

ATIVIDADE DE ANÁLOGOS DO TIMOL CONTRA *Mycobacterium tuberculosis*.

Lorena Picinini Fernandes¹(PIBIC/CNPq/FA/UEM), Renata Alexandre de Oliveira¹, João Paulo Salvaterra Pasquini¹, Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli¹(Coorientador), Rosilene Fressatti Cardoso¹(Orientador). E-mail: rfcardoso@uem.br

¹Universidade Estadual de Maringá/Centro de Ciências Biológicas e da Saúde/Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas, Microbiologia

Palavras-chave: Análogos do timol; atividade antimicrobiana; *Mycobacterium tuberculosis*.

RESUMO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada por bactérias pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que representa um grave desafio de saúde pública global, afetando milhões de indivíduos anualmente. Apesar dos avanços no tratamento da TB com uma combinação de fármacos como isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol, a baixa adesão ao regime terapêutico e o surgimento de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes, complicam o controle da doença. Alternativas terapêuticas, como o uso de compostos naturais, têm sido exploradas. Com destaque para o Timol, um monoterpene com propriedades antibacterianas, este estudo avaliou a eficácia de análogos sintéticos do timol, acilhidrazida (AHT) e 16 acilhidrazonas (THZ) contra *M. tuberculosis*. A concentração inibitória mínima (CIM) dos análogos de Timol foi determinada contra a cepa *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294 pelo método *resazurin microtiter plate assay* (REMA). A CIM do análogo do timol AHT foi 31,25 µg/µL, e os análogos THZ apresentaram CIM que variou de 31,25 a >250 µg/µL. Desta maneira, concluímos que a cepa padrão H₃₇Rv 27294 apresentou diferentes níveis de suscetibilidade aos análogos de timol em estudo, experimentos adicionais, como estudos de toxicidade e mecanismos de ação, são necessários para entender melhor a viabilidade desses compostos como potenciais agentes antimicrobianos.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa, causada por bactérias pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis*, que representa um grave desafio de saúde pública global. A transmissão da bactéria acontece,

principalmente, por aerossóis contendo a bactéria e liberados por uma pessoa doente e inalados por outra pessoa próxima (WHO, 2023).

O tratamento eficaz da TB é realizado com um regime poliquimioterápico que preconiza a utilização de 4 fármacos: Isoniazida, rifampicina, pirazinamida e etambutol. No entanto, o tratamento pode ser complicado pela falta de adesão dos pacientes devido aos efeitos colaterais causados pelos medicamentos (Rabahi et al., 2017). O surgimento de linhagens de *M. tuberculosis* resistentes aos fármacos disponíveis para o tratamento da TB, bem como o número abundante de novos casos de TB e TB resistente que surgem todos os demonstram que é necessário a busca constante de novos medicamentos, com melhores resultados e menos efeitos colaterais. A utilização de técnicas químicas para mudanças nas estruturas de moléculas tornando-as análogas possui diversas vantagens nesse contexto, o que pode melhorar a sua farmacodinâmica, farmacocinética, biodisponibilidade e toxicidade (RABAHI, M. F. et al., 201; 7WHO, 2023).

A molécula 2-isopropil-5-metilfenol, conhecida como Timol, é um monoterpreno, que demonstrou propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, cicatrizantes, antibacterianas, antifúngicas, antivirais, dentre outras (KACHUR, SUNTRES, 2020). Neste sentido, foram realizadas modificações químicas na estrutura molecular de Timol para melhorar a atividade anti-*M. tuberculosis* e relação ao composto original. Diante dessas considerações, o objetivo deste estudo foi determinar a atividade de análogos de timol em *M. tuberculosis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Manutenção da cepa Mycobacterium tuberculosis H₃₇Rv

A cepa *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294) pertencente à micobacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Médica (LEPAC-UEM) foi selecionada para este estudo. O estoque bacteriano foi descongelado e reativado. Para isso o estoque bacteriano foi semeado, inicialmente, em meio de cultura Lowenstein-Jensen e incubado por 2 a 3 semanas/35 °C. Após crescimento de colônias bacterianas características, essas foram semeadas em Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Le Pont de Claix, France) enriquecido com 0,02% de Glicerol e 10% de ácido oleico, albumina bovina, dextrose e catalase (OADC) (BBL/Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA) e incubada por 15 dias a 35°C.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

As CIMs dos análogos de Timol, AHT e THZ, foram determinadas utilizando a metodologia *resazurin microtiter assay plate (REMA)* descrita por Palomino et al

(2002). As suspensões bacterianas de *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294) foram padronizadas com escala de McFarland nº1, diluídas (1:20) em Middlebrook 7H9 enriquecido com 10% de OADC e adicionadas (100 µL) em cada orifício de microplaca de 96 orifícios contendo diluições seriadas dos análogos a serem testados. A microplaca foi incubada a 35 °C em atmosfera normal por 7 dias, e após esse período, 30µL de solução de resazurina 0,01% (Acros, Morris Plains, NJ, USA), recém preparada, foi adicionada a cada orifício e as microplacas reincubadas a 35°C por 24h para posterior leitura visual. A mudança da cor azul para rosa, pela redução da resazurina, foi considerada como presença de crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração do fármaco padrão (isoniazida) e dos análogos de Timol capaz de inibir o crescimento bacteriano, ou seja, a mudança de cor da resazurina de azul para rosa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv (ATCC 27294) apresentou diferentes níveis de suscetibilidade aos análogos de timol em estudo (AHT e AZT). A CIM de Timol foi 7,81 µg/µL e do seu análogo AHT foi 31,25 µg/µL, já os análogos THZ demonstraram eficácia variável: THZ 13 apresentou CIM de 31,25 µg/µL, THZ03, THZ15 e THZ16 apresentaram CIM de 62,5 µg/µL, e por fim THZ01, THZ02, THZ04, THZ05, THZ06, THZ07, THZ08, THZ09, THZ10, THZ11, THZ12 e THZ14 apresentaram CIM >250 µg/µL (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração inibitória mínima de Timol e seus análogos estruturais AHT e THZ contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.

		Concentração inibitória mínima (µg/µL)																
Espécie	TIM	AHT	THZ	THZ	THZ	THZ	THZ	THZ	THZ	THZ	THZ	THZ	THZ	THZ	THZ	THZ	THZ	
		01	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16
<i>Mtb</i> H ₃₇ Rv																		
ATCC		31,25				>25											31,2	
27294	7,81	5	>250	>250	62,5	0	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	>250	5	>250	62,5	62,5

TIM: timol; *Mtb* H₃₇Rv: *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv; AHT: acilhidrazida do timol; THZ: acilhidrazona do timol.

A alta CIM observada em alguns análogos THZ (>250 µg/µL) sugere que muitos desses compostos podem não ser adequados para desenvolvimento de antimicrobianos sem modificação adicional. Experimentos adicionais, como estudos de toxicidade e mecanismos de ação, são necessários para entender melhor a

viabilidade desses compostos como potenciais agentes antimicrobianos (KACHUR, SUNTRES, 2019).

Futuros estudos devem focar em aperfeiçoar as estruturas dos análogos THZ e avaliar suas toxicidades e farmacocinéticas para confirmar suas viabilidades como futuros agentes terapêuticos.

CONCLUSÕES

Quatro análogos de Timol, AHT, THZ03, THZ13, THZ15 e THZ16, que apresentaram CIM $\leq 62,5 \mu\text{g}/\mu\text{L}$, podem ser considerados para estudos adicionais para avaliação de atividade antimicrobiana.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Maringá, Fundação Araucária (FA) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

REFERÊNCIAS

KACHUR, K.; SUNTRES, Z. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1–12, 16 out. 2019.

PALOMINO, J. C. *et al.* Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, ago. 2002.

RABAHI, M. F. *et al.* Tuberculosis treatment. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*, v. 43, n. 6, p. 472–486, dez. 2017.

WHO. **Global tuberculosis report**. 2023.