

ATIVIDADE ISOLADA DO TIMOL E SUA COMBINAÇÃO COM FÁRMACOS ANTIMICOBACTERIANOS EM MICOBACTÉRIAS NÃO TUBERCULOSAS

Leticia Julia Faria (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Camile Yukari Okochi, Renata Alexandre de Oliveira, Camilla de Lima Ruffini, Anna Carolina Ponhozi, Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli, Regiane Bertin de Lima Scodro (Orientadora). E-mail: rblscodro@uem.br

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

Área e subárea do conhecimento: Ciências da Saúde, Microbiologia

Palavras-chave: micobactérias, timol, antimicobacterianos

RESUMO

As micobactérias não tuberculosas causam infecções, chamadas micobacterioses, com incidência crescente, desde infecções pulmonares e extrapulmonares como em pele e tecidos moles, essas micobacterioses exigem tratamento longo e difícil. Neste sentido, é necessário buscar alternativas terapêuticas para o tratamento dessa doença. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade isolada do timol (TIM) e combinada com ciprofloxacino (CIP), etambutol (EMB) e linezolida (LNZ) em linhagens de coleção de micobactérias não tuberculosas. Foi determinado a concentração inibitória mínima (CIM) para o TIM, CIP, EMB E LNZ, por meio do método *resazurin broth microdilution assay*, em triplicata, com repiques independentes e a ação combinada foi determinada pelo método *resazurin drugs combination microtiter assay*. As concentrações inibitórias mínimas variaram de 256 a 128 mg/L para TIM, 0,25 a 0,125 para CIP, 256 a 16 para o EMB e da LNZ variou entre 32 e 2 µg/L. Conclui-se que o timol apresenta sinergismo com LNZ e CIP em todas as linhagens testadas, configurando-se como um candidato promissor, cujo potencial terapêutico frente às micobactérias ainda requer investigação aprofundada.

INTRODUÇÃO

As micobactérias não tuberculosas (MNTs) abrangem um amplo grupo de espécies pertencentes ao gênero *Mycobacterium*, e são um importante grupo de bactérias potencialmente patogênicas, com carácter oportunista, responsáveis por diversas infecções, como doenças pulmonares, infecções de pele e tecidos moles, além de serem associados a linfadenites e infecções cirúrgicas ou associadas a cateteres (Gonzalez-Santiago e Drage, 2015).

Este grupo de micobactérias, pode ser dividido como bactérias de crescimento rápido e crescimento lento. Dentre as espécies de crescimento rápido, podemos citar *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium chelonae* e o complexo *Mycobacterium abscessus*, enquanto entre as de crescimento lento, as principais são *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare* (Gonzalez-Santiago e Drage, 2015).

O timol (TIM) é uma substância encontrada em plantas da família *Lamiaceae*, e o mecanismo de ação antibacteriano de TIM inclui a lise da parede celular e da membrana bacteriana, pois devido a sua característica hidrofóbica, TIM é capaz de interagir com a membrana das bactérias causando desequilíbrios, que desencadeiam o vazamento do conteúdo intracelular seguido da morte celular (Marchese *et al.*, 2016). Diante destes efeitos, TIM pode atuar sinergicamente com antibióticos para controlar a resistência aos antibióticos, principalmente pelo seu efeito de inibir as bombas de efluxo (Marchese *et al.*, 2016). Além da capacidade de prevenir a formação de biofilmes, esta substância mostrou-se relevante dada a crescente resistência aos antibióticos convencionais, destacando a importância da busca por novas substâncias terapêuticas, e, portanto, a combinação dessa substância com antimicrobianos pode oferecer alternativas para superar a resistência bacteriana (Kowalczyk *et al.*, 2020).

Considerando o aumento de infecções por este grupo de bactérias, as dificuldades de tratamento e o grande potencial de causar infecções disseminadas, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade de TIM isoladamente e sua combinação *in vitro* com antimicrobianos de uso padrão em micobactérias não tuberculosas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM) para o timol (TIM) e dos fármacos usualmente utilizados no tratamento, sendo eles ciprofloxacino (CIP), etambutol (EMB) e linezolida (LNZ) em três linhagens de coleção de *Mycobacterium fortuitum* e uma de *Mycobacterium intracellulare*, por meio do método *resazurin broth microdilution assay* (CLSI, 2018), em triplicatas biológicas. Inicialmente as micobactérias não tuberculosas foram cultivadas em Mueller-Hinton Broth cátion ajustado e incubado por 3 dias a 30°C. A partir desse cultivo foram preparadas suspensões bacterianas padronizadas em espectrofotômetro de acordo com o tubo 0,5 da escala de McFarland e diluídas 1:200 em MHB. Após diluição seriada dos fármacos, foi adicionado 100 µL do inóculo bacteriano padronizado em cada poço, posteriormente, as placas foram incubadas por 3 dias a 30°C. Depois dos 3 dias, foram adicionados 30 µL de solução de resazurina 0,01% e, após 24 horas, foi realizada a leitura da placa, em que a CIM corresponde a menor concentração de fármaco capaz de inibir o crescimento bacteriano.

Para a avaliação da atividade combinatória de TIM com CIP, EMB e LNZ foi utilizado o método *resazurin drugs combination microtiter assay* (Caleffi-Ferracioli *et al.*, 2013), portanto foi realizado a diluição dos antimicobacterianos (fármaco A), nas mesmas concentrações usadas para CIM, a partir da coluna 11 até a coluna 3 e o TIM foi diluído a partir da linha A até a linha G. Os poços da coluna 2 e linha H receberam diluições seriadas com os fármacos e TIM de forma isolada. Em seguida o inóculo bacteriano foi padronizado e adicionado 100 µL em cada poço da microplaca. Para interpretar o efeito do TIM com os antimicrobianos, foi utilizado o índice de concentração inibitória fracionária (FICI): $FICI = (CIM\ A + B / CIM\ A) + (CIM\ B + A / CIM\ B)$, sendo que os valores de $FICI \leq 0,5$ indicam sinergismo entre os fármacos, $FICI > 0,5-4$ indicam indiferença e $FICI > 4$ antagonismo. Além disso, foi determinado o fator modulador (FM), sendo $FM = (CIM\ A / CIM\ A + B)$ e valores ≥ 4

serão considerados significativos (Caleffi-Ferracioli *et al.*, 2013). Controles de esterilidade e crescimento bacteriano foram incorporados aos experimentos. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As CIM variaram de 256 a 128 mg/L para TIM; 0,25 a 0,125 para CIP, 256 a 16 para o EMB e da LNZ variou entre 32 e 2 µg/mL nos diferentes microrganismos testados. Estes resultados podem ser visualizados na tabela 1. Na avaliação da ação combinatória, a partir do *checkerboard*, a ação combinada de TIM e os antimicrobianos, podemos observar que a combinação com TIM foi sinérgica com os antimicrobianos LNZ e CIP em todas as linhagens de coleção analisadas, modulando a ação dela entre 8 a 32 vezes (Tabela 2).

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) de timol, ciprofloxacino, etambutol e linezolida em micobactérias não tuberculosas

Isolados bacterianos	Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)			
	TIM	CIP	EMB	LNZ
<i>M. fortuitum</i> 1	128	0,25	16	32
<i>M. fortuitum</i> 2	128	0,125	16	32
<i>M. intracellulare</i> 6	256	0,25	256	2
<i>M. fortuitum</i> ODS	128	0,25	16	16

M.: *Mycobacterium*; TIM: timol; CIP: ciprofloxacino; EMB: etambutol; LNZ: linezolida.

Tabela 2. Avaliação da ação combinada de timol e antimicrobianos em micobactérias não tuberculosas

Cepas e isolados clínicos	TIM + CIP		TIM + EMB		TIM + LNZ	
	FICI	FM	FICI	FM	FICI	FM
<i>M. fortuitum</i> 1	0,10	16	0,37	8	0,37	8
<i>M. fortuitum</i> 2	0,11	18	0,25	8	0,28	32
<i>M. intracellulare</i> 6	0,37	8	0,5	1	0,10	16
<i>M. fortuitum</i> ODS	0,10	4	0,37	8	0,18	16

M.: *Mycobacterium*; TIM: timol; CIP: ciprofloxacino; EMB: etambutol; LNZ: linezolida.

Esses resultados corroboram com a literatura que demonstram o potencial do timol como agente modulador da atividade dos antimicrobianos disponíveis atualmente. O estudo de Shankar *et al.* (2024) esclareceu a ação do timol como inibidor de biofilme e de bombas de efluxo em *Mycobacterium smegmatis*, facilitando a ação dos antibióticos utilizados em conjunto, como o CIP e a isoniazida. A ação sinérgica observada com a LNZ e CIP pode ser explicada por estudos, que sugerem que substâncias como o timol estão relacionados ao aumento da permeabilidade da

membrana citoplasmática bacteriana e perturbação da integridade da membrana bacteriana pelo timol, facilitando a entrada e aumentando a penetração da LNZE CIP (Kowalczyk *et al.*, 2020).

CONCLUSÕES

Os resultados demonstram que o timol, em associação à CIP e ao LNZE, apresentou sinergismo frente a todas as linhagens bacterianas avaliadas. Contudo, estudos adicionais são necessários para elucidar sua atividade contra micobactérias, destacando-se seu potencial promissor como alternativa terapêutica no tratamento das micobacterioses.

AGRADECIMENTOS

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

REFERÊNCIAS

CALEFFI-FERRACIOLI, K. R. *et al.* Fast detection of drug interaction in *Mycobacterium tuberculosis* by a checkerboard resazurin method. **Tuberculosis**, v. 93, n. 6, p. 660–663, nov. 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tube.2013.09.001>. Acesso em: 14 de agosto de 2024.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Ninth Edition. **CLSI document M07-A9**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012. Disponível em: <https://clsi.org/shop/standards/m07/>. Acesso em: 14 de agosto de 2024.

GONZALEZ-SANTIAGO, T.M., DRAGE, L. A. Nontuberculous Mycobacteria: Skin and Soft Tissue Infections. **Dermatologic Clinics**. v. 33 n.3 p. 563-577, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.det.2015.03.017>. Acesso em: 19 de agosto de 2024.

KOWALCZYK, A. *et al.* Thymol and thyme essential oil—new insights into selected therapeutic applications. **Molecules**. MDPI AG, 1 set. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/molecules25184125>. Acesso em: 19 de agosto de 2024.

MARCHESE, A. *et al.* Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. **Food Chemistry**. Elsevier Ltd, 1 nov. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>. Acesso em: 19 de agosto de 2024.

SHANKAR DAS, B *et al.* Thymol as Biofilm and Efflux Pump Inhibitor: A Dual-Action Approach to Combat *Mycobacterium tuberculosis*. **Cell biochemistry and function**,

34º Encontro Anual de Iniciação Científica
14º Encontro Anual de Iniciação Científica Júnior



12 e 13 de novembro de 2025

v. 48, 2024. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/cbf.70030>. Acesso em: 22 de agosto de 2024.