

Carvacrol e Seus Derivados Semissintéticos como Potenciais Agentes Antibacterianos

Carvacrol and its Semi-synthetic Derivatives as Potential Antibacterial Agents

Isabelle H. Castro,^{a,b}  Fabrício A. A. Oliveira,^b Carla C. Perez,^b  Marcelle L. F. Bispo^{b,*} 

^aUniversidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Curso de Farmácia. Avenida Robert Koch 60, Vila Operária. CEP 86039-440, Londrina-PR, Brasil.

^bUniversidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Departamento de Química. Rodovia Celso Garcia Cid, PR 445, Km 380, Campus Universitário, Cx. Postal 10.011, CEP 86057-970, Londrina-PR, Brasil.

*E-mail: mlfbispo@uel.br

Recebido em: 23 de Maio de 2022

Aceito em: 10 de Março de 2023

Publicado online: 24 de Abril de 2023

Pathogenic bacteria resistance is a huge concern for global public health because several infectious diseases, such as tuberculosis and pneumonia, before easily treatable, became dangerous due to the lack of effective and safe drugs to fight them. Thus, searching for new substances with activity against resistant bacteria is necessary, which may become future drug candidates to combat these infections. In this context, stands out the carvacrol, a phenolic monoterpene produced by several aromatic plants, with important antimicrobial properties reported in the literature. Furthermore, several carvacrol derivatives were obtained by semisynthesis to optimize their physical properties and biological activities. Therefore, the present study aims to gather and discuss pieces of evidence of antibacterial activity exhibited by carvacrol and its derivatives.

Keywords: Monoterpene; bacterial resistance; antibacterial activity.

1. Introdução

1.1. Bactérias

Bactérias são microrganismos unicelulares cuja estrutura celular é constituída basicamente por uma membrana plasmática que delimita o citoplasma, onde se encontram dispersos os ribossomos, organelas responsáveis pela síntese de proteínas, e o material genético. Devido à ausência de uma membrana nuclear, são classificadas como seres procariontes.

A maioria das bactérias também possui uma parede celular, localizada externamente à membrana plasmática, cuja principal função é conferir rigidez e prevenir a ruptura da célula em casos de alta pressão osmótica interna, determinando seu formato. Essa estrutura é quimicamente composta por peptidoglicano, um heteropolissacarídeo formado por unidades sacarídicas de *N*-acetilglicosamina e ácido *N*-acetilmurâmico, unidas por ligações cruzadas de pentapeptídeos. No entanto, a localização e a espessura da camada de peptidoglicano pode variar entre as bactérias, logo essas diferenças são utilizadas para classificá-las em dois grandes grupos de acordo com o tipo parede celular: Gram-positivas e Gram-negativas.

Essa denominação é atribuída com base em um tipo de procedimento de coloração das células bacterianas, desenvolvida pelo bacteriologista Hans Christian Joachim Gram em 1884.¹ Após aplicação de um corante básico seguido do tratamento com etanol, as bactérias Gram-positivas retêm o corante, enquanto as Gram-negativas descoram. Assim, é preciso utilizar um outro corante para que seja possível observar as Gram-negativas.² Essa coloração diferencial é possível pois as paredes celulares de bactérias Gram-positivas apresentam uma espessa camada de peptidoglicano contendo ácidos teicoicos. Em contrapartida, a parede celular das bactérias Gram-negativas é composta por poucas camadas de peptidoglicano, circundadas por uma membrana externa que contém lipopolissacarídeos, que funcionam como endotoxinas, sendo responsáveis pelo início da sepse causada por bactérias Gram-negativas.³

Apesar da coloração de Gram ter grande importância para a classificação das bactérias, não são todas que se coram adequadamente por essa técnica. Por exemplo, as micobactérias, que compreendem as bactérias do gênero *Mycobacterium*, apresentam em suas paredes celulares uma camada rica em lipídeos, chamados de ácidos micólicos. Esses componentes estão ligados a polissacarídeos denominados arabinogalactanos que, por sua vez, revestem a camada de peptidoglicano. Dessa forma, essas estruturas conferem uma camada cerosa à superfície celular, que impede a coloração adequada pela técnica de Gram e, portanto, as micobactérias são classificadas como álcool-ácido resistentes. Nesses casos, utiliza-se uma

técnica desenvolvida por Franz Ziehl e Friedrich Neelsen em 1882, denominada coloração de Ziehl-Neelsen. Esse método utiliza uma mistura do corante fucsina (de caráter básico e cor vermelha) e fenol, que possui papel de ampliar a penetração do corante, com posterior utilização do contra corante azul de metileno.⁴

As bactérias exercem um papel imprescindível para a manutenção da vida na Terra, estando amplamente distribuídas no meio ambiente, além de estarem presentes na microbiota animal. Por exemplo, em um ser humano adulto, há cerca de cem vezes mais células procarióticas do que eucarióticas, graças à presença da microbiota que, dentre outras funções, possui um papel muito importante na defesa do organismo contra outros microrganismos que tenham potencial patogênico através da produção de substâncias microbicidas. Além disso, as bactérias da microbiota exercem papel fundamental no trato gastrointestinal, para garantir que haja a metabolização e absorção dos nutrientes obtidos na alimentação.⁵

Contudo, a existência de bactérias patogênicas ainda é uma grande preocupação para a população humana. Algumas acarretam problemas ao trato gastrointestinal como, por exemplo, a bactéria Gram-negativa *Vibrio cholerae*, causadora da cólera. O trato geniturinário também pode ser contaminado por bactérias, como *Neisseria gonorrhoeae*, causadora da gonorreia, um tipo de infecção sexualmente transmissível. Há, ainda, as que comprometem a pele e as mucosas, como a *Leptospira interrogans*, causadora da leptospirose em humanos, ou a *Borrelia burgdorferi*, causadora da doença de Lyme, que é transmitida por carrapatos.⁶

Por fim, existem as bactérias que acometem o sistema respiratório, como o *Mycobacterium tuberculosis*, uma micobactéria também conhecida como bacilo de Koch, causadora da tuberculose (TB). A TB é uma doença negligenciada que afeta milhões de pessoas anualmente, principalmente populações vulneráveis e de baixa renda.⁷ De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o número de óbitos por TB, em 2019, foi de 1,2 milhão entre pessoas negativas para o vírus HIV (vírus da imunodeficiência humana) e 209 mil entre pessoas soropositivas. Em 2020, devido a pandemia de COVID-19 (sigla em inglês para “coronavirus disease 2019”), esses números aumentaram ainda mais, em decorrência da dificuldade de acesso ao tratamento, passando para 1,3 milhão de óbitos entre pessoas soronegativas e 214 mil entre pessoas soropositivas.⁸

1.2. Resistência bacteriana

O tratamento para infecções bacterianas se dá pelos fármacos antibacterianos, conhecidos como antibióticos, que foram historicamente responsáveis pela diminuição das taxas de morbidade e mortalidade associadas a essas infecções.⁹ No entanto, as bactérias podem sofrer alterações, em adaptação e resposta ao medicamento utilizado, o que

dá origem ao processo denominado resistência bacteriana. Uma vez que as cepas das bactérias se tornam resistentes a antibióticos, a infecção provocada por elas se torna um obstáculo muito maior do que aquelas causadas por bactérias sensíveis, o que leva ao aumento dos custos de tratamento, prolongamento de hospitalizações e, por conseguinte, aumento da mortalidade.¹⁰

A resistência bacteriana é um processo que ocorre naturalmente, entretanto, o uso irracional e incorreto dos antibióticos contribui para que aconteça em maior velocidade e, dessa forma, é uma preocupação crescente que acomete o mundo todo.¹⁰ As bactérias podem ser resistentes devido a alguma característica estrutural ou funcional pertencente à espécie, sendo denominada como resistência intrínseca ou natural. Outra possibilidade é a resistência não natural ou adquirida, que pode acontecer por meio de mutações no DNA do microrganismo ou pela transferência horizontal de genes, mecanismo pelo qual a bactéria pode adquirir genes de resistência provenientes de outros microrganismos.⁹

Os principais mecanismos pelos quais uma bactéria pode ser resistente aos antimicrobianos são: inativação enzimática; modificação do alvo do antibiótico; bombas de efluxo e alteração na permeabilidade da membrana plasmática. A inativação enzimática se dá quando o microrganismo produz um tipo de enzima capaz de alterar propriedades do fármaco, promovendo a sua degradação e inativação. A modificação estrutural do alvo molecular dificulta ou impede a interação entre fármaco e a macromolécula-alvo, conferindo resistência. Já as bombas de efluxo não permitem que haja uma alta concentração do fármaco no meio intracelular, uma vez que transportam a substância para o meio extracelular, impedindo a sua ação. Por fim, as bactérias podem promover alterações na quantidade de lipopolissacarídeos ou de porinas na membrana plasmática, o que confere mudança na permeabilidade, criando um impasse para a ação de fármacos.⁹

No ano de 1960, após a descoberta de cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina G (**1**, Figura 1), outro antibiótico beta-lactâmico denominado metilina foi lançado no mercado (**2**, Figura 1). Entretanto, já em 1961, foram descobertas cepas de *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA, do inglês “methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”), cujo mecanismo de resistência está relacionado a alteração do alvo molecular do fármaco. Uma vez que a resistência à metilina passou a ser disseminada pelos microrganismos, deu-se início à utilização dos glicopeptídeos como alternativa terapêutica.¹¹

A vancomicina (**3**, Figura 2) é um glicopeptídeo bastante utilizado em tratamentos de infecções provocadas por MRSA. Contudo, essa prática pode ter sido a razão do surgimento de cepas de *Enterococcus spp.* resistentes à vancomicina (VRE, do inglês “vancomycin-resistant *Enterococcus*”) no ano de 1988. O mecanismo de resistência se dá por alterações em sua parede celular, o que impede a ligação do fármaco no alvo molecular.¹¹

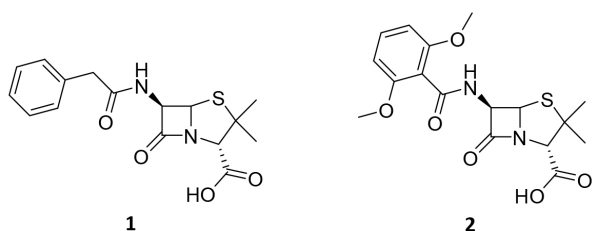


Figura 1. Estruturas químicas das penicilinas: penicilina G (1) e meticilina (2)

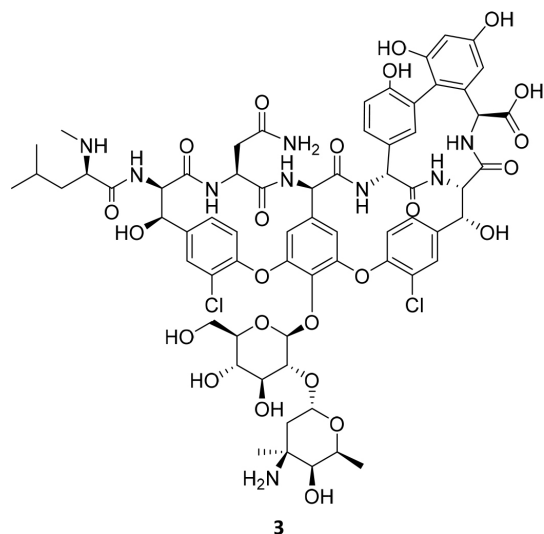


Figura 2. Estrutura química do glicopeptídeo vancomicina (3)

Algumas bactérias podem ser resistentes a mais de um medicamento, o que torna o tratamento ainda mais complexo. Como exemplo, pode-se citar a TB, cujo tratamento de primeira escolha consiste em uma associação de medicamentos, como rifampicina (4, Figura 3), isoniazida (5, Figura 3), pirazinamida (6, Figura 3) e etambutol (7, Figura 3). No entanto, existem cepas de *M. tuberculosis*

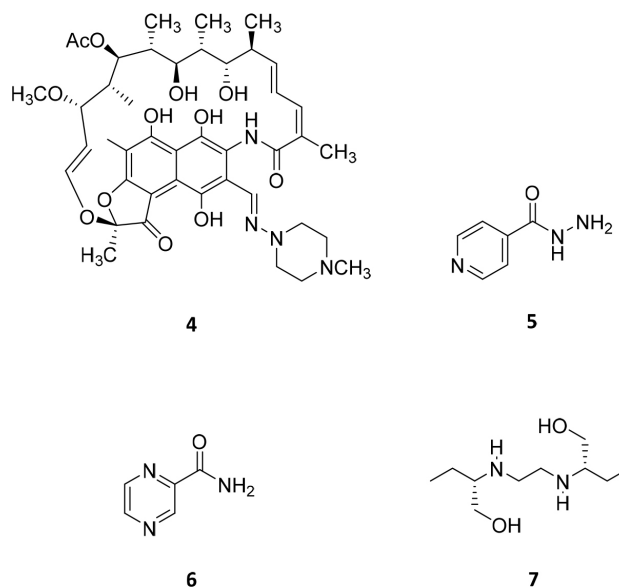


Figura 3. Estruturas químicas dos fármacos de primeira escolha utilizados no tratamento da tuberculose: rifampicina (4), isoniazida (5), pirazinamida (6) e etambutol (7)

multirresistentes (MDR-TB, do inglês “multidrug-resistant TB”), que são resistentes à isoniazida e rifampicina e, por isso, são praticamente incuráveis por meio desse esquema terapêutico. Portanto, a disseminação contínua da MDR-TB é uma preocupação crescente para a saúde pública, uma vez que dificulta ainda mais o controle global da doença.¹²

Além de serem resistentes à rifampicina (4, Figura 3) e isoniazida (5, Figura 3), existem cepas de *M. tuberculosis* extensivamente resistentes (XDR, do inglês “extensively drug-resistant”) que também apresentam resistência a alguma das fluoroquinolonas (como o levofloxacino, 8, Figura 4) e, a pelo menos, um fármaco injetável de segunda escolha (como a capreomicina, 9, Figura 4). MDR-TB e XDR-TB requerem mais tempo para o tratamento, além de

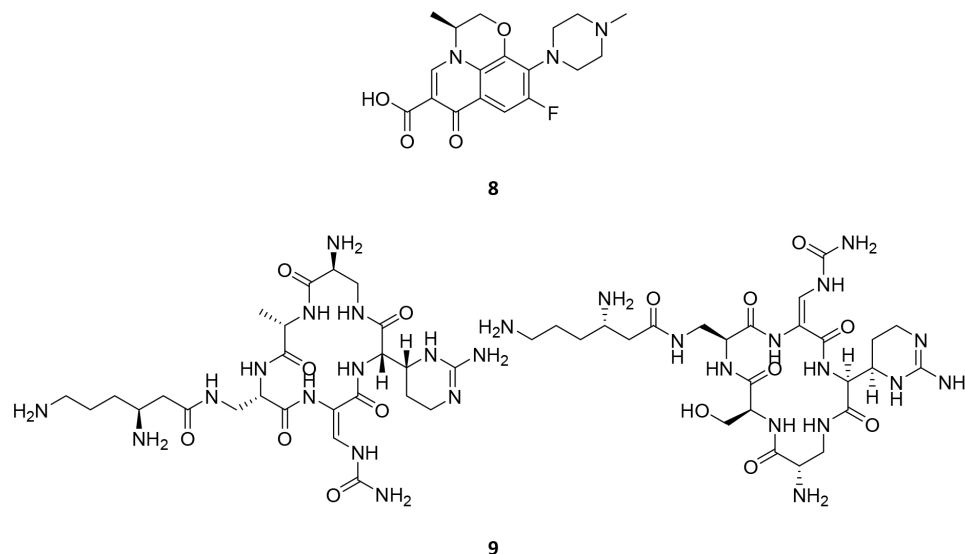


Figura 4. Estruturas químicas dos fármacos de segunda escolha usados no tratamento da tuberculose: levofloxacino (8) e capreomicina (9)

exigirem o uso de fármacos de maior custo e que causam mais reações adversas do que aqueles de primeira escolha (Figura 3).¹³

Desse modo, a resistência bacteriana se torna uma preocupação global e crescente a cada ano. O surgimento e disseminação de linhagens resistentes, em conjunto com a identificação de novos mecanismos de resistência a fármacos, ameaça o combate às doenças bacterianas infecciosas, em especial aquelas de difícil tratamento, como a TB.

1.3. Descoberta e desenvolvimento de novos fármacos antibacterianos

Apesar da diminuição da eficácia dos antibióticos ao longo das últimas décadas, houve baixo investimento para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes antibacterianos, levando poucos candidatos a ensaios clínicos. Isso pode ser comprovado pelo relatório publicado pela OMS em abril de 2021, que analisou os agentes antibacterianos que estavam em desenvolvimento clínico e pré-clínico em 2020, os quais poderiam potencialmente atingir os pacientes nos próximos 8 a 10 anos. Essa análise

foi realizada considerando fármacos que atuam em bactérias resistentes a medicamentos descritos na lista de prioridades da OMS (Tabela 1), em *Mycobacterium tuberculosis* e em *Clostridioides difficile*. Esse relatório mostrou que existem apenas 68 candidatos sob investigação, sendo 43 antibióticos tradicionais e combinações com uma nova entidade química e 27 agentes antibacterianos não tradicionais (por exemplo, medicamentos moduladores do microbioma, anticorpos, agentes imunomoduladores e enzimas derivadas de fagos). Dos 43 antibióticos tradicionais, 12 estão sendo desenvolvidos para atuar contra *M. tuberculosis*, 5 contra *C. difficile* e 26 contra patógenos prioritários da OMS, sendo que a maioria deles se encontra em fase I de ensaios clínicos.¹⁴

Na Figura 5, pode-se verificar a quantidade de novos antibacterianos aprovados pela primeira vez por agências regulatórias ao redor do mundo (como *United States Food and Drug Administration – FDA*; *European Medicines Agency – EMA*; entre outras), nos últimos 20 anos (2001-2021). Vale ainda destacar que apenas dois são para o tratamento da tuberculose.

Portanto, de um modo geral, o *pipeline* clínico e os antibióticos recentemente aprovados são insuficientes para enfrentar o desafio de conter o surgimento e a disseminação

Tabela 1. Lista global de patógenos prioritários de bactérias resistentes a antibióticos elaborada pela OMS em 2017¹⁵

Prioridade	Patógenos (resistência)
1) Crítica	<i>Acinetobacter baumannii</i> (carbapenêmicos)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (carbapenêmicos)
	<i>Enterobacteriaceae</i> (carbapenêmicos e cefalosporinas de 3ª geração)
2) Alta	<i>Enterococcus faecium</i> (vancomicina)
	<i>Staphylococcus aureus</i> (meticilina e vancomicina)
	<i>Helicobacter pylori</i> (claritromicina)
	<i>Campylobacter</i> (fluoroquinolonas)
	<i>Salmonella spp.</i> , (fluoroquinolonas)
	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (cefalosporinas de 3ª geração e fluoroquinolonas)
3) Média	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (não susceptível a penicilinas)
	<i>Haemophilus influenzae</i> (ampicilina)
	<i>Shigella spp.</i> (fluoroquinolonas)

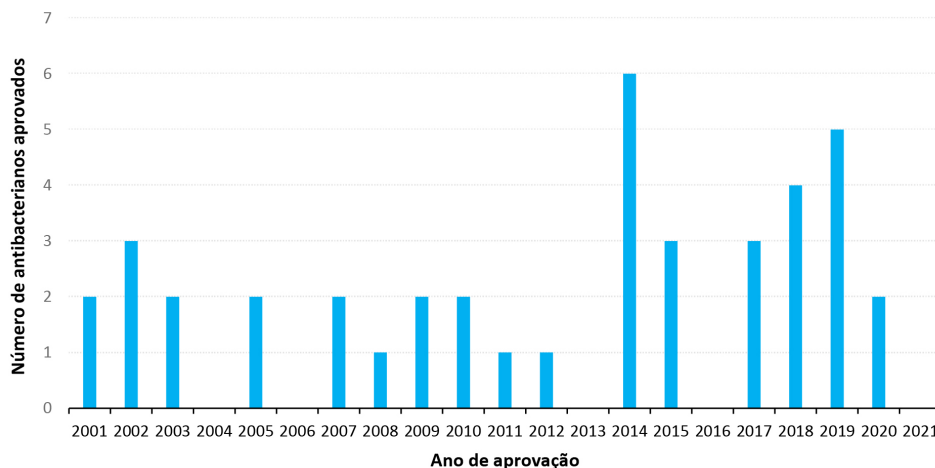


Figura 5. Novos fármacos antibacterianos aprovados pela primeira vez entre os anos de 2001 a 2021

da resistência bacteriana. Além disso, com a falta de fármacos para a prevenção e tratamento de infecções, procedimentos extremamente necessários e realizados na medicina moderna como transplante de órgãos, partos cesáreos ou até mesmo quimioterapias, podem trazer muito mais riscos aos pacientes.¹⁰ Com isso, nota-se a extrema necessidade de que haja, não apenas mudanças nos maus hábitos de consumo de antibióticos, mas também o investimento na pesquisa para a descoberta de novos fármacos antibacterianos, fundamentais para a manutenção da saúde de toda a população.

Nesse contexto, os produtos naturais vêm sendo amplamente utilizados como fonte de novos fármacos. Por exemplo, entre os anos de 1981 e 2019, dos 162 agentes antibacterianos aprovados, 78 eram produtos naturais inalterados ou derivados de produtos naturais, confirmando seu protagonismo no campo da descoberta de novos fármacos antimicrobianos.¹⁶

2. Carvacrol

O carvacrol (**10**, Figura 6) é um monoterpreno fenólico, produzido por grande número de plantas aromáticas, como diversos tipos de orégano (*Origanum vulgare*, *Origanum majorana*, *Origanum dictamnus*, entre outros) e tomilho (*Thymus vulgaris*, *Thymus zygis*, etc.). Atualmente, é bastante utilizado como aromatizante e conservante nos alimentos, na fragrância de formulações cosméticas e como desinfetante e fungicida. Além disso, já foram relatadas diversas atividades biológicas exercidas pelo carvacrol, tais como espasmolítica^{17,18}, vasodilatadora^{19,20}; moduladora de enzimas metabólicas^{21,22}; anti-inflamatória^{23,24}; antioxidante^{25,26}; antidepressiva²⁷; ansiolítica²⁸; protetora e regeneradora de órgãos danificados^{29,30}; antifúngica^{31,32} e, em especial, atividade antibacteriana, contra bactérias Gram-negativas e positivas.³³

Dentre essas diversas atividades biológicas (Figura 6), destaca-se a antimicrobiana, uma vez que o carvacrol se mostrou ativo frente a microrganismos deteriorantes de alimentos e patogênicos de plantas, humanos e animais. Entre esses microrganismos, estão: *Aspergillus flavus*, *Bacillus cereus*, *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* (MRSA), entre diversos outros.³⁴ Tendo em vista o grande potencial antimicrobiano apresentado pelo carvacrol, o objetivo deste trabalho é apresentar as possíveis aplicações desse monoterpreno, bem como de alguns de seus derivados semissintéticos, na busca por substâncias bioativas e na descoberta de novos fármacos, sobretudo, úteis no combate a bactérias resistentes.

2.1. Atividades antibacterianas do carvacrol

O carvacrol exerce atividade antibacteriana de amplo espectro, tanto frente a bactérias Gram-negativas quanto Gram-positivas, isoladas de alimentos ou clinicamente. Existem relatos na literatura da atividade do carvacrol contra *Vibrio cholerae*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas fluorescens*, entre outras bactérias.³⁵⁻³⁶

Das e colaboradores (2021) demonstraram a atividade anti-virulência do carvacrol contra a bactéria *Vibrio cholerae*, causadora da cólera, em concentrações sub-inibitórias. No estudo, a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) do carvacrol frente à *V. cholerae* N16961 foram de aproximadamente 1000 micromolar (μM), portanto, a concentração sub-inibitória utilizada para os demais experimentos foi de metade da CIM (500 μM) e de um quarto da CIM (250 μM). Nessas concentrações de carvacrol, experimentos *in vitro* mostraram que houve diminuição da habilidade do *V. cholerae* em penetrar a camada de mucina, menor produção de citocina colérica e redução da expressão de gene de virulência. Além disso, por meio de ensaios *in vivo*, o carvacrol dificultou a

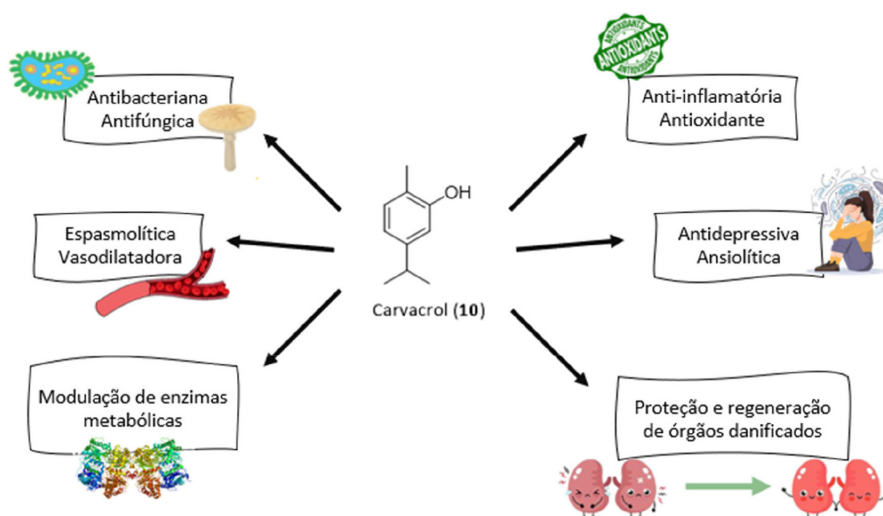


Figura 6. Estrutura química do carvacrol (**10**) e suas respectivas potenciais atividades biológicas³³

adesão da bactéria a células ileais de coelhos. Desse modo, os pesquisadores conseguiram demonstrar pela primeira vez que, mesmo em concentrações sub-inibitórias, o carvacrol pode inibir o crescimento e a virulência da bactéria *V. cholerae*.³⁵

Mauriello e colaboradores (2020) prepararam diferentes emulsões de carvacrol usando proteínas isoladas do soro de leite (WPI) e partículas de microgel (WPM), que foram caracterizadas quanto ao tamanho, estabilidade, liberação e solubilidade. Posteriormente, as emulsões foram avaliadas frente à bactéria Gram-negativa *Pseudomonas fluorescens* e à Gram-positiva *Staphylococcus epidermidis*. A amostra contendo apenas óleo de girassol como veículo não demonstrou atividade inibitória ou bactericida alguma em concentrações equivalentes àquelas utilizadas nas amostras com 25% de carvacrol. Contudo, o carvacrol (98% de pureza) apresentou atividade microbida e inibitória em baixas concentrações (menores ou iguais a 500 mg.L⁻¹) frente a ambos os microorganismos avaliados. As emulsões WPI e WPM, a 50 e 75% de carvacrol, mostraram efeito inibitório comparável àquele obtido pelo carvacrol a 98%. Com relação ao efeito microbida, apenas as emulsões WPI e WPM contendo carvacrol a 75% exibiram atividade frente a *P. fluorescens* e *S. epidermidis* comparável àquela exibida pelo carvacrol em seu estado de pureza (98%).³⁶

Falsafi e colaboradores (2014) registraram os efeitos do carvacrol frente à bactéria Gram-negativa *Helicobacter pylori*, responsável por infecções que acarretam inflamações persistentes na mucosa gástrica, o que leva ao desenvolvimento de diferentes lesões, como gastrite crônica, úlcera péptica e câncer gástrico.³⁷⁻³⁸ Neste estudo, foram avaliados o óleo essencial de *Satureja bachtiarica*, cujo componente majoritário é o carvacrol, bem como este monoterpene isolado. Dez cepas isoladas de *H. pylori* com padrões de resistência a diversos antibacterianos foram utilizadas e a atividade antimicrobiana foi analisada pelo método de difusão de disco, em que é medida pelo diâmetro da zona de inibição, medido em milímetros (mm). A média da atividade antibacteriana exercida pelo óleo essencial de *S. bachtiarica* foi de 17,6 ± 1,1 mm, enquanto a média obtida a partir do carvacrol isolado foi ainda maior (29,1 ± 3,4 mm).³⁷

No estudo de Mooyottu *et al.* (2017), o carvacrol demonstrou atividade contra a bactéria formadora de esporos *Clostridium difficile*, causadora de uma doença entérica mediada por toxinas em humanos. A esporulação é um fator de virulência crítico para a patogenia da bactéria, permitindo que os esporos sobrevivam em ambientes com condições desfavoráveis e sejam transmitidos com maior facilidade. Desse modo, os pesquisadores investigaram o potencial do carvacrol em inibir a produção, germinação e crescimento *in vitro* dos esporos de *C. difficile*, o que poderia auxiliar efetivamente no controle da infecção, transmissão e recidivas da doença entérica. O carvacrol foi avaliado frente a dois isolados hipervirulentos de *C. difficile* (ATCC BAA 1805 e 1870). A CIM obtida foi de 1200 µM para ambos, enquanto

as duas maiores concentrações sub-inibitórias foram de 900 µM (ATCC BAA 1805) e 600 µM (ATCC BAA 1870). Em amostras contendo ambos os isolados, tratadas com carvacrol em concentrações sub-inibitórias, houve uma diminuição significativa na contagem de esporos.³⁹

Com relação ao crescimento de esporos, o carvacrol promoveu diminuição e inibição total nas concentrações de 600 µM e 1200 µM, respectivamente, para ambas as cepas testadas. Também foram investigados os efeitos do carvacrol sobre a expressão de genes produtores de esporos. Desse modo, ao comparar o número de células viáveis em amostras tratadas com o carvacrol e no controle não tratado, os pesquisadores notaram que não havia diferença, o que levou à conclusão de que a diminuição da formação de esporos em amostras tratadas com carvacrol não era decorrente da inibição do crescimento bacteriano, mas sim, pela habilidade do composto em reduzir a transcrição de genes de virulência, associados à produção de esporos.³⁹

Além de exercer atividade antimicrobiana frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, o carvacrol se mostrou eficaz contra micobactérias e, entre elas, estão cepas de *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis*. Andrade-Ochoa e colaboradores (2015) estudaram a atividade bacteriana *in vitro* do carvacrol sobre cepas H37Rv de *M. tuberculosis* e AN5 de *M. bovis*, tendo suas CIM resultantes nos valores de 13,45 e 34,62 µM, respectivamente. No estudo, o carvacrol foi um dos terpenos que exibiu atividade antimicobacteriana de maior eficiência, em comparação aos outros compostos fenólicos estudados. Os pesquisadores também demonstraram que o carvacrol apresentou baixa citotoxicidade em macrófagos da linhagem J774A, indicando que esse monoterpene apresenta seletividade e potencial como agente antimicobacteriano.⁴⁰

2.2. Possíveis mecanismos de ação antibacteriana do carvacrol

Um dos mecanismos de ação antibacteriana do carvacrol pode ser atribuído à sua natureza hidrofóbica, o que lhe permite interagir com as membranas celulares bacterianas, acarretando uma mudança de conformação na bicamada lipídica da membrana. Conseqüentemente, ocorre a interrupção na função celular normal, o que provoca aumento da permeabilidade de ATP e liberação de outros componentes celulares.³³

Existem evidências que mostram que o grupamento hidroxila do carvacrol, juntamente com a presença de um sistema com elétrons deslocalizados, funcionam como um transportador de próton transmembrana. Sua estrutura não ionizada permite sua difusão pela membrana plasmática, fazendo com que o carvacrol alcance o citoplasma, onde posteriormente ocorre a ionização do grupo hidroxila e a liberação do próton (Figura 7A). Então, no meio intracelular o carvacrol ionizado forma uma sal com íons potássio (K⁺), retornando para o meio extracelular, atuando assim como

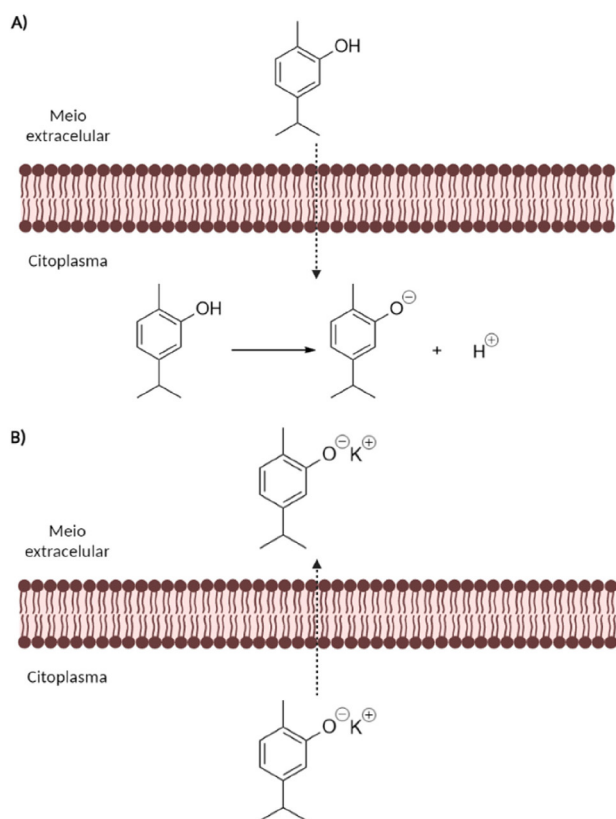


Figura 7. A) Ionização do carvacrol no citoplasma, levando à perda do próton do grupo hidroxila. B) Formação do sal potássico no citoplasma que favorece o transporte de íons pelas membranas

um transportador de íons transmembrana (Figura 7B). Sendo assim, o carvacrol é capaz de alterar o gradiente iônico através da membrana citoplasmática, resultando no colapso da força motriz de prótons e depleção do *pool* de ATP, resultando na morte celular.^{33,41}

Em concentrações subletais de carvacrol, definidas no estudo de Di Pasqua e colaboradores (2006) como a concentração mais alta que ainda permite o crescimento bacteriano à temperatura ótima (Tabela 2), foram observadas mudanças na composição de ácidos graxos da membrana plasmática de células bacterianas, com aumento do conteúdo de ácidos graxos insaturados.⁴²

Tabela 2. Concentrações antibacterianas subletais de carvacrol obtidas por Di Pasqua e colaboradores (2006)⁴²

Linhas de bactérias	Concentração máxima subletal de carvacrol (µM)
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (não patogênica) ATCC 43888	5192,38
<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhimurium ATCC 14028	6457,20
<i>Pseudomonas fluorescens</i> NCIMB 10586	12248,70
<i>Brochothrix thermosphacta</i> NCTC 10822	5192,38
<i>Staphylococcus aureus</i> NCTC 6571	6457,20

3. Derivados e Análogos do Carvacrol

Conforme exposto anteriormente, o carvacrol possui muitas propriedades importantes e, em vários estudos, demonstrou o seu potencial antibacteriano. No entanto, estratégias de modificação molecular podem ser utilizadas para o planejamento de derivados e análogos estruturais dessa substância, visando otimizar suas propriedades físico-químicas, farmacocinéticas e em seus mecanismos de ação. Desse modo, serão apresentados a seguir, estudos que relatam a síntese de diversos derivados do carvacrol que apresentaram atividades frente a diversas bactérias.

3.1. Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas

3.1.1. Derivados com substituintes no anel benzênico

Edwin e colaboradores (2006) realizaram um estudo acerca da molécula do carvacrol, com o objetivo de determinar quais os requisitos estruturais essenciais para a atividade antimicrobiana do composto. Para isso, utilizaram uma abordagem de comparação entre o carvacrol (**10**) e dois grupos de análogos. O primeiro contém moléculas em que cada um dos substituintes originalmente presentes no anel benzênico do carvacrol (metila, isopropila e hidroxila) foi removido, originando, respectivamente: 3-isopropilfenol (**11**); o-cresol (**12**); e *p*-cimeno (**13**). No segundo grupo, os análogos planejados possuem os grupos amino e metila no lugar da hidroxila do carvacrol, levando ao 2-amino-*p*-cimeno (**14**) e ao 3,4-dimetil-cumeno (**15**) (Figura 8).⁴³

Em seguida, os compostos foram testados frente a culturas de *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). A CIM foi definida como a menor concentração na qual não foi observado aumento na densidade óptica depois de 18 horas, enquanto a CBM foi definida como a menor concentração na qual não houve detecção de bactérias viáveis (Tabela 3).⁴³

De acordo com os diferentes valores de CIM e CBM obtidos para cada substância, foi possível observar que o carvacrol (Tabela 3, *entrada 1*) apresentou a maior atividade

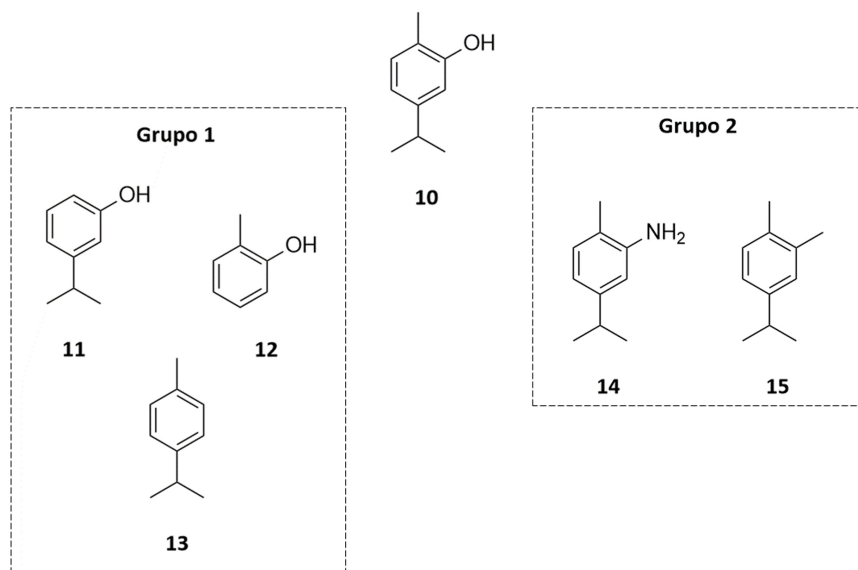


Figura 8. Estrutura do carvacrol e substâncias relacionadas avaliadas por Edwin e colaboradores (2006)⁴³

Tabela 3. Valores de CIM e CBM do carvacrol e compostos relacionados frente a *E. coli* e *S. aureus*⁴³

Entrada	Composto	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>	
		CIM (μM)	CBM (μM)	CIM (μM)	CBM (μM)
1	Carvacrol (10)	1200	1300	1700	1800
2	3-isopropilfenol (11)	1700	1800	2600	3000
3	<i>o</i> -cresol (12)	3000	3400	3000	3600
4	2-amino- <i>p</i> -cimeno (14)	4000	4250	5900	>6000
5	<i>p</i> -cimeno (13)	>36000	>36000	>36000	>36000
6	3,4-dimetilcumeno (15)	>36000	>36000	>36000	>36000

dentre os compostos testados. Dentre os compostos que apresentaram atividade (Tabela 3, *entradas 1-4*), todos obtiveram CIM frente a *S. aureus* cerca de 1,5 vezes maiores do que aquelas obtidas frente a *E. Coli*, exceto para **12** (Tabela 3, *entrada 3*).

Em geral, a ausência de um dos substituintes do carvacrol (Tabela 3, *entrada 1*) resultou em maiores valores de CIM. As ausências dos grupamentos metila (Tabela 3, *entrada 2*) ou isopropila (Tabela 3, *entrada 3*) promoveram um aumento aproximado de 2 e 2,5 vezes nos valores de CIM, respectivamente. Enquanto a ausência do grupo hidroxila (Tabela 3, *entradas 5 e 6*) resultou na perda total da atividade antibacteriana. Contudo, a substituição do grupo hidroxila por um grupamento amino (Tabela 3, *entrada 4*) resultou apenas em uma diminuição parcial da atividade.⁴³

A partir do estudo de Edwin *et al.* (2006), pode-se observar que a ausência de substituintes do anel do carvacrol (**10**) promove a diminuição da atividade antimicrobiana em todos os casos. As atividades mais baixas observadas para **11** e **12** (Tabela 3, *entradas 2 e 3*) podem ser atribuídas à diminuição do caráter anfipático das moléculas, tendo em vista a ausência de substituintes alifáticos do carvacrol, o que pode impactar a interação desses compostos com a

membrana plasmática bacteriana. Isso também pode explicar o menor efeito antibacteriano de **12** (que não contém o grupo isopropila) em comparação ao **11** (que não contém o grupo metila). Não houve atividade antimicrobiana observada para o **13** (Tabela 3, *entrada 5*), o que pode ser atribuído à falta de um grupo hidroxila na estrutura. Contudo, essa é uma explicação simplista, visto que a baixa hidrossolubilidade desse composto impede uma determinação quantitativa de sua atividade. Por isso, a falta de atividade antimicrobiana de **13** nos ensaios realizados pelos pesquisadores não pode ser utilizada para definir o papel funcional do grupo hidroxila do carvacrol.⁴³

O 2-amino-*p*-cimeno (**14**) possui solubilidade e estrutura muito semelhantes ao carvacrol (**10**). As CIMs observadas para ambos os compostos (Tabela 3, *entradas 4 e 1*, respectivamente), assim como para os compostos **11** e **12** (Tabela 3, *entradas 2 e 3*, respectivamente), ilustram que a presença de um grupo hidrofílico no anel benzênico exerce papel importante na atividade antimicrobiana. Além disso, o caráter anfipático dessas substâncias pode ser um pré-requisito para que apresentem melhores interações com a membrana plasmática celular, já que a porção hidrofílica dos compostos interage com a porção hidrofílica da membrana

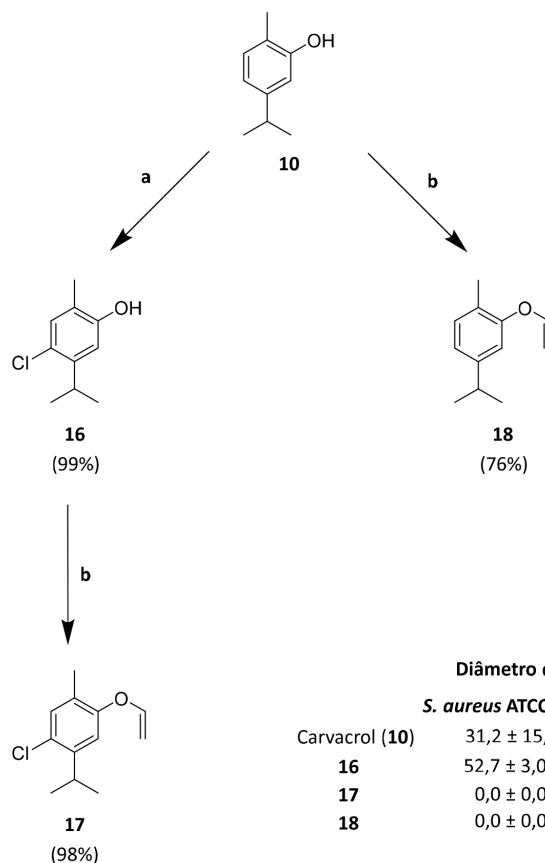
e, a porção hidrofóbica (anel benzênico e substituintes alifáticos), por sua vez, interage com a parte interna lipídica da membrana bacteriana. No entanto, o 2-amino-*p*-cimeno (**14**) ainda apresentou uma CIM maior, em quase 3 vezes, em relação àquela obtida pelo carvacrol (**10**), o que indica que o grupo hidroxila apresenta características específicas para exercer a atividade. Uma possível explicação para isso pode se dar na formação de ligações de hidrogênio mais fortes pelo grupo hidroxila, com grupos fosfato ou ésteres dos fosfolipídeos, já que grupamentos amino podem ter uma menor capacidade para realizar essas ligações, em virtude da menor eletronegatividade do átomo de nitrogênio em relação ao átomo de oxigênio. O segundo aspecto que pode esclarecer essas diferenças se dá pela acidez de compostos fenólicos, quando comparados a compostos a base de anilina. Os compostos fenólicos podem perder um próton, o que pode estar relacionado ao mecanismo de ação do carvacrol. Embora sejam ácidos fracos, a base conjugada resultante desse processo pode ser estabilizada devido aos elétrons deslocalizados da estrutura, favorecendo a ionização.⁴³

Finalmente, pode-se concluir que a atividade antimicrobiana dos compostos testados por Edwin e colaboradores (2006) está relacionada à solubilidade

destes em soluções aquosas. Os substituintes alifáticos do carvacrol estão relacionadas à sua atividade, provavelmente, por interagirem com a membrana plasmática bacteriana. Os autores também concluíram que o papel do grupo hidroxila não poderia ser determinado apenas com os ensaios realizados, devido à pouca solubilidade do *p*-cimeno (**13**). Entretanto, o 2-amino-*p*-cimeno (**14**) desempenhou atividade antimicrobiana cerca de 3 vezes menor em relação ao carvacrol. Como a substituição do grupo hidroxila por um grupo amino não afeta a solubilidade ou a estrutura espacial da molécula, os autores concluíram que a hidroxila do carvacrol não é essencial, mas contribui para o mecanismo de ação antimicrobiana do monoterpene.⁴³

Em um outro estudo, Pinheiro e colaboradores (2017) estudaram os efeitos antimicrobianos de três derivados fenólicos obtidos por semissíntese a partir do carvacrol (Esquema 1). Os autores utilizaram condições de oxicloração catalítica para promover a adição de um átomo de cloro na posição 4 do anel benzênico do carvacrol, obtendo-se o derivado **16** em 99% de rendimento. Por sua vez, os compostos **17** e **18**, foram sintetizados em rendimentos de 98 e 76%, respectivamente, através das reações com brometo de alila em meio básico (Esquema 1).⁴⁴

Para a análise da atividade antimicrobiana, através do



Reagentes e condições: a) LiCl, ácido acético, CuCl₂, O₂, 80 °C 6 h; b) brometo de alila, acetona, NaOH, refluxo 2 h.

Esquema 1. Rota sintética adaptada de Pinheiro e colaboradores para a obtenção dos derivados **16-18** a partir do carvacrol (**10**), juntamente com o diâmetro da zona de inibição (em milímetros) dos compostos frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*⁴⁴

teste de difusão em ágar, foram utilizadas cepas ATCC 6538 de *Staphylococcus aureus* e ATCC 11229 de *Escherichia coli*, de acordo com a metodologia descrita pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards*. Os resultados foram expressos em diâmetro de inibição, em milímetros (mm) no Esquema 1.⁴⁴

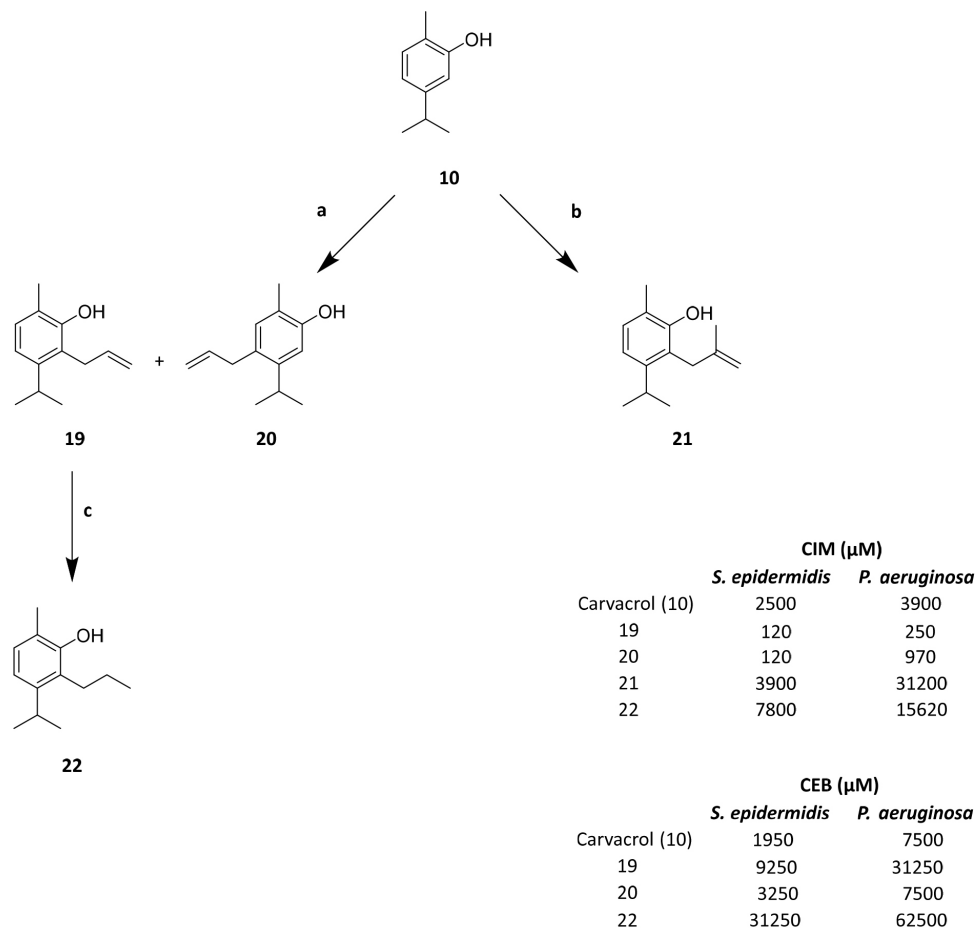
Dentre os três derivados sintetizados, apenas o **16** apresentou atividade nas cepas avaliadas. Entretanto, a atividade inibitória do **16** foi superior à do carvacrol para *S. aureus*, o que pode ser justificada pela presença do átomo de cloro na posição *para* do anel benzênico. A hidroxila fenólica contribui para a atividade antimicrobiana do carvacrol e, com o acréscimo de um átomo de cloro na posição *para* do anel, a acidez é aumentada, o que pode contribuir para potencializar a atividade antimicrobiana do composto. Os derivados **17** e **18**, que contêm um grupo éter em suas respectivas estruturas, não apresentaram atividade inibitória, o que ilustra a importância da hidroxila fenólica para exercer essa atividade.⁴⁴

Walsh e colaboradores (2019) sintetizaram outros

derivados semissintéticos do carvacrol que tiveram suas propriedades antimicrobianas avaliadas frente a bactérias planctônicas e biofilmes de *Staphylococcus epidermidis* (cepa ATCC 35984) e *Pseudomonas aeruginosa* (cepas PA01 e PA015442). Para tal, quatro derivados foram sintetizados (2-alila (**19**), 4-alila (**20**), 2-metalila (**21**) e n-propila (**22**)), nos quais as adições de grupos alila e metalila tiveram, como objetivo, o aumento de lipofilicidade, visando o aumento da permeabilidade do composto na membrana plasmática.⁴⁵

Após a formação do éter alílico, um rearranjo de Claisen em condições térmicas, deu origem aos compostos **19** e **21**, enquanto o composto **20** foi obtido como um regioisômero secundário. Após purificação, o derivado **19** foi submetido a condições de hidrogenação para a obtenção do composto **22** (Esquema 2).⁴⁵

Quando comparados à estrutura do carvacrol (**10**), tanto o derivado 2-alila (**19**) quanto o derivado 4-alila (**20**) se mostraram mais potentes frente a células planctônicas. Em contrapartida, os derivados **21** e **22** apresentaram valores de



Reagentes e condições: a) brometo de alila, acetona, K_2CO_3 , refluxo 5 h, 200 °C 12 h; b) CH_3CCHCH_2Cl , acetona, K_2CO_3 , refluxo 5 h, 200 °C 12 h; c) 10% Pd/C, H_2 , etanol, t.a 12 h.

Esquema 2. Rota sintética adaptada de Walsh e colaboradores para obtenção dos derivados **19-22** a partir do carvacrol (**10**), juntamente com as concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações de erradicação dos biofilmes (CEB) dos compostos frente a *Staphylococcus epidermidis* e *Pseudomonas aeruginosa*⁴⁵

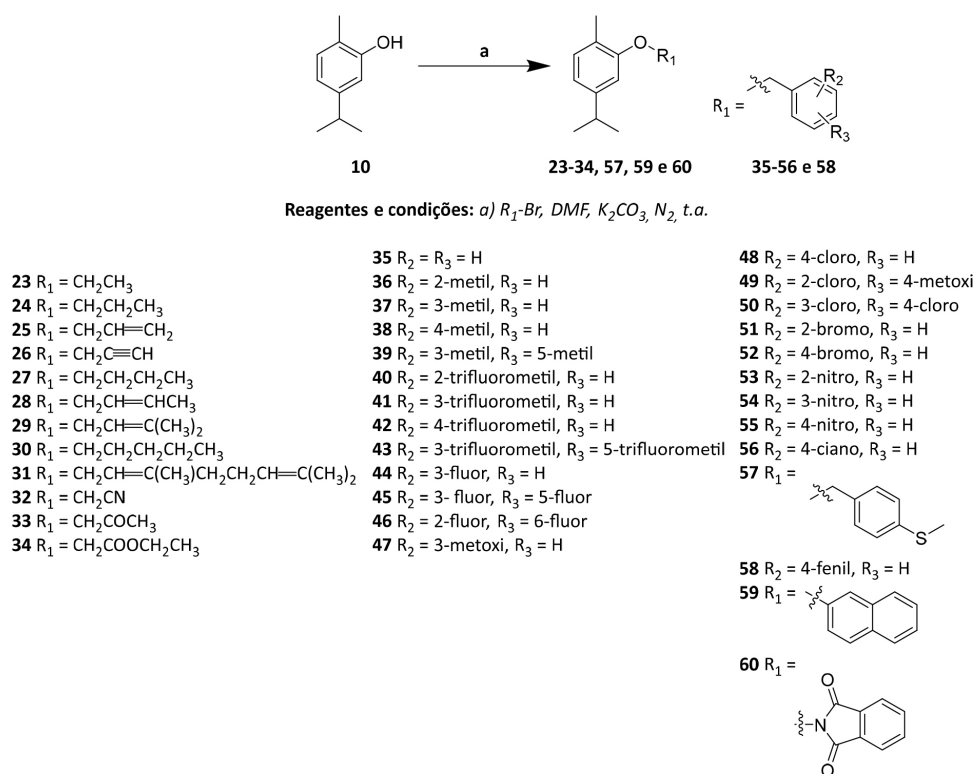
CIM superiores àqueles obtidos para o carvacrol e, portanto, se mostraram menos eficazes. Quanto às concentrações de erradicação dos biofilmes (CEB), todas foram maiores do que as inibitórias mínimas, o que confirma a menor susceptibilidade frente as bactérias em modo de crescimento de biofilmes. O carvacrol se mostrou o composto mais eficaz, sendo mais potente até do que o seu derivado 2-alila (**19**), o oposto do que ocorreu com as células planctônicas. O derivado 4-alila (**20**) obteve CEB idêntica ao carvacrol frente à *P. aeruginosa*, se mostrando mais potente do que **19** frente a esse microrganismo, apesar de não apresentar diferença em relação ao carvacrol. Frente à *S. epidermidis*, o derivado **20** se mostrou menos potente do que o carvacrol. O derivado *n*-propila (**22**), por sua vez, foi o que demonstrou menor potência frente aos biofilmes e frente a células planctônicas de *S. epidermidis*.⁴⁵

Em comparação ao carvacrol, as menores potências dos derivados **19** e **20** frente aos biofilmes podem se dar pelo impedimento estérico provocado pelos grupos 2 e 4-alila, que pode dificultar a permeação através da matriz extracelular do biofilme. Desse modo, as relações estrutura-atividade podem indicar que os compostos possuem diferentes limitações para eficácia sobre as células e biofilmes formados pelas mesmas espécies. Diante disso, é possível que a penetração dos agentes nos biofilmes ou no citoplasma das células planctônicas sejam limitadas, ou até mesmo que a expressão de alvos moleculares seja diferente em cada um dos casos.⁴⁵

3.1.2. Derivados com grupos éteres e ésteres

Sisto e colaboradores (2020) realizaram a síntese e análise dos efeitos de derivados do carvacrol sobre células da bactéria Gram-negativa *Helicobacter pylori*, considerada um agente carcinogênico de classe I pela OMS. Ao total, foram sintetizados 46 compostos, através de reações nas quais a hidroxila fenólica do carvacrol foi convertida em éteres e ésteres, com parâmetros de solubilidade modificados. Então, os compostos **23-60** (Esquema 3) foram sintetizados a partir da reação do carvacrol com o brometo de alquila correspondente, em *N,N*-dimetilformamida (DMF), na presença de carbonato de potássio (K_2CO_3) e sob atmosfera de nitrogênio (N_2), com rendimentos variando entre 56% e 98%. Após purificação e caracterização, os compostos foram submetidos aos ensaios para verificar suas atividades frente à *H. pylori*.⁴⁶

Alguns desses produtos foram submetidos a reações adicionais para a obtenção dos demais derivados (**61-65**), como hidrólise de éster, redução de grupos nitro e oxidação de grupos com enxofre, com rendimentos variando entre 25% e 95% (Esquema 4). Por exemplo, o derivado **34**, após ser hidrolisado pelo hidróxido de lítio (LiOH), deu origem ao composto **61**, um ácido carboxílico que, por sua vez, sofreu modificações em sua estrutura para a obtenção da hidrazida **62**. O composto **55** passou por uma reação de redução do grupo nitro, gerando o derivado **63**, com um grupamento amino primário. Por fim, no composto **57** ocorreu a oxidação do átomo de enxofre



Esquema 3. Rota sintética adaptada de Sisto e colaboradores para a síntese dos compostos **23-60** a partir do carvacrol (**10**)⁴⁶

para dar origem ao grupo sulfóxido do derivado **64** e ao grupo sulfona do derivado **65**, conforme representado no Esquema 4.⁴⁶

Adicionalmente, ésteres **66-68** foram sintetizados por meio de uma condensação de Knoevenagel entre o 2-hidroxibenzaldeído e malonato de dietila. Após serem submetidos à reação de hidrólise, os ésteres originaram seus respectivos ácidos carboxílicos **66a-68a**. Por fim, híbridos de cumarina e carvacrol (**69**, **70** e **71**) foram sintetizados via reação de condensação entre os ácidos **66a-68a** e o carvacrol, na presença de 4-metilmorfolina (NMM), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)-carbodiimida (EDC), 1-hidroxibenzotriazol (HOBt) e atmosfera de nitrogênio (N₂) à temperatura ambiente, por 24 horas (Esquema 5). O composto **69** foi obtido com 76% de rendimento, enquanto os compostos **70** e **71** foram obtidos com 70% e 73% de rendimento, respectivamente.⁴⁶

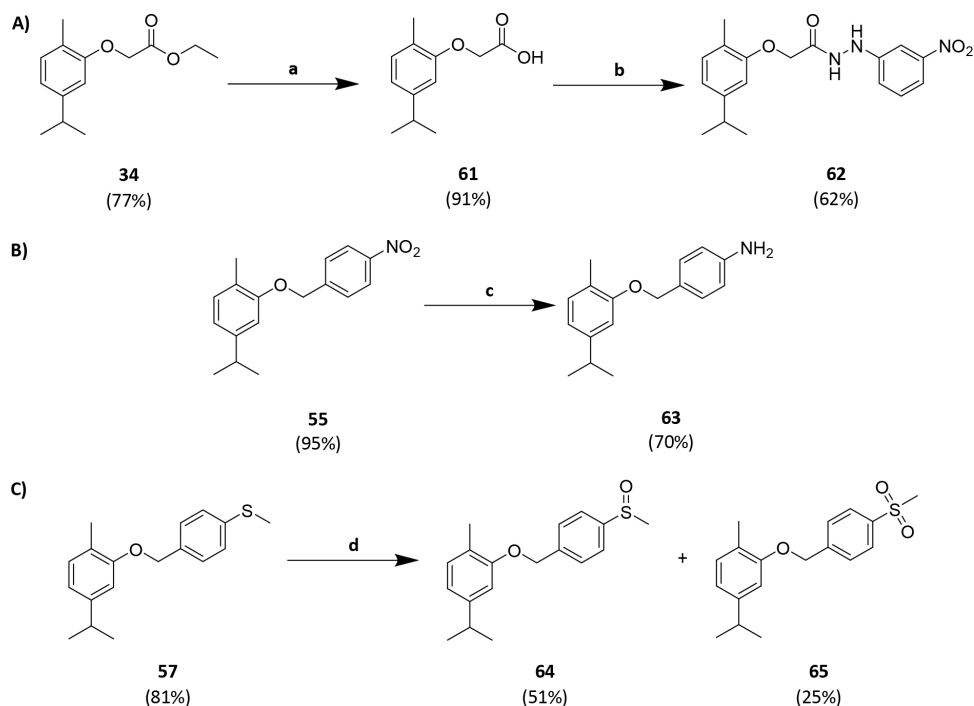
Todos os compostos sintetizados (**23-71**) foram avaliados *in vitro* quanto às suas respectivas atividades inibitória e bactericida frente a cepas de *H. pylori* (F4, 190, 23, 110R, NCTC 11637, F1, F34/497, F40/499 e F40/442), as quais apresentam diferentes perfis de sensibilidade a antibióticos. Apenas as linhagens de *H. pylori* 190, 23 e F1 são suscetíveis ao antimicrobiano metronidazol (**72**, Figura 9), enquanto as demais apresentam resistência. Com exceção das cepas F4, F1, F34/497 e F40/499, todas as demais são suscetíveis à claritromicina (**73**, Figura 9). Todas as cepas são sensíveis à amoxicilina (**74**, Figura 9). Os resultados foram expressos em valores de CIM e CBM,

sendo esta última definida como a concentração capaz de eliminar 99,9% do inóculo bacteriano inicial.⁴⁶

Com relação à atividade antimicrobiana exercida pelos compostos sintetizados, os derivados **23-35** (Esquema 3), em geral, não tiveram aumento na atividade inibitória, em comparação ao carvacrol, com exceção dos derivados **28** e **31**, que apresentaram valores de CIM e CBM menores do que o carvacrol frente a todas as linhagens avaliadas.⁴⁶

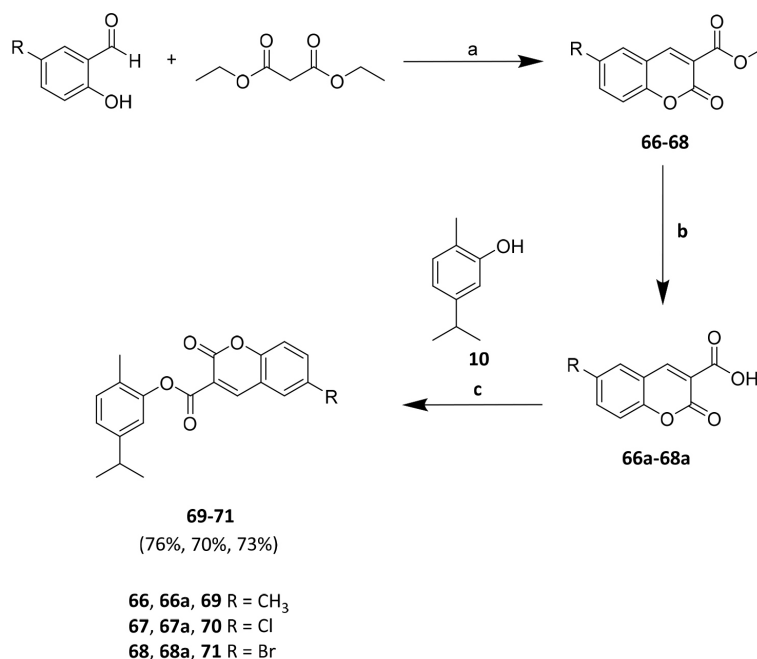
Dentre os derivados com o substituinte benzila (**35-58**, Esquema 3 e **63-65**, Esquema 4), aqueles com substituintes na posição *para* do anel benzênico (-CF₃, -Ph, -CN, -NO₂ ou -NH₂) apresentaram atividade anti-*H. pylori* comparáveis ou até mesmo melhores e promissoras do que o carvacrol, o que ilustra uma grande importância desses grupos substituintes nessa posição. Já os compostos sulfurados (**57**, Esquema 3 e **64** e **65**, Esquema 4) apresentaram maior atividade inibitória de acordo com o aumento do estado de oxidação do átomo de enxofre. Além disso, os derivados ésteres cumarínicos (**69-71**, Esquema 5) também apresentaram maiores atividades inibitórias do que o carvacrol frente a todas as linhagens testadas. No entanto, entre os compostos bicíclicos (**59** e **60**, Esquema 3), a mudança do grupo benzil para um grupo naftaleno ocasionou a perda total da atividade anti-*H. pylori*, enquanto a mudança para um grupo ftalimida demonstrou melhora na ação antibacteriana.⁴⁶

Por outro lado, Bkhaitan e colaboradores (2018), ao invés de sintetizarem derivados do carvacrol, prepararam derivados éster e éter de metronidazol (**72**, Esquema 6),



Reagentes e condições: a) LiOH•H₂O, MeOH, t.a 24 h; b) cloroformato de etila, THF, Et₃N, 3-nitrofenilhidrazina, N₂, t.a 3 h; c) Na₂S₂O₄, THF, NaHCO₃•H₂O, t.a; d) ácido 3-cloroperbenzóico, CH₂Cl₂, 0-5 °C.

Esquema 4. Rota sintética adaptada de Sisto e colaboradores para a obtenção dos derivados **61-65**⁴⁶



Reagentes e condições: a) malonato de dietila, EtOH, piperidina, ácido acético, 80 °C; b) 20% NaOH, EtOH, 3N HCl; c) NMM, EDC, HOBT, N₂ t.a 24 h.

Esquema 5. Rota sintética adaptada de Sisto e colaboradores para a obtenção dos derivados **69-71**, híbridos de cumarina e carvacrol⁴⁶

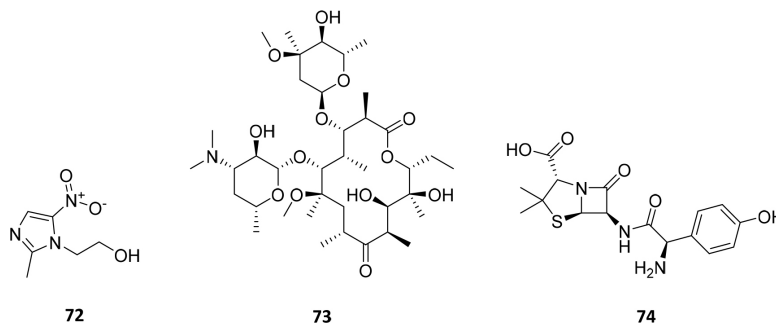


Figura 9. Estruturas químicas dos antimicrobianos metronidazol (**72**), claritromicina (**73**) e amoxicilina (**74**)

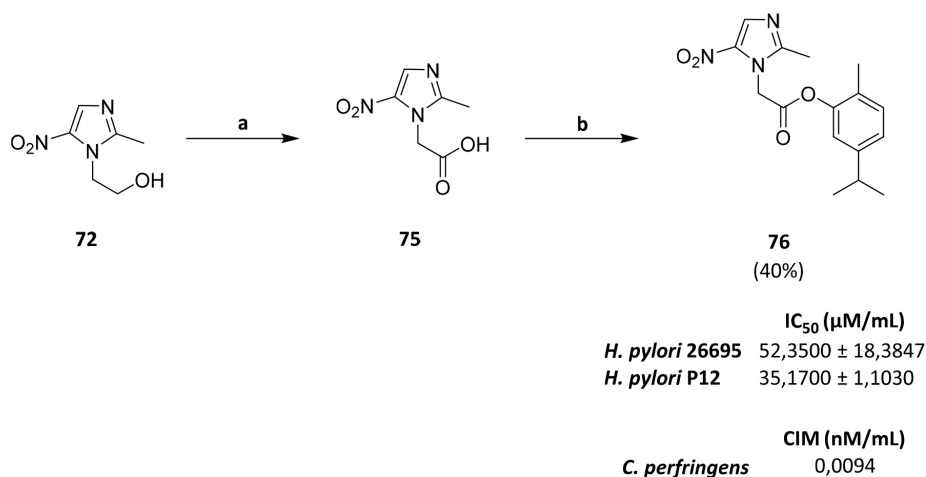
amplamente utilizado como fármaco de escolha no tratamento de infecções anaeróbicas, além de ser utilizado para tratar infecções parasitárias. Apesar de ser um antibacteriano eficaz, alguns patógenos, como *H. pylori*, podem desenvolver resistência a esse fármaco.⁴⁷

Dois dos derivados sintetizados pelo grupo de pesquisadores foram híbridos de carvacrol, sendo um éster (Esquema 6) e um éter (Esquema 7). A partir da oxidação do metronidazol com dicromato de potássio (K₂Cr₂O₇) e ácido sulfúrico (H₂SO₄) foi gerado um ácido carboxílico desse fármaco (**75**). Em seguida, foi realizada uma reação de esterificação entre **75** e o carvacrol, utilizando-se diciclohexilcarbodiimida (DCC)/4-dimetilamino piridina (DMAP) para obtenção do híbrido **76** com um rendimento de 40% (Esquema 6).⁴⁷

O derivado híbrido éter (**78**) foi obtido em uma duas etapas (Esquema 7). Primeiramente, o precursor tosila

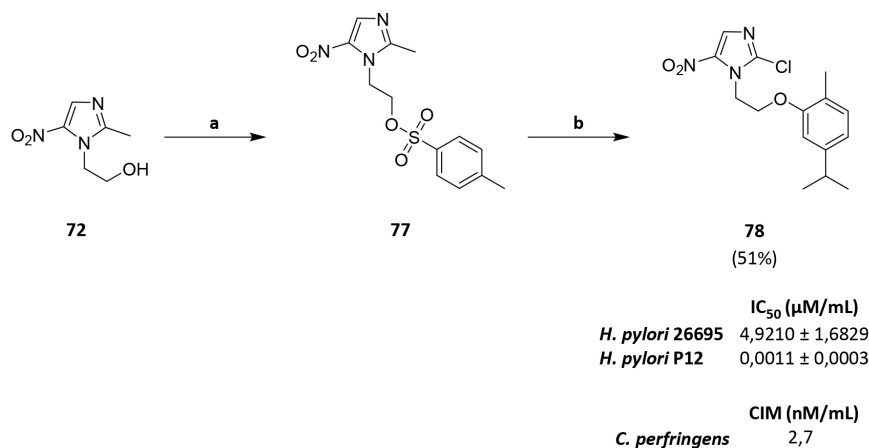
de metronidazol (**77**) foi preparado na presença de cloreto de 4-metilbenzenosulfonila, diclorometano (CH₂Cl₂) e trietanolamina (TEA). Em seguida, a reação de substituição do grupo tosilafo foi realizada utilizando-se o carvacrol (**10**) como nucleófilo, gerando o derivado éter (**78**) com 51% de rendimento.⁴⁷

Ambos os derivados foram testados *in vitro* contra duas linhagens de *H. pylori* (ATCC 26695 e P12) e contra *Clostridium perfringens*. O derivado éter (**78**) demonstrou ótima atividade antibacteriana com valores de concentração inibitória média (IC₅₀) de 4,9210 ± 1,6829 frente à variante 26695 e 0,0011 ± 0,0003 frente à linhagem P12, caracterizando maior potência do que o derivado éster (**76**) frente a essas linhagens. No teste contra *C. perfringens*, o composto **78** também demonstrou um ótimo resultado (CIM = 2,7 nM mL⁻¹). No entanto, o composto **76** apresentou o melhor resultado (CIM = 0,0094 nM mL⁻¹), comparável à



Reagentes e condições: a) $K_2Cr_2O_7$, H_2SO_4 ; b) Carvacrol (**10**), DCC/DMAP.

Esquema 6. Rota sintética adaptada de Bkhaitan e colaboradores na síntese do derivado **76**, éster de metronidazol híbrido de carvacrol, juntamente com valores de IC₅₀ e CIM do composto frente a *H. pylori* e *C. perfringens*, respectivamente⁴⁷



Reagentes e condições: a) Cloreto de 4-metilbenzenosulfonil, CH_2Cl_2 , TEA, 0 °C, 5 h; b) Carvacrol (**10**), 70-80 °C, 14-16 h.

Esquema 7. Rota sintética adaptada de Bkhaitan e colaboradores na síntese do derivado **78**, éter de metronidazol híbrido de carvacrol, juntamente com valores de IC₅₀ e CIM do composto frente a *H. pylori* e *C. perfringens*, respectivamente⁴⁷

CIM obtida para o metronidazol, utilizado como referência (0,0058 nM mL⁻¹).⁴⁷

Desse modo, os derivados **76** e **78** demonstraram alta potência frente às três linhagens bacterianas, exercendo ótima atividade antibacteriana. Os pesquisadores sugerem que o principal fator relacionado à atividade anti-*H. pylori* é devido ao próprio metronidazol, enquanto a atividade anti-*C. perfringens* se associa, principalmente, pelo monoterpene utilizado (no caso, o próprio carvacrol). Além disso, o composto **78**, que demonstrou maior potência, se mostrou seletivo e não-citotóxico para fibroblastos pulmonares de fetos humanos normais, sugerindo um perfil de segurança da molécula, em caso de utilização como fármaco.⁴⁷

Outros 23 derivados do carvacrol (Figura 10) foram sintetizados e testados quanto às suas atividades antimicrobianas em um estudo de Marinelli e colaboradores

(2019). O carvacrol (**10**) chamou a atenção dos pesquisadores por sua ação em biofilmes, uma vez que esse composto leva a um aumento da fluidez, permeabilidade e perturbação da fração lipídica da membrana citoplasmática bacteriana e, diferentemente de outros monoterpeneos, desintegra a membrana externa de bactérias Gram-negativas. Contudo, o carvacrol é pouco solúvel em água (0,11 mg mL⁻¹), possui alta volatilidade e baixa estabilidade química, o que limita seu uso como fármaco, já que a pobre hidrossolubilidade afeta negativamente a biodisponibilidade e, desse modo, seriam necessárias altas doses para que fosse atingida as concentrações plasmáticas dentro da janela terapêutica.⁴⁸

Sendo assim, Marinelli e colaboradores visando otimização das propriedades físico-químicas do carvacrol optaram pela estratégia de preparação de pró-fármacos. Para melhorar a solubilidade em água, os autores sintetizaram pró-fármacos ésteres de aminoácidos (**79-95**). Nesse

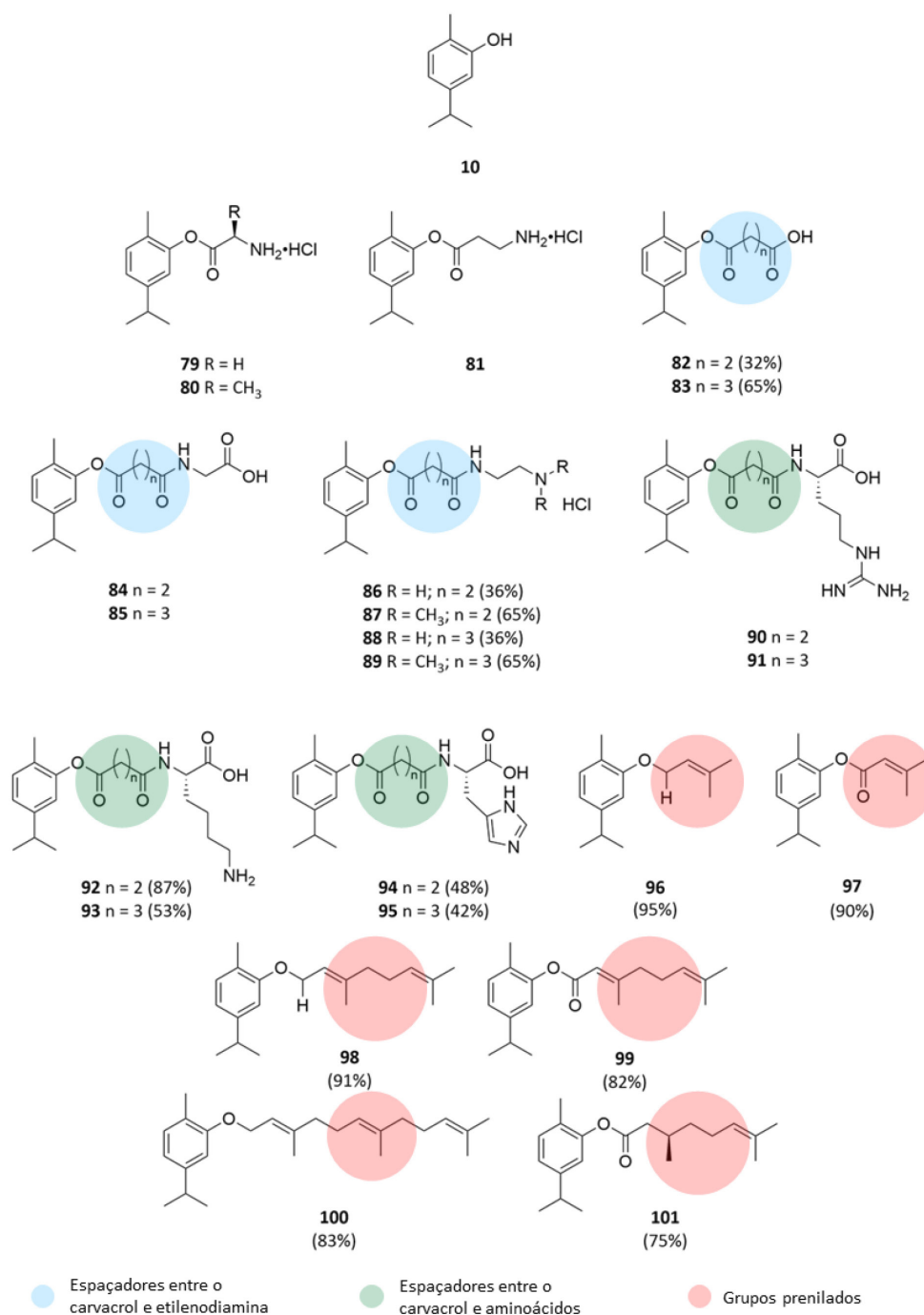


Figura 10. Estruturas químicas dos pró-fármacos do carvacrol (**79-101**) sintetizados por Marinelli e colaboradores e seus respectivos rendimentos⁴⁸

caso, os aminoácidos foram utilizados como a fração solúvel em água para projetar pró-fármacos bipartidos (em que o transportador se liga diretamente à molécula parental, **79-83**) e tripartidos (em que o transportador e a molécula parental se separam por um espaçador), nos quais foram utilizados os ácidos succínico e glutárico como espaçadores (**84-95**), dada a capacidade destes de melhorar o cruzamento pela membrana lipídica. Projetados dessa forma, os pró-fármacos poderiam apresentar maior absorção através da administração por via oral do que o carvacrol,

devido à presença de diversos aminoácidos e proteínas transportadoras de membrana localizadas na porção externa da borda em escova do intestino. Assim, uma vez absorvidos em condições fisiológicas (pH = 7,4), os pró-fármacos passariam por hidrólise, liberando o composto parental.⁴⁸

Além disso, para aumentar a permeabilidade pela membrana e conseqüente absorção por via oral, os pesquisadores projetaram e sintetizaram pró-fármacos lipofílicos pela estratégia de prenilação, visto que a adição de grupos prenila aumenta a lipofilicidade, melhorando a

interação entre os compostos e a membrana bacteriana, estando diretamente relacionados à atividade antibacteriana. Portanto, cadeias preniladas (isopentenila, geranila e farnesila) foram conjugadas à hidroxila do carvacrol, com formação dos éteres **96**, **98** e **100** ou ésteres **97**, **99** e **101**.⁴⁸

Uma vez sintetizados, os pró-fármacos foram submetidos a uma cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) para determinar a solubilidade dos compostos em água. Os resultados mostraram que os compostos **79-81** foram altamente hidrossolúveis, indicando que a formação de um sal permanece sendo o método mais comum para aumentar a hidrossolubilidade de fármacos. Os derivados **86** e **93** também se mostraram solúveis em água, embora menos do que os sais **79-81**, enquanto os demais foram classificados como pouco solúveis. A inserção dos espaçadores entre a hidroxila do carvacrol e a cadeia de etilenodiamina aumentou a lipofilicidade dos pró-fármacos (**82-89**), ao passo que a conjugação dos espaçadores a aminoácidos básicos (como arginina, lisina ou histidina, em **90-95**) diminuíram o caráter hidrofóbico das substâncias. Os pró-fármacos com grupos prenilados (**96-101**) se mostraram insolúveis em água.⁴⁸

Finalmente, os compostos foram submetidos ao teste de atividade antibacteriana frente às bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae*; e Gram-negativas: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii*. Compostos **79-81** demonstraram maior atividade antibacteriana frente às Gram-negativas, em especial **81** frente à *A. baumannii* (CIM = 496,58 µM). Os compostos **96** e **98** não demonstraram atividade frente às Gram-negativas, entretanto, foram efetivos sobre espécies Gram-positivas, conforme demonstrado na Tabela 4.⁴⁸

Tabela 4. Concentrações inibitórias mínimas do carvacrol e seus derivados **96** e **98** frente à *S. pneumoniae* e *E. faecalis*⁴⁸

Composto	CIM (µM)	
	<i>S. pneumoniae</i>	<i>E. faecalis</i>
Carvacrol (10)	1704,17	1704,17
96	293,13	586,27
98	55,86	223,42

As diferenças obtidas nos experimentos, em relação à atividade antibacteriana dos pró-fármacos **79-81** e **96** e **98**, podem ser explicadas com base nas diferenças de composição da parede celular bacteriana de Gram-positivas e negativas. Os compostos **96** e **98**, por serem pequenos e hidrofóbicos, podem atravessar a parede celular de espécies Gram-positivas pelas interações com ácidos teicoicos presentes na estrutura bacteriana. As moléculas **79-81**, por outro lado, são pequenas e com caráter hidrofílico, o que permite que interajam com canais de porinas presentes na membrana externa das bactérias e explica a atividade

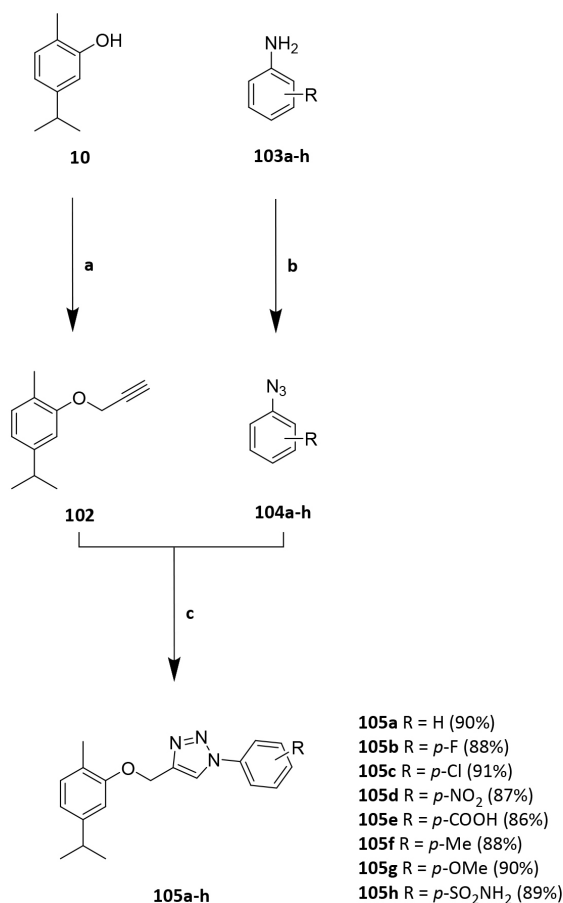
frente a bactérias Gram-negativas. Em pH fisiológico, as cargas positivas de **79-81** estabilizam as interações iônicas dentro dos canais de porinas, contribuindo para a atividade antibacteriana. Os pró-fármacos **82-95**, **97** e **99-101**, por sua vez demonstraram valores de CIM mais altos do que os obtidos pelo carvacrol, para todas as espécies. Esse fato mostra uma diminuição na atividade antibacteriana e sugere que a conjugação do carvacrol com aminoácidos básicos e a introdução de um espaçador não são necessários para aumentar a atividade.⁴⁸

Os pró-fármacos **96** e **98** demonstraram efetividade em reduzir a formação de biofilmes de *S. aureus* ATCC 43300 em todas as concentrações testadas, que foram de 1/2, 1/4 e 1/8 da CIM. O composto **98** também mostrou atividade na inibição de biofilmes de *S. epidermidis* ATCC 35984, especialmente à metade da CIM. Visto o caráter hidrofóbico desses dois pró-fármacos, a interação entre eles e a membrana bacteriana pode ocorrer de forma mais eficiente do que com o carvacrol, que possui menor hidrofobicidade. Essa interação, então, pode acarretar danos ao sistema de proteínas envolvido na fase inicial da formação de biofilmes, impedindo atividades como a adesão ao substrato e comunicação intercelular.⁴⁸

Em um outro estudo, de Aneja e colaboradores (2018), foram sintetizados análogos de 1,2,3-triazol/sulfonato do carvacrol. Desse modo, foram incorporados grupos 1,2,3-triazol e sulfonato no carvacrol, resultando em compostos que foram submetidos à avaliação antibacteriana. Os análogos contendo o grupo 1,2,3-triazol foram sintetizados pela propargilação do carvacrol (**10**), na presença de brometo de propargila e K₂CO₃, gerando o alcino correspondente (**102**). Paralelamente, anilinas substituídas com grupos doadores/retiradores de elétrons (**103a-h**) foram convertidas em suas azidas correspondentes (**104a-h**), via diazotação, utilizando nitrito de sódio (NaNO₂) e ácido clorídrico (HCl), seguido por um tratamento com azida de sódio (NaN₃). Em seguida, as azidas (**104a-h**) e o alcino (**102**) sofreram reação de cicloadição, catalisada por CuSO₄•5H₂O e ascorbato de sódio, em uma mistura de tetrahidrofurano (THF) e H₂O (1:2), gerando os compostos **105a-h** (Esquema 8).⁴⁹

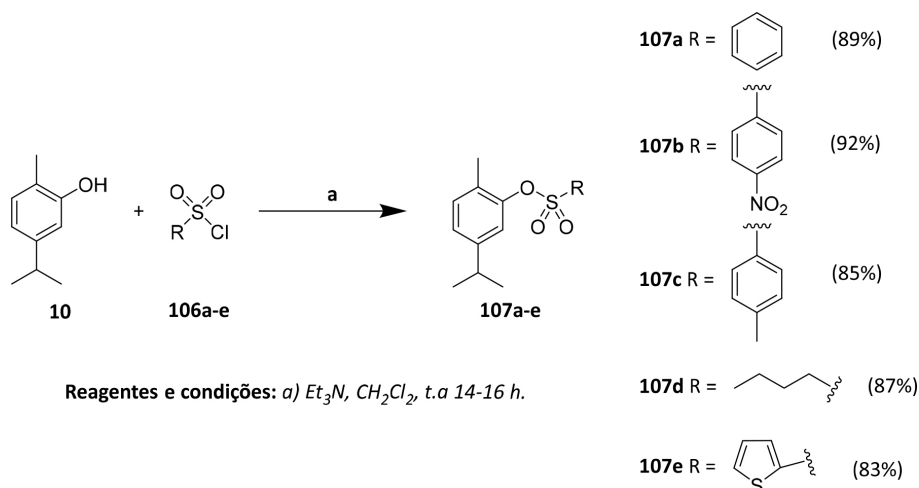
A síntese dos ésteres sulfônicos se deu pelo tratamento do precursor natural (carvacrol, **10**) com cloretos de sulfonila contendo substituintes arila, heteroarila ou alifáticos (**106a-e**), na presença de trietilamina (Et₃N) e CH₂Cl₂, o que gerou os derivados de sulfonato (**107a-e**) (Esquema 9).⁴⁹

O carvacrol e seus análogos triazol/sulfonato passaram por avaliação antibacteriana contra linhagens sensíveis de Gram-positivas (*S. pneumoniae* e *E. faecalis*) e Gram-negativas (*P. aeruginosa*, *S. enterica*, *K. pneumoniae* e *E. coli*). Os resultados mostram que alguns dos derivados com grupos 1,2,3-triazol exibiram atividade antibacteriana variando de moderada a potente, contra ambos os grupos de bactérias. O derivado **105e**, em especial, destacou-se como um potente inibidor de *E. coli* (IC₅₀ = 43,48 µM), em



Reagentes e condições: a) brometo de propargila, DMF, K₂CO₃, 0 °C, t.a 18 h; b) conc. HCl, NaNO₂, NaN₃, H₂O, EtOAc, 0 °C, t.a 2,5 h; c) CuSO₄•5H₂O, ascorbato de sódio THF/H₂O (1:2), t.a 20-24 h.

Esquema 8. Rota sintética adaptada de Aneja e colaboradores para a obtenção dos derivados do carvacrol contendo o grupo 1,2,3-triazol (**105a-h**) e seus respectivos rendimentos⁴⁹



Esquema 9. Rota sintética adaptada de Aneja e colaboradores para a obtenção dos derivados ésteres sulfônicos do carvacrol (**107a-e**) e seus respectivos rendimentos⁴⁹

relação ao carvacrol (IC₅₀ = 640,26 μM). Além de inibir do crescimento de *E. coli*, o composto **105e** também inibiu o crescimento de *S. pneumoniae* (IC₅₀ = 177,95 μM) e *E. faecalis* (IC₅₀ = 104,33 μM) com maior potência que o

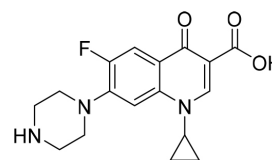
carvacrol. O composto **105d**, por sua vez, apresentou efeito moderado frente à *K. pneumoniae* (IC₅₀ = 345,72 μM), no entanto, não demonstrou potencial antibacteriano frente às demais linhagens. Em contrapartida, os compostos **105a**,

105b, **105c**, **105f**, **105g** e **105h** apresentaram redução na atividade antibacteriana frente a todas as linhagens testadas (Tabela 5).⁴⁹

Dentre os análogos ésteres sulfônicos, o composto **107a** mostrou atividade antibacteriana moderada frente a *E. coli* e *K. pneumoniae* ($IC_{50} = 388,94 \mu\text{M}$; $IC_{50} = 403,23 \mu\text{M}$, respectivamente). Já o composto **107d** apresentou atividade frente à *K. pneumoniae*, com IC_{50} de $353,34 \mu\text{M}$, e à *P. aeruginosa*, com IC_{50} de $438,07 \mu\text{M}$. O derivado **107e** também demonstrou atividade moderada frente à *P. aeruginosa* ($IC_{50} = 401,61 \mu\text{M}$). Entretanto, nenhum desses compostos exibiu maior atividade antibacteriana do que o carvacrol (Tabela 6).⁴⁹

Uma vez que o derivado **105e** demonstrou os melhores resultados, o composto foi selecionado para avaliação frente a linhagens de *E. coli* multirresistentes. À CIM ($2914,06 \mu\text{M}$), a substância inibiu mais de 95% das linhagens de *E. coli* MRA11, MRC24, MRAE26, MRAE32 e MROB11. Além disso, inibiu 86% de *E. coli* MRAE33 e MRAE44 e 79% de *E. coli* MRC17. Posteriormente, **105e** passou por uma avaliação *in vitro* para verificar seus efeitos sinérgicos frente às linhagens de *E. coli* MRA11, MRC17 e MRAE33, em combinação com o antibiótico ciprofloxacino (**108**, Figura 11). A atividade antibacteriana de **105e** combinado com ciprofloxacino foi significativamente aumentada frente a todas as linhagens, em comparação ao composto **105e** isolado.⁴⁹

Ademais, o composto **105e** demonstrou inibição da formação de biofilmes em linhagens de *E. coli* (à



108

Figura 11. Estrutura química do ciprofloxacino (**108**)

concentração de $355,72 \mu\text{M}$, em 95,23%) e *S. pneumoniae* (à concentração de $711,44 \mu\text{M}$, em 92,26%), em ensaio de redução de sal de tetrazólio. No ensaio utilizando cristal violeta, nas mesmas concentrações, **105e** inibiu a formação de biofilmes de *E. coli* em 94,32% e, de *S. pneumoniae*, em 93,36%. Em testes de citotoxicidade, o composto **105e** não se mostrou citotóxico em células HEK293 em concentrações de até $284,58 \mu\text{M}$.⁴⁹

3.1.3. Derivados com grupos sulfonamidas e ésteres de sulfenato

Oliveira e colaboradores (2016) sintetizaram nove sulfonamidas derivadas do carvacrol, inéditas na literatura, por um processo realizado em 2 etapas. Na primeira, foi sintetizado o cloreto de 4-hidroxi-2-isopropil-5-metilbenzo-1-sulfonila (**109**), a partir do carvacrol, em uma reação com ácido clorosulfônico em excesso. Na etapa seguinte, o composto **109** foi utilizado em reações com as aminas correspondentes para gerar as sulfonamidas de interesse (**110a-i**, Esquema 10).⁵⁰

Posteriormente, o carvacrol e os derivados sintetizados

Tabela 5. Atividade antibacteriana *in vitro* (medida pelo IC_{50}) do carvacrol e seus derivados com o grupo 1,2,3-triazol sintetizados por Aneja e colaboradores (**105a-h**)⁴⁹

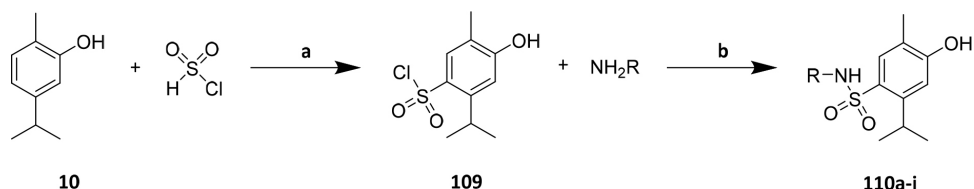
Composto	IC_{50} (μM)					
	<i>S. pneumoniae</i>	<i>E. fecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enterica</i>
Carvacrol (10)	633,74	453,73	640,26	412,13	292,44	636,73
105a	1538,21	2126,68	811,38	522,19	2132,34	1384,24
105b	968,04	1026,31	4857,83	649,18	751,58	1673,40
105c	895,09	688,76	1915,69	602,32	744,02	1320,60
105d	1402,93	680,18	1510,48	345,72	422,03	1343,06
105e	177,95	104,33	43,48	743,37	383,27	1153,16
105f	1167,72	757,95	898,39	765,63	719,59	948,48
105g	904,04	545,43	949,20	1431,48	500,41	1018,64
105h	1482,16	418,61	747,64	1556,55	1051	3340,75

Tabela 6. Atividade antibacteriana *in vitro* (medida pelo IC_{50}) do carvacrol e seus ésteres sulfônicos (**107a-e**) sintetizados por Aneja e colaboradores⁴⁹

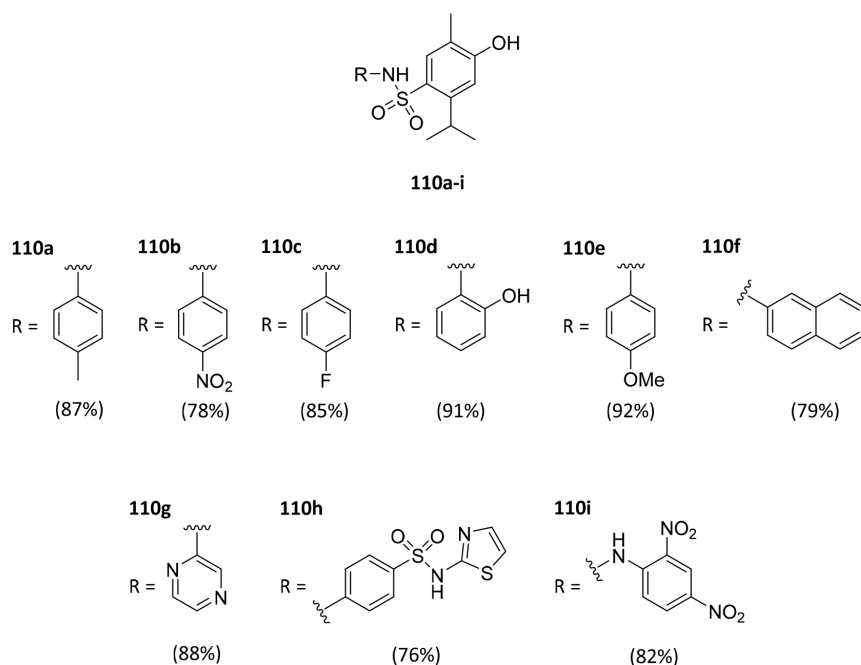
Composto	IC_{50} (μM)					
	<i>S. pneumoniae</i>	<i>E. fecalis</i>	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enterica</i>
Carvacrol (10)	633,74	453,73	640,26	412,13	292,44	636,73
107a	598,42	828,98	388,94	403,23	454,75	1189,92
107b	2643,98	731,25	524,79	1381,88	413,66	707,82
107c	1168	724,31	1041,26	917,90	476,81	777,92
107d	846,04	645,70	577,94	353,34	438,07	643,70
107e	571,10	529,94	502,95	550,55	401,61	1468,95

foram testados frente a 6 linhagens de MRSA (*S. aureus* resistente a meticilina, Sa1-Sa8) e uma cepa padrão de *S. aureus* (ATCC 25923), visando a determinação das CIM dos compostos. Os derivados de melhores resultados foram **110a**, **110c** e **110h**, dos quais o **110a** obteve melhores resultados para todas as linhagens de bactérias testadas (Tabela 7).⁵⁰

Posteriormente, o grupo de pesquisa avaliou a possível ação sinérgica entre os compostos **110a**, **110c**, carvacrol e antibióticos. Foram observados sinergismos entre o derivado **110a** e eritromicina (**111**, Figura 12), entre **110c** e tetraciclina (**112**) e entre **110c** e ampicilina (**113**). O carvacrol (**10**), no entanto, se mostrou indiferente para todos os antibióticos testados.⁵⁰



Reagentes e condições: a) 0 °C, instantâneo; b) CH₂Cl₂, t.a 3-6 h.



Esquema 10. Rota sintética adaptada de Oliveira e colaboradores para a síntese das sulfonamidas (**110a-i**) derivadas do carvacrol e seus respectivos rendimentos⁵⁰

Tabela 7. CIM do carvacrol e sulfonamidas (**110a-i**), sintetizadas por Oliveira e colaboradores, frente a diferentes linhagens de *Staphylococcus aureus*⁵⁰

Composto	CIM (ppm)						
	<i>S. aureus</i>	Sa1	Sa2	Sa3	Sa5	Sa6	Sa8
Carvacrol (10)	390,62	1562,50	1562,50	3125,00	781,25	1562,50	781,25
110a	15,62	3,90	7,81	3,90	7,81	7,81	15,62
110b	15,62	3,90	62,50	125,00	62,50	31,25	62,50
110c	31,25	7,81	62,50	7,81	31,25	7,81	31,25
110d	15,62	7,81	31,25	15,62	31,25	31,25	62,50
110e	31,25	15,62	250,00	15,62	62,50	31,25	125,00
110f	31,25	7,81	250,00	31,25	62,50	125,00	125,00
110g	62,50	31,25	500,00	31,25	15,62	31,25	500,00
110h	31,25	7,81	31,25	31,25	62,50	15,62	62,50
110i	31,25	15,62	31,25	15,62	62,50	125,00	62,50

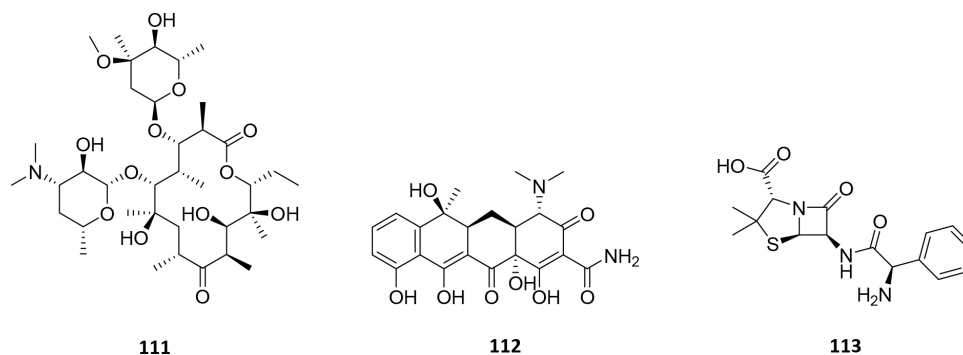


Figura 12. Estruturas químicas da eritromicina (111), tetraciclina (112) e ampicilina (113)

Por outro lado, Walsh e colaboradores (2020) sintetizaram ésteres triclorometilsulfenato do carvacrol, que foram testados contra células planctônicas de *Staphylococcus epidermidis* (Gram-positiva) e *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativa), uma vez que são prevalentes em hospitais. Desse modo, o grupo de pesquisa sintetizou um éster sulfenato do carvacrol, por meio de uma reação do monoterpreno com hipoclorito de triclorometila (CISCCl_3) em THF, conforme mostrado no Esquema 11.⁵¹

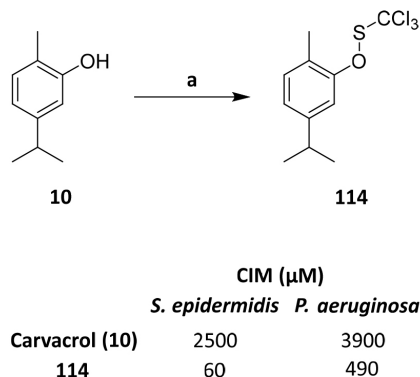
Entre outros compostos fenólicos analisados, o carvacrol (10) foi um dos que se mostraram mais potentes contra células planctônicas, tanto frente a *S. epidermidis* (CIM = 2500 μM) quanto a *P. aeruginosa* (CIM = 3900 μM). Essa atividade pode ser devido aos grupos metila e

isopropila do carvacrol, nas posições 2 e 5 do anel benzênico, respectivamente, uma vez que, de modo geral, os compostos mais lipofílicos se mostraram com menores CIM do que os hidrofílicos. Entretanto, o éster de sulfenato do carvacrol (114) apresentou menores valores de CIM do que o carvacrol para ambas as bactérias, mostrando uma atividade maior frente a *S. epidermidis* (CIM = 60 μM) do que frente a *P. aeruginosa* (CIM = 490 μM). Portanto, nesse estudo, a formação de ésteres de sulfenato do carvacrol, de fato, aumentou a atividade antibacteriana do composto.⁵¹

3.2. *Mycobacterium tuberculosis*

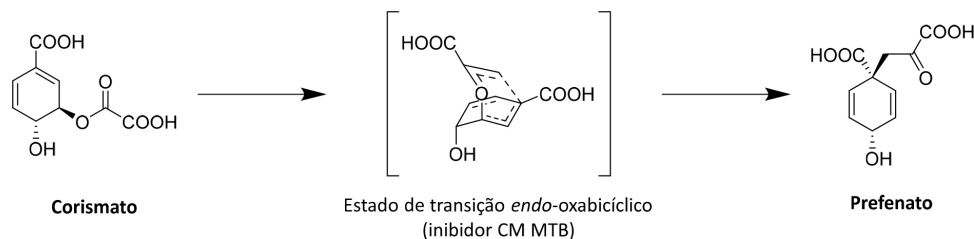
É notável que a biossíntese de aminoácidos é um processo essencial para a sobrevivência das células, uma vez que promove os monômeros para a construção de polipeptídeos fundamentais para completar as reações metabólicas no organismo. Neste contexto, a via do chiquimato compreende uma via anabólica, utilizada para a síntese dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano, utilizada por bactérias, fungos e plantas. A enzima corismato mutase (CM; EC 5.4.99.5) catalisa a conversão de corismato em prefenato, precursor fundamental para a formação de tirosina e fenilalanina. Essa reação acontece através de rearranjo de Claisen, passando por um estado de transição *endo*-oxabícíclico (Esquema 12).⁵²

A via do chiquimato é essencial para a biossíntese de aminoácidos aromáticos em bactérias. Entretanto, ela não está presente em vertebrados, portanto, a CM se torna um importante alvo molecular para o desenvolvimento de novos fármacos antibacterianos que possam ser utilizados no tratamento da tuberculose, causada pela *Mycobacterium*



Reagentes e condições: a) THF, CISCCl_3 , NEt_3 , 0 °C 1,5 h, t.a 1,5 h.

Esquema 11. Síntese do éster sulfenato do carvacrol (114) realizada por Walsh e colaboradores, juntamente com seus efeitos inibitórios (CIM) sobre *S. epidermidis* e *P. aeruginosa*.⁵¹



Esquema 12. Conversão de corismato em prefenato, por meio de um rearranjo de Claisen, realizada pela enzima corismato mutase (CM).⁵²

tuberculosis. Nesse cenário, o ácido dicarboxílico *endo*-oxabíciclico, que mimetiza o composto formado no estado de transição (Esquema 12) é um ótimo inibidor da CM, o que corrobora a hipótese de que o processo enzimático passa por uma estrutura de transição pericíclica. Dessa forma, Alokam e colaboradores (2014) sintetizaram derivados do carvacrol e avaliaram a atividade inibitória *in vitro* da CM de *M. tuberculosis*, para, então, estabelecer uma relação estrutura-atividade.⁵²

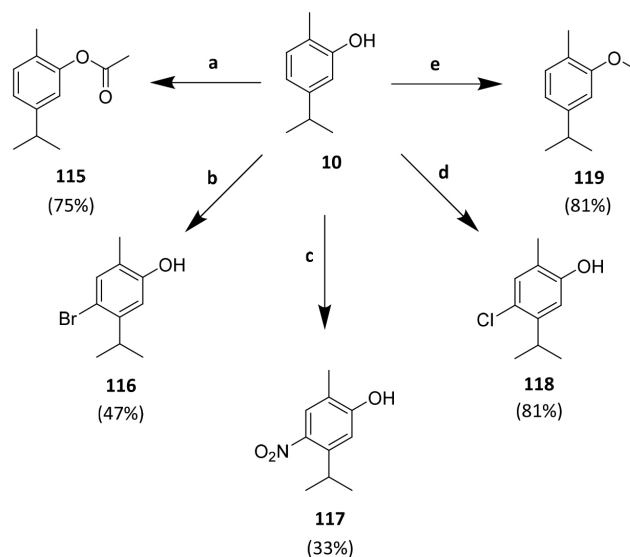
Ao total, foram sintetizados cinco derivados do carvacrol (**115**, **116**, **117**, **118** e **119**, com rendimentos de 75, 47, 33, 81 e 81%, respectivamente), conforme ilustrado no Esquema 13, para que fosse possível compreender os sítios ideais para a introdução de grupamentos químicos, além de estudar a influência do grupo fenólico na atividade antibacteriana. Todos os derivados do carvacrol se mostraram inativos frente à micobactéria causadora da TB, com exceção do derivado **118** (com o átomo de cloro na posição *para* do anel benzênico), que apresentou atividade inibitória razoável ($IC_{50} = 13,7 \pm 1,9 \mu\text{M}$; CIM = 67,69 μM).⁵²

Para que as atividades antimicobacterianas dos derivados fossem testadas, todos os compostos foram avaliados *in vitro* frente à *M. tuberculosis* H37Rv, pelo método de ensaio com Alamar Blue®. O carvacrol, que mostrou um ótimo resultado em inibir a enzima CM

($IC_{50} = 1,06 \pm 0,4 \mu\text{M}$), apresentou diminuição da sua atividade frente ao *M. tuberculosis* (CIM de 41,6 μM). Apesar disso, os derivados **115-117** e **119** apresentaram inatividade frente à micobactéria, enquanto a CIM obtida para o derivado **118** foi ainda maior do que aquela obtida para o carvacrol (CIM = 67,69 μM). A falta de corroboração nos resultados, devido ao forte potencial de inibição enzimática, mas relativamente baixa atividade anti-TB, pode estar relacionada à não-penetração dessas moléculas pela parede celular das micobactérias.⁵²

Por fim, apesar de terem apresentado certa atividade anti-TB, todos os compostos, inclusive o carvacrol (**10**), se mostraram menos ativos em comparação aos fármacos atualmente disponíveis no mercado para o tratamento da TB, como a rifampicina (**4**, CIM = 0,23 μM), a isoniazida (**5**, CIM = 0,66 μM) e o etambutol (**7**, CIM = 15,31 μM), o que demonstra um grande impasse para o desenvolvimento de novos fármacos que possam ser utilizados no tratamento da TB.⁵²

Vasconcelos e colaboradores (2018) também realizaram um estudo sobre a atividade do carvacrol (**10**) frente ao *M. tuberculosis*. Os pesquisadores avaliaram a citotoxicidade do carvacrol em células VERO e as mudanças morfológicas que a atividade do carvacrol e seus derivados podem acarretar ao *M. tuberculosis*. Nesse estudo foram utilizados



	IC_{50} (μM)	CIM (μM)
Carvacrol (10)	$1,06 \pm 0,4$	41,6
115	Inativo	
116	Inativo	
117	Inativo	
118	$13,7 \pm 1,9$	67,69
119	Inativo	

Reagentes e condições: a) CH_3COCl , CH_2Cl_2 , Et_3N , t.a 3 h; b) Br_2 , AcOH , t.a; c) AcOH , HNO_3 , t.a; d) SO_2Cl_2 , CCl_4 , t.a 45 min; e) CH_3I , K_2CO_3 , acetona, 60 °C 2 h.

Esquema 13. Rota sintética adaptada de Alokam e colaboradores para a síntese dos compostos **115-119** a partir do carvacrol (**10**), juntamente com seus efeitos inibitórios sobre a enzima CM (IC_{50}) e sobre células de *M. tuberculosis* (CIM)⁵²

a cepa padrão H37Rv e nove isolados clínicos, dentre os quais um é suscetível aos fármacos estreptomicina (STR), RMP (**4**), INH (**5**) e EMB (**7**); um é monorresistente à INH; um é monorresistente à STR e os 6 restantes correspondem às cepas de MDR-TB. Além disso, o grupo de pesquisa sintetizou três derivados do carvacrol que foram submetidos a testes frente ao *M. tuberculosis* (Esquema 14). O composto **115** foi sintetizado pela acetilação do carvacrol com anidrido acético e H_2SO_4 , com 87% de rendimento. O derivado **120** foi obtido pela acilação do carvacrol com cloreto de benzofila (BzCl), na presença de água e hidróxido de sódio (NaOH), com 72% de rendimento. O composto **35** foi obtido a partir de uma substituição nucleofílica com cloreto de benzila (BnCl), na presença de THF e hidreto de sódio (NaH), com rendimento de 76%. A atividade anti-*M. tuberculosis* do carvacrol e seus derivados foi obtida por ensaio de microtitulação de resazurina (REMA) e a CIM foi definida como a menor concentração que impediu a ocorrência da mudança de coloração que indicava crescimento da micobactéria.⁵³

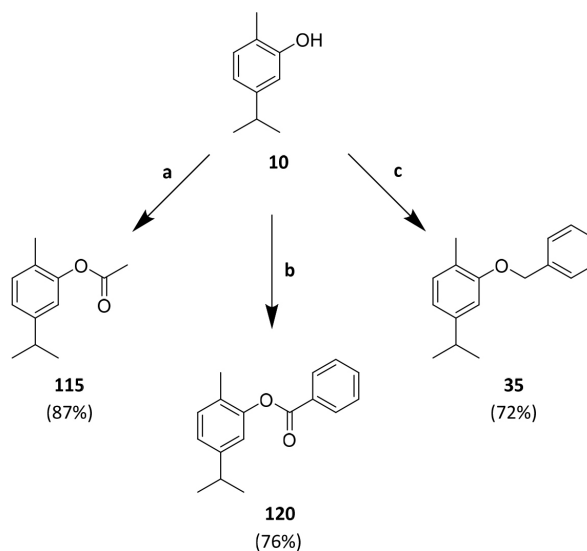
Frente à cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, os valores de CIM obtidos para o carvacrol, em pH 6,0 (visto que é o valor encontrado na célula do macrófago ativado pelo IFN- γ , em uma infecção causada pelo *M. tuberculosis*) e 7,0, foi de $76 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em pH 7,0, os derivados **115** e **35** não mostraram melhora em suas atividades contra *M. tuberculosis*, visto que os valores de CIM foram e 1250 e $312 \mu\text{g mL}^{-1}$,

respectivamente, e a CIM do derivado **77** ($78 \mu\text{g mL}^{-1}$) não mostrou diferença significativa, em comparação àquela obtida para o carvacrol.⁵³

Nos ensaios de citotoxicidade, o derivado **120** e o carvacrol se mostraram mais seletivos para *M. tuberculosis* H37Rv do que para células VERO ($CC_{50} = 86 \pm 1,41 \mu\text{g mL}^{-1}$, Índice de seletividade (IS) = 1,13; $CC_{50} = 203 \pm 20 \mu\text{g mL}^{-1}$, IS = 2,60, respectivamente), o que demonstra determinada segurança do carvacrol, ao ser utilizado em alimentos e na indústria farmacêutica, em concentrações menores do que $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. A determinação da citotoxicidade dos derivados **115** e **35** não foi realizada, já que os valores de CIM para esses compostos foram bem maiores do que aquele obtido com o carvacrol.⁵³

Os valores de CIM obtidos frente aos isolados clínicos, a partir do carvacrol e de combinação deste com fármacos clássicos para o tratamento da TB (RMP, INH e EBM) variaram de 19 a $152 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 8) e o classificam como um bom candidato a estudos adicionais para a descoberta de novos fármacos anti-TB, sobretudo pelo CIM observado no isolado 19 (uma variante MDR), sobre a qual o carvacrol apresentou CIM de $19 \mu\text{g mL}^{-1}$.⁵³

Visto que o tratamento para TB consiste em uma politerapia, torna-se essencial o conhecimento acerca de interações medicamentosas. Desse modo, a combinação de carvacrol e rifampicina frente aos isolados clínicos **7**, **45**, **64 A**, **109** e **19** demonstrou aumento do efeito antibacteriano,



<i>M. tuberculosis</i> H37Rv CIM em pH 7,0 ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
Carvacrol (10)	76
115	1250
120	78
35	312

Reagentes e condições: a) anidrido acético, H_2SO_4 , t.a 30 min; b) BzCl, H_2O , NaOH, 3 h; c) BnCl, THF, NaH, N_2 , refluxo 1h, t.a 12 h.

Esquema 14. Rota sintética adaptada de Vasconcelos e colaboradores para a obtenção dos derivados **115**, **120** e **35**, juntamente com os valores de CIM dos compostos frente a *M. tuberculosis* H37Rv, em pH 7,0⁵³

Tabela 8. Valores de CIM obtidas para rifampicina (RMP, 4), isoniazida (INH, 5), etambutol (EMB, 7), carvacrol (10) e combinações, frente à *M. tuberculosis* H37Rv e isolados clínicos⁵³

Variante/ Isolados clínicos	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)						
	Carvacrol	RMP	Carvacrol + RMP	INH	Carvacrol + INH	EMB	Carvacrol + EMB
H37Rv	76	0,004	0,002	0,06	0,03	2	0,25
47s	152	0,004	0,001	0,06	0,01	2	2
7	19	0,002	0,0005	0,06	0,03	2	2
4	19	0,12	0,001	4	2	2	2
45	38	32	4	4	2	8	4
64 A	38	200	50	3,12	3,12	2	0,25
109	19	25	12,5	4	2	1	0,5
3614	76	12,5	3,12	6,25	3,12	16	8
71A	76	50	50	12,5	12,5	8	4
19	19	12,5	3,12	3,12	1,56	8	4

em comparação aquele obtido quando utilizados de forma isolada. Além disso, não foi observado antagonismo entre o carvacrol e outros fármacos anti-TB.⁵³

Através da análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV), foi possível observar as mudanças morfológicas no bacilo exposto à metade da CIM do carvacrol nos intervalos de 24, 48 e 72 horas, nos quais houve mudanças em seu formato e tendências para a origem de aglomerados. Essas mudanças morfológicas ilustram a capacidade de terpenos naturais causarem alterações na membrana celular lipídica da micobactéria, desestabilização de ácidos graxos, interferências em vias metabólicas, alteração do controle eletrolítico, inibição de atividades enzimáticas, entre outros efeitos inibitórios.⁵³

Um dos mecanismos para o desenvolvimento de resistência a antimicrobianos do *M. tuberculosis* se dá pelo efluxo ativo de fármacos por uma membrana proteica, que é capaz de transportar fármacos de forma ativa para fora do organismo. Sendo assim, o ensaio de acúmulo de brometo de etídio foi realizado com o carvacrol sobre *M. tuberculosis* H37Rv e avaliado através de análises de fluorometria. O carvacrol demonstrou atividade inibitória da bomba de efluxo (EPI – do inglês “efflux pump inhibitors”) da micobactéria, com um valor de fluorescência relativa final (RFF) de 0,38 (similar ao resultado obtido pelo verapamil, de 0,20, utilizado como controle de EPI). Dessa forma, nesse estudo, o carvacrol se mostrou um bom candidato para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da TB, visto que teve boa atividade anti-*M. tuberculosis* e sinergismo com a RMP, um fármaco anti-TB.⁵³

Além dos grupos de pesquisa de Alokam (2014) e de Vasconcelos (2018), Jee e colaboradores (2017) também estudaram as atividades do carvacrol sobre a *M. tuberculosis*, no entanto, em sua forma latente, utilizando técnicas de modelagem molecular. O estudo teve foco na inibição da proteína do choque térmico 16.3 (sHSP16.3), expressa pelo gene *hspX* e essencial para a sobrevivência da micobactéria em seu hospedeiro, durante longos períodos de infecção. A sHSP16.3 é uma proteína

que exerce papel importante na manutenção da latência a longo prazo da *M. tuberculosis* e é indispensável para o crescimento, virulência e espessamento da parede celular da micobactéria, além de poder ser utilizada como marcador para imunodiagnóstico de diversas formas clínicas de TB. O objetivo do estudo era avaliar a afinidade de interação do carvacrol pela sHSP16.3 e analisar a estabilidade do complexo ligante-alvo molecular. Os pesquisadores utilizaram métodos *in silico*, através de cálculos de *docking* e dinâmica molecular, seguidos de validação dos achados experimentais por meio da mecânica molecular generalizada, através da área de superfície molecular, pelo método de Born/Poisson-Boltzmann.⁵⁴

Os resultados mostraram que o carvacrol foi ancorado com a proteína sHSP16.3 em sua região ativa, dentro de 5 Å. A pontuação de *docking* do carvacrol foi de 3,26 (Surflex-Dock) e a energia de *docking* obtida foi de -5,4 kcal mol⁻¹ (AutoDock). No bolsão catalítico, a molécula do carvacrol formou uma ligação de hidrogênio com o resíduo de aminoácido Glu92 e quatro interações hidrofóbicas com os resíduos Phe93, Ala94, Pro58 e Arg38, demonstrando a tendência inibitória da sHSP16.3.⁵⁴

Para confirmar a validade dos dados de *docking*, os pesquisadores realizaram uma ancoragem molecular utilizando uma outra estrutura cristalizada, similar e homóloga, do organismo *Schizosaccharomyces pombe* (PDB ID: 3W1Z), na qual os resultados mostraram uma menor energia de ligação e pontuação de *docking*, em comparação ao modelo da sHSP16.3 da *M. tuberculosis*. Portanto, foi confirmada a alta afinidade de interação pelo modelo da proteína sHSP16.3 e menor interação com a homóloga do *Schizosaccharomyces pombe*, visto que a pontuação de *docking*, obtida no Surflex-Dock foi de 2,26 e a energia de *docking* obtida no AutoDock foi de -4,9 kcal mol⁻¹. Sendo assim, o carvacrol mostrou energia de *docking* entre -4,6 e -5,4 kcal mol⁻¹, para 10 conformações obtidas no AutoDock, o que ilustra as conformações estáveis da molécula no sítio de ligação.⁵⁴

4. Conclusões

A partir do exposto, percebe-se que uma das maiores dificuldades no desenvolvimento de novos fármacos é a resistência bacteriana. O carvacrol é um importante monoterpene, produzido por diversas espécies de orégano e tomilho, com grande potencial antimicrobiano. Sugere-se que a hidroxila fenólica do carvacrol, provavelmente devido à sua acidez, pode exercer papel importante na atividade antimicrobiana, visto que os derivados que tiveram um acréscimo de cadeia alquílica e perderam o grupamento hidroxila, em geral, tiveram seu potencial antimicrobiano diminuído. O acréscimo de grupos substituintes na posição *para* do anel benzênico, por sua vez, se mostra promissor, uma vez que esses grupos levam a um aumento da acidez do composto e, assim, podem aumentar sua atividade inibitória. As porções hidrofóbicas do carvacrol (suas respectivas cadeias laterais alifáticas) também se mostram importantes na atividade antimicrobiana, uma vez que podem interagir com as membranas plasmáticas das células e promover sua ruptura e conseqüente perda de sua permeabilidade seletiva, levando ao descontrole eletrolítico e posterior morte celular. Dessa forma, observa-se o potencial do carvacrol como um composto-líder capaz de ser otimizado para, possivelmente, se tornar um novo fármaco com ação frente a microrganismos patogênicos resistentes, que constituem um problema atual para a saúde pública.

Agradecimentos

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Agradecemos também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de iniciação científica concedida.

Referências Bibliográficas

- Silhavy, T. J.; Kahne, D.; Walker, S.; The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **2010**, 2, 1. [Crossref] [PubMed]
- Beveridge, T. J.; Use of the gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry: official publication of the Biological Stain Commission* **2001**, 76, 111. [PubMed]
- Szentirmai, E.; Massie, A. R.; Kapás, L.; Lipoteichoic acid, a cell wall component of Gram-positive bacteria, induces sleep and fever and suppresses feeding. *Brain, Behavior, and Immunity* **2021**, 92, 184. [Crossref] [PubMed]
- Vilhêze, C.; Kremer, L.; Acid-Fast Positive and Acid-Fast Negative Mycobacterium tuberculosis: The Koch Paradox. *Microbiology Spectrum* **2017**, 5, 1. [Crossref] [PubMed]
- Souza, J.; Os benefícios das bactérias na saúde humana. Instituto de Microbiologia Paulo de Góes UFRJ. Disponível em: <http://www.microbiologia.ufrj.br/portal/index.php/pt/graduacao/informe-da-graduacao/430-os-beneficios-das-bacterias-na-saude-humana>. Acesso em: 5 janeiro 2021.
- Departamento de Microbiologia (ICB-USP). Glossário de Bactérias com Importância Médica. Disponível em: <https://microbiologia.icb.usp.br/cultura-e-extensao/textos-de-divulgacao/bacteriologia/bacteriologia-medica/glossario-de-bacterias-com-importancia-medica/>. Acesso em: 5 janeiro 2021.
- Valverde, R.; Doenças negligenciadas. Agência Fiocruz de Notícias: Saúde e ciência para todos. Disponível em: <https://agencia.fiocruz.br/doen%C3%A7as-negligenciadas>. Acesso em: 21 novembro 2022.
- World Health Organization (WHO). Global Tuberculosis Report 2021. Disponível em: <https://www.who.int/publications/item/9789240037021>. Acesso em: 23 janeiro 2022.
- Costa, A. L. P.; Silva Junior, A. C. S.; Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. *Estação Científica (UNIFAP)* **2017**, 7, 45. [Link]
- OPAS, Brasil. Folha informativa - Resistência aos antibióticos. Organização Pan-Americana da Saúde Brasil, 2017. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5664:folha-informativa-resistencia-aos-antibioticos&Itemid=812. Acesso em: 6 janeiro 2021
- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resistência microbiana - mecanismos e impacto clínico. Disponível em: https://www.anvisa.gov.br/servicos/controle/rede_rm/cursos/rm_controle/opas_web/modulo3/mecanismos.htm. Acesso em: 6 janeiro 2021.
- Seung, K. J.; Keshavjee, S.; Rich, M. L.; Multidrug-Resistant Tuberculosis and Extensively Drug-Resistant Tuberculosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2015**, 5, 1. [Crossref] [PubMed]
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Drug-resistant TB: XDR-TB FAQ. Disponível em: <https://www.who.int/tb/areas-of-work/drug-resistant-tb/xdr-tb-faq/en/>. Acesso em: 6 janeiro 2021.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Antibacterial products in clinical development for priority pathogens. Disponível em: <https://www.who.int/observatories/global-observatory-on-health-research-and-development/monitoring/antibacterial-products-in-clinical-development-for-priority-pathogens>. Acesso em: 31 março 2022.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>. Acesso em: 31 março 2022.
- Newman, D. J.; Cragg, G. M.; Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. *Journal of Natural Products* **2020**, 83, 770. [Crossref] [PubMed]
- Menezes, P. M. N.; Brito, M. C.; Paiva, G. O.; Santos, C. O.; Oliveira, L. M.; Ribeiro, L. A. A.; Lima, J. T.; Lucchese, A. M.; Silva, F. S.; Relaxant effect of Lippia origanoides essential oil in guinea-pig trachea smooth muscle involves potassium channels

- and soluble guanylyl cyclase. *Journal of Ethnopharmacology* **2018**, *220*, 16. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
18. Boskabady, M. H.; Jafari, Z.; Pouraboli, I.; The effect of carvacrol on muscarinic receptors of guinea-pig tracheal chains. *Phytotherapy Research* **2011**, *25*, 530. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 19. Dukanovic, D.; Bojic, M. G.; Marinkovic, S.; Trailovic, S.; Stojiljkovic, M. P.; Skrbic, R.; Vasorelaxant effect of monoterpene carvacrol on isolated human umbilical artery. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **2022**, *100*, 755. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 20. Peixoto-Neves, D.; Silva-Alves, K. S.; Gomes, M. D.; Lima, F. C.; Lahlou, S.; Magalhaes, P. J.; Ceccatto, V. M.; Coelho-de-Souza, A. N.; Leal-Cardoso, J. H.; Vasorelaxant effects of the monoterpene phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. *Fundamental & Clinical Pharmacology* **2010**, *24*, 341. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 21. Dong, R. H.; Fang, Z. Z.; Zhu, L. L.; Liang, S. C.; Ge, G. B.; Liu, Z. Y.; Investigation of UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) inhibitory properties of carvacrol. *Phytotherapy Research* **2012**, *26*, 86. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 22. Sasaki, K.; Wada, K.; Tanaka, Y.; Yoshimura, T.; Matuoka, K.; Anno, T.; Thyme (*Thymus vulgaris* L.) leaves and its constituents increase the activities of xenobiotic-metabolizing enzymes in mouse liver. *Journal of Medicinal Food* **2005**, *8*, 184. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 23. Hotta, M.; Nakata, R.; Katsukawa, M.; Hori, K.; Takahashi, S.; Inoue, H.; Carvacrol, a component of thyme oil, activates PPARalpha and gamma and suppresses COX-2 expression. *Journal of Lipid Research* **2010**, *51*, 132. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 24. Landa, P.; Kokoska, L.; Pribylova, M.; Vanek, T.; Marsik, P.; In vitro anti-inflammatory activity of carvacrol: Inhibitory effect on COX-2 catalyzed prostaglandin E(2) biosynthesis. *Archives of Pharmacal Research* **2009**, *32*, 75. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 25. Gunes-Bayir, A.; Guler, E. M.; Bilgin, M. G.; Ergun, I. S.; Kocyigit, A.; Dadak, A.; Anti-Inflammatory and Antioxidant Effects of Carvacrol on N-Methyl-N0-Nitro-N-Nitrosoguanidine (MNNG) Induced Gastric Carcinogenesis in Wistar Rats. *Nutrients* **2022**, *14*, 2848. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 26. Jayakumar, S.; Madankumar, A.; Asokkumar, S.; Raghunandhakumar, S.; Gokula Dhas, K.; Kamaraj, S.; Josephine Divya, M. G.; Devaki, T.; Potential preventive effect of carvacrol against diethylnitrosamine-induced hepatocellular carcinoma in rats. *Molecular and Cellular Biochemistry* **2012**, *360*, 51. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 27. Melo, F. H.; Moura, B. A.; de Sousa, D. P.; de Vasconcelos, S. M.; Macedo, D. S.; Fonteles, M. M.; Viana, G. S.; de Sousa, F. C.; Antidepressantlike effect of carvacrol (5-Isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement of dopaminergic system. *Fundamental & Clinical Pharmacology* **2011**, *25*, 362. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 28. Melo, F. H.; Venancio, E. T.; de Sousa, D. P.; de Franca Fonteles, M. M.; de Vasconcelos, S. M.; Viana, G. S.; de Sousa, F. C.; Anxiolytic-like effect of Carvacrol (5-isopropyl-2-methylphenol) in mice: involvement with GABAergic transmission. *Fundamental & Clinical Pharmacology* **2010**, *24*, 437. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 29. Uyanoglu, M.; Canbek, M.; Aral, E.; Husnu Can Baser, K.; Effects of carvacrol upon the liver of rats undergoing partial hepatectomy. *Phytomedicine* **2008**, *15*, 226. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 30. Canbek, M.; Uyanoglu, M.; Bayramoglu, G.; Senturk, H.; Erkasap, N.; Koken, T.; Uslu, S.; Demirutu, C.; Aral, E.; Husnu Can Baser, K.; Effects of carvacrol on defects of ischemia-reperfusion in the rat liver. *Phytomedicine* **2008**, *15*, 447. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 31. Ahmad, A.; Khan, A.; Akhtar, F.; Yousuf, S.; Xess, I.; Khan, L. A.; Manzoor, N.; Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **2011**, *30*, 41. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 32. Dalleau, S.; Cateau, E.; Berges, T.; Berjeaud, J. M.; Imbert, C.; In vitro activity of terpenes against *Candida* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents* **2008**, *31*, 572. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 33. Suntres, Z. E.; Coccimiglio, J.; Alipour, M.; The Bioactivity and Toxicological Actions of Carvacrol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2015**, *55*, 304. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 34. Baser, K. H. C. Biological and Pharmacological Activities of Carvacrol and Carvacrol Bearing Essential Oils. *Current Pharmaceutical Design* **2008**, *14*, 3106. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 35. Das, S.; Chourashi, R.; Mukherjee, P.; Kundu, S.; Koley, H.; Dutta, M.; Mukhopadhyay, A. K.; Okamoto, K.; Chatterjee, N. S.; Inhibition of growth and virulence of *Vibrio cholerae* by carvacrol, an essential oil component of *Origanum* spp. *Journal of Applied Microbiology* **2021**, *131*, 1147. [[Crossref](#)]
 36. Mauriello, E.; Ferrari, G.; Donsi, F.; Effect of formulation on properties, stability, carvacrol release and antimicrobial activity of carvacrol emulsions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2020**, *197*, 1. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 37. Falsafi, T.; Moradi, P.; Mahboubi, M.; Rahimi, E.; Momtaz, H.; Hamed, B.; Chemical composition and anti-*Helicobacter pylori* effect of *Satureja bachtiarica* Bunge essential oil. *Phytomedicine* **2014**, *22*, 173. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 38. Ladeira, M. S. P.; Salvadori, D. M. F.; Rodrigues, M. A. M.; Biopatologia do *Helicobacter pylori*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* **2003**, *39*, 335. [[Crossref](#)]
 39. Mooyottu, S.; Flock, G.; Venkitanarayanan, K.; Carvacrol reduces *Clostridium difficile* sporulation and spore outgrowth in vitro. *Journal of Medical Microbiology* **2017**, *66*, 1229. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 40. Andrade-Ochoa, S.; Nevárez-Moorillón, G. V.; Sánchez-Torres, L. E.; Villanueva-García, M.; Sánchez-Ramírez, B. E.; Rodríguez-Valdez, L. M.; Rivera-Chavira, E.; Quantitative structure-activity relationship of molecules constituent of different essential oils with antimycobacterial activity against *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **2015**, *15*, 1. [[Crossref](#)]
 41. Kachur, K.; Suntres, Z.; The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **2019**, *60*, 3042. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
 42. Di Pasqua, R.; Hoskins, N.; Betts, G.; Mauriello, G.; Changes in Membrane Fatty Acids Composition of Microbial Cells Induced by Addiction of Thymol, Carvacrol, Limonene,

- Cinnamaldehyde, and Eugenol in the Growing Media. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 2745. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
43. Edwin, J. A.; Bokhoven, J. L. M. T.; Zweijtzer, C.; Burt, S. A.; Haagsman, H. P.; Structural Requirements for the Antimicrobial Activity of Carvacrol. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2006**, *54*, 1874. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
44. Pinheiro, P. F.; Menini, L. A. P.; Bernardes, P. C.; Saraiva, S. H.; Carneiro, J. W. M.; Costa, A. V.; Arruda, T. R.; Lage, M. R.; Gonçalves, P. M.; Bernardes, C. O.; Alvarenga, E. S.; Menini, L.; Semisynthetic Phenol Derivatives from Natural Phenols: Antimicrobial Activity and Molecular Properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2017**, *66*, 323. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
45. Walsh, D. J.; Livinghouse, T.; Goeres, D. M.; Mettler, M.; Stewart, P. S.; Antimicrobial Activity of Naturally Occurring Phenols and Derivatives Against Biofilm and Planktonic Bacteria. *Frontiers in Chemistry* **2019**, *7*, 1. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
46. Sisto, F.; Carradori, S.; Guglielmi, P.; Traversi, C. B.; Spano, M.; Sobolev, A. P.; Secci, D.; Marcantonio, M. C.; Haloci, E.; Grande, R.; Mincione, G.; Synthesis and Biological Evaluation of Carvacrol-Based Derivatives as Dual Inhibitors of *H. pylori* Strains and AGS Cell Proliferation. *Pharmaceuticals (Basel)* **2020**, *13*, 405. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
47. Bkhaitan, M. M.; Alarjah, M.; Mirza, A. Z.; Abdalla, A. N.; El-Said, H. M.; Faidah, H. S.; Preparation and biological evaluation of metronidazole derivatives with monoterpenes and eugenol. *Chemical Biology and Drug Design* **2018**, *92*, 1954. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
48. Marinelli, L.; Fornasari, E.; Eusepi, P.; Ciulla, M.; Genovese, S.; Epifano, F.; Fiorito, S.; Turkez, H.; Örtücü, S.; Mingoia, M.; Simoni, S.; Pugnali, A.; Di Stefano, A.; Cacciatore, I.; Carvacrol prodrugs as novel antimicrobial agents. *European Journal of Medicinal Chemistry* **2019**, *178*, 515. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
49. Aneja, B.; Azam, M.; Alam, S.; Perwez, A.; Maguire, R.; Yadava, U.; Kavanagh, K.; Daniliuc, C. G.; Rizvi, M. M. A.; Haq, Q. M. R.; Abid, M.; Natural Product-Based 1,2,3-Triazole/Sulfonate Analogues as Potential Chemotherapeutic Agents for Bacterial Infections. *ACS Omega* **2018**, *3*, 6912. [[Crossref](#)]
50. Oliveira, A. S.; Llanes, L. C.; Brighente, I. M. C.; Nunes, R. J.; Yunes, R. A.; Máximo Jr., N.; Baumgart, A. M. K.; Aust, A. N.; Cruz, A. B.; New Sulfonamides Derived from Carvacrol: Compounds with High Antibacterial Activity against Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. *Journal of Biosciences and Medicines* **2016**, *4*, 105. [[Crossref](#)]
51. Walsh, D. J.; Livinghouse, T.; Durling, G. M.; Chase-Bayless, Y.; Arnold, A. D.; Stewart, P. S.; Sulfonate Esters of Simple Phenols Exhibit Enhanced Activity against Biofilms. *ACS Omega* **2020**, *5*, 6010. [[Crossref](#)]
52. Alokam, R.; Jeankumar, V. U.; Sridevi, J. P.; Matikonda, S. S.; Peddi, S.; Alvala, M.; Yogeewari, P.; Sriram, D.; Identification and structure–activity relationship study of carvacrol derivatives as Mycobacterium tuberculosis chorismate mutase inhibitors. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **2014**, *29*, 547. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
53. Vasconcelos, S. S. N.; Ferracioli-Caleffi, K. R.; Hegeto, L. A.; Baldin, V. P.; Nakamura, C. V.; Stefanello, T. F.; Gauze, G. F.; Yamazaki, D. A.; Scodro, R. B.; Siqueira, V. L.; Cardoso, R. F.; Carvacrol activity & morphological changes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Future Microbiology* **2018**, *13*, 877. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]
54. Jee, B.; Kumar, S.; Yadav, R.; Singh, Y.; Kumar, A.; Sharma, N.; Ursolic acid and carvacrol may be potential inhibitors of dormancy protein small heat shock protein16.3 of *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biomolecular Structure and Dynamics* **2017**, *36*, 3434. [[Crossref](#)] [[PubMed](#)]