

ATIVIDADE DE ANÁLOGOS DE PIPERINA EM *Mycobacterium tuberculosis*

Juliano Hiroyuki Ito (PIBIC/CNPq/FA/UEM), Giulienne Karla Pereira, Carolina Trevisolli Palomo, Renata Alexandre Oliveira, Regiane Bertin de Lima Scodro, Katiany Rizzieri Caleffi Ferracioli, Rosilene Fressatti Cardoso (Orientador).
E-mail: rfressatticardoso@gmail.com

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

Área e subárea do conhecimento: Ciências da Saúde e Microbiologia.

Palavras-chave: *Mycobacterium tuberculosis*, atividade antimicrobiana, análogos de piperina.

RESUMO

Mycobactérias pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis* são responsáveis por causar tuberculose (TB). A resistência desse agente bacteriano aos antimicrobianos utilizados no tratamento dessa doença é preocupante, devido ao aumento de formas de TB resistente. A piperina (PIP) extraída da pimenta preta (*Piper nigrum*) apresenta diversas atividades biológicas, inclusive antimicobacteriana. Com o intuito de trazer melhorias nas propriedades farmacológicas de PIP, o desenvolvimento de análogos sintéticos vem sendo realizado e alguns apresentaram atividades promissoras contra isolados resistentes de *M. tuberculosis*. Desse modo, 14 análogos de PIP foram submetidos à determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), pela metodologia *resazurin microtiter assay* (REMA), contra *M. tuberculosis* H₃₇Rv. Dos análogos de PIP analisados, cinco apresentaram CIM \leq 31,25 μ g/mL, os quais foram, Ácido pipérico (15,62 μ g/mL), MDA II (0,9 μ g/mL), MDA VI (3,9 μ g/mL), MDA XIII (7,8 μ g/mL) e MDA-H (31,25 μ g/mL). Esses resultados indicam um potencial promissor desses análogos de PIP para o desenvolvimento terapêutico, uma vez que as alterações na estrutura química de PIP aumentaram a atividade antimicrobiana em *Mycobacterium tuberculosis*. Neste sentido, estudos que avaliam segurança e eficácia devem ser aplicados a esses análogos, possibilitando a introdução desses compostos na linha de desenvolvimento de fármacos.

INTRODUÇÃO

A tuberculose (TB) é uma doença infectocontagiosa causada, por bacilos álcool-ácido resistente pertencentes ao Complexo *Mycobacterium tuberculosis*. Em 2022, estima-se que 1.3 milhões de pessoas morreram por conta da TB, sendo a

segunda maior causa mundial de morte causada por um único agente infeccioso, a qual fica atrás apenas da COVID-19. Atualmente, o tratamento da TB compreende em uma fase intensiva, com duração de cerca de 2 meses, com rifampicina, etambutol, isoniazida e/ou pirazinamida, e uma fase de manutenção, cerca de 4 meses com rifampicina e isoniazida. O surgimento de cepas de *M. tuberculosis* multirresistente aos antimicrobianos (MR-TB) utilizados na terapia padrão já é um problema de saúde pública mundial, estima-se que ocorreram 410 mil casos de MR-TB em 2022 (WHO, 2023).

A piperina (PIP) é um alcalóide extraído da pimenta preta (*Piper nigrum*) que apresenta potenciais efeitos antimicrobianos, anti-inflamatório, entre outros (MURASE et al., 2023). Entretanto, a mesma apresenta algumas limitações como baixa solubilidade em água e rendimentos de extração variáveis, fazendo-se necessário a busca por alternativas que melhorem esse desempenho. Neste sentido, estudam-se a síntese de análogos estruturais sintéticos de PIP, no intuito de melhorar as propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas em relação ao composto químico natural da planta (PHILIPOVA et al., 2018).

Recentemente, o grupo de pesquisa em Tuberculose e Micobacterioses na Universidade Estadual de Maringá observou atividade promissora de PIP contra linhagens de *M. tuberculosis*, sensíveis e com resistência aos fármacos anti-TB (HEGETO et al. 2018; MURASE et al., 2023). Neste sentido, com o intuito de trazer melhorias na atuação dessa substância no combate ao bacilo agente causador da TB, alguns análogos de PIP foram sintetizados quimicamente e sua atividade antimicobacteriana foi determinada *in vitro* em *M. tuberculosis*.

MATERIAIS E MÉTODOS

A cepa de referência *M. tuberculosis* H₃₇Rv ATCC 27294 estudada foi proveniente da micobacterioteca do Laboratório de Bacteriologia Médica da Universidade Estadual de Maringá. Para a reativação da cepa de referência inóculo bacteriano foi cultivado em Middlebrook 7H9 (Difco Laboratories, Le Pont de Claix, France) enriquecido com 10% de ácido oleico, albumina bovina, dextrose e catalase (OADC) (BBL/Becton-Dickinson, Sparks, MD, USA) incubado por 15 dias a 35°C.

A concentração inibitória mínima (CIM) dos análogos de PIP foi determinada utilizando a metodologia *resazurin microtiter assay plate* (REMA). As suspensões bacterianas de *M. tuberculosis* H₃₇Rv foram preparadas e 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 de PIP testados, de acordo com o método descrito por Palomino et al. (2002). As microplacas foram incubadas 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, foram adicionados a cada orifício e as microplacas foram 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 análogo de PIP capaz de inibir o crescimento bacteriano, ou seja, a mudança de cor da resazurina de azul para rosa.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos análogos de PIP analisados, cinco apresentaram CIM $\leq 31,25$ $\mu\text{g/mL}$. Ácido pipérico (15,62 $\mu\text{g/mL}$), MDA II (0,9 $\mu\text{g/mL}$), MDA VI (3,9 $\mu\text{g/mL}$), MDA XIII (7,8 $\mu\text{g/mL}$) e MDA-H (31,25 $\mu\text{g/mL}$). No entanto seis análogos de PIP analisados resultaram em CIM ≥ 250 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima de piperina e análogos de piperina contra *M. tuberculosis* H₃₇Rv.

Análogos de piperina	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	Análogos de piperina	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
Piperina	62,5	MDA V	≥ 250
Ácido pipérico	15,625	MDA VI	3,9
Piperato de Metila	≥ 250	MDA VII	≥ 250
Pipe 03	250	MDA IX	125
MDA I	≥ 250	MDA XIII	7,8
MDA II	0,9	MDA-H	31,25
MDA III	≥ 250	MDA-MaF	≥ 250
MDA IV	≥ 250	MDA V	≥ 250
MDA V	≥ 250		

*CIM: Concentração Inibitória Mínima.

Philipova et al. (2018) revelou que a substituição de uma estrutura química como o anel de piperidina é primordial para um efeito anti-*M. tuberculosis*, corroborando a importância de se estudar a ação de diferentes análogos de PIP. Embora a atividade antimicrobiana dos análogos da PIP tenha sido amplamente demonstrada em outros contextos, a pesquisa sobre a eficácia desses análogos contra *M. tuberculosis* ainda é limitada. Nesse sentido, os resultados obtidos contribuem para preencher essa lacuna e sugerem que a continuidade de estudos com análogos da PIP podem ser promissores no desenvolvimento de novas terapias anti-TB.

É importante considerar que são necessários estudos adicionais para confirmar e expandir o entendimento sobre a eficácia desses análogos contra *M. tuberculosis*, tendo em vista que a citotoxicidade desses contra isolados clínicos

resistentes aos fármacos anti-TB ainda não foram determinadas. Por isso, pesquisas futuras deverão focar na confirmação da eficácia dos análogos em condições experimentais amplas, além de explorar a ação sinérgica quando em combinação aos fármacos utilizados atualmente no tratamento da TB.

CONCLUSÕES

Os análogos de PIP - Ácido pipérico, MDA II, MDA VI, MDA XIII e MDA-H - demonstram valores baixos de CIM contra a cepa *Mycobacterium tuberculosis* H₃₇Rv. Esses resultados indicam um potencial promissor desses análogos de PIP para o desenvolvimento terapêutico, uma vez que as alterações na estrutura química do composto natural da planta aumentaram a atividade antimicrobiana em *M. tuberculosis*. Por isso, estudos que avaliam segurança e eficácia devem ser aplicados a esses análogos, possibilitando a introdução desses compostos na linha de desenvolvimento de fármacos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao CNPq e a Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

HEGETO LA, Caleffi-Ferracioli KR, Nakamura-Vasconcelos SS, Almeida AL de, Baldin VP, Nakamura CV, et al. *In vitro* combinatory activity of piperine and anti-tuberculosis drugs in *Mycobacterium tuberculosis*. **Tuberculosis**.2018;111:35–40.

MURASE, L. S. et al. Antibacterial and immunological properties of piperine evidenced by preclinical studies: a systematic review. **Future Microbiology**, v. 18, n. 17, p. 1279-1299, 2023.

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.

PHILIPOVA, I. et al. Synthetic piperine amide analogs with antimycobacterial activity. **Chemical Biology & Drug Design**, v. 91, n. 3, p. 763-768, 2018.

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