

ADAPTAÇÃO DO TESTE DO MEIO TSI PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM *Salmonella enterica* serovar Typhimurium

**CLEITON JESUS ANDRADE PEREIRA¹, LUÍZE GARCIA BLOTTA DE MELO;
VITHOR PARADA GARCIA; MILENA MATTES CERVEIRA; JANICE LUEHRING
GIONGO². RODRIGO DE ALMEIDA VAUCHER³**

¹Universidade Federal de Pelotas – andradec556@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – luizegarmel@gmail.com; paradavithor@gmail.com;
cervieramm@gmail.com; janicegiongo@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – rodvaucher@hotmail.com

1. INTRODUÇÃO

O meio TSI (do inglês, *Triple Sugar Iron*) foi desenvolvido em 1940 pelo microbiologista Edward Sulkin como um meio diferencial para bactérias entéricas gram-negativas (e.g. *Salmonella* e *Escherichia*) (EWING & DAVIS, 1974). O teste do meio TSI é um teste bioquímico usado principalmente na diferenciação destas enterobactérias e está baseado em 3 características: a fermentação de glicose, lactose e sacarose, a mudança de pH, e a produção ou ausência de gás carbônico com ou sem formação de ácido sulfídrico (H₂S). O meio contém uma proporção menor de glicose (1% m/m) e proporções iguais de lactose e sacarose (10% m/m), além de citrato de ferro (C₆H₅O₇ · xFe³⁺) e tiosulfato de sódio (Na₂S₂O₃) como fontes de ferro e enxofre, respectivamente. Além disso, o meio TSI é suplementado com peptonas e vermelho de fenol como indicador de pH. É um teste amplamente utilizado nos laboratórios de microbiologia por ser uma ferramenta eficaz para a identificação de bactérias entéricas e suas características bioquímicas (LEVINSON, 2022).

O meio TSI é preparado em tubos inclinados com uma base pouco oxigenada e uma superfície oxigenada, onde os microrganismos são inoculados da base à superfície. O uso destes tubos com diferentes condições de aerofilia é essencial para a diferenciação dos microrganismos. A fermentação de lactose e/ou sacarose produz ácidos, mudando a cor do meio de vermelho para amarelo. Nos fermentadores de glicose, a base permanece amarela, mas a superfície volta a ficar vermelha devido ao aumento de pH. Microrganismos que oxidam peptonas na superfície geram compostos nitrogenados, alcalinizando a região e deixando-a rosa. A presença de H₂S resulta em precipitados pretos de sulfeto ferroso (FeS). A região alcalina é designada como “K” e a ácida como “A”, sempre na ordem superfície/base (LEVINSON, 2022). A Tabela 1 indica as reações esperadas do meio TSI para alguns gêneros bacterianos.

Tabela 1. Reações do meio TSI em gêneros bacterianos de importância clínica

Gênero	Gás	H ₂ S	pH
<i>Escherichia</i>	+	-	A/A
<i>Salmonella</i>	+	+	K/A
<i>Shigella</i>	-	-	K/A
<i>Pseudomonas</i>	-	-	K/K

Dessa forma, o teste de Ágar TSI desempenha um papel essencial na identificação de patógenos que podem causar infecções intestinais, sistêmicas e urinárias, podendo guiar decisões terapêuticas, como o uso correto de antibióticos específicos para cada infecção (HU et al., 2022). Tendo em vista a busca de alternativas terapêuticas para driblar a resistência microbiana, que fomenta a pesquisa de novos antimicrobianos sintéticos e naturais (CHINEMEREM NWOBODO, 2022; TERRENI et al., 2021), nosso grupo de pesquisa viu a possibilidade do uso do teste do ágar TSI como uma forma barata e rápida de triar e avaliar de forma qualitativa os efeitos destes compostos nas reações do teste, bem como a utilização dos resultados obtidos para aprimorar a verificação dos mecanismos pelos quais estes compostos levam à alterações metabólicas em microrganismos específicos. Sendo assim, este trabalho teve como objetivos adaptar a metodologia do teste TSI para avaliar os efeitos de dois óleos essenciais (*Eucalyptus globulus*, EGEO; *Cymbopogon flexuosus*, CFEO), inicialmente em uma bactéria entérica padrão do gênero *Salmonella*, identificando as principais alterações bioquímicas no teste em termos das reações perante os tratamentos com EGEO e CFEO em diferentes concentrações.

2. METODOLOGIA

O presente estudo foi conduzido utilizando o meio Ágar TSI (Kasvi, Brasil) para avaliar a atividade antimicrobiana de CFEO (ViaAroma, Brasil) e EGEO (Ferquima, Brasil) frente à *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC 14028). Foram testadas três concentrações de cada óleo: 4x MIC, 2x MIC e 1x MIC, baseadas em resultados preliminares ao teste. O meio foi preparado conforme as especificações do fabricante e distribuído em tubos inclinados com 5 mL de meio por tubo. Para os óleos essenciais, as concentrações testadas foram preparadas incorporando-os ao meio ainda líquido (35 °C). Um controle bacteriano (BC) contendo apenas a bactéria inoculada e um controle de esterilidade (SC) não contendo microrganismos, também foram preparados. Após a solidificação do meio, cada tubo foi inoculado com colônias isoladas de *S. typhimurium*, utilizando uma agulha esterilizada. A inoculação foi realizada por picada na base do tubo e estria na superfície. Em seguida, os tubos foram incubados a 36°C por 24 horas. Após o período de incubação, os tubos foram observados quanto à alteração de cor no meio, produção de precipitados negros e crescimento de colônias visíveis na superfície. As observações foram registradas para cada tubo e os resultados foram comparados entre os diferentes tratamentos para avaliar a eficácia de cada agente antimicrobiano. A ausência de alteração de cor, precipitados negros e crescimento visível de colônias foram interpretadas como indicadores de forte atividade antimicrobiana. Nos casos em que o meio apresentou alteração de cor ou produção de H₂S, os resultados foram analisados em relação à concentração do agente antimicrobiano e à distribuição do mesmo no meio, comparando com os resultados do BC. Todos os resultados obtidos têm caráter qualitativo.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando os resultados da **Figura 1**, observa-se que SC confirmou a ausência de contaminações ao longo do experimento. O BC de *S. typhimurium* apresentou os resultados esperados: tubo K/A, produção de H₂S e deslocamento por produção de gás (ainda que não visível), comprovando a viabilidade da cepa utilizada.

Quanto aos resultados para o CFEO, percebe-se que a presença do óleo no meio não inibiu a fermentação de glicose nem a produção de H₂S. Contudo, o óleo impediu a degradação oxidativa das peptonas, utilizadas como fonte de energia pela bactéria, resultando em tubos A/A com precipitados pretos.

Em relação ao EGEO, as concentrações 4x e 2x MIC não provocaram alterações de cor, permanecendo semelhantes ao SC. Foram levantadas duas hipóteses para esse comportamento: 1) a morte imediata dos microrganismos, resultando em tubos sem atividade microbiana, ou 2) uma redução significativa do metabolismo bacteriano, a ponto de bloquear a fermentação de glicose e a consequente acidificação do meio. A hipótese 1 foi descartada após a semeadura dos dois primeiros tubos, nos quais as bactérias cresceram. Na concentração 1x MIC, observou-se que o EGEO não impediu a fermentação de glicose, mas bloqueou a oxidação das peptonas. O fato mais interessante é que, em todas as concentrações de EGEO, não houve produção de H₂S.

Com estes resultados, podem-se gerar dados importantes, como a possível interferência de EGEO diretamente no metabolismo do enxofre da bactéria, bloqueando a produção de H₂S, mesmo em concentrações que ainda permitiam a fermentação de glicose, sugerindo uma ação direcionada que pode indicar novos mecanismos antimicrobianos além da simples destruição celular. No caso de CFEO, percebe-se que o metabolismo do enxofre nem a fermentação de glicose são impactados e as bactérias se proliferam, mas existe uma influência direta na oxidação das peptonas. A **Tabela 2** sumariza os resultados do experimento.

Figura 1. Teste TSI modificado. (a) Efeitos do óleo essencial de *Cymbopogon flexuosus* (CFEO) e (b) *Eucalyptus globulus* em *S. typhimurium* (ATCC 14026). SC: controle de esterilidade; BC: controle bacteriano.

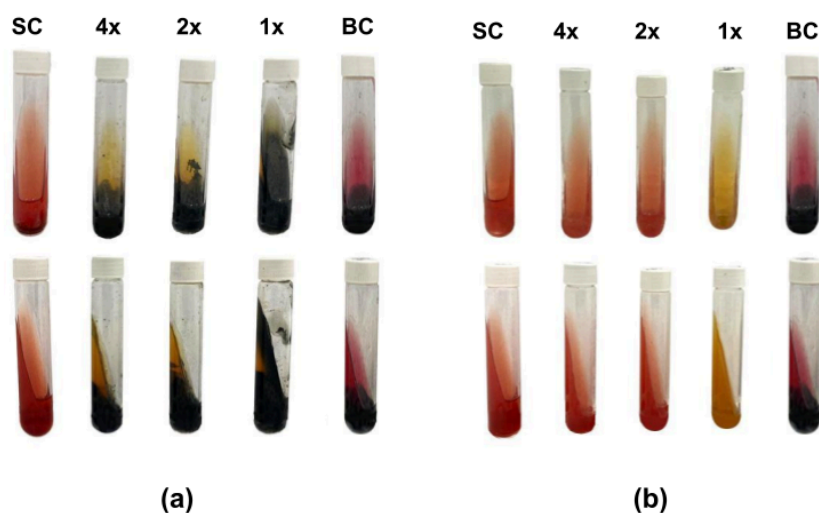


Tabela 2. Efeito dos Óleos Essenciais de *Eucalyptus globulus* (EGEO) e *Cymbopogon flexuosus* (CFEO) sobre o Metabolismo de *Salmonella Typhimurium* ATCC 14026 no Meio TSI

Composto	Concentração	Resultado	Produção H ₂ S	Colônias visíveis
	4X MIC	N/N	Ausente	Ausente

EGEO	2X MIC	N/N	Ausente	Ausente
	1X MIC	A/A	Ausente	Ausente
CFEO	4X MIC	A/A	Presente	Presente
	2X MIC	A/A	Presente	Presente
	1X MIC	A/A	Presente	Presente
BAC CTRL	-	K/A	Presente	Presente
ST CTRL	-	N/N	Ausente	Ausente

N/N: coloração vermelha, não houve alteração. A/A: coloração amarela, acidificação do meio na base e na superfície. K/A: coloração rosa na superfície e amarela na base, alcalinização e acidificação da base.

4. CONCLUSÕES

A adaptação do teste TSI foi uma estratégia eficiente para avaliar o impacto dos óleos essenciais no metabolismo de *S. typhimurium*, permitindo uma análise mais detalhada das alterações bioquímicas causadas por esses compostos. Ao utilizar este meio diferencial, foi possível observar não apenas a capacidade dos óleos de inibir o crescimento bacteriano, mas também suas influências específicas em processos metabólicos. Essa abordagem oferece um novo caminho para investigar como compostos naturais podem modular vias metabólicas bacterianas, revelando potenciais usos terapêuticos inovadores, especialmente em um cenário de crescente resistência aos antibióticos tradicionais. Portanto, a adaptação do teste TSI pode ser utilizada na pesquisa de forma qualitativa ou até mesmo de triagem de compostos, dando respostas quanto às interferências destes no metabolismo de microrganismos entéricos e aos possíveis mecanismos de ação de novos compostos, abrindo a possibilidade de desenvolver alternativas terapêuticas mais direcionadas e eficazes no combate a patógenos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHINEMEREM NWOBODO, David et al. Antibiotic resistance: The challenges and some emerging strategies for tackling a global menace. **Journal of clinical laboratory analysis**, v. 36, n. 9, p. e24655, 2022.

EWING, William Howell; DAVIS, B. R. **Media and tests for differentiation of Enterobacteriaceae**. US Department of Health, Education, and Welfare, Public Health Service, Center for Disease Control, Bureau of Laboratories, 1974.

HU, Qin et al. Mortality-related risk factors and novel antimicrobial regimens for carbapenem-resistant enterobacteriaceae infections: a systematic review. **Infection and Drug Resistance**, p. 6907-6926, 2022.

LEVINSON, W. et al. **Microbiologia médica e imunologia: um manual clínico para doenças infecciosas**. 15. ed. Porto Alegre: AMGH, 2022.

TERRENI, Marco; TACCANI, Marina; PREGNOLATO, Massimo. New antibiotics for multidrug-resistant bacterial strains: latest research developments and future perspectives. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2671, 2021.