cada concentração, médias seguidas pela mesma letra e da mesma cor não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey (P = 0,05). As barras (I) indicam desvio padrão.

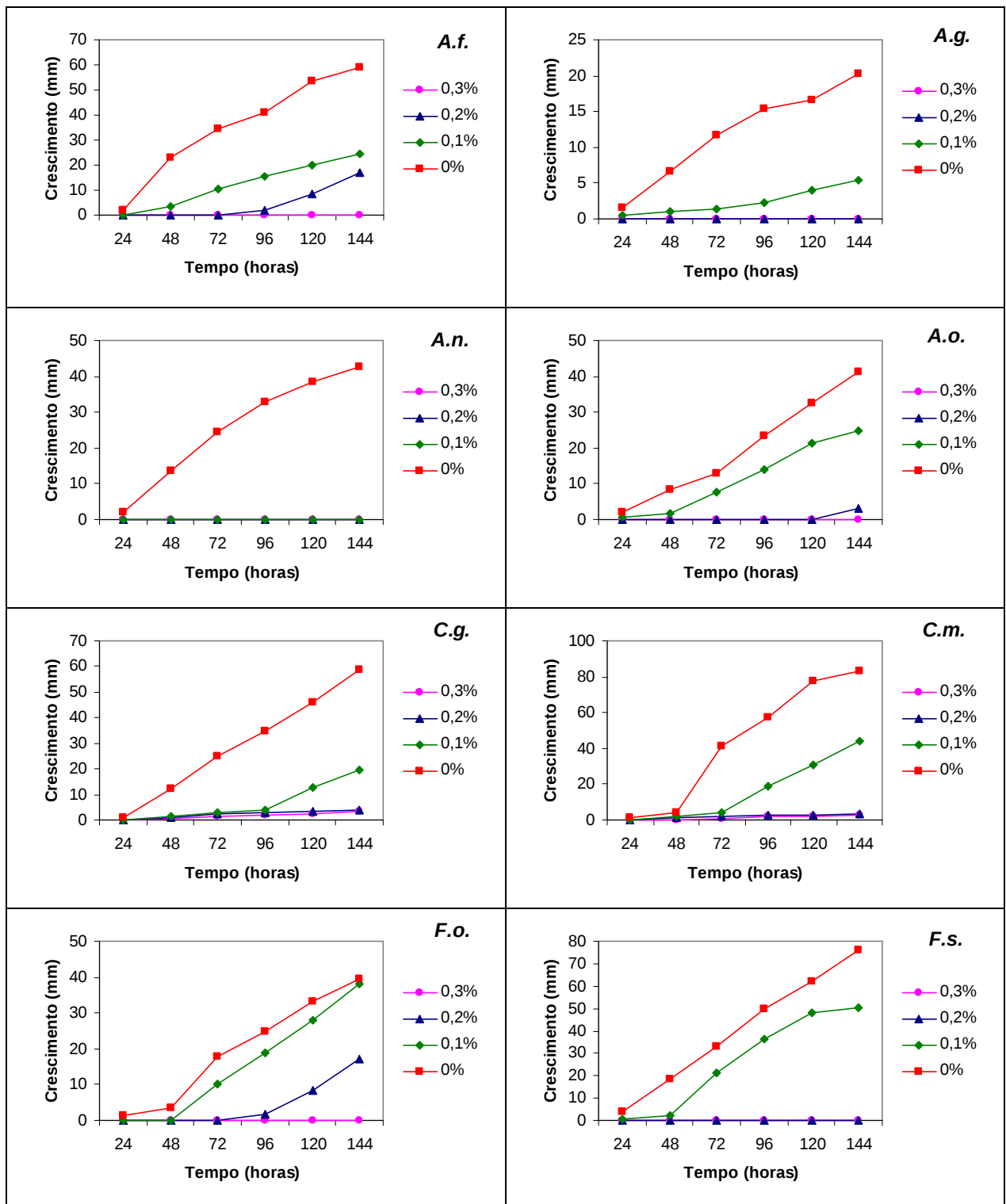


Figura 3: Efeito do extrato hexânico bruto de *Chenopodium ambrosioides*, a 0; 0,1; 0,2 e 0,3%, no crescimento radial dos fungos, em função do tempo, com medições realizadas em intervalos de 24 em 24 horas. Sendo: A.f. = *Aspergillus flavus*, A.g. = *A. glaucus*, A.n. = *A. niger*, A.o. = *A. ochraceous*, C.g. = *Colletotrichum gloesporioides*, C.m. = *C. musae*, F.o. = *Fusarium oxysporum* e F.s. = *F. semitectum*.

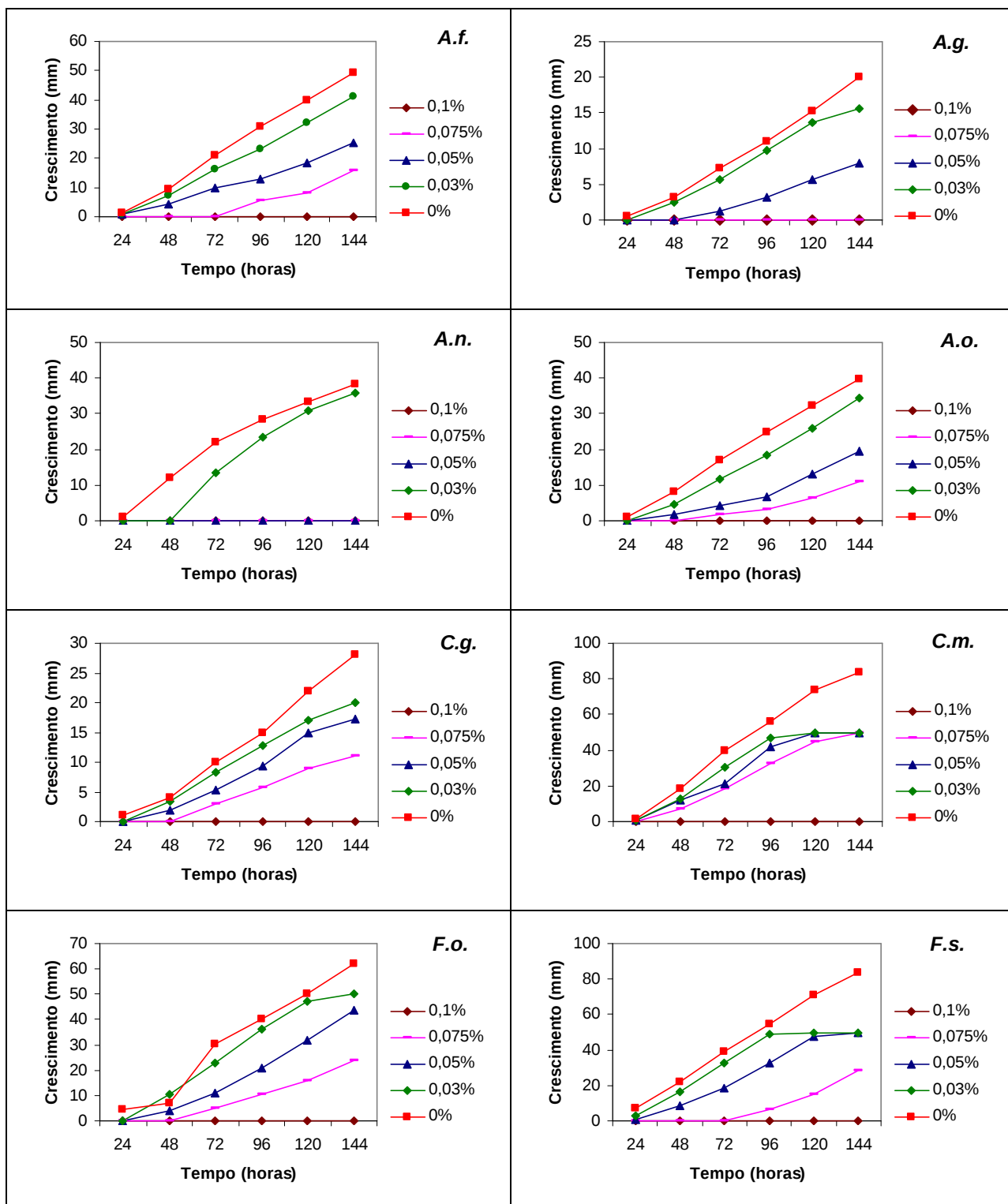


Figura 4: Efeito da fração ativa do extrato hexânico de *Chenopodium ambrosioides*, a 0; 0,03; 0,05; 0,075 e 0,1%, no crescimento radial dos fungos, em função do tempo, com medições realizadas em intervalos de 24 em 24 horas. Sendo: A.f. = *Aspergillus flavus*, A.g. = *A. glaucus*, A.n. = *A. niger*, A.o. = *A. ochraceus*, C.g. = *Colletotrichum gloesporioides*, C.m. = *C. musae*, F.o. = *Fusarium oxysporum* e F.s. = *F. semitectum*.

A atividade antifúngica do extrato hexânico de *C. ambrosioides* apresentada neste estudo mostrou-se inferior ao potencial antifúngico do óleo essencial, obtido a partir do mesmo material vegetal (Capítulo 1). Para o óleo essencial nota-se uma eficaz atividade até uma concentração de 0,1%, enquanto para o extrato hexânico expressiva atividade é relatada até 0,2%, para os fungos avaliados.

3.3. Composição do extrato hexânico bruto e da fração ativa

Na figura 5 é apresentado o cromatograma do extrato hexânico bruto obtido por CG/EM. A tabela 1 apresenta a identificação total, sendo os compostos majoritariamente encontrados, (*Z*)-ascaridol (53,98%), (*E*)-ascaridol (17,25%), α -terpineno (11,24%) e *p*-cimeno (6,05%). Pode-se notar que o conteúdo de ascaridol (isômeros *Z* e *E*) totaliza 71,23%.

Estudos referentes à constituição química do extrato hexânico da espécie *C. ambrosioides* não são relatados na literatura, apresentando apenas a composição do óleo essencial da espécie. Em estudos com o óleo essencial da planta, a porcentagem relativa do ascaridol é bastante questionável, em função do país de coleta da espécie. CHOPRA e MUKHERJI, (1932) encontraram ascaridol como componente majoritário (46%) em óleo essencial da *C. ambrosioides* da Índia, enquanto BAUER e SILVA, (1973) apontaram limoneno, seguido de ascaridol como principais compostos no óleo essencial de *C. ambrosioides* do Brasil. PASCUAL *et al.*, (1980) relatam um óleo essencial obtido na Espanha com conteúdo de limoneno inferior ao de ascaridol. LAWRENCE, (1999) destacou diversos estudos demonstrando que o principal composto encontrado em *C. ambrosioides* é o ascaridol, porém ocorrendo irregularidades no que se refere à sua quantificação, o que poderia estar relacionado à variedade botânica em que foi realizado o estudo, encontrando menores teores de ascaridol em *C. ambrosioides* L. var. *ambrosioides* e maiores na *C. ambrosioides* L. var. *anthelminticum*.

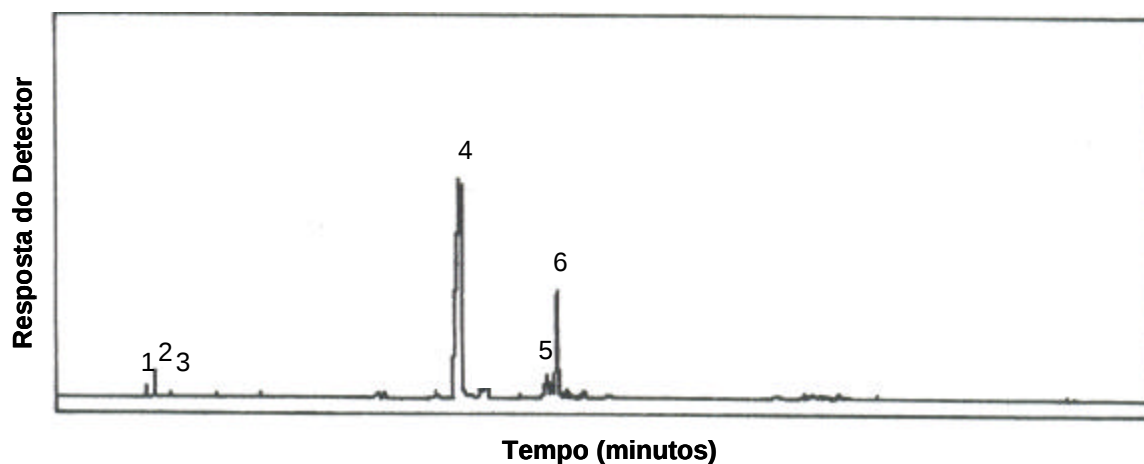


Figura 5: Cromatograma total de íons, representativo, obtido ao analisar o extrato hexânico bruto de *Chenopodium ambrosioides* por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (Shimadzu, QP 5000). Coluna Equity-5 (Supelco), com programação de temperatura inicial de 60 °C (permanência: 1 min), elevação de 3 °C/min até 240 °C (permanência: 9 min); fluxo do gás de arraste (hélio) a 1,33 mL/min; temperatura do injetor, 220 °C; temperatura da interface, 240 °C; modo de ionização, impacto de elétrons (70 eV); faixa de massa (m/z), 40–350.

Tabela 1: Composição do extrato hexânico bruto de *Chenopodium ambrosioides*.

Pico	Índice de Kováts		Composto	Porcentagem relativa
	calculado	literatura *		
1	1019	1018	α -terpineno	11,24
2	1026	1026	<i>p</i> -cimeno	6,05
3	1031	1032	álcool benzílico	0,38
4	1247	1237	(<i>Z</i>)-ascaridol	53,98
5	1287	1298	carvacrol	2,27
6	1305	1301	(<i>E</i>)-ascaridol	17,25
Outros **				8,83

* ADAMS, 1995. ** Compostos que não puderam ser identificados.

Na figura 6 tem-se o cromatograma representativo, obtido por CG/DIC, da fração ativa do extrato hexânico de *C. ambrosioides*, apontando a presença de quatro componentes. A identificação dos compostos é apresentada na tabela 4, sendo estes α -terpineno (0,41%), *p*-cimeno (0,95%), (*Z*)-ascaridol (95,58%) e (*E*)-ascaridol (3,05%).

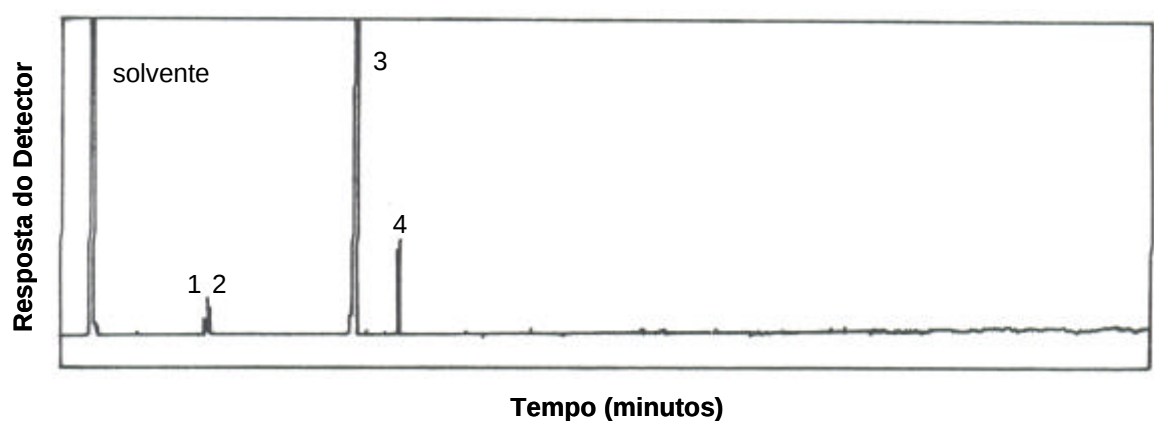


Figura 6: Cromatograma representativo obtido ao analisar a fração ativa do extrato hexânico de *Chenopodium ambrosioides* por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (Shimadzu, CG-17A). Coluna DB-5 (J&W Scientific), com programação de temperatura inicial de 60 °C (permanência: 1 min), elevação de 3 °C/min até 240 °C (permanência: 9 min); fluxo do gás de arraste (nitrogênio) a 1,33 mL/min; temperatura do injetor, 220 °C; temperatura do detector, 240 °C. Sendo 1, 2, 3, e 4 os compostos α -terpineno, *p*-cimeno, (*Z*)-ascaridol e (*E*)-ascaridol, respectivamente.

Tabela 2: Composição da fração ativa do extrato hexânico de *Chenopodium ambrosioides*.

Pico	Índice de Kováts		Composto	Porcentagem relativa
	calculado	literatura *		
1	1019	1018	α -terpineno	0,41
2	1027	1026	<i>p</i> -cimeno	0,95
3	1246	1237	(<i>Z</i>)-ascaridol	95,59
4	1304	1301	(<i>E</i>)-ascaridol	3,05

* ADAMS, 1995.

Analisando a tabela 2 pode-se perceber que a fração ativa é composta majoritariamente pelo ascaridol (isômeros *Z* e *E*), correspondendo a 98,63% da composição total. Frente ao contraste de porcentagem relativa do ascaridol em comparação aos demais compostos (α -terpineno e *p*-cimeno) atribui-se a este componente o potencial antifúngico da fração ativa do extrato hexânico da espécie *C. ambrosioides*.

4. CONCLUSÕES

Ensaio biológicos revelaram elevada atividade antifúngica do extrato hexânico de *C. ambrosioides* até uma concentração de 0,2%, para a maioria dos fungos avaliados. Atribuiu-se ao ascaridol (isômeros *Z* e *E*) o potencial antifúngico do extrato hexânico, sendo portanto um componente com potencial de utilização no controle de fungos de armazenamento.

CAPÍTULO 3

EFEITO DE EXTRATOS DE *Chenopodium ambrosioides* L. NO CONTROLE FÚNGICO EM RAÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A utilização de métodos que prolonguem a qualidade de produtos agrícolas tem sido alvo constante de estudos. Extratos vegetais vêm sendo empregados no controle de muitas espécies de fungos. CRUZ *et al.*, (1998) mostraram que o tratamento de sementes de soja (*Glycine max*) com extrato aquoso de manjerição (*Ocimum basilicum*), lavea (*Laveula officinalis*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e eucalipto (*Corymbia citriodora*), reduziu significativamente a incidência de *Penicillium* sp. e *Aspergillus* sp..

Estudos realizados com *Chenopodium ambrosioides* L., planta da família Chenopodiaceae, originária da América do Sul e amplamente encontrada no Brasil, exibem sua atividade antifúngica (BEGUM *et al.*, 1993; KISHORE *et al.*, 1993; BOURREL, *et al.*, 1995).

Os trabalhos, geralmente, relatam testes *in vitro* da atividade antifúngica, dos diferentes extratos. Ensaio mais apurados, por exemplo, com amostras de ração, não são relatados, sendo fundamentais para potencializar a atividade antifúngica real de *C. ambrosioides* no controle de fungos de armazenamento.

O monitoramento do desenvolvimento fúngico em produtos armazenados pode ser realizado por métodos biológicos, químicos ou imunológicos. Os métodos químicos baseiam-se na quantificação de substâncias constituintes da célula fúngica como a quitina ou o ergosterol, ou ainda substâncias voláteis liberadas no ambiente de armazenamento (NAPOLEÃO, 1997). SEITZ *et al.* (1977, 1979) e BERMINGHAM *et al.* (1995) sugerem a quantificação de ergosterol como uma medida útil de invasão fúngica em sementes e folhas. A determinação do ergosterol pode ser realizada por espectrofotometria ultravioleta e infravermelha, associadas aos métodos cromatográficos como camada delgada, líquida de alto desempenho (SEITZ *et al.*, 1977; REGNER *et al.*, 1994) e gasosa (EVERSCHIED *et al.*, 1988).

Nesse contexto, essa pesquisa retrata o efeito do extrato hexânico e do óleo essencial de *C. ambrosioides* sobre o crescimento fúngico em ração de suínos armazenada, sendo a dosagem fúngica determinada pela quantificação de ergosterol, através de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM), utilizando o modo MSI (Monitoramento Seletivo de Íons). Em paralelo, avaliou-se a estabilidade dos principais compostos do extrato hexânico e do óleo essencial em função de diferentes temperaturas de armazenamento, por 90 dias.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida na Universidade Federal de Viçosa, no Laboratório de Pesquisa em Produtos Naturais, do Departamento de Química, e na Clínica de Doenças de Plantas, do Departamento de Fitopatologia, no ano de 2005.

2.1. Materiais e reagentes

Todos os solventes orgânicos utilizados são de grau P.A., da Quimex, sendo os mesmos destilados previamente. Utilizou-se hidróxido de sódio, micropérolas, grau P.A., da Vetec (98% dosagem mínima). O padrão ergosterol (75%, da Sigma) foi purificado por duas cristalizações em etanol absoluto. Após a cristalização o padrão foi filtrado a vácuo e seco, por 24 horas, sendo obtido um padrão com 89% de ergosterol.

2.1.1. Material vegetal e ração

As partes aéreas da erva-de-santa-maria (*C. ambrosioides*) foram obtidas em Janeiro de 2005, de uma Casa de Vegetação localizada no Departamento de Fitotecnia, na Universidade Federal de Viçosa.

A ração de suínos, constituída principalmente por farelo de milho, foi obtida comercialmente, em estabelecimento de produtos agrícolas, em Viçosa - MG.

2.2. Obtenção do extrato hexânico e do óleo essencial

2.2.1. Extrato hexânico

A um Erlenmeyer de 2,0 L foram adicionados 200 g de partes aéreas frescas de *C. ambrosioides*, trituradas manualmente, e 1,0 L de hexano. Após agitação por quatro horas, a temperatura ambiente, foi procedida uma filtração,

sendo o filtrado seco com sulfato de sódio anidro e concentrado em evaporador rotatório. O procedimento foi repetido três vezes. Do extrato hexânico (6,6 g) obtido, 500 mg foram armazenados a 4 °C, 500 mg armazenados a 25 °C e 4 g destinados ao estudo da quantificação do crescimento fúngico em ração armazenada.

2.2.2. Óleo essencial

O óleo essencial de *C. ambrosioides* foi obtido por hidrodestilação. Em um balão de fundo redondo de 3,0 L foram adicionados 100 g da planta fresca, maceradas manualmente, e 1,5 L de água destilada. Após aquecimento, o hidrolato coletado (1000 mL) foi extraído com diclorometano (duas porções de 300 mL), seco com sulfato de sódio anidro e concentrado em evaporador rotatório. O procedimento foi repetido dez vezes. Do óleo essencial (3 g) obtido, 500 mg foram armazenados a 4 °C, 500 mg armazenados a 25 °C e 2 g destinados ao estudo da quantificação do crescimento fúngico em ração armazenada.

2.3. Análise da estabilidade do extrato hexânico e do óleo essencial

As análises foram realizadas em cromatógrafo a gás (Shimadzu, CG-17A) com detector de ionização em chama (CG/DIC) a 240 °C; auto-injetor (Shimadzu, AOC-17) a 220 °C; coluna capilar de sílica fundida DB-5 (J&W Scientific) (30 m x 0,25 mm di x 0,25 µm filme), com programação de temperatura iniciando a 60 °C (permanência: 1 min), taxa de crescimento de 3 °C/min até 240 °C (permanência: 9 min); fluxo do gás de arraste (nitrogênio) a 1,33 mL/min; modo de injeção split, 1:20; volume injetado, 1 µL.

Imediatamente após a obtenção do extrato hexânico e do óleo essencial, e após o armazenamento, a 4 e 25 °C, por 90 dias, soluções 5 mg/mL foram preparadas, em diclorometano. A cada alíquota foram adicionados 50 µL de uma solução 10 mg/mL, em diclorometano, de um padrão interno C9 (nonano). As amostras foram injetadas em CG/DIC. A adição do padrão interno

proporciona a comparação da área do seu pico com a área de picos de compostos das amostras, evitando erros de diluição e evaporação.

Os compostos foram identificados através do índice de retenção de Kováts (KI). Injetou-se, em CG/DIC, amostra de padrões de hidrocarbonetos saturados (com cadeias de 7 a 25 átomos de carbono) a 10 mg/mL, em diclorometano.

O índice de Kováts é um índice de retenção que descreve o comportamento de retenção do composto de interesse comparativamente ao de uma mistura de hidrocarbonetos saturados de diferentes números de átomos de carbono. Este índice de retenção fornece informação sobre a seqüência de eluição do composto e varia em função da fase estacionária e da temperatura, sendo independente das condições experimentais. O KI calculado para cada composto foi comparado com valores da literatura (ADAMS, 1995), sendo calculado através da equação 1.

$$KI = 100 Z + \frac{100 [(\log t'_R X) - (\log t'_R Z)]}{(\log t'_R Z + 1) - (\log t'_R Z)} \quad \text{(equação 1)}$$

Onde:

X, é o composto de interesse;

Z, é o número de átomos de carbono do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente anterior ao tempo de retenção de X;

$t'_R X$, é o tempo de retenção ajustado de X;

$t'_R Z$, é o tempo de retenção ajustado de Z;

$t'_R Z + 1$, é o tempo de retenção ajustado do hidrocarboneto com tempo de retenção imediatamente posterior ao tempo de retenção de X.

A estabilidade do extrato hexânico e do óleo essencial de *C. ambrosioides* foi avaliada em função da razão de área do padrão interno C9 com a área dos compostos. A área do padrão C9 é constante, uma vez que foi adicionada mesma quantidade em todas as amostras.

2.4. Quantificação do crescimento fúngico na ração armazenada

2.4.1. Preparo e armazenamento da ração

A ração de suínos foi congelada, a - 15 °C por 4 dias, para eliminação dos ácaros.

A partir do teor de umidade inicial da ração (13%) foram estabelecidos os teores a serem analisados, sendo estes 15 e 18%.

Para o armazenamento da ração, duas porções de 650 g foram medidas para cada tratamento a ser avaliado (óleo essencial, extrato hexânico e testemunha), sendo cada porção relativa ao teor de umidade a ser avaliado (15 e 18%).

Extrato hexânico (0,2%) e óleo essencial (0,1%) de *C. ambrosioides* foram adicionados às suas respectivas porções de ração.

Cada porção foi subdividida em alíquotas de 50 g. Estas foram adicionadas em frascos de vidro, vedadas com filme plástico, etiquetadas e armazenadas em incubadora a 25 °C.

Foram realizadas três amostragens (30, 60 e 90 dias após o armazenamento) para cada tratamento e teor de umidade, sendo realizadas em triplicata.

2.4.2. Extração do ergosterol

O ergosterol foi extraído das amostras de ração de acordo com metodologia descrita por SEITZ *et al.* (1977, 1979) e SALMANOWICZ e NYLUND (1988).

Alíquotas de ração (25 g) foram pesadas em frascos de vidro. Foram adicionados 65 mL de metanol, mantendo agitação de 100 rpm, a 50 °C, por 2 minutos. Efetuou-se uma filtração. Ao resíduo foram adicionados 85 mL de metanol e novamente realizado aquecimento a 50 °C, por 2 minutos com agitação de 100 rpm. Após filtração, reuniram-se os dois filtrados e uma saponificação foi realizada. Ao frasco contendo os filtrados, foram adicionados

25 g de hidróxido de sódio e 85 mL de etanol. Uma fervura em banho de água (70-80 °C) foi mantida por 40 minutos, com agitação de 100 rpm. Após esfriar foram acrescentados 165 mL de água destilada e efetuada vigorosa agitação. Em funil de separação, foi realizada extração com hexano, em duas etapas de 85 mL cada. A fase orgânica foi coletada, resíduos de água foram eliminados com sulfato de sódio anidro e o solvente foi evaporado em evaporador rotatório.

2.4.3. Quantificação do ergosterol

A quantificação do ergosterol, nas amostras de ração, foi realizada pelo método de padronização externa em sistema de CG/EM, utilizando o modo MSI (Monitoramento Seletivo de Íons).

As análises foram realizadas em um cromatógrafo a gás, acoplado a um espectrômetro de massas (Shimadzu, modelo QP 5000); biblioteca Wiley 229; equipado com auto-injetor (Shimadzu, AOC-17) a 260 °C; coluna capilar de sílica fundida Equity-5 (Supelco) (30 m x 0,25 mm di x 0,25 µm filme), com programação de temperatura iniciando a 150 °C, taxa de crescimento de 15 °C/min até 280 °C (permanência: 22 minutos). A temperatura da interface entre CG/EM foi de 280 °C. Hélio foi usado como gás de arraste (134,8 kPa, vazão 1,5 mL/min); injeção em modo splitless; injeção de 1 µL de amostra. O espectrômetro de massas, com fonte de íons de impacto de elétrons a 70 eV, foi operado no modo MSI, sendo selecionados para monitoramento os íons de razão massa/carga (m/z) 55, 69 e 143.

Para a construção da curva padrão foram injetadas amostras do padrão ergosterol a 0,99; 2,44; 4,76; 16,67; 33,33; 50,00 e 100,00 ng/µL, correspondentes às razões de split 100, 40, 20, 5, 2, 1 e 0, respectivamente, de uma solução do padrão a 0,1 mg/mL, em diclorometano.

As amostras, obtidas segundo item 2.4.2, foram diluídas em 3 mL de diclorometano, sendo 1 mL transferido para frasco de injeção em CG/EM. Após injeção em CG/EM, o teor de ergosterol foi determinado a partir da curva padrão. Depois de devidas conversões a concentração de ergosterol foi expressa em µg/g de ração.

2.4.4. Análise estatística

Na etapa de quantificação do ergosterol, os dados obtidos foram submetidos à análise de variância e foram ajustadas equações de regressão, com auxílio do Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas (SAEG), versão 5.0 (EUCLYDES, 1983). Após escolha do modelo que melhor representasse a relação entre a concentração de ergosterol nas amostras de ração em função do tempo, o teste F foi aplicado aos coeficientes da equação para detectar significância a 5% de probabilidade. As médias dos fatores foram avaliadas pelo teste de Tukey ao nível de 5%.

Os resultados da inibição do crescimento fúngico na ração armazenada promovida pelo extrato hexânico e pelo óleo essencial de *C. ambrosioides* foram submetidos à análise de variância (teste F) e as médias submetidas a comparação pelo teste de Tukey à 5% de probabilidade.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estabilidade do extrato hexânico e do óleo essencial

A figura 1 apresenta os cromatogramas representativos das amostras de óleo essencial e extrato hexânico de *C. ambrosioides* imediatamente após suas obtenções, com a adição do padrão interno C9.

A escolha do C9 baseou-se na sua estabilidade e no seu tempo de retenção (t_R), uma vez que este não coincide com o t_R de nenhum composto do óleo essencial e do extrato hexânico.

Os compostos do óleo essencial e do extrato hexânico selecionados para análise foram α -terpineno, *p*-cimeno, (*Z*)-ascaridol e (*E*)-ascaridol, em função das suas identificações, em *C. ambrosioides*, em trabalhos anteriores (Capítulos 1 e 2). MUHAYIMANA *et al.*, (1998) relataram os compostos α -terpineno (72,7%), *p*-cimeno (15,3%) e ascaridol (7,2%) no óleo essencial de *C. ambrosioides*.

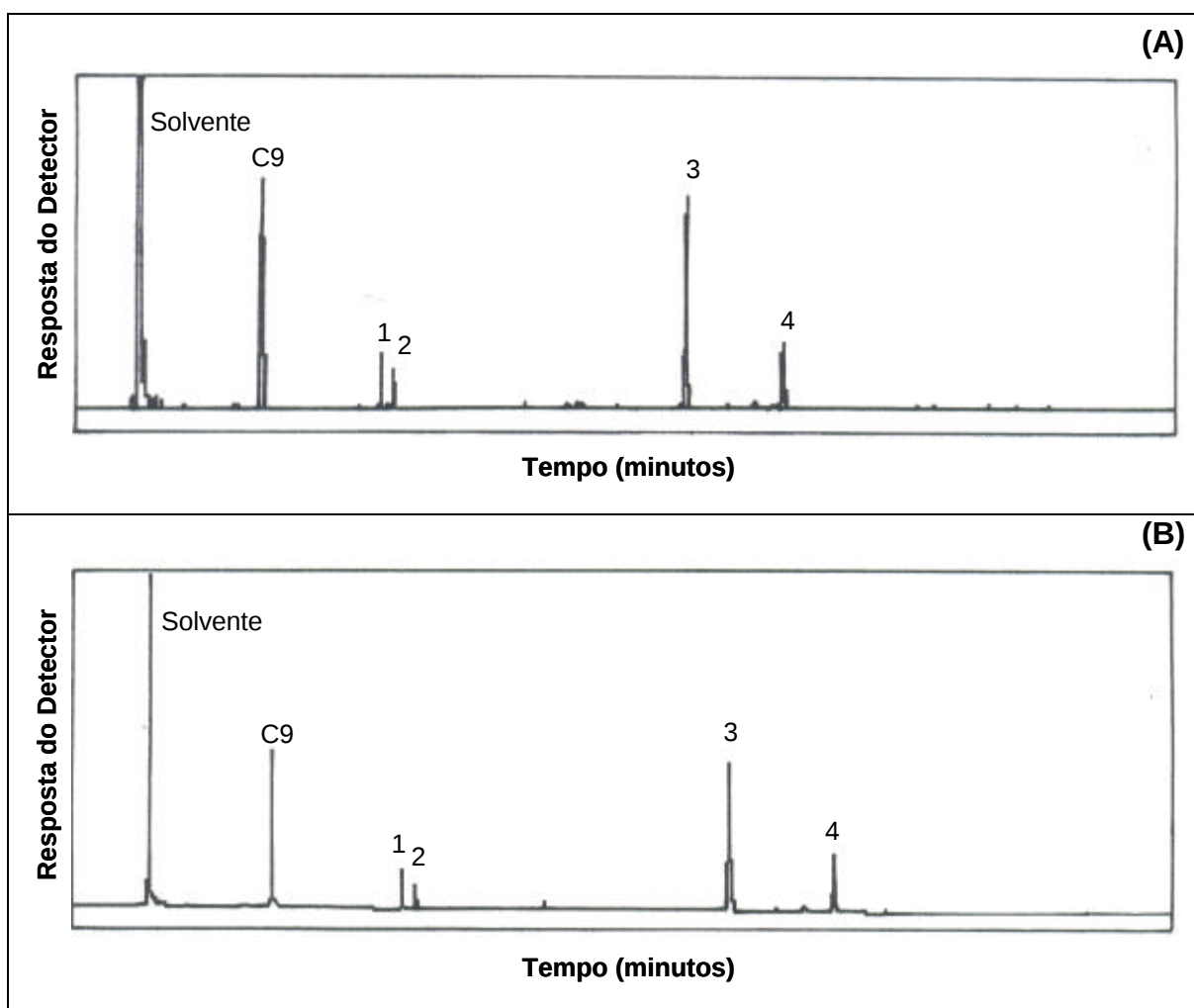


Figura 1: Cromatogramas representativos obtidos ao analisar o óleo essencial **(A)** e o extrato hexânico **(B)** de *Chenopodium ambrosioides*, com adição do padrão interno nonano (C9), por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (Shimadzu, CG-17A), imediatamente após a obtenção dos mesmos. Coluna DB-5 (J&W Scientific), com programação de temperatura inicial de 60 °C (1 min), elevação de 3 °C/min até 240 °C (9 min); fluxo do gás de arraste (N₂) a 1,33 mL/min; temperatura do injetor, 220 °C; temperatura do detector, 240 °C. Sendo 1, 2, 3 e 4 os compostos α -terpineno, *p*-cimeno, (*Z*)-ascaridol e (*E*)-ascaridol, respectivamente.

Os valores da razão de área do padrão interno C9 pela área dos compostos (α -terpineno, *p*-cimeno, (*Z*)-ascaridol e (*E*)-ascaridol) nas amostras de óleo essencial e extrato hexânico imediatamente após suas obtenções e após armazenamento, a 4 e 25 °C, por 90 dias, são apresentados na tabela 1.

A figura 2A expõe o gráfico da razão de área do padrão interno C9 pela área do composto α -terpineno. Sendo a área do padrão interno C9 constante,

um aumento no valor da razão de área implica em decomposição do α -terpineno. Para o extrato hexânico foi verificado aumento na razão de área, indicando decomposição do composto. Os prejuízos foram maiores quando o extrato foi armazenado a 25 °C. No caso do óleo essencial, o composto α -terpineno não foi detectado nas amostras submetidas ao armazenamento, o que indica ter ocorrido decomposição total do composto. JOHNSON e CROTEAU, (1984) sugerem que α -terpineno pode ser precursor do ascaridol.

As figuras 2B e 2D apresentam os gráficos da razão de área do padrão interno C9 pela área dos compostos *p*-cimeno e (*E*)-ascaridol, respectivamente. Tanto para as amostras do óleo essencial, quanto para as do extrato hexânico armazenadas, verificou-se aumento significativo na razão de área, relatando decomposição dos compostos. As degradações foram inferiores para as amostras estocadas a 4 °C.

No caso do (*Z*)-ascaridol, figura 2C, as amostras de óleo essencial não exibiram grandes diferenças na razão de área para as temperaturas avaliadas, não havendo alteração na constituição do composto nas amostras. Nas amostras de extrato hexânico armazenadas a razão aumentou, relatando decomposição do composto. Além disso, a amostra armazenada a 4 °C apresentou menor decomposição.

Tabela 1: Razão de área do padrão interno C9 (nonano) pela área dos compostos (α -terpineno, *p*-cimeno, (*Z*)-ascaridol e (*E*)-ascaridol) nas amostras de óleo essencial e extrato hexânico de *Chenopodium ambrosioides*, no tempo inicial e após o armazenamento, a 4 e 25 °C, por 90 dias.

Amostras	Área C9			
	Área composto			
	α -terpineno	<i>p</i> -cimeno	(<i>Z</i>)-ascaridol	(<i>E</i>)-ascaridol
Óleo inicial	9,29	2,57	0,25	0,59
Óleo a 4 °C, 90 dias	- *	4,45	0,27	0,75
Óleo a 25 °C, 90 dias	- *	7,07	0,27	1,88
Extrato inicial	1,57	2,50	0,23	0,97
Extrato a 4 °C, 90 dias	2,01	3,38	0,33	1,46
Extrato a 25 °C, 90 dias	2,27	3,91	0,47	2,91

* O composto α -terpineno não foi detectado nas amostras de óleo essencial armazenadas a 4 e 25 °C.

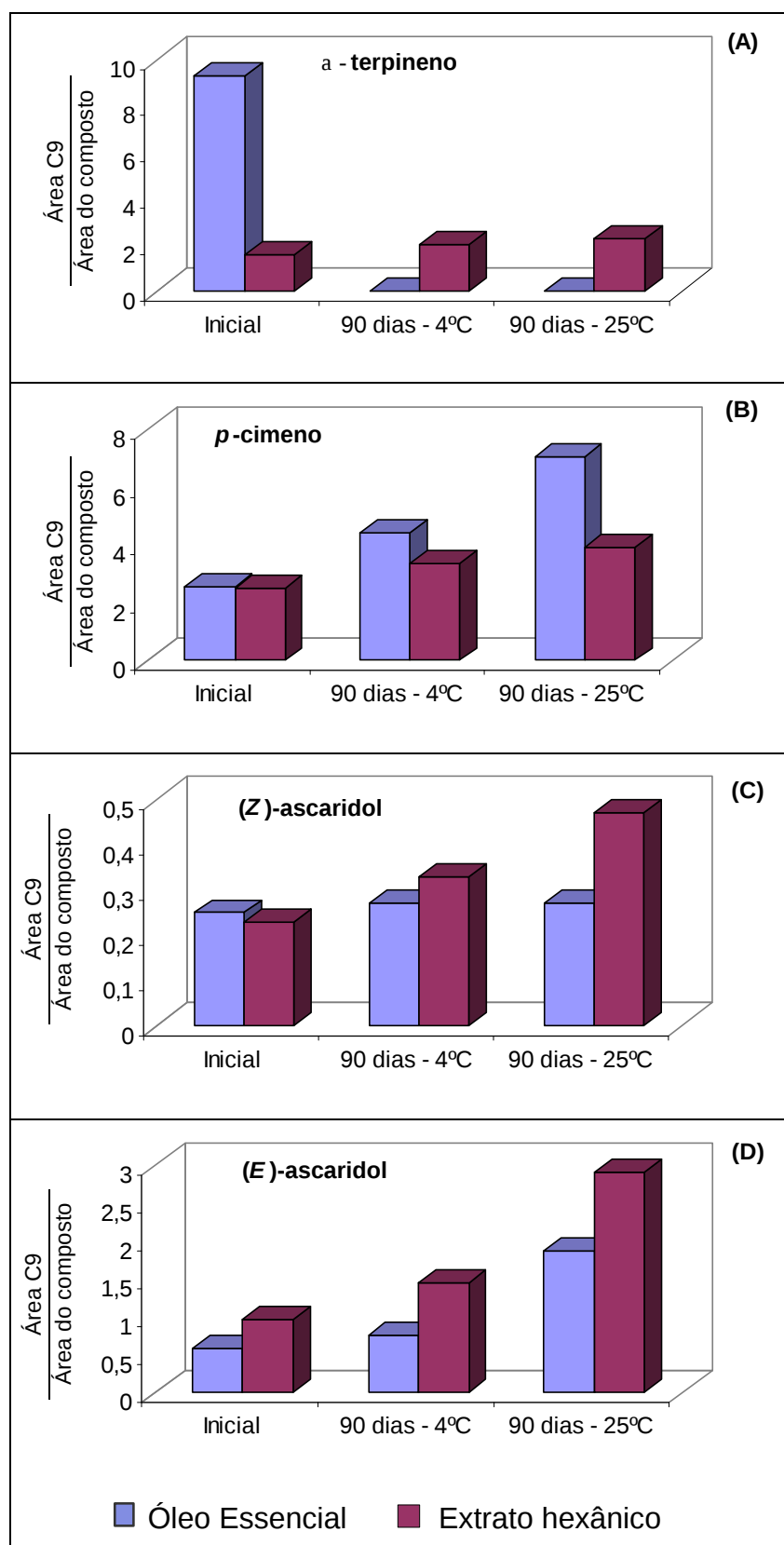


Figura 2: Razão de área do padrão C9 pela área do α -terpineno **(A)**, *p*-cimeno **(B)**, (Z)-ascaridol **(C)** e (E)-ascaridol **(D)**, nas amostras de óleo essencial e extrato hexânico de *Chenopodium ambrosioides*, no tempo inicial e após o armazenamento a 4 e 25 °C, por 90 dias.

3.2. Quantificação do crescimento fúngico na ração armazenada

Na figura 3A é apresentado o cromatograma parcial do padrão de ergosterol (89%), obtido por análise em CG/EM. Já na figura 3B tem-se o espectro de massas parcial do respectivo composto. Os dados referentes ao espectro de massas foram: m/z (intensidade relativa) 396 [M^+] (4), 363 (11), 253 (9), 157 (22), 143 (32), 81 (35), 69 (100), 55 (91), 43 (58) e 41 (55).

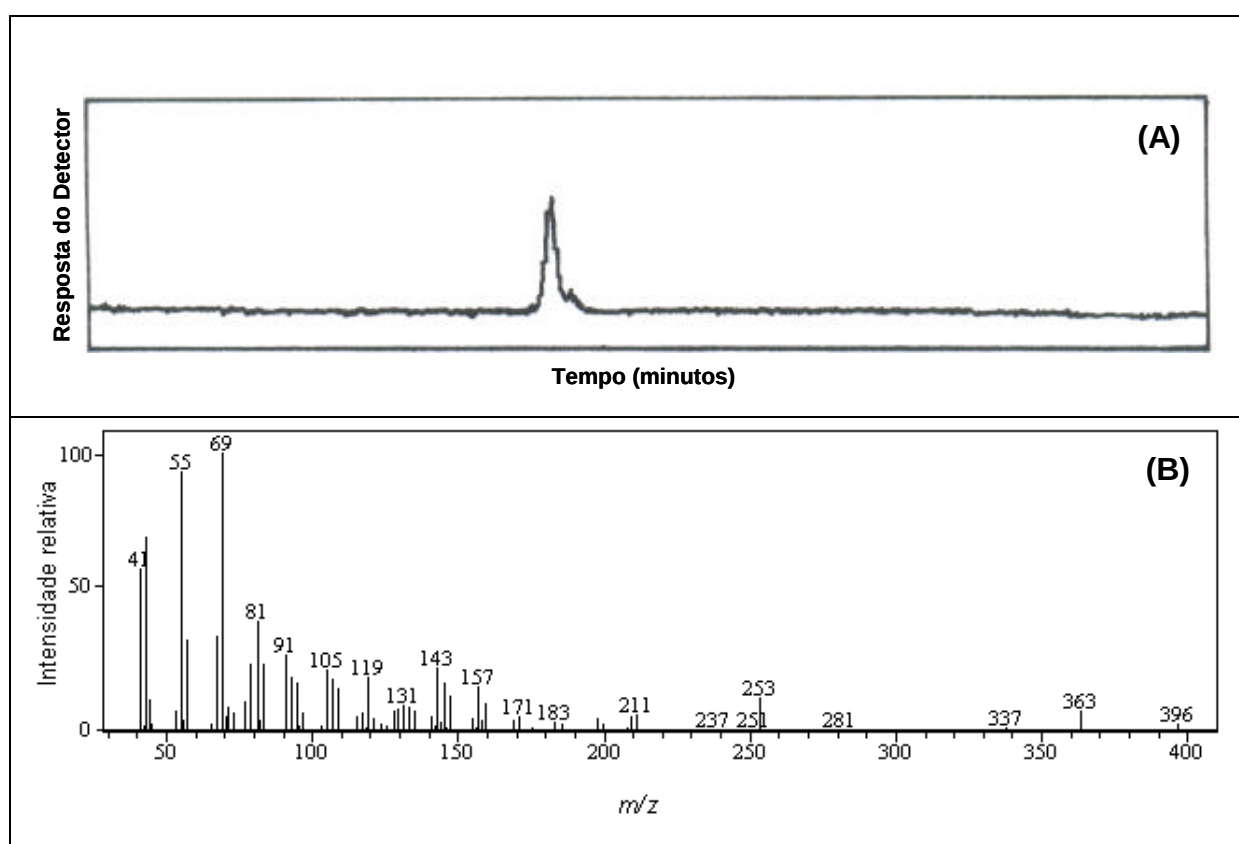


Figura 3: Cromatograma total de íons representativo **(A)** e espectro de massas parcial **(B)** do padrão ergosterol (89%), obtidos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (Shimadzu, QP 5000), operado no modo scan. Coluna Equity-5 (Supelco), com programação de temperatura inicial de 150 °C, elevação de 15 °C/min até 280 °C (permanência: 22 min); fluxo do gás de arraste (hélio) a 1,5 mL/min; temperatura do injetor, 260 °C; temperatura da interface, 280 °C; modo de ionização, impacto de elétrons (70 eV) e faixa de massa (m/z), 40–400.

Para a quantificação de ergosterol nas amostras de ração, fez-se necessário construir uma curva padrão, que é apresentada na figura 4. Pode-se perceber que a resposta do detector foi linear para as concentrações de ergosterol analisadas, podendo ser expressa pela equação 2.

$$Y = (6,144 \times 10^{-5}) X - 0,145 \quad \text{Equação 2}$$
$$R^2 = 0,9992$$

Onde:

X, é a área de ergosterol (número total de íons);

Y, é a concentração de ergosterol em ng/μL;

R^2 , é o coeficiente de correlação.

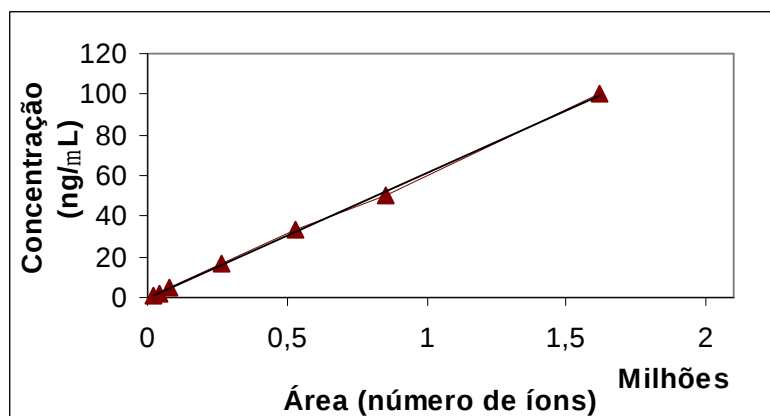


Figura 4: Curva padrão de ergosterol (89%), obtida por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (Shimadzu, QP 5000). Coluna Equity-5 (Supelco), com programação de temperatura inicial de 150 °C, elevação de 15 °C/min até 280 °C (permanência: 22 min); fluxo do gás de arraste (hélio) a 1,5 mL/min; temperatura do injetor, 260 °C; temperatura da interface, 280 °C. O espectrômetro de massas, com fonte de íons de impacto de elétrons a 70 eV, foi operado no modo MSI (Monitoramento Seletivo de Íons), sendo selecionados para monitoramento os íons m/z 55, 69 e 143. Os pontos da curva são referentes a injeções do padrão a 0,99; 2,44; 4,76; 16,67; 33,33; 50,00 e 100,00 ng/μL, em diclorometano.

A ração, antes do armazenamento, apresentou teor de umidade 13% e concentração média de ergosterol equivalente a 0,0530 μg/g de ração. Desta

forma, a ração estava naturalmente contaminada, sendo desnecessária a adição de fungos, para avaliar o efeito do extrato hexânico e do óleo essencial de *C. ambrosioides* no crescimento fúngico na ração.

Vale ressaltar que estudo da quantificação de ergosterol em ração não é retratado na literatura, não havendo, desta forma, valores de referência.

A ração de suínos analisada é composta basicamente por farelo de milho. Em amostras de grãos de milho não contaminados são encontradas concentrações de ergosterol inferiores a 3 µg/g (SEITZ e POMERANZ, 1983). MORAES *et al.*, (2003) relataram níveis de ergosterol, por cromatografia líquida de alto desempenho, de 40 amostras de milho, naturalmente contaminadas, variando entre 1,11 a 32,62 µg/g, apresentado média superior a 5,5 µg/g.

Tabela 2: Quantificação de ergosterol nas amostras de ração sem tratamento e com tratamento (óleo essencial, 0,1% e extrato hexânico, 0,2% de *Chenopodium ambrosioides*), armazenadas por 30, 60 e 90 dias, com teores de umidade 15 e 18%.

Tratamento	Concentração média de ergosterol *					
	(mg/g de ração)					
	Dias de armazenamento / Teor de Umidade					
	30 dias		60 dias		90 dias	
	15%	18%	15%	18%	15%	18%
Sem tratamento	0,3619	0,4638	1,5073	2,2004	7,9231	14,4396
(Testemunha)	** Aa	Aa	Ab	Aa	Ab	Aa
Extrato hexânico	0,0440	0,4473	0,1717	1,2751	0,6481	2,3762
(0,2%)	Aa	Aa	Bb	Ba	Bb	Ca
Óleo essencial	0,0339	0,1160	0,0596	1,7661	0,3524	5,6117
(0,1%)	Aa	Aa	Bb	ABa	Bb	Ba

* Média de três repetições. ** As médias seguidas pela mesma letra maiúscula na mesma coluna ou minúscula na mesma linha e mesmo período de tempo não diferem, entre si, pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade.

A tabela 2 apresenta os níveis médios de ergosterol, obtidos por CG/EM, utilizando o modo MSI, das amostras de ração armazenadas. As amostras sem tratamento (testemunha) apresentaram concentrações de ergosterol variando de 0,3619 a 14,4396 µg/g de ração. As amostras de ração tratadas com óleo essencial (0,1%) apresentaram concentrações de ergosterol variando de 0,0339 a 5,6117 µg/g de ração. As amostras tratadas com extrato hexânico (2,0%) apresentaram níveis de ergosterol de 0,0440 a 2,3762 µg/g de ração. Nos três tratamentos as concentrações mais elevadas foram detectadas nas amostras armazenadas por 90 dias, com teor de umidade 18%.

Vale ressaltar que o crescimento fúngico pode acontecer de forma não uniforme, ou seja, determinadas partes de ração poderiam conter maior contaminação que outras, resultando em diferenças no nível de ergosterol, mesmo em amostras com mesmo tratamento.

Uma análise estatística dos dados revelou, pelo teste F, que existe significância, ao nível de 5%, entre os fatores: concentração de ergosterol, teor de umidade da ração e tempo de armazenamento. As médias das concentrações de ergosterol (tabela 2) apontam que para as amostras tratadas com óleo essencial, extrato hexânico ou sem tratamento, armazenadas por 30 dias, com teores de umidades 15 e 18%, não houve diferença significativa, com base no teste de médias de Tukey a 5%. Para os tempos de armazenamento 60 e 90 dias aconteceu diferença significativa, ao nível de 5%, nas concentrações médias de ergosterol entre as amostras de ração sem tratamento e as amostras com tratamento (óleo essencial ou extrato hexânico). Para as amostras tratadas com óleo essencial e com extrato hexânico, com teor de umidade 15%, não houve diferença significativa nas concentrações de ergosterol.

A tabela 3 apresenta as equações ajustadas para cálculo da concentração de ergosterol em função do tempo de armazenamento da ração, para as amostras sem tratamento (testemunha), e tratadas com óleo essencial (0,1%) e extrato hexânico (0,2%), nos teores de umidade 15 e 18%.

Tabela 3: Equações ajustadas para cálculo da concentração de ergosterol em função do tempo para as amostras de ração, com teores de umidade 15 e 18%, sem tratamento e com tratamento de óleo essencial (0,1%) e extrato hexânico (0,2%) de *Chenopodium ambrosioides*.

Umidade	Ração	Equações Ajustadas	r^2
15%	Sem tratamento	$C = 0,292809 \times 10^{-2} T^2 - 0,225351 \times 10^0 T + 0,448719 \times 10^1$	0,9939
15%	Extrato hexânico	$C = 0,193758 \times 10^{-3} T^2 - 0,131835 \times 10^{-1} T + 0,265169 \times 10^0$	0,9849
15%	Óleo essencial	$C = 0,148398 \times 10^{-3} T^2 - 0,124994 \times 10^{-1} T + 0,275281 \times 10^0$	0,9611
18%	Sem tratamento	$C = 0,583471 \times 10^{-2} T^2 - 0,467236 \times 10^0 T + 0,922966 \times 10^1$	0,9998
18%	Extrato hexânico	$C = 0,151893 \times 10^{-3} T^2 + 0,139201 \times 10^{-1} T - 0,106966 \times 10^0$	0,9945
18%	Óleo essencial	$C = 0,121973 \times 10^{-2} T^2 - 0,547715 \times 10^{-1} T + 0,661348 \times 10^0$	0,9665

Onde: r^2 é o coeficiente de correlação. C é a concentração de ergosterol, em $\mu\text{g/g}$ de ração. T é o tempo de armazenamento.

De uma forma geral, as concentrações de ergosterol nas amostras de ração que foram submetidas a tratamento, com extrato hexânico e óleo essencial, foram inferiores às encontradas nas amostras sem tratamento. Desta forma, o extrato hexânico e o óleo essencial de *C. ambrosioides* tiveram influência no crescimento fúngico na ração armazenada.

A figura 5A apresenta um gráfico da porcentagem de inibição do extrato hexânico, a 0,2%, sobre o crescimento fúngico na ração armazenada. Nota-se que a atividade do extrato é mais expressiva no teor de umidade 15%, com inibição superior a 85%. Para a umidade 18% foi observado um aumento na inibição no decorrer do armazenamento, sendo notada inibição de 42,05% com 60 dias e 83,54% com 90 dias.

No gráfico da figura 5B, referente à inibição do crescimento fúngico promovida pelo óleo essencial, a 0,1%, nota-se atividade superior a 95% para o teor de umidade 15%. No teor de umidade 18% tem-se atividade de 75,00 e 61,14%, para 30 e 90 dias de armazenamento, respectivamente.

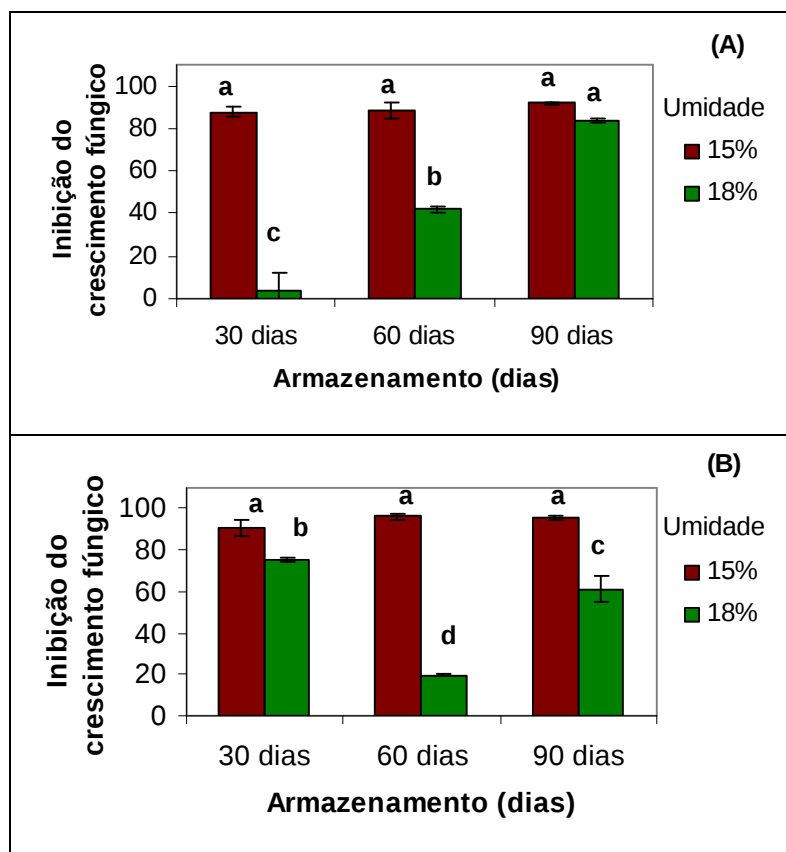


Figura 5: Inibição do crescimento fúngico na ração armazenada promovida pelo extrato hexânico (0,2%) **(A)** e pelo óleo essencial (0,1%) **(B)** de *Chenopodium ambrosioides*. As barras (I) indicam desvio padrão. As barras seguidas pelas mesmas letras não diferem entre si pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Frente aos resultados apresentados pode-se relatar o potencial antifúngico de extratos de *C. ambrosioides* em amostras de ração armazenadas.

4. CONCLUSÕES

Análises apontaram decomposição de α -terpineno, *p*-cimeno, (*Z*)-ascaridol e (*E*)-ascaridol nas amostras de óleo essencial e extrato hexânico de *C. ambrosioides* armazenadas. As decomposições foram inferiores para as amostras estocadas a 4 °C.

A pesquisa relatou o potencial antifúngico de extratos de *C. ambrosioides* em amostras de ração armazenadas. Verificou-se que CG/EM, utilizando o modo MSI, é uma técnica promissora para a quantificação de ergosterol, como indicador do crescimento fúngico em produtos armazenados.

Estudos aprimorados, a fim de verificar a toxicidade de extratos de *C. ambrosioides*, são necessários para que estas amostras tornem uma alternativa segura ao controle de fungos de armazenamento. Além disso, condições adequadas de armazenamento das amostras precisam ser estabelecidas, para que as decomposições sejam minimizadas.

CONCLUSÕES GERAIS

Análises cromatográficas, aliadas ao índice de retenção de Kováts, possibilitaram a caracterização química do óleo essencial e do extrato hexânico de partes aéreas de *Chenopodium ambrosioides*, coletadas no Brasil. As amostras são constituídas principalmente de monoterpenos, sendo o (Z)-ascaridol o principal composto identificado.

Ensaio biológicos, *in vitro*, apontaram uma relevante atividade antifúngica do extrato hexânico e do óleo essencial de *C. ambrosioides*, sobre fungos de armazenamento.

Pela quantificação de ergosterol, principal esteróide constituinte da membrana celular fúngica, em amostras de ração de suínos armazenadas, tratadas com extratos de *C. ambrosioides*, foi possível caracterizar o potencial de *C. ambrosioides* no controle da contaminação fúngica em produtos armazenados.

A avaliação da estabilidade do extrato hexânico e do óleo essencial apontou decomposição dos compostos α -terpineno, *p*-cimeno, ascaridol (isômeros *Z* e *E*) nas amostras, após armazenamento por 90 dias. As decomposições foram inferiores para as amostras estocadas a 4 °C.

Após fracionamento dos extratos, bioensaios apontaram o potencial antifúngico dos compostos α -terpineno, *p*-cimeno e ascaridol (isômeros *Z* e *E*).

Estudos aprimorados, da avaliação da toxicidade dos extratos, são necessários, para que eles possam ser utilizados, seguramente, no controle de fungos de armazenamento. Tornando, desta forma, compostos viáveis à substituição dos agroquímicos nocivos, atualmente empregados. Deve-se, ainda estabelecer condições adequadas de armazenamento das amostras, para que as decomposições sejam minimizadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R.P. (1995) **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy**. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL, USA, 469p.

ANSARI, A.A.; SHRIVASTAVA, A.K. (1991) The effect of eucalyptus oil in growth and aflatoxin production by *A. flavus*. **Letters in Applied Microbiology**, 13, p.75-77.

ARISPURO, I.V. (1994) **Aislamiento e identificación de componentes del residuo no volátil del aceite esencial de naranja: Actividades biológicas y antioxidantes**. Tesis de Doctorado. Univ. Politécnica de Valencia, *España*.

ARISPURO, I.V.; BERNAL, S.A.; TELLEZ, M.A.M.; NIEBLAS, M.O. (1997) Effect of plant extracts on the growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. **Revista Mexicana de Fitopatología**, v.15, n.2, p.91-95.

ARRUS, K.; BLANK, G.; ABRAMSON, D.; CLEARC, R.; HOLLEY, R.A. (2005) Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* in Brazil nuts. **Journal of Stored Products Research**, 41, p.513-527.

BAILEY, J.A.; JEGER, M.J. (1992) **Colletotrichum: Biology, Pathology and Control**. Edited for the British Society for Plant Pathology, 388p.

BAÑOS, S.B.; LÓPEZ, M.H.; MOLINA, E.B.; WILSON, C.L. (2003) Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. **Crop Protection**, 22, p.1087-1092.

BANWART, G.J. (1981) **Basic Food Microbiology**. Westport, CT: The AVI Publishing Company, Inc., p.51-62.

BAUER, L.; SILVA, G.A.A.B. (1973) Essential oil of *Chenopodium ambrosioides* and *Schinus terebinthifolius* from Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmácia**, 54, p.240-242.

BEGUM, J.; YUSUF, M.; CHOWDHURY, J.U.; WAHAB, M.A. (1993) Studies on essential oils for their anti-bacterial and anti-fungal properties. Part 1. Preliminary screening of 35 essential oils. **Bangladesh Journal of Scientific and Industrial Research**, 28, p.25-34.

BERMINGHAM, S.; MALBY, L.; COOKE, R.C.A. (1995) A critical assessment of the vality of ergosterol as an indicator of fungal biomass. **Mycology Research**, v.99, n.4, p.479-484.

BOITEAU, P. (1986) **Médecine Traditionnelle et Pharmacopée: Précis de Matière Médicale Malgache**. Agence de Coopération Culturelle et Technique: Paris.

BORGES, A.A.; PÉREZ, A.B.; FALCÓN, M.F. (2004) Induced resistance to fusarial wilt of banana by menadione sodium bisulphite treatments. **Crop Protection**, 23, p.1245-1247.

BOURREL, C.; VILAREM, G.; MICHEL, G.; GASET, A. (1995) Etude des propriétés bactériostatiques et fongistatiques en milieu solide de 24 huiles essentielles préalablement analysées. **Rivista Italiana EPPOS**, 16, p.3-12.

CABANIS, Y.; CHABOUIIS, L.; CHABOUIIS, F. (1970) **Végétaux et Groupements Végétaux de Madagascar et des Mascareignes, Vol. 2**. Bureau pour le Développement de la Production Agricole (BDPA): Tananarive.

CASTANEDA, G.R.; TELLEZ, M.A.M.; COHEN, S.V.; MANILLA, G.A.; ARISPURO, I.C.V.; SANZ, P.M.; YUFERA, E.P. (2001) In vitro inhibition of mycelial growth of *Tilletia indica* by extracts of native plants from Sonora, Mexico. **Revista Mexicana de Fitopatologia**, v.19, n.2, p.214-217.

CASTELLANOS, P.P.A.; BISHOP, C.D.; VILLALOBOS, M.J.P. (2001) Antifungal activity of the essential oil of flowerheads of garland chrysanthemum (*Chrysanthemum coronarium*) against agricultural pathogens. **Phytochemistry**, 57, p.99-102.

CAVALLI, J.F.; TOMI, F.; BERNARDINI, A.F.; CASANOVA, J. (2004) Combined analysis of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* by GC, GC-MS and ¹³C-RMN spectroscopy: quantitative determination of ascaridole, a heat-sensitive compound. **Phytochemical Analysis**, 15, p.275-279.

CHAUDHARY, R.K.; RAO, G.P.; PANDEY, A.K. (1995) Fungitoxicity of some essential oils against sugarcane pathogens. **Journal of Living World**, v.2, n.2, p.30-37.

CHILLET, M.; LAPEYRE, L.B.; DOREL, M.; JOAS, J.; DUBOIS, C.; MARCHAL, J.; PERRIER, X. (2000) Evidence for the variation in susceptibility of bananas to wound anthracnose due to *Colletotrichum musae* and the influence of edaphic conditions. **Scientia Horticulturae**, 86, p.33-47.

CHOPRA, R.N.; MUKHERJI, B. (1932) Indian *Chenopodium*. **Indian Medical Gazette**, 67, p.5-6.

CHRISTENSEN, C.M.; MERONUCK, R.A. (1986) **Quality Maintenance in Stored Grains and Seeds**. University of MN Press, 150p.

CORREA, M.P. (1984) **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v.4.

CRUZ, M.E.S.; BATISTA, M.A.; INOVE, N.H. (1998) Eficácia das plantas medicinais *Ocimum basilicum*, *Lavanda officinalis*, *Cymbopogon citratus* e *Eucalyptus citriodora* no controle de fungos de sementes. In: **Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 15. São Paulo.

DE, M.; DE, A.K.; BANERJEE, A.B. (1999) Antimicrobial screening of some Indian spices. **Phytotherapy Reserach**, v.13, p.616-618.

DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. (1995) **Basic Methods in Plant Pathology**. CRC press, Boca Raton, Florida, 458p.

DIENER, U.L.; COLE, R.J.; SANDERS, T.H.; PAYNE, G.A.; LEE, L.S.; KLICH, M.A. (1987) Epidemiology of aflatoxin formation by *Aspergillus flavus*. **Annual Review of Phytopathology**, 25, p.249-270.

DORNER, J.W.; COLE, R.J. (2002) Effect of application of nontoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on subsequent aflatoxin contamination of peanuts in storage. **Journal of Stored Products Research**, 38, p.329-339.

DUCK, S.O. (1990) **Natural Pesticide from Plants**. In advances in new crops. JANICK, J.; SIMON, J. E. (Eds.), Timber Press, Portland, OR.

EDWARDS, S.G. (2004) Influence of agricultural practices on *Fusarium* infection of cereals and subsequent contamination of grain by trichothecene mycotoxins. **Toxicology Letters**, 153, p.29-35.

EUCLYDES, R.F. (1983) **Manual de Utilização do Programa SAEG (Sistema para Análises Estatísticas e Genéticas)**. Viçosa, MG, UFV, 59p.

EVERSCHED, R.P.; SPOONER, N.; PRESCOTT, M.C.; GOAD, L.J. (1988) Isolation and characterisation of intact steryl ferulates from seeds. **Journal of Chromatography**, v.440, p.23-35.

FERHOUT, H.; BOHATIER, J.; GUILLOT, J.; CHALCHAT, J.C. (1999) Antifungal activity of selected essential oils, cinnamaldehyde and carvacrol against *Malassezia furfur* and *Candida albicans*. **Journal of Essential Oil Research**, v.11, p.119-129.

GUPTA, D.; CHARLES, R.; MEHTA, V.K.; GARG, S.N.; KUMAR, S. (2002) Chemical examination of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. from the southern hills of India. **Journal of Essential Oil Research**, v.14, n.2, p.93-94.

HMAMOUCI, M.; LAHLOU, M.; AGOUMI, A. (2000) Molluscicidal activity of some Moroccan medicinal plants. **Fitoterapia**, 71, p.308-314.

JAY, M.J. (1996) **Modern Food Microbiology: Mycotoxins**. 5 ed., New York, Chapman and Hall, p.595-611.

JHAM, G.N.; DHINGRA, O.D.; JARDIM, C.M.; VALENTE, V.M.M. (2005) Identification of major fungitoxic component of cinnamon bark oil. **Fitopatologia Brasileira**, v.30, n.4, p.404-408.

JOHNSON, M.; CROTEAU, R. (1984) Biosynthesis of ascaridol. Iodide peroxidase catalysed synthesis of a monoterpene endoperoxide of *Chenopodium ambrosioides* fruit. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 51, p.254-256.

KISHORE, N.; CHANSOURIA, J.P.N.; DUBEY, N.K. (1996) Antidermatophytic action of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* and an ointment prepared from it. **Phytotherapy Research**, 10, p.453-455.

KISHORE, N.; DUBEY, N.K. (2002) Fungitoxic potency of some essential oils in management of damping-off diseases in soil infested with *Pythium aphanidermatum* and *P. debaryanum*. **Indian Journal of Forestry**, v.25, n.3/4, p.463-468.

KISMANN, K.G. (1991) **Plantas Infestantes e Nocivas**. São Paulo: BASF Brasileira, 608p.

KURTZMAN, C.P.; HORN, B.W.; HESSELTINE, C.W. (1987) *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. **Antonie Van Leeuwenhoek**, 53, p.147-158.

LALL, N.; MEYER, J.J.M. (1999) In vitro inhibition of drug-resistant and drug-sensitive strains of *Mycobacterium tuberculosis* by ethnobotanically select South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 66, p.347-354.

LAWRENCE, B.M. (1999) Progress in essential oils. **Perfumer and Flavorist**, v.24, n.6, p.45-53.

MILLER, J.D. (1995) Fungi and mycotoxins in grain: implications for stored product research. **Journal of Stored Products Research**, 31, 1, p.1-16.

MISHRA, A.; DUBEY, N.K.; SINGH, S.; CHATURVEDI, C.M. (2002) Biological activities of essential oil of *Chenopodium ambrosioides* against storage pests and its effect on puberty attainment in Japanese quail. **National Academy Science Letters**, v.25, n.5/6, p.174-177.

MORAES, R.J.Q.; ALMEIDA, C.A.A.; DILKIN, P.; KOWALSKI, C.H.; MÜRMANN, L.; MALLMANN, C.A. (2003) Dosagem de ergosterol como indicador de contaminação fúngica em milho armazenado. **Arquivos do Instituto Biológico (São Paulo)**, v.70, n.4, p.483-489.

MUHAYIMANA, A.; CHALCHAT, J.C.; GARRY, R.P. (1998) Chemical composition of essential oils of *Chenopodium ambrosioides* L. from Rwanda. **Journal of Essential Oil Research**, v.10, n.6, p.690-692.

NAPOLEÃO, I.T.O. (1997) **Associação de *Aspergillus* spp. com soja (*Glycine max* (L.) Merr.) armazenada e qualidade de óleo**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa, 50p.

NOUMI, E.; YOMI, A. (2001) Medicinal plants used for intestinal diseases in Mbalmayo Region, Central Province, Cameroon. **Fitoterapia**, 72, p.246-254.

OKUYAMA, E.; UMEYAMA, K.; SAITO, Y.; YAMAZAKI, M.; SATAKE, M. (1993) Ascaridole as a pharmacologically active principle of 'Paico', a medicinal Peruvian plant. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, 41, p.1309-1311.

OLAJIDE, O.A.; AWE, S.O.; MAKINDE, J.M. (1997) Pharmacological screening of the methanolic extract of *Chenopodium ambrosioides*. **Fitoterapia**, 68, p.529-532.

ONOCHA, P.A.; EKUNDAYO, O.; ERAMO, T.; LAAKSO, I. (1999) Essential oil constituents of *Chenopodium ambrosioides* L. leaves from Nigeria. **Journal of Essential Oil Research**, v.11, n.2, p.220-222.

PARDO, E.; MARIN, S.; SANCHIS, V.; RAMOS, A.J. (2005) Impact of relative humidity and temperature on visible fungal growth and OTA production of ochratoxigenic *Aspergillus ochraceus* isolates on grapes. **Food Microbiology**, 22, p.383-389.

PASCUAL, J.T.; BELLIDO, I.S.; TORRES, C.; PEREZ, M.A. (1980) Essential oil from *Chenopodium ambrosioides*. **Rivista Italiana EPPOS**, 62, p.123-125.

PICMAN, A.K.; SCHNEIDER, E.F.; GERSHENZON, J. (1992) Antifungal activities of sunflowers terpenoids. **Biochemical Systematics and Ecology**, 18, p.325-328.

PINO, J.A.; MARBOT, R.; REAL, I.M. (2003) Essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. from Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, v.15, n.3, p.213-214.

POLLACK, Y.; SEGAL, R.; GOLENSER, J. (1990) The effect of ascaridole on the in vitro development of *Plasmodium falciparum*. **Parasitology Research**, 76, p.570-572.

PRADEEP, A.G.; LOKESH, S.; RAI, V.R. (2003) Efficacy of some essential oils on seed mycoflora and seedling quality of some crop species saved by farmers. **Adv. Pl. Sci.**, v.16, p.53-58.

QUARLES, W. (1992) Botanical pesticides from *Chenopodium*. **The IPM Practitioner**, 14, p.1-11.

REGNER, S.; SCHNÜRER, J.; JONSSON, A. (1994) Ergosterol content in relation to grain kernel weight. **Cereal Chemistry**, v.71, n.1, p.55-58.

SALMANOWICZ, B.; NYLUND, J.E. (1988) High performance liquid chromatography determination of ergosterol as a measure of ectomycorrhiza

infection in Scots pine. **European Journal of Forest Pathology**, v.18, n.5, p.291-298.

SCHER, J.M.; SPEAKMAN, J.B.; ZAPP, J.; BECKER, H. (2004) Bioactivity guided isolation of antifungal compounds from the liverwort *Bazzania trilobata* (L.) S. F. Gray. **Phytochemistry**, 65, p.2583-2588.

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

SEITZ, L.M.; MOHR, H.E.; BURROUGHS, R.; SAUER, D.B. (1977) Ergosterol as an indicator of fungal invasion in grains. **Cereal Chemistry**, v.54, p.1207-1217.

SEITZ, L.M.; POMERANZ, Y. (1983) Ergosterol, Ergosta-4,6,8(14),22-tetraen-3-one, ERG Peroxide, and chitin in ergoty barley, rye, and other grasses. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.31, n.5, p.1036-1038.

SEITZ, L.M.; SAUER, D.B.; BURROUGHS, R.; MOHR, H.E.; HUBBARD, J.D. (1979) Ergosterol as a measure of fungal growth. **Phytopathology**, v.69, p.1202-1203.

SINHA, K.K.; SINHA, A.K. (1991) Effect of *Sitophilus oryzae* infestation on *Aspergillus flavus* infection and aflatoxin contamination in stored wheat. **Journal of Stored Products Research**, v.27, n.1, p.65-68.

SINHA, K.K.; SINHA, K.; PASAD, G. (1993) The effect of clove and cinnamon oil on growth of aflatoxin production by *A. flavus*. **Letters in Applied Microbiology**, 16, p.114-117.

SOLIMAN, K.M.; BADEAA, R.I. (2002). Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. **Food and Chemical Toxicology**, 40, p.1669-1675.

SRIDHAR, S.R.; RAJAGOPAL, R.V.; RAJAVEL, R.; MASILAMANI, S.; NARASIMHAN, S. (2003) Antifungal activity of some essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 51, p.7596-7599.

TAPONDJOU, L.A.; ADLER, C.; BOUDA, H.; FONTEM, D.A. (2002) Efficacy of powder and essential oil from *Chenopodium ambrosioides* leaves as post-harvest grain protectants against six-stored product beetles. **Journal of Stored Products Research**, 38, p.395-402.

WINK, M. (1993) Production and application of phytochemicals from agricultural perspective. **Phytochemistry and Agriculture**, v.34, p.171-213.

YEH, F.; YU, M.C.; MO, C.H.; LUO, S.; TONG, M.J.; HENDERSON, B.E. (1989) Hepatitis-B virus, aflatoxin and hepatocellular carcinoma in Spulthern Guangxi, China. **Cancer Research**, 49, p.2506-2509.