

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO-DA-ÍNDIA E EUGENOL COMERCIAL SOBRE *Paracoccidioides sp.*

Pereira PCA¹, Wenzel TS¹, Joaquim MW¹, Menegon RF², Morais FV¹.

¹Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos; Laboratório de Fotoacústica Aplicada a Sistemas Biológicos, Av. Shishima Hifumi, 2911- Urbanova. ²Universidade Federal de São Paulo, Campus Diadema, Rua Prof. Artur Riedel, 275. thuany_wenzel@hotmail.com; patricia.cinachi@gmail.com; wal@univap.br; renato.farina@yahoo.br; flavia@univap.br

Resumo- O óleo essencial do cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) é constituído principalmente pelo eugenol, e apresenta diversas atividades biológicas, tais como: antimicrobiana; antioxidante; anestésica e antifúngica sobre cepas de *Candida sp.* e *Aspergillus sp.* Espécies de *Paracoccidioides* são agentes etiológicos da paracoccidioidomicose (PCM), doença endêmica da América Latina e uma das principais micoses profundas prevalentes no Brasil. O presente trabalho avaliou a atividade antifúngica do óleo essencial do cravo-da-índia e do eugenol comercial sobre as diferentes espécies de *Paracoccidioides* (*P. brasiliensis* e *P. lutzii*), pelo método de difusão em disco. Os resultados demonstraram o potencial antifúngico do óleo essencial do cravo-da-índia e do eugenol comercial sobre os dois isolados estudados, servindo de guia para a realização de futuros ensaios no âmbito farmacológico e toxicológico.

Palavras-chave: *Paracoccidioides*, cravo-da-índia, eugenol.

Área do Conhecimento: Biomedicina.

Introdução

A paracoccidioidomicose é uma doença endêmica da América Latina e uma das principais micoses profundas prevalentes no Brasil, Colômbia e Venezuela (SAN-BLAS et al., 2002). Foi descrita pela primeira vez em 1908, por Adolf Lutz. O Brasil é considerado um centro endêmico dessa doença, com maior prevalência nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste (MALUF et al., 2003). Seu agente etiológico é o *Paracoccidioides sp.*, pertencente à família *Moniliaceae*, é considerado um fungo termo-dimórfico encontrado sob a forma de micélio na natureza e levedura no hospedeiro humano.

A infecção ocorre quando os conídios ou propágulos do fungo são inalados pelo homem, sendo os pulmões os focos primários da infecção. Essas partículas, após se transformarem em leveduras, podem disseminar-se para vários órgãos e sistemas (BESINELLI et al., 2002). A paracoccidioidomicose acomete mais frequentemente adultos, trabalhadores rurais, do sexo masculino, e muitas vezes resultam em sequelas irreversíveis que incapacitam o indivíduo para o trabalho. Sem a intervenção terapêutica específica o paciente evolui para óbito (MALUF et al., 2003).

Em relação ao tratamento dessa doença as drogas mais utilizadas são: anfotericina B, do grupo de antibióticos poliênicos; sulfadiazina e outros compostos sulfanilamídicos; e o grupo de

drogas azólicas com atuação sistêmica (PALMEIRO et al., 2005). Devido à ocorrência de fatores indesejáveis como os efeitos colaterais e a resistência aos antifúngicos convencionais, novos agentes são propostos na tentativa de minimizar tais ocorrências.

O óleo essencial do cravo-da-índia é constituído principalmente pelo eugenol (70 a 85%) e outros componentes como acetato de eugenol e β - cariofileno, que juntos com o eugenol somam 99% do óleo (SILVA et al., 2011). O eugenol é um derivado fenólico, farmacologicamente muito ativo, que apresenta baixa solubilidade em água e é altamente solúvel em clorofórmio, gorduras, álcool etílico e éter. Sua alta lipossolubilidade possibilita uma fácil absorção através das membranas lipídicas e rápido acesso ao local de ação. Os efeitos biológicos do eugenol dependem de sua concentração e do tempo de exposição ao tecido (ESCOBAR et al., 2002).

Neste sentido, considerando a ampla atividade biológica apresentada pelo óleo essencial do cravo-da-índia e pelo eugenol comercial, tais como: antimicrobiana e antioxidante (SILVESTRI et al., 2010); anestésica (SEOL et al., 2007); e antifúngica sobre cepas de *Candida* e *Aspergillus* (PINTO et al., 2009), o presente trabalho teve como objetivo avaliar a ação antifúngica "in vitro" do óleo essencial do cravo-da-índia e do eugenol comercial sobre dois isolados de *Paracoccidioides sp.*, a saber: Pb01 (*P. lutzii*) e Pb18 (*P. brasiliensis*).

Metodologia

A pesquisa experimental foi realizada no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba, no Laboratório de Biologia Celular e Molecular de Fungos.

A obtenção do óleo essencial foi realizada a partir de 50gr de cravo-da-índia, os quais foram processados pelo método de hidrodestilação (SIMÕES et al., 2003). O eugenol utilizado foi obtido comercialmente (Biodinâmica).

Foram utilizados dois isolados de *Paracoccidioides sp.*, sendo eles: *P. brasiliensis* (Pb18) e *P. lutzii* (Pb01), os quais foram gentilmente fornecidos pela Dr^a Rosana Puccia, Unifesp, São Paulo, Brasil. As células fúngicas foram crescidas, por quatro dias a 36°C, em meio contendo 1% de extrato de levedura, 2% de dextrose e 2% de peptona de caseína (YPD). As células foram lavadas duas vezes em tampão fosfato-salino (PBS), e a viabilidade celular foi determinada por contagem das células, coradas com azul de metileno, em câmara de Neubauer. A concentração celular da suspensão fúngica foi ajustada para 1×10^6 células por mililitro, em mesmo tampão.

Os ensaios para determinação da atividade antifúngica foram realizados pelo método de difusão em disco, teste aceito pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e estabelecido como padrão pelo NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*) (OSTROSKY et al., 2008).

Placas de Petri estéreis contendo 20mL de ágar YPD, previamente testadas para verificação de esterilidade a 37°C por 48 horas, foram inoculadas, por espalhamento, com 1mL da suspensão fúngica. Em seguida, discos de papel filtro estéreis de 6mm foram repousados à superfície do meio contendo as células e a eles foram adicionados 10µL das diferentes concentrações do óleo essencial e do eugenol comercial, diluídos em 0,08% de Tween 20. As placas foram incubadas a 36°C por 5 dias.

Paralelamente, foi realizado o controle da viabilidade dos isolados perante o diluente utilizado (0,08% de Tween 20), e teste de sensibilidade dos isolados frente à ação de 100µg do antifúngico anfotericina B.

Os resultados foram avaliados a partir da mensuração dos diâmetros dos halos de inibição de crescimento fúngico em milímetros. Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo considerada a média aritmética dos valores obtidos.

Resultados

As Tabelas 1 e 2 mostram os resultados dos ensaios realizados para a determinação da atividade antifúngica dos produtos avaliados.

Tabela 1 – Halos de inibição do crescimento fúngico formados utilizando 10µL do óleo essencial do cravo-da-índia em diferentes concentrações sobre os isolados de *Paracoccidioides sp.*

Isolados	Halo de Inibição (mm)						Anfotericina B
	Percentual de cravo-da índia						
	0,5%	0,75%	1,0%	1,25%	1,5%	2,5%	
Pb01	9,3 ± 0,5	10,0 ± 0,0	11,0 ± 0,5	11,3 ± 0,5	13,0 ± 1,7	14,6 ± 1,0	22,3 ± 1,5
Pb18	11,6 ± 0,5	12,6 ± 1,1	14,3 ± 1,1	14,6 ± 0,5	16,3 ± 2,5	18,3 ± 2,0	23,0 ± 1,0

Tabela 2 - Halos de inibição do crescimento fúngico formados utilizando 10µL do eugenol comercial em diferentes concentrações sobre os isolados de *Paracoccidioides sp.*

Isolados	Halo de Inibição (mm)						Anfotericina B
	Percentual de eugenol comercial						
	0,5%	0,75%	1,0%	1,25%	1,5%	2,5%	
Pb01	10,6 ± 0,5	11,3 ± 0,5	12,0 ± 1,7	14,3 ± 3,2	15,6 ± 3,0	17,0 ± 3,6	22,3 ± 1,5
Pb18	13,6 ± 2,3	14,0 ± 2,6	16,3 ± 0,5	19,0 ± 2,3	20,0 ± 1,0	21,0 ± 1,0	23,0 ± 1,0

Observa-se que, tanto o óleo essencial do cravo-da-índia quanto o eugenol comercial, apresentaram efetividade de inibição a partir da concentração de 0,5%, caracterizada pela formação de halos de inibição do crescimento microbiano igual ou superior a 9mm.

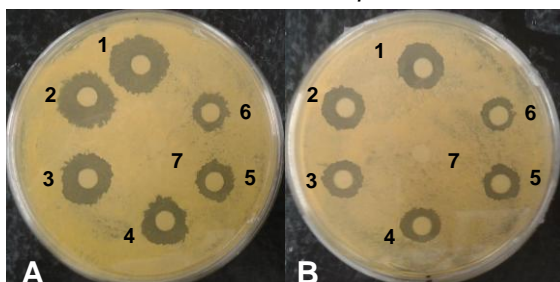
A comparação entre os dados das tabelas 1 e 2 e na figura 1 mostra que os halos formados no experimento utilizando o eugenol obtido comercialmente apresentaram um diâmetro maior se comparado com os halos formados pelo óleo essencial do cravo-da-índia.

A figura 2 mostra a sensibilidade dos isolados ensaiados frente à ação do antifúngico anfotericina B (100µg).

De acordo com o gráfico apresentado na Figura 3 nota-se que o isolado de Pb18 apresentou maior

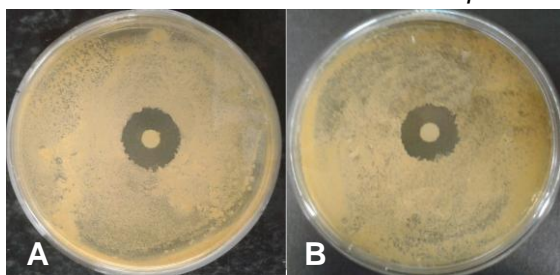
sensibilidade frente ao eugenol comercial e ao óleo essencial se comparado ao Pb01.

Figura 1 – Atividade antifúngica de diferentes concentrações de eugenol comercial sobre os isolados de *Paracoccidioides sp*



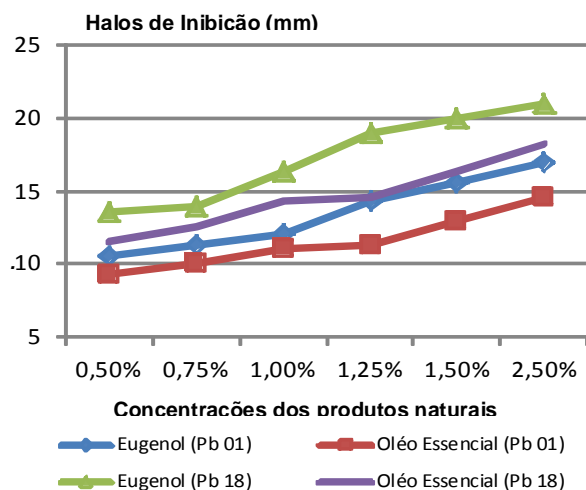
Teste de difusão em disco de diferentes concentrações de eugenol comercial (1- 2,5%; 2- 1,5%; 3- 1,25%; 4- 1,0%; 5- 0,75%; 6- 0,5%) sobre os isolados Pb18 (A) e Pb01 (B). O controle negativo, 0,8% de Tween 20, pode ser observado em 7.

Figura 2 – Atividade antifúngica da anfotericina B sobre os isolados de *Paracoccidioides sp*.



Teste de difusão de disco com 100µg do antifúngico anfotericina B, sobre os isolados Pb18 (A) e Pb01 (B).

Figura 3 – Formação dos halos de inibição do óleo essencial do cravo-da-índia e o eugenol comercial frente aos isolados testados.



Discussão

A medicina popular por muito tempo vem dando ênfase a extratos e óleos essenciais,

demonstrando um recurso promissor para a descoberta de novos agentes antifúngicos como menores efeitos colaterais. Vários estudos apontam excelentes propriedades terapêuticas dos óleos essenciais, porém a diversidade das metodologias utilizadas torna a comparação do presente estudo problemática.

Devido a algumas propriedades dos óleos essenciais, como: volatilidade, viscosidade e insolubilidade em água, tornou-se comum a utilização de solventes, detergentes ou emulsificadores para facilitar a dispersão do óleo do meio de cultura. Sendo assim, optou-se por uma metodologia utilizando difusão em discos com auxílio de um agente emulsificador (Tween 20).

No presente estudo, os produtos naturais avaliados apresentaram atividade antifúngica contra os isolados de *Paracoccidioides sp*.

Destaca-se a atividade do eugenol comercial e do óleo essencial do cravo-da-índia sobre o isolado de *Paracoccidioides brasiliensis* com a formação de halos de inibição de 21,0 e 18,3mm respectivamente. Os resultados concordam com avaliação feita por Menezes et al. (2009) referente a avaliação da atividade antifúngica do extrato do *Syzygium aromaticum* em *Candida albicans* que apresentou formação de halos de inibição de 18mm sendo sua concentração inibitória mínima (CIM) de 62,5mg.mL⁻¹. O óleo essencial do cravo-da-índia segundo Costa et al. (2011) apresentou poder fungicida na concentração de 0,15% sobre o crescimento de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani* e *Fusarium oxysporum*. De acordo com Faria et al. (2006), o eugenol na concentração de 0,31mg/disco mostrou-se eficaz contra *Penicillium chrysogenum*.

Na concentração de 62,5µg mL⁻¹ o óleo essencial das folhas de *Eugenia uniflora* inibiu o crescimento da forma leveduriforme do *Paracoccidioides brasiliensis* completamente (COSTA et al., 2010).

Vários trabalhos demonstram a eficácia antifúngica do *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia), porém existe uma lacuna na literatura em relação ao mesmo frente ao *Paracoccidioides sp.*, o que dificulta a comparação com outros estudos.

A atividade antifúngica do eugenol pode ocorrer de três formas: pela interferência na dupla camada fosfolipídica da parede celular; por alteração de uma variedade de sistemas enzimáticos, incluindo inativação ou destruição do material genético; e pelo aumento da permeabilidade e perda dos constituintes celulares (PEREIRA et al., 2007). Pesquisadores realizaram um estudo "in vitro" para investigar os efeitos do eugenol na formação do biofilme na cavidade bucal, e concluíram que o mesmo apresenta potente atividade contra

Candida albicans com baixa citotoxicidade (HE et al., 2007).

De acordo com os resultados encontrados nesse trabalho, deve-se reconhecer que os óleos essenciais e seus constituintes são considerados fontes promissoras para elaboração de novos fármacos contra a PCM. Considerando a necessidade de ampliação de drogas antifúngicas, devido ao aumento da resistência aos produtos comercialmente disponíveis e aos efeitos colaterais, a busca por novos produtos antifúngicos mostra-se de grande significância.

Dessa forma, esse estudo representa uma avaliação inicial para determinação da atividade antifúngica do óleo essencial do cravo-da-índia e o eugenol comercial sobre *Paracoccidioides sp.*, sendo necessário o desenvolvimento de novos estudos para determinação das concentrações fungicida e fungistática, e efeitos toxicológicos na perspectiva de uma possível aplicação terapêutica desses produtos.

Conclusão

A partir dos resultados obtidos, foi possível observar o potencial antifúngico dos produtos avaliados, destacando o significativo resultado apresentado pelo eugenol comercial contra *Paracoccidioides brasiliensis*.

Referências

- BISINELLI, J.C.; FERREIRA, M.L.S. Doenças infecciosas: paracoccidioidomicose (blastomicose sul-americana). **Diag. patol. bucal.** 3ª ed. São Paulo: Pancast; 2002. p. 202-209.
- COSTA, A.R.T., et al. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr e L.M. Pérry sobre as hifas de alguns fitopatogênicos. **Rev. Bras. Ol. Med**, Botucatu, V. 13, n.2, p. 240-245, 2011.
- COSTA, D.P., et al. Influence of fruit biotypes on the chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Eugenia uniflora* leaves. **J. Braz. Chem. Soc.**, V. 21, n. 5, p. 851-858, 2010.
- ESCOBAR, R.G. Eugenol: propiedades farmacológicas y toxicológicas. Ventajas y desventajas de su uso. **Rev. Cubana Estomatol.**, V. 39, n. 2, 2002. Disponível em: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S003475072002000200005&lng=es&nrm=is
Acesso em: 12 mar.2013.
- FARIA, T.J., et al. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol

chemotype) against phytopathogenic fungi. **Braz. Arch. Biol. technol.** V. 49, n. 6, p. 867-871, 2006.

- HE M.; DU M.; FAN M.; BIAN Z. In vitro activity of eugenol against candida albicans biofilms. **Mycopathologia.** V. 163, n. 3, p. 137-143, 2007.

- MALUF, M.L.F., et al. Prevalência de paracoccidioidomicose-infecção determinada através de teste sorológico em doadores de sangue na região noroeste do Paraná, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** V.36, n. 1, p. 11-16, 2003.

- MENEZES, T.O.A., et al. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre a cepa de *Candida albicans*. **Rev. Odontol. UNESP.** V. 38, n. 3, p. 184-191, 2009.

- OSTROSKY, E.A., et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, João Pessoa, V. 18, n. 2, 2008.

- PALMEIRO, M.; CHERUBINI, K.; YURGEL, L.S. Paracoccidioidomicose: Revisão da Literatura. **Scient. Med.**, Porto Alegre: PUCRS, V. 15, n. 4, 2005.

- PEREIRA, C.A.M.; MAIA, J.F. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, V. 27, n. 3, p. 624-632, 2007.

- PINTO, E., et al. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **J. Med. Microbiol.**, p. 1454-1462, 2009.

- SAN-BLAS, G.; NIÑO-VEGA, G.; ITURRIAGA, T. *Paracoccidioides brasiliensis* and paracoccidioidomycosis: molecular approaches to morphogenesis, diagnosis, epidemiology, taxonomy and genetics. **Med. Mycol.** V.40, n.3, p. 225-242, 2002.

- SEOL, D.W., et al. Oil as an anaesthetic for common octopus (*Octopus minor*, Sasaki). **Aquacult. Research.** V. 38, n.1, p.45-49, 2007.

- SILVA, T.C.; OLIVEIRA, J.R.; SOUZA, S.J.O. Extração de Eugenol a Partir do Cravo da Índia e Produção de Sabonetes Aromatizados. **Rev. Crase. Edu.** V.1, n. 1, 2011.

XVII INIC

Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica

XIII EPG

Encontro Latino Americano
de Pós Graduação

VII INIC Jr

Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica Júnior

- SIMÕES, C.M.O., et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 5ª ed., Porto Alegre – Florianópolis. Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003.