

Short Communication

Actividad antiangiogénica de los extractos diclorometánicos de hojas y ramas de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae)

[Antiangiogenic activity of leaves and branches dichloromethane extracts of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae)]

Amanda B. Carvalho, Daiane M. Ramos, Nádia C. Falcão-Bücker, Cecilia V. Nunez*

Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia, Coordenação de Tecnologia e Inovação,
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, Brasil*Correspondence to: cecilia@inpa.gov.br

Abstract: Various mechanisms are involved in the formation and growth of tumors, among which is the formation of new blood vessels, angiogenesis. The present work investigated the antiangiogenesis activity of dichloromethane extracts from the leaves and branches of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). Which is an arboreal and fruit species from the Amazon Rainforest and for which triterpenes and indole alkaloids have already been isolated. The antiangiogenic capacity of the extracts was evaluated using the Chorioallantoic Membrane Assay method in chicken eggs. The results show that the extracts inhibited the formation of new vessels in a range of 80 to 50% in the doses of 1000, 500 and 100 µg/mL. These results indicate the great antiangiogenic potential of this species.

Keywords: Bioprospection; Natural products; Phytochemistry; Triterpenes; Antiangiogenesis.

Resumen: Diversos mecanismos están involucrados en la formación y crecimiento de tumores, entre los cuales está la formación de nuevos vasos sanguíneos, la angiogénesis. El presente trabajo investigó la actividad antiangiogénica de los extractos diclorometánicos de las hojas y ramas de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). La cual es una especie arbórea y frutal de la Selva Amazónica y para la cual ya fueron aislados triterpenos y alcaloides indólicos. La capacidad antiangiogénica de los extractos fue avaliada mediante el método del Ensayo sobre la Membrana Corioalantoica en huevos de gallina. Los resultados muestran que los extractos inhibieron la formación de nuevos vasos en un rango de 80 a 50% en las dosis de 1000, 500 y 100 µg/mL. Estos resultados indican el gran potencial antiangiogénico de esta especie.

Palabras clave: Bioprospección; Productos naturales; Fitoquímica; Triterpenos; Antiangiogénesis.

Received: December 31, 2021

Accepted: January 26, 2022

This article must be cited as: Carvalho AB, Ramos DM, Falcão-Bücker NC, Nunez CV. 2021. Actividad antiangiogénica de los extractos diclorometánicos de hojas y ramas de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). *Med Plant Commun* 4 (3-4): 82 – 86..

INTRODUCCIÓN

Amazonia es el mayor bosque tropical del mundo y concentra alrededor del 20% de la biodiversidad mundial. Se estima que existen en él más de 14.000 especies de plantas con semillas (fanerógamas) (Cardoso et al., 2017), lo que sugiere que también existe una gran diversidad de metabolitos secundarios: sustancias producidas por las plantas como recurso adaptativo para ambiente en el que viven, desarrollando funciones importantes para la regulación, equilibrio y defensa del organismo y que pueden tener importantes actividades biológicas, sirviendo como materia prima para productos farmacéuticos (Taiz y Zeiger, 2006; Barreiro y Bolzani, 2009).

La familia Rubiaceae es la segunda familia más abundante de la selva amazónica (Cardoso et al., 2017) y es productora de una gran diversidad de metabolitos secundarios como iridoides, triterpenos y alcaloides indólicos (Martins y Nunez, 2015). Estudios realizados por nuestro grupo de investigación con la especie *Duroia macrophylla* Huber, un árbol frutal conocido popularmente como “apurú” o “purú-grande-da-mata”, demostraron que es productora de metabolitos secundarios activos sobre diferentes actividades biológicas, tales como antibacteriana, anti micobacteriana y antifúngica (Carrion et al., 2013, Martins et al., 2013; Martins et al., 2014; Reis et al., 2016). Además, de ella fueron aislados alcaloides indólicos derivados de la ajmalicina de sus hojas y ramas (Martins, 2014).

Los metabolitos secundarios, como los terpenos, también pueden tener actividades anticancerígenas, ya sea en la toxicidad de las líneas celulares tumorales o en la inhibición del crecimiento tumoral (Lima Filho et al., 2020). La angiogénesis es la generación de nuevos vasos sanguíneos, necesarios para este crecimiento y expansión de tumores cancerosos, cuando estos nuevos vasos se inhiben, la acción se denomina antiangiogénica (Su et al., 2005). Para evaluar esta acción se puede utilizar un método alternativo al uso de animales denominado HET-CAM (Test de la Membrana Corioalantoica de Huevos de Gallina), observando la inhibición de los vasos embrionarios cuando son interceptados por la muestra insertada en la membrana corioalantoica (Nguyen et al., 1994).

Observando la creciente búsqueda de alternativas para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer combinada con la variedad de metabolitos activos aislados de plantas amazónicas, este estudio propone evaluar la actividad antiangiogénica de extractos diclorometánicos de hojas y ramas de *Duroia macrophylla*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El material vegetal fue recolectado en Reserva Adolfo Ducke en 5 de diciembre de 2008, luego de la recolección, se secó y molió en molino de cuchillos, y se sometió a extracción utilizando el solvente diclorometano en baño de ultrasonidos por 20 min. Después de este tiempo, el material vegetal fue filtrado y una nueva extracción con diclorometano fue realizada, con el mismo procedimiento, totalizando 3 extracciones. El extracto diclorometánico fue concentrado en evaporador rotativo.

Para el análisis fitoquímico preliminar, los extractos se analizaron en Cromatografía de Capa Fina para detectar las clases de sustancias químicas presentes en cada extracto según reveladores físicos (luz UV 254 y 365 nm) y químicos: reagente de Dragendorff (para alcaloides), sulfato cérico (oxidante general y para terpenos), anisaldeído (también oxidante general y para terpenos).

Para el ensayo de antiangiogénesis se utilizó el modelo de membrana corioalantoica, método propuesto por Nguyen y colaboradores (1994). En el cual son usados embriones de huevo de gallina (*Gallus domesticus*), por triplicado. Los huevos son primeramente incubados durante 48 horas a 37,5°C y entonces una pequeña cantidad de clara de huevo es retirada y los huevos son incubados nuevamente por 72 h, luego se insertaron discos de metilcelulosa, conteniendo los extractos diclorometánicos de hojas y ramas de *D. macrophylla* en las concentraciones de 100, 500 y 1000 µg/mL (disueltos en etanol), junto con el grupo de control negativo donde los discos de metilcelulosa se insertaron solo con etanol y sin muestra. Los huevos entonces fueron incubados por 48 h y después cada huevo fue fotografiado con una cámara de aumento de 20x, para contar los vasos sanguíneos interceptados y obtener el porcentaje de vasos inhibidos por el extracto. Los resultados se expresaron como Media ± Desviación Estándar, n = 3, mostrando una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$) con relación al grupo de control negativo (CN).

RESULTADOS

En la evaluación fitoquímica preliminar se observó la presencia de sustancias terpénicas en los dos extractos, al revelar las placas cromatográficas con sulfato cérico y anisaldeído sulfúrico. El extracto diclorometánico de las ramas cuando se

reveló con DPPH adquirió un color amarillo, lo que sugiere la presencia de sustancias antioxidantes.

El extracto diclorometánico de hojas de *D. macrophylla* fue sometido a fraccionamiento por la Dra. Daiane Martins Ramos y las fracciones obtenidas fueron purificadas por HPLC e identificadas por RMN de ¹H (400 MHz) y ¹³C (100 MHz) mono y bidimensionales, identificando los triterpenos: ácido oleanólico y ácido ursólico (Martins et al., 2013).

La evaluación de los extractos sobre el modelo de membrana coirioalantoica de huevos de gallina mostró una actividad inhibidora del 80%, 70% y 50% en las dosis de 1000, 500 y 100 µg/mL, respectivamente, para el extracto diclorometánico de las hojas (Figura N° 1), y mostró una actividad inhibidora de 70%, 60% y 50% en las dosis de 1000, 500 y 100 µg/mL, respectivamente, para el extracto diclorometánico de las ramas (Figura N° 2).

Figura N° 1
Actividad antiangiogénica del extracto diclorometánico de las hojas

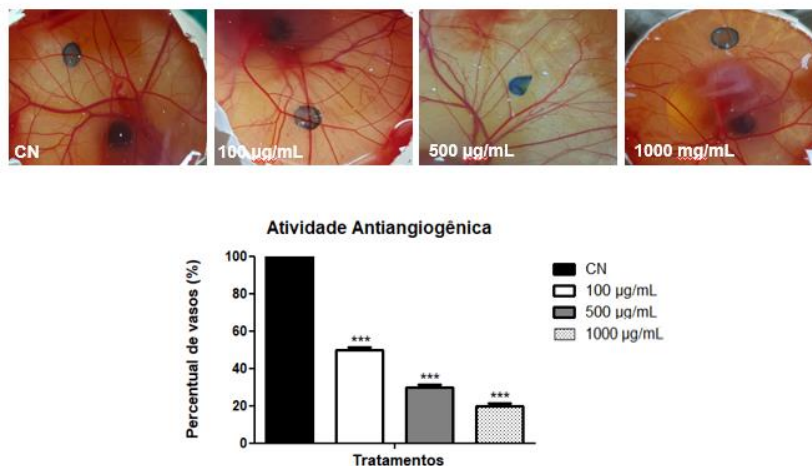
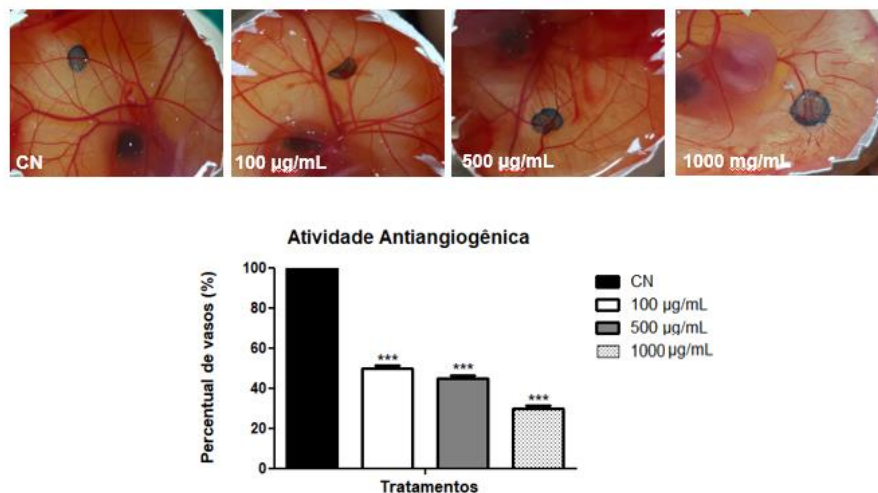


Figura N° 2
Actividad antiangiogénica del extracto diclorometánico de las ramas



Las actividades antiangiogénicas de ambos extractos mostraron un carácter dependiente de la dosis: aumentando la inhibición con un aumento de la dosis de la muestra administrada. Ambos extractos también mostraron actividad antiangiogénica similar en la dosis de 100 µg/mL, sin embargo, el desempeño del extracto diclorometánico de las hojas fue superior en la dosis de 1000 µg/mL, demostrando que la concentración de sustancias capaces de inhibir la formación de nuevos vasos sanguíneos es más grande en este extracto.

DISCUSIÓN

Ambos extractos mostraron considerable actividad antiangiogénica, pero el extracto de diclorometano de hojas mostró mayor efectividad en la dosis más alta, del que fueron aislados los triterpenos: ácido ursólico y ácido oleanólico. Estas sustancias ya fueron relatadas en la literatura con actividad antitumoral (Dalla Vecchia et al., 2009).

El ácido ursólico, que se encuentra en el extracto diclorometánico de las hojas de *D. macrophylla*, es un triterpeno pentacíclico, con fórmula molecular $C_{30}H_{48}O_3$, los estudios indican su capacidad antiproliferativa in vitro para las células de cáncer de mama (Zhang et al., 2020), y su antioxidante y antiinflamatorio. Ya se conoce la actividad en células normales y células cancerosas (Tu et al., 2009; Ye et al., 2010). Sus derivados sintéticos también muestran actividades citotóxicas considerables como lo observaron Nedopekina et al. (2017), en células de adenocarcinoma y neuroblastoma y por Shao et al. (2011), en los derivados probados en cuatro líneas celulares cancerosas, así como la actividad antioxidante observada por Nascimento (2014).

El ácido oleanólico también es un isómero triterpénico pentacíclico del ácido ursólico, a menudo se encuentra en la cera epicuticular (una capa que cubre la superficie exterior de la cutícula de la planta), donde previene la pérdida de agua y protege contra patógenos (Heinzen et al., 1996). Una de las actividades biológicas más conocidas del ácido oleanólico es su actividad hepatoprotectora, utilizada como tratamiento para trastornos hepáticos como la hepatitis viral (Liu, 1995). Khwaza et al. (2018), señalan como principales actividades del ácido oleanólico las acciones antivirales, antiinflamatorias, analgésicas, antibacterianas, antioxidantes y anticancerígenas (Khwaza et al., 2018), siendo esta última también reportada por sus derivados, como se observa en estudios realizados por Laszczyk (2009), informa que el ácido oleanólico marca las células tumorales induciéndolas a la apoptosis y modulando el desarrollo tumoral, justificando así la actividad antiangiogénica del extracto de *D. macrophylla*.

CONCLUSIÓN

En la Amazonía, existe una gran biodiversidad de plantas aún inexploradas que puede tener una potencial actividad bioactiva contra el cáncer, que victimiza a miles de personas en todo el mundo. De esta manera, el bosque se convierte en fuente de materia prima para insumos terapéuticos, lo que también incentiva la apreciación de la flora biodiversa y la innovación científica en la región. Así, la importancia de la bioprospección de las plantas amazónicas, junto con la evaluación de sus actividades biológicas, abre posibilidades para nuevas materias primas para medicamentos, que también pueden actuar para inhibir la formación de vasos que, en consecuencia, dificultan la nutrición de los tumores. Por ello, el presente estudio pone en práctica esta búsqueda de nuevas formas de tratar el cáncer, demostrando que *Duroia macrophylla* también es capaz de producir sustancias que pueden ser una alternativa para inhibir el desarrollo de tumores.

REFERENCIAS

- Barreiro EJ, Bolzani VS. 2009. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quim Nova** 32: 679-688. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300012>
- Cardoso D, Särkinen T, Alexander S, Amorim AM, Bittrich V, Celis M, Daly DC, Fiaschi P, Funk VA, Giacomini LL, Goldenberg R, Heiden G, Iganci J, Kelloff CL, Knapp S, de Lima HC, Machado AFP, dos Santos RM, Mello-Silva R, Michelangeli FA, Mitchell J, Moonlight P, de Moraes PLR, Mori SA, Nunes TS, Pennington TD, Pirani JR, Prance GT, de Queiroz LP, Rapini A, Riina R, Rincon CAV, Roque N, Shimizu G, Sobral M, Stehmann JR, Stevens WD, Taylor CM, Trovó M, van den Berg C, van der Werff H, Viana PL, Zartman CE, Forzza RC. 2017. Amazon plant diversity revealed by a taxonomically verified species list. **Proc Natl Acad Sci USA** 114: 10695-10700. <https://doi.org/10.1073/pnas.1706756114>
- Carrion LL, Ramos DF, Martins D, Osório MIC, Cursino LMC, Mesquita DWO, Nunez CV, Silva PEA. 2013. Antimycobacterial activity of Brazilian amazon plants extracts, **Int J Phytomed** 5: 479-485.
- Dalla Vecchia L, Gnoatto, SCB, Gosmann G. 2009. Derivados oleananos e ursanos e sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Quim Nova** 32: 1245-1252.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000500031>

- Heinzen H, de Vries JX, Moyna P, Remberg G, Martinez R, Tietze LF. 2018. Mass spectrometry of labelled triterpenoids: thermospray and electron impact ionization analysis. **Phytochem Anal** 237-244. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(199609\)7:5<237::AID-PCA310>3.0.CO;2-M](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(199609)7:5<237::AID-PCA310>3.0.CO;2-M)
- Khwaza V, Oyediji OO, Blessing AA. 2018. Antiviral activities of oleanolic acid and its analogues. **Molecules** 23: 2300. <https://doi.org/10.3390/molecules23092300>
- Laszczyk, MN. 2009. Pentacyclic triterpenes of the lupane, oleanane and ursane group as tools in cancer therapy. **Planta med** 75: 1549-1560. <https://doi.org/10.1055/s-0029-11861022>
- Liu J. 1995. Pharmacology of oleanolic acid and ursolic acid. **J Ethnopharmacol** 49: 57-68. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(95\)90032-2](https://doi.org/10.1016/0378-8741(95)90032-2)
- Martins D, Carrion LL, Ramos DF, Salomé KS, Silva PEA, Barison A, Nunez CV. 2013. Triterpenes and the antimycobacterial activity of *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae). **BioMed Res Int** Article ID 605831, 7 pages <https://doi.org/10.1155/2013/605831>
- Martins D. 2014. **Estudo químico e biológico de *Duroia macrophylla* Huber (Rubiaceae)**. Tesis, Universidade Federal do Amazonas, Brasil.
- Martins D, Fachin-Espinar MT, Oliveira TA, Lima KCS, Cavalcanti RM, Teles BR, Nunez CV. 2014. Tamizaje fitoquímico y evaluación de las actividades biológicas de *Duroia macrophylla* (Rubiaceae). **J Pharm Pharmacogn Res** 2: 158-171.
- Martins D, Nunez C. 2015. Secondary metabolites from Rubiaceae species. **Molecules** 20: 13422-13495. <https://doi.org/10.3390/molecules200713422>
- Nascimento PG, Lemos TL, Bizerra A, Arriaga Â, Ferreira DA, Santiago GM, Braz-Filho R, Costa JGM. 2014. Antibacterial and antioxidant activities of ursolic acid and derivatives. **Molecules** 19: 1317-1327. <https://doi.org/10.3390/molecules19011317>
- Nedopekina DA, Gubaidullin RR, Odinokov VN, Maximchik PV, Zhivotovsky B, Bel'skii YP, Khazanov VA, Manuylova AV, Gogvadze V, Spivak AY. 2017. Mitochondria-targeted betulinic and ursolic acid derivatives: synthesis and anticancer activity. **Med Chem Comm** 8: 1934-1945. <https://doi.org/10.1039/C7MD00248C>
- Nguyen M, Shing Y, Folkman J. 1994. Quantitation of angiogenesis and antiangiogenesis in the chick embryo chorioallantoic membrane. **Microvasc Res** 47: 31-40. <https://doi.org/10.1006/mvre.1994.1003>
- Reis AJ, Carrion LL, Rodrigues K, Fenalti JM, Mata-Santos T, Scaini CJ, Martins D, Mesquita DWO, Mesquita ASS, Nunez CV, Silva PEA, Ramos DF. 2016. Avaliação das atividades antifúngica, antimicobacteriana e larvicida de *Duroia macrophylla* e *D. saccifera*. **Rev Epidem Contr Infec** 6. <https://doi.org/10.17058/reci.v1i1.8188>
- Shao JW, Dai YC, Xue JP, Wang JC, Lin FP, Guo, YH. 2011. In vitro and in vivo anticancer activity evaluation of ursolic acid derivatives. **Eur J Med Chem** 46: 2652-2661. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.03.050>
- Su SJ, Yeh TM, Chuang WJ, Ho CL, Chang KL, Cheng HL, Liu HS, Cheng HL, Hsu PY, Chow NH. 2005. The novel targets for anti-angiogenesis of genistein on human cancer cells. **Biochem Pharmacol** 69: 307-318. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2004.09.025>
- Taiz L, Zeiger E. 2006. **Fisiologia vegetal**. Universitat Jaume I, Spain.
- Tu HY, Huang AM, Wei BL, Gan KH, Hour TC, Yang SC, Pu YS, Lin CN. 2009. Ursolic acid derivatives induce cell cycle arrest and apoptosis in NTUB1 cells associated with reactive oxygen species. **Bioorg Med Chem** 17: 7265-7274. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2009.08.046>
- Yeh C, Wu C, Yen G. 2010. Ursolic acid, a naturally occurring triterpenoid, suppresses migration and invasion of human breast cancer cells by modulating c-Jun N-terminal kinase, Akt and mammalian target of rapamycin signaling. **Mol Nutr Food Res** 54: 1285-1295. <https://doi.org/10.1002/mnfr.200900414>
- Zhang X, Li T, Gong ES, Liu RH. 2020. Antiproliferative activity of ursolic acid in MDA-MB-231 human breast cancer cells through Nrf2 pathway regulation. **J Agric Food Chem** 68: 7404-7415. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c03202>