UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

“Obtenção de extrato padronizado de *Solanum lycocarpum* A. St.-
Hil. contendo glicoalcalóides, desenvolvimento de método analítico por
CLAE e de forma farmacêutica de uso tópico”

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: Renata Fabiane Jorge Tiossi

Orientador: Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos

Ribeirão Preto

2010

RESUMO

Tiossi, R. F. J. **Obtenção de extrato padronizado de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. contendo glicoalcalóides, desenvolvimento de método analítico por CLAE e de forma farmacêutica de uso tópico**". 2010. 134f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Solanum lycocarpum A. St.-Hil. (Solanaceae – *Solanum*), popular lobeira, é espécie arbustiva nativa e característica do Cerrado brasileiro. Seus frutos são empregados na medicina caseira como diurética, calmante, anti-espasmódica, antiofídica e antiepilética. As espécies do gênero *Solanum* são produtoras de heterosídeos alcaloídicos, os quais possuem atividade antitumoral, incluindo-se anticâncer de pele. O câncer de pele tem preocupado as autoridades no mundo com os crescentes índices atuais e, por esse motivo, a busca por novos ativos anticâncer é primordial. Dos frutos da lobeira, pode-se produzir extrato alcaloídico, o qual se constitui de uma mistura de glicoalcalóides composta majoritariamente de solasonina e solamargina. Tais compostos têm sido estudados quanto ao potencial anticancerígeno, são relativamente seletivos para células tumorais e, em consequência, apresentam baixa toxicidade às células sadias. Por estes motivos, o potencial antitumoral desta espécie deve ser investigado. Para isso, os frutos foram coletados, secos e triturados. A droga vegetal resultante foi submetida à extração tipo ácido-base para obtenção do extrato alcaloídico. O método analítico empregado para quantificação dos heterosídeos alcaloídicos foi desenvolvida e validada em CLAE-UV. A partir do extrato alcaloídico padronizado, foram desenvolvidas formulações para uso tópico. Estas formulações foram avaliadas por meio de ensaios de permeação e retenção dérmica *in vitro*, cujo método analítico para quantificação de solasonina e solamargina foi validado. Para escolha da formulação mais promissora para ensaio anticâncer *in vivo*, as formulações de melhor desempenho *in vitro* foram avaliadas quanto à retenção dérmica *in vivo* em camundongos *hairless*. A formulação B, contendo 1% de extrato alcaloídico, 5% de monoleína (monoleato de glicerol), 5% de propilenoglicol em base de gel de Natrosol (pH 6,5), apresentou retenção dérmica total adequada para futuros ensaios anticâncer de pele *in vivo*.

Palavras-chave: *Solanum lycocarpum*, heterosídeos alcaloídicos, solamargina, solasonina, validação, formulação tópica e anticâncer.

ABSTRACT

Tiossi, R. F. J. **Obtainment of standardized extract of *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil, containing glycoalkaloids, development of analytical method by HPLC and topical pharmaceutical formulation.** 2010. 134f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Solanum lycocarpum A. St.-Hil. (Solanaceae - Solanum), popular wolf-fruit is a native shrub species and characteristic of the Brazilian Cerrado vegetation. Its fruits are used in folk medicine as diuretic, sedative, anti-spasmodic, antiepileptic and antiophidic. This species belongs to the genus *Solanum*, known to produce alkaloid heterosides, which possess antitumor activity, including skin anticancer. Skin cancer has concerned the authorities in the world because of its growing rates. Therefore, the search for new active anticancer is paramount. The wolf-fruit furnish an alkaloidic extract, which is rich in a mixture of heteroside alkaloids and composed mostly of solasonine and solamargine. Such compounds have been studied as potential anticancer, because they are relatively selective for tumor cells and, consequently, have low toxicity to health cell. For these reasons, the antitumor potential of this species should be investigated. For that, the fruits were collected, dried and crushed. The dried plant biomass was submitted to acid-base extraction to obtain the alkaloidic extract. The analytical method for the quantitation of the alkaloids in both crude alkaloid extract and plant biomass was developed and validated by HPLC-UV. From the alkaloidic extract, formulations were developed for topical use. These formulations were evaluated by *in vitro* tests of skin permeation and retention in Franz diffusion cell, for which an analytical method for quantifying solasonine and solamargine was developed, as well. The selection of the most promising formulation for anticancer assay *in vivo* was based in both, the permeation performance of the formulation *in vitro* and its skin retention *in vivo* in hairless health mice. The formulation B, containing crude alkaloid extract 1%, Monoolein 5%, propyleneglycol 5% in Natrosol gel (pH 6.5), showed total dermal retention, which is suitable for future trials of skin anticancer in animal models.

Keywords: *Solanum lycocarpum*, alkaloid heterosides, solamargine, solasonine, validation, topical formulation, anticancer.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. O Cerrado como fonte de metabólitos

O bioma Cerrado contém cerca de dez mil espécies de plantas, sendo, quatro mil e quatrocentas endêmicas, o que corresponde a 3,3 % do total das espécies endêmicas de plantas do mundo. Devido à sua ampla biodiversidade, o Cerrado é classificado como um dos “hotspots” para conservação prioritária no mundo. Atualmente, sabe-se que há somente 33% da floresta original do Cerrado, no entanto, apenas 6% desta área estão protegidas (MYERS et al., 2000).

Devido à carência de políticas de proteção e aos interesses econômicos de agricultores e criadores de gado, este bioma vem sendo desmatado e várias espécies estão desaparecendo antes mesmo de serem estudadas biológica e quimicamente. Estima-se que se o desmatamento continuar com as taxas atuais o cerrado desaparecerá em 2030 (MACHADO et al., 2004).

Como é de conhecimento, a biodiversidade dos biomas tropicais constitui-se na principal fonte de biomoléculas para indústria farmacêutica (REIS et al., 2004). Por isso a devastação do Cerrado irá acarretar na perda de muitas possíveis fontes dessas biomoléculas.

Dados da *World Health Organization* (WHO) enfatizam a importância dos estudos com espécies vegetais de biomas altamente ameaçados. Segundo esta organização, dos 252 fármacos considerados como básicos e essenciais, 11% são exclusivamente originários de plantas e uma parcela significativa é preenchida por fármacos sintéticos obtidos a partir de 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. No entanto, a grande maioria desses fármacos não pode ser sintetizada, sendo obtidos de plantas nativas ou cultivadas (RATES, 2001; NEWMAN et al., 2003).

Das substâncias vegetais com potencial uso na indústria farmacêutica, os alcalóides vegetais têm se mostrado especialmente efetivos em suas atividades biológicas, estando amplamente distribuídos em muitas espécies de plantas tropicais. Entre as atividades biológicas descritas para os alcalóides, a atividade anticâncer tem se mostrado bastante promissora. Como exemplos podem ser citados os alcalóides da vinca, vimblastina e vincristina, extraídos de *Catharanthus*

roseus, e a camptotecina, extraída de *Camptotheca acuminata* (GUERRA, NODARI, 2004).

1.2. Câncer de pele

A descoberta de novos fármacos eficientes no tratamento dos diversos tipos de câncer continua a desafiar os pesquisadores. Dentre os vários tipos de câncer conhecidos, o câncer de pele é o tipo mais frequente, correspondendo a cerca de 22% de todos os tumores malignos registrados no Brasil (INCA/MS, 2010).

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. Os carcinomas basocelular e espinocelular são também chamados de câncer de pele não melanoma, enquanto que aqueles com origem nos melanócitos são denominados de câncer de pele melanoma (BASTIAENS et al., 1998; ARMSTRONG; KRICKER, 2001).

No Brasil, o câncer de pele não melanoma continua sendo o tipo mais incidente para ambos os sexos. Estima-se que em 2010 haverá 56 novos casos a cada 100 mil homens e 61 para cada 100 mil mulheres (INCA/MS, 2010). Nos Estados Unidos a estimativa é semelhante, sendo 61 novos casos para cada 100 mil pessoas (NCI, 2010).

Atualmente, a cirurgia é o tratamento mais indicado tanto para as lesões não-melanoma, quanto para o melanoma. A radioterapia e a quimioterapia também podem ser utilizadas dependendo do estágio e extensão do câncer. Porém, quando há metástase, o melanoma é incurável na maioria dos casos (INCA/MS, 2010).

As terapias convencionais apresentam alto custo e também possuem o inconveniente de deixar cicatrizes, causar hipo e hiperpigmentação, além de efeitos colaterais, tais como, dor, inflamação severa, irritação e feridas que podem durar por semanas (PENG et al., 1995).

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 poderia ser uma valiosa ferramenta na busca de terapias mais baratas e com menos efeitos colaterais que os tratamentos disponíveis atualmente.

1.3. O gênero *Solanum* e a espécie *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil

A busca por ativos naturais anticâncer é antiga, pois já em 1825 havia relatos de que extratos de espécies do gênero *Solanum* foram efetivos no tratamento de câncer (CHAM, 1994).

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). Algumas espécies deste gênero são de interesse econômico como a batata (*Solanum tuberosum*), o tomate (*Solanum lycopersicum*) e a berinjela (*Solanum melongena*).

Estudos têm relatado importantes atividades biológicas para várias espécies do gênero *Solanum* tais como: atividade antioxidante (*S. tuberosum* e *S. lyratum*), atividade antiulcerogênica (*S. nigrum*), atividade hepatoprotetora (*S. lyratum*, *S. capsicastrum*, *S. nigrum*, *S. indicum*, e *S. incanum*) e atividade antitumoral (*S. nigrum*, *S. dulcamara*, *S. capsicastrum*, *S. trilobatum*, *S. lyratum* e *S. indicum*) (AMIR; KUMAR, 2004).

O gênero *Solanum* é conhecido por sua produção e diversidade em heterosídeos alcaloídicos, também conhecidos como glicoalcalóides (HARRISON, 1990). Esses glicoalcalóides têm sido estudados quanto ao seu potencial antitumoral (CHAM; GILLIVER; WILSON, 1987; KUO et al., 2000; LEE et al., 2007, PUNJABI et al., 2008).

Os glicoalcalóides solasonina e solamargina são extraídos majoritariamente dos frutos da espécie *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. (HARRISON, 1990; YOSHIKAWA et al., 2007).

S. lycocarpum é uma das espécies arbustivas mais características do Cerrado brasileiro (KISSMANN; GROTH, 2000), sendo popularmente conhecida como fruto do lobo, capoeira branca, lobeira, berinjela do mato, jurubebão, baba de boi, jurubeba de boi (LORENZI; MATOS, 2002).

A espécie é facilmente reconhecida pelos seus frutos globosos com diâmetro de 8-15 cm e polpa carnosa com muitas sementes (KISSMANN; GROTH, 2000). Na medicina popular, o suco dos frutos é utilizado para eliminação de verrugas, um tumor de pele benigno (LORENZI, 1991; LORENZI; MATOS, 2002). Os frutos também são utilizados na medicina caseira como diurético, calmante, antiespasmódico, antiofídico e antiepilético (LORENZI; MATOS, 2002).

1.4. Glicoalcalóides do fruto do lobo e atividade anticâncer

Como citado anteriormente, da fração de alcalóides do fruto de *S. lycocarpum* obtêm-se majoritariamente solasonina e solamargina (YOSHIKAWA, 2007). Esses glicoalcalóides também podem ser obtidos de mais de 100 espécies do gênero *Solanum* (BLANKEMEYER et al., 1998), entre elas estão *Solanum nigrum* L. (RIDOUT et al., 1989), *Solanum melongena* (BLANKEMEYER et al., 1998), *Solanum incanum* (KUO et al., 2000).

A solasonina e solamargina apresentam o mesmo núcleo esteroidal, solasodina, porém diferenciam-se pela cadeia de açúcares associada à posição 3 do carbono deste núcleo. A α -solamargina apresenta duas unidades de raminose que estão nas posições 2' e 4' dos carbonos da D-glicose, enquanto que a α -solasonina tem somente uma raminose e uma glicose que se ligam aos carbonos 2' e 3' da D-galactose (WEISSERBERG, 2001).

Figura 1. Estrutura química da solasonina e da solamargina

Estes glicoalcalóides têm se destacado quanto ao potencial citotóxico frente linhagens de células tumorais: câncer de cólon humano (HT29) (LEE et al., 2004) e (HCT-116) (IKEDA et al., 2003), câncer de pulmão (PC-1) (IKEDA et al., 2003), hepatoma humano Hep-3b (KUO et al., 2000) e Hep G2 (LEE et al., 2004), câncer de ovário (C180-135) (DAUNTER; CHAM, 1990) e células de câncer pulmonar resistentes à cisplatina (LIANG et al., 2004). Además, além do efeito direto da solamargina contra células cancerosas, a mesma, pode ter efeito sinérgico, pois, quando associadas a fármacos anticâncer, aumenta a suscetibilidade destas células a tais fármacos, o que pode ser interessante à tumores multidroga resistentes (LIANG, et al., 2008).

Estudos *in vivo* também foram realizados com estes glicoalcalóides. Cham e Daunter, (1990) observaram que o extrato alcaloídico (BEC, composto de 33% de solamargina, 33% de solasonina e 34% de misturas de di e monoglicosídeos) de *Solanum sodomaeum*, foi ativo em camundongos com sarcoma murino 180 (S 180) em estágio avançado.

Os glicoalcalóides da mistura BEC, também têm sido avaliados em humanos (CHAM; MEARES, 1987; CHAM; DAUNTER; EVANS, 1991; PUNJABI et al., 2008). Estudos mostram que tais compostos são ativos frente à canceres não-melanoma como carcinoma basocelular e espinocelular apresentando regressão completa das lesões tratadas em 100% dos pacientes com a formulação comercial Curaderm com 0,005% de BEC (CHAM; DAUNTER; EVANS, 1991), em 83% dos pacientes com formulação contendo 10% de BEC (CHAM; MEARES, 1987) e em 66% dos pacientes com creme Zycure com 0,005% de BEC (PUNJABI et al., 2008).

Na avaliação dos parâmetros bioquímicos, hematológicos e estudos analíticos da urina não houve efeitos colaterais nos parâmetros estudados (CHAM; MEARES, 1987). Destaca-se, ainda, que estudos prévios mostraram que 10% do extrato na formulação cremosa não tiveram efeito sobre a pele normal, indicando especificidade para células cancerosas (DAUNTER; CHAM, 1990).

1.5. Mecanismo de ação dos glicoalcalóides

Estudos têm demonstrado que tais compostos são mais seletivos para células cancerosas do que para células sadias (CHAM; DAUNTER, 1990). A ligação dos heterosídeos de solasodina em células tumorais parece ser mediada pela raminose, um açúcar encontrado em plantas e não encontrado em tecidos de mamíferos. Este

fato também pode explicar a seletividade destes compostos em células cancerígenas pois é improvável que células saudáveis tenham receptores para tais compostos (CHAM, 1994; CHAM, 2007).

Estudos mostraram que os glicoalcalóides em presença de raminose livre apresentam menor potencial citotóxico, sugerindo a competição por sítios específicos (CHAM; DAUNTER, 1990). Li et al., 2007, observaram que a atividade citotóxica frente a linhagens de hepatoma humano era reduzida quando utilizada raminose modificada estruturalmente. Estas observações poderiam explicar a razão pela qual a aglicona, solasodina, não apresenta potencial citotóxico frente às linhagens de células de câncer (DAUNTER; CHAM, 1990; CHAM et al. 1990).

Estudos têm explicado o efeito dos glicoalcalóides em células tumorais. Chang, et al. 1998, observaram que a raminose é capaz de ativar receptores de necrose tumoral (TNFR I e II). Kuo et al, 2000, relata que estes receptores intracelulares são desencadeadores da apoptose. Entretanto, outros estudos explicam a citotoxicidade pela interação de glicoalcalóides aos receptores presentes na membrana plasmática, conhecidos como receptores de lecitina mediadores de endocitose, resultando em morte celular (CHAM, 2007).

Em relação aos receptores endógenos de lecitinas, sabe-se que estes são mais prevalentes em células tumorais que em células normais. Esse fato permite aos glicoalcalóides se ligarem a tais receptores presentes na membrana plasmática das células tumorais por meio de seus açúcares conjugados. O complexo é consequentemente interiorizado e levado até o lisossoma, onde ocorrem hidrólise e liberação da aglicona, solasodina. Esta causa ruptura do lisossomo e as enzimas do lisossomo aparecem repentinamente no citosol, digerindo conteúdos celulares, o que desencadeia o processo de morte das células tumorais (CHAM, 1994; CHAM, 2007).

Além da seletividade dos constituintes da BEC pelas células tumorais, estudos toxicológicos demonstraram que BEC apresenta baixa toxicidade em ratos e em camundongos, tanto pela via intraperitoneal, quanto pela via oral (CHAM; GILLIVER; WILSON, 1987).

Assim, pelo exposto anteriormente, os glicoalcalóides apresentam grande potencial antitumoral, principalmente contra o câncer de pele, apresentando grande seletividade para células tumorais e, em consequência, baixa toxicidade para as células sadias e para o organismo como um todo. Por isso, os glicoalcalóides devem ser alvos de mais estudos. Estes estudos envolvem a bioprospecção dos

glicoalcalóides em espécies vegetais do gênero *Solanum* nativas do Brasil, em especial as espécies do Cerrado, bioma brasileiro pouco conhecido e com alto índice de devastação. Tais estudos devem envolver, ainda, a padronização de extrato rico em alcalóides, bem como o desenvolvimento de formulação fitoterápica para uso tópico. Tal formulação fitoterápica poderá se tornar uma alternativa de menor custo e de redução dos efeitos adversos decorrentes dos tratamentos disponíveis para os vários tipos de cânceres de pele.

1.6. Desenvolvimento da formulação tópica

O sucesso do desenvolvimento de formulações requer não somente otimização da atividade farmacológica, mas também a liberação eficiente para o sítio alvo (PAGLIARA et al., 1999).

A principal função da pele é separar e proteger o interior do corpo do ambiente externo, além de receber estímulo sensorial, ajudar a regular a temperatura do corpo e excretar substâncias não desejadas. A pele também previne a entrada de microrganismos, substâncias químicas e várias formas de radiação, além de proteger os fluidos e tecidos corporais (BARRY, 2005). Dessa forma, a composição do estrato córneo e a disposição das células e lipídios no estrato córneo criam um caminho tortuoso e fazem dele uma importante barreira que controla a saída de compostos e água do organismo, bem como a entrada de compostos acidental ou deliberadamente na pele, representando assim, o principal obstáculo à penetração cutânea de fármacos (MADISON, 2003).

No desenvolvimento de uma formulação para liberação tópica de fármacos, muitos fatores devem ser considerados, como a estabilidade do fármaco, o uso específico do produto e o sítio de aplicação (SMITH et al., 2000). O potencial de liberação do fármaco do veículo é dependente das propriedades físico-químicas do fármaco e dos componentes químicos da matriz que foram combinados para formar a formulação (HADGRAFT; LANE, 2005).

A solubilidade da substância ativa na formulação é de importância primária na determinação da taxa na qual esta substância atravessa uma membrana como a pele. A difusão é um processo cinético passivo que ocorre a favor do gradiente de concentração da região de maior para de menor concentração (SURBER et al, 1999). No entanto, como estratégias de promoção da penetração na pele podem-se incorporar à formulação compostos químicos promotores de permeação cutânea.

Estes são compostos farmacologicamente inativos, porém, são capazes de interagir com os constituintes do estrato córneo diminuindo sua resistência e facilitando assim a passagem da substância ativa (MARTINS; VEIGA, 2002).

O objetivo do tratamento tópico é produzir concentrações adequadas da substância no tecido alvo, enquanto produz baixas concentrações sanguíneas, não só devido a efeitos sistêmicos não desejados, bem como devido à rápida remoção pelo sangue, o que pode limitar a baixa concentração da substância no tecido. Desta forma, para uma substância que deve exercer sua atividade nos tecidos da pele, a situação ideal seria que ela tivesse uma boa penetração e retenção na pele com uma mínima permeação para os vasos sanguíneos, ou seja, baixa absorção sistêmica (ZATZ, 1993).

Conhecer o transporte químico através da pele é importante tanto para otimização da liberação tópica quanto transdermal. Para facilitar a estimativa da absorção dérmica, sistemas *in vitro* têm sido desenvolvidos (PAGLIARA et al., 1999).

Estudos de liberação *in vitro* podem servir como uma importante ferramenta para a avaliação inicial de formulações experimentais na área de desenvolvimento de produto. A substância ativa deve ser liberada do veículo, e depois deve estar disponível para penetração no estrato córneo e nas camadas inferiores da pele (GETIE et al., 2002).

Para o desenvolvimento de formulação para uso tópico é necessário avaliar a retenção de substâncias ativas na pele ou permeação através dela. Estes estudos são normalmente realizados utilizando pele de camundongo, pele humana proveniente de cirurgia ou pele de orelha de porco, que é considerado o melhor modelo de pele, pois além de sua maior disponibilidade, esta tem demonstrado propriedades histológicas e fisiológicas similares à da pele humana (PAGLIARA et al., 1999).

Na área de tratamento tópico anticâncer, estudos de absorção pela pele são de grande importância, pois em geral, os componentes anticâncer não devem ter efeito sistêmico quando se deseja efeito local (BRONAUGH; COLLIER, 1993). Porém, tais substâncias ativas devem atingir o estrato córneo e a epiderme para exercerem seu efeito (SEQUEIRA, 1993). Portanto, estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro* são úteis para avaliar a biodisponibilidade de substâncias ativas e comparar formulações em desenvolvimento (WESTER; MALBACH, 1990).

1.7. Desenvolvimento e validação do método analítico

Para análise e controle de qualidade da droga vegetal, do extrato alcaloídico, da formulação tópica, bem como a monitorização de etapas de desenvolvimento desta, é imprescindível o desenvolvimento e validação de métodos analíticos para a quantificação dos glicoalcalóides.

A validação da metodologia analítica visa assegurar que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (ANVISA, 2003).

Para validação dos métodos analíticos é necessário avaliar diferentes parâmetros de desempenho analítico: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de detecção, limite de quantificação, e robustez (INMETRO, 2007; ANVISA, 2003).

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir com a sua determinação em uma amostra complexa, ou seja, garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI et al, 2004).

Linearidade é a habilidade de um método analítico em produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito em amostras, em uma dada faixa de concentração. Após análise de diferentes concentrações em triplicata é necessário tratar os dados estatisticamente para determinação de parâmetros como, coeficiente de correlação, coeficientes linear e angular e soma residual dos quadrados mínimos da regressão linear e também o desvio padrão relativo (ANVISA, 2003).

Precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A precisão pode ser expressa através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (cv%) (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004).

A precisão em validação de métodos é considerada em três níveis diferentes: repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. Repetitividade, denominadas também como repetibilidade, precisão intra-ensaio e precisão intra-corrida, representa o grau de concordância entre os resultados de determinações sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição. As condições de

repetitividade são: mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento usado sob as mesmas condições, mesmo local e repetições em um curto intervalo de tempo. Precisão intermediária indica o efeito das variações dentro do laboratório devido a eventos como diferentes dias ou diferentes analistas ou diferentes equipamentos ou uma combinação de fatores. A reprodutibilidade é o grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra, efetuadas sob condições variadas (mudança de operador, local, equipamentos, etc). A reprodutibilidade refere-se aos resultados dos estudos de colaboração entre laboratórios e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos a serem incluídos em compêndios (RIBANI et al., 2004; CASSIANO et al., 2009).

Exatidão, tendências ou *Bias* representam o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. A exatidão quando aplicada a uma série de resultados de ensaio implica numa combinação de componentes de erros aleatórios e sistemáticos (tendência), podendo ser expressa como recuperação analítica (INMETRO, 2007). A exatidão é sempre considerada dentro de limites, a um dado nível de confiança. Estes limites podem ser estreitos em níveis de concentração elevados e mais amplos em níveis de traços (ANVISA, 2003; RIBANI et al., 2004; CASSIANO et al., 2009).

O limite de detecção (LD) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada, utilizando um determinado procedimento experimental (ANVISA, 2003).

O limite de quantificação (LQ) representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, utilizando um determinado procedimento experimental.

A robustez de um método analítico mede sua suscetibilidade frente a pequenas variações que podem ocorrer durante as análises de rotina. Os testes de robustez são de fundamental importância para que os analistas conheçam quais fatores devem ser estritamente controlados durante a execução de um método. Para examinar as causas de variabilidade dos resultados, vários fatores devem ser avaliados. O método é considerado robusto quando ele não é afetado por uma modificação pequena e deliberada em seus parâmetros (INMETRO, 2007; RIBANI et al., 2004).

Conclusões

5. CONCLUSÕES

Considerando-se os resultados e as discussões obtidas neste estudo pode-se concluir:

Os glicoalcalóides, solasonina e solamargina, podem ser isolados a partir do extrato alcaloídico, por cromatografia em camada delgada preparativa e por cromatografia flash associada à cromatografia de fase líquida de alta eficiência em escala preparativa.

O método analítico desenvolvido para quantificação dos glicoalcalóides por CLAE-UV no material vegetal é eficiente para quantificação desses alcalóides em extrato etanólico e extrato alcaloídico.

Os frutos verdes de *Solanum lycocarpum* apresentaram maiores teores em glicoalcalóides do que os frutos maduros.

Quanto ao potencial citotóxico, a solamargina apresenta maior potencial citotóxico que a solasonina, enquanto a solasodina, a aglicona destes heterosídeos, não apresenta potencial citotóxico frente às três linhagens de células tumorais: MDA-MB435 (melanoma humano), HCT-8 (cólon humano), HL-60 (leucemia humana) e SF-295 (glioblastoma humano).

O método analítico para quantificação dos glicoalcalóides nos experimentos de permeação e retenção é adequado para análise em matriz biológica;

A formulação “B” contendo 1% de extrato é a formulação mais adequada para experimentação *in vivo* considerando-se o modelo animal utilizado, camundongo *hairless*;

O sistema de promoção de permeação proposto, monoleína 5%, é eficiente para promover retenção na epiderme viável e derme e que a formulação desenvolvida é adequada para utilização nos futuros ensaios anticâncer de pele em camundongos *hairless*.

Referências bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABREU, P.; RELVA, A.; MATTHEW, S.; GOMES, Z.; MORAIS, Z. High-performance liquid chromatographic determination of glycoalkaloids in potatoes from conventional, integrated, and organic crop systems. **Food Control**. v.18, n. 1, p. 40-44, 2007.
- AGRA, M. F.; New Species of Solanum subgenus Leptostemonum (Solanaceae) from Chapada da Diamantina, Bahia, Brazil. **Novon**. n.9, v. 292, 1999.
- AMIR, M.; KUMAR, S. Possible industrial applications of genus Solanum in twenty first century: A review. **Journal of Scientific and Industrial Research**. v. 63, n. 2, p. 116-124, 2004.
- ANVISA- AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução nº 899. **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. 29 de maio de 2003.
- 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.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. Official methods of analysis of the Association of the Analytical Chemists. 16 ed., Washington: Arlington, 1993.
- AULTON, M. E. Pré- formulação farmacêutica. In: **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ed. Ed. Artmed: Porto Alegre, p. 124-146, -2005.
- BARRY, B. Liberação transdérmica de fármacos. In: **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2ed. Ed. Artmed: Porto Alegre, p. 504-534, 2005.
- BASTIAENS, M. T.; HOEFNAGEL, J.J.; BRUIJN, J.A.; WESTENDORP, R.G.; VERMEER, B.J.; BOUWES BAVINCK, J.N. Differences in age, site distribution, and sex between nodular and superficial basal cell carcinoma indicate different types of tumors. **Journal of Investigative Dermatology**. v.110, n.6, p.880-4. 1998.
- BLANKEMEYER, J. T.; MCWILLIAMS, M. L.; RAYBURN, J. R.; WEISSENBERG, M.; FRIEDMAN M. Developmental Toxicology of solamargine and solasonine glycoalkaloids in frog embryos. **Food and Chemical Toxicology**. v.36, n.5, p. 383-389, 1998.
- BONATO, P. S. Cromatografia Gasosa. In: **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP. Editora da UNICAMP, p. 251-256, 2006.
- BRONAUGH, R. L., COLLIER, S. W. In vitro methods for measuring skin permeation. In: **Skin Permeation – Fundamentals and Application**. Wheaton: Allured. Publishing Corporation, p. 93-111, 1993.
- CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p.1021-1030, 2009.

- CHAM, B. E. Monograph on the compound BEC. **Drugs of the future**. v. 13, n. 8, p.714-716, 1988.
- CHAM, B. E. Solasodine glycosides as anti-cancer agents: Pre-clinical and clinical studies. **Journal of Pharmacology**, v. 9, p.113-118, 1994.
- 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, n. 4, 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 solasodine glycosides. **Cancer Letters**. v. 59, p. 209-221, 1983.
- CHAM, B. E.; DAUNTER, B. Solasodine glycosides. Selective cytotoxicity for cancer cells and inhibition of cytotoxicity by rhamnose in mice with sarcoma 180. **Cancer Letters**. v. 55, p. 221-225, 1990.
- CHAM, B. E.; GILLIVER, M.; WILSON, L. Antitumor effects of glycoalkaloids isolated from *Solanum sodomaeum*. **Planta Medica**. v. 53, n. 1, 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.; TSAI, T.; WANG, J.; LIN, C.; KUO, K. The rhamnose moiety of solamargine plays a crucial role in triggering cell death by apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 242, n. 1, p. 21-25, 1998.
- CIPOLLINI, M. L.; LEVEY, D. J. Why are some fruits toxic? Glycoalkaloids in *Solanum* and fruit choice by vertebrates. **Ecology**, v. 78, n. 3, p. 782-798, 1997.
- COLLINS, C. H. Princípios básicos de cromatografia. In: **Fundamentos de Cromatografia**. Campinas, SP. Editora da UNICAMP, p. 30-41, 2006.
- CRABBE, P. G.; FRYER, C. Rapid quantitative analysis of solasodine, solasodine glycosides and soladiene by high-pressure liquid chromatography. **Journal of Chromatography**. v.187, p.87-100, 1980.
- DAUNTER, B.; CHAM, B. E. Solasodine glycosides. In vitro preferential cytotoxicity for human cancer cells. **Cancer Letters**. v. 55, p. 209-220, 1990.
- DISTL, M.; WINK, M. Identification and Quantification of Steroidal Alkaloids from Wild Tuber-Bearing *Solanum* Species by HPLC and LC-ESI-MS. **Potato Research**, v.52, n.1, p.79-104, 2009.
- EANES, R. C.; TEK, N.; KIRSOY, O.; FRARY, A.; DOGONLAR, S.; ALMEIDA, A. E. Development of practical HPLC methods for separation and determination of eggplant steroidal glycoalkaloids and their aglycones. **Journal of Liquid Chromatography e Related Technologies**. v. 31, p. 984-1000, 2008.

- EDWARDS, E. J.; COBB, A. H. Improved High-Performance Liquid Chromatographic Method for the Analysis of Potato (*Solanum tuberosum*) Glycoalkaloids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 44, n. 9, p. 2705-2709, 1996.
- GODWIN, D. A.; KIM, N.; FELTON, L. A. Influence of Transcutol CG on the skin accumulation and transdermal permeation of ultraviolet absorbers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.53, p 23–27, 2002.
- GETIE, M.; GEBRE-MARIAM, T.; RIETZ, R.; NEUBERT, R. H. H. Evaluation of the release profiles of flavonoids from topical formulations of the crude extract of the leaves of *odonata viscosa* (Sapindaceae). **Pharmazie**, v. 57, p. 320-322, 2002.
- GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: **Farmacognosia-da planta ao medicamento**. 5ªed. Porto Alegre-RS. Ed. UFRGS, p. 13-25, 2004.
- HADGRAFT, J.; VALENTA, C. pH, pKa and dermal delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, 200, p. 243–247, 2000.
- HADGRAFT, J.; LANE, M. E. Skin permeation: The years of enlightenment. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 305, p. 2–12, 2005.
- HARRISON, D. M. Steroidal Alkaloids. **Natural Products Reports**. v.2, p.139-147, 1990.
- HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P. KERBER, V. A. MORENO, P. R. H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: **Farmacognosia-da planta ao medicamento**. 5ªed. Porto Alegre-RS. Ed. UFRGS, p. 13-25, 2004.
- INMETRO-INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA. DOQ-CGCRE-008-Revisão 02. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos, 2007.
- INSTITUTO DE QUÍMICA DA UNICAMP. Espectrometria de massas. Disponível em <<http://em.iqm.unicamp.br/>>. Acesso em abril de 2009.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA) - MINISTÉRIO DA SAÚDE. Estimativa de incidência de câncer no Brasil. Disponível em <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em março de 2008.
- IKEDA, T.; TSUMAGARI, H.; HONBU T.; NOHARA T. Cytotoxic Activity of Steroidal Glycosides from Solanum Plants. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 26, p.1198-1201, 2003.
- KISSMANN, K. G; GROTH, D. **Plantas nocivas e infestantes**. Vol. III- 2º Ed. BASF, São Paulo-SP, p. 577-580, 2000.
- KUO, K.; HSU, S.; LI, Y.; LIN, W.; LIU, L.; CHANG, L.; LIN, C.; LIN, C.; SHEU, H. Anticancer activity evaluation of Solanum glycoalkaloid solamargina: 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, S.; HE, D.; ZHANG, X.; NI, W.; ZHOU, Y.; ZHANG, L. Modification of sugar chains in glycoalkaloids and variation of anticancer activity. **Chemical Research in Chinese Universities**. v. 23, n. 3, p. 303-309, 2007.
- LIANG, C.; LIU, F.; SHIU, L.; HUANG, Y.; CHANG, L.; KUO, K. Action of solamargina on TNFs and cisplatin-resistant human lung cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 322, p. 751-775, 2004.
- LOPEZ, R.F.V., BENTLEY, M.V.L.B., DELGADO-CHARRO, M.B., GUY, R.H. Iontophoretic delivery of 5- aminolevulinic acid (ALA): effect of pH. **Pharmaceutical Research**. v. 18, p. 311- 315, 2001.
- LOPES, L. B.; SPERETA, F. F. F.; BENTLEY, M. V. L. B. Enhancement of skin penetration of vitamin K using monoolein-based liquid crystalline systems. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 32, p. 209-215, 2007.
- LORENZI, H. **Plantas daninhas do Brasil**. Ed. Plantarum, Nova Odessa-SP. p. 392, 1991.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Ed. Plantarum, Nova Odessa-SP, p. 460-461, 2002.
- MACILVAINE, T. C. Buffer solution for colorimetric comparison. **Journal of Biological Chemistry**, v.49, 183-186, 1921.
- MACHADO, R.B., M.B. RAMOS NETO, P.G.P. PEREIRA, E. CALDAS, D.A. GONÇALVES, N.S. SANTOS, K. TABOR E M. STEININGER. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Relatório técnico não publicado. **Conservação Internacional**, Brasília, DF, 2004.
- MADISON, K. C. Barrier function of the skin: "La Raison d'être" of the epidermis. **Journal of Investigative Dermatology**, Baltimore, v. 121, p. 231-241, 2003.
- MARTINS, M. R. F. M.; VEIGA F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos:uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 38, n.1, 2002.
- MATOS, F.J. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2.ed. Fortaleza: UFC. 1997. 128p.

- MOSER, K., KRIWET, K., NAIK, A., KALIA, Y.N., GUY, R.H. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.82, p.103-112, 2001.
- MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**. v.65, p 55-63, 1983.
- 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.
- NATIONAL CANCER INSTITUTE (NCI). A to Z list of câncer. Disponível em <<http://www.cancer.gov>>. Acesso em março de 2008.
- NEWMAN, D. J.; GRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**. v. 6, p. 1022-1037, 2003.
- OLIVEIRA, F., AKISUE, G., AKISUE, M.K. **Farmacognosia**. São Paulo: Atheneu, 1996. 412 p.
- PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. **Introduction to spectroscopy: a guide for students of organic chemistry**. 3.ed. Washington. Thompson Learning, 2001. 680p.
- PAGLIARA, A., REIST, M., GEINOZ, S., CARRUPT, P. A., TESTA, B. Evaluation and prediction of drug permeation. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, p. 1339-1357, 1999.
- PENG, Q.; WARLOE, T.; MOAN, J.; HEYERDAHL, H.; STEEN, H.B.; NESLAND, J.M.; GIERCKSKY, K.E. Distribution of 5-aminolevulinic acid-induced porphyrins in nodulocutaneous basal cell carcinoma. **Journal of Photochemistry and Photobiology, B: Biology**. v. 62, p. 906-913, 1995.
- PUNJABI, S; COOK, L. J.; KERSEY, P.; MARKS, R.. Solasodine glycoalkaloids: a novel topical therapy for basal cell carcinoma. A double-blind, randomized, placebo-controlled, parallel group, multicenter study. **International Journal of Dermatology**. v. 47, p. 78-82, 2008.
- PURI, R.; WONG, T. C. ^1H - and ^{13}C -nmr assignments and structural determination of a novel glycoalkaloid from *Solanum platanifolium*. **Journal of Natural products**. v. 57, n.5, p.587-96, 1994.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**. v. 39, p. 603-613, 2001.
- REIS, M. S.; MARIOT, A.; STEENBOCK, W. Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: **Farmacognosia-da planta ao medicamento**. 5ªed. Porto Alegre-RS. Ed. UFRGS, p. 45-47, 2004.
- RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validation for chromatographic and electrophoretic methods. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

- RIDOUT C. L.; PRICE, K. R.; COXON, D. T.; FENWICK, G. R. Glicoalkaloids from *Solanum nigrum* L., solamargine and solasonina. *Pharmazie*, v.44, p. 732-733, 1989.
- SCIENTIFIC COMMITTEE ON CONSUMER PRODUCTS (SCCP). Basic criteria for the *in vitro* assessment of dermal absorption of cosmetic ingredients. **European Commission health and consumer protection directorate-General**, 2006.
- SCHWARZ, A.; PINTO, E.; MITSUE, H.; OLIVEIRA, C. A.; BERNARDI, M. M.; SPINOSA, H. S. Phytochemical study of *Solanum lycocarpum* (St. Hil) unripe fruit and its effects on rat gestation. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 11, p. 1025 – 1028, 2007.
- SEQUEIRA, J. A., Optimization of the skin availability of topical drugs **.Skin Permeation – Fundamentals and application**. Wheaton: Allured Publishing Corporation, p.163-176, 1993.
- SILVA, J.A.; SILVA, D.B.; JUNQUEIRA, N.T.V.; ANDRADE, L.R.M. **Frutas nativas dos cerrados**. Brasília: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Brasil (EMBRAPA), Brasil. 1994. 166p.
- SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X; KIEMLE, D. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7.ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2007. 490 p.
- SMITH, E. W.; MALBACH, H. I.; SURBER, C. Use of emulsions as topical drug delivery systems. In: **Pharmaceutical emulsions and suspensions**, Marcel Dekker, p.259-269, 2000.
- STAHL, E.; BOLLINGER, H. R. **Thin-layer chromatography; a laboratory handbook**. Ed. Springer, 1965.
- 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.
- SURBER, C.; SCHWARB, F.; SMITH, E. Tape-stripping technique. In: **Percutaneous absorption – Drugs, Cosmetics, Mechanisms and Methodology**, 3° ed, Marcel Dekker, New York, p.395-409, 1999.
- VERMA, D.D., FAHR, A. Synergistic penetration effect of ethanol and phospholipids on the topical delivery of cyclosporin A. **Journal of Control Release**, v.97, p.55-66, 2004.
- WEISSENBERG, M. Isolation of solasodine and other steroidal alkaloids and sapogenins by direct hydrolysis-extraction of *Solanum* plants or glycosides therefrom. **Phytochemistry**. v. 58, p. 501–508, 2001.

- WESTER, C. R., MAIBACH, H. L. In vitro testing of topical pharmaceutical formulations
In: OSBORNE, D.W., AMAMNN, A.H. **Topical Drug Delivery Formulations**. New
York: Marcel Dekker, p. 213-220, 1990.
- WELLS, J.L. **Pharmaceutical preformulation: the physicochemical properties of
drug substances**. Ellis Horwood, Hardcover, p.21-85, 1988.
- YOSHIKAWA, M.; NAKAMURA, S.; OZAKI, K.; KUMAHARA, A.; MORUKAWA, T.;
MATSUDA, H. Structures of steroidal alkaloid oligoglycosides, robeneosides A and
B, as antidiabetogenic constituents from the brazilian medicianl plant Solanum
Lycocarpum. **Journal of Natural Products**. v. 70, p.210-214, 2007.
- ZATZ, J. Rationale and approaches to skin permeation In: **Skin Permeation –
Fundamentals** and application. Wheaton: Allured Publishing Corporation, p.11-31,
1993.
- ZHA, X.; SUN, H.; HAO, J.; ZHANG, Y. Efficient Synthesis of Solasodine, O-
Acetylsolasodine, and Soladulcidine as Anticancer Steroidal Alkaloids. **Chemistry
and biodiversity**. v. 4, p. 25-31, 2007.