

CARVACROL: AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIBACTERIANO E CITOTÓXICO *IN VITRO*

SUZANE OLACHEA ALLEND¹; KAMILA FURTADO DA CUNHA ²; MARCELLE OLIVEIRA GARCIA³; SUÉLEN CAVALHEIRO AMARAL⁴; SILVIA DE OLIVEIRA HÜBNER⁵; DAIANE DRAWANZ HARTWIG⁶

¹*Universidade Federal de Pelotas* – Suzane.olachea@yahoo.com.br

²*Universidade Federal de Pelotas* – kamilafurtado1@hotmail.com

³*Universidade Federal de Pelotas* – marcelle.garcia@hotmail.com

⁴*Universidade Federal de Pelotas* – suelen.ca@hotmail.com

⁵*Universidade Federal de Pelotas* – suhubner@yahoo.com.br

⁶*Universidade Federal de Pelotas* – daianehartwig@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

O aumento da mortalidade em pacientes com doenças infecciosas no ambiente hospitalar, relacionado à resistência aos antimicrobianos, representa um grave problema em saúde pública. Infecções nosocomiais são preocupantes, uma vez que os pacientes hospitalizados estão imunocomprometidos, com comorbidades e susceptíveis às infecções (GARZA et al., 2018).

A resistência a múltiplas drogas (MDR) cresce num ritmo alarmante entre as espécies bacterianas. No ambiente hospitalar destacam-se particularmente os bacilos Gram-negativos pertencentes às espécies: *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii* (SAGHI et al., 2015; GARZA et al., 2018).

A MDR limita as opções terapêuticas para tratamento das infecções causadas por estes patógenos, justificando a busca por novas alternativas. Neste sentido, fármacos que sejam mais eficientes e menos tóxicos ao hospedeiro vêm sendo avaliados, dentre eles, destacam-se os de origem vegetal (SOUZA et al., 2014; RAEI et al., 2017). Os óleos essenciais (OE) e extratos são produtos naturais extraídos de diferentes plantas e, devido às suas propriedades antibacterianas e antifúngicas, podem ser considerados uma nova alternativa terapêutica para o tratamento de doenças infecciosas, além disso, podem apresentar propriedades antioxidantes e anticancerígenas. A atividade antimicrobiana de vários OE tem sido atribuída à presença de compostos fenólicos, dentre eles o carvacrol, um fenol monoterpenóide, um dos compostos com maior atividade antimicrobiana dentre os compostos voláteis. O carvacrol é predominante no OE de plantas da família Labiatae, incluindo orégano (*Origanum vulgare*) e tomilho (*Thymus vulgaris*) (RAEI et al., 2017; ALTHUNIBAT et al., 2016; GARZA et al., 2018).

Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antibacteriana do carvacrol frente as bactérias Gram-negativas *P. aeruginosa* e *A. baumannii*, bem como, determinar o efeito citotóxico deste composto “*in vitro*” em células de mamífero.

2. METODOLOGIA

O composto carvacrol utilizado neste estudo foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich. A avaliação da atividade antibacteriana do carvacrol seguiu conforme preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2017). A determinação da concentração mínima inibitória (CIM) foi feita pelo método de microdiluição em caldo utilizando microplacas de 96 cavidades. Para

os testes foram utilizadas as cepas padrão de *P. aeruginosa* ATCC 27853 e de *A. baumannii* ATCC 19606. O inóculo foi preparado com suspensão bacteriana contendo 1×10^4 UFC.mL⁻¹ em caldo Muller Hinton (MH) (CLSI, 2017). As concentrações do carvacrol avaliadas variaram de 0,027 a 56 mg.mL⁻¹. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Para leitura dos resultados foram adicionados 20 µL de Resazurina 0,02% (Sigma) nas cavidades da placa. A partir dos resultados obtidos no ensaio para determinação da CIM, foi realizada a concentração bactericida mínima (CBM), também segundo CLSI, 2017.

Para a avaliação da citotoxicidade do carvacrol *in vitro* frente a células de mamíferos, foram utilizadas células da linhagem *Madin Darby Bovine Kidney* (MDBK) e seguiu o método proposto por PICOLI et al., (2015). Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$), com auxílio do software SAS System for Windows versão 8.0.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os produtos naturais são uma fonte importante de princípios ativos para o tratamento de várias doenças. Diferentes estudos descrevem a atividade antibacteriana de óleos de plantas, incluindo componentes individuais como o carvacrol (ARFA et al., 2006; SAGHI et al., 2015; ALTHUNIBST et al., 2016; RAEI et al., 2017; GARZA et al., 2018).

Neste estudo, foi encontrada atividade antibacteriana do carvacrol frente à *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, com CIM de 1,87 mg.mL⁻¹ e 3,75 mg.mL⁻¹, respectivamente, e com CBM de 3,75 mg.mL⁻¹ e 7,5 mg.mL⁻¹, respectivamente. Alguns mecanismos foram propostos para explicar a atividade antimicrobiana do carvacrol em bactérias, como a desintegração da membrana externa de bactérias Gram-negativas (composto lipofílico), liberando o lipopolissacarídeo (LPS) e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática (ULTEE, 1999).

Um dos problemas no uso de OE é que a sua composição pode variar significativamente dependendo da localização geográfica, variedade e idade da planta, procedimento de secagem e o método de extração (SAGHI et al., 2015; RAEI et al., 2017). Assim, utilizar o composto isolado, como o carvacrol, seria uma alternativa no tratamento de infecções bacterianas (GARZA et al., 2018).

Neste estudo, avaliamos também o efeito citotóxico do carvacrol (FIGURA 1), o qual foi possível relacionar que quanto menor a concentração do carvacrol maior a viabilidade celular. Ainda, foi possível determinar que concentrações acima de 0,109 mg.mL⁻¹ de carvacrol, diminuem a viabilidade celular, indicando maior grau de toxicidade. Isso corrobora com o encontrado por SOUZA et al, (2014), onde demonstraram que o carvacrol não apresentou citotoxicidade na concentração de 0,05 mg.mL⁻¹.

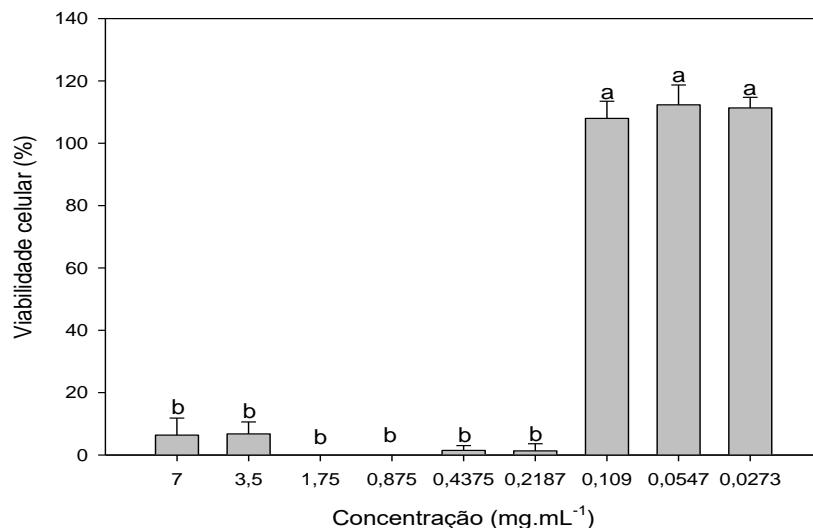


Figura 1: Ensaio de citotoxicidade do carvacrol em células MDBK.

4. CONCLUSÕES

O carvacrol é uma potente alternativa no tratamento contra bactérias Gram-negativas multirresistentes. Este composto apresentou atividade antibacteriana frente a *A. baumannii* e *P. aeruginosa*, com CIM de $1,87 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $3,75 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente e CBM de $3,75 \text{ mg.mL}^{-1}$ e $7,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, respectivamente. Apesar disso, apresentou maior grau de toxicidade em células MDBK, já que em concentrações acima de $0,109 \text{ mg.mL}^{-1}$ deste composto, a viabilidade celular diminui. Novos estudos, capazes de diminuir a concentração do composto, bem como sua toxicidade se faz necessário, sendo a combinação de compostos uma boa alternativa.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GARZA, B. A. A.; IBARIAS, P. B.; TORRES, N. W.; ARANDA, R. S.; OLAZARÁN, S. M.; LÓPEZ, L. A. P.; TREVIÑO, S. F.; GONZÁLEZ, E. G. Antimicrobial activity of essential oils-derived volatile compounds against several nosocomial pathogens including representative multidrugresistant *A. baumannii* clinical isolates. **Journal of Essential Oil Research.** v. 30, n.5, p.341-346, 2018.
- SAGHI, H.; BAHADOR, A.; KHALEDI, A.; KACHOEI, R. A.; DASTJERDI, F. A.; ESMAEILI, D. antibacterial effects of *Origanum vulgare* essence against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolated from selected hospitals of tehran, iran. **Journal clinical microbiological infection**, v.2, n.1, p.1-5, 2015.
- SOUZA, C. E. S.; LEITE, N. F.; BRITO, D. I. V.; LAVOR, K. L. S. A.; ALENCAR, L. B.B.; ALBUQUERQUE, R. S.; FERREIRA, J. V. A.; FREITAS, M. A.; MATIAS, E. F.F.; ANDRADE, J. C.; TINTINO, S. R.; MORAIS, M. F.B.; VEJA, C.; COUTINHO, H. D.M. Avaliacao da atividade citotoxica e potencial antiparasitário *in vitro* do α -pineno e carvacrol Cytotoxic and antiparasitic *in vitro* activities of α -pinene and carvacrol. **Acta Toxicol. Argent.** V.22, n.2, p.76-80, 2014.

RAEI, P.; POURLAK, T.; MEMAR, M.Y.; ALIZADEH, N.; AGHAMALI, M.; ZEINALZADEH, E.; ASGHARZADEH, M.; KAFIL, H. S. Thymol and carvacrol strongly inhibit biofilm formation and growth of carbapenemase-producing Gram negative bacilli. **Cellular and Molecular Biology**. v.63, p.108-112, 2017.

ALTHUNIBAT, O. Y.; QARALLEH, H.; AL-DALIN, S. Y. A.; ABOUD, M.; KHLEIFAT, K.; MAJALI, I. S.; ALDAL'IN, H. K. H.; RAYYAN, W. A.; AHMAD JAAFRAA, A. Effect of thymol and carvacrol, the major components of *Thymus capitatus* on the growth of *pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Pure and Applied Microbiology**. v.10, n.1, p.367-374, 2016.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100 (ISBN 1-56238-804-5 [Print]; ISBN 1-56238-805-3 [Electronic]). **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 950 West Valley Road, Suite 2500, Wayne, Pennsylvania 19087 USA, 2017.

PICOLI, T.; PICH, C. S.; LOPES, M. G.; TEIXEIRA, A. G.; FISCHER, G. Sensibilidade de linhagens celulares frente à melitina isolada de veneno de abelha. **Science and Animal Health**, v.4, n.2, p.101-116, 2016.

ARFA, A. B.; COMBES, S.; BELLOY, P. L.; GONTARD, N.; CHALIER, P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology**. V.43, p.149-154, 2006.

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; SMID, E. J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and environmental microbiology**. v.65, n. 10, p. 4606-4610, 1999.