

Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos

COSTA, A.R.T.¹; AMARAL, M.F.Z.J.¹; MARTINS, P.M.²; PAULA, J.A.M.¹; FIUZA, T.S.³; TRESVENZOL, L.M.F.¹; PAULA, J.R.¹; BARA, M.T.F.^{1*}

¹Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, CEP: 74605-220. Goiânia-Brasil * mbara@farmacia.ufg.br

²Centro de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Goiás, CEP: 75.132-903, Anápolis-Brasil ³Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, CEP: 74.001-970, Goiânia-Brasil

RESUMO: Atualmente o uso de métodos alternativos para o controle de doenças e pragas na agricultura, visando minimizar os danos ao meio ambiente e à saúde pública é uma prática reconhecida e necessária. Este trabalho objetivou investigar a ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry sobre o crescimento micelial *in vitro* dos fungos fitopatogênicos *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* e *Macrophomina phaseolina*. A análise por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa possibilitou a identificação de eugenol (83,6%), acetato de eugenila (11,6%) e cariofileno (4,2%). A avaliação microscópica dos micélios dos fungos evidenciou diversas alterações morfológicas, como a presença de vacúolos, desorganização dos conteúdos celulares, diminuição na nitidez da parede celular, intensa fragmentação e menor turgência das hifas. O óleo essencial de cravo apresentou atividade fungicida na concentração de 0,15% sobre o crescimento de *R. solani*, *F. oxysporum* e *F. solani*, entretanto não demonstrou essa atividade sobre *M. phaseolina*. Esses resultados indicam perspectivas favoráveis para posterior uso do óleo de cravo no controle desses fitopatógenos na agricultura.

Palavras-chave: antifúngicos naturais, óleos essenciais, cravo-da-Índia, eugenol, *Syzygium aromaticum*

ABSTRACT: Action of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry essential oil on the hyphae of some phytopathogenic fungi. Currently, the use of alternative methods to control diseases and pests in agriculture has been a recognized and necessary practice to minimize damages to the environment and public health. This study aimed to investigate the action of clove [*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry] essential oil on the *in vitro* mycelial growth of the phytopathogenic fungi *Rhizoctonia solani*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* and *Macrophomina phaseolina*. Analysis by gas chromatography-mass spectrometry allowed the identification of eugenol (83.6%), eugenyl acetate (11.6%) and caryophyllene (4.2%). Microscopic evaluation of mycelia showed several morphological changes such as presence of vacuoles, cell content disorganization, decreased cell wall clearness, intense fragmentation and lower turgescence of hyphae. Clove essential oil showed fungicidal activity at 0.15% on the growth of *R. solani*, *F. oxysporum* and *F. solani*, but not for *M. phaseolina*. These results indicate favorable perspectives for future use of clove essential oil to control these phytopathogens in agriculture.

Key words: natural antifungals, essential oils, clove, eugenol, *Syzygium aromaticum*

INTRODUÇÃO

O cravo da Índia, como é conhecido popularmente, a espécie *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry, tem a origem descrita por Pahlow (2004) como sendo das Filipinas e leste da África. Outros autores a descrevem como originária da Índia, sendo também encontrado na Indonésia, Zanzibar e Ceilão (Lorenzi & Matos, 2002; Banerjee et al., 2006;

Paoli et al., 2007). É cultivado em vários países tropicais inclusive no Brasil, mais precisamente no sul da Bahia, estimando a área cultivada em 8.500 ha em mais de 3.000 propriedades, caracterizando-se como atividade de agricultura familiar. A produção anual apresenta-se em torno de 2.200 t de cravo seco (Reis et al., 2006).

A planta é árvore sempre verde, de copa

alongada característica, medindo de 10 a 20 m de altura. A espécie é explorada principalmente para extração industrial do óleo essencial obtido a partir dos botões florais, folhas e outras partes. O uso popular da espécie refere-se ao chá dos botões florais como carminativo e estimulante das funções digestivas (Lorenzi & Matos, 2002). Na Índia é utilizado pela medicina Ayurvédica, para tratamentos respiratórios e transtornos alimentares. As propriedades antissépticas e antibióticas são também exploradas em preparação de dentifrícios caseiros e enxaguatórios bucais (Banerjee et al., 2006).

Os estudos fitoquímicos do cravo revelam a presença de até 90% de óleo essencial, no qual o eugenol é o componente majoritário, acompanhado por trans-cariofileno, acetato de eugenila e α -humuleno (Paoli et al., 2007; Pereira et al., 2008). Segundo Amaral & Bara (2005), Park et al. (2007) e Nzeako & Lawati (2008), o eugenol pode contribuir com atividade antifúngica e antibacteriana (Lorenzi & Matos, 2002; Pahlow, 2004; Oliveira et al., 2006; Pereira et al., 2008). Estudos referentes ao potencial anticarcinogênico ou quimiopreventivo, antioxidante, antiagregante plaquetário e antitrombótico do cravo têm sido descritos nas literaturas especializadas (Lorenzi & Matos, 2002; Banerjee & Das, 2005; Banerjee et al., 2006; Paoli et al., 2007).

Atualmente o uso de métodos alternativos para o controle de doenças e pragas na agricultura, visando minimizar os danos ao meio ambiente e à saúde pública é prática reconhecida e necessária (Nist, 1998; Ranasinghe et al., 2002; Coitinho et al., 2006; Souza et al., 2006; Pinto et al., 2008).

O desenvolvimento de pesquisas com plantas medicinais representa uma possibilidade de substituir o uso de agroquímicos por outros produtos e contribuição na busca de novos ativos. Dentre esses produtos, os óleos essenciais apresentam baixa toxicidade a mamíferos e estão sendo amplamente testados no controle de fitopatógenos em diferentes culturas (Daferera et al., 2003; Bastos & Albuquerque, 2004; Dingra et al., 2004; Gayoso et al., 2005; Diniz et al., 2006; Silva & Bastos, 2007; Silva, 2008).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi pesquisar a atividade antifúngica do óleo essencial de *S. aromaticum* sobre o crescimento micelial e prováveis alterações nas hifas de fungos fitopatogênicos: *Fusarium oxysporum* (Schl.) Snyder e Hansen, *F. solani* (Mart.) Saac., *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid, e *Rhizoctonia solani* Kuhn.

MATERIAL E MÉTODO

Espécie utilizada

O cravo da Índia, *S. aromaticum*, foi adquirido e dessecado em casa de produtos naturais na cidade de Goiânia/Goiás.

Obtenção do óleo essencial

Os botões florais dessecados da *S. aromaticum* comercial foram submetidos à destilação por arraste a vapor em aparelho de Clevenger modificado, por 2 h, para a obtenção do óleo essencial (Costa, 2001).

Fungos fitopatogênicos estudados

Os fungos *R. solani*, *F. solani*, *F. oxysporum* e *M. phaseolina* foram cedidos pela EMBRAPA Arroz e Feijão - (CNPAP) e foram mantidos meio de cultura Batata-Dextrose (BDA), à temperatura ambiente (28 a 30°C), sendo repicados mensalmente.

Avaliação da composição do óleo essencial de cravo

Amostras do óleo essencial de *S. aromaticum* foram submetidas à análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) no aparelho Shimadzu QP5050A utilizando coluna capilar de sílica fundida (CBP-5; 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), mantendo-se fluxo de 1 mL min⁻¹ de hélio, e aquecimento com temperatura programada (60°C por 2 min; 3°C por min até 240°C; 10°C por min até 280°C e finalmente 280°C por 10 min), e energia de ionização de 70 eV. O volume de injeção foi de 1 μ L, no modo Split com razão de 1:5. A identificação dos componentes foi realizada por comparação dos espectros de massa e índices de retenção com os valores da literatura para os componentes mais comuns de óleos essenciais (Nist, 1998; Gayoso et al., 2005; Myint et al., 2006; Oliveira et al., 2006; Adams, 2001; Pereira et al., 2008). Os índices de retenção foram calculados através da co-injeção de uma mistura de hidrocarbonetos, C8 - C32 (Dool & Kratz, 1963).

Investigação da atividade antifúngica do óleo de *S. aromaticum*

Para se investigar o efeito do óleo essencial de *S. aromaticum* sobre o crescimento de *F. oxysporum*, *F. solani*, *M. phaseolina* e *R. solani* discos de 5 mm de diâmetro da colônia jovem desses fungos que foram depositados em frascos de vidro de 10 mL, previamente esterilizados contendo 3 mL de caldo Sabouraud 2% e o óleo essencial à 0,15%. Simultaneamente foram feitos controles negativos (sem óleo). Após 12 horas de incubação, os discos foram levados ao microscópio óptico, para análise das alterações celulares das hifas. As imagens foram obtidas por sistema de captura de imagens em microscópio Olympus BX40, acoplado a câmera Sony CCD-Iris, e ao programa Image Pro Life.

Para investigar o efeito fungistático ou fungicida do óleo essencial da *S. aromaticum* sobre os fungos citados anteriormente, os discos de BDA contendo os micélios tratados com óleo essencial na concentração de 0,15%, foram incubados

novamente em placas de Petri contendo meio BDA e mantidos a temperatura ambiente por 10 dias, a fim de se observar o crescimento radial das colônias dos fungos fitopatogênicos estudados. Esses experimentos foram realizados em duplicata.

RESULTADO

Avaliação da composição química do óleo essencial de *S. aromaticum*

Na análise por cromatografia gasosa (Figura 1), evidenciou-se que o óleo essencial de *S. aromaticum* comercial empregado nesse experimento contém como componentes majoritários: eugenol (83,6%) - pico 3; acetato de eugenila (11,6%) - pico 5 e cariofileno (4,2%) - pico 7.

Avaliação da atividade antifúngica do óleo de *S. aromaticum*

A análise microscópica dos micélios dos fungos evidenciou diversas alterações morfológicas. As Figuras 2A, 2C, 2E e 2G representam os controles de *R. solani*, *F. oxysporum*, *F. solani* e *M. phaseolina*. As Figuras 2B, 2D, 2F e 2H representam os tratamentos, respectivamente. Foram evidenciadas

a presença de vacúolos e desorganização dos conteúdos celulares (Figuras 2B, 2D, 2F), diminuição na nitidez da parede celular (Figura 2D), intensa fragmentação das hifas (figuras 2F, 2H), além de menor turgência das mesmas (Figuras 2D, 2F, 2H), o que pode ser considerado um indicativo de degeneração celular.

Foi observado que, ao se reinocular em meio de cultura BDA os discos contendo os micélios dos fungos tratados com óleo essencial, os fungos *F. oxysporum*, *F. solani* e *R. solani* não retomaram o crescimento, apenas *M. phaseolina* não teve o crescimento inibido na concentração utilizada. Os valores do diâmetro das colônias são expressos na Tabela 1.

DISCUSSÃO

A composição química do óleo essencial de cravo da Índia encontrado no comércio da cidade de Goiânia está de acordo com os valores referenciais descritos na literatura (Ranasinghe et al., 2002; Banerjee et al., 2006; Pereira et al., 2008).

A inibição de fungos pelo óleo essencial de *S. aromaticum* pode ser justificada pela grande porcentagem de eugenol, composto fenólico

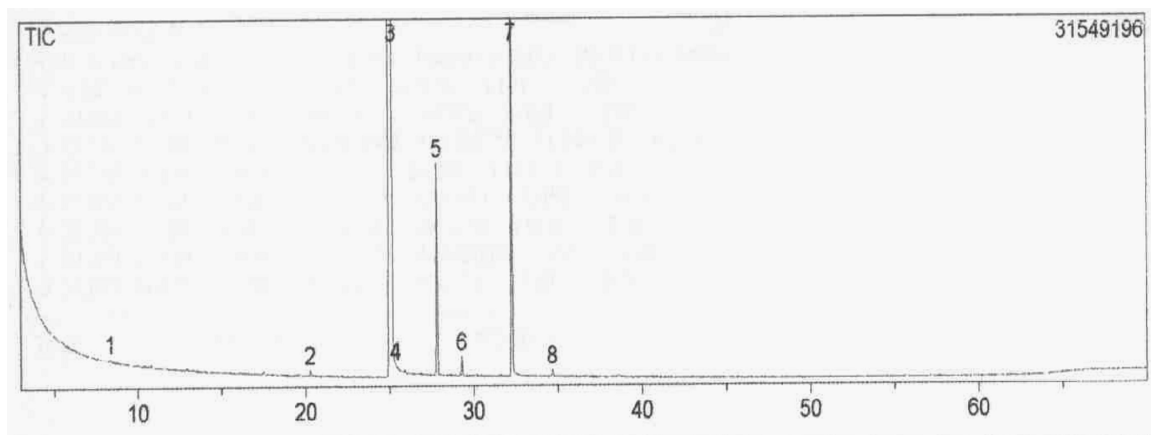


FIGURA 1. Cromatografia gasosa do óleo essencial de *S. aromaticum* obtido no comércio em Goiânia/GO.

TABELA 1. Efeito do óleo essencial de *S. aromaticum* a 0,15% sobre o crescimento dos fungos *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Rhizoctonia solani* e *Macrophomina phaseolina*.

| Fungos testados | Inibição do crescimento micelial*(%) | Crescimento radial (diâmetro - cm)* |
|----------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|
| <i>F. oxysporum</i> | 100 | 0 |
| <i>F. solani</i> | 100 | 0 |
| <i>R. solani</i> | 100 | 0 |
| <i>M. phaseolina</i> | 0 | 5,3 |

*Valores médios de duas repetições comparados aos controles negativos.

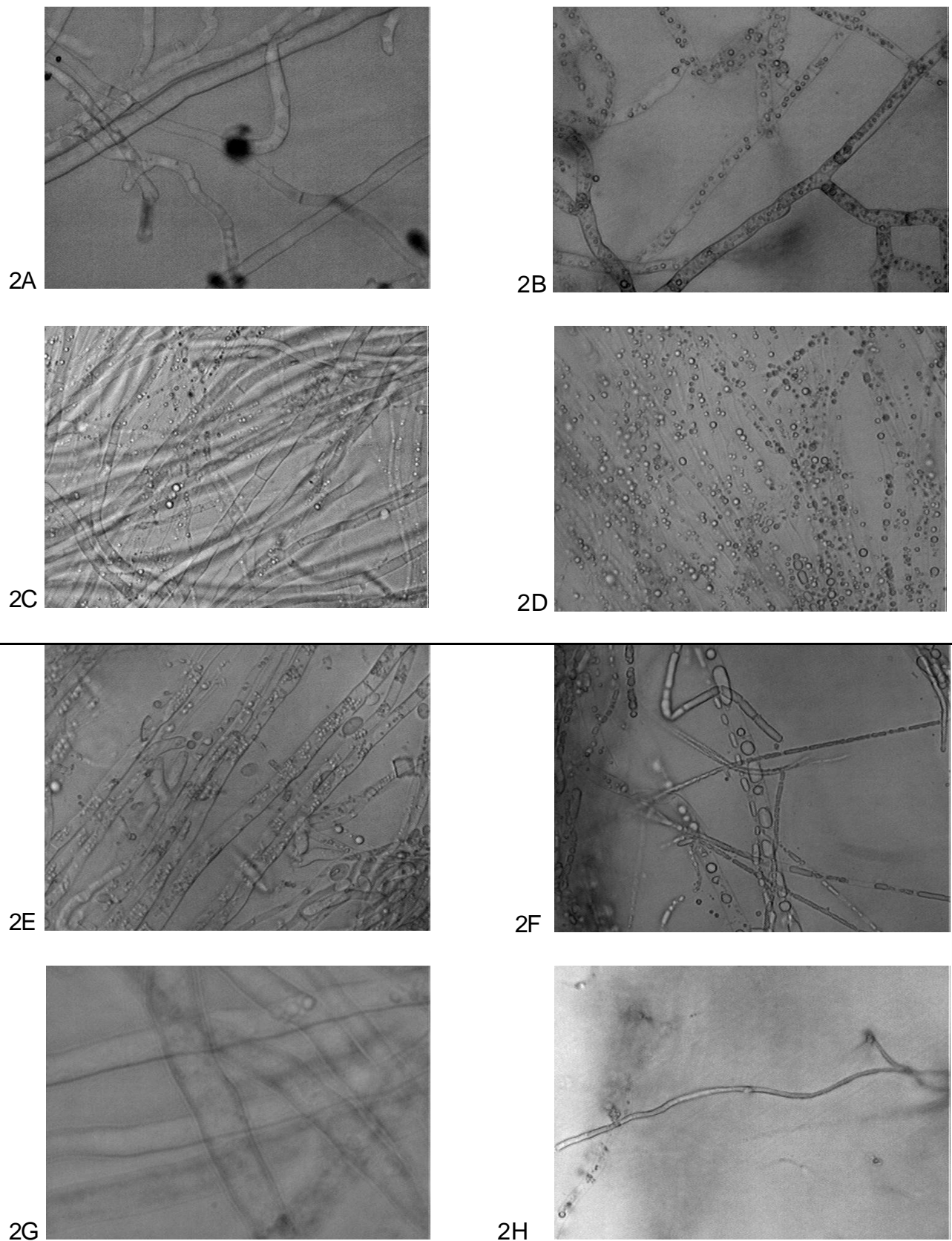


FIGURA 2. Microscopia óptica através de um sistema de captura de imagens dos micélios de fungos fitopatogênicos tratados com 0,15% de óleo essencial da *S. aromaticum*: *R. solani* (**2A**-controle e **2B**-tratamento), aumento de 40 X; *F. oxysporum* (**2C**-controle e **2D**-tratamento), aumento de 40 X; *F. solani* (**2E**-controle e **2F**-tratamento), aumento de 40 X; *M. phaseolina* (**2G**-controle e **2H**-tratamento), aumento de 100 X (2G) e de 40 X (2H).

antisséptico de ação já conhecida (Ranasinghe et al., 2002; Daferera et al., 2003; Amaral & Bara, 2005; Gayoso et al., 2005). Os resultados concordam com avaliação feita por Amaral & Bara (2005) referente à influência da atividade antifúngica do óleo de cravo em concentrações de 0,1 a 0,5% sobre fitopatógenos presentes em sementes de arroz, feijão, soja e milho. Tal propriedade foi confirmada por Silva (2008), que descreve diminuição do crescimento micelial do fungo *Rhizopus stolonifer*, em meio de cultura com óleo essencial de cravo, em concentrações de 200, 400, 600 e 800 mg mL⁻¹. A atividade antifúngica do óleo essencial está relacionada com sua hidrofobicidade, a qual os permite interagir com os lipídeos da parede, membrana celular e da mitocôndria, alterando a permeabilidade, causando distúrbios nestas estruturas. Os componentes do óleo podem ligar-se a íons e moléculas (hormônios) de outras células. É relatado também por Silva et al. (2003) que os antifúngicos naturais provocam danos à membrana celular das células expostas a eles, deixando-as extremamente solúveis e com fraturas grosseiras que acabam por expor o conteúdo celular, inclusive o núcleo.

Esses dados podem justificar a atividade fungicida do óleo de cravo na concentração de 0,15% sobre o crescimento de *F. oxysporum*, *F. solani* e *R. solani*. Em relação ao crescimento de *M. phaseolina*, de acordo com a análise microscópica do micélio, não foi observada vacuolização celular e rompimento de hifas, o que pode justificar a não inibição do crescimento.

Dhingra et al. (2004) verificaram que o óleo das sementes de mostarda - *Brassica* spp adicionada ao solo inibiu *in vitro* o crescimento de *R. solani* e sugeriram que o mecanismo de inibição envolvido no controle do fitopatógeno está relacionado à presença de substâncias como allisotiocianato (AITC) produzidos pelos tecidos dessas sementes. Como essa substância não é encontrada no óleo essencial de cravo, acredita-se que o mecanismo de ação envolvido na inibição seja diferenciado.

Os experimentos realizados no presente trabalho permitem observar que o óleo de cravo causou danos celulares aos fungos, no entanto, o mecanismo de ação ainda não está esclarecido. Deve-se ressaltar que não se pode descartar a possível atividade antifúngica das substâncias minoritárias presentes no óleo essencial da espécie estudada. Avaliações complementares devem ser realizadas a fim de que se possa determinar se o acetato de eugenila e o cariofileno também exercem efeito antifúngico e se esses compostos atuam sinergicamente.

Assim, de acordo com os resultados alcançados nesse trabalho, existe a indicação de boas perspectivas para uso experimental do óleo essencial de *S. aromaticum*. O controle de fitopatógenos em casa de vegetação e em campo deve ser investigado,

uma vez que a exposição à radiação solar direta e umidade relativa possibilite a redução da atividade antifúngica, conforme descrito por Diniz et al. (2006) em experimentos realizados a campo utilizando extratos combinados de cravo e outras espécies, atomizados sobre a cultura, para controle de *Phytophthora infestans* (de Bary) causador da "requeima do tomateiro".

Estudos posteriores deverão investigar também o comportamento *in vivo* desse óleo, a fim de que produtos derivados de *S. aromaticum* possam ser utilizados como uma alternativa aos fungicidas sintéticos.

AGRADECIMENTO

Ao CNPq (PIBIC) pela concessão das bolsas e a SECTEC/GO pelo auxílio financeiro.

REFERÊNCIA

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2001. 456p.
- AMARAL, M.F.Z.J.; BARA, M.T.F. Avaliação da atividade antifúngica de extratos de plantas sobre o crescimento de fitopatógenos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.2, n.2, p.5-8, 2005.
- BANERJEE, S. et al. Clove (*Syzygium aromaticum*), a potential chemopreventive agent for lung cancer. **Carcinogenesis**, v.77, n.8, p.1645-54, 2006.
- BANERJEE, S.; DAS, S. Anticarcinogenic effects of an aqueous infusion of cloves on skin carcinogenesis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v.6, p.304-8, 2005.
- BASTOS, C.N.; ALBUQUERQUE, P.S.B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle pós-colheita de *Colletotricum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, v.26, n.5, p.555-7, 2004.
- COITINHO, R.L.B.C. et al. Efeito residual de inseticidas naturais no controle de *Sitophilus zeamais* Mots. em milho armazenado. **Revista Caatinga**, v.19, n.2, p.183-91, 2006.
- COSTA, A.F. **Farmacognosia: farmacognosia experimental**. 3.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2001. 992p.
- DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, M.G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium sp.*, and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Journal of Crop Protection**, v.22, p.39-44, 2003.
- DHINGRA, O.D. et al. Essential oil of mustard to control *Rhizoctonia solani* causing seedling damping off and seedling blight in nursery. **Fitopatologia Brasileira**, v.29, n.6, p.683-6, 2004.
- DINIZ, L.P. et al. Avaliação de produtos alternativas para controle da requeima do tomateiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.31, n.2, p.171-9, 2006.
- DOOL, H.V.D.; KRATZ, P.D.J.A. Generalization of the retention index system including linear temperature

- programmed gas-Liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography**, v.11, p.463-71, 1963.
- GAYOSO, C.W. et al. Sensitivity of fungi isolated from onychomycosis to *Eugenia caryophyllata* essential oil and eugenol. **Fitoterapia**, v.76, p.247-9, 2005.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.
- MYINT, S. et al. Gas chromatographic determination of eugenol in ethanol extract of cloves. **Journal of Chromatography B**, v.679, p.193-5, 1996.
- NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY - NIST. **PC version of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Database**. Gaithersburg: U. S. of Commerce, 1998.
- NZEAKO, B.C.; LAWATI, B.A. Comparative studies of antimycotic potential of thyme and clove oil extracts with antifungal antibiotics on *Candida albicans*. **African Journal of Biotechnology**, v.7, n.11, p.1612-19, 2008.
- OLIVEIRA, F.P. et al. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical materials. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.4, p.510-6, 2006.
- PAHLOW, M. **Das grosse buch der heilpflanzen: gesund durch die heilkräfte der natur**. Slovka: Weltbild Verlag, 2004. 526p.
- PAOLI, S. et al. Effects of clove (*Caryophyllus aromaticus* L.) on the Labeling of blood constituents with technetium and on the morphology of red blood cells. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.50, p.175-82, 2007.
- PARK, M. et al. Antifungal activities of the essential oil in *Syzygium aromaticum* and *Leptosmum petersonii* bailey and their constituents against various dermatophytes. **The Journal of Microbiology**, v.45, n.5, p.460-5, 2007.
- PEREIRA, A.A. et al. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, v.32, n.3, p.887-93, 2008.
- PINTO, C.E.M. et al. Fungitoxicidade associada ao extrato etanólico de cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*) sobre *Cladosporium shpaerospermum*. In: CONGRESSO DE PESQUISA E INOVAÇÃO DE REDE NORTE NORDESTE DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA, 3., 2008. Fortaleza. **Resumo Impresso**. Fortaleza: CEFET, 2008. p.11-2.
- RANASINGHE, L. et al. Fungicidal activity of essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* (L.) and *Syzygium aromaticum* (L.) L.M.Perry against crown rot and anthracnose pathogens isolated from banana. **Letters in Applied Microbiology**, v.35, p.208-11, 2002.
- REIS, T.M. et al. Óleos essenciais extraídos dos talos e frutos do craveiro-da-Índia. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UESC/CIÊNCIAS EXATAS DA TERRA E ENGENHARIAS, 12., 2006, Ilhéus. **Anais... Ilhéus**, 2006. p.284-5.
- SILVA, D.M.; BASTOS, C.N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Criniphellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v.32, n.2, p.143-4, 2007.
- SILVA, F.C. **Efeito *in vitro* e *in vivo* dos óleos essenciais de condimentos sobre fungos que ocorrem em pós-colheita em frutos de morango e mamão**. 2008. 85p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- SILVA, S.R.S. et al. Análise de constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.6, p.63-70, 2003.
- SOUZA, M.A.A. et al. Composição química do óleo fixo de *Croton cajucara* e determinação das suas propriedades fungicidas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.599-610, 2006.