

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 Tioffi 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. **Alcaloidic 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.

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).

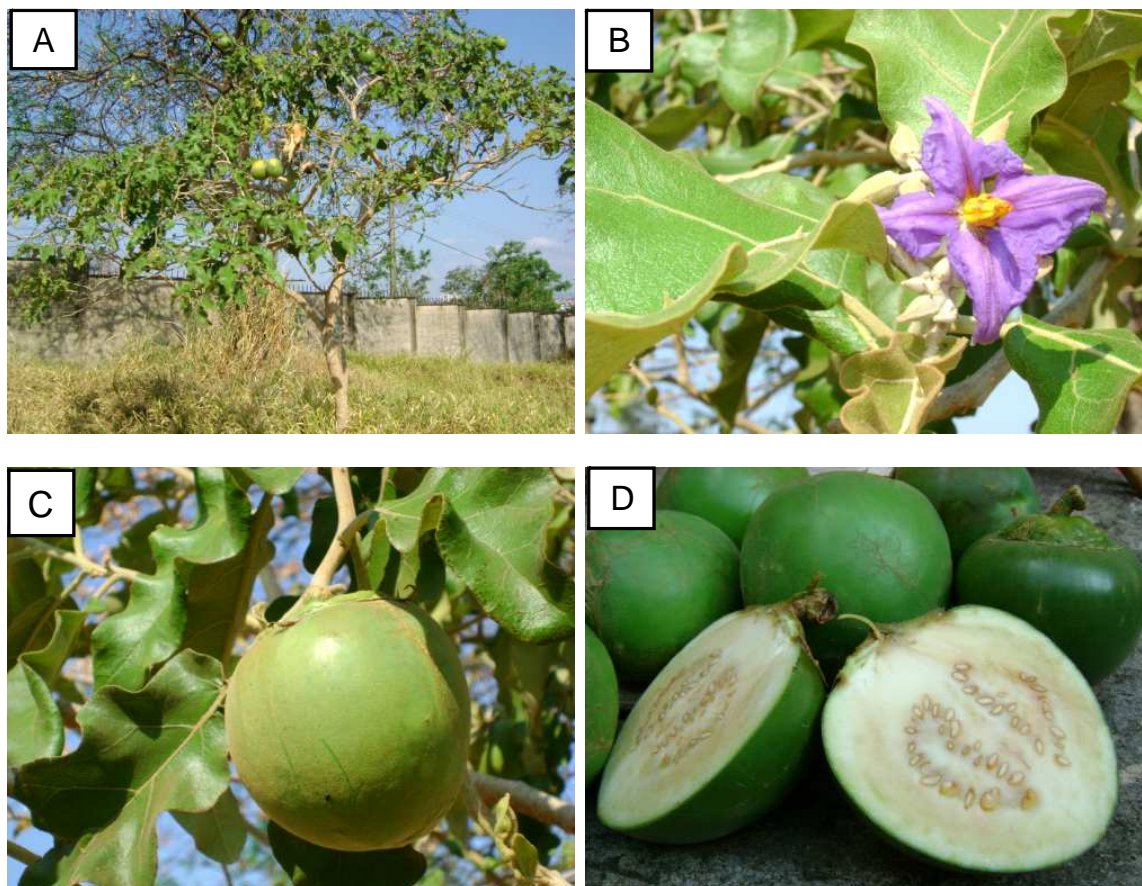


Figura 1 – Árvore (A); Flor (B) e Fruto (C e D) da espécie *S. lycocarpum* A. St.-Hil.

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).

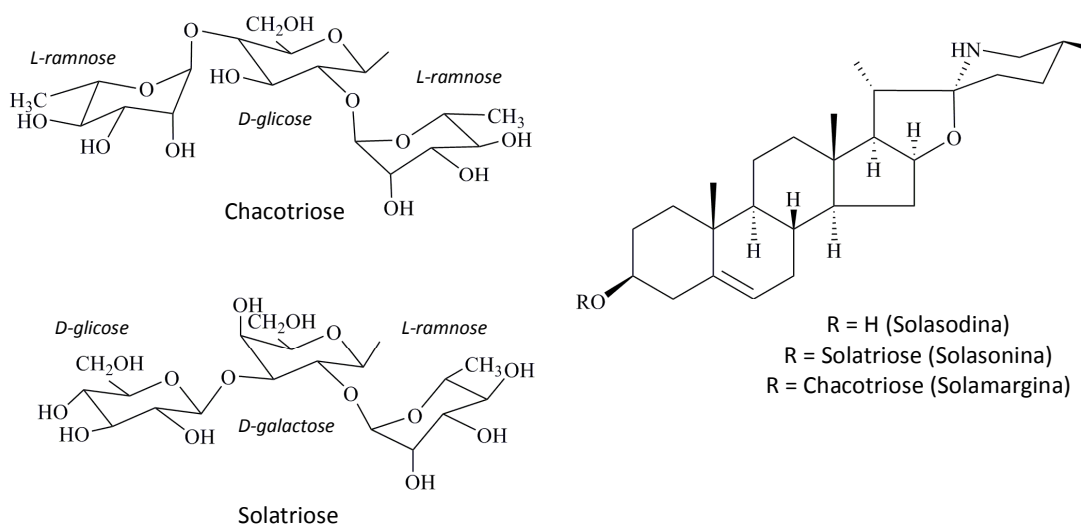


Figura 2 – Estrutura química da solasodina e dos heterosídeos alcaloídicos solamargina e solasonina.

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 ramnose presentes na SM e SS estão diretamente ligadas à atividade antitumoral destes compostos, uma vez que SM apresenta duas ramnose 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 atuam 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).

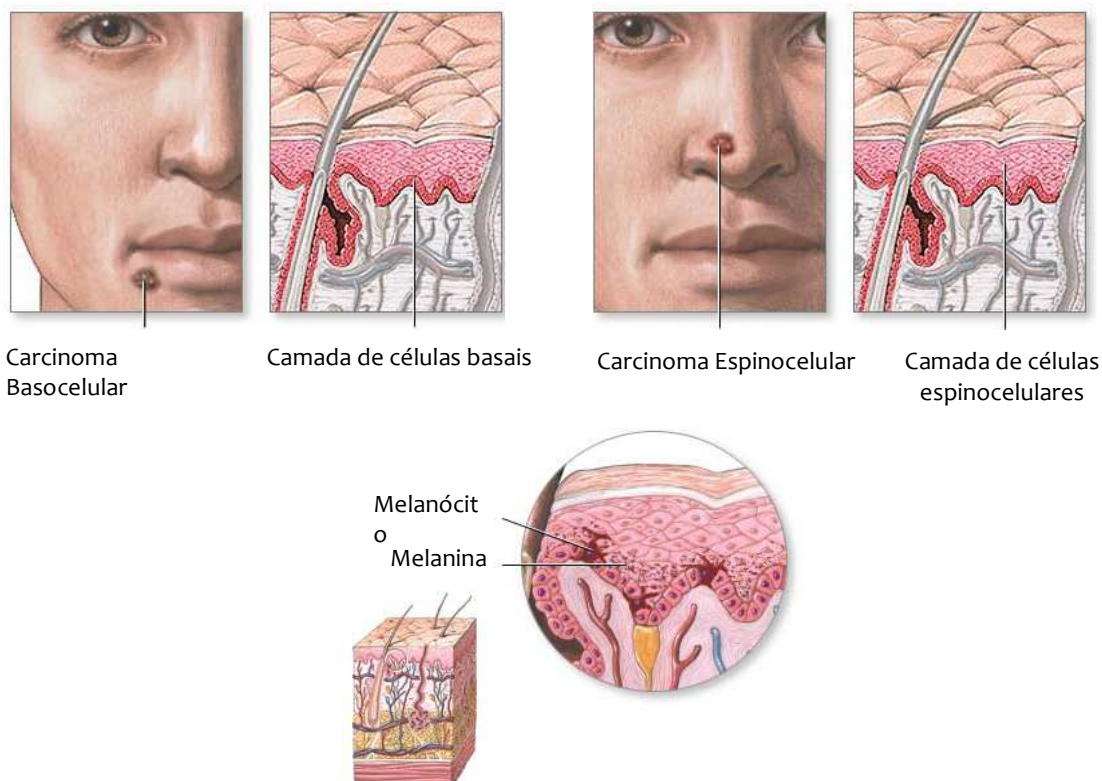


Figura 3 – Tipos de células afetadas no câncer de pele. Adaptado de A.D.A.M. Disponível em: <<http://adam.about.net/reports/Melanoma-and-other-skin-cancers.htm>>. Acesso em: 06 Fev. 2012.

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.

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 aminolevulinic acid-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.