UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Heterosídeos alcaloídicos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil.:
avaliação das atividades contra fungos dermatófitos e
câncer de pele**

Juliana de Carvalho da Costa

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Heterosídeos alcaloídicos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil.:
avaliação das atividades contra fungos dermatófitos e
câncer de pele**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Produtos Naturais
e Sintéticos.

Orientada: Juliana de Carvalho da Costa

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Ribeirão Preto

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Da Costa, Juliana de Carvalho

Heterosídeos alcaloídicos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil.: avaliação das atividades contra fungos dermatófitos e câncer de pele. Ribeirão Preto, 2012.

69 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Bastos, Jairo Kenupp.

1. *Solanum lycocarpum*. 2. Solamargina. 3. Solasonina. 4. Dermatófitos. 5. Formulação tópica. 6. Anticâncer.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana de Carvalho da Costa

Heterosídeos alcaloídicos de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil.: avaliação das atividades contra fungos dermatófitos e câncer de pele.

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. (a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. (a) Dr.(a) _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

**Trabalho realizado no Departamento de
Ciências Farmacêuticas da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Preto da Universidade de São Paulo,
Laboratório de Farmacognosia.**

**Apoio Financeiro
FAPESP
Processo:2010/00925-6**

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Eliane e Augusto e ao meu irmão João Paulo, que apesar da distância sempre me deram a força necessária para seguir em busca de novas conquistas.

Aos meus avós, Nilda e Antônio, pelo amor e carinho de sempre.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por sempre iluminar e guiar os meus caminhos.

Ao Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos por ter me dado a oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa, por sua atenção e disponibilidade em ajudar.

Ao meu amor Diego, por me fazer muito feliz e estar sempre ao meu lado. Amo você.

Aos meus familiares, pelos excelentes momentos que passamos juntos, pelo apoio e pelas palavras de incentivo.

Às amigas Mariza Abreu Miranda e Renata Fabiane Jorge Tiossi que prontamente me acolheram quando cheguei a Ribeirão Preto e que sempre dividiram comigo seus conhecimentos e histórias de vida. Muito obrigada pelos dias inesquecíveis.

À minha família de Ribeirão, Fabrícia, Ricardo e Naty. É um prazer morar com vocês.

Aos meus amigos de laboratório Renata, Mariza, Mauro, Ricardo, Dani A., Eliane, William, Rejane, Cris, Thiago, Bruno, Camila, João, Carol, João Paulo, Dani F. e Erick, muito obrigada por toda ajuda, companheirismo e amizade.

Ao Dr. James McChesney e Prof. Maria Vitória pela co-orientação e auxílio no desenvolvimento deste projeto.

À Prof. Renata Fonseca Vianna Lopez pelas valiosas discussões.

À Prof. Maria José Fonseca, Regina Célia Candido e Prof. Luiz Alexandre, pela oportunidade de poder realizar experimentos em seus laboratórios.

Ao Prof. Sérgio Britto Garcia pelo auxílio nas análises histológicas.

Aos técnicos de laboratório, Mário, João, Valtinho, José Orestes, Henrique, Josiane, Patrícia, Jabor e Rose, pelo apoio técnico prestado para realização deste trabalho.

Aos amigos que fiz durante o mestrado, principalmente à Fernanda Vilela, Joel, Rodrigo Molina e Jean Gonzales por toda ajuda na realização de experimentos.

À Coordenação do programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e a todos os funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

À CAPES e a FAPESP pelo apoio financeiro.

Muito Obrigada!!!

“Mas é do buscar e não achar que nasce o que eu não conhecia.”

Clarice Lispector

RESUMO

Da Costa, J. C. **Heterosídeos alcaloídicos de *Solanum lycocarpum* A. St-Hil.: avaliação das atividades contra fungos dermatófitos e câncer de pele.** 2012. 69 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Solanum lycocarpum A. Saint-Hilaire (Solanaceae), popularmente conhecida como “fruta do lobo”, é uma planta nativa do Brasil muito comum na região do cerrado brasileiro. Além disso, *S. lycocarpum* apresenta altas concentrações de alcalóides esteroidais, sendo os majoritários solasonina (SS) e solamargina (SM), os quais, por sua vez, são substâncias com potencial para as atividades antifúngica e anticancerígena. Os fungos dermatófitos são os agentes mais comuns causadores de micoses superficiais em humanos e animais, infectando exclusivamente o estrato córneo da pele, cabelo e unhas. O câncer de pele é o tipo mais frequente, correspondendo a cerca de 25% de todos os tumores malignos registrados no Brasil. Há que se destacar que uma formulação de uso tópico foi desenvolvida pelo grupo para uso contra câncer de pele e o estudo da estabilidade acelerada desta formulação foi avaliado nesse trabalho. Os frutos da espécie *S. lycocarpum* foram coletados, secos, triturados, submetidos à extração ácido-base e o precipitado foi suspenso em etanol e filtrado. Os heterosídeos alcaloídicos, SS e SM, foram isolados por cromatografia em coluna a vácuo e purificados em CLAE semipreparativa. A formulação contendo extrato alcaloídico armazenada em temperatura ambiente (27 ± 2 °C) apresentou a melhor estabilidade física. Ensaio para avaliação da atividade antifúngica *in vitro* do extrato alcaloídico, SS, SM e aglicona (SD) foram realizados com cepas de fungos dermatófitos e *Candida* spp., sendo que a SM apresentou o menor valor de concentração inibitória. No ensaio de citotoxicidade em células humanas de carcinoma espinocelular (A431) e células de fibroblastos de camundongos (L929) foi possível observar a toxicidade do extrato alcaloídico e das substâncias, SS, SM e SD frente às células cancerígenas. No ensaio *in vivo*, os animais foram induzidos ao câncer de pele não-melanoma do tipo espinocelular com células A431 e verificou-se que apenas o grupo de animais tratados com a formulação Curaderm BEC 5 apresentou redução tumoral. Em contrapartida, o grupo tratado com formulação contendo extrato alcaloídico se comportou da mesma maneira que os grupos controle da formulação e controle negativo. Com auxílio da histologia confirmou-se que o câncer de pele induzido nos animais foi do tipo espinocelular. No ensaio imunoistoquímico foi utilizado o anticorpo caspase-3 para marcar as células em apoptose nos tumores, sendo que o maior número de células apoptóticas foi verificada no grupo tratado com a formulação Curaderm BEC 5.

Palavras chave: *Solanum lycocarpum*, solamargina, solasonina, dermatófitos, formulação tópica e anticâncer.

ABSTRACT

Da Costa, J. C. **Alkaloidic heterosides from *Solanum lycocarpum* A. St-Hil.: evaluation of the activities against dermatophytic fungus and skin cancer.** 2012. 69 p. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Solanum lycocarpum A. Saint-Hilaire (Solanaceae), commonly known as wolf apple or wolf's fruit, is a plant native of Brazil very common in the Brazilian savanna. High concentrations of steroidal alkaloids are found in *S. lycocarpum* fruits, and solasonine (SS) and solamargine (SM) are the most important ones. These two alkaloids present potential antifungal and anticancer activities. Dermatophytic fungi are the most common agents responsible for superficial mycoses in humans and animals, by infecting exclusively the stratum corneum of skin, hair and nails. Skin cancer is the most frequent type corresponding to roughly 25% of all the malignant tumors registered in Brazil. A topical formulation for skin cancer treatment was developed by our research group and its stability tests are reported in this work. The *S. lycocarpum* fruits were collected, dried, milled and submitted to acid-base extraction furnishing a precipitate, which was solubilized in ethanol and then filtered. The heterosidic alkaloids SS and SM were isolated by using vacuum column chromatography and purified by semi-preparative HPLC. The formulation containing the alkaloidic extract stored at room temperature (27 ± 2 °C) was more stable than the ones in other conditions. Antifungal *in vitro* test of the alkaloidic extract, SS, SM and the aglycone (SD) were performed with *Candida* spp and dermatophytic fungi strains. The alkaloid SM displayed the lower inhibitory concentration. The toxicity of the alkaloidic extract, SS, SM and SD was verified in a cytotoxicity test performed with both cultured human cells of spinocellular carcinoma (A431) and mice fibroblast cells (L929). An *in vivo* cytotoxicity test was performed by inducing non-melanoma skin cancer in mice with spinocellular cells A431, in which only the animals treated with a commercial formulation Curaderm BEC 5, showed tumor reduction. There was no statistical difference between the group treated with the formulation containing the alkaloidic extract and control groups. Histological analysis confirmed that the skin cancer induced in the animals were spinocellular type. In an immunohistoquimic test, caspase-3 antibody was employed to stain the cells in apoptosis in the tumors, showing that apoptotic cells were more numerous in the group treated with the formulation Curaderm BEC 5.

Key words: *Solanum lycocarpum*, solamargin, solasonin, dermatophytes, anticancer topical formulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Árvore (A); Flor (B) e Fruto (C e D) da espécie <i>S. lycocarpum</i> A. St.-Hil.....	4
Figura 2	Estrutura química da solasodina e dos heterosídeos alcaloídicos solamargina e solasonina.....	5
Figura 3	Tipos de células afetadas no câncer de pele. Adaptado de A.D.A.M. Disponível em: < http://adam.about.net/reports/Melanoma-and-other-skin-cancers.htm >. Acesso em: 06 Fev. 2012.....	11
Figura 4	Esquema da extração seletiva ácido-base dos alcalóides da espécie <i>S. lycocarpum</i>	18
Figura 5	Esquema da montagem da microplaca para a determinação da atividade antifúngica.....	22
Figura 6	Indução tumoral dos animais com células A431.....	27
Figura 7	Perfil cromatográfico do extrato alcaloídico de <i>S. lycocarpum</i> por CLAE-UV. Condições cromatográficas: Zorbax-SB (5 µm), 250 x 4,6 mm. Fase móvel: ACN: Tampão fosfato pH 7,2 (0,01M) (36,5: 63,5), vazão: 1,0 mL/min e detecção em 200 nm.....	33
Figura 8	Aspectos visuais das formulações contendo extrato (a) e formulações controle (b) armazenadas em $5 \pm 2^\circ\text{C}$ (geladeira), $37 \pm 2^\circ\text{C}$ (estufa) e $27 \pm 2^\circ\text{C}$ (ambiente), nos seguintes tempos: (A) Tempo 24 horas; (B) 7 dias; (C) 15 dias; (D) 30 dias; (E) 60 dias e (F) 90 dias.....	35
Figura 9	Imagem com aumento de 10X da formulação controle (A) e formulação contendo extrato (B) em microscópio óptico com filtro de luz polarizada (Carl Zeiss AG, Alemanha). As formulações foram analisadas 24 horas após o preparo.....	36
Figura 10	Reogramas das formulações contendo extrato e das formulações controle no (A) tempo 24 horas; (B) 30 dias na geladeira; (C) 30 dias na estufa e (D) 30 dias em temperatura ambiente.....	37
Figura 11	Gráfico da viscosidade x taxa de cisalhamento das formulações contendo extrato e das formulações controle no (A) tempo 24 horas; (B) 30 dias na geladeira; (C) 30 dias na estufa e (D) 30 dias em temperatura ambiente.....	38
Figura 12	Avaliação da citotoxicidade do extrato alcaloídico, dos compostos isolados SM, SS, SD e doxorrubicina frente às células A431.....	44
Figura 13	Avaliação da citotoxicidade do extrato alcaloídico, dos compostos isolados SM, SS, SD e da doxorrubicina frente às células L929.....	44

Figura 14	Avaliação visual do tumor do animal tratado com formulação Curaderm BEC 5 durante 50 dias.....	48
Figura 15	Volume tumoral em cm^3 dos animais ($n = 5$) tratados com a formulação contendo extrato alcaloídico por 50 dias. Valores expressos em média $\pm$ E.P.M.....	48
Figura 16	Avaliação visual do tumor do animal tratado com formulação contendo extrato durante 50 dias.....	49
Figura 17	Volume tumoral em cm^3 dos animais ($n = 5$) tratados com a formulação contendo extrato por 50 dias. Valores expressos em média $\pm$ E.P.M.....	49
Figura 18	Avaliação visual do tumor do animal tratado com formulação controle durante 50 dias.....	50
Figura 19	Volume tumoral em cm^3 dos animais ($n = 5$) tratados com formulação controle por 50 dias. Valores expressos em média $\pm$ E.P.M.....	50
Figura 20	Avaliação visual do tumor do animal sem tratamento durante 50 dias.....	20
Figura 21	Volume tumoral em cm^3 dos animais ($n = 5$) sem tratamento por 50 dias. Valores expressos em média $\pm$ E.P.M.....	21
Figura 22	Volume tumoral em cm^3 dos grupos de animais ($n = 5$) tratados pela formulação contendo extrato, controle da formulação sem o extrato, formulação Curaderm BEC5 e controle negativo sem tratamento, por 50 dias.....	52
Figura 23	Células marcadas pelo anticorpo caspase-3 nos grupos de animais ($n = 5$) tratados com formulação Curaderm BEC 5, formulação contendo extrato alcaloídico, controle da formulação sem extrato e controle negativo sem tratamento.....	54
Figura 24	Imagem da marcação por imunoistoquímica para o anticorpo caspase-3 no grupo formulação Curaderm BEC 5, com aumento de 20X. N = necrose e A = apoptose.....	55
Figura 25	Imagem da marcação por imunoistoquímica para o anticorpo caspase-3 no grupo formulação contendo extrato alcaloídico, com aumento de 20X.....	55
Figura 26	Imagem da marcação por imunoistoquímica para o anticorpo caspase-3 no grupo formulação controle, com aumento de 20X.....	56
Figura 27	Imagem da marcação por imunoistoquímica para o anticorpo caspase-3 no grupo controle negativo, com aumento de 20X.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Tipos de dermatofitoses.....	9
Tabela 2	Componentes e concentrações do gel de hidroxietilcelulose.....	24
Tabela 3	Componentes da formulação contendo extrato e da formulação controle com suas respectivas concentrações em porcentagem (%).....	24
Tabela 4	Variação de pH da formulação contendo extrato e da formulação controle em diferentes temperaturas nos tempos 0, 24 horas, 7, 15, 30, 60 e 90 dias.....	39
Tabela 5	Atividade antifúngica (CIM e CFM), expressos em µg/mL do extrato alcaloídico de <i>S. lycocarpum</i> , solasonina, solamargina e solasodina frente aos dermatófitos.....	41
Tabela 6	Atividade antifúngica (CIM e CFM), expressos em µg/mL do extrato alcaloídico de <i>S. lycocarpum</i> , solasonina, solamargina e solasodina frente às espécies de <i>Candida</i>	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

^1H NMR	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
A431	Células humanas de carcinoma escamoso
ACN	Acetonitrila
AcOEt	Acetato de etila
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	Coleção Americana de Cultura de Células
BEC	33 % de solamargina, 33 % de solasonina e 33% de mono e diglicosídeos
C180-135	Células de câncer de ovário
CCDC	Cromatografia de camada delgada comparativa
CCV	Cromatografia em coluna a vácuo
CFM	Concentração fungicida mínima
CI ₅₀	Dose citotóxica para 50 % das células
CIM	Concentração inibitória mínima
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CO ₂	Gás carbônico
DAB	Diamino benzidina
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
E.P.M.	Erro padrão da média
FAFITPE	Fundação de Apoio e Fomento à Inovação Tecnológica à Pesquisa e ao Ensino
FBS	Soro bovino fetal

FC	Formulação controle
FCFRP-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP
FE	Formulação com extrato
FFCLRP-USP	Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto
H ₂ O	Água
HeLa	Células de câncer cervical
INCA	Instituto Nacional do Câncer
L929	Células de fibroblastos de camundongos
LCL	Células linfoblastóides
MeOH	Metanol
MOPS	[ácido 3-(N-morfolino)-propanossulfônico]
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NH ₄ OH	Hidróxido de amônia
ns	Não significativo
OMS	Organização Mundial da Saúde
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SD	Solasodina
SM	Solamargina
SS	Solasonina
TFA	Ácido trifluoroacético
TNF	Fatores de necrose tumoral
TNFR	Receptores de fator de necrose tumoral
UFC	Unidade formadora de colônia
UV/VIS	Ultravioleta / visível

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas.....	v
Lista de abreviaturas e siglas.....	vi
 1. INTRODUÇÃO.....	 1
1.1 Produtos Naturais.....	2
1.2 Família Solanaceae e o gênero <i>Solanum</i>	2
1.3 A espécie <i>Solanum lycocarpum</i> A. St.-Hil.....	3
1.4 Os alcalóides obtidos do fruto de <i>S. lycocarpum</i> e suas atividades biológicas.....	4
1.5 Mecanismo de ação dos heterosídeos alcaloídicos solamargina e solasonina contra fungos e células tumorais.....	7
1.6 Doenças fúngicas causadas por dermatófitos e <i>Candida</i> spp.....	8
1.7 Câncer de pele.....	11
1.8 Estudo de estabilidade e comportamento reológico de formulações.....	12
1.9 Relevância do tema.....	14
 2. OBJETIVOS.....	 15
 3. MATERIAL E MÉTODOS.....	 17
3.1 Coleta do fruto de <i>S. lycocarpum</i> e extração dos heterosídeos alcaloídicos..	18
3.1.1 Cromatografia em coluna a vácuo do extrato alcaloídico.....	19
3.1.2 CLAE semipreparativa.....	19
3.1.3 Obtenção da aglicona solasodina.....	19
3.1.4 Quantificação de solamargina e solasonina no extrato alcaloídico.....	20

3.2 Avaliação da atividade antifúngica contra fungos dermatófitos e <i>Candida</i> spp.....	20
3.3 Preparo da formulação com atividade anticâncer de pele e contra fungos dermatófitos.....	23
3.4 Estudo de estabilidade da formulação.....	24
3.4.1 Caracterização física da formulação.....	25
3.5 Avaliação da citotoxicidade das substâncias isoladas e do extrato alcaloídico pelo teste de MTT.....	25
3.6 Avaliação da atividade anticâncer <i>in vivo</i>	26
3.7 Coleta e processamento do tecido.....	28
3.8 Imunoistoquímica.....	29
3.9 Análise estatística.....	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1 Obtenção do extrato alcaloídico.....	32
4.2 Obtenção das substâncias isoladas.....	32
4.3 Quantificação de solamargina e solasonina no extrato alcaloídico.....	33
4.4 Estudo de estabilidade da formulação.....	34
4.5 Atividade antifúngica <i>in vitro</i>	40
4.6 Avaliação da citotoxicidade das substâncias isoladas e do extrato alcaloídico pelo teste de MTT.....	43
4.7 Avaliação da atividade anticâncer <i>in vivo</i>	46
4.7.1 Formulação Curaderm BEC 5.....	48
4.7.2 Formulação contendo 1 % de extrato alcaloídico de <i>S. lycocarpum</i>	49
4.7.3 Formulação controle.....	50
4.7.4 Controle negativo sem tratamento.....	51
4.8 Análise histológica e imunoistoquímica dos tumores.....	52

5. CONCLUSÕES.....	57
---------------------------	-----------

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
--	-----------

1. Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1 Produtos Naturais

Atualmente, a pesquisa e o desenvolvimento de novos medicamentos a partir de produtos naturais têm se tornado uma tendência global de forma sistemática e estratégica. Medicamentos derivados de produtos naturais são amplamente utilizados e representam mais de 30 % das prescrições na clínica terapêutica (YANG et al., 2008). Segundo alguns autores, a busca de produtos naturais bioativos constitui a estratégia de maior sucesso na descoberta de novos medicamentos (HARVEY, 2000; LI et al., 2004).

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), dos 252 fármacos considerados como básicos e essenciais 11 % são exclusivamente originários de plantas e uma parcela significativa é preenchida por fármacos sintéticos obtidos por precursores naturais. Estima-se que 60 % dos antitumorais e antimicrobianos que já estão no mercado, ou que estão sob triagem clínica, são de origem natural (RATES, 2001).

A pesquisa com as plantas brasileiras, principalmente as do cerrado, considerado um “*hot spot*” mundial em biodiversidade, apresenta grande potencial para o desenvolvimento de novos medicamentos (MYERS et al., 2000). Entretanto, este bioma vem sendo desmatado e várias espécies estão desaparecendo antes mesmo de serem estudadas biológica e quimicamente. Destaca-se, ainda, que a biodiversidade dos biomas tropicais constitui-se na principal fonte de biomoléculas para indústria farmacêutica (SIMÕES et al., 2001). Além disso, estima-se que se o desmatamento continuar com as taxas atuais o cerrado desaparecerá em 2030 (MACHADO et al., 2004).

1.2 Família Solanaceae e o gênero *Solanum*

A família Solanaceae possui distribuição cosmopolita, estando concentrada na região tropical. No Brasil ocorrem 32 gêneros e 350 espécies. Diversas plantas de interesse econômico pertencem a esta família, tais como: tomateiro (*Solanum*

lycopersycum), batata (*Solanum tuberosum*), fumo (*Nicotina tabacum*), pimentão (*Capsicum ssp*) e berinjela (*Solanum melongena*) (SOUZA; LORENZI, 2005).

O gênero *Solanum* é o maior e o mais complexo gênero da família Solanaceae, com cerca de 1500 espécies nas regiões tropicais e subtropicais do mundo e tendo a América do Sul como centro de diversidade e distribuição (AGRA, 1999). Do ponto de vista químico, o gênero *Solanum* é conhecido pela presença de altas concentrações de heterosídeos alcaloídicos, sendo que estes compostos são estruturalmente relacionados e geralmente apresentam uma aglicona em comum, diferenciando-se apenas pelo grupo de carboidratos presentes (FEWELL; RODDICK; WEISSENBERG, 1994; BLANKEMEYER et al., 1998).

1.3 A espécie *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil.

Solanum lycocarpum Auguste Saint-Hilaire (Solanaceae), popularmente conhecida como “fruta do lobo” ou “lobeira”, é uma planta nativa do Brasil, muito comum na região do cerrado brasileiro (SOARES-MOTA et al., 2010). Foi inicialmente utilizada pelos Índios Xavantes brasileiros como agente hipoglicemiante e seus frutos são empregados na medicina popular no tratamento da obesidade, diabetes e na diminuição dos níveis de colesterol (SCHWARZ et al., 2005; NAKAMURA et al., 2008). Também foi reportado na literatura que o fruto apresenta atividade diurética, antiespasmódica, antiepilética, sedativa e anti-inflamatória (SOARES-MOTA et al., 2010).

A espécie *S. lycocarpum* possui a forma arbustiva (Figura 1), podendo atingir 3 – 5 m de altura e apresenta ramos contendo espinhos e tricomas. Seus frutos são verdes, esféricos, produzidos por todo o ano e suas sementes, cerca de 600 – 800 por fruto são dispersas por mamíferos, principalmente o “lobo-guará” (*Chrysocyon brachyurus*), compreendendo 50 % de sua alimentação e promovendo ação terapêutica contra parasitoses fatais que acometem este animal. Os frutos podem pesar entre 400 – 900 g e, após maturação completa, a polpa exala um odor característico. A árvore floresce durante todo o ano, porém com maior intensidade durante estações chuvosas. Já a colheita se dá entre os meses de julho e janeiro (BRIANI; GUIMARÃES JÚNIOR, 2007; CLERICI et al., 2011).

Figura 1 – Árvore (A); Flor (B) e Fruto (C e D) da espécie *S. lycocarpum* A. St.-Hil.

1.4 Os alcalóides obtidos do fruto de *S. lycocarpum* e suas atividades biológicas

Os metabólitos secundários solamargina (SM) e solasonina (SS) são heterosídeos alcaloídicos majoritariamente produzidos pelo fruto da espécie *S. lycocarpum*, sendo que a aglicona destes compostos é a solasodina (SD) (Figura 2) (BLANKEMEYER et al., 1998; SCHWARZ et al., 2007; SOARES-MOTA et al., 2010). Estruturalmente SM e SS apresentam em comum o núcleo esteroidal SD, que possui 27 carbonos, nitrogênio no anel F e geralmente apresenta ligações osídicas na hidroxila do carbono 3, bem como ligações duplas entre os carbonos 5 e 6 (SIMÕES et al., 2001). Dessa maneira, esses compostos diferenciam-se apenas pelos grupamentos de açúcares ligados ao seu núcleo esteroidal SD, sendo que a triose do composto SM é denominada chacotriose, a qual é constituída por duas unidades de ramnose ligadas aos carbonos 2' e 4' da glicose. Já a triose do

composto SS é conhecida como solatriose, sendo composta por unidades de ramnose e glicose ligadas nas posições 2' e 3' da galactose, respectivamente (FEWELL; RODDICK; WEISSENBERG, 1994; BLANKEMEYER et al., 1998).

A ausência de grupos cromóforos nos heterosídeos alcaloídicos torna sua detecção um problema desafiador para a realização do isolamento desses compostos e na quantificação em experimentos com amostras biológicas (SHANKER et al., 2011).

Figura 2 – Estrutura química da solasodina e dos heterosídeos alcaloídicos solamargina e solasonina.

Há um grande interesse em fontes naturais que apresentem baixo valor comercial na síntese de esteróides, como é o caso da aglicona SD obtida pela hidrólise das cadeias de açúcares das moléculas SM e SS. Dessa forma, a SD pode ser facilmente convertida em compostos intermediários da síntese de medicamentos esteroidais (SCHWARZ et al., 2007; SOARES-MOTA et al., 2010).

Não apenas a SD apresenta aplicação farmacológica, como também os compostos SM e SS, que foram avaliados quanto ao seu potencial antifúngico por Fewell, Roddick e Weissenberg (1994), demonstrando que tais compostos inibem o desenvolvimento do micélio nos fungos *Phoma medicaginis* e *Rhizoctonia solani*.

Além da atividade antifúngica, esses compostos também foram avaliados *in vitro* quanto aos seus potenciais citotóxicos frente células de tumores de pele (A431, SCC4, SCC9 e SCC25) (WU et al., 2011), hepatoma (SMMC-7721 e HepG2) (DING et al., 2012), câncer de ovário (C180-135) (DAUNTER; CHAM, 1990) e câncer de cólon (HT29) (LEE et al., 2004). Em estudos *in vitro* com linhagens de células de câncer de pulmão (H441, H520, H661 e H69), SM apresentou atividade citotóxica superior aos fármacos paclitaxel, cisplatina, etoposido e gemcitabina (LIU et al., 2004). Ademais, também foi relatado por Liang et al. (2008), que SM tem excelente atividade sinérgica com os fármacos antitumorais transtuzumabe e epirrubicina, inibindo a proliferação celular das linhagens H661 e H69.

Há que se destacar que desde 1987 estudos *in vivo*, com animais e humanos, têm sido realizados pelo pesquisador Dr. Bill Elliot Cham com o intuito de verificar a atividade antitumoral do extrato alcaloídico de *Solanum sodomaeum* L. que contém 33 % de SM, 33 % de SS e 33 % de mono e diglicosídeos (BEC). Após o BEC ser solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) passou a ser denominado pelos pesquisadores como BEC 01 e foi utilizado no tratamento de ratos com sarcoma 180 (CHAM; GILLIVER; WILSON, 1987). Em seguida, Cham e Meares (1987) desenvolveram uma formulação para o tratamento de tumores malignos de pele (carcinomas basocelular e espinocelular) e tumores benignos (queratoses e queratoacantomas). Tal formulação foi denominada BEC 02 e constituía-se de 10 % de BEC e 10 % de DMSO em base de creme cetomacrogol. Essa formulação foi utilizada no tratamento de 28 pacientes, curando 83 % dos que apresentavam carcinoma basocelular e espinocelular e 100 % dos que apresentavam queratoses e queratoacantomas. Anos mais tarde, Cham, Daunter e Evans (1991) relataram que a formulação Curaderm, constituída de 0,005 % de BEC havia sido 100 % efetiva no tratamento de pacientes que apresentavam queratoses, carcinoma basocelular e espinocelular. Atualmente a formulação é conhecida como Curaderm BEC 5 e tem sido comercializada na Austrália por aproximadamente 20 anos (PUNJABI et al., 2008; WU et al., 2011).

1.5 Mecanismo de ação dos heterosídeos alcaloídicos solamargina e solasonina contra fungos e células tumorais.

Em geral, heterosídeos alcaloídicos apresentam atividade antifúngica devido à ligação que realizam com esteróis (colesterol e ergosterol), provocando a perda da integridade da membrana, o que resulta em alterações de permeabilidade e provoca a morte celular (CIPOLLINI; LEVEY, 1997; PUNJABI et al., 2008). Um estudo comprovou que SM é capaz de romper a membrana de lipossomas formados de fosfatidilcolina e colesterol com mais eficiência que SS, sugerindo que as cadeias de carboidratos ligadas a estes compostos podem estar diretamente relacionadas com esta atividade (RODDICK; RIJNENBERG; WEISSENBERG, 1990).

Com relação à atividade antitumoral da SM e SS, existem três hipóteses sobre seus possíveis mecanismos de ação, sendo que a primeira refere-se à interação de receptores de lectinas presentes na membrana celular de células tumorais com as cadeias de açúcares desses compostos (PUNJABI et al., 2008). Segundo Chang et al. (1998) e Cham (2007), as ramnoses presentes na SM e SS estão diretamente ligadas à atividade antitumoral destes compostos, uma vez que SM apresenta duas ramnoses e é mais ativo do que SS, que apresenta apenas uma. Já a aglicona SD, que não possui cadeia de açúcar, não apresenta atividade antitumoral. A segunda hipótese sugere que os heterosídeos alcaloídicos se difundem dentro da célula tumoral, fazendo com que a expressão dos receptores de fator de necrose tumoral (TNFR) sejam ativados. Por conseguinte, os TNFR se conjugam com os fatores de necrose tumoral (TNF), desencadeando uma cascata de reações que provocam a morte celular (PUNJABI et al., 2008). Assim sendo, vários estudos corroboram com a afirmação de que SM aumenta a expressão das proteínas apoptóticas TNFR, Fas, TRADD, FADD, Bax, citocromo c, caspase-8, -9 e -3, ao passo que inibe as proteínas anti-apoptose, Bcl-2 e Bcl-xL, sugerindo que a via extrínseca da apoptose pode estar envolvida na morte celular induzida por SM (LIANG et al., 2004; LIU et al., 2004; SHIU et al., 2007; LIANG et al., 2008; WU et al., 2011; DING et al., 2012). Por fim, a terceira hipótese foi constatada com o auxílio da técnica de citometria de fluxo, em que foi possível verificar que após o tratamento das células com SM houve uma drástica mudança da fase celular G₂/M, correspondente a fase em que ocorre divisão celular, para a sub-G₁, fase em que as

células não se dividem e permanecem neste estágio até a morte. Portanto, esta mudança de fase celular também é considerada outra via de apoptose (KUO et al., 2000; LIU et al., 2004; SHIU et al., 2007). Dessa forma, nota-se que a apoptose se tornou um foco de interesse na oncologia, pois a alteração deste processo pode levar ao surgimento de malignidades (KUO et al., 2000; LIU et al., 2004).

1.6 Doenças fúngicas causadas por dermatófitos e *Candida* spp.

Infecções humanas, particularmente aquelas que envolvem a pele e as mucosas, constituem um grave problema de saúde, especialmente em regiões tropicais e subtropicais de países em desenvolvimento. Nos últimos anos, tem havido uma busca por novos compostos antifúngicos devido à falta de eficácia, os efeitos colaterais e a resistência associada com os fármacos existentes (GURGEL et al., 2005). Além do mais, tem sido relatado um notável aumento na incidência de diferentes micoses, causada pela agressiva quimioterapia no tratamento do câncer, ao uso indiscriminado de antibióticos de amplo espectro e de imunossupressores nos casos de transplante de órgãos (GHAHFAROKHI et al., 2004; KOROISHI et al., 2008).

Muita atenção tem sido dada aos compostos fungicidas originados de plantas, uma vez que estas possuem sua própria defesa contra fungos patogênicos. Assim, espécies vegetais podem produzir compostos em seu metabolismo secundário que atuem na proteção contra fitopatógenos, os quais têm o potencial de serem ativos contra fungos patogênicos aos homens e animais (GURGEL et al., 2005; VERMA; KABRA; MUKHOPADHYAY, 2011).

Os fungos dermatófitos são os agentes mais comuns causadores de micoses superficiais em humanos e animais, infectando exclusivamente o estrato córneo da pele, cabelo e unha. Esta infecção está relacionada com a produção de enzimas hidrolíticas pelos fungos, as quais são capazes de degradar o compacto tecido queratinizado (ZAUGG et al., 2008). Os dermatófitos subdividem-se nos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*, que se assemelham pela capacidade de utilizarem queratina como substrato (SOARES JÚNIOR et al., 2007; DIEGO, 2011). *Trichophyton rubrum* é a principal espécie de fungo dermatófito causador da dermatofitose, seguido por *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton tonsurans*.

Os fungos *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum* são também ocasionalmente isolados como agentes etiológicos de pacientes com tinea (KANBE et al., 2003). Normalmente, o nome das infecções causadas por dermatófitos estão associadas com as partes anatômicas envolvidas (Tabela 1).

Tabela 1 – Tipos de dermatofitoses.

Dermatofitoses	Área do corpo afetada	Principais espécies envolvidas nas infecções
Tinea barbae	Barba e bigode	<i>Trichophyton</i> spp., principalmente <i>T. mentagrophytes</i>
Tinea capitis	Couro cabeludo	<i>Microsporum</i> spp. e <i>Trichophyton</i> spp., sendo <i>M. canis</i> a espécie predominante
Tinea corporis	Tronco, ombros, pernas e às vezes a face	<i>T. rubrum</i> , <i>M. canis</i> , <i>T. mentagrophytes</i> e <i>T. tonsurans</i>
Tinea cruris	Regiões inguinais (zona dos genitais), ocasionalmente, na parte superior das coxas	<i>T. rubrum</i> e <i>E. floccosum</i>
Tinea favosa	Placa amarelada no couro cabeludo com formação de crosta	<i>Trichophyton schoenleinii</i>
Tinea imbricata	É uma manifestação específica da tinea corporis, sendo considerada uma micose crônica do corpo	Seu único agente etiológico é <i>Trichophyton concentricum</i>
Tinea manuum	Palma das mãos e espaços interdigitais	A maioria dos casos é provocada por <i>T. rubrum</i>
Tinea pedis (pé de atleta)	Regiões plantares e espaços interdigitais	<i>T. rubrum</i> , <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i> e <i>E. floccosum</i>
Tinea unguium	Unhas	<i>T. rubrum</i> e <i>T. mentagrophytes</i> var. <i>interdigitale</i>

(WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995; DIEGO, 2011)

Com base em seus nichos ecológicos principais, os dermatófitos são categorizados como antropofílico (parasitam homens), geofílicos (presentes no solo), ou zoofílicos (parasitam animais). Diversos dermatófitos podem ser associados com mais de um nicho ecológico. A principal vantagem deste sistema de classificação reside em determinar a origem dos dermatófitos e a causa de uma infecção. Clinicamente, dermatófitos geofílicos e zoofílicos são os principais responsáveis pela formação de lesões mais graves. Em contraste, espécies antropofílicas causam lesões com pouca inflamação, mas que podem persistir por longos períodos (WALKER et al., 2006).

Muito embora os fungos dermatofíticos acometam grande parcela da população mundial, as infecções por espécies do gênero *Candida* ocorrem com uma frequência ainda maior, principalmente em indivíduos que apresentam baixa imunidade. Algumas espécies de *Candida* residem no organismo como comensais da flora microbiana normal, sem causar danos à saúde. Entretanto, tais espécies também são os agentes responsáveis por causar candidíase oral e vaginal, provocando a morte de milhões de indivíduos no mundo todo (NAGLIK et al., 2011).

As espécies de *Candida* são frequentemente isoladas de mucosas, porém a incidência de candidemia, que são as infecções hospitalares causadas por *Candida* spp. na corrente sanguínea, vem aumentando consideravelmente nos últimos anos. Isso ocorre devido às terapias mais invasivas para o tratamento de doenças como câncer e da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (HA et al., 2011). Em uma revisão realizada por Falagas, Roussos e Vardakas (2010) demonstrou-se que em hospitais do Brasil a espécie *Candida albicans* é a que apresenta maior patogenicidade, seguida de *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei*. Os medicamentos da classe dos azóis são preferencialmente utilizados no tratamento da candidíase, sendo que fluconazol é o principal medicamento de escolha. Todavia, a utilização deste medicamento pode ser limitante quando não se tem o conhecimento prévio sobre a espécie de *Candida* infectante, uma vez que as espécies *C. glabrata* e *C. krusei* podem apresentar resistência a este fármaco (HA et al., 2011).

1.7 Câncer de pele

A utilização do gênero *Solanum* contra o câncer é secular e estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que os compostos SM e SS são capazes de suprimir o desenvolvimento do câncer (WU et al., 2011).

A descoberta de novos fármacos eficazes para o tratamento dos diversos tipos de câncer continua desafiando pesquisadores. O câncer de pele é o tipo mais frequente, correspondendo a cerca de 25% de todos os tumores malignos registrados no Brasil. Os tipos de câncer de pele mais comuns são o carcinoma basocelular, responsável por 70% dos diagnósticos de câncer de pele, o carcinoma espinocelular com 25% dos casos, e o melanoma, detectado em 4% dos pacientes (Figura 3) (INCA, 2012). Os carcinomas basocelular e espinocelular são também chamados de câncer de pele não-melanoma, enquanto outros tipos, com origem nos melanócitos, são denominados câncer de pele melanoma (ARMSTRONG; KRICKER, 2001).

Figura 3 – Tipos de células afetadas no câncer de pele. Adaptado de A.D.A.M. Disponível em: <<http://adam.about.net/reports/Melanoma-and-other-skin-cancers.htm>>. Acesso em: 06 Fev. 2012.

Apesar de o câncer basocelular ser o mais incidente, é o câncer menos agressivo e raramente sofre metástase, pois o crescimento das células basais é lento. Em contraste, os cânceres espinocelular e melanoma apresentam alto índice de metástase, uma vez que o crescimento das células espinocelulares e dos melanócitos é mais acelerado e por se localizarem próximas aos nódulos linfáticos, podem ser facilmente espalhadas pela corrente sanguínea (GREEN; KHAVARI, 2004).

No cenário mundial, a Austrália é o país que apresenta uma das maiores incidências de câncer de pele, sendo que por ano há uma estimativa de 434.000 casos de câncer não-melanomas e 10.300 melanomas (CANCER COUNCIL AUSTRALIA, 2012). Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o número de casos novos de cânceres de pele não melanoma estimados para o Brasil em 2012 é de 62.680 entre homens e de 71.490 nas mulheres. Estes valores correspondem a um risco estimado de 65 e 71 casos novos a cada 100 mil homens e mulheres, respectivamente (INCA, 2012).

Atualmente, os cânceres de pele do tipo não-melanoma são tratados através de cirurgia, eletrodissecação, criocirurgia, aplicação tópica de podofilina e 5-fluoracil e radioterapia. Estas terapias possuem alto custo além de apresentarem o inconveniente de deixar cicatrizes, causar hipo e hiperpigmentação e efeitos colaterais, tais como: dor, inflamação severa, irritação e feridas, as quais podem durar semanas e, inclusive, provocar o reaparecimento do câncer (PENG et al., 1995; STENDER; WULF, 1996; WU, 2011). Todos esses inconvenientes e os índices crescentes de câncer de pele no mundo tornam imprescindível a busca por novos fármacos mais eficientes. Desse modo, a utilização de produtos de origem natural é uma valiosa ferramenta na busca de terapias mais baratas e com menos efeitos colaterais que os tratamentos disponíveis atualmente.

1.8 Estudo de estabilidade e comportamento reológico de formulações

O estudo de estabilidade de uma formulação representa uma etapa crucial nos testes de desenvolvimento de um produto farmacêutico, sendo que a instabilidade de um produto modifica essencialmente os três principais requisitos de uma boa formulação, que são: qualidade, eficácia e segurança (VICENTINI, 2011). Segundo o

Guia para realização de estudos de estabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), a estabilidade dos produtos depende de fatores ambientais, tais como: temperatura, umidade, luz, propriedades físicas e químicas de substâncias ativas e excipientes, forma farmacêutica, processo de fabricação e dos tipos e propriedades dos materiais de embalagem (BRASIL, 2005). Existem diferentes testes de estabilidade, como a de acompanhamento, acelerada, cumulativa, de longa duração, de longa duração parcial e de uso. Entretanto, para que um produto biológico terminado entre no mercado é necessário apresentar um relatório completo com os ensaios de estabilidade acelerada e de longa duração, sendo que este último ensaio pode ser parcial (BRASIL, 2011).

O estudo de estabilidade acelerada visa avaliar as possíveis degradações químicas e físicas do produto em condições forçadas de armazenamento (temperaturas altas ou baixas). Dessa forma, este estudo de estabilidade demonstra de maneira empírica o que poderá ocorrer com o produto farmacêutico em condições normais de armazenamento após longo período de tempo. Também serve para avaliar as possíveis mudanças químicas e físicas que podem ocorrer após serem expostas por curto período de tempo a condições fora daquelas estabelecidas no rótulo, sendo que esta exposição a diferentes temperaturas geralmente ocorre durante o transporte do produto (BRASIL, 2004, 2005, 2011). Já o estudo de estabilidade de longa duração é realizado com produtos com prazo de validade superior a 12 meses, em que são realizadas avaliações do produto durante e, opcionalmente, depois do prazo de validade estipulado. Tal teste tem por finalidade estabelecer ou confirmar o prazo de validade do produto, além de recomendar as condições de armazenamento (BRASIL, 2011). Todavia, não apenas o teste de estabilidade é importante para o desenvolvimento de uma formulação, como também o estudo do comportamento reológico. A reologia é uma área ampla que atua em vários campos da tecnologia, como na ciência de materiais e mecânica de sólidos (TANNER, 2009). Com o auxílio dos estudos reológicos é possível verificar a consistência exata da formulação para uma boa aplicação na pele, proporcionando um bom espalhamento e a dispersão dos seus compostos ativos (TADROS, 2004).

1.9 Relevância do tema

Nas últimas décadas, a busca por novos agentes antimicrobianos, principalmente de fontes naturais, vem ganhando destaque. Neste sentido, os vegetais constituem uma enorme e importante fonte de produtos naturais que são biologicamente ativos (GURGEL et al., 2005; STOPPA, 2009). O potencial da espécie *S. lycocarpum* para atividade antifúngica ainda não foi avaliado, mas sabendo-se que as saponinas, em geral, são excelentes antifúngicos para uso tópico, justificam-se os ensaios antifúngicos propostos, tendo em vista que os heterosídeos alcaloídicos presentes na planta são saponinas esteroidais. Há que se destacar que uma formulação de uso tópico foi desenvolvida pelo grupo para uso contra câncer de pele. Assim, este produto formulado contendo o extrato alcaloídico também terá potencial para o tratamento de dermatofitoses.

Os heterosídeos alcaloídicos, SM e SS, presentes na espécie *S. lycocarpum* apresentam atividade anticancerígena marcante de acordo com a literatura (DAUNTER; CHAM, 1990; LEE et al., 2004; WU et al., 2011; DING et al., 2012). Neste sentido, o desenvolvimento da forma farmacêutica para uso tópico contendo extrato alcaloídico de *S. lycocarpum* é uma alternativa para a terapêutica no tratamento de lesões dérmicas pré-cancerígenas e cancerígenas, não-melanômicas. Portanto, a realização dos ensaios anticancerígenos *in vivo*, utilizando modelo animal, fez parte do cronograma de atividades deste projeto. Dessa forma, este projeto teve interface tecnológica, pois buscou-se o desenvolvimento de um futuro fitoterápico anticâncer para uso tópico, uma vez que a incidência de câncer de pele no mundo é alarmante e as terapias atuais não são satisfatórias (CONSTANTINIDES, 1995).

S. lycocarpum é uma espécie adaptada ao Cerrado brasileiro e produz grande quantidade de frutos (20 a 60 kg de frutos por indivíduo), sendo dessa forma altamente produtiva. Assim, havendo o desenvolvimento de produto comercial, a disponibilidade de matéria-prima não será difícil, considerando, ainda, que em experimentos iniciais foi observado que é de fácil cultivo e crescimento rápido, pois após 11 meses as unidades cultivadas floresceram.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

Objetivos gerais:

- ❖ Investigar a atividade anticâncer de pele de uma formulação tópica contendo 1 % de extrato alcaloídico de *S. lycocarpum* e o potencial antifúngico do extrato e dos heterosídeos alcaloídicos contra dermatófitos.

Objetivos específicos:

- ❖ Obter o extrato alcaloídico a partir dos frutos de *S. lycocarpum*;
- ❖ Isolar os heterosídeos alcaloídicos SM e SS e obter a aglicona SD a partir do extrato alcaloídico de *S. lycocarpum*;
- ❖ Avaliar a atividade antifúngica do extrato alcaloídico e dos heterosídeos alcaloídicos isolados utilizando cepas de fungos dermatófitos e *Candida* spp.;
- ❖ Avaliar a estabilidade acelerada e realizar a caracterização física da formulação contendo extrato alcaloídico de *S. lycocarpum*;
- ❖ Avaliar a citotoxicidade do extrato alcaloídico e das substâncias isoladas *in vitro* pelo teste de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT);
- ❖ Avaliar a atividade anticâncer de pele *in vivo* da formulação contendo o extrato alcaloídico de *S. lycocarpum*;
- ❖ Avaliar por imunistoquímica os tumores marcados com o anticorpo caspase-3.

3. Material e métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta do fruto de *S. lycocarpum* e extração dos heterosídeos alcaloídicos

Os frutos foram coletados no horto da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP-USP). Em seguida, foram picados e submetidos à secagem em estufa de ar quente e circulante a 45 °C. Após secagem, o material vegetal foi submetido à moagem em moinho de martelos. Uma exsicata foi depositada no herbário do Departamento de Biologia da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto (FFCLRP-USP) sob o número de registro SPFR: 11638, sendo identificada pelo Prof. Dr. Milton Groppo Júnior da FFCLRP-USP.

O processo de extração seletiva dos alcalóides do fruto de *S. lycocarpum* foi realizado com o material vegetal seco e triturado, utilizando-se o método de extração ácido-base (HENRIQUES et al., 2004). Para tanto, cerca de 4 kg do material vegetal moído foi submetido à extração aquosa ácida, utilizando-se de solução de ácido clorídrico 0,05 M até atingir o pH 2 e deixada em maceração pelo período de 24 horas. Em seguida, o material foi submetido à filtração e o extrato obtido foi alcalinizado até pH 10, utilizando-se hidróxido de sódio 3,0 M. Após 24 horas de alcalinização do meio houve formação de precipitado, o qual foi separado por decantação, seguido de centrifugação e posterior secagem em estufa à 45 °C. O precipitado seco foi triturado e suspenso em etanol, seguido de filtração. O extrato alcaloídico, constituído majoritariamente dos heterosídeos alcaloídicos, foi concentrado em rotaevaporador a vácuo (Figura 4).

Figura 4 – Esquema da extração seletiva ácido-base dos alcalóides da espécie *S. lycocarpum*.

3.1.1 Cromatografia em coluna a vácuo do extrato alcaloídico

O extrato alcaloídico (1,6 g) foi submetido à cromatografia em coluna a vácuo (CCV), tipo *flash*, de acordo com metodologia descrita por Still, Kahn e Mitra (1978). Para isso, uma coluna de vidro de 52 x 5 cm de raio foi empacotada com 283 g de sílica gel 60 (0,040-0,063 mm) (*Merck*) (art 1093851000). Desta coluna foram coletadas 85 frações de 40 mL, na vazão de 15 mL/min, utilizando fase móvel isocrática de AcOEt : MeOH : H₂O : NH₄OH (63 : 40 : 2 : 0,3). As frações obtidas foram reunidas de acordo com a análise em cromatografia de camada delgada comparativa (CCDC). A partir de tal análise as frações que apresentaram os constituintes de interesse foram purificadas por cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativa (CLAE semipreparativa).

3.1.2 CLAE semipreparativa

Para a purificação das frações obtidas por CCV utilizou-se o equipamento de CLAE semipreparativa acoplado ao detector UV/VIS (SPD-20 A *Shimadzu*) com software LC solution versão 1.1 e coluna semipreparativa de fase reversa (*Shimadzu* – CLC – ODS (M) C₁₈, 250 mm x 20 mm, com partículas de 5 µm, vazão de 8 mL/min). A eluição foi feita em modo isocrático com a fase móvel ACN : H₂O (3:7) com 0,01 % de TFA e tempo de eluição de 20 minutos.

Para a obtenção dos heterosídeos alcaloídicos, SS e SM, alíquotas de 25 mg das frações obtidas por CCV foram solubilizadas em metanol grau CLAE, filtradas em membranas de 0,45 µm e injetadas no aparelho de CLAE semipreparativa. As frações coletadas foram concentradas em rotaevaporador e, posteriormente, secas a vácuo. (*Speed-vacum* Savant SPD2010). Para obtenção dos heterosídeos alcaloídicos, várias injeções foram realizadas (STICHER, 2008). A verificação da pureza dos compostos isolados foi verificada por CLAE-DAD (cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos) analítico (*Shimadzu*).

3.1.3 Obtenção da aglicona solasodina

A SD corresponde ao núcleo esteroidal dos heterosídeos alcaloídicos SM e SS. Assim, para que ocorresse a hidrólise dos açúcares presentes nestas substâncias foi

necessário submeter 6 g do extrato alcaloídico (obtido conforme descrito no item 3.1.1), rico em SM e SS, em metanol acidificado com ácido clorídrico (pH 1,0), à refluxo por 8 horas. Em seguida, a solução foi concentrada a vácuo em rotaevaporador para retirar o excesso de metanol. Hidróxido de sódio 6 M foi adicionado até obtenção de pH 12,0. Após a adição da base, o núcleo esteroidal ficou na forma de base livre e pode ser extraído através de partição com AcOEt. Com a massa obtida realizou-se cromatografia em coluna clássica utilizando sílica gel (60 – 200 *mesh*) como fase estacionária. Como fase móvel utilizou-se AcOEt e MeOH, iniciando-se com 100 % de AcOEt e terminando com 100 % de MeOH.

3.1.4 Quantificação de solamargina e solasonina no extrato alcaloídico

A quantificação de SM e SS presente no extrato alcaloídico foi realizada solubilizando-se 10 mg de extrato em 50 mL de solução de padrão interno, veratraldeído a 3 µg/mL em etanol 80%. Esta solução foi filtrada em papel de filtro e alíquotas de 1 mL foram novamente filtradas em filtros de seringa com porosidade de 0,45 µm (*Millipore*®). As análises foram realizadas em CLAE (*Shimadzu*), equipado com duas bombas LC-10AD, detector de UV modelo SPD – M10Avp e sistema controlador modelo SCL-10Avp integrado a software Class-VP versão 5.02. Empregou-se coluna analítica Zorbax SB-C₁₈ (*Agilent*) (4,6 x 250 mm, 5 µm) e método isocrático de eluição utilizando-se a fase móvel constituída de razão de acetonitrila: tampão fosfato 0,01 M, pH 7,2, (36,5%) sob vazão de 1 mL/min, injeção de 20 µL de amostra, tempo de eluição de 20 minutos e detecção em 200 nm.

3.2 Avaliação da atividade antifúngica contra fungos dermatófitos e *Candida* spp.

A avaliação da atividade antifúngica do extrato alcaloídico de *S. lycocarpum*, aglicona (SD) e dos heterosídeos alcaloídicos (SM e SS) foi realizada segundo a metodologia proposta pelo *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS) atual *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (NCCLS, 2002). O meio de cultivo utilizado foi o caldo RPMI-1640 GIBCO BRL® (Life Technologies, Grand Island, EUA), com glutamina, sem bicarbonato de sódio, suplementado de glicose e tamponado com [ácido 3-(N-morfolino)-propanossulfônico] (MOPS) em pH 7,0.

As cepas padrões de fungos dermatófitos utilizadas foram obtidas da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC), *T. mentagrophytes* ATCC 9533, *T. rubrum* ATCC 28188, *M. canis* ATCC 36299 e *M. gypseum* ATCC 24102. A suspensão final do inóculo foi preparada em solução fisiológica (0,85 %) esterilizada, utilizando-se cultura de sete dias. Foram adicionados 2 mL de solução fisiológica e, a seguir, com o auxílio de um swab esterilizado, os conídios foram removidos por meio de raspagem do micélio aderido ao meio de cultura. A mistura foi transferida para um tubo cônico esterilizado e o volume completado para 5 mL. A seguir, o inóculo foi ajustado por contagem de conídios em câmara de Neubauer para a obtenção de uma concentração igual a $1-5 \times 10^6$ UFC/mL. A suspensão inicial de cada micro-organismo foi diluída 1: 100 em meio RPMI para a obtenção de uma suspensão $1-5 \times 10^4$ UFC/mL. Volumes de 100 µL desta suspensão foram inoculados nos poços da placa de microdiluição. A viabilidade e a pureza do inóculo foram controladas por cultivo de alíquotas de suspensão em placas de ágar Sabouraud dextrose, incubadas a 30 °C durante sete dias.

Os inóculos das espécies de *Candida* foram preparados em água deionizada esterilizada, equivalente à escala 0,5 de McFarland, utilizando-se colônias de 24 horas. Em seguida, foi ajustado por contagem de células em câmara de Neubauer, para a obtenção de um inóculo de concentração igual a $1-5 \times 10^6$ UFC/mL. A viabilidade e a pureza do inóculo foram controladas por cultivo de alíquotas de suspensão em placas de ágar Sabouraud dextrose, incubadas a 37 °C durante 48 horas. As cepas utilizadas foram *C. albicans* ATCC 64548, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. krusei* ATCC 6258, *C. glabrata* ATCC 90030 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. A suspensão inicial de cada micro-organismo foi diluída 1:50 e posteriormente 1:20 em meio RPMI para a obtenção de uma suspensão $1-5 \times 10^3$ UFC/mL. Volumes de 100 µL desta suspensão foram inoculados nos poços da placa de microdiluição. As substâncias analisadas quanto a sua atividade antifúngica foram diluídas em 5 % de dimetilsulfóxido (DMSO) e em meio RPMI.

Alíquotas de 100 µL de cada substância testada foram depositadas nos poços da coluna 2 que continha 100 µL de inóculo em meio RPMI e também nos poços da coluna 3, que continham 100 µL de inóculo em meio RPMI mais outros 100 µL de meio RPMI. Em seguida, diluições seriadas foram realizadas nos poços 3 a 11 da placa de microdiluição, atingindo um volume final de 200 µL por poço. Os poços da

coluna 1 foram utilizados como controle do meio (controle negativo), sendo depositado nestes 200 μ L de meio RPMI. Os poços da coluna 12 foram utilizados como controle de crescimento do micro-organismo, sendo depositado nestes 100 μ L de inóculo e 100 μ L de meio RPMI (Figura 5).

Legenda:

- **Coluna 1:** 200 μ L meio RPMI.
- **Coluna 2:** 100 μ L de inóculo em meio RPMI + 100 μ L amostra.
- **Colunas 3 - 11:** 100 μ L de meio RPMI + 100 μ L de amostra (diluições seriadas) + 100 μ L de inóculo.
- **Coluna 12:** 100 μ L de meio RPMI + 100 μ L de inóculo.

Figura 5 – Esquema da montagem da microplaca para a determinação da atividade antifúngica.

Como controle positivo para os fungos dermatófitos utilizou-se cetoconazol nas concentrações de 50,0 a 0,09 μ g/mL e para as leveduras do gênero *Candida* utilizou-se fluconazol 64,0 a 0,125 μ g/mL e itraconazol 16,0 a 0,03 μ g/mL. Para o extrato alcaloídico, as concentrações variaram entre 500 e 0,97 μ g/mL. Já para as substâncias isoladas SM, SS e SD as concentrações variaram entre 250 e 0,48 μ g/mL. Além de avaliar os alcalóides SM e SS separadamente, também se verificou a atividade dessas substâncias nas seguintes proporções: 75% SS + 25% SM, 50% SS + 50% SM e 25% SS + 75% SM.

As microplacas foram incubadas a 30 °C por cinco dias para os fungos dermatófitos e a 35 °C por 48 horas para espécies do gênero *Candida*. A leitura foi realizada visualmente, comparando-se o crescimento nos poços do controle positivo e negativo com os demais poços referentes às concentrações das substâncias testadas.

Foi considerada concentração inibitória mínima (CIM) a menor concentração capaz de inibir o crescimento de 100 % dos dermatófitos e *Candida* spp. Posteriormente, um volume de 10 µL da respectiva CIM foi semeado em placas de ágar Sabouraud dextrose por estrias e, após incubação a 30 °C por cinco dias para os fungos dermatófitos e a 37 °C por 48 horas para espécies de *Candida*, foi observada a presença ou ausência de crescimento de micro-organismos, considerando a concentração fungicida mínima (CFM) a menor concentração capaz de matar 100 % dos fungos. Todos os testes foram realizados em duplicata.

3.3 Preparo da formulação com atividade anticâncer de pele e contra fungos dermatófitos

Com a intenção de produzir uma formulação eficiente contra o câncer de pele e os fungos dermatófitos, o grupo de pesquisa do Laboratório de Farmacognosia em colaboração com o Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, ambos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, realizaram a extração seletiva de alcalóides do fruto da espécie *S. lycocarpum*, obtendo-se um extrato rico nos compostos SM e SS. Este extrato foi incorporado em uma formulação e, em seguida, diversos ensaios *in vitro* e *in vivo* foram realizados para analisar a absorção dos heterosídeos alcaloídicos na pele. As formulações tinham como base o gel de hidroxietilcelulose (Natrosol 250 MR) que foi preparado com os componentes descritos na Tabela 2 sob aquecimento (75 °C) e agitação.

Tabela 2 – Componentes e concentrações do gel de hidroxietilcelulose.

Componentes	Concentração (%)
Hidroxietilcelulose	2 %
Propilenoglicol	1 %
Metilparabeno	0,18 %
Propilparabeno	0,02 %
Tampão fosfato 100 mM (pH 6,5)	q.s.p.

Ao gel de hidroxietilcelulose foram adicionados os compostos apresentados na Tabela 3. Com o auxílio do homogeneizador de alta rotação ultra-turrax na velocidade 8000 rpm/min foram misturados os componentes e produzida a formulação contendo extrato e o controle da formulação. A monoleína (monoleato de glicerol) (*Kerry*) foi utilizada como promotor de absorção dos compostos SM e SS presentes no extrato alcaloídico.

Tabela 3 – Componentes da formulação contendo extrato e da formulação controle com suas respectivas concentrações em porcentagem (%).

Componentes	Concentração (%)
Extrato alcaloídico de <i>S. lycocarpum</i> *	1 %
Propilenoglicol	5 %
Monoleína	5%
Gel de Hidroxietilcelulose	q.s.p.

* A formulação controle foi preparada com as mesmas concentrações dos componentes. Porém, não continha o extrato alcaloídico de *S. lycocarpum* 1 %.

3.4 Estudo de estabilidade da formulação

Como parâmetros para realização do teste de estabilidade acelerada foram utilizadas as normas preconizadas pela ANVISA (BRASIL, 2004). Assim, a formulação contendo 1 % de extrato alcaloídico de *S. lycocarpum* e a formulação controle foram preparadas e armazenadas em *ependorfs* nas temperaturas de 37 ± 2 °C/ 75 % UR $\pm$ 5 % UR (estufa), 27 ± 2 °C (ambiente) e 5 ± 2 °C (geladeira). As amostras foram analisadas nos tempos 0, 24 horas, 7, 15, 30, 60 e 90 dias.

3.4.1 Caracterização física da formulação

Antes de iniciar o estudo de estabilidade acelerada todas as amostras foram submetidas ao teste de centrifugação a 3.000 rpm durante 30 minutos. Na caracterização física da formulação utilizou-se avaliação visual, na qual as formulações foram observadas quanto à alteração de cor, homogeneidade e separação de fases. Na avaliação do pH, amostras de formulação contendo extrato e da formulação controle foram diluídos a 10 % em água deionizada e o valor do pH determinado em temperatura ambiente, utilizando-se peagâmetro (Digimed, SP, Brasil). A microscopia de luz polarizada foi realizada após 24 horas de preparo das formulações para a identificação de materiais líquido-cristalinos, utilizando microscópio óptico com filtro de luz polarizada (Carl Zeiss AG, Alemanha).

O comportamento reológico da formulação foi verificado no tempo 24 horas, armazenadas em 27 ± 2 °C (temperatura ambiente) e no tempo 30 dias, após serem armazenadas nas temperaturas de 37 ± 2 °C/ 75 % UR $\pm$ 5 % UR (estufa), 27 ± 2 °C (ambiente) e 5 ± 2 °C (geladeira) com o auxílio do reômetro Brookfield R/S plus tipo cone/placa, com spindle C-25 mm. Todas as medidas foram realizadas em 25 °C e em triplicata. As medidas foram realizadas empregando-se velocidades de rotação crescentes, de 0 a 33,3 rpm, para obtenção da curva ascendente e o procedimento foi repetido no sentido inverso para obtenção de curva descendente. Este procedimento foi realizado no intervalo de tempo de 60 segundos.

3.5 Avaliação da citotoxicidade das substâncias isoladas e do extrato alcaloídico pelo teste de MTT

A citotoxicidade das substâncias isoladas SM, SS, SD e do extrato alcaloídico foram avaliadas pelo teste de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina (MTT) frente às células A431 (células humanas de carcinoma espinocelular) e L929 (células de fibroblastos de camundongos), obtidas da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC, Rockville, MD, USA). As células foram cultivadas a 37 °C em atmosfera contendo 5 % de CO₂ no meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), suplementado com 10 % de soro bovino fetal (FBS), 0,5 % de penicilina e 0,5 % de ciprofloxacina.

Para realização do teste de MTT, $0,5 \times 10^5$ células por poço foram semeadas em microplacas de 96 poços. Após 24 horas de incubação as substâncias isoladas, o extrato alcaloídico e a doxorrubicina (controle positivo) ($n = 8$) foram aplicados na placa em concentrações que variavam de 1 $\mu\text{g/mL}$ a 100 $\mu\text{g/mL}$ e deixados em contato com as células por 12 horas. Todas as amostras analisadas foram solubilizadas em DMSO 1 %, sendo esta solução utilizada como controle negativo do meio. Em seguida, as células foram lavadas com solução salina e deixadas em repouso com meio de cultura incompleto por aproximadamente 12 horas. Após este período, 10 μL de MTT foram adicionados na placa e deixados em contato por 4 horas. Por fim, todo o conteúdo da placa de cultura foi descartado, permanecendo apenas as células viáveis aderidas contendo os cristais de formazan, que foram solubilizados com 200 μL de DMSO e 20 μL de tampão glicina. A leitura da microplaca foi realizada em espectrofotômetro de UV/VIS a 570 nm e a viabilidade celular foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = (A \times 100 / B)$$

Em que:

A= média da absorvância do grupo experimental.

B= média da absorvância do grupo controle negativo (DMSO 1 %).

3.6 Avaliação da atividade anticâncer *in vivo*

No ensaio *in vivo* para verificação da atividade anticâncer da formulação contendo 1 % de extrato alcaloídico de *S. lycocarpum* foram utilizados camundongos nude (atímicos) hairless machos, com idade aproximada de oito semanas e pesando cerca de 20 g. Os animais foram provenientes da Fundação de Apoio e Fomento à Inovação Tecnológica à Pesquisa e ao Ensino (FAFITPE), São Paulo e foram mantidos em biotério aclimatado à temperatura ambiente controlada (27 ± 2 °C), em regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 horas e com livre acesso a água e dieta comercial balanceada. Por se tratar de camundongos atímicos, estes animais foram alojados em microisoladores que eram autoclavados duas vezes por semana juntamente com a ração, água e a maravalha.

A indução do tumor não-melanoma do tipo espinocelular foi realizada com a aplicação subcutânea de 2×10^6 células A431 no dorso de cada animal (Figura 6). Estas células foram cultivadas conforme descrito no item 3.5 (ANAND et al., 2009). Após 6 a 10 dias da aplicação das células foi possível verificar o surgimento do tumor. Quando o tumor atingiu as dimensões de 0,7 cm de largura por 0,7 cm de comprimento, o tratamento do animal foi iniciado.

Figura 6 – Indução tumoral dos animais com células A431.

Os animais foram divididos em quatro grupos ($n = 5$), sendo distribuídos da seguinte maneira:

- ❖ Grupo formulação Curaderm BEC 5 (formulação que contém 0,005 % dos isolados SM e SS, ácido salicílico e uréia);
- ❖ Grupo formulação contendo 1 % de extrato alcaloídico de *S. lycocarpum* (formulação padronizada por nosso grupo de pesquisa);
- ❖ Grupo formulação controle (veículo da formulação padronizada, sem os princípios ativos);
- ❖ Grupo controle negativo (animais sem nenhum tipo de tratamento).

Durante 50 dias (7 semanas), as formulações foram aplicadas, uma vez ao dia, sobre os tumores dos animais de seu grupo correspondente. Após a aplicação da formulação o tumor era recoberto por um curativo oclusivo. Diariamente cada animal teve seu peso medido, as dimensões dos tumores mensuradas e o aspecto do tumor

registrado por fotografias. Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e o tumor foi dissecado do dorso do animal para a realização do estudo histológico e imunoistoquímico.

O protocolo de experimentação com os animais foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da USP – *campus* de Ribeirão Preto, com protocolo de nº 11.1.1051.53.1.

3.7 Coleta e processamento do tecido

Para coleta do tumor, após a morte dos animais em câmara de CO₂, estes foram submetidos à biópsia excisional, que consiste na retirada total do tumor e da área circundante para diagnósticos. O tumor retirado foi seccionado em fatias de aproximadamente dois milímetros e foram submersos em formalina tamponada a 10 % por um período mínimo de 24 horas. Em seguida, os tecidos foram desidratados em alcoóis de concentrações crescentes (70 %, 80 %, 90 % e 100 %) por aproximadamente cinco horas.

Posteriormente, para a diafanização do material, as peças foram submergidas em xilol 100 % por 1 hora e 20 minutos. Após este período, as amostras foram deixadas em parafina líquida na temperatura de 60 °C por 4 horas e, em seguida, foram incluídas em blocos de parafina na posição desejada para realização do corte. Com o auxílio do micrótomo, os blocos foram cortados na espessura de 5 µm e as lâminas foram montadas.

Para realizar a coloração das lâminas, estas foram novamente hidratadas, passando inicialmente pelo banho de xilol 100 % e depois de alcoóis (100 %, 90 %, 80 % e 70 %). As lâminas foram coradas com hematoxilina por três minutos e contra coradas com solução de eosina por 10 segundos. Por fim, as lâminas foram novamente desidratadas em concentrações crescentes de alcoóis e, em seguida, foram diafanizadas em xilol, que é o meio miscível de Entelan® (Merck & Co. Inc, As), utilizado para montagem das lâminas.

3.8 Imunoistoquímica

A imunoistoquímica foi realizada conforme descrito no item anterior até a parte em que as lâminas foram desparafinadas e hidratadas. Posteriormente, estas lâminas passaram por um processo de recuperação antigênica através de incubação em panela a vapor em meio tamponado com tampão citrato em pH 6,0 por 40 minutos. Após resfriamento do material, as peroxidases teciduais endógenas foram removidas pela adição do peróxido de hidrogênio e ligações inespecíficas de anticorpo primário foram evitadas por adição de soro de cavalo na proporção de 1:50. Aplicou-se o anticorpo primário por duas horas e realizou-se a lavagem com tampão fosfato em pH 7,4. Em seguida, as lâminas foram incubadas com anticorpo secundário por 30 minutos, seguido pelo polímero conjugado (Kit PicTure™ MAX Polymer ZYMED® Laboratories) também por 30 minutos e corou-se com diâmino benzidina (DAB) por 1 minuto. O anticorpo primário utilizado foi caspase-3 (Novocastra®, UK, clone JHM62) em diluição de 1:100, incubados por 12 horas (overnight) em câmara úmida. A imunoreatividade foi considerada positiva quando detectada coloração marrom avermelhada no citoplasma das células para marcação do anticorpo caspase-3.

Para contagem das células marcadas por caspase-3 foi analisada a região do fronte de invasão, que fica na margem do tumor, a cerca de 30 µm de distância. Para cada tumor, foram tiradas quatro fotografias desta região com microscópio com aumento de 40X (Carl Zeiss AG, Alemanha). Em seguida, com o auxílio do software ImageJ, foram contadas as células marcadas por caspase-3 nas fotografias e esses valores foram posteriormente analisados estatisticamente.

3.9 Análise estatística

A análise estatística do presente trabalho foi realizada com o auxílio do software *Prism GraphPad 5*®. O estudo de comportamento reológico das formulações foi analisado pela diferença estatisticamente entre dois grupos, que foram avaliados pelo teste *t* não-pareado. As diferenças foram consideradas significativas com valores de $P < 0,05$.

Para a análise estatística dos resultados obtidos no teste de MTT, na avaliação do volume tumoral e imunoistoquímica, foi utilizada a análise de variância

não paramétrica (one-way ANOVA), sendo que as diferenças entre os grupos foram comparadas pelo teste de Tukey, com $P < 0,05$ considerados estatisticamente significativos (SOKAL; ROHLF, 1995). No teste de MTT também foi calculada a dose citotóxica para 50 % das células (CI_{50}) utilizando-se o método estatístico de curva dose-resposta sigmoidal.

4. Resultados e discussão

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Obtenção do extrato alcaloídico

No processo de extração seletiva ácido-base dos frutos de *S. lycocarpum*, o rendimento final foi de 35,8% de precipitado. Além disso, realizou-se a solubilização do precipitado em etanol e o rendimento da fração etanólica, contendo os heterosídeos alcaloídicos, foi de 1,23% em relação aos frutos secos e triturados.

Schwarz et al. (2007), relatou rendimento de 1,85% de alcalóides totais no fruto do lobo, sendo que 0,06 % correspondia a SM e 0,09 % a SS. Porém, a técnica de extração utilizada no presente trabalho foi diferente da relatada por Schwarz et al. (2007). Ademais é necessário levar em consideração que os materiais vegetais utilizados para a extração foram diferentes e coletados em locais e épocas diferentes (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

4.2 Obtenção das substâncias isoladas

Após cromatografia em coluna a vácuo do extrato alcaloídico, reuniram-se as frações 31-45 (698 mg) que apresentaram SM e as frações 58-70 (501 mg) que apresentaram SS, quando avaliadas em CCDC. A partir destas frações 31-45 e 58-70, injetaram-se 374 mg e 269 mg, respectivamente, para repurificação em CLAE-semipreparativa, obtendo-se rendimentos de 30,29 % (113,3 mg) de SM e 12,86 % (34,6 mg) de SS. A aglicona solasodina foi isolada de 6 g do extrato alcaloídico hidrolisado e particionado com AcOEt, apresentando rendimento de 33 % (2,01 g) de aglicona e impurezas. Dessa forma, foi necessário uma repurificação da amostra por coluna clássica, sendo que o rendimento final foi 19 % (1,13 g) em relação à massa do extrato alcaloídico inicial.

Os alcalóides isolados foram comparados frente a padrões autênticos previamente identificados e isolados pelo grupo.

4.3 Quantificação de solamargina e solasonina no extrato alcaloídico

A quantificação dos heterosídeos alcaloídicos SM e SS foi realizada em CLAE, conforme descrito no item 3.1.4.

O comprimento de onda de melhor detecção desses compostos foi em 200 nm. O uso deste baixo comprimento de onda foi devido ao fato da SM e SS possuírem apenas um grupo cromóforo (uma única ligação dupla).

Na Figura 7 está apresentado o cromatograma do extrato alcaloídico.

Figura 7 – Perfil cromatográfico do extrato alcaloídico de *S. lycocarpum* por CLAE-UV. Condições cromatográficas: Zorbax-SB (5 μ m), 250 x 4,6 mm. Fase móvel: ACN: Tampão fosfato pH 7,2 (0,01M) (36,5: 63,5), vazão: 1,0 mL/min e detecção em 200 nm.

Os teores dos alcalóides na análise quantitativa do extrato alcaloídico foram de 44,37 % para SM e 45,09 % para SS. A soma dos teores de SS e SM no extrato alcaloídico resultou em 89,46 %, o que demonstra que a extração seletiva ácido-base de tais compostos é bastante efetiva.

4.4 Estudo de estabilidade da formulação

Uma vez terminado o teste preliminar de centrifugação, verificou-se que as amostras não apresentaram nenhuma instabilidade quanto à separação de fases, havendo possibilidade de dar continuidade aos outros testes.

Durante a avaliação visual, conforme apresentado na Figura 8, no tempo 0 e 24 horas verificou-se que a formulação contendo o extrato permanecia ligeiramente amarelada e a formulação controle esbranquiçada, quando armazenadas nas diferentes temperaturas. Porém, ambas as formulações apresentavam-se homogêneas. A partir do sétimo dia, as formulações armazenadas em geladeira (5 ± 2 °C) começaram a apresentar grande quantidade de grumos de monoleína. Já as formulações armazenadas em temperatura ambiente e estufa mantiveram-se com o mesmo aspecto inicial. Após 15 dias, as formulações armazenadas em geladeira apresentavam-se totalmente opacas. As formulações armazenadas em estufa começaram a apresentar alguns grumos e as armazenadas em temperatura ambiente permaneciam constantes, sem diferenças aparentes. Do trigésimo ao nonagésimo dias, as formulações apresentaram separação de fases quando armazenadas em estufa e temperatura ambiente. Quando armazenadas em geladeira permaneceram opacas. Em todos os tempos, o odor das formulações manteve-se semelhante.

Dessa forma, pode-se sugerir que as formulações em estudo podem ser consideradas estáveis quando armazenadas durante 15 dias no ambiente. Assim, todas as formulações utilizadas nos testes posteriores foram preparadas no dia anterior de cada análise, armazenadas em temperatura ambiente e utilizadas num prazo máximo de 15 dias.

No trabalho realizado por Kim et al. (2004), uma formulação de fase cúbica também foi preparada contendo monoleína e apresentou separação de fases após 56 dias, tendo sido constatado por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (^1H NMR) que o óleo que se formava com o tempo tratava-se da monoleína.

Figura 8 – Aspectos visuais das formulações contendo extrato (a) e formulações controle (b) armazenadas em 5 ± 2 °C (geladeira), 37 ± 2 °C (estufa) e 27 ± 2 °C (ambiente), nos seguintes tempos: (A) Tempo 24 horas; (B) 7 dias; (C) 15 dias; (D) 30 dias; (E) 60 dias e (F) 90 dias.

Não houve diferença estatística ($P > 0,05$) entre os valores de pH das formulações nos diferentes tempos de armazenamento, como pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4 – Variação de pH da formulação contendo extrato e da formulação controle em diferentes temperaturas nos tempos 0, 24 horas, 7, 15, 30, 60 e 90 dias.

Temperatura	Formulação contendo extrato	Formulação Controle
Geladeira (5 ± 2 °C)	$6,91 \pm 0,0215$	$6,95 \pm 0,0150$
Ambiente (27 ± 2 °C)	$6,91 \pm 0,0219$	$6,84 \pm 0,0370$
Estufa (37 ± 2 °C)	$6,85 \pm 0,0292$	$6,84 \pm 0,0332$

A técnica de microscopia de luz polarizada permitiu verificar que as formulações são de fase cúbica, uma vez que apresentaram características isotrópicas e não são capazes de desviar o plano de luz incidente (Figura 9). Além disso, as formulações de fase cúbica possuem viscosidade elevada, sendo que esta característica também pôde ser observada na formulação devido à monoleína adicionada ao gel (CHORILLI et al., 2009).

Figura 9 – Imagem com aumento de 10X da formulação controle (A) e formulação contendo extrato (B) em microscópio óptico com filtro de luz polarizada (Carl Zeiss AG, Alemanha). As formulações foram analisadas 24 horas após o preparo.

Com a avaliação do comportamento reológico foi possível observar que as formulações são do tipo não-newtoniana e apresentam comportamento

pseudoplástico, visto que as formulações com este comportamento saem da origem e o material começa a fluir tão logo uma tensão de cisalhamento é aplicada sobre ela. Além disso, a inclinação da curva diminui gradualmente com o aumento da velocidade de cisalhamento (Figura 10) (AULTON, 2005).

Figura 10 – Reogramas das formulações contendo extrato e das formulações controle no (A) tempo 24 horas; (B) 30 dias na geladeira; (C) 30 dias na estufa e (D) 30 dias em temperatura ambiente.

Com o auxílio dos reogramas também foi possível verificar que as formulações apresentaram área de histerese (tixotropia), sendo que esta é uma característica normalmente encontrada em gráficos de formulações com comportamento pseudoplástico (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003).

Dessa forma, a tixotropia apresentada pela formulação está relacionada com a diminuição da viscosidade com o tempo quando uma tensão é aplicada à amostra e a posterior recuperação da viscosidade quando esta tensão é retirada (Figura 11) (MEWIS; WAGNER, 2009). Sendo assim, uma das vantagens da utilização de uma formulação com comportamento pseudoplástico é que sua espalhabilidade é melhor, pois irá perder a viscosidade ao ser aplicada na pele com certa tensão e, logo após que for formado um filme sobre a pele, a viscosidade voltará a ser semelhante à inicial, impedindo que a formulação escorra (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003).

Figura 11 – Gráfico da viscosidade x taxa de cisalhamento das formulações contendo extrato e das formulações controle no (A) tempo 24 horas; (B) 30 dias na geladeira; (C) 30 dias na estufa e (D) 30 dias em temperatura ambiente.

Os dados da Tabela 4 foram analisados estatisticamente comparando-se a formulação controle preparada após 24 horas com as formulações controle preparadas após 30 dias e armazenadas em temperatura ambiente, geladeira e estufa. A mesma análise foi realizada para a formulação contendo extrato. Com isso, foi possível verificar que a viscosidade de todas as formulações analisadas após 30 dias, exceto a formulação controle armazenada em geladeira, apresentaram redução

da viscosidade com $p < 0,001$. Porém, verificando os valores apresentados na Tabela 4, observou-se que as formulações armazenadas por 30 dias em temperatura ambiente e estufa apresentaram considerável diminuição da viscosidade. Isso pode ter ocorrido devido ao fato dessas formulações não apresentarem floculação, provocada pela monoleína, quando expostas às temperaturas mais elevadas (TADROS, 2004).

Os valores referentes ao índice de fluxo menores que 1 confirmam que a formulação apresenta comportamento pseudoplástico (GASPAR; MAIA CAMPOS, 2003; TADROS, 2004). Observou-se que as formulações controle e com extrato armazenadas em temperatura ambiente e estufa por 30 dias, apresentaram aumento significativo nos valores de índice de fluxo ($p < 0,01$).

Com relação à tixotropia verificou-se que as formulações apresentaram baixos valores, que por sua vez, não sofreram alterações significantes durante a armazenagem.

Tabela 4 – Valores de viscosidade, índice de fluxo, tixotropia e coeficiente de correlação da formulação controle (FC) e da formulação contendo extrato (FE) no tempo 24 horas e 30 dias, armazenados nas temperaturas $5 \pm 2^\circ\text{C}$ (geladeira), $27 \pm 2^\circ\text{C}$ (ambiente) e $37 \pm 2^\circ\text{C}$ (estufa).

Formulações	Viscosidade		Índice de Fluxo		Tixotropia	
24 horas FC	$5,316 \pm 0,1870$		$0,1971 \pm 0,0065$		$1729 \pm 71,04$	
24 horas FE	$4,876 \pm 0,0391$		$0,1877 \pm 0,0026$		$2526 \pm 391,4$	
30 dias FC – Geladeira	$4,668 \pm 0,0287$	*	$0,1973 \pm 0,0105$	ns	$1934 \pm 279,8$	ns
30 dias FE – Geladeira	$4,190 \pm 0,0502$	***	$0,2058 \pm 0,0494$	ns	$3814 \pm 630,5$	ns
30 dias FC – Ambiente	$3,362 \pm 0,1049$	***	$0,2620 \pm 0,0103$	**	$879,7 \pm 383,1$	ns
30 dias FE – Ambiente	$3,793 \pm 0,0816$	***	$0,2480 \pm 0,0108$	**	$1482 \pm 72,35$	ns
30 dias FC – Estufa	$2,454 \pm 0,0990$	***	$0,3348 \pm 0,0327$	*	$961,1 \pm 219,7$	*
30 dias FE – Estufa	$3,157 \pm 0,2150$	***	$0,3135 \pm 0,0257$	**	$1327 \pm 207,2$	ns

Os resultados são expressos pela média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) ($n = 3$). Análise estatística com intervalo de confiança em nível de 95 %. Valores estatisticamente significantes com * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ e os valores não significantes (ns).

4.5 Atividade antifúngica *in vitro*

Em geral, saponinas esteroidais que são pertencentes ao grupo dos alcalóides esteroidais são capazes de desorganizar membranas celulares e, conseqüentemente, são passíveis de apresentar atividade antifúngica. Os compostos SM e SS, que são saponinas esteroidais, e o extrato alcaloídico de *S. lycocarpum* apresentaram atividade inibitória contra fungos dermatófitos e espécies de *Candida*. Porém a aglicona SD, que também é uma saponina esteroideal, não demonstrou atividade frente estes micro-organismos. Além do mais, foi possível observar que os heterosídeos alcaloídicos apresentaram sinergismo quando foram avaliados em diferentes proporções.

Os valores da concentração inibitória mínima (CIM) foram calculados pelo teste de microdiluição seriada e, assim, foi possível verificar a concentração fungistática de cada amostra testada. Em seguida, foi realizado o teste da concentração fungicida mínima (CFM) em placas de ágar Sabouraud dextrose com as CIM obtidas, com o intuito de verificar se além de possuir atividade fungistática, as amostras também possuíam atividade fungicida.

Observou-se com os resultados para a CIM e CFM foram idênticos, ou seja, na mesma concentração em que as amostras foram fungistáticas, também foram fungicidas. Assim, os valores dessas concentrações para os fungos dermatófitos e espécies de *Candida* estão apresentados nas Tabelas 5 e 6, respectivamente. Tais valores foram expressos em µg/mL, sendo que para os compostos isolados o resultado também foi expresso em µM.

Para realizar esta conversão, as seguintes massas molares teóricas foram utilizadas:

$$\text{Solamargina (SM)} = 868,0813 \text{ g/mol}$$

$$\text{Solasonina (SS)} = 884,5012 \text{ g/mol}$$

$$\text{Solasodina (SD)} = 414,3405 \text{ g/mol}$$

Dessa forma, constata-se que as massas molares dos compostos SM e SS são similares, diferindo apenas por 16,4 g/mol a mais de SS. Em contrapartida, a

massa molar da SD é praticamente a metade de SM e SS. Com isso, a quantidade de SD utilizada no experimento foi praticamente o dobro em relação aos outros compostos.

Tabela 5 – Atividade antifúngica (CIM e CFM), expressos em µg/mL do extrato alcaloídico de *S. lycocarpum*, solasonina, solamargina e solasodina frente aos dermatófitos.

Compostos	<i>T. rubrum</i>	<i>T. mentagrophytes</i>	<i>M. canis</i>	<i>M. gypseum</i>
Extrato alcaloídico	250	125	250	125
Solasonina (SS)	250 (282,64)*	250 (282,64)	> 250 (>282,64)	125 (141,32)
Solamargina (SM)	125 (143,99)	62,5 (71,99)	125 (143,99)	62,5 (71,99)
Solasodina (SD)	> 250 (>603,36)	> 250 (>603,36)	>250 (>603,36)	> 250 (>603,36)
75% SS + 25% SM	125	125	125	62,5
50% SS + 50% SM	125	62,5	125	62,5
25% SS + 75% SM	125	62,5	125	62,5
Cetoconazol	0,78	0,78	0,38	3,1

* Entre parênteses estão os valores dos compostos SS, SM e SD expressos em µM.

Tabela 6 – Atividade antifúngica (CIM e CFM), expressos em µg/mL do extrato alcaloídico de *S. lycocarpum*, solasonina, solamargina e solasodina frente às espécies de *Candida*.

Compostos	<i>C. albicans</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>C. parapsilosis</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>
Extrato alcaloídico	250	500	500	250	500
Solasonina (SS)	250 (282,64)*	> 250 (> 282,64)	> 250 (> 282,64)	250 (282,64)	> 250 (> 282,64)
Solamargina (SM)	125 (143,99)	250 (282,64)	125 (143,99)	125 (143,99)	250 (282,64)
Solasodina (SD)	> 250 (> 603,36)	> 250 (> 603,36)	>250 (> 603,36)	>250 (> 603,36)	> 250 (> 603,36)
75% SS + 25% SM	125	250	250	125	> 250
50% SS + 50% SM	125	250	250	125	> 250
25% SS + 75% SM	125	250	250	125	> 250
Fluconazol	0,25	0,5	1	8	4
Itraconazol	0,03	0,03	0,03	0,78	0,03

* Entre parênteses estão os valores dos compostos SS, SM e SD expressos em µM.

Muito embora a quantidade em moles de SD tenha sido maior do que a de SM e SS, este composto não apresentou atividade contra nenhum micro-organismo quando avaliado nos testes de CIM e CFM. Entretanto, SM apresentou a maior atividade antifúngica em relação aos outros compostos testados. Com isso, é possível considerar que a atividade antifúngica da SM e SS esteja relacionada com a cadeia de açúcares ligada ao núcleo esteroidal da molécula, uma vez que a SD não apresentou atividade (BLANKEMEYER et al., 1998). Além do mais, o açúcar ramnose também pode estar influenciando nesta atividade, pois o composto SM possui duas ramnoses ligadas ao núcleo esteroidal, enquanto SS apresenta apenas uma. Verma, Kabra e Mukhopadhyay (2011) reconhecendo a importância da cadeia de açúcares da SM (chacotriose) e da SS (salotriose) presentes nestes compostos resolveram sintetizá-los deixando-os ligados ao grupo *p*-metoxifenílico (OMP) para possibilitar que outras conjugações pudessem ocorrer com núcleos diferentes da SD.

Outro estudo que corrobora com o fato das cadeias de açúcares estarem ligadas à atividade antifúngica foi o realizado por Ruiz et al. (2006), que comprovou que os fungos produzem lipases, que são enzimas responsáveis pela manutenção da infecção fúngica em hospedeiros. Tais enzimas podem ser inibidas por algumas saponinas, alcalóides e flavonóides. Porém, devido ao tamanho do núcleo destes metabólitos secundários, que são algumas vezes glicosilados, não é possível haver a entrada do núcleo do metabólito na enzima, entrando apenas os carboidratos e sendo estes os responsáveis pela inibição da lipase.

Segundo Pinto et al. (2011) os compostos SM e SS possuem atividade antifúngica contra os fungos dermatófitos (*T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis* e *M. gypseum*) e leveduras (*C. albicans* e *C. parapsilosis*). Entretanto, o composto SS foi muito mais ativo que SM, indo de encontro com os resultados apresentados neste trabalho. Contudo, há relatos na literatura que demonstram que SM geralmente é mais ativa do que SS (FEWELL; RODDICK; WEISSENBERG, 1994; BLANKEMEYER et al., 1998; SUN et al., 2010).

Outro aspecto observado com o auxílio dos resultados expressos nas Tabelas 5 e 6 foi que os compostos SM e SS apresentaram sinergismo quando foram avaliados em diferentes proporções, sendo que na literatura esta atividade sinérgica

entre SM e SS já havia sido reportada por Fewell, Roddick e Weissenberg (1994) contra os fungos *R. solani* e *P. medicaginis*. Nos fungos testados, exceto para *C. parapsilosis* e *C. krusei* verificou-se que na proporção 50 % SS + 50 % SM a CIM e CFM prevaleceram com o valor de 100 % SM. Dessa forma, pode-se observar que mesmo a SM estando em menor quantidade sua atividade é mantida quando associada a SS. Tal sinergismo também foi reportado quando estes compostos tiveram sua citotoxicidade testada frente às raízes de pepinos, em que apresentaram 58 % de aumento da citotoxicidade quando foram avaliados juntos e em proporções iguais (SUN et al., 2010).

Como controles positivos dos experimentos antifúngicos foram utilizados cetoconazol para os dermatófitos e fluconazol e itraconazol para as leveduras do gênero *Candida*. O mecanismo de ação desses fármacos se dá pela inibição do citocromo p450, prejudicando a síntese de ergosterol e provocando o aumento da permeabilidade da membrana. Assim, há inibição do crescimento e da reprodução celular (HA et al., 2011).

4.6 Avaliação da citotoxicidade das substâncias isoladas e do extrato alcaloídico pelo teste de MTT

A citotoxicidade do extrato alcaloídico e dos compostos SM, SS e SD foram avaliadas frente às linhagens de células A431 e L929, que são respectivamente células humanas de carcinoma espinocelular e células de fibroblastos de camundongos. A principal finalidade da realização deste teste *in vitro* foi a de obter a confirmação de que, principalmente, o extrato alcaloídico é tóxico às células A431, pois no teste anticâncer *in vivo*, realizado no presente trabalho, utilizou-se de uma formulação contendo 1 % de extrato alcaloídico para tratar animais que foram induzidos ao câncer de pele por células A431. Assim sendo, nas Figuras 12 e 13 mostram-se as porcentagens de células viáveis após terem sido expostas às amostras por 12 horas nas concentrações 5 – 100 µg/mL, considerando que o controle negativo (DMSO 1 %) apresentou viabilidade celular de 100 %.

Figura 12 – Avaliação da citotoxicidade do extrato alcaloídico, dos compostos isolados SM, SS, SD e doxorubicina frente às células A431.

Figura 13 – Avaliação da citotoxicidade do extrato alcaloídico, dos compostos isolados SM, SS, SD e da doxorubicina frente às células L929.

Os gráficos demonstram que o extrato alcaloídico, SS e SM foram mais citotóxicos frente às células tumorais do que aos fibroblastos. Verifica-se que a CI_{50} do extrato alcaloídico, SS e SM foram 45,9; 73,8 e 5,1 $\mu\text{g/mL}$ para células A431, respectivamente. Enquanto que para as células L929 foram de 84,2; 110,6 e 35,1 $\mu\text{g/mL}$. Sendo assim, constata-se que estes compostos apresentaram seletividade pelas células tumorais em detrimento das normais (CHAM, 2007). Outro estudo que relatou esta seletividade frente às células tumorais foi o realizado por Wu et al. (2011), em que o produto desenvolvido SR-T100, que contém majoritariamente os compostos SM e SS, apresentaram atividade citotóxica frente às células A431 e linhagens de células carcinoma espinocelular da língua (SCC 4, SCC9 e SCC25). Porém, os compostos SM e SS não apresentaram citotoxicidade frente às células de queratinócitos imortalizadas (HaCaT). Além disso, também foi observado que a atividade citotóxica do composto SS é menor quando comparada com SM, sendo que esta informação também foi relatada na literatura em testes de citotoxicidade realizados por Sun et al. (2010) e Wu et al. (2011). Dessa forma, no teste de citotoxicidade frente às células A431 ao se comparar SM, SS, SD e doxorrubicina com o extrato alcaloídico, verificou-se que nas concentrações 5 e 25 $\mu\text{g/mL}$ o extrato era estatisticamente diferente ($P < 0,001$) de SM e doxorrubicina. Porém, nas concentrações 50 e 75 $\mu\text{g/mL}$ essa diferença estatística foi diminuindo ($P < 0,01$) até que na concentração 100 $\mu\text{g/mL}$ o extrato foi semelhante a esses compostos. Todavia, a SS apenas foi semelhante ao extrato na concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ e a SD, que não apresentou citotoxicidade frente às células A431, foi estatisticamente diferente ($P < 0,001$) do extrato a partir da concentração 50 $\mu\text{g/mL}$.

Com relação à citotoxicidade frente às células L929, verificou-se que SM apresentou maior citotoxicidade, sendo que o extrato foi apenas diferente ($P < 0,001$) deste composto até a concentração 50 $\mu\text{g/mL}$. As amostras SS, SD e doxorrubicina não apresentaram citotoxicidade frente às células L929, sendo que a partir da concentração 75 $\mu\text{g/mL}$ o extrato passou a ser estatisticamente diferente ($P < 0,05$) da doxorrubicina e ($P < 0,001$) da SD e, na concentração 100 $\mu\text{g/mL}$ essa diferença aumentou para doxorrubicina e SD ($P < 0,001$) e para SS ($P < 0,05$).

Apesar do mecanismo de ação dos compostos SM e SS não estar bem esclarecido contra células tumorais, verificou-se pelo perfil dos gráficos de citotoxicidade frente às células A431 e L929 e comparação com dados da literatura

(KUO et al., 2000; SHIU et al., 2007; LI et al. 2011; DING et al., 2012), que os mesmos não são semelhantes ao apresentado pela doxorrubicina. Em síntese, o mecanismo de ação apresentado pela doxorrubicina se dá pela interpolação deste composto na cadeia dupla hélice de DNA, parcialmente desenrolando-a. Dessa forma, a ação da DNA polimerase será inibida e, conseqüentemente, impedirá a síntese de um novo ácido nucléico, levando a apoptose celular (BEER; BOTTONNE; VOEST, 2001).

4.7 Avaliação da atividade anticâncer *in vivo*

Nos ensaios para avaliação da atividade anticâncer *in vivo*, o câncer de pele não-melanoma do tipo espinocelular foi induzido nos animais por injeção subcutânea de células A431. Este protocolo foi muito bem padronizado, pois todos os animais que foram induzidos ao câncer apresentaram o tumor dias depois. Para que a indução do câncer ocorresse de forma efetiva, os animais precisaram ser do tipo “*nude*”, atímicos. Com isso, esses animais não produzem células T contra corpos estranhos que entravam em contato com seu organismo, sendo esta a razão das células A431 não terem sido combatidas (ANAND et al., 2009).

Após aproximadamente 10 dias da indução quando os tumores atingiram o tamanho de 0,7 cm de largura por 0,7 cm de comprimento, o tratamento dos animais foi iniciado. O acompanhamento do crescimento e da regressão tumoral foi realizado diariamente por fotografias e por medições do tumor com paquímetro. Durante 50 dias os animais foram tratados com as formulações Curaderm BEC 5, formulação contendo extrato e formulação controle, sendo em seguida, aplicado um curativo oclusivo para promover o contato prolongado das formulações com o tumor.

Todos os animais do grupo controle positivo tratados com formulação Curaderm BEC 5 apresentaram regressão e diminuição do tumor (Figuras 14 e 15). Entretanto, os animais que foram tratados com a formulação contendo extrato, formulação controle e os não tratados (controle negativo) não apresentaram regressão e nem diminuição do volume tumoral (Figuras 14, 15, 16, 17 e 18).

Apesar de estudos farmacotécnicos preliminares terem sido realizados *in vitro* e *in vivo* com a formulação contendo 1 % de extrato alcaloídico, esta não foi efetiva no

tratamento do câncer neste modelo de estudo. A provável razão do resultado não ter sido satisfatório foi devido ao fato dos compostos SM e SS não terem atingido o tumor de maneira efetiva, mesmo com o auxílio do promotor de absorção monoleína. Por outro lado, a formulação Curaderm BEC 5 que contém 0,005 % de BEC e alta concentração de ácido salicílico e uréia, foi altamente queratolítica, sendo capaz de promover o desprendimento do tumor do animal em aproximadamente 15 dias. Dessa maneira, mesmo a formulação apresentando baixa concentração dos compostos SM e SS, esta foi capaz de destruir as células tumorais presentes no local.

Normalmente, o ácido salicílico é utilizado em *peelings* e como agente queratolítico para tratamento de calos e verrugas (BASHIR et al., 2005). Sendo assim, o ácido salicílico presente na formulação Curaderm BEC 5, foi o responsável por baixar o pH para 2,4 e foi capaz de destruir em poucos dias toda camada epidérmica que recobria o tumor, como pode ser observado na Figura 14. Além disso, verificou-se forte processo inflamatório nesta região, o qual com o passar dos dias cicatrizou espontaneamente.

Muito embora a formulação Curaderm BEC 5 seja comercializada em diversos países, principalmente Austrália, no próprio site de venda do produto é declarado que este não se destina a tratar, curar ou prevenir qualquer doença. Este produto também não possui autorização da Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA) para ser comercializado (CURADERM, 2012).

4.7.1 Formulação Curaderm BEC 5

Figura 14 – Avaliação visual do tumor do animal tratado com formulação Curaderm BEC 5 durante 50 dias.

Figura 15 – Volume tumoral em cm^3 dos animais ($n = 5$) tratados com a formulação contendo extrato alcaloídico por 50 dias. Valores expressos em média $\pm$ E.P.M.

4.7.2 Formulação contendo 1 % de extrato alcaloídico de *S. lycocarpum*

Figura 16 – Avaliação visual do tumor do animal tratado com formulação contendo extrato durante 50 dias.

Figura 17 – Volume tumoral em cm³ dos animais (n = 5) tratados com a formulação contendo extrato por 50 dias. Valores expressos em média ± E.P.M.

4.7.3 Formulação controle

Figura 18 – Avaliação visual do tumor do animal tratado com formulação controle durante 50 dias.

Figura 19 – Volume tumoral em cm^3 dos animais ($n = 5$) tratados com formulação controle por 50 dias. Valores expressos em média $\pm$ E.P.M.

4.7.4 Controle negativo sem tratamento

Figura 20 – Avaliação visual do tumor do animal sem tratamento durante 50 dias.

Figura 21 – Volume tumoral em cm³ dos animais (n = 5) sem tratamento por 50 dias. Valores expressos em média ± E.P.M.

Ao realizar a análise estatística do volume tumoral verificou-se que o controle negativo, a formulação contendo extrato e a formulação controle apresentaram diferença estatística com significância de $P < 0,001$ em comparação à obtida para a formulação Curaderm BEC5. Porém, a diferença entre os grupos formulação contendo extrato e formulação controle não foram significativamente diferentes em relação ao grupo controle negativo, podendo-se concluir que a formulação contendo o extrato alcaloídico não apresentou atividade contra o câncer de pele (Figura 22).

Figura 22 – Volume tumoral em cm^3 dos grupos de animais ($n = 5$) tratados pela formulação contendo extrato, formulação controle, formulação Curaderm BEC5 e controle negativo, por 50 dias.

4.8 Análise histológica e imunoistoquímica dos tumores

A análise histológica dos tumores foi realizada pelo patologista Prof. Dr. Sérgio Britto Garcia da faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto, o qual verificou que o câncer de pele apresentado pelos animais no teste *in vivo* se tratava do carcinoma espinocelular. Segundo o patologista, os tumores apresentavam pérolas córneas, que são características deste tipo de câncer, bem como a patologia tumoral foi confirmada pelo padrão morfológico observado. Dessa forma, pode-se confirmar que as células de carcinoma espinocelular A431, utilizadas na indução do câncer dos animais, foram as responsáveis pelo desenvolvimento dos tumores.

Com relação ao teste imunoistoquímico, o anticorpo caspase-3 foi o escolhido para marcação dos tumores, uma vez que este permite a avaliação da indução de

apoptose e na literatura há diversos relatos de que o mecanismo de ação dos compostos SM e SS se dão por esta via (SHIU et al., 2007; LI et al., 2011; DING et al., 2012;). O fronte tumoral foi a região escolhida para análise do tumor, uma vez que esta região é a mais externa e com isso pode-se observar se as formulações apresentaram atividade ao entrar em contato com o tumor.

A apoptose, também conhecida como morte programada da célula, ocorre em organismos multicelulares. As caspases, por sua vez, são uma família de proteases cisteínicas que desempenham um papel importante na apoptose, pois são as responsáveis por alterarem a morfologia e bioquímica das células (COHEN, 1997; SUN; MIKUNI; KINJO, 2011). Existem dois tipos de caspases segundo Sun et al. (1999): as que são “iniciadoras” da apoptose, como é o caso das caspase -8 e -9, e as “efetoras”, no caso das caspases-3, -6 e -7. A caspase-3 é uma protease cisteínica efetora de grande importância na apoptose, pois é a responsável pela clivagem proteolítica total e parcial de proteínas, como a enzima nuclear poli(ADP-ribose) polimerase (PARP), a qual é clivada por diferentes vias durante a apoptose celular (COHEN, 1997). Dessa maneira, caspase-3 tem demonstrado ser um componente chave envolvido nos mecanismos de apoptose, sendo que sua ativação é considerada como ponto final de muitas vias apoptóticas (SUN; MIKUNI; KINJO, 2011). De acordo com os resultados obtidos na contagem de células marcadas por caspase-3, verificou-se que o grupo que obteve redução tumoral, que foi tratado com a formulação Curaderm BEC5, apresentou maior número de células em apoptose (Figura 23).

Figura 23 – Células marcadas pelo anticorpo caspase-3 nos grupos de animais (n = 5) tratados com formulação Curaderm BEC 5, formulação contendo extrato, formulação controle e controle negativo.

O resultado da formulação Curaderm BEC 5 foi estatisticamente diferente de todos os outros grupos, apresentando $P < 0,01$ para os grupos formulação contendo extrato e controle negativo e, $P < 0,001$ para o grupo formulação controle. A formulação Curaderm BEC 5 causou grande necrose na periferia do tecido e foi verificada uma extensa faixa de apoptose no interior do tumor. Esta necrose foi observada apenas na área de contato da formulação Curaderm BEC 5 com a pele, não sendo observada nos demais grupos. Dessa forma, sugere-se que o ácido salicílico, presente na formulação, foi o responsável por causar esta necrose (Figura 24). Há também no interior do tumor diversas células marcadas com o anticorpo caspase-3, confirmando a ação apoptótica da formulação Curaderm BEC 5. Assim, além de promover a necrose tumoral, a formulação Curaderm BEC 5 também foi capaz de atingir o tumor e provocar a apoptose de células.

Em contrapartida, o mesmo não foi observado para os animais tratados com a formulação contendo extrato, pois os tumores não apresentaram resultados satisfatórios quanto à marcação pelo anticorpo caspase-3, ou seja, as células não sofreram apoptose. Assim, o resultado revela que a formulação contendo extrato não foi suficientemente lítica para atravessar a barreira da pele e atingir o tumor, provavelmente devido à falta de agente queratolítico na formulação, uma vez que o promotor de permeação, monoleína, não foi suficiente para propiciar permeação adequada (Figura 25).

Figura 24 - Imagem da marcação por imunoistoquímica para o anticorpo caspase-3 no grupo formulação Curadem BEC 5, com aumento de 20X. **N** = necrose e **A** = apoptose.

Figura 25 - Imagem da marcação por imunoistoquímica para o anticorpo caspase-3 no grupo formulação contendo extrato alcaloídico, com aumento de 20X.

As mesmas observações feitas para o grupo formulação contendo extrato alcaloídico foram feitas para os grupos controle negativo e formulação controle, pois não foram observadas atividades necróticas e apoptóticas (Figuras 26 e 27).

Figura 26 - Imagem da marcação por imunoistoquímica para o anticorpo caspase-3 no grupo formulação controle, com aumento de 20X.

Figura 27 - Imagem da marcação por imunoistoquímica para o anticorpo caspase-3 no grupo controle negativo, com aumento de 20X.

5. Conclusões

5. CONCLUSÕES

A extração ácido-base nos frutos de *S. lycocarpum* foi eficiente obtendo-se extrato alcaloídico com 89,46 % de alcalóides, os quais, após coluna cromatográfica a vácuo, seguido de CLAE–semipreparativa, permitiu o isolamento dos heterosídeos alcaloídicos, SS e SM. Após hidrólise ácida do extrato, seguido de purificação por coluna clássica foi possível a obtenção da aglicona SD;

Com relação aos testes de estabilidade e de caracterização física da formulação, verificou-se que as formulações contendo extrato alcaloídico e formulações controle mantidas à temperatura ambiente (27 ± 2 °C) apresentaram características físicas de estabilidade até um prazo de 15 dias. Porém, as formulações armazenadas em geladeira (5 ± 2 °C) apresentaram instabilidade após o sétimo dia e as armazenadas em estufa (37 ± 2 °C) a instabilidade foi observada após o décimo quinto dia;

O extrato alcaloídico, SS e SM apresentaram atividade antifúngica contra os fungos dermatófitos e espécies do gênero *Candida*, sendo que SM foi a substância com maior atividade. Por outro lado, SD, a aglicona, não apresentou atividade, o que destaca a importância das cadeias de açúcares para atividade antifúngica destes compostos;

No teste de citotoxicidade *in vitro* frente às células A431, foi possível observar que os compostos apresentaram atividade citotóxica. O composto SM foi o que apresentou maior atividade, porém também apresentou relativa citotoxicidade frente às células L929;

Nos ensaios *in vivo* verificou-se que a única formulação efetiva no tratamento do câncer de pele espinocelular, induzido por células A431, foi o grupo tratado pela formulação Curaderm BEC 5, que por conter ácido salicílico em sua formulação favoreceu a penetração dos compostos SM e SS no tumor. Todavia, os grupos que foram tratados com formulação contendo extrato alcaloídico e formulação controle apresentaram o mesmo aspecto que os animais do grupo controle negativo;

Referências bibliográficas

REFERÊNCIAS

AGRA, M. F.; New Species of *Solanum* subgenus *Leptostemonum* (Solanaceae) from Chapada da Diamantina, Bahia, Brazil. **Novon**, n.9, v. 292, 1999.

ANAND, S.; HONARI, G.; HASAN, T.; ELSON, P.; MAYTIN, E. V. Low-dose methotrexate enhances aminolevulinate-based photodynamic therapy in skin carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. **Cancer therapy: preclinical**, v. 15, p. 3333-3343, 2009.

ARMSTRONG, B. K.; KRICKER, A. The epidemiology of UV induced skin cancer. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 63, p. 8-18, 2001.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas**, 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BASHIR, S. J.; DREHER, F.; CHEW, A. L.; ZHAI, H.; LEVIN, C.; STERN, R.; MAIBACHA, H. I. Cutaneous bioassay of salicylic acid as a keratolytic. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 292, p. 187–194, 2005.

BEER, E. L.; BOTTONE, A. E.; VOEST, E. E. Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment: a review. **European Journal of Pharmacology**, v. 415, p. 1–11, 2001.

BLANKEMEYER, J. T.; McWILLIAMS, M. L.; RAYBUM, J. R.; WEISSENBERG, M.; FRIEDMAN, M. Developmental toxicology of solamargine and solasonine glycoalkaloids in frog embryos. **Food Chemistry Toxicology**, v. 36, p. 383-389, 1998.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. **Guia de estabilidade de produtos cosméticos**. Rio de Janeiro, 2004. v. 1

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Guia para realização de estudos de estabilidade. RE nº1, de 29 de julho de 2005. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 21 Jan. 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução - RDC Nº 50, de 20 de setembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos e condições de realização de estudos de estabilidade para o registro ou alterações pós-registro de produtos biológicos e dá outras providências. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>> Acesso em: 21 jan. 2012

BRIANI, D. C.; GUIMARÃES JÚNIOR, P. R. Seed predation and fruit damage of *Solanum lycocarpum* (Solanaceae) by rodents in the Cerrado of central Brazil. **Acta Oecologica**, v. 31, p. 8-12, 2007.

CANCER COUNCIL AUSTRALIA. Skin cancer facts and figures. Disponível em: <<http://www.cancer.org.au/cancersmartlifestyle/SunSmart/Skincancerfactsandfigures.htm>>. Acesso em: 06 fev. 2012.

CHAM, B. E. Solasodine rhamnosyl glycosides specifically bind cancer cell receptors and induce apoptosis and necrosis. Treatment for skin cancer and hope for internal cancer. **Research Journal of Biological Science**. v. 2, p. 503-514, 2007.

CHAM, B. E.; DAUNTER, B.; EVANS, R. A. Topical treatment of malignant and premalignant skin lesions by very low concentrations of standard mixture (BEC) of solasodina glycosides. **Cancer Letters**, v. 59, p. 183-192, 1991.

CHAM, B. E.; GILLIVER, M.; WILSON, L. Antitumor effects of glycoalkaloids isolated from *Solanum sodomaeum*. **Planta Médica**, v. 53, p. 34-36, 1987.

CHAM, B. E.; MEARES, H. M. Glycoalkaloids from *Solanum sodomaeum* are effective in the treatment of skin cancer in man. **Cancer Letters**, v. 36, p. 111-118, 1987.

CHANG, L. C.; TSAI, T. R.; WANG, J. J.; LIN, C. N.; KUO, K. W. The rhamnose moiety of solamargina plays a crucial role in triggering cell death by apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 242, p. 21-25, 1998.

CHORILLI, M.; PRESTES, P. S.; RIGON, R. B.; LEONARDI, G. R.; CHIAVACCI, L. A.; SCARPA, M. V. Desenvolvimento de sistemas líquido-cristalinos empregando silicone fluido de co-polímero glicol e poliéter funcional siloxano. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1036-1040, 2009.

CIPOLLINI, M. L.; LEVEY, D. Antifungal activity of *Solanum* fruit glycoalkaloids: implications for frugivory and seed dispersal. **Ecology**, v. 78, p. 799-809, 1997.

CLERICI, M. T. P. S.; KALLMANN, C.; GASPI, M. A.; MARTINEZ-BUSTO, F.; CHANG, Y. K. Physical, chemical and technological characteristics of *Solanum lycocarpum* A. St. - HILL (Solanaceae) fruit flour and starch. **Food Research International**, v. 44, p. 2143-2150, 2011.

COHEN, G. M. Caspases: the executioners of apoptosis. **Biochemical Journal**, v. 326, p. 1-16, 1997.

CONSTANTINIDES, P. P. Lipid microemulsions for improving drug dissolution and oral absorption: Physical and Biopharmaceutical aspects. **Pharmaceutical Research**, v. 12, p. 1561-1572, 1995.

CURADERM. Curaderm-BEC5 – An effective treatment for non-melanoma skin cancers. Disponível em: <<http://curaderm.net/?s=BEC+CONTAIN&x=0&y=0>>. Acesso em: 06 Fev. 2012.

DAUNTER, B.; CHAM, B. E. Solasodine glycosides. *In vitro* preferential cytotoxicity for human cancer cells. **Cancer Letters**, v. 55, p. 209-220, 1990.

DIEGO, A. M. Aspectos clínicos, diagnósticos y terapéuticos de las dermatofitosis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 29, p. 33-39, 2011.

DING, X.; ZHU, F. S.; LI, M.; GAO, S. G. Induction of apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells by solamargine from *Solanum nigrum* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 599– 604, 2012.

FALAGAS, M. E.; ROUSSOS, N.; VARDAKAS, K. Z. Relative frequency of albicans and the various non-albicans *Candida* spp. among candidemia isolates from inpatients in various parts of the world: a systematic review. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. 954–966, 2010.

FEWELL, A. L.; RODDICK, J. G.; WEISSENBERG, M. Interactions between the glycoalkaloids solasonine and solamargine in relation to inhibition of fungal growth. **Phytochemistry**, v. 37, n.4, p. 1007-1011, 1994.

GASPAR, L. R.; MAIA CAMPOS, P. M. B. G. Rheological behavior and the SPF of sunscreens. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 250, p. 35-44, 2003.

GHAHFAROKHI, M. S.; GOODARZI, M.; ABYANEH, M. S.; TIRAIHI, T. A.; SEYEDIPOUR, G. Morphological evidences for onion-induced growth inhibition of *Trichophyton rubrum* and *Trichophyton mentagrophytes*. **Fitoterapia**, v. 75, p. 645-655, 2004.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GREEN, C. L.; KHAVARI, P. A. Targets for molecular therapy of skin cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 14, p. 63–69, 2004.

GURGEL, L. A.; SIDRIM, J. J. C.; MARTINS, D. T.; FILHO, V. C.; RAO, V. S. *In vitro* antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 409–412, 2005.

HA, J. F.; ITALIANO, C. M.; HEATH, C. H.; SHIH, S.; REA, S.; WOOD, F. M. Candidemia and invasive candidiasis: A review of the literature for the burns surgeon. **Burns**, v. 37, p. 181–195, 2011.

HARVEY, A. L. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5, p. 294–300, 2000.

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 5 ed., cap.12, p. 13–25. 2004.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA) - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa de incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 06 Fev. 2012.

KANBE, T.; SUZUKI, Y.; KAMIYA, A.; MOCHIZUKI, T.; KAWASAKI, M.; FUJIHIRO, M.; KIKUCHI, A. Species-identification of dermatophytes *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton* by PCR and PCR-RFLP targeting of the DNA topoisomerase II genes. **Journal of Dermatological Science**, v. 33, p. 41–54, 2003.

KIM, J.; LEE, K. U.; SHIN, W. C.; LEE, H. Y.; KIM, J. D.; KIM, Y. C.; TAE, G.; LEE, K. Y.; LEE, S.; KIM, J. Monoolein cubic phases containing hydrogen peroxide. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 36, p.161–166, 2004.

KOROISHI, A. M.; FOSS, S. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, T. U.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. *In vitro* antifungal activity of extracts and neolignans from *Piper regnellii* against dermatophytes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 117, p. 270–277, 2008.

KUO, K. W.; HSU, S. H.; LI, Y. P.; LIN, W. L.; LIU, L. F.; CHANG, L. C.; LIN, C. C.; LIN, C. N.; SHEU, H. M. Anticancer activity evaluation of the *Solanum* glycoalkaloid solamargine-triggering apoptosis in human hepatoma cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 1865–1873, 2000.

LEE, K.; KOZUKUE, N.; HAN, J.; PARK, J.; CHANG, E.; BAEK, E.; CHANG, J. FRIEDMAN, M. Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HEP G2) cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2832-2839, 2004.

LI, W. L.; ZHENG, H. C.; BUKURU, J.; KIMPE, N. Natural medicines used in the tradicional Chinese medical system for therapy of diabetes mellitus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92, p. 1-21, 2004.

LI, X.; ZHAO, Y.; WU, W. K. K.; LIU, S.; CUI, M.; LOU, H. Solamargine induces apoptosis associated with p53 transcription-dependent and transcription-independent pathways in human osteosarcoma U2OS cells. **Life Sciences**, v. 88, p. 314-321, 2011.

LIANG, C. H.; LIU, L. F.; SHIU, L. Y.; HUANG, Y. S.; CHANG, L. C.; KUO, K. W. Action of solamargina on TNFs and cisplatin-resistant human lung cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 322, p. 751-775, 2004.

LIANG, C. H.; SHIU, L. Y.; CHANG, L. C.; SHEU, H. M.; TSAI, E. M.; KUO, K.W. Solamargine enhances HER2 expression and increases the susceptibility of human lung cancer H661 and H69 cells to trastuzumab and epirubicin. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, p. 393–399, 2008.

LIU, L. F.; LIANG, C. H.; SHIU, L. Y.; LIN, W. L.; LIN, C. C.; KUO, K. W. Action of solamargine on human lung cancer cells – enhancement of the susceptibility of cancer cells to TNFs. **FEBS Letters**, v. 577, p. 67–74, 2004.

MACHADO, R. B.; RAMOS NETO, M. B.; PEREIRA, P. G. P.; CALDAS, E. F.; GONÇALVES, D. A.; SANTOS, N. S.; TABOR, K.; STEININGER, M. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Relatório técnico não publicado. **Conservação Internacional**, Brasília, DF, 2004.

MEWIS, J.; WAGNER, N. J. Thixotropy. **Advances in colloid and interface science**, v. 147, p. 214-227, 2009.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 24, 2000.

NAGLIK, J. R.; MOYES, D. L.; WÄCHTLER, B.; HUBE, B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. **Microbes and Infection**, v. 13, p. 963-976, 2011.

NAKAMURA, S.; HONGO, M.; SUGIMOTO, S.; MATSUDA, H.; YOSHIKAWA, M. Steroidal saponins and pseudoalkaloid oligoglycoside from Brazilian natural medicine, “fruta do lobo” (fruit of *Solanum lycocarpum*). **Phytochemistry**, v. 69, p. 1565–1572, 2008.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard M27-A2**, 2nd ed. [S.l.], 2002.

PENG, Q.; WARLOE, T.; MOAN, J.; HEYERDAHL, H.; STEEN, H. B.; NESLAND, J. M.; GIERCKSKY, K. E. Distribution of 5aminolevulinic acid-induced porphyrins in noduloucerative basal cell carcinoma. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**, v. 62, p. 906-913, 1995.

PINTO, F. C. L.; UCHOA, D. E. A.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L.; BRAZ-FILHO, R. Glicoalcalóides antifúngicos, flavonóides e outros constituintes químicos de *Solanum asperum*. **Química Nova**, v. 34, p. 284-288, 2011.

PUNJABI, S.; COOK, L. J.; KERSEY, P.; MARKS, R.; CERIO, R. Solasodine glycoalkaloids: a novel topical therapy for basal cell carcinoma. A double-blind, randomized, placebocontrolled, parallel group, multicenter study. **International Journal of Dermatology**, v. 47, p. 78–82, 2008.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

RODDICK, J. G.; RIJNENBERG, A. L.; WEISSENBERG, M. Membrane-disrupting properties of the steroidal glycoalkaloids solasonine and solamargine. **Phytochemistry**, v. 29, p. 1513-1518, 1990.

RUIZ, C.; FALCOCCHIO, S.; XOXI, E.; VILLO, L.; NICOLOSI, G.; PASTOR, F. I. J.; DIAZ, P.; SASO, L. Inhibition of *Candida rugosa* lipase by saponins, flavonoids and alkaloids. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 40, p. 138-143, 2006.

SCHWARZ, A.; PINTO, E.; MITSUE, H.; OLIVEIRA, C. A.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S. Phytochemical study of *Solanum lycocarpum* (St. Hill) unripe fruit and its effects on rat gestation. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 11, p. 1025-1028, 2007.

SCHWARZ, A.; SOARES, M. R.; FLÓRIO, J. C.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S. Rats exposed to *Solanum lycocarpum* fruit in utero and during lactation: Neurochemical, behavioral and histopathological effects. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 27, p. 861-870, 2005.

SHANKER, K.; GUPTA, S.; SRIVASTAVA, P.; SRIVASTAVA, S. K.; SINGH, S.; GUPTA, M. M. Simultaneous determination of three steroidal glycoalkaloids in *Solanum xanthocarpum* by high performance thin layer chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 54, p.497–502, 2011.

SHIU, L. Y.; CHANG, L. C.; LIANG, C. H.; HUANG, Y. S.; SHEU, H. M.; KUO, K. W. Solamargine induces apoptosis and sensitizes breast cancer cells to cisplatin. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 2155–2164, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2001.

SOARES JÚNIOR, F. A.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; BRITO, E. H. S.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. Glucose improves the *in vitro* viability of *Microsporum canis* and *Trichophyton mentagrophytes* var. *Mentagrophytes*. **Journal of Microbiological Methods**, v. 69, p. 218–221, 2007.

SOARES-MOTA, M. R.; SCHWARZ, A.; BERNARDI, M. M.; MAIORKA, P. C.; SPINOSA, H. S. Toxicological evaluation of 10 % *Solanum lycocarpum* St. Hill fruit consumption in the diet of grow in grats: Hematological, biochemical and histopathological effects. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 62, p. 549–553, 2010.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometria**. New York: W. H. Freeman and Company. 1995. 887p.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2ª ed. 2005. 640p.

STENDER, I. M.; WULF, H. C. Photodynamic therapy with 5-aminolevulinic acid in the treatment of actinic cheilitis. **British Journal of Dermatology**, v. 135, p. 454-456, 1996.

STICHER, O. Natural product isolation. **Natural Product Report**, v. 25, p. 517-554, 2008.

STILL, W. C.; KAHN, M.; MITRA, A. Rapid chromatographic technique for preparative separations with moderate resolution. **Journal Organic Chemistry**, v. 43, n. 14, p. 1968-1970, 1978.

SUN, F.; LI, S.; HE, D.; CAO, G.; NI, X.; TAI, G.; ZHOU, Y.; WANG, D. Effects of glycoalkaloids from *Solanum* plants on cucumber root growth. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1534–1538, 2010.

SUN, F.; MIKUNI, S.; KINJO, M. Monitoring the caspase cascade in single apoptotic cells using a three-color fluorescent protein substrate. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 404, p. 706–710, 2011.

SUN, X. M.; MACFARLANE, M.; ZHUANG, J.; WOLF, B. B.; GREEN, D. R.; COHEN, G. M. Distinct caspase cascades are initiated in receptor-mediated and chemical-induced apoptosis. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 274, p. 5053–5060, 1999.

TADROS, T. Application of rheology for assessment and prediction of the long-term physical stability of emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108, p. 227–258, 2004.

TANNER, R. I. The changing face of rheology. **Journal of Non-Newtonian Fluid Mechanics**, v. 157, p. 141–144, 2009.

VERMA, P.; KABRA, V. K.; MUKHOPADHYAY, B. Synthesis of two trisaccharides related to the triterpenoid saponins isolated from *Solanum lycocarpum*. **Carbohydrate Research**, v. 346, p. 2342–2347, 2011.

VICENTINI, F. T. M. C.; VAZ, M. M. O. L. L.; FONSECA, Y. M.; BENTLEY, M. V. B.; FONSECA, M. J. V. Characterization and stability study of a water-in-oil microemulsion incorporating quercetin. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 37, n. 1, p. 47-55, 2011.

WALKER, D.; MAGUIÑA, C.; BARTONELLOSES, M. M. **Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens, & Practice**. Philadelphia: Elsevier Churchill Livingstone. 2nd ed. 2006. 1936p.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The Dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, p. 240–259, 1995.

WU, C. H.; LIANG, C. H.; SHIU, L. Y.; CHANG, L. C.; LIN, T. S.; LAN, C. C. E.; TSAI, J. C.; WONG, T. W.; WEI, K. J.; LIN, T. K.; CHANG, N. S.; SHEU, H. M. *Solanum incanum* extract (SR-T100) induces human cutaneous squamous cell carcinoma apoptosis through modulating tumor necrosis factor receptor signaling pathway. **Journal of Dermatological Science**, v. 63, p. 83-92, 2011.

YANG, Y.; QIANG, L. X.; PING, T. C. Natural Products Chemistry Research 2006's Progress in China. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 6, p. 70 -78, 2008.

ZAUGG, C.; JOUSSON, O.; LE´CHENNE, B.; STAIB, P.; MONOD, M. *Trichophyton rubrum* secreted and membrane-associated carboxypeptidases. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 298, p. 669–682, 2008.