



PPG

Pró-Reitoria de Pesquisa e
Pós-Graduação
Gerência de Pesquisa e
Inovação - GPI



Governo do
Estado da Bahia

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB
Recredenciada pelo Decreto Estadual
Nº 16.825, de 04.07.2016

Estudo químico e avaliação biológica das folhas de *Piper klotzschianum* kunth (Piperaceae).

Maicon Chaplim Teles de Almeida (IC)¹

maycon.almeida11@gmail.com

Jeferson Chagas do Nascimento (PQ)¹

jefersonchag@gmail.com

Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

RESUMO

Este trabalho descreve o estudo químico dos constituintes fixos das folhas de *Piper klotzschianum* Kunth, a avaliação biológica dos constituintes isolados frente à *Artemia salina*. A partir do extrato orgânico das folhas de *Piper klotzschianum* foram isoladas 5 substâncias naturais utilizando técnicas de separação cromatográfica (adsorção e partição). Foi possível elucidar 3 estruturas dos metabólitos isolados baseando-se em dados obtidos nas análises de CLAE e CCDC. Os compostos identificados foram o 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, Piperovatina e tetra-hidroPiperlonguminina. Além disso, foi determinado o ponto de fusão para duas substâncias sólidas resultantes do fracionamento em Coluna Cromatográfica (CC) sendo obtido um intervalo de fusão igual a 77 – 79 °C e 113 – 114 °C. Entretanto, não foi possível encontrar um resultado semelhante ao observado na literatura, dessa forma o material foi encaminhado para análises de RMN de ¹H e ¹³C. Nos ensaios contra náuplios de *Artemia salina* os constituintes isolados apresentaram alta atividade, sendo o 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno o composto mais efetivo com valores CL₅₀ = 7,06, 7,07 e 7,62 µg mL⁻¹. Atividades larvicidas contra o terceiro instar do *Aedes aegypty* foram constatadas para o 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, piperovantina, tetra-hidropiperlonguminina. As piperamidas foram destaques mostrando alta atividade sendo a piperovatina (CL₅₀ = 1,50 µg mL⁻¹) e tetra-hidropiperlonguminina (CL₅₀ = 10,43 µg mL⁻¹).

Palavras-chave: *Piper klotzschianum*, piperamidas, atividades biológicas, CLAE.

ABSTRACT

This work describes the chemical study of the fixed constituents of the leaves of *Piper klotzschianum* Kunth, and the biological evaluation of the isolated constituents against *Artemia salina*. From the organic extract of *Piper klotzschianum* leaves, 5 natural substances were isolated using chromatographic separation techniques (adsorption and partition). It was possible to elucidate 3 structures of the isolated metabolites based on data obtained from HPLC and CCDC analyses. The compounds identified were 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene, Piperovatin and tetrahydroPiperlonguminin. In addition, the melting point was determined for two solid substances resulting from the fractionation in Column Chromatographic (CC) and a melting range equal to 77 – 79 °C and 113 – 114 °C was obtained. However, it was not possible to find a result similar to that observed in the literature, so the material was sent for ¹H and ¹³C NMR analyses. In assays against *Artemia salina* nauplii, the isolated constituents showed high activity, with 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene being the most effective compound with LC₅₀ values = 7.06, 7.07 and 7.62 µg mL⁻¹. Larvicidal activities against the third instar of *Aedes aegypti* were observed for 1-butyl-3,4-methylenedioxybenzene, piperovatin, tetrahydropiperlonguminin. The piperamides were highlighted showing high activity being piperovatin (LC₅₀ = 1.50 µg mL⁻¹) and tetrahydropiperlonguminin (LC₅₀ = 10.43 µg mL⁻¹).

Keywords: *Piper klotzschianum*, piperamides, biological activities, HPLC.

1. INTRODUÇÃO

O tratamento de determinadas doenças utilizando plantas é conhecido como medicina popular, uma prática proveniente dos tempos da antiguidade transmitida de forma não sistemática para as gerações seguintes. Apesar do grande avanço tecnológico no âmbito químico e farmacêuticas nas últimas décadas, essa bagagem de saberes populares ainda tem grande importância na atualidade. Visto que, existem inúmeras pesquisas no ramo de produtos naturais com objetivo de se obterem produtos fitoterápicos que atuem diretamente no tratamento e na prevenção de diversas doenças.

A Organização Mundial de Saúde reconhece a eficácia terapêutica e segurança no tratamento de doenças utilizando plantas medicinais usadas por este largo segmento da população mundial e vem incentivando esta prática como forma adequada para cuidados primários à saúde (MATOS, 1998).

As plantas constituem uma fonte inesgotável de substâncias potencialmente ativas e, portanto, devem ser consideradas como matéria-prima, como ponto de partida para a descoberta de novas moléculas e para o desenvolvimento de novos fitoterápicos (SIMÕES et al., 2001).

Segundo o Relatório Anual de Desmatamento no Brasil (RAD), do MapBiomas, o desmatamento no país aumentou 20% em 2021, ocorrendo a perda de 16.557 km² da cobertura de vegetação nativa em todos os biomas. Por consequência da exploração irracional dos recursos naturais pode ser esgotada essa grande fonte de substâncias ativas, além desses outros constituintes podem ser dizimados, sem ao menos ser elucidado sua estrutura química e potenciais atividades biológicas.

Dentro dessa necessidade constante por novas formas de tratamento e novas substâncias com finalidades terapêuticas oriundas do metabolismo secundário de plantas, o gênero *Piper* se destaca como uma fonte promissora de substâncias com as mais diversas atividades. Como por exemplo, importantes atividades inseticidas (bioinseticidas), tem sido comprovada pelas publicações de diversos artigos sobre o tema. (SU & HORVAT 1981; PARK et al., 2002; YANG et al., 2002; SCOTT et al., 2008; AUTRAN et al., 2009).

Piperaceae é uma das maiores famílias entre as Angiospermas, com cerca de 3000 espécies distribuídas de forma pantropical. Seus representantes são importantes elementos da composição do sub-bosque de florestas tropicais. Historicamente foram descritos cerca de 15 gêneros para a família Piperaceae.

O presente trabalho busca estudar os componentes fixos das folhas de *Piper klotzschianum*, a partir do material vegetal coletado na cidade de Jequié-BA, localizado na região sudoeste da Bahia, território de flora que é uma riqueza invejável devido a zona limítrofe entre a caatinga e a zona da mata. Existem poucos estudos químicos e biológicos desta

espécie de *Piper*, dessa forma o estudo pode contribuir com a pesquisa na busca de novas substâncias naturais com atividade larvicidas, as quais poderão servir como modelo experimental para o desenvolvimento de novas drogas

2. MATERIAIS E MÉTODOS

- 1) Os solventes utilizados no preparo dos extratos, na solubilização das amostras, nas eluições em Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) e Cromatografia em Coluna (CC) foram: hexano (Hex.), acetato de etila (AcOEt), diclorometano (DCM) e metanol (MeOH) ((grau analítico procedência: Synth).
- 2) Os solventes utilizados para preparação de amostras e injeção na Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram: ACN (grau HPLC 99,9%, procedência Sigma-Aldrich) e H₂O (ultrapura).
- 3) Nos processos de fracionamento por CC o adsorvente utilizado como fase estacionária foi sílica-gel 60 (0,063-0,200 mm) da Sigma-Aldrich.
- 4) Para análise em cromatográfica em camada delgada (CCD), utilizando placas de vidro com 1 mm de sílica-gel com indicador de fluorescência UV254 da Fluka.
- 5) A revelação placas de CCD foi através de métodos como exposição das placas à radiação, empregando-se, em gabinete apropriado, lâmpada ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm (Boitton – BOIT-GAB01) e vapores de iodo.
- 6) Rotaevaporador empregado para evaporação de solventes sob pressão reduzida foi da marca Fisatom modelo 801, com temperatura em geral entre 30 e 120 °C, equipado com uma bomba a vácuo da Tecnal modelo TE-058.
- 7) As identificações das *Piper*amidas foram feitas em CLAE da Shimadzu equipado com um controlador de sistema CBM-20A, duas unidades de bombeamento de solventes (LC-6AD), um degaseificador DGU-20^a5R, uma coluna analítica fase normal ZORBAX SIL com dimensões de 5 µm e 4,6 x 250 mm, um detector UV SPD-20A, um injetor com loop de 20 µL e o Software Lab Solution versão 1.25 SP4 para aquisição e processamento dos dados.

2.1. Coleta do Material Vegetal e identificação das espécies

A espécie do gênero *Piper* foi coletada em Jequié (Figura 1), no dia 13 de outubro de 2017 estação da primavera no período da manhã na região do cajueiro próximo a BR 330. O local de coleta é uma área de transição entre a mata atlântica e caatinga que fica aproximadamente 15 km do centro da cidade (coordenadas: 13° 55' 53.688" S / 39° 40' 43.680" W). Suas exsicatas foram identificadas pela Profa. Dra. Elzie Flanklim Guimarães como sendo: HUESB8456.



Figura 1. Folhas e caule da espécie *Piper klotzschianum* Kunth (A) e Raízes da espécie *Piper klotzschianum* Kunth (B).

2.2. Preparo dos extratos

As folhas de *Piper klotzschianum* foram lavadas e secas em estufa com circulação de ar a 40 °C durante 48 horas. Após a secagem o material foi triturado com auxílio de um liquidificador industrial, em seguida 100 g das folhas trituradas foi submetido a extração a quente com hexano (Soxhlet), permanecendo em refluxo no Soxhlet durante 3 horas utilizando 500 mL de hexano. Após o processo de extração, o solvente usado foi removido no evaporador rotatório sob pressão reduzida, resultando em 3,8299 g do extrato bruto. O extrato produzido foi denominado Extrato hexânico das folhas de *Piper klotzschianum* (EHFPK1).

2.3. Análise do Extratos de Piper

Foi separado 1,366 g do extrato hexânico de Piper preparado anteriormente para o estudo. Cerca de 0,5 g do EHFPK1 foi destinado para análises em Cromatográfica em Camada Delgada Comparativa (CCDC) com um padrão contendo uma mistura de amidas denominado (DJD31-3). Devido à similaridade com o padrão há a suspeita da presença de *Piper*amidas devido a semelhança com um padrão contendo uma mistura de amidas.

2.4. Fracionamento do extrato - EHFPK1

O extrato EHFPK1 (1,366 g), foi incorporado em sílica-gel 60 e submetido a cromatografia em coluna. Como fase móvel usou-se uma mistura de hexano (Hex) e acetato de etila (AcOET), com aumento de polaridade (gradiente), iniciado com 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1 e 0:1 (Hex:AcOET). Foi coletado 90 frações, que foram analisadas por CCD comparativa resultando em 8 frações denominada EHFPK1-1 a EHFPK1-8.

2.5. Fracionamento das frações EHFPK1-1 a EHFPK1-8

Posteriormente foi realizado procedimentos de Cromatográfica em Coluna (CC) em todas as frações obtidas no fracionamento do EHFPK1, com intuito de elucidar a estrutura química das *Piperamidas* presentes no material em estudo. A Tabela 1, plotada a seguir resume de forma geral o procedimento realizado em cada em cada fração.

Tabela 1. Resumo dos procedimentos realizados nos extratos de *Piper*.

Código	Massa do Extrato (mg)	Coluna Cromatográfica
EHFPK1-1	37	Não fracionado
EHFPK1-2	97	7
EHFPK1-3	141	2
EHFPK1-4	41	Não fracionado
EHFPK1-5	36	4
EHFPK1-6	74	3
EHFPK1-7	79	3
EHFPK1-8	7	4

2.6. Identificação de Piperamidas nos extratos de Piper usando CLAE/UV

Usando como base o padrão (DJD31-3) para elaboração de um método analítico usando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE/UV), com intuito de comparar os resultados obtidos para o DJD31-3 com os extratos da *Piper* para a identificação das *Piperamidas* Piperovatina e tetra-hidropiperloguminina. Após alguns testes com variações de polaridade do solvente (ACN:H₂O) foi possível obter um método que caracterizasse de forma qualitativa duas *Piperamidas*.

2.7. Condições analíticas

- Fase móvel: ACN/H₂O (50:50)
- Temperatura: 25 °C
- Fluxo: 0,65 mL / minuto
- Tempo de análise: 60 minutos
- Massa da amostra: 1 mg
- Volume de injeção: 20 µL
- Comprimento de onda: 260 nm
- Coluna: 250 x 4,6 mm, 5 µm, fase normal – Sílica
- Diluyente: ACN e H₂O (50:50)

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Através da técnica de CCD comparativa notou-se que no extrato EHFPK1-3 havia a suspeita da presença de *Piperamidas* devido a semelhança com um padrão contendo uma mistura de amidas, como mostra a Figura 2, a seguir:



Figura 2. Comparação entre o Padrão (P) e o EHFPK1-3 (3).

Foi separado 1 mg do EHFPK1-3, posteriormente foi diluída em 2 mL de uma mistura de ACN:H₂O (60:40), onde 20 µL foi injetado no método analítico usando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE/UV) para a identificação das *Piperamidas*. A partir do resultado obtido verificou-se uma mistura de amidas sendo possível a identificação da Piperovatina (Figura 4) e tetra-hidroPiperlonguminina (Figura 5) como mostra o cromatograma na Figura 3, necessitando de fracionamento em CC para separação dos constituintes do extrato.

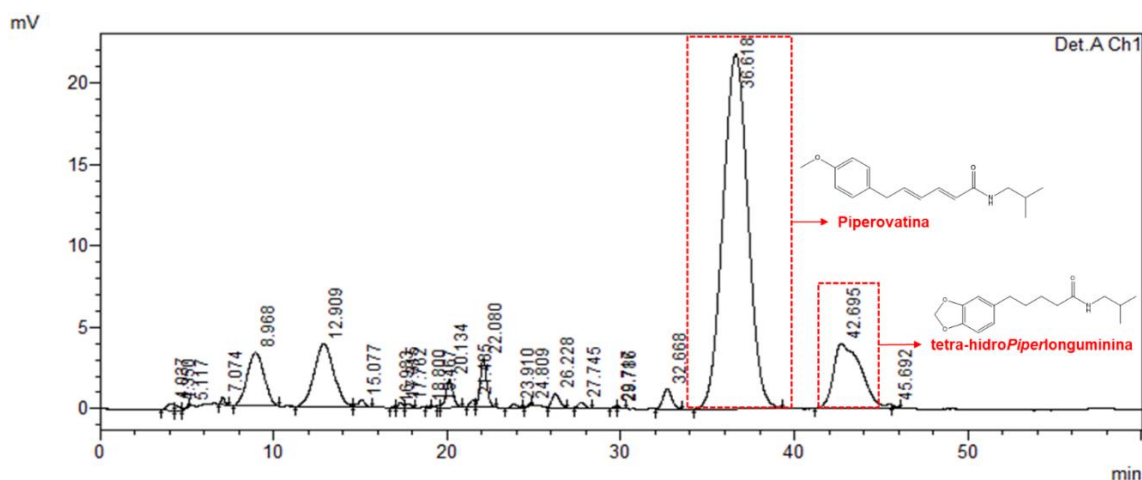


Figura 3. Cromatograma do Extrato das folhas de Piper (EHFPK1-3).

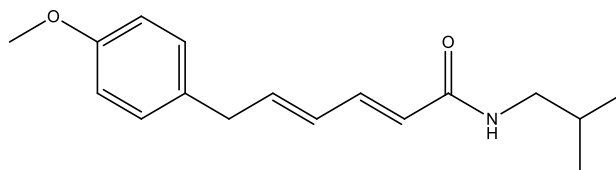


Figura 4. Estrutura molecular da *Piperamida Piperovatina*.

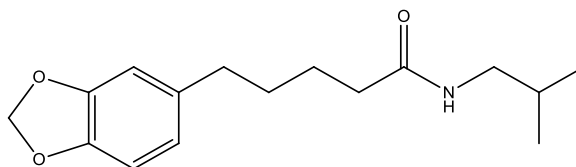


Figura 5. Estrutura molecular da *Piperamida tetra-hidroPiperlonguminina*.

O EHFPK1-3 (141 mg) foi incorporado em sílica-gel 60 e submetido a Cromatografia em Coluna (CC) denominada coluna de número 2, com objetivo de purificar as *Piperamidas* identificadas anteriormente. Como fase móvel usou-se uma mistura de hexano (Hex), acetato de etila (AcOET) e diclorometano (DCM), na proporção de 2: ½:½ (Hex:AcOET:DCM). Foi coletado 21 frações, que foram analisadas por CCD comparativa resultando em 8 frações (EHFPK2-1 a EHFPK2-8). As frações grupadas foram analisadas por CCDC com o padrão, notou-se que a EHFPK2-3 um comportamento semelhante ao padrão usado.

Com base no resultado obtido por CCDC, foi separado 1 mg do EHFPK2-3, posteriormente foi diluída em 2 mL de uma mistura de ACN:H₂O (50:50), onde 20 µL foi injetado no método analítico usando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta (CLAE/UV) para a identificação das *Piperamidas*. Verificou-se a presença das *Piperamidas* Piperovatina e tetra-hidroPiperlonguminina, resultado esperado devido ao cromatograma obtido do EHFPK1-3. Entretanto, observou-se uma melhor purificação da amostra analisada como pode ser visto no Cromatografia Líquida de Alta eficiência com Detector Ultravioleta, a seguir:

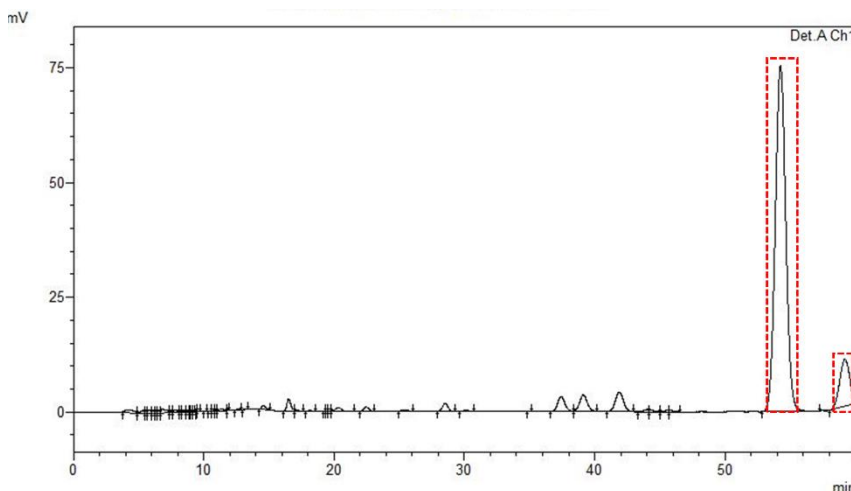


Figura 6. Cromatograma do Extrato das folhas de Piper (EHFPK2-3).

Com base os resultados obtidos na literatura (OLIVEIRA, 2019), realizou a identificação das *piperamidas* Piperovatina e tetra-hidro*Piperlonguminina* no extrato utilizando a técnica CLAE. O cromatograma (Figura 7) obtido apresentou uma similaridade ao EHFPK2-3 podendo ser identificada de forma qualitativa a presença das *piperamidas* Piperovatina e tetra-hidro*Piperlonguminina* no EHFPK2-3.

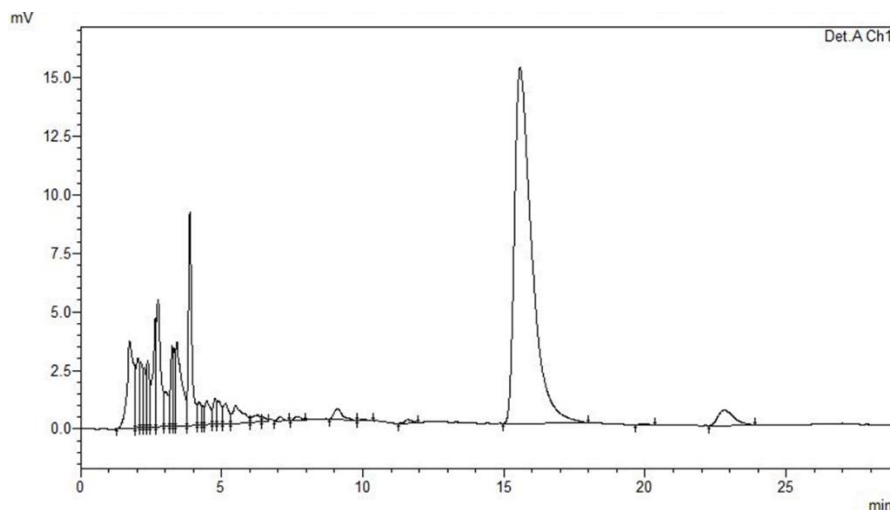


Figura 7. Cromatograma padrão das *Piperamidas* Piperovatina e tetra-hidro*Piperlonguminina*. Fonte: (OLIVEIRA, 2019).

O fracionamento em Coluna Cromatográfica número 4 (EHFPK1-5 e EHFPK1-8) deu origem a um sólido esbranquiçado. Foram coletados um total de 30 frações; sendo agrupadas por CCD comparativa em 5 frações, denominadas EHFPK4-1 a EHFPK4-5. No sólido do EHFPK4-1 foi determinado o ponto de fusão que foi de 77 – 79 °C, com objetivo comparação com dados da literatura, entretanto não foi possível encontrar um resultado semelhante ao observado. A partir disso o EHFPK4-1 que tem aproximadamente 10 mg foi encaminhado ao Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Química da UFBA-BA para análises de RMN de ^1H e ^{13}C .

A CC número 5 que tem origem da fração 8 obtida no fracionamento da coluna 3, teve como resultado um sólido com um tom pouco amarelado. Assim como o sólido obtido na Coluna Cromatográfica número 4, foi determinado o ponto de fusão que foi de 113 – 114 °C, com objetivo comparação com dados da literatura, mas não foi possível encontrar um resultado semelhante ao observado, o material foi encaminhado para análises de RMN de ^1H e ^{13}C .

No EHFPK1-2 notou-se um aroma agradável, que ao ser fracionado na coluna 7 obteve-se um óleo incolor semelhante ao descrito na literatura (NASCIMENTO, 2011). Ao ser analisado em foi por CCDC com um padrão autêntico identificado no EHFPK1-2 como sendo o 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno (Figura 7).

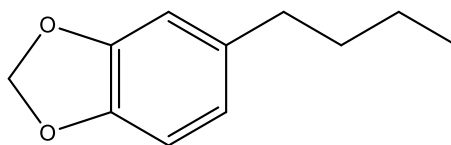


Figura 7. Estrutura química do 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno.

Os testes biológicos realizados por NASCIMENTO, contra náuplios de *Artemia salina* os constituintes isolados apresentaram alta atividade, sendo o 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno o composto mais efetivo com valores $CL_{50} = 7,06, 7,07$ e $7,62 \mu\text{g mL}^{-1}$. Atividades larvicidas contra o terceiro instar do *Aedes aegypti* foram constatadas para o 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, piperovantina, tetra-hidropiperlonguminina. As piperamidas foram destaques mostrando alta atividade sendo a piperovantina ($CL_{50} = 1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e tetra-hidropiperlonguminina ($CL_{50} = 10,43 \mu\text{g mL}^{-1}$).

4. CONCLUSÕES

O presente trabalho contribuiu de forma satisfatória para uma investigação a respeito dos constituintes fixos isolados das folhas de *Piper klotzschianum* Kunth. A espécie do gênero *Piper* foi coletada em Jequié na região do Cajueiro próximo a BR 330. Dessa forma foi possível fazer um paralelo com trabalhos onde o material vegetal foi coletado em regiões diferentes.

A partir dos resultados obtidos neste trabalho verifica-se o isolamento de metabólitos secundários com características diferentes, o que confirma a grande diversidade estrutural encontrada na espécie *Piper klotzschianum*. O estudo do extrato hexânico das folhas de *P. klotzschianum* foram isoladas substâncias naturais utilizando métodos fitoquímicos clássicos, são elas o 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, piperovantina, tetra-hidropiperlonguminina. Sobretudo, todos os constituintes que a estrutura molecular foi elucidada tem atividade biológica comprovada na literatura dessa forma não foi necessário realizar os ensaios, visto que o processo envolve gastos desnecessário já que as estruturas identificadas são semelhantes às do ensaio realizado por NASCIMENTO, 2011. Nos ensaios contra náuplios de *A. salina* todas as amostras apresentaram altamente ativas, tendo o 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno apresentado ótimos valores de Concentração Letal (CL_{50}) do extrato hexânico de folhas. Atividades larvicidas contra o terceiro instar do *Aedes aegypti* foram constatadas para o 1-butil-3,4-metilenodioxibenzeno, piperovantina, tetra-hidropiperlonguminina. As piperamidas foram destaques mostrando alta atividade sendo a Piperovantina ($CL_{50} = 1,50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e tetra-hidropiperlonguminina ($CL_{50} = 10,43 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Além disso, foi possível obter a partir do fracionamento em Coluna Cromatográfica número 4 e 5 um sólido, o qual foi terminado o ponto de fusão tendo um intervalo de fusão de $77 - 79 \text{ }^\circ\text{C}$ e $113 - 114 \text{ }^\circ\text{C}$ respectivamente, que não há registros semelhantes na literatura.

Entretanto, não foi elucidado a estrutura molecular precisando das análises de RMN de ^1H e ^{13}C que serão terminadas no ao Laboratório de Pesquisa e Desenvolvimento em Química da UFBA-BA.

Em suma, o trabalho realizado teve êxito na investigação dos constituintes presentes nas folhas da espécie *Piper klotzschianum*. A partir dos resultados podem ser explorados posteriormente com objetivo de maiores contribuições na descoberta de novas substâncias bioativas, na produção de bioinseticidas, fármacos e que venham a explorar as potenciais atividades citotóxicas e toxicológicas da espécie estudada.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1) NASCIMENTO J. C.; **Estudo Químico E Avaliação Biológica De Piper klotzschianum Kunth (Piperaceae) E Croton grewoides Baill (Euphorbiaceae)**, Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2011.
- 2) OLIVEIRA H. J.; **Identificação E Quantificação De Piperamidas E Constituintes Voláteis Em Espécies Do Gênero Piper**, Tese (Mestrado na de Área de concentração: Química Analítica) – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Jequié, 2019.
- 3) MATOS, F. J. A. **“Farmácias vivas”**, 3ª ed. Fortaleza: UFC, 1998. 219p.
- 4) SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. & PETROVICK, P. R. (eds). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ª ed. Porto alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 2001. 467p.