

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DE TIMOL EM MICOBACTÉRIAS DE CRESCIMENTO RÁPIDO

Camile Yukari Okochi (PIBIC/FA), Jean Eduardo Meneguello, Renata Alexandre de Oliveira, Leticia Julia Faria, Camilla de Lima Ruffini, Anna Carolina Ponhozi, Rosilene Fressatti Cardoso (Orientador). E-mail: rfcardoso@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências Biológicas/Microbiologia

Palavras-chave: Micobactérias não tuberculosas; Concentração Inibitória Mínima; Timol.

RESUMO

As micobactérias não-tuberculosas (MNT) são microrganismos que podem causar uma variedade de infecções, sendo mais comum a infecção pulmonar. Essas bactérias possuem uma parede celular com características específicas do gênero *Mycobacterium* spp. como uma fina camada de peptidoglicano cercada por um revestimento lipídico externo, podendo conferir resistência a antibióticos e desinfetantes e sobrevivência em condições adversas. As MNT são divididas em MNT de crescimento lento, que requerem sete dias ou mais para crescimento e MNT de crescimento rápido, com um tempo de crescimento inferior a sete dias. MNT de crescimento rápido geralmente exibem maior resistência à antimicrobianos disponíveis no mercado, o que leva a necessidade de realização de testes de suscetibilidade para determinar o tratamento adequado. Como o timol (TIM), um composto aromático, exibe propriedades antibacterianas, anti-inflamatórias, antioxidantes e antitumorais, o objetivo deste estudo foi determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de TIM contra MNT de crescimento rápido por *resazurin broth microdilution assay* (REBMA). A CIM de TIM variou de 16-256 µg/mL. Os resultados do presente estudo confirmaram a atividade de TIM, embora em pequeno número de isolados e espécies, contra MNT. O TIM deve ser considerado um candidato para estudos futuros bem como desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas ou estratégias de tratamento menos tóxicas para os pacientes com doenças causadas por MNT de crescimento rápido.

INTRODUÇÃO

As micobactérias não-tuberculosas (MNT) são um grupo de micobactérias não pertencentes ao complexo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) e que podem ser potencialmente patogênicas, as quais podem causar variadas infecções, sendo mais frequente infecção pulmonar (Porvaznik; Solovič; Mokry, 2017). Os microrganismos pertencentes a esse gênero bacteriano possuem características especiais como uma parede celular que as difere de outras bactérias. A parede celular é formada por

uma fina camada de peptidoglicano envolta por um revestimento externo rico em lipídios, o que pode ajudar na fixação da bactéria em superfícies, podendo ser esta um fator importante no desenvolvimento de resistência a antimicrobianos e desinfetantes. As MNT podem ser divididas em MNT de crescimento rápido (<7 dias) e MNT de crescimento lento (≥ 7 dias) (Sharma; Upadhyay, 2020).

As MNT de crescimento rápido costumam apresentar maior resistência aos antimicrobianos e não apresentam sensibilidade aos fármacos de primeira linha utilizados no tratamento da tuberculose, o que leva à necessidade de realização de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos para determinar o tratamento adequado na tentativa de sucesso terapêutico com cura clínica (Castilho *et al.*, 2015).

Substâncias como óleos essenciais e compostos derivados possuem uma gama de atividades antimicrobianas. Estudos recentes com o timol (TIM), ou 2-isopropil-5-metilfenol, um composto aromático hidrofóbico presente em algumas plantas e que é rapidamente absorvido e/ou degradado no intestino delgado, demonstraram que TIM apresentou propriedades antibacteriana, anti-inflamatória, antioxidante e antitumorais (Gholami-Ahangaran *et al.*, 2022).

A busca por tratamentos alternativos é essencial, tendo em vista o aumento de doenças causadas por MNT e o panorama de resistência das MNT de crescimento rápido aos antimicrobianos de uso padrão, para encontrar o melhor esquema terapêutico considerando as condições do paciente. Assim, o objetivo do presente estudo foi determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de TIM, contra MNT de crescimento rápido que estão relacionadas com doenças em humanos e animais.

MATERIAIS E MÉTODOS

Inicialmente, foram selecionadas linhagens de MNT de crescimento rápido pertencentes à bacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Médica do Departamento de Análises Clínicas da Universidade Estadual de Maringá (DAB/Uem), semeadas em Mueller Hinton Broth (Difco Laboratories, Detroit, USA) cátiom ajustado e incubadas por 3 dias a 30 °C.

A CIM de TIM foi determinada pelo método *resazurin broth microdilution assay* (REBMA), de acordo com Castilho *et al.* (2015), utilizando microplaca de 96 orifícios. A concentração das suspensões de MNT foram padronizadas com escala McFarland n° 0,5 e diluídas (1:200) em Mueller Hinton Broth cátiom ajustado. Após, 100 µL de cada suspensão bacteriana padronizada foram adicionados em cada orifício da microplaca contendo diluições seriadas de TIM. As microplacas foram incubadas por 3 dias/30 °C. Finalizado o período de incubação, 30 µL de solução de resazurina 0,01% (Acros, Morris Plains, NJ, USA) foram adicionados a cada orifício e as microplacas foram reincubadas por 24 horas/30 °C. A mudança da cor azul para rosa, pela redução da resazurina, foi considerada como presença de crescimento bacteriano. A CIM de TIM para cada MNT estudada foi definida como a menor concentração de TIM capaz de inibir o crescimento bacteriano. Controles de

esterilidade e crescimento bacteriano foram incorporados aos experimentos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata em dias diferentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A CIM de TIM contra as MNT de crescimento rápido estudadas variou de 16 a 256 µg/mL. Os resultados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima de timol em micobactérias de crescimento rápido.

Linhagem de coleção	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)
	TIM
<i>Mycobacterium abscessus</i> ATCC 19977	16
<i>Mycobacterium smegmatis</i> 1	256
<i>Mycobacterium smegmatis</i> 2	64
<i>Mycobacterium smegmatis</i> 3	128
<i>Mycobacterium abscessus</i> subsp. <i>bolletii</i>	16

TIM: Timol.

A resistência de MNT de crescimento rápido aos antimicrobianos de uso padrão no tratamento de doenças infecciosas aponta para a necessidade da busca de novas moléculas e implementação de alternativas terapêuticas que sejam capazes de eliminar essas micobactérias, visando o tratamento e eventual cura do paciente. Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciaram a atividade do TIM, indicando seu potencial como candidato para futuras estratégias terapêuticas. Em um estudo realizado por Puk *et al.* (2024), com *Mycobacterium marinum*, *M. abscessus* e *Mycobacterium chelonae*, a CIM de TIM variou de 64 a 128 µg/mL, valores semelhantes aos obtidos no presente estudo com *M. abscessus* ATCC 19977 e *M. abscessus* subsp. *bolletii*. Pesquisas envolvendo carvacrol, um isômero do timol, encontraram CIM que variou de 32 a 128 µg/mL contra *M. abscessus*, *M. chelonae*, *Mycobacterium fortuitum* e *M. smegmatis* (Huang *et al.*, 2024). Avaliar o potencial antimicobacteriano de derivados de compostos naturais pode levar à possibilidade de incorporação dessas substâncias em estratégias de tratamento de pacientes acometidos por doenças causadas por micobactérias, sendo necessária a realização de mais estudos acerca da atividade de TIM.

CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo confirmaram a atividade do TIM, embora em pequeno número de isolados e espécies, contra MNT. O TIM deve ser

considerado um candidato para estudos futuros bem como desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas ou estratégias de tratamento menos tóxicas para os pacientes com doenças causadas por MNT de crescimento rápido.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

CASTILHO, Aline Lemes *et al.* Detection of drug susceptibility in rapidly growing mycobacteria by resazurin broth microdilution assay. **Journal of microbiological methods**, v. 111, p. 119-121, 2015. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0167701215000615>. Acesso em: 22 ago. 2025.

GHOLAMI-AHANGARAN, M.; AHMADI-DASTGERDI, A.; AZIZI, S.; BASIRATPOUR, A. *et al.* Thymol and carvacrol supplementation in poultry health and performance. **Veterinary Medicine and Science**, 8, n. 1, p. 267-288, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/vms3.663>. Acesso em: 24 ago. 2025.

HUANG, Y. L.; HUANG, C. H.; HUANG, Y. C.; YEN, C. L. *et al.* Anti-biofilm activities and antibiotic synergy of naturally occurring compounds against drug-resistant rapidly growing mycobacteria. **Microbiology Spectrum**, 12, n. 8, p. e0019924, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/spectrum.00199-24>. Acesso em: 24 ago. 2025.

PORVAZNIK, I.; SOLOVIČ, I.; MOKRÝ, J. Non-Tuberculous Mycobacteria: Classification, Diagnostics, and Therapy. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, 944, p. 19-25, 2017. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/5584_2016_45. Acesso em: 24 ago. 2025.

PUK, K.; GUZ, L.; PASTUSZKA, A. Berberine enhances the antibacterial activity of thymoquinone, carvacrol and thymol against multi-drug resistant nontuberculous mycobacteria. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, 27, n. 3, p. 469-473, 2024. Disponível em: https://pjavsci.uwm.edu.pl/editor_files/2220-pjvs-2024-1724667849.pdf. Acesso em: 24 ago. 2025.

SHARMA, S. K.; UPADHYAY, V. Epidemiology, diagnosis & treatment of non-tuberculous mycobacterial diseases. **Indian Journal of Medical Research**, 152, n. 3, p. 185-226, 2020. Disponível em: <https://ijmr.org.in/epidemiology-diagnosis-treatment-of-non-tuberculous-mycobacterial-diseases/>. Acesso em: 24 ago. 2025