

Diss. ETH No. 10116

**PHYTOCHEMICAL AND BIOLOGICAL
INVESTIGATION OF *PIPER ADUNCUM*,
A TRADITIONAL REMEDY FROM
PAPUA NEW GUINEA**

A dissertation submitted to the

SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZURICH

for the degree of
Doctor of Natural Sciences

Presented by

JIMMY E. ORJALA

Dipl. Pharm. ETH
born February 17, 1961
Stockholm, Sweden

accepted on recommendation of

Prof. Dr. O. Sticher, examiner
Prof. Dr. G. Folkers, co-examiner
Dr. C. Erdelmeier, co-examiner

Zürich 1993

SUMMARY

The leaves of *Piper aduncum*, a slender tree, are used in the folk medicine of the Finnschhafen area of Papua New Guinea as an anti-septic on fresh cuts. The fresh leaves are crushed and applied to the wound.

In this study a biological screening of the crude light petrol and dichloro-methane (DCM) extracts of the leaves of *P. aduncum*, direct bioautographic assays indicated anti-bacterial and anti-fungal activities. Test organisms were the bacteria *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* and the fungus *Penicillium oxalicum*. The extracts also indicated a molluscicidal potential towards *Biomphalaria glabrata*. The DCM extract was also found to be cytotoxic towards KB nasopharyngeal carcinoma cells.

A combination of chromatographic methods (VLC, MPLC, HPLC) and an efficient optimization model (the "PRISMA" system) were used to obtain pure isolates. The bio-guided fractionation of the extracts resulted in the isolation of 43 natural products, of which 17 were new to the literature:

- 3-(3,7-dimethyl-2,6-octadienyl)-4-methoxy-benzoic acid methyl ester
- 4-hydroxy-3,5-bis(3-methyl-2-butenyl) benzoic acid-1-(1-methylethyl)-4-methyl-3-cyclohexenyl ester
- 3,5-bis(3-methyl-2-butenyl)-4-methoxy-benzoic acid-1-(1-methylethyl)-4-methyl-3-cyclohexenyl ester
- 3,5-bis(3-methyl-2-butenyl)-4-methoxy-benzoic acid methyl ester
- 4-hydroxy-3-(3-methyl-2-butene-1-oxoyl)-5-(3-methyl-2-butenyl) benzoic acid
- methyl 8-methoxy-2,2-dimethyl-2*H*-chromene-6-carboxylate
- 2,2-dimethyl-8-(3-methyl-2-butenyl)-2*H*-chromene-6-carboxylic acid
- 3-(6-hydroxy-3,7-dimethyl-2,7-octadienyl)-4-methoxy-benzoic acid methyl ester
- Adunctin A
- Adunctin B
- Adunctin C
- Adunctin D
- Adunctin E
- Piperaduncin A
- Piperaduncin B
- Piperaduncin C
- Aduncamide

Further, this study is the first report of 4-hydroxy-3,5-bis(3-methyl-2-butenyl)-benzoic acid (nervogenic acid), 4-hydroxy-3,5-bis(3-methyl-2-butenyl)-benzoic

acid methyl ester, and 4-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-benzoic acid methyl ester as natural products and the first report of (6*S*)-2-*trans*-6-hydroxy-2,6-dimethyl-2,7-octadienoate, methylindaretin, asebogenin, sakuranetin, anodendroic acid methyl ester, and caryophyllenol-II from the genus *Piper*.

The structures of all isolates were elucidated by spectroscopic methods, in particular 1D- and 2D-NMR spectroscopy. The regio- and/or relative stereochemistry was mostly resolved from the results of 2D NOESY experiments. The experimentally derived NOE conformation of piperaduncin B was translated into a 3D structure utilising the energy minimum obtained by molecular modelling. The relative stereochemistry of adunctin B and C were solved by single crystal x-ray analysis.

The biological potentials of the pure isolates were also investigated using the above described biological screening assays. In the bioautographic assays, a significant activity (<0.5 µg) was found against *B. subtilis* and/or *M. luteus* for 8 isolates; 4-hydroxy-3-(3-methyl-2-butene-1-oxoyl)-5-(3-methyl-2-butenyl)-benzoic acid, 3,5-bis(3-methyl-2-butenyl)-4-methoxy-benzoic acid, nervogenic acid, 2', 6'-dihydroxy-4'-methoxydihydrochalcone, asebogenin, sakuranetin, piperaduncin B, and aduncamide.

A molluscicidal potential (<10 ppm) was found for three isolates; dillapiol, 3,5-bis(3-methyl-2-butenyl)-4-methoxy-benzoic acid, and 3,5-bis(3-methyl-2-butenyl)-4-methoxy-benzoic acid methyl ester.

Only piperaduncin A exhibited a cytotoxic activity (<4µg/ml) towards KB nasopharyngeal carcinoma cells.

The anti-microbial activity of the metabolites reported here suggest that the topical application of *P. aduncum* leaves will have a beneficial effect on infected wounds and thus support the traditional use of *P. aduncum* leaves in Papua New Guinea.

ZUSAMMENFASSUNG

Die Blätter von *Piper aduncum*, ein schlanker Baum, werden in der Volksmedizin der Finnschhafengegend von Papua Neu Guinea auf Schnittwunden als ein Antiseptikum verwendet. Die frischen Blätter werden dabei zerquetscht und auf die Wunde gelegt.

In vorliegender Untersuchung zeigten die Petrolether - und Dichlormethan (DCM) - Rohextrakte aus den Blättern von *P. aduncum* im bioautographischen Testsystem antibakterielle und antifungale Aktivitäten (als Testorganismen wurden die Bakterien *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Escherichia coli* und der Pilz *Penicillium oxalicum* verwendet). Die Extrakte zeigten auch einen mol-lus-ziziden Effekt (Testorganismus: *Biomphalaria glabrata*). Für den DCM-Extrakt wurde zusätzlich eine Zytotoxizität gegenüber den KB-Krebszellen gefunden.

Verschiedene chromatographische Methoden (VLC, MPLC, HPLC) und das "Prisma"-System als Optimierungsmodell wurden verwendet, um die reinen Naturstoffe zu erhalten. Die Fraktionierung der Extrakte nach biologischer Aktivität führte zur Isolierung von 43 Naturstoffen, von denen 17 hier zum ersten Mal beschrieben werden:

- 3-(3,7-Dimethyl-2,6-octadienyl)-4-methoxy-benzoessäuremethylester
- 4-Hydroxy-3,5-bis(3-methyl-2-butenyl) benzoessäure-1-(1-methylethyl)-4-methyl-3-cyclohexenylester
- 3,5-bis(3-Methyl-2-butenyl)-4-methoxy-benzoessäure-1-(1-methylethyl)-4-methyl-3-cyclohexenylester
- 3,5-bis(3-Methyl-2-butenyl)-4-methoxy-benzoessäuremethylester
- 4-Hydroxy-3-(3-methyl-2-buten-1-oxoyl)-5-(3-methyl-2-butenyl) benzoessäure
- Methyl-8-methoxy-2,2-dimethyl-2*H*-chromene-6-carboxylat
- 2,2-Dimethyl-8-(3-methyl-2-butenyl)-2*H*-chromene-6-carbonsäure
- 3-(6-Hydroxy-3,7-dimethyl-2,7-octadienyl)-4-methoxy-benzoessäuremethylester
- Adunctin A
- Adunctin B
- Adunctin C
- Adunctin D
- Adunctin E
- Piperaduncin A
- Piperaduncin B
- Piperaduncin C

– Aduncamid

Weiterhin wurden in dieser Arbeit zum ersten Mal 4-Hydroxy-3,5-bis(3-methyl-2-butenyl)-benzoesäure (Nervogenic acid), 4-Hydroxy-3,5-bis(3-methyl-2-butenyl)-benzoesäuremethylester, und 4-Hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-benzoesäuremethylester als Naturstoffe und (6*S*)-2-*trans*-6-Hydroxy-2,6-dimethyl-2,7-octadienoat, Methyllindaretin, Asebogenin, Sakuranetin, Anodendronsäuremethylester, und Caryophyllenol-II aus der Gattung *Piper* beschrieben.

Die Strukturen aller isolierten Substanzen wurden mittels spektroskopischer Methoden, insbesondere 1D- und 2D-NMR-Spektroskopie aufgeklärt. Die Regio- und/oder relative Stereochemie wurde hauptsächlich durch die Ergebnisse von 2D NOESY Experimenten gelöst. Die experimentell abgeleitete NOE-Konformation von Piperaduncin B stand in Übereinstimmung zu der 3D Struktur, die unter Verwendung des Energieminimums mittels "Molecular-modelling" erhalten wurde. Die relative Stereochemie von Adunctin B und C wurde durch eine Röntgenstrukturanalyse ermittelt.

Auch die biologische Aktivität der Reinsubstanzen wurde unter Verwendung der beschriebenen biologischen Screeningversuche untersucht. In den bioautographischen Tests wurde eine signifikante Aktivität (<0,5µg) gegen *B. subtilis* und/oder *M. luteus* bei 8 Substanzen beobachtet: 4-Hydroxy-3-(3-methyl-2-buten-1-oxoyl)-5-(3-methyl-2-butenyl) benzoesäure, 3,5-bis(3-Methyl-2-butenyl)-4-methoxy-benzoesäure, 4-Hydroxy-3,5-bis(3-methyl-2-butenyl)-benzoesäure, 2',6'-Dihydroxy-4'-methoxydihydrochalkon, Asebogenin, Sakuranetin, Piperaduncin B und Aduncamid.

Bei drei Substanzen wurde eine mollusizide Wirkung gefunden: Dillapiol, 3,5-bis(3-Methyl-2-butenyl)-4-methoxy-benzoesäure, and 3,5-bis(3-Methyl-2-butenyl)-4-methoxy-benzoesäuremethylester.

Nur Piperaduncin A zeigte eine zytotoxische Aktivität (<4µg/ml) gegen KB Krebszellen.

Die hier gefundenen antimikrobielle Aktivität der Metaboliten legt nahe, dass die topische Anwendung von *P. aduncum* Blättern einen nützlichen Effekt auf infizierte Wunden hat und untermauert somit die traditionelle Verwendung dieser Pflanze in Papua Neu Guinea.