

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE EXTRACTOS DE HOJAS Y TALLOS DE NIGUITO *Monochaetum multiflorum* (BONPL.) NAUD. (MELASTOMATACEAE)

Antitumoral activity evaluation of stem and leaf of extracts niguito *Monochaetum multiflorum* (BONPL.) NAUD

RESUMEN

Las hojas y tallos de la planta Niguito (*Monochaetum multiflorum*) (Bonpl.) Naud., se homogenizaron en acetona acuosa al 70%. El homogenizado fue fraccionado secuencialmente por extracción líquido-líquido con Et_2O , $EtOAc$, *n*-butanol. Para la evaluación de la actividad antitumoral, se utilizaron explantes de discos de zanahoria (*Dacus carota*) y la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*, responsable de tumoración. Los extractos etéreos de tallos y hojas presentaron los porcentajes de inhibición más altos.

PALABRAS CLAVES: *Monochaetum multiflorum*, melastomataceae, actividad antitumoral, *Agrobacterium tumefaciens*.

ABSTRACT

The leaves and stem of Niguito (*Monochaetum multiflorum*) (Bonpl.) Naud., was homogenized in 70% aqueous acetone. The homogenate was fractionated sequentially by liquid-liquid partition to give the corresponding Et_2O , $EtOAc$, *n*-butanol and aqueous extracts. To assess the antitumorlike activity, were used carrot disks (*Dacus carota*) and the bacteria *Agrobacterium tumefaciens* as tumor generator. Et_2O extracts from stem and leaf presented high percentages of antitumoral activity.

KEYWORDS: *Monochaetum multiflorum*, melastomataceae, antitumoral activity, *Agrobacterium tumefaciens*.

LUZ S. RAMÍREZ A.

Ph.D.
Profesor asociado, Grupo Polifenoles
Escuela de Química. Universidad Tecnológica de Pereira.
luramire@utp.edu.co

MARIA L. GONZALES G.

Instituto Oncológico
malugo80@hotmail.com

MARIA D. HENAO H.

Universidad Católica de Manizales.

1. INTRODUCCIÓN

Desde tiempos prehistóricos el hombre ha utilizado plantas con fines medicinales (curativos y preventivos), alimenticios y cosméticos. Actualmente, nuevas especies de plantas promisorias de uso etnofarmacológico son fuentes de información para el descubrimiento de posibles sustancias con importante actividad biológica [1].

Monochaetum multiflorum es un árbol nativo de Colombia, de 4-8 m de altura, pertenece a la sección Tamonea de *Miconia*; el género más grande en la familia que agrupa aproximadamente 1000 especies distribuidas en toda América tropical [2,3,4]. Las plantas melastomataceas han sido empleadas a través de los años como medicina tradicional; especialmente en Asia y América Latina, se han utilizado como astringentes o hemostáticos, como remedios para diarrea, disentería, leucorrea y enfermedades de la piel [5]; contra afecciones respiratorias [6], malaria, cálculos en la vejiga y otras enfermedades del tracto genitourinario, irritaciones en las encías, y como diurético [7].

En la fitoquímica de *Monochaetum*, se han identificado flavonoides, polifenoles, taninos hidrolizables y glicosidos acilados [8]. Muchos compuestos polifenólicos han sido estudiados por sus efectos como antioxidantes, antiinflamatorios, antimutagénicos y antitumorales [9].

El ensayo de actividad antitumoral identifica agentes de reconocida toxicidad en diferentes tipos de células, aunque, muchos antitumorales resultan costosos, requieren de laboratorios especializados y pueden presentar problemas en la interpretación de los datos obtenidos con extractos de plantas., es indispensable continuar en la búsqueda de nuevas sustancias con efecto antitumoral

La inhibición de *A. tumefaciens* para inducir tumores (o agalla de corona) en tejidos de disco de papa es un ensayo basado en la actividad antimitótica y puede detectar un amplio rango de conocidos y nuevos efectos antitumorales [10]. Camptotecina, paclitaxel, podophyllin, vinblastina y vincristina son drogas quimioterapéuticas aprobadas por la FDA producidas a partir de plantas, que exhiben diversos modos de acción sobre el ciclo celular [11].

La validez de este bioensayo se basa en la demostración de que ciertos mecanismos tumorgénicos son similares en plantas y animales.

A. tumefaciens es una bacteria gram negativa que es causante de la enfermedad de agalla de corona, afección causada en tejidos de tallos y raíces de plantas maderables, que se presentan como masas (tumor) duras o esponjosas, y pueden o no tener un efecto sobre la planta. Los tumores producidos son histológicamente similares a los encontrados en humanos y animales [12].

Durante la infección del material vegetal con *A. tumefaciens*, un tumor es inducido por el plásmido Ti, encontrado en el DNA de la bacteria, siendo a su vez incorporado en el DNA cromosomal de la planta. El plásmido Ti causa en las células de las plantas multiplicación rápida sin marcha a través de apoptosis, resultando formación tumoral con contenido similar en ácido nucléico; McLaughlin concluye que el ensayo de discos de papa puede ser usado como un claro, rápido, barato y fiable análisis de actividad antitumoral [12].

La actividad antitumoral es un ensayo preliminar conveniente para la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos en plantas [13], por cuanto existen reportes de productos naturales antitumorales que también exhiben una variedad de otras actividades biológicas.

Este estudio tiene por objeto identificar la función quimiopreventiva de los extractos obtenidos a partir de la planta *Monochaetum multiflorum* evaluados mediante el ensayo de discos de papa modificados a discos de zanahoria.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1 Material Vegetal

Las hojas de *Monochaetum multiflorum* (BONPL) Naud. fueron colectadas en el municipio de Manzales Caldas-Colombia a 2120 m.s.n.m. Dos ejemplares fueron enviados al Herbario Nacional de Colombia, allí fueron registrados con el voucher 361696.

2.2 Procedimiento de extracción

El material vegetal seco y molido (10 g.) fue homogenizado en acetona acuosa al 70% con agitación por 20 min. El homogenizado obtenido fue secado en rotaevaporador a temperatura aproximada de 40°C. Posteriormente el extracto en acetona fue sometido a separación líquido-líquido con éter etílico, AcEtO y *n*-butanol. Cada homogenizado fue filtrado y concentrado a presión reducida a 40 °C.

2.3 Evaluación de la actividad antitumoral

2.3.1 Obtención de los discos de zanahoria

Para la evaluación de la actividad antitumoral con la técnica de discos de zanahoria, se seleccionaron ejemplares sanos y frescos, que fueron esterilizadas en solución de hipoclorito de sodio por 30 s. Con la ayuda de un sacabocados se obtuvieron anillos de 0.5 cm, que fueron colocados sobre agar-agar al 1% para evaluar el nivel de contaminación y supervivencia durante 20 días.

2.3.2 Preparación del inoculo de *A. tumefaciens*

Las cepas de *A. tumefaciens*, Ach5 y 1182 fueron suministradas por el Dr. William Roca del CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, Palmira-Colombia).

La concentración bacteriana utilizada fue de 3×10^8 bacterias/mL, correspondiente al tubo 1 en la escala de Mac farland. A partir de esta se preparo una dilución 1/100 para obtener una concentración de 3×10^6 bacterias/mL.

2.3.3 Evaluación de la actividad antibacteriana

Con el fin de evitar falsos positivos se evaluaron los extractos obtenidos con cada una de las cepas anteriores, sembrando en profundidad a concentración de 3×10^6 bacterias/mL en agar Mueller Hinton, una vez solidificado se procedió a realizar pozos con sacabocados estéril, en cada uno de los cuales se depositaron 100 µL de cada uno de los extractos, y sus respectivos controles, los cuales fueron incubados en oscuridad durante 6 días a 25 °C.

2.3.4 Evaluación de la actividad antitumoral sobre discos de zanahoria

Los discos de zanahorias sobre platos de agar-agar al 1% fueron sometidos a pequeñas incisiones donde se procedió a depositar 200 µL de los diferentes extractos e inóculos bacterianos.

Para valorar la inhibición tumoral se preparó como control L-metionina a una concentración de 500 mg/mL. A su vez, se trataron explantes sin ningún tipo de inoculación para garantizar la supervivencia del mismo. Cada una de las cajas fue sellada con parafilm e incubada a 25 °C.

A partir de los tumores producidos en los discos de papa, se realizó el test de opinas las cuales son sustancias que solo producen las células vegetales transformadas y que se utilizan como fuente de carbono y nitrógeno solo por las bacterias que tienen el plásmido ti y el gen específico para el catabolismo de las opinas en particular. Se utilizaron placas de sílica gel como fase estacionaria y una solución de propanol, agua, ácido acético en proporción 80:15:5 como fase móvil. Para la detección de octopina y nopalina se utilizó fenantroquinona y para la detección de manopina se utilizó una solución de nitrato de plata

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Frente a la evaluación de actividad antibacteriana el único extracto que arrojó resultado positivo fue el de *n*-butanol de hojas, el cual fue descartado para la evaluación de actividad antitumoral y así evitar los falsos positivos.

Al comparar la capacidad de las dos cepas en cuanto a su poder biológico para la transferencia del plásmido no se encontraron diferencias significativas aplicando la prueba de tukey al 5%, lo cual demuestra que se puede utilizar cualquiera de las dos para este tipo de análisis.

Sin embargo, cuando se evaluaron con los controles de L-metionina la cepa 1182 no presentó inhibición de la tumoración, en tanto que la cepa Ach 5 respondió perfectamente a los controles, además, se presentaron diferencias en el comportamiento de estas dos cepas frente a los extractos, demostrando que si bien tienen la misma capacidad para transferir el plásmido, tienen diferencia en la susceptibilidad para evitar su formación, encontrándose más sensible a la inhibición la cepa Ach 5 que la 1182 (Fig 1).

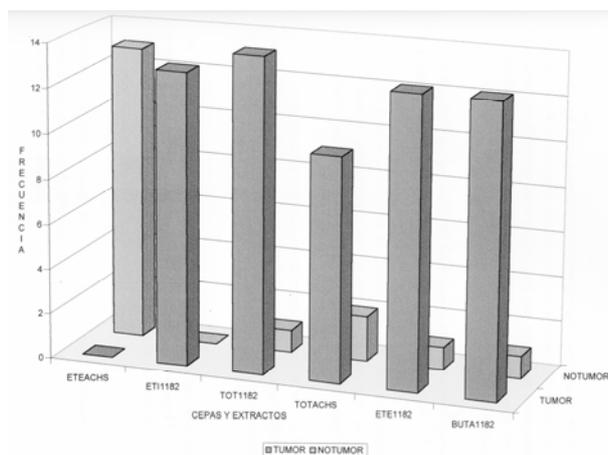


Fig. 1. Frecuencia de inhibición de tumoración con extractos de tallos frente a las dos cepas evaluadas

El extracto en acetato de etilo obtenido de hojas, aplicado al explante de zanahoria presentó una mayor inhibición de la tumoración que el extracto total.

Los extractos etéreos de hojas y tallos presentaron mejor actividad antitumoral frente a la cepa Ach5, con porcentajes de inhibición del 92.3% y 100%, respectivamente. Comparando con el control positivo de L-metionina. Lo anterior puede deberse a la presencia de compuestos de tipo fenólicos, los cuales han sido reportados por Isaza [14] en esta planta; los compuestos de tipo fenólico han mostrado ejercer actividad de manera específica sobre los mecanismos de control del ciclo celular y por tanto sobre la capacidad de la célula

para dividirse. Una variedad de mecanismos moleculares que contribuyen a estos efectos beneficiosos de los fenoles han sido descritos en diferentes sistemas celulares. Así, los fenoles pueden prevenir el daño en el ADN mediante una captura directa del carcinógeno debido, fundamentalmente a su actividad antioxidante, también estimulando la excreción de carcinógenos mediante la activación de los sistemas enzimáticos de fase I y II, involucrados en la eliminación de compuestos del organismo. Sin embargo, la inducción de enzimas de fase I puede conducir a la activación de precarcinógenos. Diferentes fenoles han mostrado su capacidad para inhibir enzimas de fase I y por tanto, su actividad anticarcinogénica.

4. CONCLUSIONES

En el presente estudio el extracto etéreo de tallos y hojas de *Monochaetum multioflorum* en explantes de zanahoria con *A tumefaciens* inhibió la producción de tumores. También el extracto de hojas con acetato de etilo, utilizando *A tumefaciens* cepa 1182, produjo efecto antitumoral

La prueba de opinas confirmó la presencia de octopina en los explantes inoculados con *A tumefaciens* cepa Ach5 y evidenció manopina en aquellos inoculados con cepa 1182 lo que representa una forma sencilla de verificar la producción de tumores en la célula vegetal ocasionada por la transferencia del plásmido ADN- t de *A. tumefaciens* a los discos de zanahoria.

5. AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus agradecimientos a: la Universidad Tecnológica de Pereira, Unidad de Biotecnología del CIAT y al equipo de trabajo de la central de laboratorios de la Universidad Católica de Manizales.

6. BIBLIOGRAFÍA

- [1] Monache, F.D. Tópicos en Productos Naturales Para el Desarrollo de Nuevas Drogas. Universidad Católica de Sacro, Centro Clínica Del Retori (CNR). Roma, Italia. Memorias Congreso de Fitopatología, 1997.
- [2] Quiñones M., L.M. Diversidad de la Familia Melastomataceae en la Orinoquía Colombiana. 2001. pag 125.
- [3] Renner, S.S. 1993. Phylogeny and Classification of the Melastomataceae and Memecilaceae. Nordic Journal of Botany. **13**: 519-540.
- [4] Umaña Doderó, G. and Alameda, F. 1995. *Miconia amplinoies* (Melastomataceae: Miconieae), una nueva especie para Costa Rica. Novon. 5: 110-113.

-
- [5] Perry, L.M. and Metzger, J. 1980. Medicinal Plants of East and Southeast of Asia, MIT Press, Cambridge.
- [6] Renner, S.S. 1990. A Revision of *Rychanthera* (Melastomataceae). Nord. J. Bot. (9): 601-630.
- [7] García Barriga, H. 1992. Flora Medicinal Colombiana. Botánica Médica. Vol. 2. Tercer Mundo Editores., Santa fe de Bogota.
- [8] José H. Isaza, Hideyuki Ito, Takashi Yoshida .A flavonol glycoside-lignan ester and accompanying acylated glucosides from *Monochaetum multiflorum* . Phytochemistry 58 (2001)321-327
- [9] Mirella Nardini, Cristina Scaccini, Lester Packer and Fabio Virgili. In vitro inhibition of the activity of phosphorylase kinase, protein kinase C and protein kinase A by caffeic acid and a procyanidin-rich pine bark (*Pinus marittima*) extract .2000. Biochimica et Biophysica Acta (BBA).V1474,Issue 2 (219-225)
- [10] Agrios, N G. Enfermedades de las plantas ocasionadas por bacterias. Manual de enfermedades de las plantas. Tomo 3. Ediciones Ciencia y Técnica S.A. México. Limusa.1995 p 479-555.
- [11] Giovanni Luca Beretta and Franco Zunino 2007 relevance of extracellular and intracellular interactions of camptothecins as determinants of antitumor activity. Biochemical Pharmacology V 74 Issue 10 (1437-1444)
- [12] McLaughlin, J.L. Crown galas tumors on potato discs and briene shrimp lethality: Two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. In Methods in Plant Biochemistry. Academic Press. London. 1991. 1-32.
- [13] Ito, H., Muranaka, T., Mori, K., Jin, Z.-X., Tokuda, H., Nishino, H., and Yoshida, T. 2000. Ichthyotoxic phloroglucinol Derivatives from *Dryopteris fragrans* and their Anti-tumor Promoting Activity. Chem. Pharm. Bull. 48:1190-1195.
- [14] José H. Isaza, Hideyuki Ito, Takashi Yoshida Oligomeric hydrolyzable tannins from *Monochaetum multiflorum*. Phytochemistry 65 (2004) 359-367.