

## **Sinergismo en la actividad antimicrobiana *in vitro* entre piperina y ciprofloxacina frente a *Staphylococcus aureus***

Storani G, Diaz David DC, Fernández HR, Picco EJ.

Cátedra de Farmacología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Litoral.  
ginostorani@hotmail.com

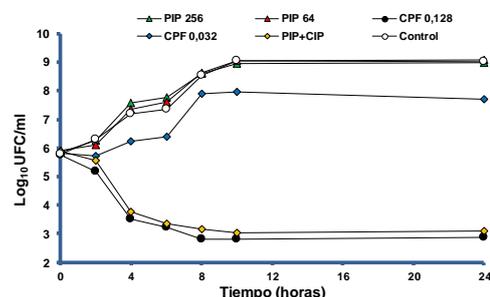
El uso masivo, y con frecuencia irracional de los antimicrobianos, ha dado lugar al problema de resistencia. En las últimas décadas, si bien varios medicamentos antibacterianos han sido desarrollados, y las compañías farmacéuticas han suministrado generación tras generación antibióticos mejorados, el problema de la resistencia parece no tener límite. Una alternativa que podría ayudar a contrarrestar esta situación podría ser el empleo de compuestos que potencien el accionar de los antimicrobianos, ya que la aplicación conjunta podría resultar en un mejor efecto. En este sentido, diversos agentes han demostrado inhibir mecanismos que confieren resistencia, tal es caso de la piperina (PIP), un compuesto de origen natural extraído de la pimienta negra<sup>1</sup> que ha demostrado en modelos animales inhibir varias vías metabólicas mediadas por el citocromo P450, así como las bombas de eflujo en *S. aureus*. El objetivo de este trabajo fue evaluar si la incorporación de piperina potenciaba el accionar antibacteriano de ciprofloxacina (CPF) frente a una cepa de referencia de *S. aureus*, aislada a partir de un caso de mastitis. Luego de determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de CPF frente a la cepa de *S. aureus* (ATCC 29740) mediante la técnica de microdilución en placa con caldo Mueller-Hinton, se procedió a evaluar el efecto ejercido por la incorporación de PIP sobre la actividad de CPF, para lo cual las placas se cargaron conformando un tablero con diluciones de PIP y CPF. En el eje X se colocaron las diluciones de CPF en concentraciones iguales a 0; 0,016; 0,032; 0,064; 0,128; 0,256 y 0,512 µg/mL, en tanto que en el eje Y se colocaron diluciones de PIP en las siguientes concentraciones: 0; 16; 32; 64; 128 y 256 µg/mL. De esta manera quedaron representadas todas las posibles combinaciones de las diluciones. Cada pocillo del tablero presentó un volumen final de 200 µL, de los cuales 50 µL se incorporaron con la concentración de CPF y 50 µL con la de PIP para esa casilla, correspondiendo los restantes 100 µL al inóculo bacteriano (10<sup>6</sup> UFC/mL). Se incubó a 35 ± 1 °C durante 24 horas, al cabo de las cuales se procedió a la lectura de los resultados. La CIM fue definida como la menor concentración en la que no se observó la formación de botón de crecimiento ni turbidez. Posteriormente se caracterizó el comportamiento cinético de esta interacción empleando un modelo dinámico de curva de crecimiento bacteriano. El estudio se realizó en tubos exponiendo el inóculo de *S. aureus* a PIP y CPF a las concentraciones con las cuales se registró la interacción, esto es 0,032 µg/mL de CPF y 64 µg/mL de PIP, tanto en forma combinada como independiente, así como también a concentraciones iguales a la CIM de CIP y a 256 µg/mL para PIP. Un inóculo fue cultivado en ausencia de fármaco e incubado en estufa bajo idénticas condiciones (35 ± 1 °C) para la construcción de la curva de crecimiento testigo. De cada cultivo se obtuvieron alícuotas de 100 µL al tiempo cero y luego de 2, 4, 6, 8, 10 y 24 horas de crecimiento. Éstas se diluyeron en solución salina isotónica a 4 °C y una alícuota de cada última dilución fue extendida sobre la superficie de una placa de agar Mueller-Hinton e incubada a 35 ± 1 °C durante 24 horas. La dilución se efectuó a fin de obtener un número de colonias de entre 50 y 500 UFC por placa. Todas las curvas se construyeron por duplicado y los valores de UFC/mL fueron estimados por el factor de corrección correspondiente. El número de bacterias viables en cada tiempo de muestreo fue expresado como el promedio de conteos realizados en cada repetición.

La CIM de CPF para esta cepa de *S. aureus* fue de 0,128 µg/mL, en tanto que al aplicar en forma conjunta antimicrobiano y PIP encontramos que la CIM de CPF descendió a 0,032 µg/mL luego de la incorporación de PIP a razón de 64 µg/mL, lo que indica una reducción de 4 veces en la CIM (Figura 1). Por su parte, en la figura 2 se muestra la evolución de la población bacteriana al exponerse a diferentes concentraciones

de estos compuestos. Puede apreciarse que PIP, incluso a concentraciones 4 veces superiores a la que generó el efecto de interacción carece de actividad antibacteriana, siendo el desarrollo similar al registrado en la curva control. Concentraciones sub inhibitorias de CPF generaron una disminución inicial en el crecimiento de los microorganismos, pero esta actividad desapareció entre las 2 y 4 horas, presentando a partir de allí un crecimiento significativo. Por su parte, cuando se valoró el crecimiento bacteriano en presencia de CPF a concentraciones iguales a la CIM se ve claramente la actividad bactericida, ya que se aprecia una disminución en el crecimiento de 3 logaritmos. Cuando se caracteriza la evolución de la población bacteriana enfrentándola en forma conjunta a PIP y CPF a las concentraciones en las cuales se registró el efecto sinérgico en el modelo de microdilución se aprecia nuevamente el efecto bactericida, aunque ligeramente inferior al registrado con CPF a concentraciones equivalentes a la CIM.

Piperina (µg/mL)	256							
	128							
	64							
	32							
	16							
	0							
		0	0,016	0,032	0,064	0,128	0,256	0,512
	Ciprofloxacina (µg/mL)							

**Figura 1:** Representación gráfica de la interacción entre PIP y CIP frente a *S. aureus* empleando la técnica del tablero. (■ Con crecimiento bacteriano □ Sin crecimiento bacteriano).



**Figura 2:** Evolución de la masa bacteriana de *S. aureus* expuesta a PIP y/o CPF. Los valores se hallan expresados como  $\log_{10}$  UFC/mL

La incorporación de PIP consiguió reducir en forma significativa la CIM de ciprofloxacina frente a esta cepa de referencia de *S. aureus*. Estos resultados son similares a los reportados por otros autores, empleando la misma combinación, pero sobre cepas de *S. aureus* meticilino resistentes<sup>2</sup>. En base a estos resultados se desarrollarán nuevos ensayos empleando cepas aisladas de casos clínicos de nuestra región, valorando también el efecto sobre otros antimicrobianos, ya que por ejemplo se reporta que la piperina ejerce un efecto antagónico sobre el accionar de otros antibióticos frente a *Pseudomonas aeruginosa*<sup>3</sup>.

## Bibliografía

- 1- Gorgani, L.; Mohammadi, M.; Najafpour, G.; Nikzad, M. (2017). Piperine-The bioactive compound of black pepper: From isolation to medicinal formulations. *Comp. Rev Food Sci.*, 16, 124-140.
- 2- Khan, I.; Mirza, Z.; Kumar, A.; Verma, V.; Qazi, G. (2006). Piperine, a phytochemical potentiator of ciprofloxacin against *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 50, 810-812.
- 3- Mgbeahuruike, E.; Stålnacke, M.; Vuorela, H.; Holm, Y. (2019). Antimicrobial and synergistic effects of commercial piperine and piperlongumine in combination with conventional antimicrobials. *Antibiotics*, 8, 1-12.