

**Atividade antiangiogênica de *Deguelia duckeana* A.M.G. Azevedo:  
3,5,4'-trimetoxiestilbeno e 4-metoxilonchocarpina**

**Antiangiogenic activity of *Deguelia duckeana* A.M.G. Azevedo: 3,5,4'-  
trimethoxystilbene and 4-methoxylonchocarpine**

DOI:10.34117/bjdv7n7-429

Recebimento dos originais: 07/06/2021

Aceitação para publicação: 20/07/2021

**Laura Corrêa Cavalcante Leite\***

Mestrado em Ciências Biológicas (Botânica)

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

Avenida André Araújo, Petrópolis, 69067375 - Manaus, AM – Brasil

lauraccleite@outlook.com.br

**Nádia Cristina Falcão-Bücker**

Doutorado em Farmácia

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Coordenação de Tecnologia e  
Inovação

Avenida André Araújo, Petrópolis, 69067375 - Manaus, AM – Brasil

nadiafarmaster@gmail.com

**Cecilia Veronica Nunez**

Doutorado em Química Orgânica

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), Coordenação de Tecnologia e  
Inovação

Avenida André Araújo, Petrópolis, 69067375 - Manaus, AM – Brasil

cvnunez@gmail.com

**RESUMO**

Verifica-se na literatura que muitas substâncias fenólicas isoladas de espécies de *Deguelia*, como os isoflavonoides e chalconas, apresentaram resultados positivos para diversos ensaios de potencial antitumoral, principalmente citotoxicidade para linhagens tumorais humanas. A espécie *Deguelia duckeana* A.M.G. Azevedo, entretanto, apresenta poucos estudos fitoquímicos e biológicos de potencial antitumoral. Para a realização de ensaios antitumorais, o cultivo de células é uma etapa dispendiosa. Uma alternativa pouco explorada são ensaios *in vitro* de inibição da angiogênese, ou seja, inibição da formação de novos vasos sanguíneos que promoveriam o crescimento de tumores. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antiangiogênica das substâncias fenólicas de *D. duckeana* utilizando o método de análise da vascularização da membrana corioalantóica de embriões de galinha. Sob incubação em chocadeira e por orifícios na casca dos ovos, foram implantados sobre os vasos sanguíneos, no terço externo da membrana corioalantóica, discos de metilcelulose (1,5%) embebidos com 10 µL dos extratos nas concentrações de 1000 mg/mL, 500 mg/mL e 100 mg/mL diluídos com álcool etílico. O orifício foi fechado com uma fita, seguindo a incubação por mais 48 h,

para se efetuar a contagem de vasos sanguíneos que interceptam o disco e vasos presentes na vizinhança em uma área de 0,9 cm<sup>2</sup>. Os resultados foram expressos como percentual de vasos  $\pm$  desvio-padrão. Os extratos hexânicos, principalmente das raízes, obtiveram as maiores atividades antiangiogênicas. O fracionamento do extrato hexânico das raízes levou ao isolamento e caracterização de três substâncias fenólicas, das quais duas (3,5,4'-trimetoxiestilbeno e 4-metoxilonchocarpina) são potenciais agentes antiangiogênicos já descritos na literatura, corroborando para a necessidade de prospecção de outras substâncias destes extratos hexânicos que possam interferir em alvos moleculares dos processos de angiogênese e, conseqüentemente, de progressão das neoplasias.

**Palavras-chave:** Antiangiogênico, Substâncias fenólicas, *Deguelia duckeana*.

## ABSTRACT

It is verified in the literature that many phenolic substances isolated from *Deguelia* species, such as isoflavonoids and chalcones, presented positive results for several assays of antitumor potential, mainly cytotoxicity for human tumor lines. The species *Deguelia duckeana* A.M.G. Azevedo, however, presents few phytochemical and biological studies of antitumor potential. To perform antitumor assays, cell culture is an expensive step. An unexplored alternative is in vitro angiogenesis inhibition assays, that is, inhibition of new blood vessel formation that would promote tumor growth. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antiangiogenic activity of phenolic substances from *D. duckeana* using the method of analysis of the vascularization of the chorioallantoic membrane of chicken embryos. Under incubation in an incubator and through holes in the egg shells, methylcellulose discs (1.5%) soaked with 10  $\mu$ L of the extracts at concentrations of 1000 mg/mL, 500 mg/mL and 100 mg/mL diluted with ethyl alcohol were implanted over the blood vessels in the outer third of the chorioallantoic membrane. The hole was closed with a tape, followed by incubation for another 48 h, to perform the count of blood vessels intercepting the disk and vessels present in the vicinity in an area of 0.9 cm<sup>2</sup>. The results were expressed as percentage of vessels  $\pm$  standard deviation. The hexanic extracts, mainly from the roots, obtained the highest antiangiogenic activities. The fractionation of the hexanic extract of the roots led to the isolation and characterization of three phenolic substances, two of which (3,5,4'-trimethoxystilbene and 4-methoxylonchocarpine) are potential antiangiogenic agents already described in the literature, corroborating the need for prospecting other substances from these hexanic extracts that may interfere in molecular targets of the angiogenesis processes and, consequently, of neoplasm progression.

**Keywords:** Antiangiogenic, Phenolic substances, *Deguelia duckeana*.

## 1 INTRODUÇÃO

A espécie deste estudo, *Deguelia duckeana* A.M.G. Azevedo, descrita em 1994, pertence a Tribo Millettieae (Papilionoideae - Fabaceae). Ocorre principalmente nos estados do Amazonas e Pará, especialmente em florestas não-inundadas e densas capoeiras, onde é conhecida pelos habitantes como cipó-cururu ou timbó (Camargo & Tozzi, 2014).

A riqueza fitoquímica do gênero foi revisada por Marques e colaboradores (2015) e Lima e colaboradores (2017). São encontrados na literatura apenas quatro trabalhos de estudo fitoquímico e biológico (Lima *et al.*, 2013; Carrion *et al.*, 2015; Cursino, 2015; Cursino *et al.*, 2016), nos quais todos os extratos desta espécie foram altamente tóxicos para *Artemia salina*, apesar do baixo potencial antioxidante e alguns apresentarem bioatividade em testes antibacterianos para *Staphylococcus aureus* (Lima *et al.*, 2013).

Ao todo, oito substâncias foram isoladas do extrato diclorometânico das raízes, e cinco do extrato hexânico dos galhos; sendo a maior parte flavonoides, e os outros chalconas, estilbenos e esteroides. Seis destas substâncias foram investigadas quanto aos mecanismos de indução de morte em células neuronais SK-N-SH (Cursino *et al.*, 2016).

Além destes resultados, verifica-se na literatura que várias substâncias fenólicas isoladas de *Deguelia* spp. ou de espécies da tribo a qual pertencem, como os isoflavonoides e chalconas, apresentam resultados positivos para diversos ensaios de potencial antitumoral (Ishibashi, 2010; Hussain *et al.*, 2012; Lu & Yan, 2012), principalmente citotoxicidade para linhagens tumorais humanas (Cunha *et al.*, 2003; Su *et al.*, 2012).

Realizar ensaios tumorais envolvendo células cancerígenas, todavia, não é possível por serem dispendiosos. Uma alternativa de alvo molecular para o desenvolvimento de novos protótipos de fármacos anticancerígenos, pouco explorada como atividade biológica, porém de suma importância, é a busca por substâncias que possam inibir a neovascularização induzida por células tumorais, impedindo o processo de metástase (Sagar *et al.*, 2006; Bielenberg & Zetter, 2015; Kotoku *et al.*, 2016), o que pode ser avaliado em ensaios *in vitro*, *ex vivo* ou *in vivo* de inibição da angiogênese (Sun *et al.*, 2015), um potencial ainda não avaliado diretamente em produtos naturais de espécies da tribo Millettieae.

Portanto, como continuação aos estudos sobre *D. duckeana*, o presente trabalho teve como objetivo a investigação do potencial de seus extratos brutos quanto a atividade antiangiogênica, ainda não avaliada para nenhuma espécie da tribo, e o isolamento de substâncias bioativas.

## 2 METODOLOGIA

A avaliação da atividade antiangiogênica foi realizada conforme (Falcão-Bücker, 2012), baseada na metodologia descrita por Nguyen e colaboradores (1994), no Laboratório de Bioprospecção e Biotecnologia do INPA. Para a realização destes

experimentos foram utilizados ovos de galinha fertilizados (FC Cabocla III) adquiridos na Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

Ovos fertilizados foram postos em uma incubadora automática e digital (Chocmaster®), na posição horizontal, à temperatura de 37,5°C e sob umidade relativa do ar de 33%. Após 48 h de incubação, uma pequena janela de 5 mm de diâmetro foi aberta na casca, na região onde se localiza a câmara de ar do ovo para que uma quantidade de aproximadamente 3 mL de claras seja retirada para inibição da aderência dos embriões nas membranas ovulares. A quantidade de ovos é sempre em triplicata para cada tratamento e controles.

Outra janela de 15 mm de diâmetro também foi aberta na região do ovo posicionada acima da região da membrana corioalantóica dos embriões. A mesma também foi fechada com fita isolante de cor preta para minimizar a perda de umidade. Os embriões permaneceram assim, sob incubação, por mais 72 h até a idade embrionária de 6 dias, quando um disco de metilcelulose (1,5%) embebido com 10 µL de extratos nas concentrações de 1000 mg.mL<sup>-1</sup>, 500 mg.mL<sup>-1</sup> e 100 mg.mL<sup>-1</sup>, diluídos com álcool etílico, foram implantados sobre os vasos sanguíneos no terço externo da membrana corioalantóica. O orifício foi novamente fechado com a mesma fita. A incubação prosseguiu por mais 48 h, até a idade embrionária de 8 dias.

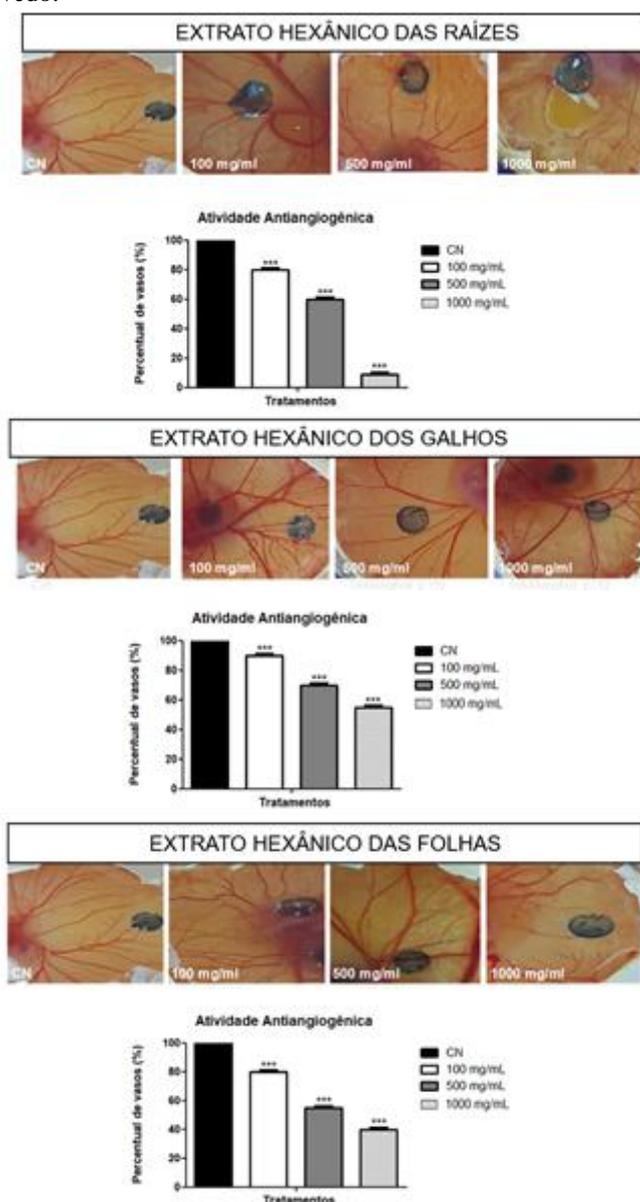
Para a análise da atividade antiangiogênica a fita foi retirada e os dados referentes ao desenvolvimento embrionário e vascular na região de implantação do disco foram registrados com uma câmera fotográfica para posterior contagem de vasos sanguíneos que interceptam o disco e vasos presentes na vizinhança em uma área de 0,9 cm<sup>2</sup>. Os resultados foram expressos como percentual de vasos ± desvio-padrão.

O extrato de maior atividade antiangiogênica foi submetido a um fracionamento em coluna cromatográfica aberta de sílica com gradientes de hexano/diclorometano, diclorometano/acetato de etila e acetato de etila/metanol, até serem obtidas 116 frações de 15 mL cada, as quais foram reunidas em 33 frações. Destas, a fração 30-31, obtida no sistema hexano/diclorometano 1:1, foi novamente fracionada em cromatografia em camada delgada preparativa de sílica, tendo como eluente um sistema monofásico de hexano 100% em seis eluições, da qual foram isoladas nove bandas. As frações purificadas foram analisadas por métodos de ressonância magnética nuclear (RMN), e espectros de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C, COSY, HMBC e HSQC foram comparados com dados da literatura para elucidação estrutural das substâncias.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No ensaio da membrana corioalantóica de embrião de galinha, um aumento na densidade de vasos ao redor do implante dos discos de metilcelulose, após 72-96 h, pode indicar uma atividade angiogênica para as amostras contidas nestes discos, ao passo que uma menor densidade ou a completa inibição da formação de vasos, indica a presença de um agente angiostático (Ribatti 2017). Uma atividade antiangiogênica foi observada para os extratos hexânicos (Figura 1), principalmente das raízes a 1000 µg.mL<sup>-1</sup>, inibindo até 80% da formação dos vasos sanguíneos.

Figura 1 - Atividade antiangiogênica dose-dependente apresentada pelos extratos hexânicos de *Deguelia duckeana* A.M.G. Azevedo.



Resultados expressos em média  $\pm$  desvio padrão, n=3. (\*\*\*) representa diferença estatística significativa ( $p < 0,001$ ) em relação ao grupo controle negativo (CN).

Devido a este resultado, apenas o extrato hexânico das raízes (2,3 g) foi selecionado para ser submetido às etapas de fracionamento cromatográfico, obtendo-se 33 frações. Das subfrações (30-31)5, (30-31)6 e (30-31)8 foram isoladas as substâncias majoritárias: 4-metoxilonchocarpina, 3,5,4'-trimetoxiestilbeno e a derricidina, respectivamente, cujas estruturas foram confirmadas por métodos espectroscópicos de RMN.

Considerando o alto conteúdo fenólico dos extratos hexânicos analisados, o resultado antiangiogênico não era inesperado, visto que inúmeras substâncias fenólicas como chalconas, estilbenos e demais flavonoides são conhecidos metabólitos bioativos para a inibição da angiogênese (Mirossay *et al.* 2017). O ensaio realizado neste trabalho, é preliminar e simples, não indicando quais fatores do processo de angiogênese podem estar sendo afetados pelos extratos.

Sabe-se que várias etapas e fatores regulam a neovascularização (Tang & Conti 2004), e que agentes angiostáticos ou angiogênicos podem atuar de formas distintas. Uma massa tumoral pode ser nutrida por difusão apenas até certo ponto. Após este limite, um estado de hipóxia induz o HIF-1 (fator de transcrição induzido por hipóxia) a ativar a expressão gênica do VEGF (*vascular endothelial growth factor*), que se liga aos seus receptores (VEGFRs) nas células de vasos sanguíneos, iniciando a degradação da matriz extracelular adjacente por metaloproteinasas, proliferação de células endoteliais e de fibroblastos por outros fatores de crescimento (FGF, VEGF A, Ang -1), o alinhamento destas células, formação de novos tubos capilares e a deposição de nova matriz extracelular (membrana basal).

É em alguma destas etapas que os extratos estão interferindo, e que outros ensaios serão necessários para esclarecer. Todavia, sabemos o mecanismo antiangiogênico do 3,5,4' - trimetoxiestilbeno, isolado do extrato hexânico das raízes (o extrato de maior atividade), pois este foi investigado por Alex *et al.* (2009).

Alex *et al.* (2009) demonstrou que a propriedade antiangiogênica do 3,5,4'-trimetoxiestilbeno foi maior que de seu análogo resveratrol em ensaios *in vitro* e *in vivo* porque este diminuiu a expressão gênica do VEGFR2, a proteína receptora do fator VEGF em células endoteliais, e induziu apoptose após parada do ciclo celular em G2/M, em células endoteliais de peixe-zebra (*Danio rerio*), impedindo a formação de novos vasos.

Além disso, chalconas muito similares à 4-metoxilonchocarpina apresentam potencial antiangiogênico (Wang *et al.* 2015a; Mirossay *et al.* 2017). Uma substância de esqueleto muito similar a 4-metoxilonchocarpina, diferindo apenas quanto a presença de

uma hidroxila em posição *orto*, sintetizada no trabalho de Wang *et al.* (2015a), apresentou alta atividade antiangiogênica *in vivo* e *in vitro*, acompanhada de baixa toxicidade intravenosa (não tóxica até 200 mg/kg em camundongos Swiss). Esta chalcona diminuiu a expressão da HIF-1 $\alpha$  sob condições de hipóxia, suprimindo a migração e invasão de células Hep3B e HUVEC induzidas pelo VEGF, retardando o crescimento tumoral de Hep3B e reduzindo a expressão de CD31 e MMP-2 em tecidos tumorais.

#### 4 CONCLUSÃO

A ação antiangiogênica dos extratos hexânicos, principalmente das raízes, aponta para uma nova atividade biológica que pode ser explorada neste gênero botânico. O fracionamento do extrato hexânico das raízes também levou ao isolamento e caracterização de três substâncias fenólicas, das quais duas são potenciais agentes antiangiogênicos possivelmente atuando na inibição dos efeitos do HIF-1 e VEGF, corroborando para a necessidade de prospecção de outras substâncias destes extratos hexânicos que possam interferir em alvos moleculares dos processos de angiogênese e, conseqüentemente, de progressão das neoplasias.

## REFERÊNCIAS

- Camargo, R.A.; Tozzi, A.M.G.A. 2014. A new species of *Deguelia* (Leguminosae, Papilionoideae) from the Brazilian Amazon Basin. *Phytotaxa*, 184 (3): 160.
- Lima, N.M.; Andrade, J.I.A.; Lima, K.C.S.; dos Santos, F.N.; Barison, A.; Salome, K.S.; Matsuura, T.; Nunez, C. V. 2013. Chemical profile and biological activities of *Deguelia duckeana* A.M.G. Azevedo (Fabaceae). *Natural Product Research*, 27 (4–5): 425–432.
- Carrion, L.L.; Ramos, D.F.; Martins, D.; Osorio, M.I.C.; Cursino, L.M. de C.; Mesquita, D.W.O.; Nunez, C.V.; Silva, P.E.A. da. 2015. Antimycobacterial activity of Brazilian Amazon plants extracts. *International Journal of Phytomedicine*, 7 (February 2015):468–478.
- Cursino, L.M. de C. 2015. *Estudo fitoquímico e bioatividade de Diplotropis purpurea e Deguelia duckeana*. Universidade Federal do Amazonas, 188 p.
- Cursino, L.M.C.; Lima, N.M.; Murillo, R.; Nunez, C. V.; Merfort, I.; Humar, M. 2016. Isolation of flavonoids from *deguelia duckeana* and their effect on cellular viability, AMPK, eEF2, eIF2 and eIF4E. *Molecules*, 21 (2).
- Lu, W.; Yan, C. 2012. Molecular Mechanism of Deguelin in Anti-tumor Effect. *Current Pharmaceutical Analysis*, 8 (1): 14–19.
- Su, X.-H.; Li, C.-Y.; Zhong, Y.-J.; Yuan, Z.-P.; Li, Y.-F.; Liang, B. 2012. A new prenylated chalcone from the seeds of *Milletia pachycarpa*. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 10 (3): 222–225.
- Bielenberg, D.R.; Zetter, B.R. 2015. The Contribution of Angiogenesis to the Process of Metastasis. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, 21 (4): 267–273.
- Kotoku, N.; Arai, M.; Kobayashi, M. 2016. Search for Anti-angiogenic Substances from Natural Sources. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 64 (2): 128–134.
- Sun, Q.; Heilmann, J.; Konig, B. 2015. Natural phenolic metabolites with anti-angiogenic properties – a review from the chemical point of view. *Beilstein J. Org. Chem*, 11: 249–264.
- Ribatti, D. 2017. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. *Reproductive Toxicology*, 70: 97–101.
- Mirossay, L.; Varinska, L.; Mojžiš, J. 2017. Antiangiogenic Effect of Flavonoids and Chalcones: An Update. *International Journal of Molecular Sciences*, 19 (1): 27.
- Alex, D.; Leong, E.C.; Zhang, Z.-J.; Yan, G.T.H.; Cheng, S.-H.; Leong, C.-W.; Li, Z.-H.; Lam, K.-H.; Chan, S.-W.; Lee, S.M.-Y. 2009. Resveratrol derivative, trans-3,5,4'-trimethoxystilbene, exerts antiangiogenic and vascular-disrupting effects in zebrafish through the downregulation of VEGFR2 and cell-cycle modulation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 109 (2):
- Wang, L.; Chen, G.; Lu, X.; Wang, S.; Han, S.; Li, Y.; Ping, G.; Jiang, X.; Li, H.; Yang, J.; Wu, C. 2015a. Novel chalcone derivatives as hypoxia-inducible factor (HIF)-1

inhibitor: Synthesis, anti-invasive and anti-angiogenic properties. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 89: 88–97.

Tang, D.G.; Conti, C. J. Endothelial cell development, vasculogenesis, angiogenesis, and tumor neovascularization: an update. *Semin Thromb Hemost.* 2004 Feb;30(1):109-17. doi: 10.1055/s-2004-822975. PMID: 15034802.

Falcão-Bücker, N.C. 2012. Efeito antitumoral e antiangiogênico de extratos bruto e supecrítico de *Bidens Pilosa L.* e *Casearia sylvestris Swartz.* Universidade Federal de Santa Catarina, 113 p.

Sagar, S.M.; Yance, D.; Wong, R.K. 2006. Natural health products that inhibit angiogenesis: a potential source for investigational new agents to treat cancer-Part 1. *Current oncology (Toronto, Ont.)*, 13 (1): 14–26

Cunha, G.M.D.A.; Fontenele, J.B.; Nobre-Júnior, H. V.; De Sousa, F.C.M.; Silveira, E.R.; Nogueira, N.A.P.; De Moraes, M.O.; Viana, G.S.B.; Costa-Lotufo, L. V. 2003. Cytotoxic activity of chalcones isolated from *Lonchocarpus sericeus* (Pocr.) Kunth. *Phytotherapy Research*, 17 (2): 155–159. Doi: 10.1002/ptr.1096.

Ishibashi, M. 2010. Search for bioactive natural products targeting TRAIL signaling for tumor-selective apoptosis inducement. *Pacificchem 2010, International Chemical Congress of Pacific Basin Societies*: 15–20.

Hussain, T.; Siddiqui, H.H.; Fareed, S.; Vijayakumar, M.; Rao, C.V. 2012. Chemopreventive evaluation of *Tephrosia purpurea* against N-nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis in Wistar rats. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 64 (8): 1195–1205. Doi: 10.1111/j.2042-7158.2012.01503.x.