

Piper corcovadensis*: um antimicrobiano natural**Piper corcovadensis*: a natural antimicrobial**

Jéssica Bruna de Lima, Marcílio Wagner Fonte Silva, Giselle Barbosa Bezerra, Amanda Lins

Bispo Monteiro, Drielly Emanoele Tomé Barros De Oliveira, Clécio Souza Ramos*

Laboratório de Ecologia Química e Síntese, Departamento de Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP: 52171-900 - Recife/PE *clecio.ramos@ufrpe.com

Resumo

O extrato etanólico bruto obtido das folhas de *Piper corcovadensis* mostrou forte atividade antimicrobiana principalmente para o fungo *Candida Krusei* e a bactéria *Staphylococcus faecalis* com concentração mínima inibitória (CMI) de 19,5 µg/mL. O fracionamento do extrato por cromatografia em coluna permitiu o isolamento e elucidação estrutural da amida piperovatina. A amida mostrou atividade antimicrobiana para todos os microrganismos testados com CMI de 2500 µg/mL. Para nosso conhecimento, este é o primeiro estudo da atividade antimicrobiana e isolamento da piperovatina das folhas *P. corcovadensis*, uma planta de uso na medicina popular no tratamento de doenças infecciosas do trato gastrointestinal.

Palavras-chave: Piperaceae; *Piper corcovadensis*; Piperovatina; Antifúngico; *Candida Krusei*.

Abstract

The crude ethanol extract obtained of the *Piper corcovadensis* leaves showed strong antimicrobial activity mainly against *Candida Krusei* fungus and *Staphylococcus faecalis* bacterium with value of minimum inhibitory concentration (MIC) of 19.5 µg/mL. The fractionation of the extract by column chromatography facilitated the isolation and structural elucidation of the piperovatine amide. The amide showed antimicrobial activity for all microorganisms tested with MIC of 2500 µg/mL. To our knowledge, this is the first report of the antimicrobial activity and isolation of piperovatine from *P. corcovadensis* leaves, a plant used in folk medicine to infectious diseases of the gastrointestinal tract.

Keywords: Piperaceae; *Piper corcovadensis*; Piperovatine; Antifungal; *Candida Krusei*.

Introdução

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), óbitos causados por infecções chegam a 25% no mundo e 45% em países subdesenvolvidos, sendo que no Brasil as doenças infecciosas e parasitárias ainda têm grande relevância como causa de morbidade e mortalidade com 47.053 óbitos em 2009 [1,2]. A descoberta de novos compostos antimicrobianos é iminente e uma questão de saúde pública, sendo que as plantas são consideradas uma excelente fonte de moléculas no desenvolvimento de novos fármacos [3-6].

Espécies de plantas da família Piperaceae tem sido alvo de diversos estudos devido o seu grande potencial biológico, o que tem levado a elucidação estrutural de vários metabólitos fisiologicamente ativos como neolignanas, lignanas, lactonas, terpenos, hidroquinonas, amidas, alcaloides, ácidos benzóicos prenilados, flavonoides e cromenos [7]. Com ocorrência global, as espécies de Piperaceae são amplamente usadas na medicina popular no tratamento de diversas patologias que incluem doenças gastrointestinais, venéreas, infecciosas bem como para aliviar dores associadas a inflamações [8]. Algumas espécies têm importância econômica como a *Piper nigrum* usada na culinária, a *P. methysticum* como fitoterápico, a *Peperomia pellucida* amplamente usada para fins ornamentais, como agroquímicos, sendo fonte de inseticidas botânicos como os fenilpropanóides safrol (*P. hispidinervium* e *P. divaricatum*) e dilapiol (*P. aduncum*) obtidos dos óleos essenciais [9-11]. O gênero *Piper* é o mais abrangente da família Piperaceae com mais de 3000 mil espécies identificadas que apresentam diversas atividades biológicas, incluindo a atividade antimicrobiana [12-14].

Em nosso contínuo estudo sistemático na busca por espécies de *Piper* como fonte de compostos bioativos, o potencial antimicrobiano das folhas de *P. corcovadensis* foi avaliado contra fungos e bactérias. A *P. corcovadensis* (Miq.) C. DC (syn. *Ottonia corcovadensis*) também conhecido como jaborandi falso, sendo usada na medicina popular brasileira no alívio da dor associada a inflamações [15-16]. A *P. corcovadensis* acumula em suas raízes como composto majoritário a piperovatina, que apresenta atividades antimicrobiana, inseticida, anti-inflamatória e anestésica. Há também relatos do isolamento das amidas piperlonguminina, corcovadina, isopiperlonguminina e isocorcovadina dos tecidos de *P. corcovadensis* [17].

Experimental

Reagentes e equipamentos

Os reagentes e solventes foram obtidos comercialmente com teor maior que 98% dos fornecedores Merck, Aldrich, Cinética. Para a cromatografia em camada delgada foi usada cromatofolhas de sílica-gel, contendo indicador fluorescente F₂₅₄, da Macherey/Nagel, como revelador a radiação ultravioleta em 254 nm e cuba contendo sistema de H₂SO₄/etanol. Para cromatografia em coluna foi utilizada sílica gel 60 (Merck, 70-230 mesh). As análises de CG/EM foram realizadas em um equipamento VARIAN com coluna DB-5 de capilaridade com sílica (30m x 0,25mm x 0,25µm). A temperatura da coluna foi programada para 60°C até 240 à 3°C/min. As temperaturas do injetor e detector foram de 240°C e 280°C, respectivamente. O gás de arraste foi o hélio, fluxo de 1,5 mL/min, (1:50). Os espectros de massas foram obtidos a 70 eV. A velocidade de leitura foi de 0.5 scans-1 de m/z 40 a 650. Os espectros de RMN ¹H e ¹³C foram obtidos no equipamento da Varian modelos Unitty Plus (300 MHz para prótons), usando solventes deuterados e tetrametilsilano (TMS) como padrão interno.

Material vegetal

As folhas de *Piper corcovadensis* foram coletadas no Jardim Botânico de Pernambuco da cidade de Recife em Pernambuco e identificadas pela bióloga Amanda Lins Bispo Monteiro (UFRPE). As folhas coletadas foram secas em estufa por 48h a 40°C e em seguida foram maceradas para obtenção dos extratos brutos em um moinho de facas. O material vegetal seco e macerado foi submetido à extração exaustiva em três sistemas respectivamente etanol (3x de 250 mL), etanol/água 1:1 (3x de 250 mL), e butanol (3x de 250 mL) pelo método de maceração a frio por 48h para cada sistema. Todo material vegetal foi concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotativo (40°C, ± 80rpm) obtendo-se os extratos brutos etanólico (4,0 g), etanol/água 1:1 (5,0 g) e butanólico (3,0 g) com o rendimento de 2,5, 1,9 e 2,1 %, respectivamente.

Fracionamento do extrato

O extrato bruto etanólico das folhas de *P. corcovadensis*, 1,0 g em metanol/água 7:1 foi inicialmente fracionado em uma coluna a seco a vácuo usando como fase estacionária celite 545 (Dinâmica). A coluna foi eluída consecutivamente com a mistura de solventes 7:1 metanol/água, 100%

hexano, hexano/acetato de etila 1:1 e 100% acetato de etila resultando em quatro frações. A primeira fração foi submetida à cromatografia em coluna com sílica gel (230-400 mesh, Merck) com obtendo-se trinta subfrações e eluída com hexano/acetato de etila começando na proporção de 8:2 até 100% acetato de etila. As frações 23 e 24 foram reunidas, após análise por cromatografia de camada delgada, resultando no isolamento de 55 mg de um composto puro.

Atividade antimicrobiana

Foram utilizadas para avaliação da atividade antimicrobiana para as bactérias *Staphylococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, para os fungos *Candida utilis* e *Candida krusei*. Foram utilizados meios de cultura líquidos Saubouraud para os fungos e meio líquido Mueller Hinton para bactérias. As microplacas foram cultivadas em estufas distintas: a 37°C por 24 h para as bactérias, 30°C por 72 h para os fungos. Após o período de incubação, as microplacas foram reveladas com a adição de 10 µL da solução de risazurina a 0,01% e incubadas por 3 h e os valores da concentração mínima inibitória (CMI) de cada amostra foi determinada conforme protocolo relatado previamente [18]. Como controle positivo foi usado o Metronidazol para as bactérias e o Fluconazol para os fungos.

Resultados

O fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das folhas de *P. corcovadensis* permitiu o isolamento de um composto com elucidação estrutural determinada por EM e RMN ^1H e ^{13}C . O espectro de RMN de ^1H do composto isolado apresentou um duplete em δ 0,93 correspondentes a hidrogênios de duas metilas ($J = 6$, 6H), um multiplete em δ 1,80 (m, 1H) e um tripleto em δ 3,15 com (t, $J = 6$, 2H), referente aos hidrogênios metilênicos. Foram observados dois dupletos de hidrogênios aromáticos em δ 7,06 (d, $J = 9$, 2H) e em δ 6,83 (d, $J = 9$, 2H) bem como um simpleto em 3,79 (s, 2H), característico de uma metoxila. Também foi observado um duplete em δ 5,77 (d, $J = 15$, 1H), um duplo duplete em δ 7,17 (dd, $J = 15$ e 6, 1H) e dois multipletos em δ 6,07 – 6,22 (m, 2H), sinais característicos para amidas isobutílicas.

No espectro de RMN de ^{13}C foi observado um sinal em δ 55,2 referente ao grupo metoxila e um sinal em δ 20,6 referente a carbono sp^3 . A presença de conjunto de sinais em δ 129,5, 113,92, 158,12, 129,5 atribuídos como carbonos sp^2 de um anel aromático. Os sinais em δ 122,7, 140,62, 129,01, 140,98 referentes aos carbonos sp^2 de duas duplas ligações com configuração *E*. À interpretação dos sinais dos

espectros de RMN ^1H e ^{13}C bem como comparados com os dados obtidos na literatura permitiu determinar o composto isolado como a amida piperovatina (Tabela 1).

Tabela 1. Dados do espectro de RMN de ^1H e de ^{13}C da piperovatina (300 MHz e 75 MHz, CDCl_3 , δ ppm, J Hz).

C	Dados piperovatina		Dados da literatura [19]	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
1	-	166,20	-	166,2
2	5,77 d (15)	122,70	5,78 d (14,9)	122,7
3	7,17 dd (15;6)	140,62	7,21 dd (14,9; 10,0)	140,6
4	6,07 – 6,22 m	129,01	6,12 dd (15,2; 10,0)	129,0
5	6,07 – 6,22 m	148,98	6,20 dt (15,2; 6,6)	140,9
6	3,41 d (6)	38,21	3,42 d (6,6)	38,2
7	-	131,06	-	131,1
8	7,06 d (9)	129,54	7,08 d (8,3)	129,5
9	6,83d (9)	113,92	6,84 d (8,3)	113,9
10	-	158,12	-	158,1
11	6,83 d (9)	113,92	6,84 d (8,3)	113,9
12	7,06 d (9)	129,54	7,07 d (8,3)	129,5
1'	3,15 t (6)	46,88	3,16 dd (6,7; 6,1)	46,9
2'	1,80 m	28,55	1,79 m (6,7)	28,6
3' e 4'	0,93 d (6)	20,06	0,92 d (6,7)	20,1
OCH ₃	3,79 s	55,22	3,90 s	55,2
NH			5,49 s	-

O espectro de massas do composto isolado mostrou um íon molecular de m/z 273 Da (Figura 1), com pico base em m/z 173 Da. Outras fragmentações com m/z 152, 139, e 96 Da foram observadas, confirmando o composto como sendo a amida piperovatina com base na interpretação das fragmentações dos íons (Figura 2).

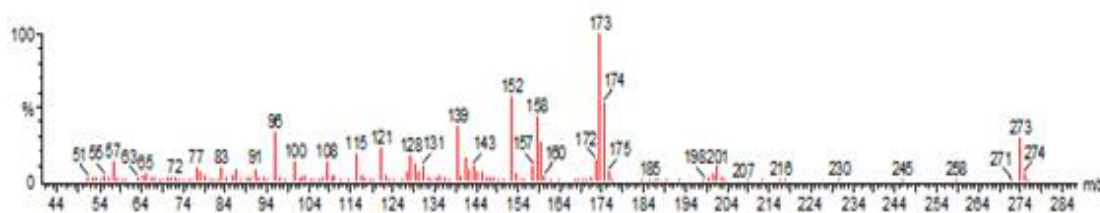


Figura 1. Espectro de massa da amida piperovatina ($\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{NO}_2$, m/z =273 Da).

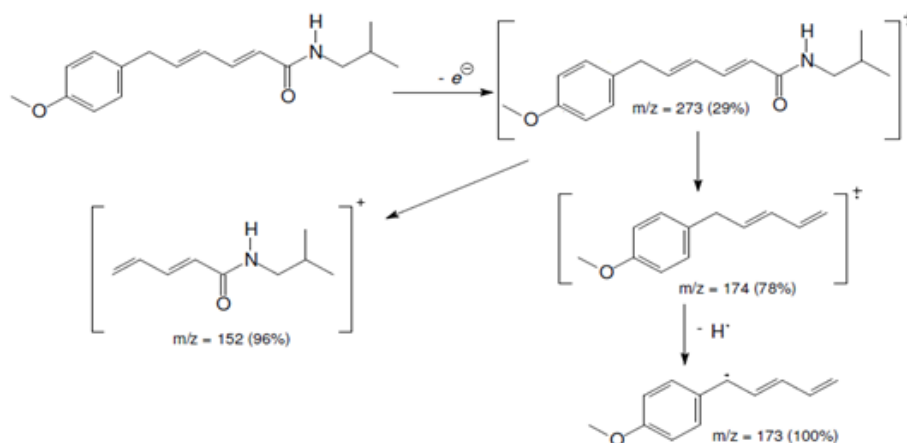


Figura 2. Proposta para as fragmentações observadas no EM para a amida piperovatina.

Os valores CMI dos extratos das folhas de *P. corcovadensis* e da amida piperovatina foram determinados frente a seis microrganismos incluindo bactérias e fungos (Tabela 2). Valores de CMI menores que 500 µg/mL são considerados inibidores fortes de micro-organismo, valores de 600 a 1500µg/mL são considerados moderados e valores acima de 1500 inibidores fracos [20]. As amostras testadas apresentaram valores de CMI que variaram de 19,5 µg/mL a 2500 µg/mL. O extrato etanólico apresentou o melhor resultado como forte atividade frente às bactérias *E. faecalis* e *B. subtilis* com CMI de 19,5 e 39,0µg/mL, respectivamente, bem como atividade moderada para a bactéria *K. pneumoniae* com CMI 625µg/mL. Para o fungo *Candida krusei* os extratos etanólico e etanol/água (1:1) apresentaram atividade forte com CMI de 19,5µg/mL. A amida piperovatina mostrou atividade fraca frente aos microrganismos testados com CMI de 2500 µg/mL.

Tabela 2: Valores de CMI em µg/mL para avaliação antimicrobiana de *P. corcovadensis*

Bactérias	Extrato Etanólico	Extrato Etanol/água 1:1	Extrato Butanólico	Piperovatina	^a Metronidazol
<i>E. faecalis</i>	19,5	625	2500	2500	156
<i>B. subtilis</i>	39	625	2500	2500	2500
<i>E. coli</i>	2500	>2500	2500	2500	78
<i>K. pneumoniae</i>	625	1250	>2500	2500	625
Fungos					^b Fluconazol
<i>C. krusei</i>	19,5	19,5	^c na	na	2,5
<i>C. utilis</i>	625	625	na	na	2,5

^aControle positivo para as bactérias; ^bControle positivo para os fungos; ^cNão avaliado

Considerações Finais

Para o nosso conhecimento, este é o primeiro relato do isolamento da amida perovatina das folhas de *P. corcovadensis*, sendo a amida isolada previamente somente das raízes e nas folhas foram isolados flavonoides. A atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de *P. corcovadensis*, relatada também pela primeira vez, mostrou que a planta possui potente ação antifúngica contra os fungos *C. krusei* e *C. utilis* bem como potente ação antibacteriana contra as bactérias gram-positiva *E. faecalis* e *B. subtilis*. A amida perovatina apresentou CMI de 2500 µg/mL para todos os microrganismos testados indicando que há outros compostos bioativos e que somente a amida não justifica a forte atividade antimicrobiana das folhas *P. corcovadensis*.

O estudo revelou o potencial antimicrobiano das folhas de *P. corcovadensis*, justificando o seu uso na medicina popular no tratamento de doenças infecciosas do trato gastrointestinal.

Referências

- [1] Wannmacher, L. Uso indiscriminado de antibióticos e resistência microbiana: uma guerra perdida? Uso racional de medicamentos: temas selecionados, Brasília, v. 1, n. 4, pp. 1-11, 2004.
- [2] Plano Nacional de Saúde – PNS : 2012-2015. Subsecretaria de Planejamento e Orçamento. , pp. 1-114, 2011.
- [3] D. J. Cragg,. “Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010,” J. N. Prod., 75 (2012) 311–335.
- [4] M. A. Jaramillo, R. Callejas, “Current perspectives on the classification and phylogenetics of the genus *Piper* L,” in *Piper: A Model Genus for Studies of Phytochemistry, Ecology, and Evolution*, L. A. Dyer, A. D. N. Palmer, Eds., p. 219, Academic/Plenum Publishers, New York, NY, USA, 2004.
- [5] L. V. Costa-Lotufo, R. C. Montegro, A. P. Alves, N. N. Madeira, S. V. F. C. Pessoa, M. E. A. Moraes, M. O. Moraes, A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, Rev. Virt. Quím., 2 (2010) 47-58.
- [6] F. E. Koehn, G. T. Carter, “The evolving role of natural products in drug discovery,” Nature Rev. Drug Disc., 4 (2005) 206–220.
- [7] M. J. Kato M. Furlan, Chemistry and evolution of the Piperaceae, Pur. Appl. Chem., 79 (2007) 529-538.

- [8] B. Salehi, Z. A. Zakaria, R. Gyawali, S. A. Ibrahim, J. Rajkovic, Z. K. Shinwari, T. Khan, J. Sharifi-Rad, A. Ozleyen, E. Turkdonmez, M. Valussi, T. B. Tumer, M. Fidalgo, M. Martorell, W. N. Setzer WN, *Piper* Species: A Comprehensive Review on Their Phytochemistry, Biological Activities and Applications, *Molecules*, 24 (2019)1-118.
- [9] N. S. F. Alves, W. N. Setzer, J. K. R. da Silva, The chemistry and biological activities of *Peperomia pellucida* (Piperaceae): A critical review. *J Ethnopharmacol.*, 25 (2019) 90-102
- [10] D. R. Barbosa, L. L, A. K. Partata, Kava-Kava (*Piper methysticum*): Uma revisão geral *Revista Científica do ITPAC, Araguaína*, 6 (2013) 1-19.
- [11] W. Salleh, W. M. N. H, H. Kassim, A. Tawang, Traditional uses, chemical profile and biological activities of *Piper hispidum* Sw.: a review, *Biointer. Res. in Appl. Chem.*, 11 (2021) 13115-13129.
- [12] S. Wanke, L. Vanderschaeve, G. Mathieu, C. Neinhuis, P. Goetghebeur, M. S. Samain, From forgotten taxon to a missing link? The position of the genus *Verhuellia* (Piperaceae) revealed by molecules, *Ann. Bot*, 9 (2007) 1231-1238. .
- [13] Q. P. S. Barbosa, C. A. G. da Camara, C. S. Ramos, D. C. O. Nascimento, J. V. Lima-Filho, E. F Guimaraes, Chemical composition, circadian rhythm and antibacterial activity of essential oils of *Piper divaricatum*: a new source of safrole, *Quim. Nova*, 35 (2012) 1806-1808.
- [14] W. K. Tilak, T. Mishra, Study of antimicrobial activity of betel leaves extracts against ESBL and MBL producing pathogenes, *J. Pharmac. Res.* 6 (2017) 2364-2368.
- [15] C. M.M. Fernandez, V. P. Baldin, A. L. Ieque, K. Z. Bernuci, R. T. Almeida, L. M. Valone, D. P. Fonseca, R. Y. Makimori, J. P. P. Andrade, E. J. Pilau, M. B. Romagnolo, T. U. Nakamura, R. F. C., D. A. G. Cortez, Z. C. Gazim, R. B.L. Scodro, B. P. Dias Filho, Anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of dichloromethane extract of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC. roots and isolated compounds, *Ind. Crop. Prod.*, 131, (2019), 341-347,
- [16] M. F. R. Silva, P. C. Bezerra-Silva, C. S. Lira, B. N. L. Albuquerque, Afonso C. A. Neto, E. V. Pontual, J. R. Maciel, P. Maria G. Paiva, D. M. A. F. Navarro, Composition and biological activities of the essential oil of *Piper corcovadensis* (Miq.) C. DC (Piperaceae), *Exp. Parasit.*, 165 (2016) 64-70,
- [17] S. S. Costa, W. B. Mors, Amides of *Ottonia corcovadensis*, *Phytochemistry* 20 (1981) 1305-7.
- [18] J. M. Conceição, M. W. F. Silva, C S. Ramos, Toxicidade, atividade antimicrobiana e antioxidante das folhas de *Solanum paniculatum* metabolizadas pelo gafanhoto *Xileus discoideus*, *Exatas online*, 1, (2020) 23-31.
- [19] W. Rendón, G. Chávez, M. Meléndez-Rodríguez, P. Joseph-Nathan, Total assignment of the ¹H and ¹³C NMR spectra of piperovatine, *Spectroscopy*, 14, (1998) 35–40.

- [20] N. Aligiannis, E. Kalpoutzakis, S. Mitaku, I. B. Chinou, Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species, J. Agric. Food Chem., 49, (2001) 4168– 4170.
- [21] V. A. Facundo, S. M. Moraes, R. B. Filho, Constituintes químicos de *Ottonia corcovadensis* Miq. da floresta amazônica – atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de hidrogênio e carbono, Quim. Nova, 27 (2004) 79-83.