



AVALIAÇÃO ECOTOXICOLÓGICA DO COMPOSTO BIOATIVO CARVACROL EM ORGANISMOS AQUÁTICOS

Gabriel Prudencio **Silva**¹; Mara Denise Luck **Mendes**²; José Henrique **Vallim**³; Claudio Martín **Jonsson**⁴; Sonia Claudia do Nascimento de **Queiroz**⁵

Nº 24407

RESUMO – Nos últimos anos tem havido uma grande preocupação sobre o uso intensivo de antibióticos no controle de doenças de animais devido aos potenciais efeitos adversos em organismos não-alvo e nos seres humanos que se alimentam dessas fontes proteicas. Assim, óleos essenciais produzidos por plantas e que apresentam fortes atividades antibacterianas, vêm sendo avaliados para substituir os produtos comerciais. Dentre os componentes presentes em óleos essenciais já identificados com potente ação antimicrobiana, um dos mais estudados é o carvacrol. Devido ao fato de não existir risco zero, mesmo sendo proveniente de óleos essenciais considerados seguros, há uma necessidade de avaliar o risco do uso das substâncias para organismos não-alvo, quando utilizados na forma isolada. Assim sendo, foram avaliados os efeitos adversos do carvacrol para as espécies aquáticas Raphidocelis subcapitata (microalga), Lemna minor (macrófita), Daphnia magna (microcrustáceo), Artemia salina (microcrustáceo) e Panagrolaimus sp. (nematóide), através de uma relação concentração-resposta. Dentre os organismos-teste avaliados quanto aos efeitos adversos do carvacrol, as microalgas e as macrófitas foram os mais sensíveis, demonstrando valor de concentração efetiva média (inibição de crescimento em 168 h e 120 h para L. minor e R. subcapitata, respectivamente) do composto equivalente a ~1,3 mg/L para ambos os organismos-teste. A concentração hipotética de risco para somente 5% das espécies de uma comunidade (HC5) foi determinada com valor equivalente a 0,0676 mg/L. Este dado auxilia no estabelecimento de uma concentração máxima permissível nos compartimentos aquáticos associada ao uso de carvacrol.

Palavras-chaves Óleos essenciais, Risco ambiental, Bioinsumos, Concentração Máxima Permissível, Ecotoxicologia.

¹Autor: Bolsista CNPq (PIBIC), Graduação em Ciências Biológicas, PUC-Campinas; prudencio.gps@gmail.com

² Colaborador: Técnico, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

³ Colaborador: Analista, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

⁴ Colaborador: Pesquisador, Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP.

⁵ Orientador: Pesquisador da Embrapa Meio Ambiente, Jaguariúna-SP; sonia.queiroz@embrapa.br



ABSTRACT – *In recent years there has been great concern about the intensive use of antibiotics in controlling animal diseases due to the potential adverse effects on non-target organisms and humans that feed on these protein sources. Therefore, essential oils produced by plants and which have strong antibacterial activities have been evaluated to replace commercial products. Among the components present in essential oils already identified with powerful antimicrobial action, one of the most studied is carvacrol. Due to the fact that there is no zero risk, even though it comes from essential oils considered safe, there is a need to assess the risk to non-target organisms when used in isolated form. Therefore, the adverse effects of carvacrol were evaluated on the aquatic species Raphidocelis subcapitata (microalgae), Lemna minor (macrophyte), Daphnia magna (microcrustacean), Artemia salina (microcrustacean) and Panagrolaimus sp. (nematode), through a concentration- response. Among the test organisms evaluated for the adverse effects of carvacrol, microalgae and macrophytes were the most sensitive, demonstrating the compound's average effective concentration value (growth inhibition at 168 h and 120 h for L. minor and R. subcapitata, respectively) equivalent to ~1.3 mg/L for both test organisms. The hypothetical risk concentration for only 5% of the species in a community (HC5) was determined with a value equivalent to 0.0676 mg/L. This data helps to establish a maximum permissible concentration in aquatic compartments associated with the use of carvacrol.*

Keywords: Essencial oils, Environmental risk, Biological inputs, Maximum Permissible Concentration, Ecotoxicology.

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem havido uma preocupação muito grande sobre o uso intensivo de antibióticos no controle de doenças de animais devidos aos potenciais efeitos adversos em organismos não-alvo, e nos seres humanos que se alimentam dessas fontes de proteína.

Os maiores problemas quanto ao uso indiscriminado são devido às altas probabilidades de causarem resistência das bactérias a essas substâncias e também alergias nos consumidores quando há a presença de seus resíduos nos alimentos (Ben et al., 2019). Assim, nos últimos anos muitas pesquisas têm sido realizadas envolvendo o uso de compostos bioativos produzidos por plantas. Devido às suas potentes atividades antibacterianas, os óleos essenciais vêm sendo avaliados para substituir os produtos comerciais.

Uma das principais vantagens é que os óleos essenciais são, em geral, reconhecidos como seguros pelo FDA (Food and Drug Administration, 2024). Existem muitos relatos na literatura confirmando a atividade antimicrobiana de diversos óleos essenciais (Bonin et al., 2020). O mecanismo de ação desses compostos é a degradação da membrana plasmática das bactérias, causando a morte das mesmas devido às alterações nos perfis de ácidos graxos que constituem a membrana celular. Dentre os componentes presentes em óleos essenciais já identificados com potente ação antimicrobiana, um dos mais estudados é o carvacrol (Figura 1) (Maczka et al, 2023). Essa substância está presente em vários óleos essenciais, como tomilho, orégano, bergamota selvagem, pimenta, dentre outros.

O carvacrol, além da atividade antimicrobiana, possui várias outras propriedades farmacológicas importantes como antifúngicas, antioxidante e anticancerígena (Maczka et al, 2023). Devido a isso, o carvacrol tem sido utilizado no manejo de pragas e doenças na agricultura como bioinsumo, como conservante de alimentos, no tratamento de doenças de animais, dentre outras (Sarry et al, 2024; Bonin et al., 2020; Ribeiro-Santos et al, 2017). Trabalhos recentes realizados na Embrapa Meio Ambiente, avaliaram a atividade antimicrobiana in vitro do carvacrol contra os patógenos *A. hydrophila* e *S. agalactiae*, que são bactérias causadoras de doenças em peixes, na forma pura e nanoencapsulada (Bonin et al., 2020; Banhara et al, 2020).

Mesmo que o carvacrol seja proveniente de óleos essenciais considerados seguros, quando utilizado na forma isolada é necessário avaliar o risco do seu uso em organismos não-alvo. Isso se deve ao fato que não existe risco zero, mesmo para compostos provenientes de plantas. Assim, embora possua um potencial de ser utilizado em larga escala na agricultura para controle de doenças, há uma carência de estudos ecotoxicológicos desse composto descritos na literatura. Portanto, é necessário estabelecer as concentrações máximas permissíveis dessas substâncias, utilizando ensaios ecotoxicológicos com organismos bioindicadores e uso de protocolos padronizados e reconhecidos por agências reguladoras.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar a toxicidade do carvacrol (Figura 1) para cinco organismos-teste bioindicadores do compartimento aquático, e com base nisto, determinar uma concentração de baixo risco do composto para a biota aquática.

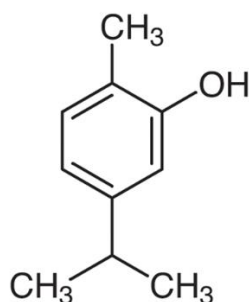


Figura 1: Estrutura química do carvacrol

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material-teste

As soluções teste contendo carvacrol ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich) foram preparadas nas seguintes concentrações: 0,0; 0,01; 0,10; 1,00; 10 e 100,00 mg/L, usando o adjuvante Tween 20 (Biograde) para solubilização (100 mg/L).

2.2. Avaliação da toxicidade e da concentração de baixo risco

De acordo com as metodologias descritas por Castro et al. (2018) e Castro (2022) foram realizados estudos de dose-resposta com os organismos-teste *Raphidocelis subcapitata*, *Lemna minor*, *Daphnia magna*, *Artemia salina* e *Panagrolaimus sp.*

Após o período de exposição foram determinados os valores de Concentração Efetiva que causa efeito inibitório da mobilidade em 50% da população de organismos (CE50) referente aos períodos de exposição por 48h para *Daphnia magna* e *Artemia salina* e por 96h para *Panagrolaimus sp.* Juntamente com os valores de CE50, foram determinados os intervalos de confiança com nível de certeza 95%. Para isto, utilizou-se o módulo de “Análise de Probit” do programa estatístico Statgraphics Centurion XVII, versão 1. 17. 04 (StatPoint Technologies).

Analogamente aos invertebrados acima citados, foram determinados os valores de CE50 (com intervalos de confiança 95%) referente a 120 h e 168 h de exposição de modo a avaliar a fitotoxicidade para *Raphidocelis subcapitata* e *Lemna minor*, respectivamente. Para isto, utilizou-se o modulo "Regressão Simples" contido no programa citado anteriormente.

A concentração hipotética de risco para somente 5% das espécies de uma comunidade (HC5) foi determinada com base numa distribuição log-logística dos valores de Concentração de Efeito Não Observado (CENO) (Organisation for Economic Co-Operation and Development, 1995; Wheeler et al., 2002). A HC5 foi calculada com base no intervalo de confiança (limite inferior) da regressão

"Frequência acumulada vs Log CENO" a nível de 50% de certeza (Maltby et al., 2005; Cardwell et al., 2018) utilizando o programa Statgraphics Centurion XVII, versão 1. 17. 04 (StatPoint Technologies). Os valores de CENO foram determinados pela relação CE50/10 (Elmeggard; Akkerhuis, 2000).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os organismos-teste mais sensíveis aos efeitos do carvacrol foram as microalgas e as macrófitas aquáticas apresentando os menores valores de CE50 (Tabela 1). Na Figura 2 é demonstrada a relação concentração-efeito sobre a macrófita *Lemna minor* (com base na alteração do peso úmido), sendo o composto classificado como "moderadamente tóxico" (CE50 >1 - 10 mg/L; Smith et al, 1988; USEPA, 2023) para estes organismos, assim como para as microalgas. Portanto, observa-se que devido a este efeito fitotóxico, o carvacrol, em concentrações de aproximadamente 1 mg/L, pode comprometer a produção primária em ecossistemas aquáticos, interferindo assim nas funções vitais em organismos de níveis tróficos superiores. Por outro lado, o composto demonstrou ser "praticamente não toxico" (CE50 > 100 mg/L; USEPA, 2023) para o nematoide *Panagrolaimus* sp, um nematoide de vida livre. Estes organismos merecem importância nos processos de ciclagem de matéria orgânica por estar envolvidos nos processos de decomposição desta matéria, ou pelo seu caráter detritívoro (Rusconi et al., 2023).

Na ficha de avaliação de segurança do produto (Sigma Aldrich, 2024) são descritos os valores de CE50-96h (mortalidade) em "zebrafish"; EC50-48h (mobilidade) em *Daphnia magna* e EC50-72h (crescimento) em *Raphidocelis subcapitata*, equivalentes a 6,17; 6,06 e 1,25 mg/L, respectivamente. Observa-se que estes valores referentes aos dois últimos organismos corroboram os resultados do presente trabalho (Tabela 1).

Tabela 1. Toxicidade (Efeito avaliado e CE50 (mg/L)) do carvacrol em organismos bioindicadores do compartimento aquático.

	Efeito avaliado	CE50 (mg/L)
<i>Raphidocelis subcapitata</i> (microalga)	inibição de crescimento (120 h) / densidade celular	1,29 (n.d, - 3,46)
<i>Lemna minor</i> (macrófita)	inibição de crescimento (168 h) / número de frondes	11,76 (9,11 - 14,77)
	inibição de crescimento (168 h) / peso úmido	1,26 (0,72 - 1,81)
	inibição de crescimento (168 h) / clorofila total	8,22 (7,20 - 10,39)
<i>Daphnia magna</i> (microcrustáceo)	imobilidade (48 h)	6,16 (4,86 - 7,86)
<i>Artemia salina</i> (microcrustáceo)	imobilidade (48 h)	16,26 (10,87 - 39,60)
<i>Panagrolaimus sp</i> (nematóide)	imobilidade (96 h)	268, 16 (136,90 - n.d.)

n.d. : não determinado

Na Figura 3 é demonstrada a função log-logística da sensibilidade acumulada de acordo com os valores de CENO para diferentes organismos-teste. A variabilidade de sensibilidade para as diferentes espécies gerou diferentes valores de CENO que permitiram calcular um valor de HC5 equivalente a 0,0676 mg/L. Fatores de segurança de 1 - 5 podem ser aplicados a este valor (ECHA, 2008) obtendo-se valores de “Concentração Preditiva Sem Efeito” CPSE na faixa de 0,0676 a 0,01352 mg/L.

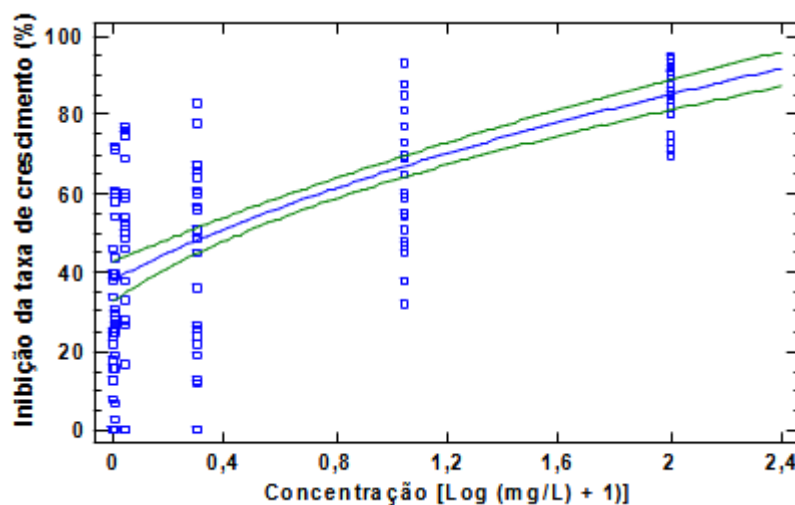


Figura 2. Efeito do carvacrol no crescimento de *Lemna minor* (peso úmido) exposta a diferentes concentrações durante 168 horas. — curvas de intervalos de confiança 95% (inferior e superior); — curva de regressão.

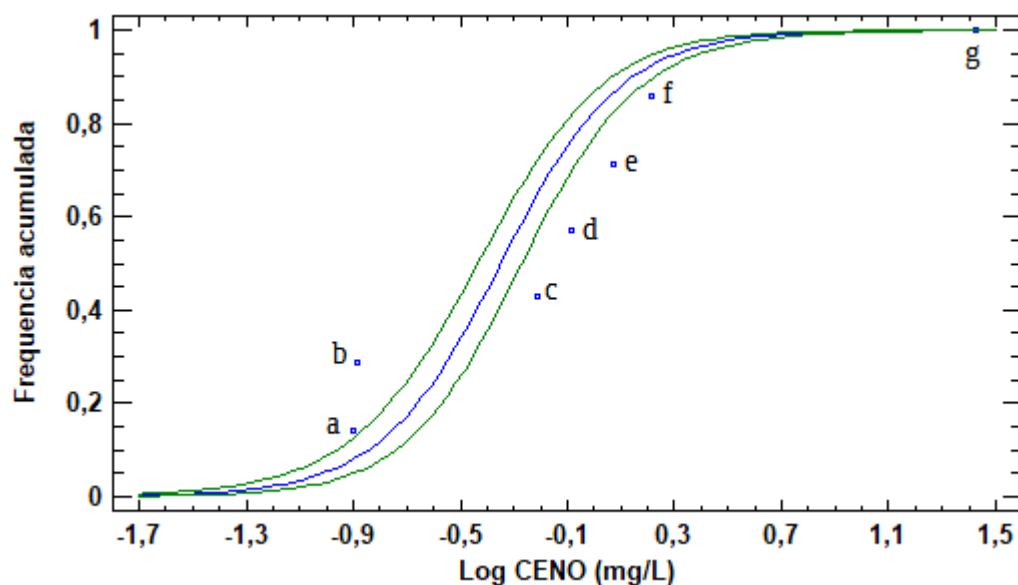


Figura 3. Curva de distribuição da sensibilidade de acordo com os valores de Concentração de Efeito Não Observado (CENO) do carvacrol para os organismos-teste: a- macrófita *Lemna minor* (peso úmido); b- microalga *Raphidocelis subcapitata* (crescimento); c- microcrustáceo *Daphnia magna* (imobilidade); d- macrófita *Lemna minor* (clorofila); e- macrófita *Lemna minor* (número de frondes); f- microcrustáceo *Artemia salina* (imobilidade); g- nematoide *Panagrolaimus sp* (imobilidade); — curvas de intervalos de confiança 50 % (inferior e superior), — curva de regressão. HC5 = 0,0676 mg/L

4. CONCLUSÃO

Dentre os organismos-teste avaliados quanto aos efeitos adversos do carvacrol, as microalgas e macrófitas foram os mais sensíveis. Embora não se tenham relatos da literatura científica especializada a respeito da ecotoxicidade do carvacrol, os dados sobre estes efeitos adversos relatados pela ficha técnica do produto são da mesma ordem de grandeza dos obtidos no presente trabalho.

A determinação de um valor de parâmetro de risco (HC5) para o ambiente aquático realizado com organismos de diferentes níveis tróficos auxilia para o estabelecimento de uma concentração máxima permissível em corpos de água associada ao uso do carvacrol.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq pela concessão da Bolsa de Iniciação Científica para o primeiro autor e à Embrapa Meio Ambiente pela disponibilização de recursos e oportunidade de desenvolvimento da pesquisa.



6. REFERÊNCIAS

- BANHARA, P. et al. Obtenção de nanopartículas mucoadesivas contendo carvacrol in vitro contra *Streptococcus agalactiae*. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14., 2020, Campinas. **Anais...** Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 2020. RE20416. p. 1-11.
- BEN, Y. et al. Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. **Environmental Research**, v. 169, p. 483-493, 2019.
- BONIN, M. C. B.; PENTEADO, A. L.; QUEIROZ, S. C. N. Atividade antimicrobiana de componentes e óleos essenciais frente aos patógenos *A. hydrophila* e *S. agalactiae*. In: CONGRESSO INTERINSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 14., 2020, Campinas. **Anais...** Campinas: Embrapa Informática Agropecuária, 2020. RE20406. p. 1-12.
- CARDWELL, A. S. et al. Chronic toxicity of aluminum, at a pH of 6, to freshwater organisms: Empirical data for the development of international regulatory standards/criteria. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 37, n.1, p. 36-48, 2018
- CASTRO, V. L. Estimates of AgNP toxicity thresholds in support of environmental safety policies. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 24, n. 9 p. 1-20, 2022.
- CASTRO, V. L. et al. Nanoecotoxicity assessment of graphene oxide and its relationship with humic acid. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v.37, n. 7, p. 1998-2012, 2018.
- ECHA. **Guidance on information requirements and chemical safety assessment**. Chapter R.10: Characterisation of dose [concentration] response for environment, 2008. Disponível em: https://echa.europa.eu/documents/10162/13632/information_requirements_r10_en.pdf/bb902be7-a503-4ab7-9036-d866b8ddce69. Acesso em: 31 maio 2024.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Code of federal regulations (CFR)**. Title 21: Food and drugs. Chapter I e food and drug administration, department of health and human services, subchapter B food for human consumption (continued), Part 182 substances generally recognized as safe (GRAS), subpart a general provisions, subpart 182.20 essential oils, oleoresins (solvent-free), and natural extractives (including distillates). Code of Federal Regulations, Washington, (Revised January, 2024). Disponível em: <https://www.ecfr.gov/current/title-21/chapter-I/subchapter-B/part-182>. Acesso em: Jul., 2024.
- ELMEGGARD, N.; AKKERHUIS, G.A.J.M. **Safety factors in pesticide risk assessment. Differences in species sensitivity and acute-chronic relations**. National Environmental Research Institute, NERI Technical Report 325. 2000, p.54
- MAÇZKA, W. et al. Carvacrol a natural phenolic compound with antimicrobial properties. **Antibiotics**, v. 12, p. 824, 2023.
- MALTBY, L.; BLAKE, N.; BROCK, T.C. Insecticide species sensitivity distributions: importance of test species selection and relevance to aquatic ecosystems. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 24, n.2, p. 379-388, 2005.
- ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Guidance document for aquatic effects assessment**. Paris: OECD, 1995. (Environment Monographs, 92). Disponível em: <https://web.archive.org/2012-06-15/153739-34290206.pdf>. Acesso em: 31 maio 2024.
- RIBEIRO-SANTOS, R. et al. Use of essential oils in active food packaging: recent advances and future trends. **Trends in Food Science & Technology**, v. 61, p.132-140, 2017.
- RUSCONI, J. M. et al. Morphological and molecular characterization of *Geraldus galapagoensis* (Nematoda: Chambersiellidae) associated with lichens in Argentina. **Papeis Avulsos de Zoologia**, v.63: e202363042, p.1-6, 2023.



SARRY, K. et al. Recent advances and developments in the nematicidal activity of essential oils and their components against root-knot nematodes. **Agronomy**, v. 14, p. 1-25, 2024.

SIGMA ALDRICH, **Carvacrol**. Disponível em:
<https://www.sigmaaldrich.com/br/en/sds/aldrich/w224511?usertype=undefined>. Acesso em: 31 maio 2024.
(Safety Data Sheet, n. 1907/20006)

SMITH, S.B.; SAVINO, J.F.; BLOUIN, M.A. Acute toxicity to *Daphnia Pulex* of six classes of chemical compounds potentially hazardous to Great Lakes aquatic biota. **Journal of Great Lakes Research**, v. 14, n. 4, 394-404, 1988.

USEPA. **Technical overview of ecological risk assessment - analysis phase: ecological effects characterization**. Washington: Environmental Protection Agency, 2023. Disponível em:
<https://www.epa.gov/pesticide-science-and-assessing-pesticide-risks/technical-overview-ecological-risk-assessment-0>. Acesso em: 02 julho 2024.

WHEELER, J. R. et al. Species sensitivity distributions: data and model choice. **Marine Pollution Bulletin**, v. 45, p. 192-202, 2002.