

ANÁLISE DA ATIVIDADE COMBINATÓRIA DE PIPERINA E FÁRMACOS ANTIBACTERIANOS CONTRA ISOLADOS DE *Mycobacterium avium* E *Mycobacterium intracellulare*

Ana Beatriz Miranda (PIBIC/CNPq/UEM), Carolina Trevisolli Palomo, Renata Alexandre de Oliveira, Beatriz Ignácio Pinel, Giulienne Karla Pereira da Silva, Letícia Sayuri Murase, Rosilene Fressatti Cardoso (Orientadora). E-mail: rfcardoso@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina, Maringá, PR.

Área e subárea do conhecimento: Ciências biológicas / Bacteriologia.

Palavras-chave: Antimicrobianos; Complexo *Mycobacterium avium*; Piperina.

RESUMO

As espécies de micobactérias não tuberculosas (MNTs), *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare*, pertencentes do Complexo *Mycobacterium avium*, são importantes causadoras de doenças pulmonares e têm sido amplamente estudadas, em virtude do aumento do número de casos de doenças causadas por essas e pelo aumento da resistência aos fármacos disponíveis para tratamento. Tendo conhecimento que o composto natural piperina (PIP), quando utilizado como adjuvante, é uma possível estratégia farmacológica devido às suas propriedades antimicrobianas, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade combinatória de PIP com os antimicrobianos amicacina (AMK), rifampicina (RIF), claritromicina (CLA), moxifloxacino (MOX) e etambutol (EMB), pelo método *Resazurin Drugs Combination Microtiter Assay*, em isolados clínicos de *M. avium* e *M. intracellulare*. A análise da atividade combinatória foi determinada pelo fator modulador (FM), em que redução de pelo menos 4 vezes da concentração inibitória mínima do antimicrobiano, quando combinado com PIP, foi considerado como ação modulatória de PIP. O fator modulador apresentou valores maiores que 4 para combinação de PIP+RIF em *M. avium* e *M. intracellulare*, além de PIP e CLA em *M. intracellulare*. Para as combinações com AMK, MOXI e EMB não houve ação modulatória de PIP. Vale salientar que, existe a necessidade da realização de testes incluindo um número maior de isolados clínicos, além de ampliar os estudos com outras espécies de MNTs para ter uma visão melhor da ação de PIP como fármaco adjuvante no tratamento de micobacterioses.

INTRODUÇÃO

As micobactérias não tuberculosas (MNTs) têm apresentado destaque na literatura em saúde, em virtude da alta incidência de doenças pulmonares causadas por tais patógenos em humanos, especialmente em pacientes imunocomprometidos (HAN *et al*, 2005). Dentre as espécies de MNTs, destacam-se as pertencentes ao complexo

Mycobacterium avium (MAC), que engloba as espécies *Mycobacterium avium* e *Mycobacterium intracellulare*.

Os fármacos, disponíveis atualmente e recomendados para o tratamento de micobacterioses, são combinações de macrolídeos, como a claritromicina (CLA) e aminoglicosídeos, como a amicacina (AMK) (GRIFFITH, 2018). Além do mais, preconiza-se a associação de fármacos com diferentes mecanismos de ação como etambutol (EMB), moxifloxacino (MOX) e rifampicina (RIF), visando evitar o desenvolvimento de resistência à antimicrobianos, o que é comum nas micobactérias deste grupo (GRIFFITH, 2018).

Dentre as possíveis estratégias farmacológicas para impedir o surgimento de resistência ou restabelecer a ação de antimicrobianos contra bacilos resistentes, destaca-se o uso de compostos de origem natural como adjuvantes no tratamento, como a piperina (PIP), devido às suas atividades antimicrobiana, anti-inflamatória, analgésica, entre outras (HAQ *et al*, 2021). Considerando a promissora atividade que a PIP demonstra e a atual limitação do tratamento de doenças causadas por MNTs do complexo MAC, torna-se interessante e importante avaliar a atividade da PIP em combinação com outros antimicrobianos contra *M. avium* e *M. intracellulare*. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar, *in vitro*, a atividade da PIP associada aos antimicrobianos AMK, RIF, CLA, MOX e EMB nessas espécies de micobactérias.

MATERIAIS E MÉTODOS

Seleção e cultivo de isolados clínicos de M. avium e M. intracellulare

Três isolados clínicos (dois de *M. avium* e um de *M. intracellulare*) presente na micobacterioteca no Laboratório de Bacteriologia Médica da Universidade Estadual de Maringá, foram descongelados e cultivados em meio Mueller Hinton Broth com ajuste de cátions e 5% de OADC (ácido oleico, albumina, dextrose e catalase) (CAMHB) a 37 °C por 5 dias.

Preparação das soluções de antimicrobianos

Com base em uma busca na literatura e manuais de referência acerca dos antimicrobianos usados no tratamento de doenças causadas por MNTs, bem como a disponibilidade do fármaco no Laboratório de Bacteriologia Médica, foram escolhidos os AMK, RIF, EMB e MOX para o estudo. A PIP foi utilizada para avaliar sua atividade combinada com os antimicrobianos. Os fármacos foram preparados segundo recomendação dos fabricantes e PIP diluída em dimetilsulfóxido (DMSO).

Análise da atividade combinatória de piperina com antimicrobianos

A análise foi realizada em microplacas de 96 orifícios, pelo método *Resazurin Drugs Combination Microtiter Assay* (REDCA) com modificações. Primeiro foi realizada a

diluição dos antimicrobianos no sentido vertical e da PIP horizontalmente, nos orifícios da microplaca contendo 100 µL de CAMHB. Os inóculos bacterianos foram previamente preparados, padronizado a concentração utilizando escala McFarland nº 0,5 e diluídos na razão 1:200 em CAMHB. Foram distribuídos 100 µL do inóculo bacteriano padronizado em cada orifício da microplaca, as quais foram incubadas a 37 °C por 5 dias. Após o período de incubação, foram adicionados 30 µL de resazurina 0,01% em cada orifício da microplaca e novamente incubada por 24 horas para posterior leitura visual. A atividade combinatória foi determinada pelo fator modulador (FM), sendo $FM = (CIM A / CIM A+B)$, onde A é o antimicrobiano e B o composto piperina, na fórmula. Uma redução de pelo menos 4 vezes no valor da concentração inibitória mínima (CIM) do antimicrobiano, quando combinado com PIP, foi considerado como ação modulatória de PIP.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise das microplacas, o FM foi determinado para as combinações e isolados clínicos testados, gerando resultados que estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Determinação do fator modulador a partir da combinação de piperina com fármacos antimicobacterianos em isolados clínicos pertencentes ao Complexo *Mycobacterium avium*.

Isolados clínicos	Fator modulador (FM)				
	PIP+RIF	PIP+AMK	PIP+MOX	PIP+CLA	PIP+EMB
<i>M. avium</i> 1	32	2	1	NT	NT
<i>M. avium</i> 2	4	1	1	NT	NT
<i>M. intracellulare</i> ODS	4	NT	NT	32	1

Legendas: NT (NÃO TESTADO); PIP (PIPERINA); RIF (RIFAMPICINA); AMK (AMICACINA); MOXI (moxifloxacino); CLA (claritromicina); EMB (etambutol). Resultados destacados são significativos.

Os resultados destacados na tabela indicam ação modulatória de PIP em RIF (PIP+RIF) nos três isolados estudados pertencentes ao MAC, uma vez que os valores de FM foram maiores ou iguais a quatro. A combinação de PIP+CLA mostrou ação modulatória de PIP em CLA somente em *M. intracellulare* ODS. Já a combinação entre PIP e AMK, MOX ou EMB apresentou valores de FM abaixo de 4, não havendo redução significativa no valor da CIM de cada antimicrobiano.

Os dados obtidos com PIP+RIF corrobora resultados demonstrados em estudos prévios com *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv, uma cepa de referência usada em estudos *in vitro*, que representa o agente causador da tuberculose (HEGETO *et al*, 2018), além de um estudo *in silico* que demonstra que PIP e RIF possuem o mesmo sítio de ligação na enzima RNA polimerase de *Mycobacterium* (MURASE *et al*, 2022).

CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que a combinação do composto natural PIP com o fármaco RIF teve ação adjuvante significativa, contra os isolados clínicos de *M. avium* e *M. intracellulare* ODS. O mesmo efeito da ação modulatória foi observado na associação de PIP com a CLA, contra o isolado clínico da espécie *M. intracellulare* ODS. Vale salientar que, existe a necessidade da realização de testes incluindo um número maior de isolados clínicos, além de ampliar os estudos com outras espécies de MNTs para ter uma visão melhor da ação de PIP como fármaco adjuvante no tratamento de micobacterioses.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq e à CAPES, pelo apoio e financiamento do projeto e ao Laboratório de Bacteriologia Médica da Universidade Estadual de Maringá.

REFERÊNCIAS

GRIFFITH, D. E. Treatment of Mycobacterium avium complex (MAC). Seminars in respiratory and critical care medicine. **Thieme Medical Publishers**, p. 351-361, 2018. Disponível em: <https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-0038-1660472>. Acesso em: 07/08/2023.

HAN, X. Y. *et al.* Clinical Significance and Epidemiologic Analyses of *Mycobacterium avium*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 9, p. 4407-4412, 2005. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1234053/pdf/0123-05.pdf>. Acesso em: 07/08/2023.

HAQ, I. U. *et al.* Piperine: A review of its biological effects. **Phytotherapy Research**, p. 680-700, 2021. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.1002/ptr.6855>. Acesso em: 10/08/2023.

HEGETO, L. A. *et al.* In vitro combinatory activity of piperine and anti-tuberculosis drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis (Edinb)**, p. 35-40, 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472979218300490?via%3Dihub>. Acesso em: 23/08/2023.

MURASE L. S., *et al.* Binding of piperine to mycobacterial RNA polymerase improves the efficacy of rifampicin activity against *Mycobacterium leprae* and nontuberculous mycobacteria. **J. Biomol Struct Dyn**, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36255291/>. Acesso em: 23/08/2023.