

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTITUMORAL DE EXTRATO *Spilanthes acmella*.****Fernanda Grazielle Ferreira Renó<sup>1</sup>, Valeria Rosseto Lemos<sup>2</sup>, Ary Gomes da Silva<sup>2</sup>, Renan Meyer Campoy<sup>1</sup>, Carlos Augusto Priante da Silva<sup>1</sup>, Cristina Pacheco Soares<sup>1</sup>**

1- Universidade do Vale do Paraíba (Univap) /Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) – Laboratório de Dinâmica de Compartimentos Celulares; Av. Shishima Hifumi, 2911 – Urbanova, São José dos Campos – SP

[fernandareno@ig.com.br](mailto:fernandareno@ig.com.br), [cpsoares@univap.br](mailto:cpsoares@univap.br)

2- Centro Universitário Vila Velha Rua Jairo Mattos Pereira, 49.Santos Dumont, Vila Velha – ES  
[vr-lemos@uol.com.br](mailto:vr-lemos@uol.com.br),

**Resumo-** O interesse nas ervas medicinais, no tratamento do Câncer, tem estimulado várias pesquisas. Muitas destas ervas apresentam grande potencial terapêutico, porém com poucos conhecimentos sobre a ação dos mesmos sobre as células cancerígenas. O extrato de *Spilanthes acmella* tem sido amplamente explorado na área dermatológica, sendo considerado o Botox natural. O objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicação terapêutica do extrato de *S. acmella* em células neoplásicas da linhagem HEP-2, através de avaliação de lipídeos e proteínas de membranas após aplicação de concentrações variáveis desse extrato. As culturas foram avaliadas 24 horas após incubação com o extrato nas concentrações de 1mg/mL, 500µg/mL, 250 µg/mL, 100 µg/mL e marcadas com sondas fluorescentes PKH26 (lipídeos) e DTAF (proteínas). A análise foi realizada através de microscopia de Fluorescência demonstrando alteração na distribuição de lipídeos e proteínas de membranas nas concentrações de 1mg/ml e 500µg/mL.

**Palavras-chave:** Citologia, Câncer, *Spilanthes acmella*, Medicina alternativa.

**Área do Conhecimento:** Biologia Celular.

**Introdução**

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que possuem em comum o crescimento desordenado das células que invadem os tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo. Dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (BARBOSA, 2003), assim constitui-se a segunda causa de morte na população brasileira, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida (INCA, 2010).

Entre os vários tratamentos para o câncer, a medicina complementar alternativa (MCA) é muito utilizada em pacientes na maioria das sociedades (LEAL; SCHWASTSMANN; LUCAS, 2008), despertando o interesse nas ervas medicinais, as quais apresentam grande potencial terapêutico, porém com poucos conhecimentos sobre a ação dos mesmos sobre as células cancerígenas.

*Spilanthes acmella* é uma planta herbácea pertencente à Família *Asteraceae* amplamente cultivada e utilizada em vários municípios da região nordeste do Estado do Pará, sendo que o uso fitoterápico tradicional está concentrado nas folhas e flores (COUTINHO; APARECIDO;

FIGUEIREDO, 2006). Estudos posteriores demonstraram que o extrato de *Spilanthes acmella* possui atividades diurética, antibacteriana e antiinflamatória (WU *et al.*, 2008), sendo que, outros estudos, descrevem o spilantol (substância encontrada no óleo essencial obtido das folhas de *S. acmella*) como um cosmético anti-ruga por inibir as contrações dos músculos subcutâneos, em especial os do rosto, assim como o botox usado no tratamento de rejuvenescimento (JORNAL REPÓRTER, 2008). Wu *et al.* (2008) descreve que a partir do *Spilanthes acmella* obteve extrato para utilização em células de macrófagos de camundongos, o qual mostrou uma forma eficaz na produção de mediadores antiinflamatórios.

Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicação terapêutica do extrato de *S. acmella* em células neoplásicas da linhagem Hep-2, através de testes de citotoxicidade e avaliação dos possíveis alvos celulares.

**Metodologia**

**Cultura de células:** A linhagem HEP-2, carcinoma epidermóide de laringe humana (CCL-23 ATCC-USA), utilizada nos experimentos, foi

obtida do Instituto Adolfo Lutz/ Seção de Culturas Celulares (São Paulo /SP). Foi suprida no meio de cultura MEM, suplementado com 1 % (v/v) de antibiótico-antimicótico e 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB).

As células foram transferidas para placas de cultura contendo lamínulas estéreis, Sobre as mesmas foi adicionado extrato de *Spilanthes acmella* em concentrações decrescentes (1mg/mL, 500µL/mL, 250 µL/mL, 100 µL/mL

**Extrato:** o extrato foi preparado pelo Prof. Dr. Ary Gomes da Silva e Profa. Valéria Rosseto Lemos, do Centro Universitário de Vila Velha-ES.

#### Marcadores de proteínas de membrana:

Cultura de células da linhagem HEP-2 foram lavadas em solução salina tampão fosfato (PBS), e incubadas em solução de glicose isotônica/ Dichlorotriazinylaminofluorescein - DTAF, (0,5mg/mL) no escuro por um período de 30 minutos. As células foram lavadas novamente em PBS e as lamínulas foram montadas com N-propiril-galato e observadas e fotografadas com câmera Leica DFC310FX, acoplada ao microscópio de fluorescência DMLB. A avaliação da fluorescência foi realizada visualmente.

#### Marcadores de lipídeos em membrana:

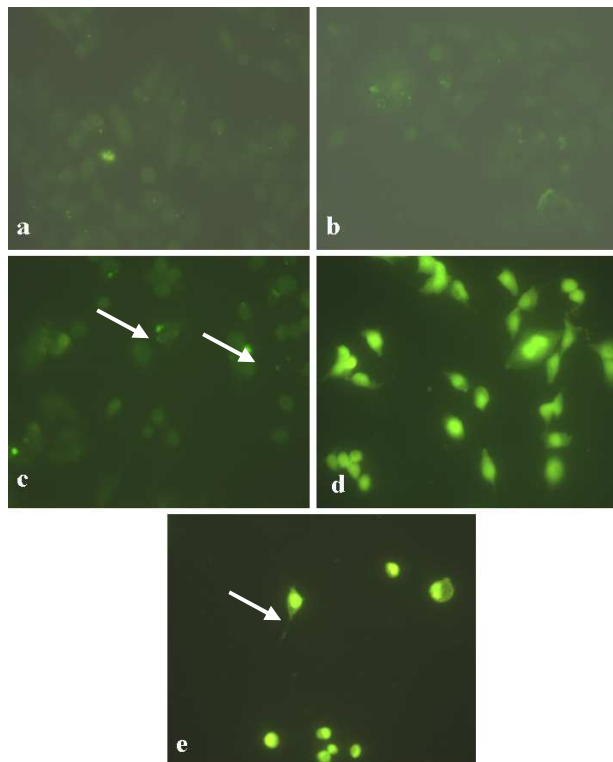
Cultura de células da linhagem HEP-2 foram lavadas em PBS e incubadas em solução de glicose isotônica / PKH26 (100µg/mL) por um período de 30 segundos. As células forma lavadas novamente em PBS e as lamínulas foram montadas com N-propiril-galato e observadas e fotografadas com câmera Leica DFC310FX, acoplada ao microscópio de fluorescência DMLB. A avaliação da fluorescência foi realizada visualmente.

### Resultados

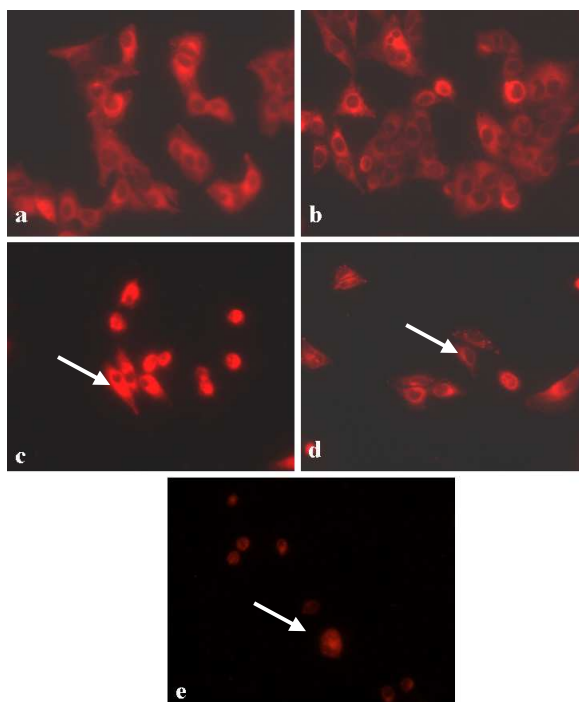
As análises dos resultados com a marcação para proteína e lipídios, foi realizada visualmente, sendo nesta etapa quantificado o nº de células com alterações. Os dados obtidos com DTAF demonstram que o extrato de *S. acmella* acarreta alteração na distribuição de proteínas nas células incubadas com 500 µg/mL e 1mg/mL, ocasionando inclusive alteração na morfologia celular, com redução na população de células, como demonstrado na figura 1.

As células incubadas com extrato de *S.acmella* e marcadas com PKH26 permitem acompanhar a redução de lipídeos de membrana de acordo com aumento da concentração de extrato de *S. acmella*. Na figura 2 é possível verificar que na

concentração de 250 µg/mL, ocorre uma concentração de lipídeos na região central da célula, havendo quase que completa redução da marcação na concentração de 1mg/mL.



**Figura 1:** Células HEP-2 marcadas com DTAF. (a) controle, somente células. (b) Células incubadas com 100 µg/mL de extrato de *S. acmella*. (c) células incubadas com 250 µg/mL extrato de *S.acmella*, observa-se uma discreta marcação em umas células. (d) células incubadas com 500 µg/mL de extrato de *S.acmella*, e (e) células incubadas com 1 mg/mL de extrato de *S.acmella*, notam-se intensa marcação havendo redução significativa no grupo de 1 mg/ml.



**Figura 2:** Células HEp-2 marcadas com PKH26. (a) controle, somente células, observa-se uma marcação intensa e uniforme dos lipídeos, ocorrendo o mesmo padrão em (b) células incubadas com 100 µg/mL de extrato de *S. acmella*; em (c) células incubadas com 250 µg/mL extrato de *S. acmella*, observa-se uma marcação mais concentrada na região central das células com redução do número de células e adesão; (d) células incubadas com 500 µg/mL de extrato de *S. acmella*, e (e) células incubadas com 1 mg/mL de extrato de *S. acmella*, apresentam redução significativa da distribuição de lipídeos. O número de células também reduz significativamente no grupo de 1 mg/ml.

## Discussão

Um tumor só é maligno quando suas células têm a capacidade de invadir os tecidos vizinhos. Em alguns casos as células se desprendem de tumores primários, uma vez que possuem propriedades invasivas, penetram na corrente sanguínea ou vasos linfáticos formando tumores secundários, (ALBERTS, 2006). Além disso as dificuldades nos tratamentos ocorrem frequentemente devido a resistência aos medicamentos, toxicidade e baixa especificidade.

Moléculas de plantas, seus derivados sintéticos e semi-sintéticos são importantes fontes de medicamentos antitumorais. Segundo Cragg e Newman (2000) cerca de 50% dos fármacos em

ensaios clínicos para atividade anti-câncer são de fontes naturais ou correlacionadas a elas (Mesquita et al., 2009). O Brasil tem a maior diversidade vegetal do mundo, e as plantas, desde tempos antigos, têm sido utilizadas para o tratamento de diversas doenças inclusive o câncer (Brandão et al., 2008).

Assim seguindo esta linha de raciocínio, é possível afirmar que existem plantas que produzem substâncias antimitóticas, capazes de deter o crescimento de tumores malignos. Segundo Miraca (2010) os produtos naturais podem ser vantajosos aos pacientes, pois agredem menos o organismo em relação aos procedimentos convencionais.

A avaliação de novos extratos, com aplicações farmacológicas vem sendo empregado em larga escala, o qual têm mostrado êxito em muitas experiências. Miraca (2010) descreve que o extrato de *Cassia occidentalis*, popularmente conhecida como Fedegoso, quando aplicado em cultura de células MCF-7 (carcinoma de mama) acarreta 80% de morte das células cancerígenas. Pesquisadores Centro Médico Southwestern, da Universidade do Texas descobriram que uma substância extraída de casca de ipê-roxo mata célula cancerígena do pulmão (Canto Verde, 2010).

Pesquisadores da Universidade Federal Fluminense (UFF) descobriram um método de utilização para a substância conhecida como álcool perílico (AP), um lipídio que pode ser extraído de óleos essenciais de várias plantas, como frutas cítricas e vegetais, comprovando a ação *in vitro* do álcool perílico em células cancerígenas cerebrais, foi evidenciado a inibição da proliferação destas células em menos de meia hora pelo processo de apoptose (Fonseca, 2010).

A ação de *Sphilantes acmella* sobre células tumorais não é descrito na literatura. Seu espectro de aplicação é amplo com descrição de atividades diurética, anti-bacterianas e anti-inflamatória.

Idealizando no contexto acima, o presente trabalho propôs a avaliação do extrato da planta *Sphilantes acmella*, em cultura de células tumorais Hep-2, analisando estruturas celulares alvo do extrato, uma vez que a literatura não descreve a ação deste extrato sobre estruturas celulares.

A análise inicial demonstrou que os lipídeos de membranas apresentam alteração em sua distribuição devido a concentração do extrato. As proteínas de membrana apresentam-se mais evidentes nas concentrações mais altas, entretanto não podemos descartar a presença de proteínas no extrato, o que pode ser mais evidente nestas concentrações utilizadas. Este resultado é importante também, pois indica que devido a uma maior concentração do extrato (proteínas) as mesmas aderem a membrana, necessitando de

uma melhor caracterização destas e sua ação direta sobre estruturas celulares.

Embora este seja um estudo preliminar, entendemos que mais estudos se fazem necessários para a compreensão dos alvos celulares do extrato do *Spilanthes acmella*, bem como a purificação e caracterização do princípio ativo, com atividade antitumoral. Os resultados preliminares obtidos mostram-se promissores, pois este vegetal apresenta cultivo de baixo custo e um desenvolvimento demasiadamente rápido não ocasionando nenhum prejuízo ao meio ambiente, diferente por exemplo de *Taxus brevifolia*, uma árvore do Pacífico, do qual foi isolado o paclitaxel em 1971; um grande problema na extração do paclitaxel reside no fato de que a espécie *Taxus brevifolia* demora cerca de 100 a 200 anos para atingir a maturidade e encontra-se em extinção, para a obtenção de 1 kg do paclitaxel são necessários aproximadamente 10.000 kg da casca da *Taxus brevifolia*, sendo necessário cerca de 3.000 árvores. Essa quantidade poderia ser utilizada no tratamento de apenas 500 pacientes durante o período de um ano, sendo que um número muito reduzido de pessoas seriam beneficiadas, já que o câncer é uma doença que atinge, somente nos EUA, cerca de 6,5 milhões de pessoas por ano (Souza, 2003).

## Conclusão

A avaliação do extrato de *S.acmella*, em cultura de células tumorais, revelou alterações na distribuição de proteínas e lipídeos de membrana.

Mais estudos se fazem necessários para a compreensão dos mecanismos celulares e alvos celulares, bem como a caracterização do princípio ativo, com atividade antitumoral.

## Referências

- ALBERTS, B.; SANTOS, A. L. C. S.; Fundamentos da Biologia Celular – Porto Alegre, 2006 – 2º edição
- BARBOSA, A. M.; Câncer Direito e Cidadania – 8º. Edição. São Paulo, SP, 2003.
- BRANDÃO, M.G., Zanetti, N.N., Oliveira, P. Graef, C.F., Santos, A.C., Monte-Mór, R.L. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the official Pharmacopoeia. Journal of Ethnopharmacology, 120, 141-148. 2008.
- CANTO VERDE – Câncer e as plantas medicinais – disponível em: [www.cantoverde.org](http://www.cantoverde.org) – acesso em: 06/09/2010
- CRAGG, G.M, NEWMAN, D.J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. Expert Opinion on Investigational Drugs 9, 1-15. 2000.
- COUTINHO, L. N.; APARECIDO, C. C.; FIGUEIREDO, M. B.; Galhas e deformações em jambu (*Spilanthes oleraceae*) causados por *Tecaphora spilanthos* (Ustilaginales) – Botucatu – SP – 2006.
- FONSECA, CLÓVIS ORLANDO; Álcool perílico Pesquisas apontam ação em células cancerígenas – disponível em: [www.fec.uff.br](http://www.fec.uff.br) – acesso em: 06/09/10
- INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – Estimativa para 2010 – Incidências de Câncer no Brasil – São Paulo, SP – 2010.
- JORNAL REPÓRTER - Jambu amazonense agora é patente americana – São Paulo - SP – 2008 – disponível em: <http://oreporter.wordpress.com> – acesso em: 02/03/2010
- LEAL, F.; SCHWASTSMANN; LUCAS, H. S.; Artigo: Medicina complementar e alternativa: uma prática comum entre os pacientes com câncer – São Paulo, SP – 2008.
- MESQUITA, M.L., PAULA, J.E, PESSOA, C. et al. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. Journal of Ethnopharmacology 123, 439-445. 2009
- MIRACA, ANDREZA – Plantas contra o câncer de mama – disponível em: [www.funccapciencia.funccap.ce.gov.br](http://www.funccapciencia.funccap.ce.gov.br) – acesso em: 06/09/2010
- SOUZA, MARCUS VINÍCIUS NARA DE; Novos produtos naturais capazes de atuar na estabilização de microtúbulos, um importante alvo no combate ao câncer - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos Farmanguinhos, Rio de Janeiro, RJ - 2003
- WU, L.; FAN, N.; LIN, M.; CHU, L.; HUANG, S.; HU, C.; HAN, S.; Anti-inflammatory Effect of Spilanthol from *Spilanthes acmella* on Murine Macrophage by Down-Regulating LPS-Induced Inflammatory Mediators – Taiwan – 2008.