

DESENVOLVIMENTO DE UMA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA COM PROPRIEDADE ANTIFÚNGICA UTILIZANDO O ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO

Oliveira, F. A.¹; Teodoro, G. R.²; Arakawa, N. S.³; Salvador, M. J.⁴; Khouri, S.⁵

^{1,2,3,4,5} Faculdade de Ciências da Saúde, Curso Farmácia – Laboratório de Microbiologia, Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP), Brasil,
Fone: +55 12 3947 1000 R. 2011

⁴ Curso de Farmácia, Instituto de Biologia, Departamento de Fisiologia Vegetal, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Brasil,
Fone: +55 16 9701 8358

fernandaunivap@bol.com.br, guilhermerte@uol.com.br, arakaw@fcrp.usp.br, mjsalvador1531@yahoo.com.br, soniak@univap.br

Resumo – Ao longo dos últimos anos, a ocorrência de infecções fúngicas humanas vem apresentando um aumento expressivo. A onicomicose constitui-se em sério problema, pois possui difícil diagnóstico e o seu tratamento representa uma das principais dificuldades terapêuticas. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo obter o óleo essencial de botões florais do cravo-da-índia, desenvolver uma formulação farmacêutica contendo este óleo e avaliar a atividade antifúngica, sob cepas clínicas de *Trichophyton spp.*, um dos mais importantes agentes causadores de onicomicoses. Foi utilizado o óleo essencial de cravo, obtido pelo processo de hidrodestilação e o óleo de cravo comercial - Alanza[®]. Dessa forma, foram desenvolvidas duas diferentes formulações, sendo estas testadas em diversas concentrações. No ensaio de avaliação da atividade antifúngica foi utilizado o método de difusão em ágar e incubados à 25°C por 7 dias. Os resultados obtidos, do presente trabalho, demonstraram o potencial antifúngico de ambos os óleos de cravo, assim como de suas formulações farmacêuticas. Estes resultados encorajam para que mais estudos, tanto *in vitro* como *in vivo*, sejam futuramente realizados.

Palavras-chave: óleos essenciais, antifúngicos, onicomicoses.

Área do Conhecimento: CIÊNCIAS DA SAÚDE

Introdução

Nos dias atuais, o comprometimento fúngico das unhas constitui-se em sério problema, em razão de sua elevada frequência e sua dificuldade diagnóstica. Somado a esse problema, o tratamento das onicomicoses representa uma das principais dificuldades terapêuticas encontradas na prática clínica micológica. Além disso, o tratamento das infecções fúngicas não é sempre efetivo, pois a maioria dos fármacos antifúngicos disponíveis produzem recorrência ou causam resistência, além de apresentarem importante toxicidade. Por esta razão, há uma busca contínua de novos fármacos antifúngicos mais potentes, mas, sobretudo, mais seguros que os existentes (FENNER et al., 2006).

O Eugenol é o maior constituinte do óleo essencial dos botões florais, popularmente conhecidos como cravo-da-índia, da Mirtácea arbórea *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & Perry. Ele representa aproximadamente, 70 a 85% do óleo extraído do cravo-da-índia. Outros componentes dessa fração são acetato de eugenol (15%) e β -cariofileno (5 a 12%), que juntos com o eugenol somam 99% do óleo (MAZZAFERA et al., 2003). Alguns trabalhos mostraram que o eugenol pode ser empregado

como agente anestésico, antibacteriano, antifúngico, antiviral, antiinflamatório, antioxidante e repelente (GAYOSO et al., 2005; MAZZAFERA et al., 2003). Segundo Park et al. (2007) o óleo de cravo apresentou excelentes resultados na avaliação da atividade antifúngica contra dermatófitos.

Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de cravo e também de uma formulação farmacêutica, com este óleo incorporado, sob cepas clínicas de *Trichophyton spp.*, um dos mais importantes agentes causadores de onicomicoses.

Metodologia

O processo de obtenção do óleo essencial seguiu o método de hidrodestilação, segundo Simões et al. (2003). Foi utilizado o aparelho de Clevenger acoplado a um balão de 1000 mL. Foram colocados 100 g de cravo-da-índia e 500 mL de água destilada no balão. Em seguida, o conjunto foi levado para manta aquecedora. A extração foi realizada durante 2 horas contadas a partir da ebulição da amostra. O rendimento foi calculado em porcentagem pelo peso total do óleo

obtido sobre o peso da massa total de cravo utilizado no processo de hidrodestilação.

A análise do óleo de cravo foi realizada através da cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), segundo Collins et al. (2006). Foi utilizada uma placa de vidro 10x20 cm recoberta com sílica-gel GF 254. A amostra foi preparada utilizando 5 µL de óleo de cravo e 250 µL de acetato de etila. O padrão utilizado foi o eugenol - Biodinâmica®, sendo utilizado 5 µL de padrão e 1000 µL de acetato de etila. A fase móvel utilizada foi tolueno:acetato de etila (93:07). A revelação da placa cromatográfica foi realizada através de vanilina sulfúrica, aquecimento a 105°C por 2 minutos e cálculo do fator de retenção (Rf) de cada amostra.

O preparo da formulação farmacêutica foi realizado através da incorporação do óleo de cravo na base de esmalte incolor®. Foi utilizado o óleo essencial de cravo, obtido pelo processo de hidrodestilação e o óleo de cravo comercial - Alanza®. Dessa forma, foram desenvolvidas diferentes formulações, utilizando diversas concentrações de cada uma delas.

As cepas clínicas de *Trichophyton spp.*, isoladas de onicomicoses, foram cedidas pelo Hospital Universitário de Taubaté (HUT), pela responsável técnica do laboratório de Microbiologia, Andreza Mônica Rodrigues dos Santos. Foram utilizadas 7 cepas clínicas, sendo destas 4 cepas de *Trichophyton rubrum*, 2 cepas de *Trichophyton mentagrophytes* e uma cepa de *Trichophyton tonsurans*.

Na preparação do inóculo foi utilizada uma alça descartável estéril de 1µL, com esta, as cepas foram transferidas das culturas puras para tubos contendo 10 mL de solução fisiológica estéril a 0,9%. Em seguida, esta solução foi agitada no vórtex por aproximadamente um minuto.

No ensaio de avaliação da atividade antifúngica foi utilizada a técnica de Pour Plate, segundo Bauer et.al. (1966). Para a realização da técnica foi colocado cerca de 1 mL do inóculo na placa de Petri e em seguida, adicionado 100 mL de ágar Batata a 45°C. Fazendo movimentos circulares em 8, para completa mistura entre o inóculo e o meio. Após a solidificação do ágar, com o auxílio de canudos de plástico estéreis, foi feito orifícios no ágar, onde foi colocado 20µL da droga teste. As placas foram incubadas a 25°C por 7 dias, para realização da leitura dos halos de inibição.

Foram testadas diferentes concentrações de ambos os óleos de cravo, utilizando o óleo de amêndoas - Leclerc®, como diluente. Foram testadas também as suas respectivas formulações. O óleo de cravo obtido por hidrodestilação e sua formulação foram testados nas concentrações de 2,5% a 12,5%, num intervalo de 2,5%. Enquanto que o óleo de cravo comercial e sua formulação foram testados nas

concentrações de 15% a 35%, num intervalo de 5%.

Resultados

O rendimento do óleo essencial de cravo obtido pelo processo de hidrodestilação foi de 3,3%. Na análise cromatográfica foi detectada a presença de Eugenol em ambos os óleos, tanto no óleo de cravo comercial (amostra 2) como no óleo de cravo obtido por hidrodestilação (amostra 3) comparado ao padrão de Eugenol (amostra 1), conforme figura 1. Os valores do fator de retenção (Rf) calculado foi de 0,46 nas três amostras. Na análise cromatográfica do óleo comercial foi detectada uma substância adicional, na qual não pôde ser identificada devido a falta de padrões para efeito comparativo.

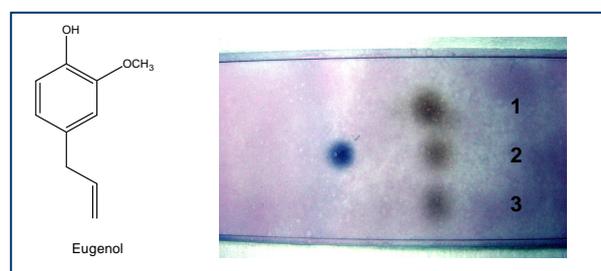


Fig.1 Cromatoplaça comparativa do óleo essencial de cravo; (1) Eugenol - padrão (estrutura química); (2) óleo comercial; (3) óleo obtido por hidrodestilação. Fase móvel utilizada: tolueno:acetato de etila (93:07).

No experimento realizado com óleo de cravo, obtido por hidrodestilação, foi demonstrado que nenhuma das cepas apresentou halo de inibição na concentração de 2,5% (Tabela 1). Entretanto, houve formação de halo de inibição a partir da concentração de 5%. Nesta mesma etapa do experimento, foi testado o óleo de amêndoas, o qual mostrou ser inócua às cepas clínicas testadas.

Tabela 1 - Halos de inibição formados utilizando 20 µL do óleo de cravo obtido por hidrodestilação (em diferentes concentrações) contra cepas de *Trichophyton spp.*

Amostra/Espécie	Halo de inibição (mm)					
	2,5%	5%	7,5%	10%	12,5%	C+
01 <i>T. rubrum</i>	0	8	12	15	19	24
02 <i>T. rubrum</i>	0	8	13	15	18	25
03 <i>T. rubrum</i>	0	0	8	15	17	26
04 <i>T. rubrum</i>	0	0	8	11	16	24
05 <i>T. mentagrophytes</i>	0	9	14	19	24	23
06 <i>T. mentagrophytes</i>	0	0	7	15	19	25
07 <i>T. tonsurans</i>	0	0	10	19	25	25

C+: nitrato de miconazol

No experimento realizado com a formulação utilizando óleo de cravo obtido por

hidrodestilação foi verificada presença de halo de inibição nas mesmas concentrações que no óleo de cravo (Tabela 2). Nesta mesma etapa do experimento, foi testada a base de esmalte incolor®, a qual mostrou ser inócua às cepas clínicas estudadas.

Tabela 2 - Halos de inibição formados utilizando 20 µL da **formulação contendo o óleo de cravo obtido por hidrodestilação** (em diferentes concentrações) contra cepas de *Trichophyton spp.*

Amostra/Espécie	Halo de inibição (mm)					
	2,5%	5%	7,5%	10%	12,5%	C+
01 <i>T. rubrum</i>	0	8	15	21	24	25
02 <i>T. rubrum</i>	0	8	14	19	24	26
03 <i>T. rubrum</i>	0	0	8	15	18	24
04 <i>T. rubrum</i>	0	8	13	19	25	25
05 <i>T. mentagrophytes</i>	0	10	18	28	34	26
06 <i>T. mentagrophytes</i>	0	0	14	22	32	25
07 <i>T. tonsurans</i>	0	0	15	25	33	25

C+: nitrato de miconazol

No experimento realizado com óleo de cravo comercial foi demonstrado que houve formação de halo de inibição a partir da concentração de 15%. (Tabela 3). Assim como também ocorreu com a sua formulação (Tabela 4). Porém pode-se observar que os halos formados no experimento utilizando a formulação apresentaram um diâmetro maior, demonstrando um maior potencial antifúngico da formulação.

Tabela 3 - Halos de inibição formados utilizando 20 µL do **óleo de cravo comercial** (em diferentes concentrações) contra cepas de *Trichophyton spp.*

Amostra/Espécie	Halo de inibição (mm)					
	15%	20%	25%	30%	35%	C+
01 <i>T. rubrum</i>	0	0	10	14	17	25
02 <i>T. rubrum</i>	0	8	13	17	19	26
03 <i>T. rubrum</i>	0	0	9	11	17	26
04 <i>T. rubrum</i>	0	0	9	14	18	25
05 <i>T. mentagrophytes</i>	8	16	22	26	31	25
06 <i>T. mentagrophytes</i>	0	0	14	19	24	25
07 <i>T. tonsurans</i>	0	9	12	18	23	24

C+: nitrato de miconazol

Tabela 4 - Halos de inibição formados utilizando 20 µL da **formulação contendo o óleo de cravo comercial** (em diferentes concentrações) contra cepas de *Trichophyton spp.*

Amostra/Espécie	Halo de inibição (mm)					
	15%	20%	25%	30%	35%	C+
01 <i>T. rubrum</i>	0	9	14	18	22	26
02 <i>T. rubrum</i>	0	8	16	19	25	27
03 <i>T. rubrum</i>	0	7	10	17	21	25
04 <i>T. rubrum</i>	0	8	13	17	21	24
05 <i>T. mentagrophytes</i>	10	16	22	28	34	25
06 <i>T. mentagrophytes</i>	0	9	16	22	28	25
07 <i>T. tonsurans</i>	0	11	18	23	28	26

C+: nitrato de miconazol

A figura 2 apresenta a comparação entre a formação de halos de inibição do óleo de cravo obtido por hidrodestilação e de sua formulação, ambos em diversas concentrações, frente à cepa clínica de *T. mentagrophytes* (amostra 05).

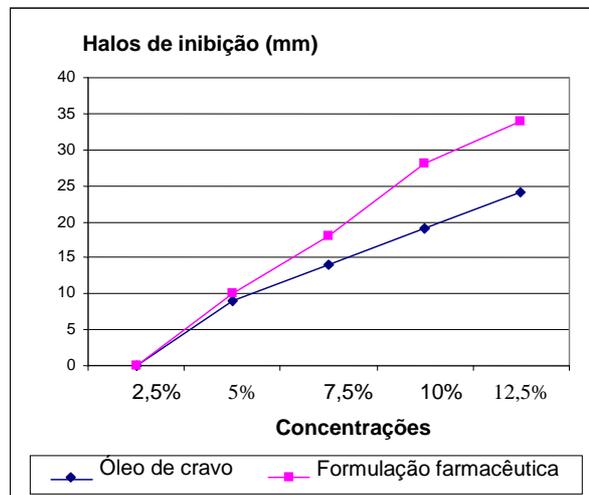


Fig. 2 Comparação da formação de halos de inibição do óleo de cravo e de sua formulação.

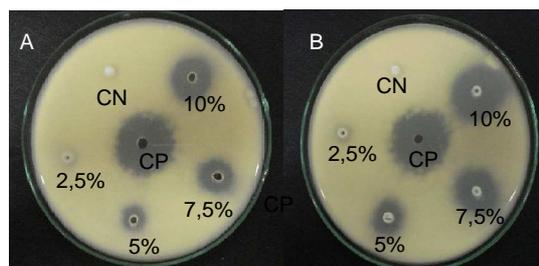


Fig. 3 Teste de sensibilidade de uma cepa clínica de *T. mentagrophytes* frente às concentrações testadas de (A) óleo de cravo obtido por hidrodestilação e (B) da formulação contendo óleo de cravo obtido por hidrodestilação.

Discussão

Através da técnica de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) foi comprovada a presença de eugenol em ambos os óleos de cravo utilizados no presente trabalho, pois quando comparados os valores de Rf das substâncias na cromatoplaça, comprovou-se deste modo a presença e a predominância deste composto. O Eugenol é o princípio ativo do cravo-da-índia. Segundo Pereira et al.(2007), a atividade antimicrobiana do eugenol ocorre em nível de membrana plasmática, juntamente com a inativação de enzimas, e/ou, no material genético celular.

O estudo de produtos derivados de vegetais de uso medicinal com atividade antifúngica vem ganhando grandes perspectivas e objetiva obter princípios ativos para uma possível aplicação prática no tratamento de suas infecções (LIMA et al., 1999). Os testes realizados e os

resultados obtidos, no presente estudo, mostraram o potencial antifúngico do óleo de cravo, assim como da formulação farmacêutica que o contém.

O óleo de cravo obtido por hidrodestilação apresentou CIM (Concentração Inibitória Mínima) menor que o óleo comercial. Esse fato pode ser explicado devido à constituição do óleo de cravo comercial apresentar porcentagens menores de óleo essencial de cravo.

Comparando a CIM dos óleos de cravo e de suas respectivas formulações foi possível perceber que a CIM das formulações foram menores. Nos testes com quantidade de 20 µL do óleo de cravo comercial numa concentração de 20% apenas 3 cepas apresentaram formação de halo de inibição. Enquanto que em sua formulação, na mesma concentração, todas as cepas formaram halo de inibição. Um fato semelhante ocorreu com o óleo de cravo obtido por hidrodestilação e sua formulação. Sendo assim, foi observado que a incorporação do óleo de cravo na base de esmalte potencializou a atividade antifúngica da formulação frente às cepas clínicas de *Trichophyton spp.*

De acordo com alguns trabalhos encontrados na literatura, já foi comprovada a atividade antifúngica do óleo essencial de cravo (GAYOSO et al., 2005; MAZZAFERA et al., 2003). Segundo Gayoso et. al. (2005), a atividade antifúngica do óleo de cravo e de seu constituinte majoritário, o Eugenol, frente a cepas isoladas de onicomicose, apresentou CIM de 1% e 4%, respectivamente. Entretanto, na presente pesquisa a CIM do óleo de cravo obtido por hidrodestilação variou de 5% a 7,5%.

Park et.al.(2007) também avaliou a atividade antifúngica do óleo de cravo, sendo utilizadas as concentrações de 0.05, 0.1, 0.15, e 0.2 mg/ml sob as cepas de *Microsporum canis* (KCTC 6591), *Trichophyton mentagrophytes* (KCTC 6077), *Trichophyton rubrum* (KCCM 60443), *Epidermophyton floccosum* (KCCM 11667) e *Microsporum gypseum*, nas quais, todas estas cepas apresentaram-se sensíveis, corroborando com o presente estudo que também obteve 100% de sensibilidade das cepas clínicas testados frente ao óleo de cravo..

Novos estudos deverão ser realizados, desenvolvendo procedimentos analíticos para a quantificação do Eugenol nos óleos essenciais bioativos, como na formulação farmacêutica com propriedade antifúngica desenvolvida. A avaliação antifúngica do Eugenol puro também poderá ser realizada frente aos fungos filamentosos estudados.

Conclusão

No presente estudo, foi comprovada a presença de Eugenol no óleo de cravo tanto por

hidrodestilação quanto o obtido comercialmente, sendo este o seu constituinte majoritário e o princípio ativo do óleo.

Foi comprovada também a atividade antifúngica do óleo de cravo, tanto do óleo de cravo obtido por hidrodestilação como do óleo de cravo comercial. Assim como também de suas respectivas formulações. A CIM do óleo de cravo obtido por hidrodestilação e de sua formulação foi de 7,5%. Enquanto que, a CIM do óleo de cravo comercial foi de 25% e de sua formulação foi de 20%. Comparando-se a variação do diâmetro dos halos de inibição dos óleos de cravo e de suas respectivas formulações, pode-se observar um diâmetro maior na formulação em todas as cepas clínicas testadas.

A incorporação do óleo de cravo na formulação potencializou sua atividade antifúngica. Estes resultados encorajam para que mais estudos, tanto *in vitro* como *in vivo*, sejam realizados para o controle de fungos causadores de infecções superficiais.

Referências

- FENNER, R.; BETTI, A.H.; MENTZ, L.A.; RATES, S.M.K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, v.42, n.3, p. 369-394, 2006.
- GAYOSO, C.W. Sensitivity of fungi isolates from onychomycosis to *Eugenia caryophyllata* essential oil and eugenol. Fitoterapia, João Pessoa, v.76, p.247-249, 2005.
- LIMA, E.O.; FARIAS, N.M. P. Atividade antifúngica de óleos essenciais, obtidos de plantas medicinais, contra leveduras do gênero *Candida*. Rev. Bras. Ciênc. Saúde;3(1/3):51-64, 1999.
- MAZZAFERA, P. Efeito alelopático do extrato alcoólico do cravo-da-índia e eugenol. Revista Brasil. Bot., v.26, n.2, p.231-238, 2003.
- PARK, M.; GWAK, K.; In YANG, CHOI W.; JO H.; CHANG J.; JEUNG E.; In-Gyu CHOI. Antifungal Activities of the Essential Oils in *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. Et Perry and *Leptospermum petersonii* Bailey and their Constituents against Various Dermatophytes. The Journal of Microbiology, v.45, n.5, p.460-465, October 2007.
- PEREIRA, C.A.M. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). Ciência e Tecnologia de Alimentos, 27(3): p.624-632, 2007.