

**BIOATIVIDADE DA SOLAMARGINA E SOLASODINA PARA DIFERENTES
SISTEMAS CELULARES APÓS METABOLIZAÇÃO IN VITRO POR FRAÇÃO
MICROSSOMAL HEPÁTICA**

Orientada: Karina Ponsoni

Orientadora: Profa. Dra. Maria Stella Gonçalves Raddi

Araraquara

2012

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS CÂMPUS DE ARARAQUARA

KARINA PONSONI

**BIOATIVIDADE DA SOLAMARGINA E SOLASODINA PARA DIFERENTES
SISTEMAS CELULARES APÓS METABOLIZAÇÃO IN VITRO POR FRAÇÃO
MICROSSOMAL HEPÁTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biociências e Biotecnologia aplicada à
Farmácia, Área de Análises Clínicas da Faculdade
de Ciências Farmacêuticas da UNESP, como parte
dos requisitos para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Stella Gonçalves Raddi

Araraquara

2012

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

P799b Ponsoni, Karina
Bioatividade da solamargina e solasodina para diferentes sistemas celulares após metabolização in vitro por fração microsomal hepática / Karina Ponsoni. – Araraquara, 2012
109 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia
Orientador: Maria Stella Gonçalves Raddi

1. Solamargina. 2. Solasodina. 3. Metabolização. 4. Citotoxicidade. 5. Mutagenicidade. 6. Atividade antibacteriana. I. Raddi, Maria Stella Gonçalves, orient. II. Título.

COMISSÃO EXAMINADORA

Profa. Dra. Maria Stella Gonçalves Raddi

Profa. Dra. Miriam Sannomiya

Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins

Prof. Dr. Alberto Camilo Alécio

Prof. Dr. Luis Marcos da Fonseca

DEDICATÓRIA

Ao meu filho Leonardo

espero que entenda um dia a importância dessa etapa em minha vida e o porquê dos momentos de ausência....

À Stella,

... que poderia ter se limitado à orientação como professora, mas foi muito além disso.

... pelos momentos de compreensão em minhas dificuldades e obstáculos, meu eterno obrigado!

AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas graças proporcionadas em minha vida.

Aos meus pais Lurdinha e Pedro: a emoção e a razão, que complementam minha existência.

Às minhas queridas irmãs Sara e Evelin e respectivos cunhados, Ricardo e Marcelo, pela convivência e por todas as palavras de carinho e incentivo.

Ao Leandro, pela presença e carinho.

À Profa. Dra. Adélia Almeida, pelo isolamento dos alcalóides e pela disponibilidade sempre.

À Profa. Dra. Eliana Varanda, pelo acolhimento em seu grupo de pesquisa e confiança.

Ao Prof. Dr. Alberto Camilo Alécio, por me orientar na análise química e amizade.

Às queridas amigas: Cibele, Mary, Fabiana e Eliana, pela convivência, troca de experiências e amizade.

Ao Felipe Oliveira pela ajuda com a manutenção das linhagens celulares e a amizade.

À Cassia pela ajuda com os ensaios de mutagenicidade e amizade.

Ao Rodrigo, pelos momentos em que se fez presente.

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

I INTRODUÇÃO

1.1.	Família Solanácea -----	18
1.2.	Metabólitos Secundários -----	19
1.3.	Alcalóides -----	20
1.4.	Glicoalcalóides -----	22
1.5.	Biotransformação -----	24
1.6.	Fração S9 -----	25
1.7.	Atividade biológica dos glicoalcalóides -----	26
1.8.	Citotoxicidade -----	29
1.9.	Mutagenicidade -----	30
1.10.	Antimicrobiano -----	31
1.11.	Espectrometria de massas -----	33
1.12.	<i>Electrospray</i> -----	33
1.13.	Espectrometria de massas seqüencial – Tandem - (EM/EM)	33

II OBJETIVO

2.1.	Geral -----	37
------	-------------	----

2.2. Específico -----	37
III MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1 Obtenção da Solamargina e Solasodina -----	38
3.1.1. Planta -----	38
3.1.2. Isolamento da solamargina -----	38
3.1.3. Separação e purificação da solamargina -----	40
3.1.4. Separação e purificação da solasodina -----	41
3.1.5. Identificação dos alcalóides -----	43
3.2. Fração S9 (sistema de ativação metabólica) -----	43
3.3 Preparo dos alcalóides -----	43
3.4 Determinação da atividade citotóxica -----	44
3.4.1 Procedimento -----	44
3.4.2 Técnica do vermelho neutro -----	45
3.4.3 Técnica do MTT -----	45
3.4.4 Determinação do Índice Citotóxico (IC) -----	46
3.4.5 Citotoxicidade associada ao sistema de metabolização S9 ---	46
3.4.6. Análise Estatística -----	47
3.5. Determinação da atividade antimicrobiana -----	47
3.6. Determinação da atividade mutagênica -----	48
3.7. Análise Espectral -----	50
IV RESULTADOS	
4.1. Influência da fração S9 na viabilidade celular -----	51

4.2.	Influência da fração S9 na atividade antimicrobiana -----	56
4.3.	Influência da fração S9 na atividade mutagênica -----	60
4.4.	Produtos de metabolização in vitro da solamargina e solasodina ---	64
V	DISCUSSÃO	70
VI	CONCLUSÃO	80
VII	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

RESUMO

O glicoalcalóide esteroidal solamargina (SM) e sua aglicona solasodina (SD), isolados de frutos de *Solanum palinacanthum* (juá), foram avaliados *in vitro* quanto à citotoxicidade, mutagenicidade, atividade antimicrobiana na presença de sistema de metabolização microsomal hepático (fração S9). A viabilidade das linhagens celulares RAW 264.7, SiHa e HepG2 expostas a diferentes concentrações (200 – 6,25 µg/mL) dos alcalóides, na presença ou não da fração S9, foi avaliada após 24 horas pela técnica do MTT-tetrazólio e Vermelho Neutro (VN). A curva dose-resposta indicou que a fração microsomal diminuiu o efeito citotóxico dos alcalóides para as linhagens RAW e SiHA, entretanto essa atividade foi potencializada para a linhagem HepG2. Atividade antibacteriana para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, através da técnica de microdiluição, demonstrou que a fração S9 potencializou esse efeito para ambos os alcalóides, entretanto a concentração inibitória mínima (CIM) só foi definida para *S. aureus* (1,0 mg/mL), porém apenas com efeito bacteriostático. O teste de mutagenicidade, realizado pela técnica de AMES, demonstrou efeito mutagênico apenas para a SM na linhagem TA98 na ausência de ativação metabólica nas concentrações acima de 400 µg/mL. Espectrometria de massas foi utilizada para comparar os fragmentos gerados pelos alcalóides após metabolização com a fração S9. A análise espectral evidenciou a presença de diferentes fragmentos, indicando biotransformação dos alcalóides.

Palavras-chave: Solamargina, solasodina, metabolização, citotoxicidade, mutagenicidade, atividade antibacteriana

ABSTRACT

The steroidal glycoalkaloid solamargine (SM) and its aglycone solasodine (SD), isolated from fruits of *Solanum palinacanthum* (juá) were evaluated in vitro for cytotoxicity, mutagenicity, antimicrobial activity in the presence of hepatic microsomal metabolizing system (S9 fraction). The viability of RAW 264.7 cell lines, SiHa and HepG2 cells exposed to different concentrations (200 to 6.25 mg/mL) of alkaloids, in the presence or absence of S9 fraction was analyzed after 24 hours using the techniques of the MTT-tetrazolium and Neutral Red (RN). The dose-response curve indicated that the microsomal fraction decreased to cytotoxic of alkaloids lines for RAW and Siha, however this activity has was potentiated to the HepG2. Antibacterial activity *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* by the microdilution technique, showed that the fraction S9 potentiated the effect to both alkaloids, however the minimum inhibitory concentration (MIC) was defined only for *S. aureus* (1.0 mg / mL), but without bactericidal effect. The mutagenicity test, performed by the technique of AMES, demonstrated mutagenic effect only for the SM strain TA98 in the absence of metabolic activation at concentrations above 400 mg/mL. Mass spectrometry was used to compare the fragments generated by alkaloids after metabolization with S9 fraction. Spectral analysis showed the presence of different fragments, indicating biotransformation of alkaloids.

Keywords: solamargine, solasodine, metabolism, cytotoxicity, mutagenicity, antibacterial activity

LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES E SÍMBOLOS

AF	2-aminofluoreno
ANTR	2-antramina
ATCC	American Type Culture Collection
AS	Azida Sódica
C	Carbono
°C	Graus Celsius
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CIM	Concentrações Inibitória Mínima
CIS	Cisplatina
CIS+	Cisplatina com S9
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO₂	Dióxido de Carbono
DAU	Daunomicina
DMEM	Meio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil Sufóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
EM	Espectrometria de Massas
H	Hidrogênio
His	Histidina
IC	Índice Citotóxico

IV	Infra Vermelho
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mV	Milivolts
m/z	Relação massa por carga
M	mol/Litro
µmols	Micromoles
mHz	Mega Hertz
mL	Mililitro
mg	Miligrama
mM	Milimolar
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
N	Normalidade
nm	Nanômetro
NADP	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
NPD	4-O-nitrofenilenodiamina
OH⁻	Radical Hidroxil
PBS	Tampão Salina Fosfato
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
<i>R_f</i>	Fator de resolução
RM	Razão de Mutagenicidade

SBF	Soro Fetal Bovino
S9	Sistema de Ativação Metabólica
SM	Solamargina
SM+	Solamargina acrescida do sistema de metabolização S9
SD	Solasodina
Sd+	Solasodina acrescida do sistema de metabolização S9
TA	Teste Ames
GL	°Gay Lussac
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UV	Ultra Violeta
VN	Vermelho Neutro
v/v	Volume por Volume
V	Volts

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspecto geral do indivíduo adulto <i>Solanum palinacanthum</i> -----	20
Figura 2. Relação estrutural dos principais glicoalcalóides de <i>Solanum</i> -----	24
Figura 3. Estrutura química do glicoalcalóide solamargina e aglicona solasodina	25
Figura 4. Obtenção de extrato bruto com glicoalcalóides -----	40
Figura 5. Identificação de frações esteroídicas -----	41
Figura 6. Isolamento da solamargina -----	42
Figura 7. Isolamento da solasodina -----	43
Figura 8. Relação dose-resposta de diferentes concentrações de solamargina e solasodina, com e sem sistema de metabolização (S9), na viabilidade de células RAW, utilizando a técnica do VN -----	52
Figura 9. Relação dose-resposta de diferentes concentrações de solamargina e solasodina, com e sem sistema de metabolização (S9), na viabilidade de células SiHa, utilizando a técnica do VN -----	53
Figura 10. Relação dose-resposta de diferentes concentrações de solamargina e solasodina, com e sem sistema de metabolização (S9), na viabilidade de células HepG2, utilizando a técnica do VN -----	53
Figura 11. Relação dose-resposta de diferentes concentrações de solamargina e solasodina, com e sem sistema de metabolização (S9), na viabilidade de células RAW, utilizando a técnica do MTT -----	54
Figura 12. Relação dose-resposta de diferentes concentrações de solamargina e solasodina, com e sem sistema de metabolização (S9), na viabilidade de	

células SiHa, utilizando a técnica do MTT -----	54
Figura 13. Relação dose-resposta de diferentes concentrações de solamargina e solasodina, com e sem sistema de metabolização (S9), na viabilidade de células HepG2, utilizando a técnica do MTT -----	55
Figura 14. Relação dose-resposta do crescimento de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> na presença de solamargina e solasodina com e sem de metabolização -----	58
Figura 15. Relação dose-resposta do crescimento de <i>Escherichia coli</i> na presença de solamargina e solasodina com e sem sistema de metabolização ---	59
Figura 16. Relação dose-resposta do crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> na presença de solamargina e solasodina com e sem sistema de metabolização ---	60
Figura 17. Espectro de massas da solamargina -----	66
Figura 18. Fragmentograma da solamargina na presença de S9 -----	67
Figura 19. Espectro de massas da solasodina -----	68
Figura 20. Fragmentograma da solasodina na presença de S9 -----	69
Figura 21. Fragmentograma do DMEN acrescido de fração S9 -----	70
Figura 22. Fragmentos da solasodina detectados em MS -----	80

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Índice citotóxico ($\mu\text{g/mL}$) da solamargina e solasodina ($\mu\text{g/mL}$) com e sem sistema de ativação metabólica para diferentes linhagens celulares obtido pela técnica do Vermelho Neutro -----	56
Tabela 2 – Índice citotóxico ($\mu\text{g/mL}$) da solamargina e solasodina com e sem sistema de ativação metabólica para diferentes linhagens celulares obtido pela técnica do MTT-tetrazólio -----	57
Tabela 3 – Inibição do crescimento <i>Pseudomonas aeruginosa</i> induzido por diferentes concentrações de solamargina e solasodina, com e sem sistema de ativação metabólica -----	58
Tabela 4 – Inibição do crescimento de <i>Escherichia coli</i> induzido por diferentes concentrações de solamargina e solasodina, com e sem sistema de ativação metabólica -----	59
Tabela 5 – Inibição do crescimento de <i>Staphylococcus aureus</i> induzido por diferentes concentrações de solamargina e solasodina, com e sem sistema de ativação metabólica -----	60
Tabela 6 – Mutagenicidade da solasodina com e sem sistema de ativação metabólica para linhagens TA98 e TA100 de <i>S. typhimurium</i> -----	62
Tabela 7 – Razão de mutagenicidade em linhagens TA98 e TA100 de <i>S. typhimurium</i> para diferentes concentrações de solasodina -----	62
Tabela 8 – Mutagenicidade da solamargina com e sem sistema de ativação metabólica para linhagens TA98 e TA97 de <i>S. typhimurium</i> -----	63

Tabela 9 – Razão de mutagenicidade obtida com linhagens TA98 e TA97 de <i>S. typhimurium</i> tratadas com diferentes concentrações de solamargina -----	63
Tabela 10 – Mutagenicidade da solamargina com e sem sistema de ativação metabólica para linhagens TA100 e TA102 de <i>S. typhimurium</i> -----	64
Tabela 11 – Razão de mutagenicidade em linhagens TA100 e TA102 de <i>S. typhimurium</i> para diferentes concentrações de solamargina -----	64

I - INTRODUÇÃO

As plantas produzem uma vasta variedade de compostos orgânicos, sendo que a maioria não está, necessariamente, relacionada de forma direta ao processo de crescimento e desenvolvimento das mesmas. Esses compostos, conhecidos como metabólitos secundários, são produtos derivados do metabolismo primário, sintetizados para a preservação do vegetal e, em muitos casos, como resposta a alguns estímulos incluindo o ataque por microrganismos, insetos e herbívoros, que garantem vantagens para a sobrevivência e perpetuação da espécie em seu ecossistema (HARBORNE, 1999; AERTS et al., 1991).

1.1. Família Solanácea

Plantas da família Solanaceae são exploradas no contexto científico por apresentarem características relevantes à saúde humana (FRIEDMAN, 2006). Nessa família de, aproximadamente, 96 gêneros e 3000 espécies, o gênero *Solanum* é o mais representativo, uma vez que contém espécies que fazem parte da alimentação humana (MABBERLY, 1997). Dentre as principais espécies utilizadas como alimentos destacam-se *S. tuberosum* (batata), *S. lycopersicum* (tomate) e *S. melongena* (berinjela) (FRIEDMAN, 2004).

Muitas solanáceas são endêmicas no Brasil. A espécie *Solanum palinacanthum* Dunal, (Figura 1), denominada popularmente de juá, possui como característica arbusto ereto, caule, ramos com folhas isoladas e espinhosas, flores roxas, baga globosa e numerosas sementes. Essa planta foi utilizada nesse estudo para obtenção de solamargina.

Trata-se de uma espécie exclusiva da América do Sul, com distribuição no Brasil, Bolívia, Paraguai e Argentina, em locais com altitudes abaixo de 1.200 m (AGRA, 2009).



Figura 1. Aspecto geral do indivíduo adulto *Solanum palinacanthum* L.

1.2. Metabólitos Secundários

A maioria dos metabolitos secundários de interesse científico é classificada em categorias com base na sua origem biossintética e são, muitas vezes, derivados dos metabólitos primários. Entende-se por metabolismo primário o conjunto de processos metabólicos que desempenham uma função essencial no vegetal, tais como a fotossíntese, a respiração e o transporte de solutos, e possuem uma distribuição universal nas plantas (VERPOORTE e MEMELINK, 2002).

A taxonomia vegetal pode ser realizada através da avaliação do metabólito secundário originado, uma vez que esses compostos não possuem uma distribuição universal e não são necessários para todas as plantas (MARASCHIN e VERPOORTE; MEMELINK et al, 2001).

O ciclo de vida das plantas, na maioria das vezes, independe do metabolismo secundário, mas ele desempenha um papel importante na interação dessas com o ambiente (SANTOS, 2000). Os produtos secundários possuem um papel contra o ataque de patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de semente e microrganismos simbioses (VERPOORTE et al, 2000). Contudo, produtos secundários também possuem ação protetora em relação a mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição à UV e deficiência de nutrientes minerais (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

Existem três grandes grupos de metabólitos secundários: terpenos, compostos fenólicos e alcalóides. Os terpenos são feitos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Os compostos fenólicos são derivados do ácido chiquímico ou ácido mevalônico. Por fim, os alcalóides são derivados de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico, e também de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) (CROTEAU et al., 2000).

Espécies do gênero *Solanum* acumulam alcalóides, que constituem uma classe de metabólitos secundários, representada por um grande número de substâncias estruturalmente diversas, e, portanto, difícil de serem definidas quimicamente (MILNER, 2011).

1.3. Alcalóides

Por definição alcalóides são compostos orgânicos heterocíclicos, que possuem um ou mais nitrogênio em seu esqueleto carbônico, característica que indica a origem química. Os alcalóides esteroidais são classificados com base no hidrocarboneto esteroideal que

melhor representa a estrutura geral do composto, em três grupos principais: aminopregnanos (21 átomos de carbono), 20-piperidilpregnanos (27 átomos de carbono) e alcalóides com esqueletos anômalos. Os alcalóides esteroidais com 27 carbonos, do tipo piperidilpregnano, podem ser encontrados na forma de glicosídeos produzidos pela planta, e classificam-se em quatro subgrupos: espirosolanos, solanidanos, solanocapsinas e 20-piperidilpregnanos simples (CHIESA et al., 1999).

Desse modo, quase a totalidade dos alcalóides é derivada de aminoácidos, como a ornitina, a lisina, a tirosina e o triptofano. A ornitina é precursora dos alcalóides pirrolidínicos e tropânicos, a lisina origina os alcalóides piperidínicos. A tirosina e o triptofano são formados na via do ácido chiquímico e originam os alcalóides isoquinolínicos e indólicos, respectivamente (DEWICK, 2001).

A presença do átomo de N indica um par de elétrons não compartilhados, conferindo caráter alcalino a maioria dos alcalóides. Os alcalóides são sintetizados no retículo endoplasmático, concentrando-se, em seguida, nos vacúolos e, dessa forma, não aparecem em células jovens. Essa classe de compostos do metabolismo secundário é famosa pela presença de substâncias que possuem acentuado efeito no sistema nervoso, sendo muitas delas utilizadas como venenos ou alucinógenos (FACCHINI, 2001).

Os dados de uso desses compostos são referenciados desde a antiguidade, sendo talvez o caso mais famoso a execução do filósofo grego Sócrates, condenado a ingerir cicuta (*Conium maculatum*), uma fonte do alcalóide coniina. Os romanos também faziam uso de alcalóides em homicídios, sendo os principais alcalóides em questão a hiosciamina, a atropina e a baladonina, todos derivados de *Atropa belladonna*. Tal uso fez com que mais

tarde essa e outras plantas da família Solanaceae fossem conhecidas na Europa como plantas da sombra da noite ou night shade. (KUTCHAN, 1995).

Os alcalóides também são úteis para a sociedade, medicamentos com alcalóides vincristina e vinblastina, presentes em vinca (*Vinca rosea*) são amplamente utilizados no tratamento anticâncer (MARINHO, 2001).

1.4. Glicoalcalóides

Glicoalcalóides consistem de dois componentes estruturais, que representa a sua natureza anfifílica. A unidade aglicona consiste de um esqueleto de 27 carbonos de colestano hidrofóbico com resíduo glicosídeo ligado na posição 3-OH, caracterizado por uma hidrófila cadeia lateral de hidrato de carbono. As agliconas de glicoalcalóides, também referido como alcalinas, são classificadas em cinco categorias diferentes, dependendo das suas estruturas: solanidanas, spirosolanas, epiminocolestanas, R-epiminocyclohemiacetals e 3-aminospirostanas. A maioria dos glicoalcalóides encontrada em espécies de *Solanum* pertence à categoria solanidane e spirosolana (MILNER, 2011). A estrutura dos principais glicoalcalóides de *Solanum*, relacionando a aglicona ao resíduo glicosídeo pode ser observada na Figura 2.

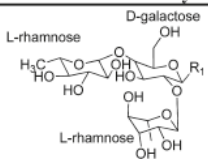
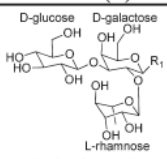
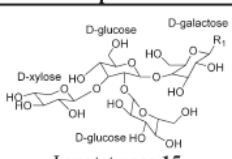
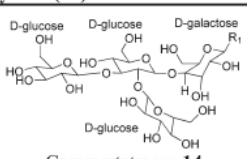
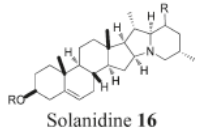
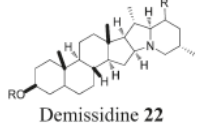
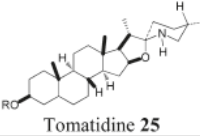
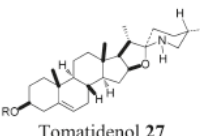
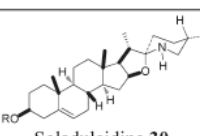
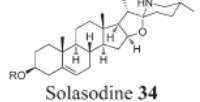
Aglycones R ¹	Glycosidic Residues (R) attached at 3-OH position on the aglycone (R ¹)			
	 Chacotriose 12	 Solatriose 13	 Lycotetraose 15	 Commertetraose 14
 Solanidine 16	α-Chaconine 2 (R=H) Leptine I 17 (R=OAc) Leptinine I 18 (R=OH) (potato)	α-Solanine 1 (R=H) Leptine II 19 (R=OAc) Leptinine II 20 (R=OH) (potato)		Dehydrocommersonine 21 (potato)
 Demissidine 22			Demissine 23 (potato)	Commersonine 24 (potato)
 Tomatidine 25			α-Tomatine 3 (tomato)	Sisunine 26 (potato hybrids)
 Tomatidenol 27	β-Solamarine 28 (deadly nightshade)	α-Solamarine 29 (deadly nightshade)	Dehydrotomatine 4 (tomato)	
 Soladulcine 30	Soladulcine A 31 (deadly nightshade)	β-Soladulcine 32	Soladulcine B 33 (deadly nightshade)	
 Solasodine 34	α-Solamargine 6 (aubergine)	α-Solasonine 5 (aubergine)		

Figura 2. Relação estrutural dos principais glicoalcalóides de *Solanum*

(Fonte: MILNER, 2011)

A solamargina é um heterosídeo alcaloídico que difere da aglicona solasodina por apresentar uma cadeia de trissacarídeo no grupo 3-hidroxi, denominada chacotriose, formada por duas moléculas de ramnose e uma de galactose como ilustra a Figura 3 (BLANKEMEYER et al., 1998).

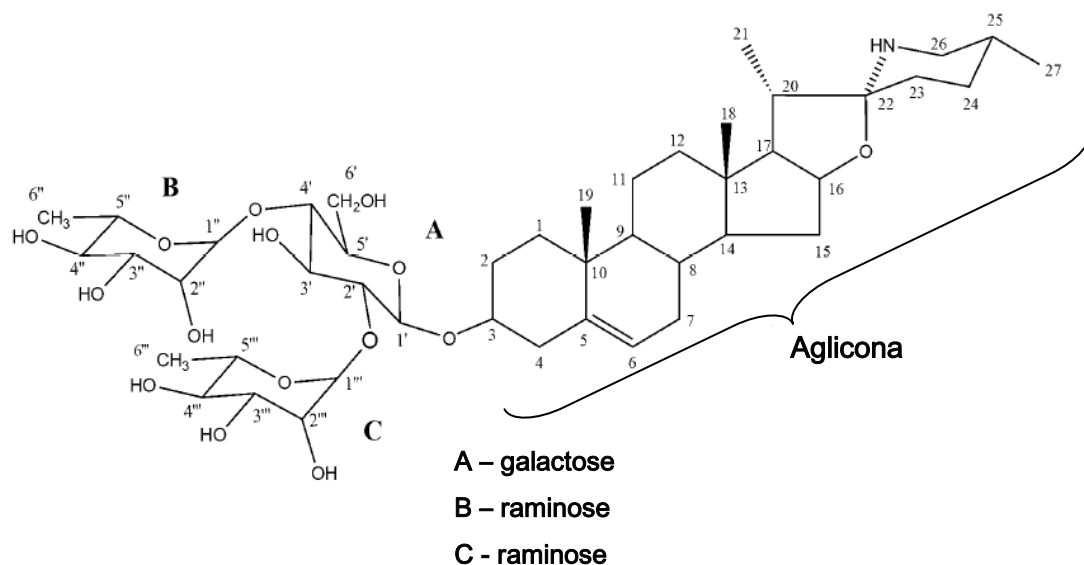


Figura 3. Estrutura química do glicoalcalóide solamargina e aglicona solasodina, enfatizando os resíduos glicosídeos da chacotriose: A – galactose, B e C – raminose.

1.5. Biotransformação

Biotransformação é a alteração química sofrida por xenobióticos no organismo, comumente sob a ação de enzimas específicas e/ou inespecíficas (MEYER, 1996). Processos de biotransformação são capazes de converter compostos lipofílicos em metabólitos mais solúveis através de reações enzimáticas. Assim, a molécula original é modificada no sentido de reduzir sua capacidade de partição em membranas biológicas, o que restringe sua distribuição pelos tecidos e sua reabsorção renal e intestinal. (OLIVEIRA, 2006).

Na maioria das vezes, os processos de biotransformação levam à inativação das substâncias (mecanismo de desativação), mas pode ocorrer que os metabólitos produzidos sejam mais tóxicos que os compostos de origem (mecanismo de ativação ou bioativação).

São conhecidos inúmeros exemplos onde o fármaco administrado (denominado "pró-fármaco") é um produto inativo, o qual é convertido *in vivo* na forma farmacologicamente ativa, como por exemplo, a ciclofosfamida, que é um agente antineoplásico que requer ativação metabólica por enzimas hepáticas do sistema citocromo P-450, pois somente os metabólitos formados são responsáveis pela atividade antitumoral (RANG et al., 2003; CHU e SARTORELLI, 2005). Assim, a bioativação pode levar à formação de intermediários mais ativos capazes de causar danos induzindo morte celular, como também câncer quimicamente induzido, teratogênese e outras consequências indesejáveis (WALGREN et. al, 2005; PARK et. al, 2005).

O fígado é o órgão primário para a biotransformação de xenobióticos e nutrientes, que é realizada, geralmente, por enzimas, principalmente aquelas existentes nos microssomas e na fração solúvel do citoplasma de células hepáticas. As reações de biotransformação são referidas, frequentemente, como microssômicas ou citosólicas, de acordo com as localizações subcelulares das enzimas envolvidas. O principal sistema enzimático responsável pela biotransformação de xenobióticos (citocromo P-450) contem cerca de 30 enzimas oxidativas agrupadas em 11 famílias (RENDIC e DI CARLO, 1997).

1.6. Fração S9

A fração microssomal S9, composta por um homogenato de células de fígado de rato pré-tratado com a mistura do indutor enzimático bifenil policlorinada (Aroclor 1254) que induz um aumento das enzimas P450, pode ser utilizada em uma variedade de modelos, sendo aceita como ativador metabólico para testes *in vitro* (BARILE, 1994). Enzimas do complexo P450, responsáveis por reações de oxidação e redução que fazem parte do grupo

das reações da fase I (metabolismo), causam aumento da polaridade da substância metabolizada e ancoram grupos para subseqüentes reações de conjugação (PEREIRA, 2007; WERMUTH, 2003; COSTA, 2004). Testes *in vitro* que simulam situações *in vivo* possibilitam a obtenção de dados que complementam os testes de citotoxicidade.

1.7. Atividade biológica dos glicoalcalóides

A ingestão de glicoalcalóides na dieta humana inclui chaconina e solanina (batata), tomatina e deidrotomatina (tomate) e solamargina e solasonina (berinjela), existindo assim grande necessidade de se definir os possíveis efeitos dessas substâncias. Para o consumo de insumos que contenham esses compostos, as quantidades deveriam ser estimadas para atender condições de segurança (FRIEDMAN, 2006).

As Batatas são consideradas um dos alimentos mais importantes para o consumo humano por fazer parte de uma dieta estável para muitas culturas, devido às suas características nutricionais (MACHADO et al., 2007). No entanto, glicoalcalóides tóxicos estão presentes em produtos provenientes de batatas por apresentarem papéis fundamentais na proteção natural desses vegetais (CAHILL, 2010).

Atualmente, estudos que envolvem a biodisponibilidade, metabolismo e farmacocinética de glicoalcalóides em seres humanos são escassos. Glicoalcalóides presentes em batatas têm recebido maior atenção nesta área, porém o desenvolvimnto de um perfil de segurança para esses compostos, em geral, precisa ainda ser retificado. Modelos animais foram empregados para determinar os mecanismos pelos quais esses compostos induzem a toxicidade. Hellenas et al. (1992) e Mensinga et al. (2005)

investigaram *in vivo* o metabolismo de glicoalcalóides presentes na batata e relataram o acúmulo dos mesmos no corpo, com depuração renal (clearance) superior a 24 horas.

Estudos indicam que a biotransformação dos glicoalcalóides para a aglicona solanidina e vários metabólitos desconhecidos ocorre tanto no trato digestivo como em outros órgãos (FRIEDMAN, 2006). Ainda não é conclusivo se as cadeias laterais de oligossacáridos são hidrolisadas no estômago, trato intestinal ou fígado e se os agentes tóxicos são os glicosídeos ou as agliconas (FRIEDMAN et al., 2005).

Em decorrência da alta toxicidade, os alcalóides têm sido foco de atenção científica, especialmente em relação à sua presença em alimentos essenciais à dieta humana e animal, sendo considerados potenciais fontes de intoxicações alimentares (FRIEDMAN e McDONALD, 1997).

Os alcalóides esteroidais derivados de *Solanum*, na sua forma glicosilada ou não, também são relatados como teratogênicos, embriotóxicos e genotóxicos (KORPAN et al., 2004). Alguns são conhecidos por exibirem fortes propriedades líticas e inibirem a atividade de enzimas, como a acetilcolinesterase e butirilcolinesterase (KRAKOWSKI et al. 1997).

Os glicoalcalóides não são alterados durante o processamento dos alimentos, como cozinhar, assar e fritar (FRIEDMAN e LEVIN, 1995; FRIEDMAN e DAO, 1992). Altos níveis de glicoalcalóides confere sabor amargo às batatas e o consumo desses vegetais, nessa situação, pode causar doença grave e até morte (KORPAN et al., 2004; GIESBRECHT et al., 2003). A ingestão de baixas doses glicoalcalóide pode acarretar em intoxicações, levando a quadros clínicos que incluem vômitos, cefaléias e diarreias. Em doses elevadas, os glicoalcalóides, em seres humanos, produzem sintomas como febre, pulso rápido, pressão arterial baixa, respiração rápida e até a morte (RAYBURN et al., 1994). Alterações

neuroológicas também foram relatadas, incluindo apatia, sonolência, agitação, confusão mental, incoerências, estupor, alucinações, tonturas, tremedeira e distúrbios visuais (MILNER et al., 2011).

Estudos sobre a tolerancia para intoxicação de glicoalcalóides em humanos são variados. Casos letais de envenenamento foram relatados com doses orais acima de 3-6 mg total de glicoalcalóide/kg peso corporal, e intoxicação leve podem ocorrer com doses de 1-5 mg/kg (HELLENAS et. al., 1992). Suspeita-se que uma maior porcentagem de envenenamento por doses leves de glicoalcalóide pode ocorrer, no entanto, os sintomas são semelhantes aos de outros distúrbios gastrointestinais e permanecem sub-relatada (MILNER, 2011). Devido à toxicidade humana, 200 mg de glicoalcalóide total/ kg peso fresco (PF) em batata é o limite seguro aceito (SMITH, et. al, 1996).

Pesquisas demonstram que os glicoalcalóides isolados de *Solanum* também podem ter efeitos benéficos, tais como ação antiinflamatória, antinociceptiva, antipirética, antifúngica e antibacteriana (MILNER et al., 2011). Alguns estudos relacionam a solamargina com a indução de apoptose e inibição do crescimento de células tumorais humanas (KUO et al., 2000; SHIU et al., 2007), sugerindo uma atividade altamente citotóxica desejável no tratamento de carcinoma de células escamosa e basal da pele, células de fígado e cólon humano (LEE et al., 2004), células do câncer de pulmão (LIU et al., 2004). Em oposição ao extensivo estudo farmacológico, referências em relação a biodisponibilidade, metabolismo e farmacocinética em humanos ainda são escassas.

1.8. Citotoxicidade

Citotoxicidade é um evento complexo *in vivo* cuja expressão pode ser manifestada através de um amplo espectro de efeitos, com alterações funcionais até morte celular (FRESHNEY, 1994). A viabilidade celular representa um dos parâmetros mais utilizados para avaliar a citotoxicidade, a qual pode ser demonstrada por uma variedade de técnicas, incluindo a utilização de corantes, como o vermelho neutro (VN) e MTT-tetrazólio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio).

A técnica do MTT-tetrazólio baseia-se na quebra do sal de MTT-tetrazólio (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio), o qual é reduzido em produto corado (formazana) por redutases microssomais e, em menor parcela, pela enzima mitocondrial succinato desidrogenase. Os cristais azuis formados intracelularmente são solubilizados e, posteriormente, avaliados por espectrofotometria UV/visível. Deste modo, quanto menor a viabilidade celular, menor será a redução do MTT e menor a absorvância (MOSMANN, 1983).

O teste do vermelho neutro (VN) baseia-se na capacidade das células viáveis incorporarem o corante cloridrato de 3-amino-dimetilamino-2-metilfenazina a nível lisossomal. O VN é um corante fracamente catiônico que penetra rapidamente nas células por difusão não iônica e é retido intracelularmente nos lisossomas devido ao conteúdo ácido dessas organelas. Alterações na membrana lisossomal resultam numa redução da incorporação do VN, podendo distinguir células viáveis (incorporam VN) de não viáveis (não incorporam VN) (BORENFREUND et al., 1988; BORENFREUND e PUERNER, 1985). Alguns estudos demonstram que o tipo de linhagem celular e os métodos utilizados para a determinação da citotoxicidade *in vitro* possuem pouca influência na correlação entre os

índices tóxicos, principalmente para substâncias que atuam em funções celulares basais (SHRISVASTAVA et al., 1992).

1.9. Mutagenicidade

Mutagenicidade é a capacidade de um agente químico ou físico causar alterações no conteúdo ou estrutura do material genético de um organismo (DEARFIELD, 2002). Esse agente pode ser um mutágeno primário, interagindo diretamente com a molécula de DNA, ou mutágeno secundário que, sofrendo reações metabólicas no organismo vivo, tornam-se mutagênicos (VARELLA et al., 2004). Estudos demonstram que mutações gênicas atuam nas etapas da carcinogênese e que os ensaios que detectam genotoxicidade permitem identificar substâncias com risco potencial à saúde humana.

O teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*, também conhecido como teste de Ames, é uma das metodologias mais utilizada para detectar substâncias genotóxicas (VARELLA et al., 2004). Nesse ensaio, são utilizadas linhagens de *Salmonella typhimurium* mutantes no operon da histidina que, na presença do agente mutagênico, reverterem seu caráter auxotrófico para a síntese desse aminoácido, crescendo em meios que não o possuem. O crescimento de colônias revela uma mutação induzida pela substância teste e a quantidade caracteriza a ação mutagênica em função da concentração (ZEIGER, 2001).

As diferentes mutações no operon histidina permitem diferenciar mecanismos de ação, ou seja, diferentes mutações causadas pelos agentes químicos. As mutações podem ser substituições de bases ou do tipo frameshift (AMES, 1983; MORTELMANS e ZEIGER, 2000). As linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium* são

comumente utilizadas nos estudos de triagem e mostram eficiência na detecção de grande número de agentes mutagênicos. A linhagem TA98 apresenta mutação no gene D (hisD3052) e detecta compostos mutagênicos que alteram o quadro de leitura do DNA. A linhagem TA100 apresenta mutação hisG46 e detecta agentes que causam substituições de pares de base, principalmente em G-C. A cepa TA102 contém a mutação no gene hisG detectando agentes químicos e radiações, além de agentes cross-link. A linhagem TA97a também detecta mutágenos do tipo frameshift, apresentando mutação no gene hisD6610 (MARON e AMES, 1983).

A estrutura primária do DNA de procariotos é a mesma do genoma humano, assim substâncias que provocam alterações no genoma de organismos procariotos podem também ocasioná-las no genoma humano (PILOT e DRAGAN, 1998). Entretanto, as bactérias não apresentam a maioria das enzimas envolvidas no processo de biotransformação, cujo mecanismo pode gerar substâncias com ou sem atividade mutagênica. Para que os testes em procariotos possam detectar mutágenos secundários para o homem, esses ensaios também são realizados na presença de um sistema exógeno de metabolização, como a fração S9 (LANG e PELKONEN, 1999).

1.10. Antimicrobianos

A flora brasileira apresenta-se altamente diversificada em espécies que na maioria ainda não foi pesquisada cientificamente quanto à ação antimicrobiana (SIMÕES et al., 2000; AURICCHIO e BACCHI, 2003). Em razão ao grande aumento da resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas drogas e devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos surge a preocupação para a procura de novas alternativas terapêuticas

(OLIVEIRA et al., 2007). O uso de extratos e componentes químicos vegetais ambos com propriedades antimicrobianas vêm contribuindo para resultado satisfatório em tratamentos terapêuticos (ALBUQUERQUE e HANAZAKI, 2006; OLIVEIRA et al., 2007).

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns dos constituintes, tais como, flavonóides, alcalóides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos e lignanas, tem sido objeto de incessantes estudos (HAVSTEEN, 1983). O impacto da crescente resistência dos microrganismos a antibióticos e substâncias específicas intensificou a pesquisa para o desenvolvimento de novas drogas que sejam capazes de combater as estratégias de adaptação que esses organismos elaboram (PRATES et al., 2000). Nas últimas décadas, os fitofármacos têm sido usados como alternativa no meio terapêutico, mediante as propriedades antimicrobianas (KREUGER et al., 2007; SIMÕES et al., 2008).

Vários métodos podem ser utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana *in vitro*, sendo aplicados em estudos pilotos na triagem de novas substâncias ativas. Atualmente, técnicas espectrofotométricas de microdiluição possibilitam a utilização de volumes reduzidos na determinação da concentração inibitória mínima de substâncias químicas. Tais técnicas permitem a análise de vários compostos para diferentes espécies bacterianas concomitantemente (DEVIIENNE; RADDI, 2002; JORGENSEN et al., 1999), bem como possibilitam associar substâncias que possam induzir biotransformação nesses compostos para promover a atividade antibacteriana.

Conforme descrito anteriormente, pró-farmacos são compostos que necessitavam de biotransformação prévia para promover efeito farmacológico. Como exemplo de pró-fármaco com atividade antibacteriana cita-se a isoniazida, fármaco utilizado no tratamento da

tuberculose, que origina um potente metabólito capaz de oxidar grupos protéicos que atuam na síntese do ácido micólico (CHUNG et al., 2005).

1.11. Espectrometria de massas

Atualmente, a espectrometria de massas é uma das mais complexas técnicas analíticas instrumentais existentes e, entre suas qualidades, destacam-se a capacidade de identificar qualitativamente diferentes tipos de substâncias, utilizando o tipo de ionização adequado; a possibilidade de realizar análises quantitativas; a capacidade de analisar misturas complexas e a alta sensibilidade e especificidade (ESTEBAN, 1993).

O principal requisito de um espectrômetro de massas consiste numa zona de vácuo eficiente que permite que os íons atinjam o detector sem colidir com outras moléculas gasosas. Se essas colisões acontecerem, ocorre uma diminuição da resolução e da sensibilidade do equipamento, uma vez que, ou essas colisões acabam induzindo novas fragmentações ou impedindo que os íons alcancem o detector.

1.12. *Electrospray*

Electrospray é definido como um alto potencial elétrico aplicado a uma fase móvel emergindo de um capilar, provocando a quebra do solvente em pequenas gotas. Este fenômeno foi descrito pela primeira vez por Zeleny em 1917 (NIESSEN e VAN DER GREEF, 1992).

A primeira aplicação do *electrospray* em espectrometria de massas foi reportada em 1968, quando Dole e colaboradores investigaram a possibilidade da produção de íons intactos à pressão atmosférica de substâncias com alto peso molecular pelo spray elétrico

dessas macro-moléculas dissolvidas (NIESSEN e VAN DER GREEF, 1992). Trata-se da extração de íons em solução ou na formação desses íons sob a ação de um forte campo elétrico gerando íons com altos pesos moleculares e cargas múltiplas que podem ser observados e analisados em espectrômetros de massas simples (quadrupolo), fato que contribuiu para uma enorme popularização dessa técnica (ROSENBERG, 2003), que é amplamente utilizada para a análise de compostos polares, iônicos e não voláteis (ROSENBERG, 2003; GASKELL, 1997).

Aproximadamente 80 % de todos os produtos naturais não são voláteis ou são termicamente instáveis e por isso essa técnica de ionização é utilizada e de grande importância (STREGE, 1999).

A faixa de aplicação da ionização por *electrospray* é bastante ampla, sendo utilizada, por exemplo, no estudo de substâncias orgânicas sintéticas, análises de fármacos e seus metabólitos, produtos naturais, química forense, proteínas, carboidratos, lipídeos, polímeros, compostos inorgânicos e organometálicos, fulerenos, surfactantes entre outros (PRAMANIK et al., 2002).

A ionização por *electrospray*, ao contrário da maioria dos métodos de ionização empregados normalmente, produz predominantemente íons com cargas múltiplas de moléculas intactas do soluto. Como o espectrômetro de massas mede a razão massa/carga (m/z) de um íon, tal fato aumenta efetivamente a faixa de massas e permite o estudo de moléculas com massa molecular acima de uma faixa normal de trabalho (por exemplo, um íon com m/z 1000, com 20 cargas, é derivado de uma substância com uma massa molecular de 20000 Da).

Devido ao grande número de fatores que devem ser otimizados numa ionização por *electrospray* (composição e fluxo da fase móvel, energia de ionização etc), a variação das condições experimentais pode produzir variações significativas na aparência dos espectros obtidos.

1.13. Espectrometria de massas seqüencial – Tandem - (EM/EM)

A técnica de ESI é considerada um método brando de ionização e, como tal, não produz muitos fragmentos. Essa característica de não produção de fragmentos em abundância é extremamente útil em análises quantitativas e em determinações de massas moleculares. No entanto, não é útil em elucidação estrutural (NIESSEN e VAN DER GREEF, 1992; HE, 2000). Portanto, diante dessa limitação, é necessário o desenvolvimento de técnicas que permitam, a partir dos modos de ionização brandos, propiciar informações estruturais das moléculas analisadas através de fragmentação adicional dessas moléculas.

A espectrometria de massas seqüencial é o ramo da espectrometria de massas que utiliza a seleção de um íon particular formado de uma molécula (ou uma mistura de moléculas) e sua ativação, através de colisões (com um gás inerte ou com um sólido), para gerar íons fragmentos secundários característicos (FUTRELL, 2000; SHUKLA e FUTRELL, 2000). Esse tipo de ativação colisional não é indicado para a análise de misturas, uma vez que todos os constituintes da amostra, sem exceção, são ativados (PRAMANIK et al., 2002).

Um dos principais modos de monitoramento de íons disponíveis utilizando a espectrometria de massas seqüencial é o monitoramento dos íons produtos, também denominados de íons “filhos”. Neste tipo de experimento, íons de um determinado valor de

m/z são selecionados e induzidos à novas fragmentações. Os íons produzidos são então transmitidos e analisados (HOFFMANN, 1996; ESTEBAN, 1993).

Apesar de certos alcalóides serem genotóxicos, e outros inibirem a mutagenicidade e carcinogenicidade de diferentes mutágenos (FRIEDMAN et al., 2005; FRIEDMAN e HENIKA, 1992) houve um aumento na investigação das atividades biológicas desses compostos devido a presença em alimentos e potenciais aplicações em medicamentos, cosméticos e agroquímicos (PINTO, 2002).

A toxicidade dos alcalóides é reconhecida, entretanto poucos estudos relacionam processos de biotransformação à bioatividade. O desenvolvimento de bioensaios simplificados, novos métodos de triagem, testes *in vitro* que mimetizam situações análogas *in vivo*, entre outros, aceleram a avaliação da atividade farmacológica e toxicológica de substâncias isoladas ou de extratos totais do vegetal (SONAGLIO et al., 1999). Devido à exposição humana a esses alcalóides, através de alimentos e a possibilidade de utilização na terapêutica é importante considerar a biotransformação desses compostos antes de serem administrados *in vivo* (RANG et al., 2003). Motivado pelo crescente estudo dos produtos naturais, este estudo avaliou *in vitro* diferentes atividades biológicas dos alcalóides solamargina e solasodina na presença de um sistema exógeno de metabolização.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivos Gerais

Analisar *in vitro* a bioatividade do glicoalcalóide solamargina e da aglicona solasodina sobre diferentes sistemas celulares.

2.2 Objetivos Específicos

- 1 – Determinar a atividade da solamargina e solasodina, com e sem sistema de ativação metabólica, utilizando a fração microsomal S9, quanto à:
 - a) Citotoxicidade para linhagem celular de carcinoma hepatocelular humano (HepG2, ATCC 59195), carcinoma cervical (SiHa, ATCC HTB-35) e macrófagos murino (RAW 264.7);
 - b) Atividade antibacteriana para *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853);
 - c) Mutagenicidade empregando as linhagens TA 97a, TA 98, TA 100, TA 102 de *Salmonella typhimurium*;
- 2 – Avaliar o perfil de biotransformação da solamargina e solasodina induzido pela fração microsomal S9.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Obtenção da solamargina e solasodina

3.1.1. Planta

Frutos de *Solanum palinacanthum* Dunal foram obtidos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP, Rodovia Araraquara/Jau Km 1, São Paulo, Brasil (21° 48' 53,39" S e 48° 12' 0,09" W). Coletados em janeiro de 2009, tiveram amostras depositadas no Herbário Rioclarense (HRCB) da UNESP, exsicata número 56873.

3.1.2. Isolamento da solamargina

A obtenção dos alcalóides foi realizada no laboratório de Química Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas campus de Araraquara - UNESP sob orientação da Profa. Dra. Adélia Emília de Almeida, conduzida de acordo com a metodologia proposta por Almeida e Rocca (1995). Os frutos de *Solanum palinacanthum* (400g) foram cortados em pedaços e colocados em estufa a 100° C durante quarenta minutos, para inativação de enzimas. Na seqüência, foram conservados em estufa a 60° C por dois dias para secagem completa. Para obtenção do extrato bruto, os frutos dessecados foram triturados em liquidificador e diluídos em dois litros de etanol 95° GL, mantidos por 4 horas, e filtrados. Esse processo foi repetido três vezes, mantendo sempre o mesmo volume de solvente.

O extrato alcoólico obtido (cerca de 6 litros) foi concentrado à pressão reduzida, em rotaevaporador, até consistência xaroposa e, em seguida, dissolvido em 350 mL de ácido acético aquoso 5% (v/v), mantido em repouso por 24 horas e, posteriormente, desengordurado mediante extrações sucessivas com hexano. A seguir, levou-se a

alcalinização com hidróxido de amônio, até obtenção de pH 10. Após novo repouso, por 24 horas, o material foi filtrado e o resíduo seco, obtendo-se 19,4 gramas.

A verificação da presença de alcalóides no precipitado bruto (Figura 4) foi possível através da análise cromatográfica em camada delgada (CCD) de sílica gel G. Para realização da CCD, placas de vidro (15x20cm) preparadas com camadas de sílica gel de 0,25µ de espessura foram ativadas em estufa a 150°C, por 30 minutos. Na seqüência, foi aplicada a amostra, utilizando como padrão uma autêntica de outra espécie de *Solanum*. A cromatoplaça foi desenvolvida em n-butanol, ácido acético glacial e água, na proporção de 6:3:1, respectivamente. Posteriormente foi revelada com ácido sulfúrico a 10% e aquecida em forno (150° C), durante 5 minutos.



Figura 4. Obtenção de extrato bruto com glicoalcalóides

3.1.3. Separação e purificação da solamargina

A presença do glicoalcalóide no extrato bruto foi confirmada na CCD em sílica e o extrato foi submetido a um processo de separação através de cromatografia em coluna. Para essa finalidade, foram utilizadas colunas de alumina neutra atividade I e etanol aquoso 40% como eluente. Cerca de 200 frações de 15 mL, foram recolhidas, levadas à capela para evaporação total do solvente e submetidas a análise cromatográfica por CCD em sílica gel G, para constatação de componentes esteroídicos (Figura 5).

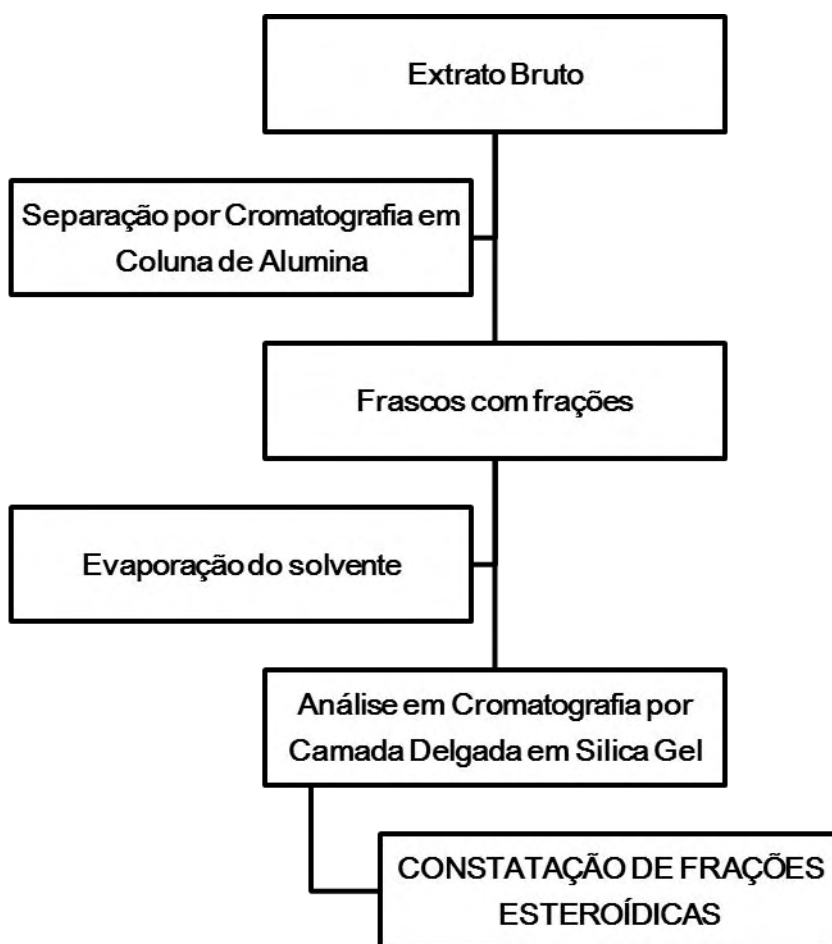


Figura 5. Identificação de frações esteroídicas

A análise das 200 frações por CCD ocorreu por triagem numérica, cromatografando de 10 em 10 frascos e a verificação ocorreu pela comparação do r_f com o padrão do glicoalcalóide. As frações identificadas como possíveis portadoras do glicoalcalóide foram submetidas à separação através de cromatografia em coluna. Para separação da solamargina foram utilizadas colunas de alumina neutra atividade I e etanol aquoso 40% (v/v) como eluente, cuja purificação ocorreu através da recristalização, com aquecimento em banho maria, adicionando-se metanol quente até completa solubilização. Após três horas de resfriamento em freezer, com posterior filtração a vácuo, obteve-se um grama de solamargina (Figura 6).

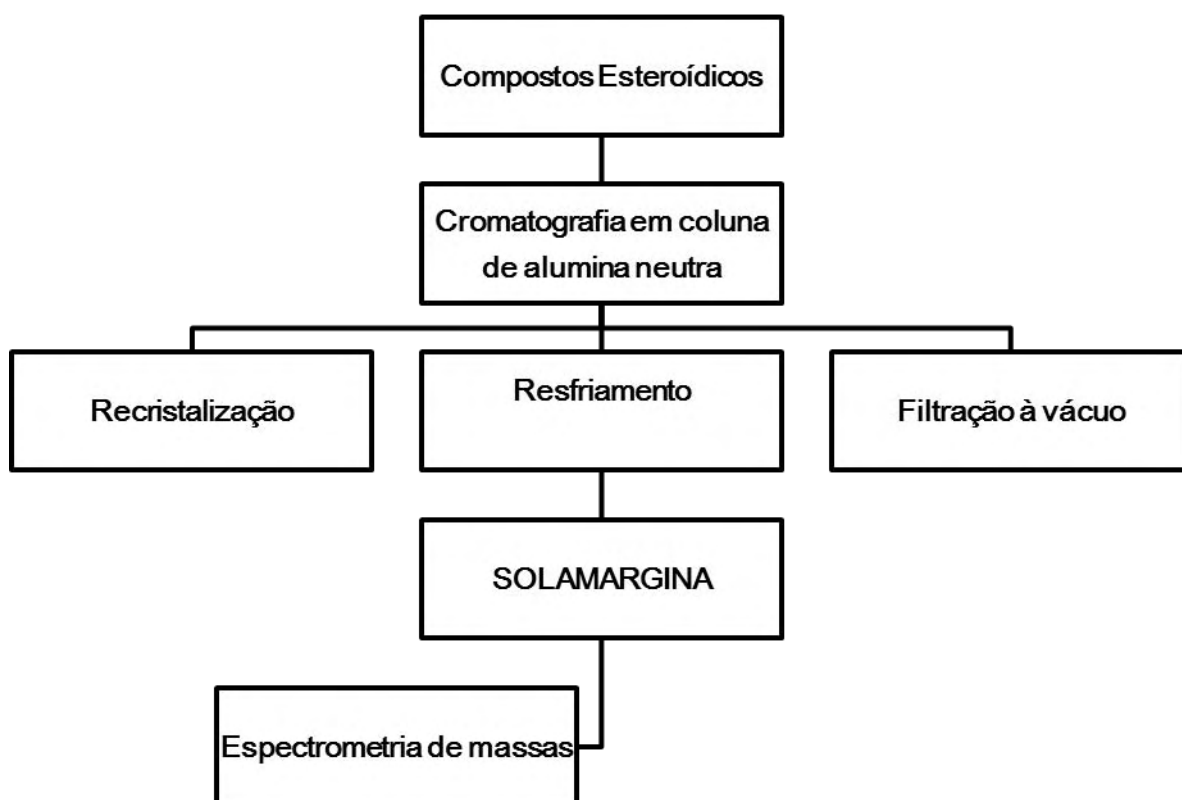


Figura 6. Isolamento da solamargina

3.1.4. Separação e purificação da solasodina

A obtenção da solasodina ocorreu por hidrólise da solamargina isolada anteriormente, acrescentando 50 ml de solução metanólica de ácido clorídrico 2N em, aproximadamente, 500mg de solamargina, refluxados por 5 horas. O solvente foi eliminado por concentração a vácuo e o resíduo suspenso em mesmo volume de água, acrescido de hidróxido de amônio, refluxado por 1 hora. Após resfriamento, o precipitado formado, correspondente a glicona, foi separado por filtração fornecendo peso seco de 200 mg de solasodina (Figura 7), cuja purificação ocorreu através da recristalização, com dissolução do material em metanol, conforme descrito para a solamargina.

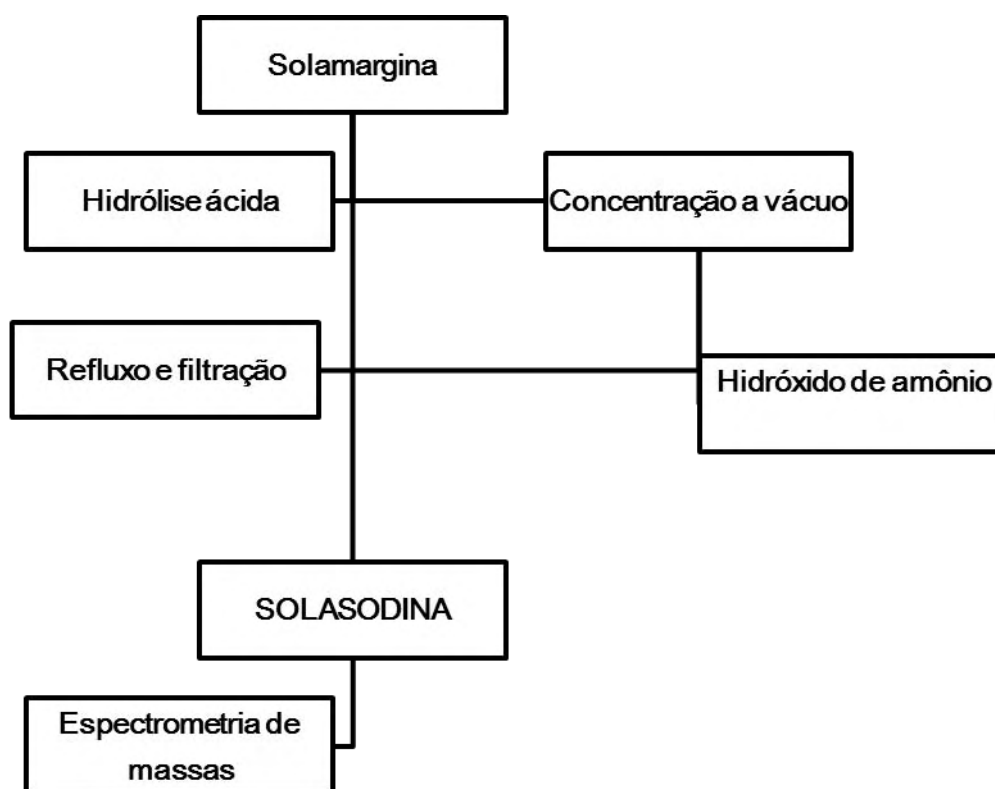


Figura 7. Isolamento da solasodina

3.1.5. Identificação dos alcalóides

A identificação da solamargina e solasodina ocorreu mediante comparação realizada com pastilhas de brometo de potássio na concentração de 1:2, em espectrofotômetro modelo IR Prestige-21. Utilizou-se também a determinação das faixas de fusão para identificação do glicoalcalóide e sua aglicona, através do equipamento FLUKE MEL-TEMP II.

A faixa de fusão da solamargina (294 a 302°C) ocorreu no processo de carbonização à 297°C, indicando a presença da substância. Para a aglicona solasodina, cujo ponto de fusão varia entre 200 a 202°C, a carbonização ocorreu em 200°C. Espectroscopia de infravermelho (IV) foi usada para caracterização da solasodina e solamargina. Os dados de absorção foram obtidos na faixa 4000-400 cm^{-1} em espectrofotômetro Perkin-Elmer 567, à temperatura ambiente.

3.2. Fração microssomal S9 (sistema de ativação metabólica)

O sistema de ativação metabólica (fração S9) consiste de um preparado liofilizado de fígado de ratos Sprague–Dawley induzidos com arocloror 1254, um indutor de enzimas (MOLTOX, USA), acrescidos de soluções de cloreto de magnésio 0,4M, cloreto de potássio 0,4M, glicose-6-fosfato 1M, beta-NADP 0,1M, tampão fosfato 0,2M e água destilada.

3.3. Preparo dos alcalóides

Os alcalóides foram preparados para cada ensaio em soluções contendo 2,0 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO). Imediatamente antes da utilização, diluições em série da

solução-mãe foi realizada segundo o protocolo a ser utilizado. A concentração final de DMSO (2%) não interfere na viabilidade celular (DEVIIENNE, 2000).

3.4. Determinação da atividade citotóxica

3.4.1 Procedimento

As linhagens SiHa (carcinoma cervical, ATCC HTB-35) e HepG2 (linhagem de carcinoma hepatocelular humano, ATCC HB-8065) foram mantidas em meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEN) contendo L-glutamina e glicose, a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂, em garrafas de 75cm². A dispersão da monocamada celular foi realizada utilizando-se 2 mL de solução contendo tripsina 0,2% e versene 0,02% (ATV, Instituto Adolfo Lutz). Após tripsinização, as células foram suspensas no meio de cultivo e distribuídas em garrafas destinadas à manutenção ou em meio DMEM acrescido de 10% de soro fetal bovino na concentração de 10⁴ a 10⁵ células/mL para a realização dos testes. Linhagem RAW 264.7 (macrófagos murino, ATCC, TIB 71) foi mantida em garrafas, conforme descrito por WASLEY (1969), em DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF), a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. Decorridos 3-4 dias, as células foram removidas com o auxílio de scrapers, homogeneizadas e resuspendidas em meio DMEM na concentração de 10⁴ a 10⁵ células/mL para a realização dos testes.

Duzentos microlitros (200 µL) da suspensão celular foram distribuídos em orifícios de microplacas (96 orifícios) para cultura de tecido, as quais foram incubadas por 72 horas, em atmosfera contendo 5% de CO₂ para obtenção de crescimento com cerca de 70% de confluência. Após incubação, o meio foi removido e as células tratadas com diferentes concentrações das substâncias teste (solamargina e solasodina), substância de referência

para morte celular (cisplatina) e solvente (DMSO). Após 24 horas de incubação, as placas foram preparadas para o teste do vermelho neutro e MTT-tetrazólio. Os testes de citotoxicidade foram acompanhados de crescimento controle, realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, três vezes. As linhagens SiHa e HepG2 foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Cristiane Pienna Soares e a linhagem RAW 264.7 pela Profa. Dra. Alexandra Ivo de Medeiros.

3.4.2. Técnica do vermelho neutro

A citotoxicidade dos alcalóides e seus metabólitos para as diferentes linhagens celulares foi avaliada pela técnica do vermelho neutro (MOSMANN, 1983). Para a determinação da viabilidade celular, o meio foi substituído por DMEN sem soro (200 μ L), contendo 50 mg/mL de vermelho neutro. As placas foram incubadas por 3 horas, a 37°C. Após esse período, o meio foi removido e as células lavadas duas vezes com solução fosfatada tamponada e, em seguida, 200 μ L de solução aquosa de ácido acético/etanol (1/50) foram adicionados a cada orifício para remoção do corante incorporado. Após 10 minutos, sob agitação, foi realizada leitura espectrofotométrica em leitor de microplacas (Tecan Spectra) em comprimento de onda de 540 nm

3.4.3 Técnica do MTT

A citotoxicidade dos alcalóides e seus metabólitos para as diferentes linhagens celulares também foi avaliada pela técnica do MTT (BORENFREUND, 1988). O meio de cultivo contendo as diferentes concentrações das substâncias teste foi desprezado e 100 μ L de meio contendo MTT (1mg/mL) foram adicionados em cada orifício. Após 3 horas de

incubação, sob as mesmas condições atmosféricas de crescimento, os cristais de formazana formados foram solubilizados pela adição de 100 μ L de isopropanol. Leitura espectrofotométrica foi realizada em espectrofotômetro multicanal (Tecan Spectra), em comprimento de onda de 540 nm.

3.4.4 Determinação do Índice Citotóxico (IC_{50})

O IC_{50} dos alcalóides foi determinado através da análise de regressão linear da relação dose-resposta (absorvância versus concentração), que define a concentração da droga capaz de reduzir em 50% viabilidade celular.

3.4.5 Citotoxicidade associada ao sistema de metabolização S9

Para avaliar a citotoxicidade após reação com sistema exógeno de metabolização (fração S9), o mesmo procedimento descrito em 3.4.1 foi realizado, sendo as células tratadas com 200 μ L das diferentes concentrações dos alcalóides previamente submetidos à metabolização com 10% de fração S9. Como controle, os experimentos foram acompanhados de crescimento celular na ausência dos alcalóides, na presença de 10% da mistura S9, na maior concentração do solvente (DMSO) e com diferentes concentrações de cisplatina com e sem a adição da fração S9. Após 24 horas de incubação, o meio foi desprezado e a viabilidade celular determinada pelo teste do VN e MTT, conforme descritos anteriormente. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos, no mínimo, três vezes. O IC_{50} foi determinado conforme descrito em 3.4.4.

3.4.6. Análise Estatística

O teste t-Student foi utilizado para comparar dos índices citotóxicos na presença (+) e ausência da fração S9. Assim, foram formados cinco grupos:

- (A) Solamargina com (SM+) e sem (SM) sistema de metabolização,
- (B) Solasodina com (SD+) e sem (SD) sistema de metabolização,
- (C) Solamargina (SM) e Solasodina (SD),
- (D) Solamargina (SM) e Cisplatina (CIS),
- (E) Solasodina (SD) e Cisplatina (CIS).

3.5. Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antibacteriana dos alcalóides foi determinada utilizando a técnica de microdiluição em placas, conforme proposta por Devienne e Raddi (2002). *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foram semeados em placas contendo agar sangue de carneiro e incubadas a 37°C. Após 24 horas, colônias foram transferidas para tubos contendo caldo Mueller Hinton, os quais foram incubados *overnight*, a 37°C. Para obtenção de crescimento em fase exponencial, uma alíquota dessa cultura foi transferida para o mesmo caldo, incubado a 37°C até turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarland. Orifícios de microplacas foram preenchidos com 100 µL do meio de crescimento contendo concentrações dos alcalóides (variando de 1500 a 0,125 mg/mL), na ausência e presença do sistema de metabolização (10% fração S9), sobre os quais foram adicionados 100 µL do crescimento dos diferentes microrganismos em fase exponencial (10^8 UFC/mL). Gentamicina foi utilizada como antimicrobiano padrão. A inibição do crescimento, induzida pelos alcalóides, foi determinada

através da diferença de absorvância em 620 nm (espectrofotômetro multicanal Spectra (Shell) & Rainbow (Shell) Readers da Tecan Austria GesmbH) obtida antes e após incubação por 24 horas a 37 °C. Alíquotas da suspensão bacteriana contida nos orifícios da microplaca foram inoculadas em caldo triptona soja e em placas contendo agar sangue de carneiro a 5% que, após incubação, foram utilizados para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM). Os testes foram realizados em triplicata e acompanhados de crescimento controle.

A relação direta entre a absorvância do crescimento bacteriano após incubação e concentração da substância teste define a concentração inibitória mínima, que graficamente, é a menor concentração do composto que induz um brusco declínio no valor da absorvância próximo de zero, que é mantido nas concentrações seguintes. A CBM é determinada como a menor concentração dos alcalóides a partir da qual não há crescimento bacteriano, após repique em meios isentos de substância teste.

3.6. Determinação da atividade mutagênica

Neste estudo foram utilizadas linhagens de *Salmonella typhimurium* auxotróficas em relação à histidina que detectam, preferencialmente, mutágenos que causam deslocamento do quadro de leitura ou substituição de pares de bases do DNA (MARON; AMES, 1983). Linhagens de *S. typhimurium* TA 97, TA 98, TA 100 e TA 102 foram inoculadas em 30 mL de caldo nutriente, os quais foram incubados à 37°C, por 14 horas, sob agitação, até resultar suspensão contendo de 1 a 2 x 10⁹ UFC/mL. Diferentes concentrações dos alcalóides (500 a 125 µg/mL) e 100 µL da cultura bacteriana foram adicionados a 2 mL de Top agar, homogeneizados e vertidos sobre placas de Petri contendo agar mínimo seletivo. Após

solidificação do Top agar, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas e colônias histidina positiva (+His) foram manualmente contadas. A influência da ativação metabólica dos glicoalcalóides foi testada simultaneamente sobre as mesmas linhagens, por meio da adição de 500 µL de mistura S9 ao Top agar, seguindo a metodologia descrita acima. Os experimentos foram realizados em triplicata, repetidos três vezes, acompanhados de controle de crescimento espontâneo, controle do solvente (controle negativo) e controle da +fração S9 (quando necessário). Esses ensaios foram realizados no Laboratório de Mutagenicidade, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP, sob a orientação da Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda.

Linhagem	Mutágeno padrão
TA 100 / -S9	AS = azida sódica (1,25 µg/placa)
TA 100 / +S9	ANTR = 2-antramina (1,25 µg/placa)
TA 98 e 97/ -S9	NPD = 4-O-nitrofenilenodiamina (10 µg/placa)
TA 98 e 97/ +S9	ANTR = 2-antramina (1,25 µg/placa)
TA 102 / -S9	DAU = daumicina C (6 µg/placa)
TA 102 / +S9	AF = 2-aminofluoreno (10 µg/placa)

Uma substância é considerada mutagênica quando a razão de mutagenicidade (RM) é maior ou igual a dois (MORTELMANS e ZEIGER, 2000), em pelo menos uma das doses testadas. Igualmente, deve ficar evidenciada uma relação dose-resposta entre as concentrações avaliadas e o número de revertentes induzidos. A RM consiste na razão entre a média do número de revertentes por placa teste (espontâneas e induzidas) e a média do número de revertentes por placa do controle negativo (espontâneas) (VALENT, 1993; UMBUZEIRO e VARGAS, 2003).

3.7. Análise do perfil espectral para avaliação dos produtos de metabolização dos alcalóides pela fração S9

O glicoalcalóide solamargina e sua aglicona solasodina foram analisados por espectrometria de massas, isolados (padrão) e diluídos em DMEN acrescido de 10% de fração S9 (amostras). Os espectros de massas foram obtidos através de equipamento LCQ Fleet, da Thermo Scientific. Os padrões e as amostras foram solubilizados em metanol contendo 0,01% de ácido fórmico e infundidos com o auxílio de seringa de infusão em fluxo de 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ em uma interface de electrospray, operando no modo positivo, com as seguintes condições de análise: voltagem do spray = 5 kV, temperatura do capilar = 275°C, voltagem do capilar = 20 V, voltagem das lentes do tubo = 100 V e fluxo do gás nebulizador (nitrogênio) = 6 unidades arbitrárias. Os fragmentogramas foram obtidos em full scan com m/z 50 a 650 para solasodina e 50 a 950 para solamargina. As análises foram realizadas no Instituto de Química de Araraquara pelo Prof. Dr. Alberto Alécio Camilo.

IV. RESULTADOS

4.1. Influência da fração S9 na viabilidade celular

A relação dose-resposta induzida pelos alcalóides solamargina e solasodina em células Raw, SiHa e HepG2, avaliada na ausência e presença de sistema de ativação metabólica, pela técnica do VN e MTT, é apresentada nas Figuras 8 a 13.

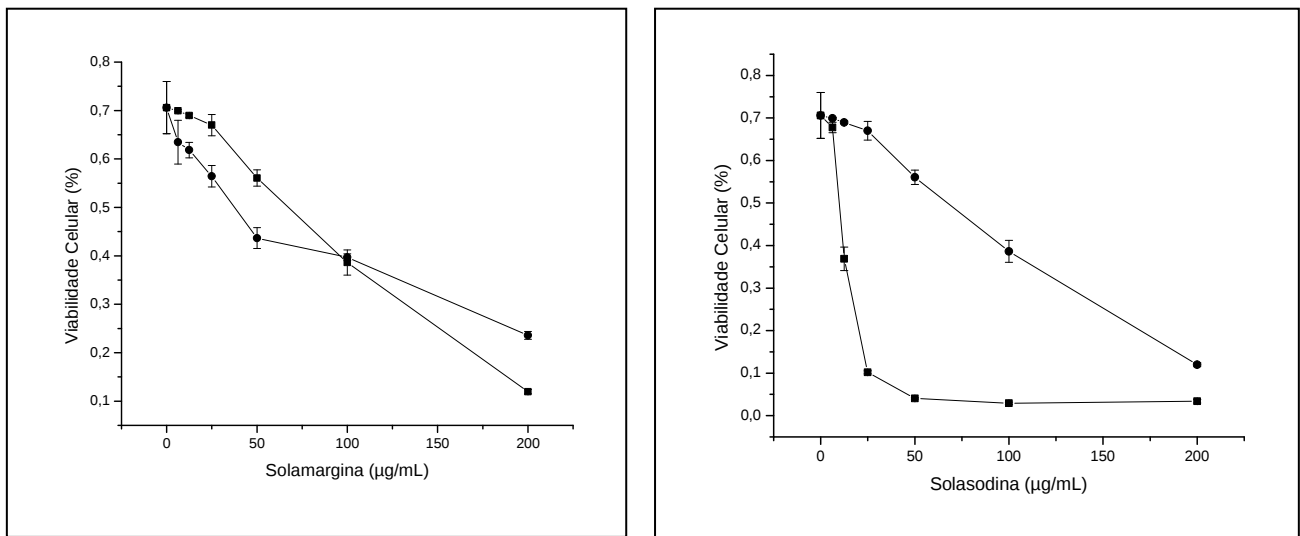


Figura 8. Relação dose-resposta de diferentes concentrações de solamargina e solasodina, com (●) e sem (■) sistema de metabolização (S9), na viabilidade de células RAW, utilizando a técnica do VN

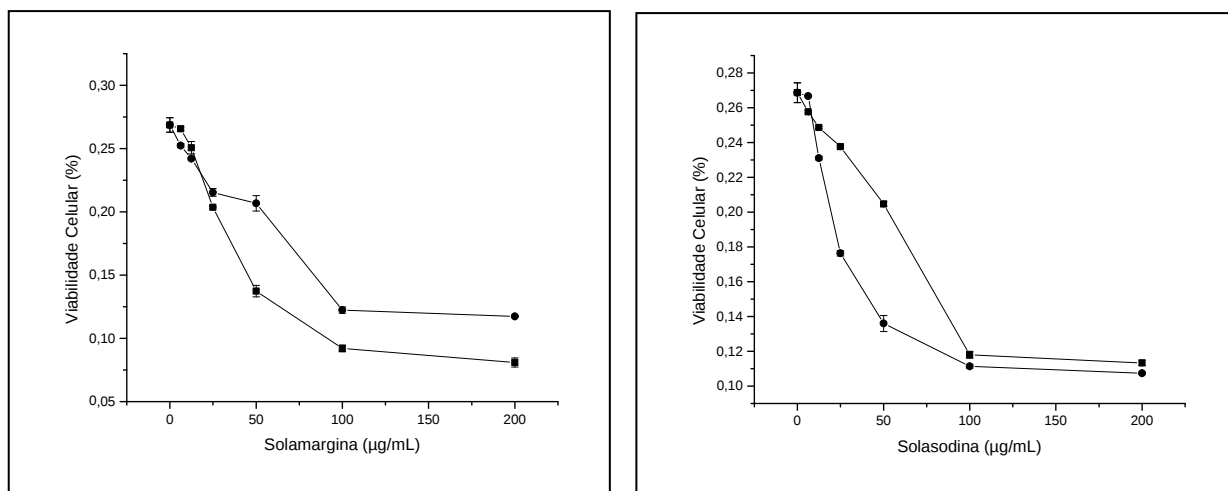


Figura 9. Relação dose-resposta de diferentes concentrações de solamargina e solasodina, com (-●-) e sem (-■-) sistema de metabolização (S9), na viabilidade de células SiHa, utilizando a técnica do VN

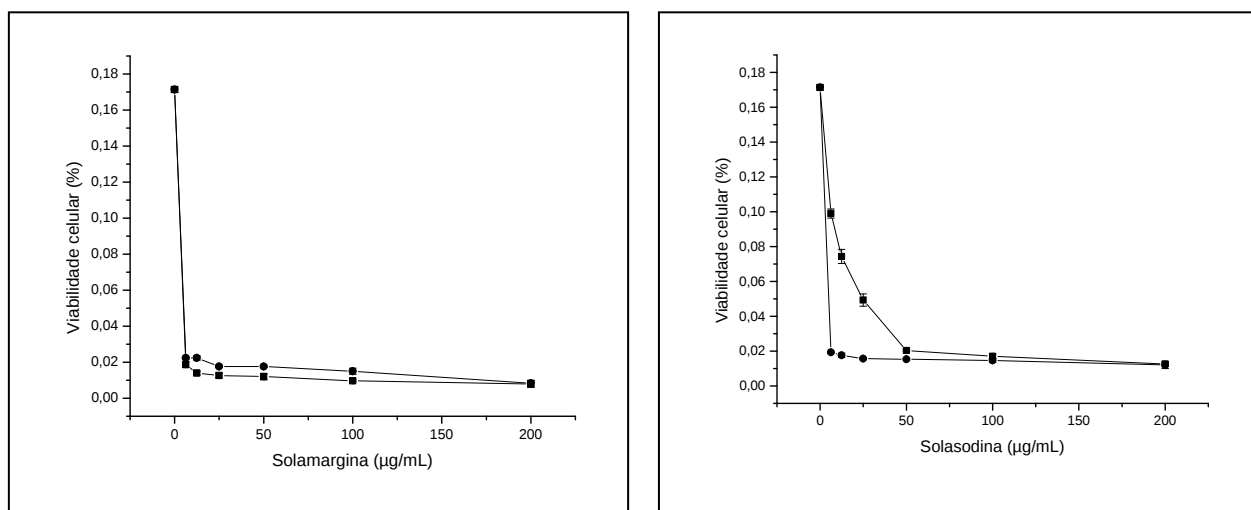


Figura 10. Relação dose-resposta de diferentes concentrações de solamargina e solasodina, com (-●-) e sem (-■-) sistema de metabolização (S9), na viabilidade de células HepG2, utilizando a técnica do VN

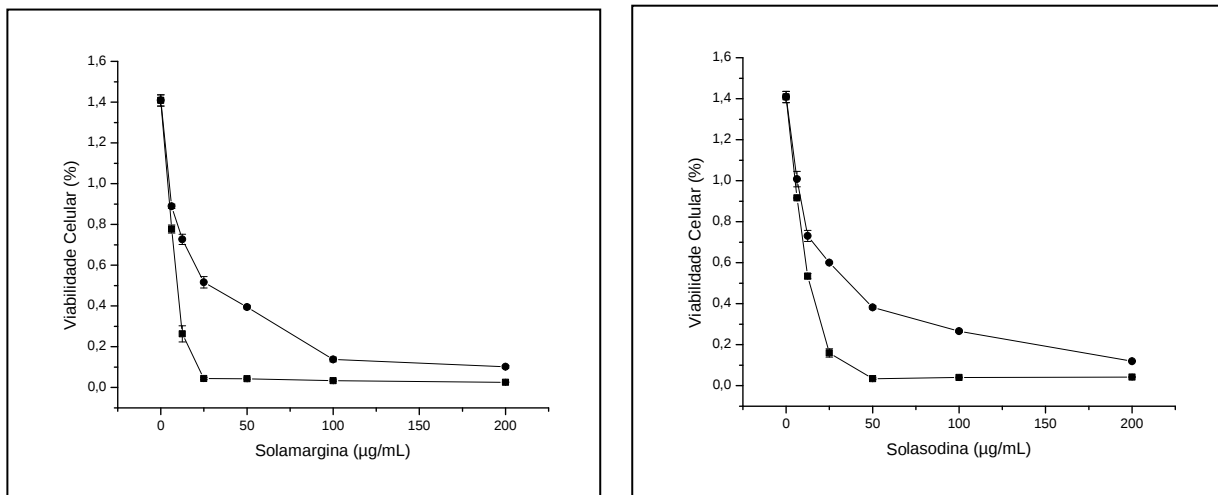


Figura 11. Relação dose-resposta de diferentes concentrações de solamargina e solasodina, com (●) e sem (■) sistema de metabolização (S9), na viabilidade de células RAW, utilizando a técnica do MTT

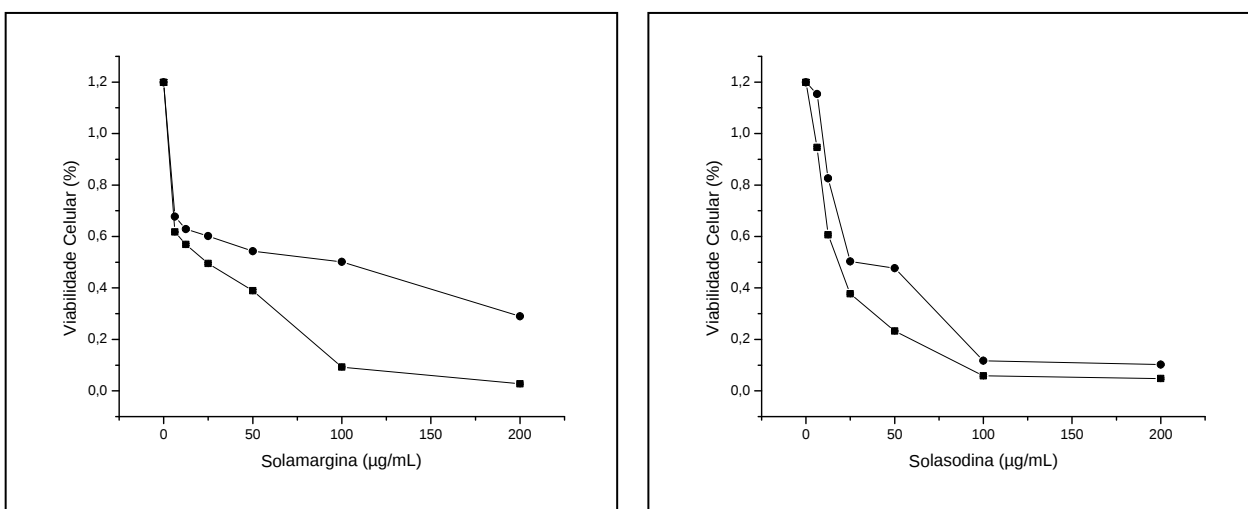


Figura 12. Relação dose-resposta de diferentes concentrações de solamargina e solasodina, com (●) e sem (■) sistema de metabolização (S9), na viabilidade de células SiHa, utilizando a técnica do MTT

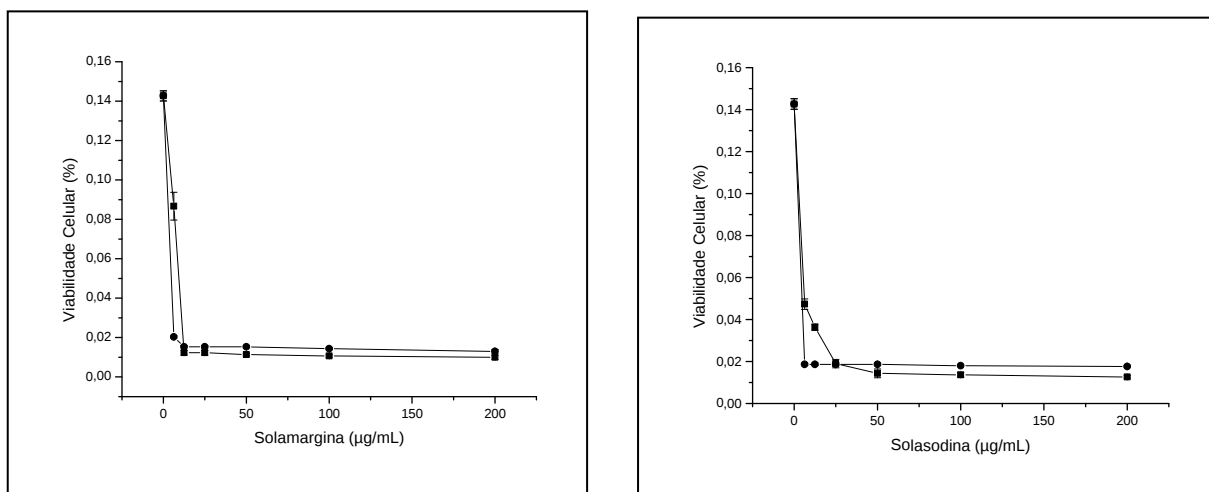


Figura 13. Relação dose-resposta de diferentes concentrações de solamargina e solasodina, com (●-) e sem (■-) sistema de metabolização (S9), na viabilidade de células HepG2, utilizando a técnica do MTT

A Tabela 1 apresenta os índices citotóxicos obtidos pela técnica do VN e demonstra a potente atividade tóxica dos alcalóides para as linhagens celulares, superior à cisplatina, droga usada como agente quimioterapêutico antineoplásico. O IC_{50} foi definido para as linhagens Raw e SiHa, contudo, para a linhagem HepG2 esse índice não pode ser determinado com as concentrações utilizadas, definindo-se assim o IC_{80} . O IC_{80} é a concentração da substância teste (µg/mL) capaz de reduzir em 80% viabilidade celular. A análise estatística demonstrou não haver diferenças entre os índices tóxico da solamargina e solasodina para as linhagens Raw e SiHa. Na presença da fração S9, observa-se que o índice citotóxico aumenta significativamente para a linhagem Raw de ambos alcalóides, enquanto que esse aumento na linhagens SiHa linhagem ocorreu apenas para solamargina. Para a linhagem HepG2 a fração S9 potencializou o efeito citotóxico dos alcalóides.

Tabela 1. Índice citotóxico (IC) da solamargina (SM) e solasodina (SD) ($\mu\text{g/mL}$), com (+) e sem sistema de ativação metabólica, para diferentes linhagens celulares obtido pela técnica do vermelho neutro

Linhagens	Alcalóides, Droga Controle e Sistema de Ativação Metabólica S9					
	SM	SM+	SD	SD+	Cis	Cis+
RAW (IC₅₀)	12,5 $\pm$ 0,4 ^{a,c}	129,1 $\pm$ 0,8	17,6 $\pm$ 0,2 ^a	121,1 $\pm$ 0,3	271,6 $\pm$ 21,8	161,6 $\pm$ 0,7
SiHa (IC₅₀)	53,6 $\pm$ 3,6 ^a	92,8 $\pm$ 1,0	90,4 $\pm$ 0,8	54,1 $\pm$ 6,3	87,0 $\pm$ 5,1	9,7 $\pm$ 0,7
HepG2 (IC₈₀)	7,4 $\pm$ 0,7 ^{a,b,c}	1,8 $\pm$ 0,1	5,5 $\pm$ 0,2 ^{a,b,c}	2,3 $\pm$ 0,1	160,6 $\pm$ 10,4	68,4 $\pm$ 4,6

^aDiferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na presença e ausência da fração S9; ^bDiferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da solamargina e solasodina na presença e ausência da fração S9;

^cDiferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) dos alcalóides e cisplatina.

A Tabela 2 apresenta os índices citotóxicos dos alcalóides, com e sem o sistema de metabolização, determinados pela técnica do MTT-tetrazólio. Para as linhagens RAW e SiHa não houve diferença significativa para o IC₅₀ dos alcalóides. Conforme já demonstrado pela técnica do VN, devido a alta toxicidade desses alcalóides para HepG2, as concentrações utilizadas nos ensaios não permitiram a definição do IC₅₀, sendo determinado o IC₈₀. Para essa linhagem, apesar da fração S9 potencializar o efeito citotóxico dos alcalóides não houve diferença significativa em relação aos índices na ausência do sistema de metabolização. A comparação dos resultados demonstra que a concentração tóxica obtida pela técnica do MTT-tetrazólio foi menor que a obtida pela técnica do VN, exceção feita para HepG2, porém o comportamento citotóxico de dose-dependência é mantido, independente da técnica utilizada. O resumo da análise estatística por teste t-Student para comparação da atividade citotóxica determinada pela técnica do VN e MTT é apresentado a

seguir. Nota-se que apenas para a linhagem HepG2 não houve diferença significativa entre as duas técnicas utilizadas para a comparação da citotoxicidade nos diferentes grupos analisados.

Tabela 2 – Índice citotóxico (IC) da solamargina e solasodina com e sem sistema de ativação metabólica para diferentes linhagens celulares obtido pela técnica do MTT-tetrazólio

Linhagens	Alcalóides, Droga Controle e Sistema de Ativação Metabólica S9					
	SM	SM+	SD	SD+	Cis	Cis+
RAW (IC ₅₀)	7,2 ± 0,3 ^a	13,6 ± 1,0	9,8 ± 0,4 ^a	14,8 ± 1,9	35,7 ± 3,8	11,2 ± 0,01
SiHa (IC ₅₀)	8,6 ± 1,0 ^{a,c}	26,0 ± 2,5	13,3 ± 0,6 ^{a,c}	21,1 ± 0,2	51,6 ± 6,5	19,2 ± 0,4
HepG2 (IC ₈₀)	11,6 ± 0,2	3,4 ± 0,4	15,9 ± 0,1	3,5 ± 0,1	3,6 ± 0,1	4,1 ± 0,2

^aDiferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na presença e ausência da fração S9; ^bDiferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da solamargina e solasodina na presença e ausência da fração S9;

^cDiferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) dos alcalóides e cisplatina.

4.2. Influência da fração S9 na atividade antimicrobiana

Os ensaios para a determinação da atividade antimicrobiana revelaram que os alcalóides inibem o crescimento bacteriano de maneira dose-dependente. Este comportamento ocorreu com e sem o sistema de metabolização S9 para os diferentes gêneros bacterianos. A fração S9 contribuiu com o efeito antimicrobiano dos alcalóides para *P. aeruginosa* (Figura 14 e Tabela 3). Quando a atividade antibacterina foi avaliada para *E. coli*, a solamargina apresentou maior atividade inibitória em relação a solasodina (Figura 15 e Tabela 4) e a solasodina na presença da fração S9 aumentou sua capacidade em inibir o

crescimento desse gênero bacteriano. Para *S. aureus*, a solasodina foi o alcalóide que demonstrou maior atividade antibacterina, sendo a CIM, na presença e ausência do sistema de metabolização, de 1000 µg/mL (Figura 16 e Tabela 5). A CIM de 1000 µg/mL foi obtida para a solamargina apenas na presença do ativador metabólico. Salienta-se que o efeito bactericida não foi observado na maior concentração ensaiada (1500 µg/mL).

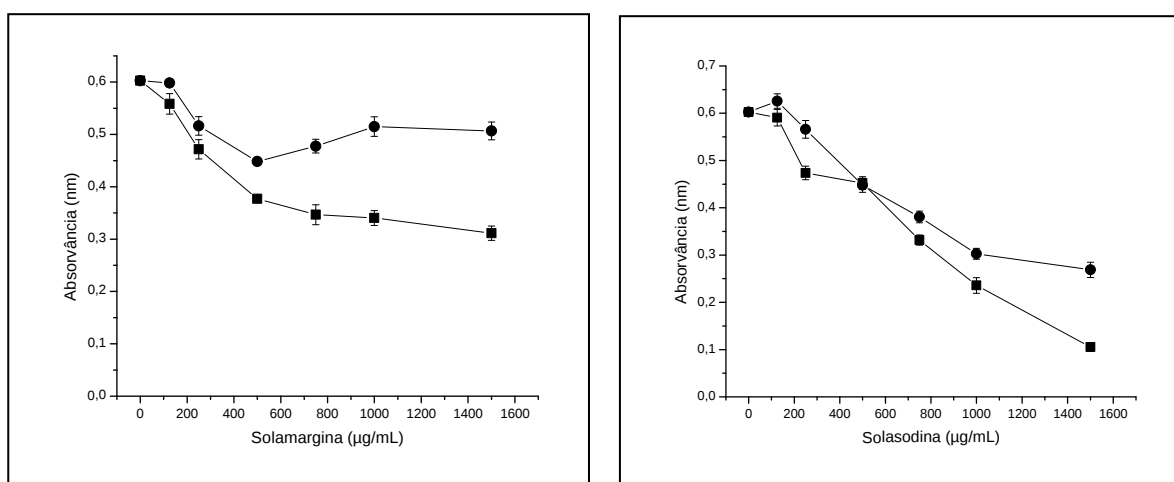


Figura 14. Relação dose-resposta do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* na presença de solamargina e solasodina com (-●-) e sem (-■-) sistema de metabolização (S9)

Tabela 3 – Inibição do crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* (%) induzido por diferentes concentrações de solamargina (SM) e solasodina (SD), com (+S9) e sem ativação metabólica S9

mg/mL	Porcentagem de inibição (%)			
	SM	SM+S9	SD	SD+S9
0,125	26	19	20	51
0,250	32	41	31	50
0,500	41	50	33	54
0,750	43	75	49	55
1,000	53	78	49	62
1,500	60	80	80	72

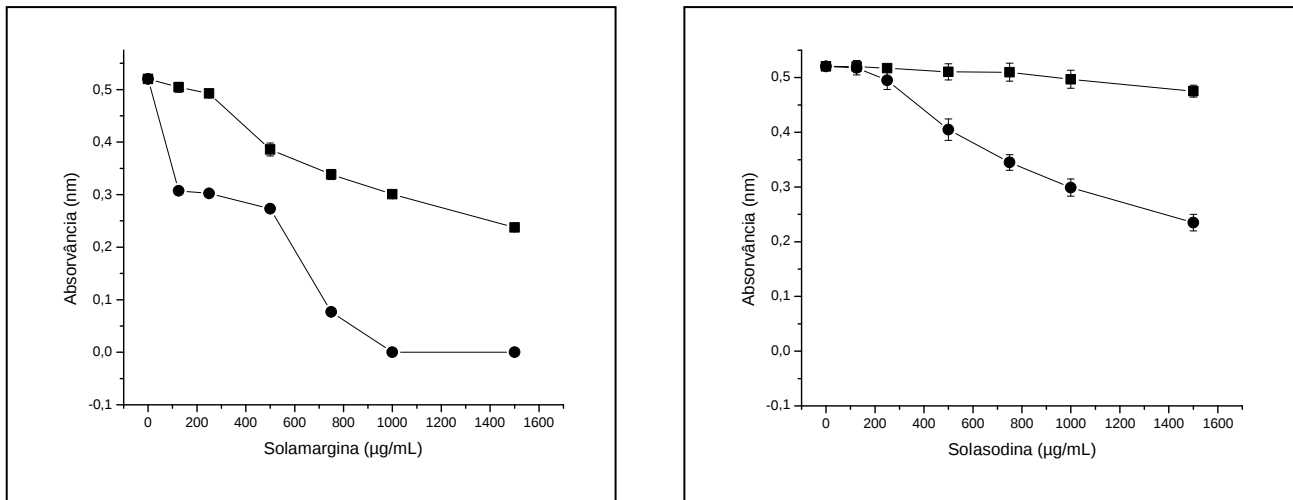


Figura 15. Relação dose-resposta do crescimento de *Escherichia coli* na presença de solamargina e solasodina com (-●-) e sem (-■-) sistema de metabolização (S9)

Tabela 4 – Inibição do crescimento de *Escherichia coli* (%) induzido por diferentes concentrações de solamargina (SM) e solasodina (SD,) com (+S9) e sem ativação metabólica S9

mg/mL	Porcentagem de inibição (%)			
	SM	SM+S9	SD	SD+S9
0,125	34	23	36	48
0,250	60	26	37	64
0,500	61	29	37	73
0,750	63	30	46	76
1,000	65	30	52	78
1,500	75	98	66	82

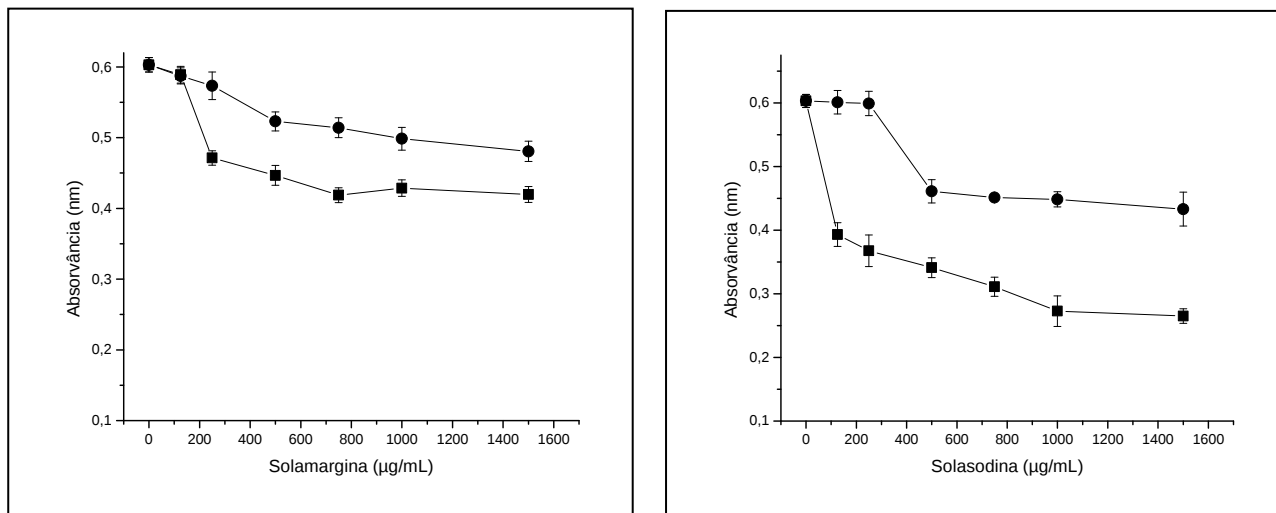


Figura 16. Relação dose-resposta do crescimento de *Staphylococcus aureus* na presença de solamargina e solasodina com (-●-) e sem (-■-) sistema de metabolização (S9)

Tabela 5 – Inibição do crescimento de *Staphylococcus aureus* (%) induzido por diferentes concentrações de solamargina (SM) e solasodina (SD) com (+S9) e sem ativação metabólica S9

mg/mL	Porcentagem de inibição (%)			
	SM	SM+S9	SD	SD+S9
0,125	3	40	36	61
0,250	14	48	42	74
0,500	33	70	59	74
0,750	36	85	71	84
1,000	47	100	100	100
1,500	50	100	100	100

4.3. Influência da fração S9 na atividade mutagênica

Os resultados dos ensaios realizados com a solasodina para as linhagens TA98 e TA100 de *S. typhimurium*, na presença e ausência de ativação metabólica, são apresentados na Tabela 6. Os valores de razão de mutagenicidade demonstraram que a solasodina não possui propriedades mutagênicas na maior concentração ensaiada (500 µg/placa), visto a razão de mutagenicidade, igual ou superior a 2, não ter sido detectada (Tabela 7). Devido à baixa quantidade de massa, a atividade mutagênica para as linhagens TA97 e TA102 não foi realizada. Para a solamargina, os resultados dos ensaios revertentes/placa com as linhagens TA 98 e TA 97, na presença e ausência da ativação metabólica, são apresentados na Tabela 8. Diferença estatisticamente significativa para as revertentes da linhagem TA98 nas concentrações de 350, 450 e 500 µg/placa, na ausência de metabolização em relação a metabolizada, foi observada. Os valores de razão de mutagenicidade igual e superior a dois demonstraram que esse glicoalcalóide apresenta atividade mutagênica para essa linhagem. O mesmo não é observado para a linhagem TA 97 (Tabela 9). A Tabela 10 apresenta os resultados revertentes/placa para as linhagens TA100 e TA102, para solamargina com e sem sistema de ativação metabólica. Apesar do número de vertentes por placas tratadas com solamargina em sistema de metabolização apresentar diferença nas concentrações maiores ou igual a 250 µg/placa, esse valor não foi suficiente para atingir a razão de mutagenicidade (Tabela 11).

Tabela 6 – Mutagenicidade da solasodina com e sem ativação metabólica para linhagens TA98 e TA100 de *S. typhimurium*

Tratamento (µg/placa)	Revertentes/placa em linhagens de <i>S. typhimurium</i> ^a			
	TA 98		TA 100	
	- S9	+S9	- S9	+ S9
0	18 ± 3,5	20 ± 4,7	149 ± 2,1	119 ± 13,5
125	19 ± 0,0	22 ± 4,5	152 ± 2,1	110 ± 14,7
250	13 ± 1,5	25 ± 7,2	118 ± 1,0	121 ± 15,9
350	13 ± 1,5	26 ± 3,2	129 ± 7,0	126 ± 23,5
500	20 ± 7,6	23 ± 2,7	150 ± 4,5	146 ± 14,0
C+	416 ± 22,3	525 ± 8,7	1962 ± 105,1	1182 ± 54,8

^a Valores apresentados como média e desvio padrão. A frequência de reversão espontânea não foi subtraída. Controle negativo = 0 (DMSO – 100 (µL/placa)); Controle Positivo: TA 98 (-S9) - NDP (4-o-nitrofenilenodiamina – 10,0 (µg/placa)); TA 98 (+S9) - ANTR (2-antramina - 1,25 (µg/placa)); TA 100 (-S9) – AS (azida sódica – 1,25 (µg/placa)); TA100 (+S9) – ANTR (2-antramina - 1,25 (µg/placa)).

Tabela 7 – Razão de mutagenicidade em linhagens TA98 e TA100 de *S. typhimurium* para diferentes concentrações de solasodina

Tratamento (µg/placa)	Razão de mutagenicidade			
	TA 98		TA 100	
	- S9	+S9	- S9	+ S9
125	1,0	1,1	0,8	0,9
250	0,7	1,3	0,8	1,0
350	0,7	1,3	0,7	1,1
450	1,1	1,2	1,0	0,9
500	1,0	1,1	0,8	0,9

Tabela 8 – Mutagenicidade da solamargina com e sem ativação metabólica para linhagens TA98 e TA97 de *S. typhimurium*

Revertentes/placa em linhagens de <i>S. typhimurium</i> ^a				
Tratamento (µg/placa)	TA 98		TA 97	
	- S9	+S9	- S9	+ S9
0	36 ± 4,0	30 ± 1,5	172 ± 5,0	166 ± 4,0
125	34 ± 1,0	31 ± 2,1	168 ± 6,0	162 ± 4,5
250	37 ± 2,7	30 ± 2,0	171 ± 4,0	167 ± 7,0
350	48 ± 3,5 ^b	36 ± 1,5	176 ± 4,9	171 ± 9,0
450	76 ± 3,1 ^b	38 ± 4,0	175 ± 5,0	177 ± 5,0
500	82 ± 2,5 ^b	49 ± 3,1	202 ± 2,1	193 ± 4,4
C+	667 ± 2,5	41 ± 5,1	184 ± 2,7	176 ± 4,0

^a Valores apresentados como média e desvio padrão. A frequência de reversão espontânea não foi subtraída. Controle negativo = 0 (DMSO – 100 (µL/placa)). Controle Positivo: TA 98 e 97 (-S9) - NDP (4-o-nitrofenilenodiamina – 10,0 (µg/placa)); TA 98 e 97 (+S9) - ANTR (2-antramina- 1,25 (µg/placa)). ^b Diferença estatisticamente significativa (p<0,05) na presença e ausência da fração S9.

Tabela 9 – Razão de mutagenicidade obtida com linhagens TA98 e TA97 de *S. typhimurium* tratadas com diferentes concentrações de solamargina

Razão de mutagenicidade				
Tratamento (µg/placa)	TA 98		TA 97	
	- S9	+S9	- S9	+ S9
125	0,9	1,0	0,9	1,0
250	0,9	1,1	1,0	1,0
350	1,0	1,2	1,0	1,0
450	2,0	1,2	1,1	1,1
500	2,2	1,2	1,1	1,1

Tabela 10 – Mutagenicidade da solamargina com e sem ativação metabólica para linhagens TA100 e TA102 de *S. typhimurium*

Revertentes/placa em linhagens de <i>S. typhimurium</i> ^a				
Tratamento (µg/placa)	TA 100		TA 102	
	- S9	+S9	- S9	+ S9
0	171 ± 3,1	152 ± 5,6	261 ± 10,1	276 ± 6,1
125	163 ± 5,4	158 ± 5,3	251 ± 8,1	278 ± 6,7
250	169 ± 2,5 ^b	170 ± 4,7	264 ± 6,0	287 ± 8,5
350	174 ± 4,5 ^b	176 ± 3,6	276 ± 5,3	302 ± 11,1
450	175 ± 5,5 ^b	178 ± 4,0	286 ± 6,0	305 ± 7,5
500	178 ± 4,0 ^b	176 ± 4,1	282 ± 5,9	292 ± 7,6
C+	1145 ± 89	1225 ± 45	999 ± 53	1035 ± 67

^a Valores apresentados como média e desvio padrão. A frequência de reversão espontânea não foi subtraída. Controle negativo = 0 (DMSO – 100 (µL/placa)). Controle Positivo: TA 100 (-S9) - AS (azida Sódica – 1,25 (µg/placa)); TA 100 (+S9) - ANTR (2-antramina - 1,25 (µg/placa)). TA 102 (-S9) – DAU (daunomicina – 6 (µg/placa)); TA 102 (+S9) – AF (2-aminofluoreno – 10 (µg/placa)); ^b Diferença estatisticamente significativa (p<0,05) na presença e ausência da fração S9.

Tabela 11 – Razão de mutagenicidade em linhagens TA100 e TA102 de para diferentes concentrações de solamargina

Razão de mutagenicidade				
Tratamento (µg/placa)	TA 100		TA 102	
	- S9	+S9	- S9	+ S9
0	0,9	1,0	0,9	1,0
125	0,9	1,1	1,0	1,0
250	1,0	1,2	1,0	1,0
350	1,0	1,2	1,1	1,1
450	1,0	1,2	1,1	1,1
500	1,0	1,2	1,1	1,1

4.4. Produtos de metabolização *in vitro* da solamargina e solasodina

Ionização por electrospray foi realizada para as amostra dos alcalóides no intervalo de massas de m/z 50-950 no modo positivo produzindo molécula protonadas $[M + H]^+$. O fragmentograma da solamargina (Figura 17) contém dois íons. O íon protonado m/z 868 corresponde a solamargina e o fragmento m/z 850 corresponde à perda de uma molécula de água. Os produtos de fragmentação da solamargina com adição da fração S9 (Figura 18) contém dez fragmentos detectados em m/z 357, 369, 421, 434, 499, 579, 601, 633, 737, 835 que diferem da solamargina pura e da mistura de DMEN acrescido de S9 (Figura 21). Nesse mesmo fragmentograma (Figura 18) observa-se, ainda, a presença de três íons em m/z 877, 893 e 934, que não são detectados na mistura S9 (Figura 21) e podem ser indicativos de produto de metabolização por conjugação. O fragmentograma da solasodina apresentado na Figura 19 contém cinco picos principais. O íon protonado m/z 414 corresponde a solasodina e o m/z 396 corresponde à perda de uma molécula de água. Três picos adicionais também foram identificados e os seus íons moleculares foram detectados em m/z 157, 253, e 271. Os produtos de fragmentação da solasodina após biotransformação com fração S9 (Figura 20) contém três fragmentos m/z 317, 379, e 381 que diferem dos obtidos para solasodina pura, e não estão presentes na fração S9 (Figura 21), porém, nota-se a presença de seis íons em m/z 421, 499, 522, 559, 579, 601, demonstrando mudanças no perfil de fragmentos dos alcalóides. Com excessão dos fragmentos m/z 522 e 559, todos os demais coincidem com íons detectados no fragmentograma da solamargina na presença da fração S9 (Figura 18).

Karinacorbj_Smpadrao_filhos869_1703201101_11031614140318-56 RT: 0.26-0.85 AV: 39 NL: 7.05E4
T: ITMS + c ESI Full ms2 869.00@cid25.00 [235.00-950.00]

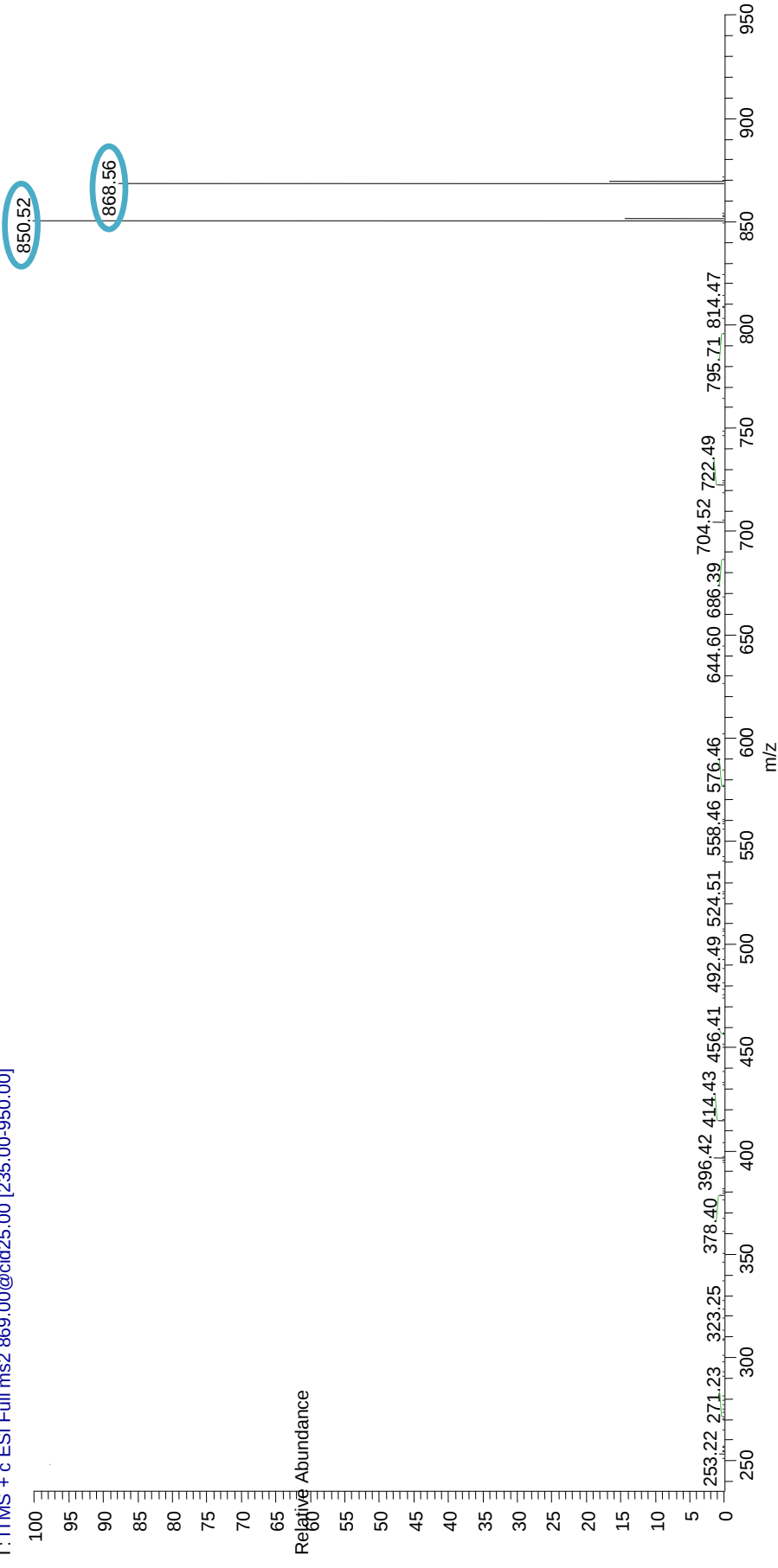


Figura 17. Espectro de massas da solamargina

KarinaFCF_SMpositiva_espos25V_1703201101_110316141403 #2-118 RT: 0.00-0.35 AV: 117 NL: 2.92E3
T: ITMS + c ESI Full ms [70.00-950.00]

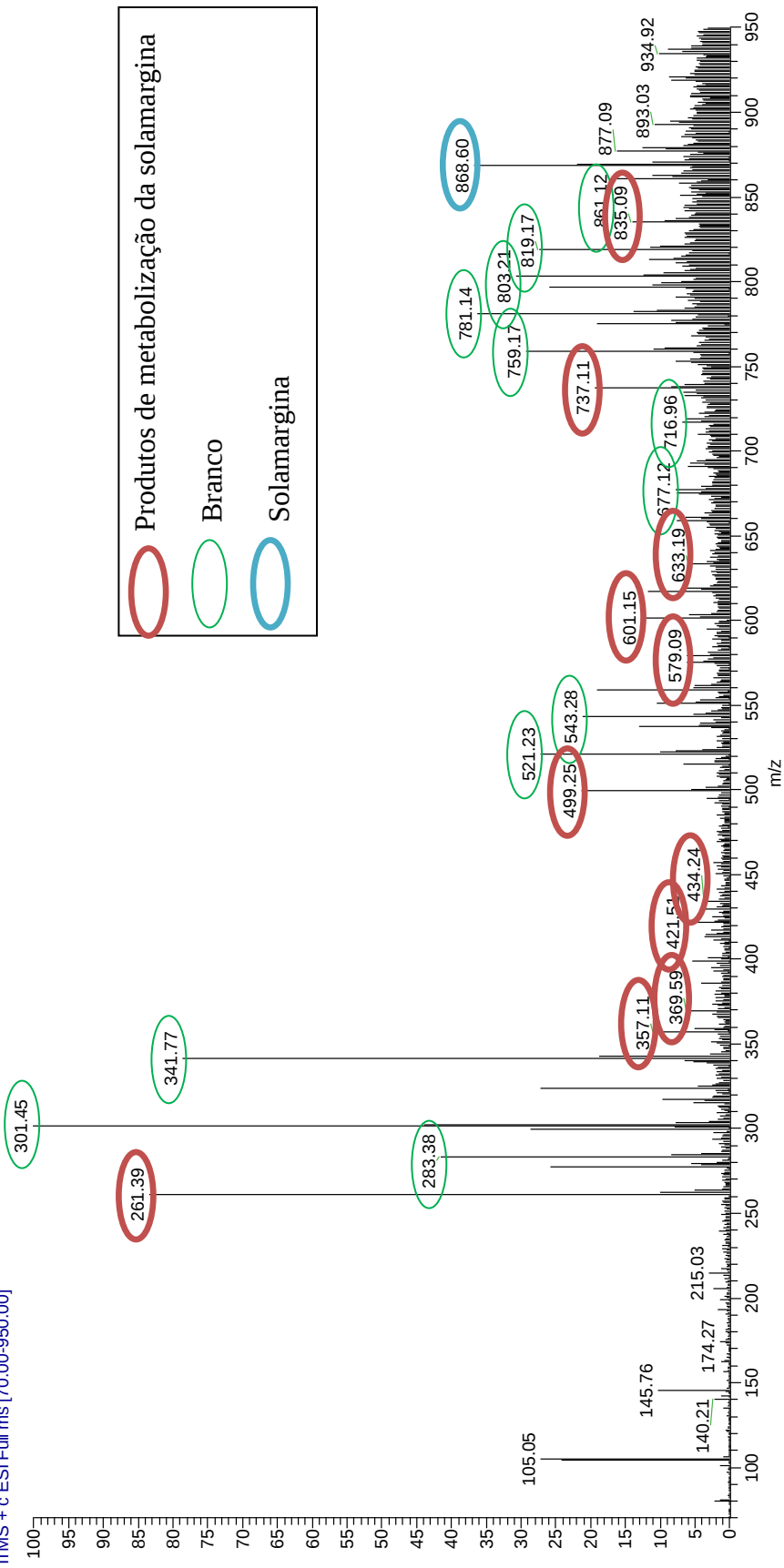


Figura 18. Fragmentograma da solamargina na presença da fração S9

Karinacorbil_SDpadrao_filhos414_1703201101_110316141403 #39-51 RT: 0.49-0.64 AV: 13 NL: 2.89E4
T: ITMS + c ESI Full ms2 414.50@cid27.00 [110.00-500.00]

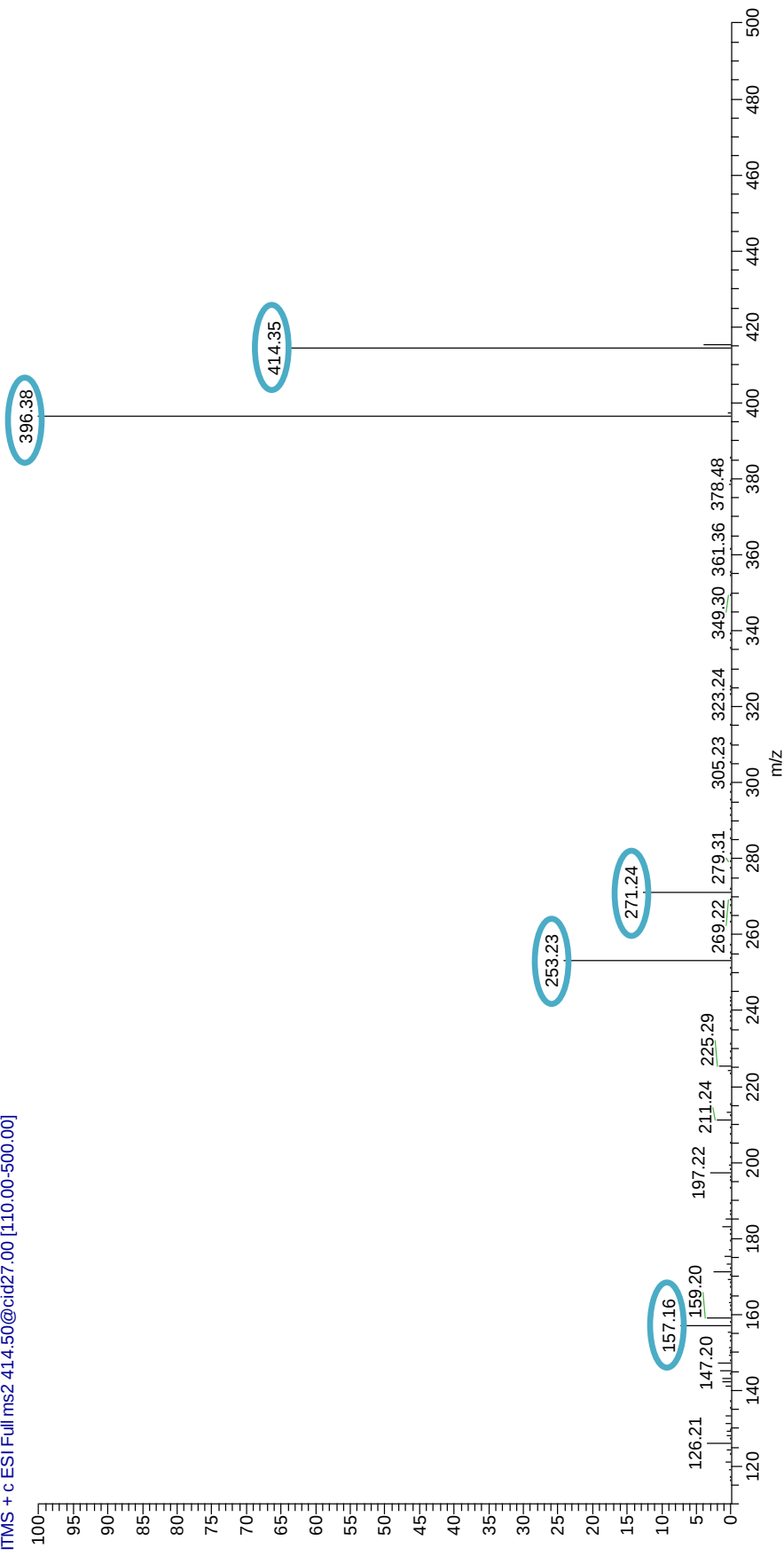


Figura 19. Espectro de massas da solasodina

KarinaFCF_SDpositiva_esipos25V_1703201101_110316141403 #4-162 RT: 0.01-0.40 AV: 159 NL: 1.22E4
T: ITMS + c ESI Full ms [50.00-650.00]

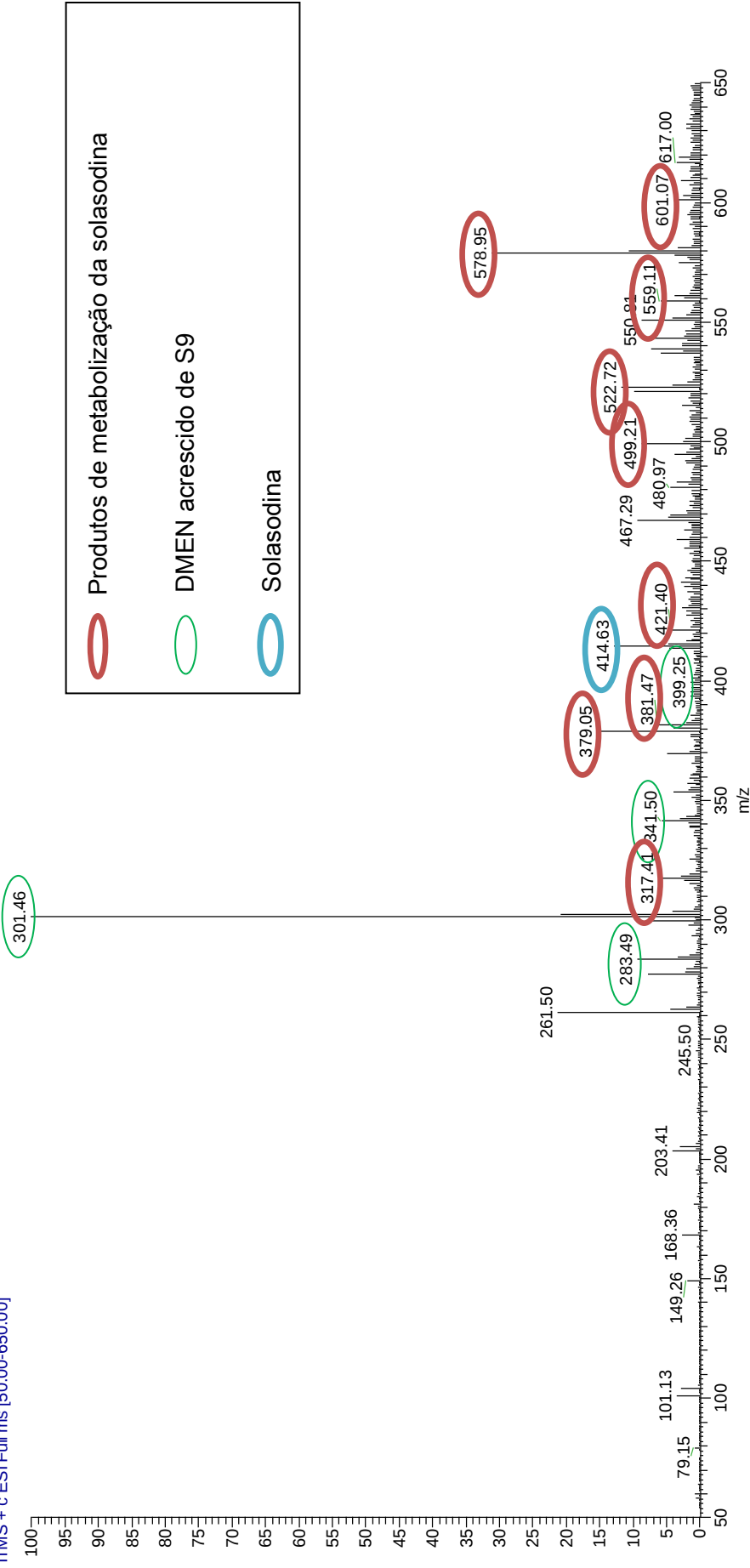


Figura 20. Fragmentograma da solasodina na presença de S9

Karinacorbi_branco_esipos20V_1703201101_110316141403 #1-58 RT: 0.00-0.24 AV: 58 NL: 3.16E3
T: ITMS + c ESI Full ms [200.00-2000.00]

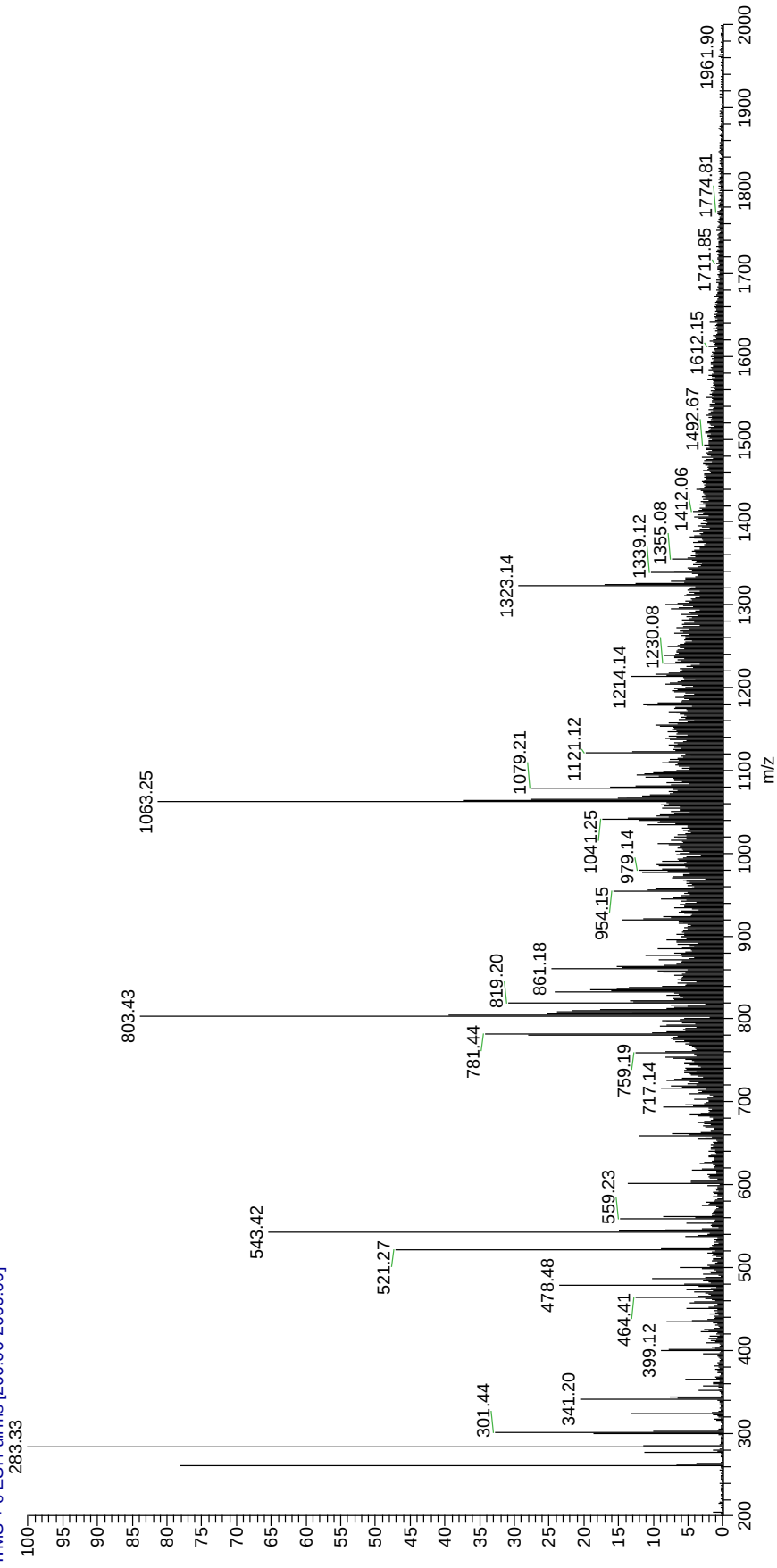


Figura 21. Fragmentograma do DMEN acrescido da fração S9.

V – DISCUSSÃO

Compostos bioativos são, em sua maioria, metabólitos secundários e, geralmente, estão relacionados com os sistemas de defesa das plantas contra a radiação ultravioleta ou as agressões de insetos ou patógenos (MANACH et al., 2004). Um bioativo pode apresentar certa atividade biológica *in vitro*, mas esse mesmo composto pode não ser biodisponível *in vivo* ou ser rapidamente metabolizado e excretado, tornando-se ineficaz. Uma abordagem completa sobre a atividade biológica dessas substâncias deve envolver o estudo da sua biodisponibilidade, englobando a absorção, distribuição, metabolismo, tempo de meia vida efetiva, mecanismos de ativação e inativação e a excreção do composto em questão. Certamente, somente uma pequena parte dos compostos bioativos foi adequadamente estudada sob esse ponto de vista.

Embora mais de 100 glicoalcalóides estruturalmente diferentes tenham sido isolados a partir de mais de 350 espécies de *Solanum*, os quatro glicoalcalóides mais conhecidos são chaconina, solanina, solamargina e solasonina (FUKUHARA e KUBO, 1991). Os estudos que avaliam o potencial biológico dos alcalóides incidem sobre a estrutura química dos diferentes metabólitos de *Solanum* spp e foram desenvolvidos para melhorar a segurança dos alimentos vegetais da dieta humana (MILNER et al. 2006).

Apesar dos glicoalcalóides estarem relacionados com intoxicação em seres humanos, nas últimas décadas, a maioria dos estudos foi direcionado para a atividade anticancerígena devido a extrema citotoxicidade. É reconhecido que glicosídeos contendo chacotriose são mais ativos quando comparados a outros resíduos glicosídeos de estrutura química semelhante.

Alguns estudos relatam que as agliconas possuem baixa atividade biológica, sugerindo que essa função possa estar relacionada aos glicosídeos ligados à aglicona (MORILLO et al., 2001). Nesse trabalho demonstramos pela técnica do MTT-tetrazólio não haver diferença no potencial citotóxico do glicoalcalóide solamargina e da aglicona solasodina, independente da linhagem celular utilizada (Raw, SiHa e HepG2), sugerindo que a cadeia lateral de trissacarídeo não interfere nessa atividade para esses sistemas celulares.

O mecanismo de morte celular (apoptose) induzido pela solamargina em células leucêmicas (K562) foi relatado por Sun et al. (2010), onde os autores demonstram que, inicialmente, esse alcalóide induz permeabilização da membrana mitocondrial, com ruptura dos lisossomas e liberação de catepsina B para o citosol. Subsequentemente, ocorre dano mitocondrial, com diminuição do potencial de membrana, e liberação do citocromo C. Esse mecanismo pode justificar as diferenças nos índices citotóxicos determinado por técnicas que revelam atividades mitocondrial (MTT) e lisossomal (VN). A citotoxicidade dos alcalóides foi maior para as linhagens RAW e SiHa quando determinada pela técnica do MTT em relação ao VN. Essa diferença pode ser decorrente da sequência dos mecanismos pelos quais esses alcalóides induzem morte celular. Ainda há muito a esclarecer sobre as ligações moleculares entre as vias lisossomal e mitocondrial na indução de morte celular pela solamargina (SUN et al., 2010).

É notório o efeito citotóxico observado para a solamargina em células tumorais SiHa e Raw, mas nas mesmas concentrações utilizadas nos ensaios, o IC₅₀ não foi definido para a linhagem HepG2, demonstrando maior sensibilidade dessas células. As células HepG2

conservam, além das atividades das enzimas da fase I, tais como as do citocromo P450, as enzimas da fase II, incluindo glutathiona-S-transferases, sulfotransferases, N-acetiltransferases e glucoranosiltransferases que estão envolvidas no metabolismo de carcinógenos, as quais apresentam importante função na ativação ou detoxicação de carcinógenos reativos de DNA (MAJER et al., 2004). Portanto é aceitável que esses ensaios possam refletir com mais fidelidade o metabolismo desses alcalóides.

O mecanismo pelo qual alguns glicoalcalóides desencadeiam reações apoptóticas também foi descrito por Shiu et al. (2007), que demonstraram ocorrer uma super expressão dos receptores de morte, culminando no aumento de Bax para Bcl-2. Isso resulta na liberação de citocromo C da mitocôndria e ativação de caspase-8, caspase-9 e caspase-3. Nesse mesmo estudo, os pesquisadores observaram atividade antiproliferativa dos glicoalcalóides solamargina e solasonina, que possuem a mesma aglicona, bem como seus produtos de hidrólise (chacotriose e raminose), em células tumorais HCT-8, através da técnica do MTT. Os resultados mostraram que ambos glicoalcalóides exibem forte atividade citotóxica, sugerindo que as diferenças nas cadeias laterais (trissacarídeos) da aglicona não influenciaram nessa atividade.

Os glicoalcalóides solamargina e solasonina, isolados de *Solanum sodomaeum*, foram eficazes na inibição de tumores da pele humana, incluindo carcinomas de células basais e escamosas (CHAM, 1994). Outros estudos indicam que a solamargina e seus derivados possuem atividade antitumoral, inibindo o crescimento de linhagens celulares cancerígenas tais como de cólon (HT-29, HCT-15), de próstata (LNCaP, PC-3), de mama (T47D, MDA-MB-231)

(HU, 1999; LEE, 2004) e células de câncer de pulmão (H441, H520, H66, H69) (LIU, 2004; FRIEDMAN, 2005, TIOSSI, 2010).

O efeito citotóxico da solamargina em células de câncer de mama humana demonstrou ser maior que a de medicamentos utilizados na quimioterapia, como cisplatina, metotrexato, 5-fluorouracil, epirrubicina e ciclofosfamida (SHIU, 2007), dados que corroboram com nossos resultados em relação às linhagens de carcinoma cervical e macrófagos murino utilizadas nesse estudo. Diferenças na sensibilidade de linhagens celulares a determinados xenobióticos podem estar relacionadas aos diferentes mecanismos de entrada, ação e resposta celular a esses agentes. Alguns antineoplásicos derivados de planta que induzem apoptose demonstram que esse efeito depende do estágio de diferenciação celular, sendo mais efetivo contra células pouco diferenciadas (BRANDÃO et al., 2010).

A demonstração de que apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica e que vários agentes quimioterápicos agem através da indução desse tipo de morte celular (agentes supressores de câncer) levou a uma intensa investigação de substâncias químicas para aplicação no tratamento do câncer. (GRIVICICH et al., 2007)

Algumas famílias de enzimas do citocromo P450, que catalizam a maior parte das reações da fase I do metabolismo, são importantes na neutralização do efeito citotóxico de alguns agentes antineoplásicos, gerando metabólitos com pouca ou nenhuma citotoxicidade. Esta situação induz efeitos inesperados na terapia contra certos tipos de câncer. Como exemplo pode-se citar a procarbazina e tamoxifeno, que inibem mielomas múltiplos e tumores de mama, respectivamente. Entretanto, existem subfamílias de enzimas P450 que catalisam reações cujos

produtos são metabólitos com potente atividade antitumoral. Exemplos destes são a ifosfamida e ciclofosfamida, pró-drogas metabolizadas por subfamílias do complexo P450, empregadas no tratamento de sarcoma e leucemias, respectivamente (QUIÑONES et al., 2008). Apesar de estudos com P450 serem os mais utilizados para avaliar o metabolismo de drogas, esse sistema não contém todas as enzimas de reações da fase II, não representando totalmente o ambiente fisiológico endógeno (JIA e LIU, 2007).

Na tentativa de mimetizar a biotransformação *in vivo* por enzimas do complexo P450, os testes de citotoxicidade foram feitos na presença de 10% da fração S9. Para a linhagem RAW, nossos resultados demonstraram significativa diminuição da citotoxicidade dos alcalóides obtidos pelas duas técnicas utilizadas. A presença da fração S9 para a linhagem SiHa diminuiu a citotoxicidade dos alcalóides apenas quando revelada pela técnica do MTT. Para a linhagem HepG2, a presença do sistema de metabolização aumentou significativamente a citotoxicidade de ambos compostos demonstrada pela técnica do VN, entretanto não houve diferença no índice citotóxico pela técnica do MTT. Esses resultados sugerem diferenças na interação célula-droga ou especificidade de resposta celular ou que o sistema exógeno de metabolização não interferiu na estrutura do alcalóides ou mesmo que, caso tenha ocorrido a metabolização, a atividade citotóxica dos metabólitos gerados não modifica a citotoxicidade dos alcalóides.

O potencial antimicrobiano é o principal alvo para novos fármacos em decorrência da resistência bacteriana aos atualmente utilizados. Extratos de frutos e folhas de algumas espécies de plantas da família Solanaceae foram avaliados quanto à atividade antibacteriana por serem utilizadas na medicina tradicional para tratar algumas doenças humanas e animais

(WANYONYI et al., 2002). Poucos são os trabalhos que relatam a atividade antibacteriana de alcalóides isolados e identificados, entretanto essa atividade é observada, mesmo que moderada, quando esses compostos estão presentes em extratos brutos (SHOKEEN et al., 1999; SIMEÓN et al., 1990).

Extrato metanólico bruto dos frutos de *Solanum aculeastrum* Dunal demonstrou atividade antibacteriana moderada para *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, através do teste de disco difusão, sendo que essa atividade foi maior nas frações contendo maior quantidade de glicosaponinas esteroidais (mais polares) que à observada nas frações com maiores quantidades de glicoalcaloides esteroidais (menos polares). Os autores justificam que essa atividade é decorrente de diferenças no número, tipo de açúcar e ligações interglicosídeos do açúcar ligado à aglicona (WANYONYI et al., 2003). Esses autores não observaram haver diferença no halo de inibição de uma das frações menos polar em relação ao extrato metanólico bruto para *S. aureus*.

A comparação do potencial antimicrobiano de compostos vegetais é dificultada em função das diversas metodologias utilizadas pelos pesquisadores. Os dois métodos mais comumente utilizados avaliação do potencial antimicrobiano, principalmente de extratos de plantas, são os de difusão em ágar e de diluição em caldo. O método de difusão em ágar pode ser realizado através das técnicas do disco, do poço ou template. Várias alterações foram realizadas nessas metodologias para obtenção de resultados mais confiáveis, pois alguns fatores, tais como composição do meio de cultura, microrganismos testados, método de extração, pH e solubilidade das amostras no meio de cultura, podem alterar os resultados,

dificultando a padronização do procedimento (ALVES et al., 2008). Cowan (1999) sugere que a padronização sistemática dos testes *in vitro* na busca de compostos com atividade antibacteriana seja uma alternativa para solucionar a discrepância de resultados. Em nosso estudo, a solasodina apresentou CIM apenas para *S. aureus* (1,0 mg/mL), obtida através da técnica espectrofotométrica de microdiluição em placa. O sistema exógeno de metabolização potencializou a atividade antimicrobiana de ambos alcalóides. Compostos que necessitam de biotransformação prévia para promover efeito farmacológico são designados de pró-fármacos (CHIN e FERREIRA, 1999). Entretanto, esses alcalóides, mesmo após biotransformação, mantêm alta atividade citotóxica em baixas concentrações, não demonstrando ser estruturas propícias para maiores investigações como agente antimicrobiano.

A quimioterapia com uso de drogas citotóxicas tem sido rotina no tratamento de câncer, sendo que as drogas utilizadas apresentam diferentes mecanismos de ação e a maioria mutagênica e/ou carcinogênica. Dentre os testes para avaliação da atividade mutagênica, destacam-se os ensaios de mutação gênica reversa com *S. typhimurium*, teste de AMES, que é mundialmente reconhecido quanto a sua eficiência na detecção de mutações pontuais por diferentes agentes (ZEIGER, 2001; VARELLA et al., 2004). Várias substâncias mutagênicas primeiramente identificadas pelo teste de Ames mostraram-se carcinogênicas em ensaios com animais (UMBUZEIRO e VARGAS, 2003; MARON e AMES, 1983).

Nossos resultados demonstram que a solasodina não apresenta atividade mutagênica, pois não alterou significativamente a frequência de revertentes para as linhagens testadas. A solamargina demonstrou indícios de mutagenicidade na linhagem TA98 nas maiores

concentrações ensaiadas. Essa linhagem detecta compostos que deslocam o quadro de leitura do DNA, resultados que corroboram com os achados de Almeida et al. (2010). Entretanto, as linhagens bacterianas por não apresentarem enzimas de metabolização, adiciona-se às culturas fração microssomal S9 (MARON e AMES, 1983). Na presença da fração S9, solamargina e solasodina não demonstraram atividade mutagênica para as linhagens testadas.

Um dos primeiros estudos em relação a mutagenicidade dos alcalóides foi realizado por Friedman e Henika (1992), pelo teste de Ames, com as linhagens TA98 e TA100. A chaconina apresentou ser mutagênica na TA98 sem ativação microssomal e a solanina demonstrou ser fracamente positiva na TA100 com sistema de ativação S9 demonstrando que esses alcalóides não causam danos no DNA. Todavia, alguns trabalhos demonstram embriotoxicidade e teratogenicidade induzida por alcalóides (WANG et al., 2005; McWILLIAMS et al., 2000; FRIEDMAN et al., 1997; BLANKEMEYER et al., 1997; DRESSER et al., 1992). Assim, apesar da maioria dos dados sobre potencial mutagênico de antineoplásicos derivar de ensaios com *S. typhimurium*, é fundamental que outros testes mais complexos sejam realizados na detecção de danos genéticos causados por agentes antineoplásicos.

O emprego Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - Espectrometria de Massa (CLAE-MS) como um método analítico para a determinação estrutural de glicoalcalóides ganhou impulso na última década. A identificação de glicoalcalóides é primeiramente realizada pelo seu peso molecular e confirmada por comparação o padrão de fragmentação resultante de acordo com a literatura (TROUILLAS, 2005). Para a maioria dos xenobióticos em teste, o metabolismo é muito complexo e envolve vários compostos ativos, dificultando a interpretação e a

determinação dos caminhos de fragmentação. A interpretação dos padrões de fragmentação de glicoalcalóides da berinjela, da batata e do tomate realizada por MS fornece uma referência útil para a análise desses alcalóides (DISTL e WINK, 2009; CATALDI, 2005; CLAEYS, 1996).

Mudanças estruturais causadas por reações metabólicas induzem efeitos no comportamento cromatográfico dos compostos de origem, pois alteram as estruturas químicas dos mesmos (NALECZ-JAWECKI, 2007; NALECZ-JAWECKI et al., 2007). Os fragmentos observados na espectrometria de massas correspondem a partes de uma molécula que, com base nas mudanças de suas massas, determinam metabólitos gerados, quando comparados aos composto de origem. A análise espectral demonstrou a biotransformação dos alcalóides solamargina e solasodina induzida pelo sistema exógeno de metabolização S9. Observa-se que a quantidade da fração microsssomal utilizada (10%) não foi suficiente para metabolizar todas as moléculas dos alcalóides presente nos ensaios, visto que ainda são detectados picos referentes a esses alcalóides, contudo foi possível demonstrar diferentes produtos formados pela adição da fração S9. Os produtos de fragmentação por MS, detectados em nosso estudo, são provenientes da clivagem no anel B e E conforme proposto por Cahill et al. (2010) cujos fragmentos correspondem aos íons m/z 271, 253 e 175, conforme demonstrado na Figura 16. Como esperado, na MS da solasodina é detectado íons m/z 414 e 396, esse último referente à perda de uma molécula de água.

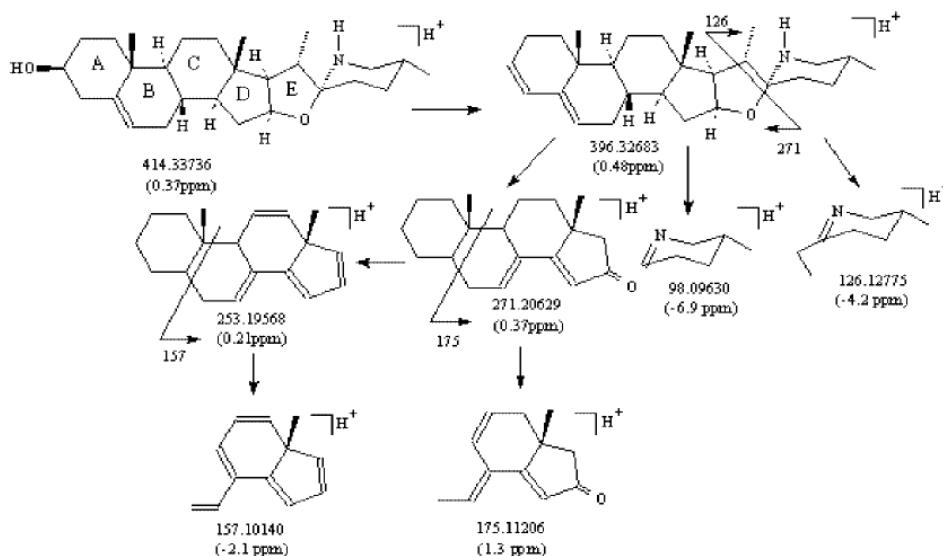


Figura 22. Fragmentos da solasodina detectados em MS (CAHILL et al., 2010)

Uma das limitação para o possível desenvolvimento de medicamentos anticancerígenos a partir de plantas é a obtenção de pequena quantidade dessas moléculas ativas. Estudos que evidenciam glicoalcalóides de *Solanum palinacanthum* demonstram que essa espécie de *Solanum* apresenta um bom rendimento para a obtenção de solamargina, conforme metodologia utilizada em nosso estudo e proposta por Almeida e Rocca (1995).

Uma das limitação para desenvolvimento de medicamentos anticancerígenos a partir de plantas é a pequena concentração dessas moléculas ativas. Estudos que evidenciaram glicoalcalóides em *Solanum palinacanthum* demonstraram que essa espécie apresenta um bom rendimento para a obtenção de solamargina, conforme metodologia utilizada em nosso estudo e proposta por Almeida e Rocca (1995).

Embora a literatura relate a ação anticancerígena da solamargina, é importante ressaltar que essa molécula, conforme demonstrado nesse trabalho é biotransformada in vitro por enzimas microsossomais presentes na fração S9. Assim, é importante destacar que a resposta

farmacológica esperada pode não ser observada in vivo, visto ser a biotransformação uma das principais etapas farmacocinéticas responsáveis pela atividade terapêutica das drogas.

VI – CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que o sistema de metabolização S9:

1) Altera a atividade citotóxica da solamargina e solasodina para as linhagens celulares RAW e SiHa e potencializa essa atividade na linhagem HepG2, demonstrando poder induzir in vivo efeitos hepatotóxicos;

2) Potencializa a inibição do crescimento bacteriano dos alcalóides para *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, entretanto a CIM foi obtida somente para *Staphylococcus aureus* na concentração 1,0 mg/mL;

3) Reverte o traço de mutagenicidade da solamargina na linhagem TA98;

4) Não biotransforma o glicoalcalóide solamargina em sua aglicona solasodina, conforme demonstrado pelo espectro de massa, mas atua nesses compostos gerando outros metabólitos.

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AERTS, R. J.; SNOEIJER, W.; van der MEIJDEN, E.; VERPOORTE, R. Allelopathic inhibition of seed germination by *Cinchona* alkaloids? **Phytochem.**, v. 30, p. 2947 – 2951, 1991.

AGRA, M. F.; NURIT-SILVA, K.; BERGER, L. R. Flora da Paraíba, Brasil: *Solanum* L. (Solanaceae). **Acta bot. bras.**, v. 23, p. 826 – 842, 2009.

ALMEIDA, A. E.; ROCCA, M. A. Glicoalcalóides dos frutos do *Solanum flaccidum* VELL. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 16, p. 11 – 118, 1995.

ALMEIDA, A. E.; CARDOSO, C. R. P.; ALMEIDA, D. V.; MOREIRA, R. R. D.; SILVA, M.; VRANDA, E. A. Mutagenic activity glycoalkaloidss from *Solanum palinacanthum* Dunal (Solanaceae) found in the Brazilian cerrado. **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 29, p. 122 – 126, 2010.

AMES, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. **Science**, v. 221, p. 1256 – 1264, 1983.

ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas de *screening* para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Quim. Nova**, v. 31, p. 1224 – 1229, 2008.

BARILE, F. A. Introduction to in vitro cytotoxicology: mechanisms and methods. **CRC Press.**, p. 222, 1994.

BEAMAN-MBAYA, V.; MUHAMMED, S. I. Antibiotic action of *Solanum incanum* Linnaeus. **Antimicrob. Agents Ch.**, v. 9, p. 920 – 924, 1976.

BLANKEMEYER, J. T.; MCWILLIAMS, M. L.; RAYBURN, J. R.; WEISSENBERG, M.; FRIEDMAN, M. Developmental toxicology of solamargine and solasonine glycoalkaloids in frog embryos. **Food Chem. Toxicol.**, v. 36, p. 383 – 389, 1998.

BLANKEMEYER, J. T.; WHITE, J. B.; STRINGER, B. K.; FRIEDMAN, M. Effect of R-tomatine and tomatidine on membrane potential of frog embryos and active transport of ions in frog skin. **Food Chem. Toxicol.**, v. 35, p. 639 – 646, 1997.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J. A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol. Lett.**, v. 24, p. 119 – 124, 1985.

BORENFREUND, E.; BABICH, H.; Martin-ALGUACIL, N. Comparisons of two *in vitro* cytotoxicity assays – the neutral red (NR) and tetrazolium MTT tests. **Toxicol. in vitro**, v. 2, p. 1 – 6, 1988.

BRANDÃO, H. N.; JUCENI, P. D.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas, **Qui. Nova**, v. 33, p.1359 – 1369, 2010.

CAHILL, M. G.; CAPRIOLI, G.; VITTORI, S.; JAMESA, K. J. Elucidation of the mass fragmentation pathways of potato glycoalkaloids and aglycons using Orbitrap mass spectrometry. **J. Mass Spectrom.**, v. 45, p. 1019 – 1025, 2010.

CATALDI, T. R.; LELARIO, F.; BUFO, A. S. Analysis of tomato glycoalkaloids by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass. Sp**, v. 19, p. 3103 – 3110, 2005.

CHAM, B. E. Solasodine glycosides as anticancer agents -preclinical and clinical-studies. **Asia Pacif. J. Pharmacol.**, v. 9, p. 113–118, 1994.

CHIESA, F. A. F.; MOYNA, P. Alcalóides esteroidales. Em: Farmacognosia da Planta ao medicamento, p.869 – 883,1999.

CHIN, C. M. e FERREIRA, E. I. O processo de latenciação no planejamento de fármacos. **Quím. Nova**, v. 22, p. 75 – 84, 1999.

CHU, E.; SARTORELLI, A. C. Quimioterapia co Câncer. In: KATZUNG, B. G. Farmacologia básica e clínica. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; v. 55, 751 – 755, 2005.

CHUNG, M. C.; SILVA, A. T. A.; CASTRO, L. F.; GÜIDO, R. V. C.; NASSUTE, J. C.; FERREIRA, E. I. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v.41, p. 155 – 179, 2005.

CLAEYS, M.; VAN DEN HEUVEL, H.; CHEN, S.; DERRICK, P.; MELLON, F. A.; PRICE, K. R. Comparison of high- and low energy collision-induced dissociation tandem mass spectrometry in the analysis of glycoalkaloids and their aglycons. **J. Am. Soc. Mass Spectrom.**, v.7, p.173 – 181, 1996.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 12, p. 564 – 582, 1999.

COSTA, E. M. M. B.; OLIVEIRA, V.; PIMENTA, F. C. Citocromo P450 e biotransformação. **RPT**, v. 33, p. 21 – 31, 2004.

DEARFIELD, K. L.; CIMINO, M. C.; MCCARROLL, N. E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L. R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutat. Res.**, v. 521, p. 121–135. 2002.

DEVIENCE, K. F.; RADDI, M. S. G. Screening for antimicrobial activity of natural products using a microplate photometer. **Braz J Microbiol**, v. 33, p. 166 – 168, 2002.

DEVIENCE, K. F. Avaliação da atividade biológica *in vitro* de isocumarinas naturais e semi-sintéticas obtidas de *Paepalanthus bromelioides*. 2000. 127f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: A biosynthetic approach. London: John Wiley, 2nd ed., p. 507, 2001.

DISTL, M. e WINK, M. Identification and quantification of steroidal Alkaloids from Wild tuber-bearing *Solanum* species by HPLC and LC-ESI-MS. **Potato Res.**, v. 52, p. 79 – 104, 2009.

DRESSER, T. H.; RIVERA, E. R.; HOFFMANN, F. J.; FINCH, R. A. Teratogenic assessment of 4 solvents using the frog embryo teratogenesis assay - *Xenopus* (fetax). **J. Appl. Toxicol.**, v. 12, p. 49 – 56, 1992.

ESTEBAN, L. La espectrometria de masas en imagenes. Madrid: ACK Editores, 1993.

FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells: a manual of basic technique. 3^a ed. New York: **Wiley-Liss**, p. 486, 1994.

FRIEDMAN, M.; DAO, L. Distribution of glycoalkaloids in potato plants and commercial potato products. **J. Agr. Food Chem.**, v. 40, p. 419 – 423, 1992.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R. Absence of genotoxicity of potato alkaloids R-chaconine, R-solanine and solanidine in the Ames *Salmonella* and adult and fetal erythrocyte micronucleus assays. **Food Chem. Toxicol.**, v. 30, p. 689 – 694, 1992.

FRIEDMAN, M.; LEVIN, C. E. R-Tomatine content in tomato and tomato products determined by HPLC with pulsed amperometric detection. **J. Agr. Food chem.**, 43, 1507–1511, 1995.

FRIEDMAN, M.; McDONALD, G. M. Potato glycoalkaloids: chemistry, analysis, safety, and plant physiology. **Crit. Rev. Plant. Sci.**, v. 16, p. 55 – 132, 1997.

FRIEDMAN, M.; BURNS, C. F.; BUTCHKO, C. A.; BLANKEMEYER, J. T. Folic acid protects against potato glycoalkaloid R-chaconine-induced disruption of frog embryo cell membranes and developmental toxicity. **J. Agr. Food Chem.**, v. 45, p. 3991 – 3994, 1997.

FRIEDMAN, M. Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HepG2) cancer cells. **J. Agr. Food Chem.**, v. 52, p. 2832 – 2839, 2004.

FRIEDMAN, M.; LEE, K. R.; KIM, H. J.; LEE, I. S.; KOZUKUE, N. Anticarcinogenic effects of glycoalkaloids from potatoes against human cervical, liver, lymphoma, and stomach cancer cells. **J. Agr. Food Chem.**, v. 53, p. 6162 – 6169, 2005.

FRIEDMAN, M. Potato glycoalkaloids and metabolites: roles in the plant and in the diet. **J. Agr. Food Chem.**, v. 54, p. 8655 – 8681, 2006.

FUKUHARA, K.; KUBO, I. Isolation of steroidal glycoalkaloids from *Solanum incanum* by two countercurrent chromatographic methods. **Phytochemistry**, V. 30, p. 485 – 687, 1991.

FUTRELL, J. H. Development of tandem mass spectrometry: one perspective. **Int. J. Mass Spectrom.**, v. 200, p. 495 – 508, 2000.

GASKELL, S. J. Electrospray: Principles and practice. **J. Mass Spectrom.**, v. 32, p. 677 – 688, 1997.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. Morte Celular por Apoptose. **Rev. bras. cancerol.**, v. 53, p. 335 – 343, 2007.

JORGENSEN, J. H.; TURNIDGE, J. D.; WASHINGTON, J. A. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: MURRAY, P. R. et al. Manual of Clinical Microbiology. 7^a ed. Washington: **ASM**, v. 118, p. 1526 – 1543, 1999.

HARBORNE, J. B. Classes and functions of secondary products, In: Walton NJ, Brown DE (Ed.). Chemicals from plants, perspectives on secondary plant products. London: **Imperial College**, p.1 – 25, 1999.

HE, X. G. On-line identification of phytochemical constituents in botanical extracts by combined high-performance liquid chromatographic-diode array detection-mass spectrometric techniques.

J. Chromatogr. A, v. 880, p. 203 – 232, 2000.

HELLENAS, K. E.; NYMAN, A.; SLANINA, P.; LOOF, L.; GABRIELSSON, J. Determination of potato glycoalkaloids and their aglycone in bloodserum by high-performance liquid-chromatography - application to pharmacokinetic studies in humans. **Chromat J. B: Biomed. Sci. Appl.**, v. 573, p. 69 – 78, 1992.

HOFFMANN, E. Tandem mass spectrometry: a primer. **J. Mass Spectrom.**, v. 31, p. 129 – 137, 1996.

HU, K.; KOBAYASHI, H.; DONG, A.; JING, Y.; IWASAKI, S.; YAO, X. Antineoplastic agents III: steroidal glycosides from *Solanum nigrum*. **Planta Méd.**, v. 65, p. 35 – 38, 1999.

JIA, L.; LIU, X. The conduct of drug metabolism studies considered good practice (II): *in vitro* experiments. **Curr. Drug Metab.**, v. 8, p. 822 – 829, 2007.

KORPAN, Y. L.; NAZARENKO, E. A.; SKRYSHEVSKAYA, I. V.; MARTELET, C.; JAFFREZIC-RENAULT, N.; EL`SKAYA, A. Potato glycoalkaloids: true safety or false sense of security?. **Trends Biotechnol.**, v. 22, p. 147 – 151, 2004.

KRAKOWSKI, M. D. Natural inhibitors of cholinesterase's: implications for adverse drug reactions. **Can. J Anaesth.**, v. 44, p. 525 – 534, 1997.

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. **Biochem. Pharmacol.**, v. 60, p. 1865 – 1873, 2000.

LANG, M.; PELKONEN O. Metabolism of xenobiotics and chemical carcinogenesis. In: Metabolic Polymorphisms and Susceptibility to Cancer. **IARC Sci. Publ.**, v. 39, p. 13 – 22, 1999.

LEE, K. R.; KOZUKUE, N.; HAN, J. S.; PARK, J. H.; CHANG, E. Y.; BAEK, E. J.; CHANG, J. S.; FRIEDMAN, M. Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HepG2) cancer cells. **J. Agr. Food Chem.**, v. 52, p. 2832 – 2839, 2004.

LIU, L. F.; LIANG, C. H.; SHIU, L. Y. Action of solamargine on human lung cancer cells enhancement of the susceptibility of cancer cells to TNFs. **FEBS Lett.**, v.1, p. 67 – 74, 2004.

MABBERLY, D. J. The plant book. A portable dictionary of the vascular plants. 2nd ed. Cambrigde: Cambridge University Press, p. 858, 1997.

MAJER, B. J.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; DARROUDI, F.; LAKY, B.; WIT, K.; KANSMULLER, S. Genotoxic effects of dietary and lifestyle related carcinogens in human derived hepatoma (Hep G2; Hep3B) cells. **Mutat. Res.**, v. 551, p. 153 – 166, 2004.

MANACH, C. SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMENEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 79, p.727-47, 2004.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised Methods for the Salmonella Mutagenicity Test. **Mutat. Res.**, v. 113, p. 173 – 215, 1983.

MCWILLIAMS, M. L.; BLANKEMEYER, J. T.; FRIEDMAN, M. The folic acid analogue methotrexate protects frog embryo cell membranes against damage by the potato glycoalkaloid R-chaconine. **Food Chem. Toxicol.**, v. 38, p. 853 – 859, 2000.

MILNER, S. E.; BRUTON, N. P.; JONES, P. W.; O'BRIEN, N. M.; COLLINS, S. G.; MAGUIRE, A. R. Bioactivities of glycoalkaloids and their aglycones from *Solanum* species. **J. Agr. Food Chem.**, v. 59, p. 3454 – 3484, 2011.

MENSSINGA, T. T.; AJAM, S.; ROMPELBERG, C. J. M.; van TWILLERT, K.; MEULENBELT, J.; van den TOP, H. J.; van EGMOND, H. P. Potato glycoalkaloids and adverse effects in humans: an ascending dose study. **Regul. Toxicol. Pharm.**, v. 41, p. 66 – 72, 2005.

MEYER, U. Overview of enzymes of drug metabolism. **J. Pharmacokinet Biopharm.**, v. 24, p. 449 – 459, 1996.

MORILLO, M.; LEQUART, V.; GRAND, E.; GOETHALS, G.; USUBILLAGA, A.; VILLA, P.; MARTIN, P. Synthesis of peracetylated chacotriose. **Carbohydr. Res.**, v. 334, p. 281 – 287, 2001.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 65, p. 55 – 63, 1983.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/Microsome Mutagenicity Assay. **Mutat. Res.**, v. 455, p. 29 – 60, 2000.

NAŁĘCZ-JAWECKI, G. Evaluation of the in vitro biotransformation of fluoxetine with HPLC, mass spectrometry and ecotoxicological tests. **Chemosphere**, v. 70, p. 29 – 35, 2007.

NAŁĘCZ-JAWECKI, G.; WÓJCIK, T.; SAWICKI, J. In Vitro Biotransformation of Amitriptyline and Imipramine with Rat Hepatic S9 Fraction: Evaluation of the Toxicity with Spirotox and Thamnotoxkit Ftrade mark Tests. **Arch. Environ. Con. Tox.**, 52 – 58, 2007.

NIESSEN, W. M. A.; VAN DER GREEF, J. Liquid chromatography-mass spectrometry: principles and applications. New York: Marcel Dekker, 1992.

OLIVEIRA, A. M. Farmacogenética e Farmacogenômica da biotransformação de drogas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, p. 39 – 41, 2006.

PARK, B. K.; KITTERINGHAM, N. R.; MAGGS, J. L.; PIRMOHAMED, M.; WILLIAMS, D. P. The role of metabolic activation in drug-induced hepatotoxicity. **Annu. Rev. Pharmacol.**, v. 45, p. 177 – 202, 2005.

PEREIRA, D. G. Importância do metabolismo no planejamento de fármacos. **Quim. Nova**, v. 30, p. 171 – 177, 2007.

PILOT, H. C.; DRAGAN, Y. P. Chemical carcinogens. In: Casarett & Doull's Toxicology. The Basic Science of Poisons (M. O. Amdur, J. Doull & C. D. Klaassen, 5 ed., New York/ St. Louis/San Francisco, **McGraw-Hill Inc**, p. 201 – 267, 1998.

PINTO, A. C; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidades, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 25, p. 45 – 61, 2002.

PRAMANIK, B. N.; GANGULY, A. K.; GROSS, M. L. Applied electrospray mass spectrometry. New York: Marcel Dekker, 2002.

QUIÑONES, S. L. Role of cytochrome P450 enzymes in the metabolism of antineoplastic drugs. **Rev méd de Chile**, v. 136, p. 1327 – 1335, 2008.

RAYBURN, J. R.; BANTLE, J. A.; FRIEDMAN, M. Role of carbohydrate side-chains of potato glycoalkaloids in developmental toxicity. **J. Agr. Food Chem.**, v. 42, p. 1511–1515, 1994.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, P. Farmacologia. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2003.

RENDIC, S.; DI CARLO, F. J. Human cytochrome P450 enzymes: A status report summarizing their reactions, substrates, inducers and inhibitors. **Drug Metab. Rev.**, v. 29, p. 413 – 580, 1997.

ROSENBERG, E. The potential of organic (electrospray and atmospheric pressure chemical ionisation) mass spectrometric techniques coupled to liquid-phase separation for speciation analysis. **J. Chromatogr. A**, v. 1000, p. 841 – 889, 2003.

SHIU, L. Y.; CHANG, L. C.; LIANG, C. H. Solamargine induces apoptosis and sensitizes breast cancer cells to cisplatin. **Food Chem. Toxicol.**, v. 45, p. 2155 – 2164, 2007.

SHOKEEN, P.; RAY, K.; BALA, M.; TANDON, D. Preliminary studies on activity of *Ocimum sanctum*, *Drynaria quercifolia*, and *Annona squamosa* against *Neisseria gonorrhoeae*. **Quím. Nova**, v. 22, p. 106 – 111, 1999.

SHUKLA, A. K.; FUTRELL, J. H. Tandem mass spectrometry: dissociation of ions by collisional activation. **J. Mass Spectrom.**, v. 35, p. 1069 – 1090, 2000.

SIMEÓN, S.; RÍOS, J. L.; VILLAR, A., Antimicrobial activity of *Annona cherimolia* stem bark alkaloids. **Pharmazie** vol. 45, p. 442 – 443, 1990.

SHRISVASTAVA, R. et al., Comparison of *in vivo* acute lethal potency and *in vitro* cytotoxicity of 48 chemicals. **Cells Biol. Toxicol.**, v. 8 , n. 2, p.157 – 70, 1992.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. et al. (Org). Farmacognosia: da planta ao medicamento, v. 13, p. 221– 258, 1999.

SUN, L.; ZHAO, Y.; LI, X.; YUAN, H.; CHENG, A.; LOU, H. A lysosomal-mitochondrial death pathway is induced by solamargine in human K562 leukemia cells. **Toxicol. In Vitro**, v. 24, p. 1504 – 1511, 2010.

TIOSSI, R. F. J.; MIRANDA, M. A.; SOUSA, J. P. B.; PRAÇA, F. S. G.; BENTLEY, M. V. L. B.; MCCHESENEY, J. D.; BASTOS, J. K. A Validated Reverse Phase HPLC Analytical Method for Quantitation of Glycoalkaloids in *Solanum lycocarpum* and its Extracts. **J. Anal. Chem+**, 8p, 2012.

TROUILLAS, P.; CORBIERE, C.; LIAGRE, B.; DUROUX, J. L.; BENEYTOUT, J. L. Structure-function relationship for saponin effects on cell cycle arrest and apoptosis in the human 1547 osteosarcoma cells: a molecular modelling approach of natural molecules structurally close to diosgenin. **Bioorgan. Med. Chem.**, v. 13, p.1141 – 1149, 2005.

UMBUZEIRO, G. A.; VARGAS, V. M. F. Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em potencial para mamíferos. In: Ribeiro, LR; Salvadori, DMF.; Marques, E. Editora da Ulbra. **Mutag. Amb.**, 2003.

VARELLA, S. D.; POZETTI, G. L.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenic activity of sweepings and pigments a household-wax factory assayed with *Salmonella typhimurium*. **Food Chem. Toxicol.**, v. 42, p. 2029 – 2035, 2004.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as lead for drug development. **Drug Discov. Today**, v. 3, p. 232 – 238, 1998.

WALGREN, J. L.; MITCHELL, M. D.; THOMPSON D. C. Role of metabolism in drug-induced idiosyncratic hepatotoxicity. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 35, p. 325 – 361, 2005.

WANG, S.; PANTER, K. E.; GAFFIELD, W.; EVANS, R. C.; BUNCH, T. D. Effects of steroidal glycoalkaloids from potatoes (*Solanum tuberosum*) on in vitro bovine embryo development. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 85, p. 243 – 250, 2005.

WANYONYI, A. W.; CHHABRA, S. C.; MKOJI, G.; EILERT, U.; NJUE, W. M. Bioactive steroidal alkaloid glycosides from *Solanum aculeastrum*. **Phytochemistry**, v. 59, p. 79 – 84, 2002.

WANYONYI, A. W.; CHHABRA, S. C.; MKOJI, G.; NJUE, W.; TARUS, P. K. Molluscicidal and antimicrobial activity of *Solanum aculeastrum*. **Fitoterapia**, v.74, p. 298 – 301, 2003.

WERMUTH, C. G. Designing prodrugs and bioprecursors In: The practice of medicinal chemistry. London: **Acad. Press**, p. 697 – 716, 2003.

ZEIGER, E. Mutagens that are not carcinogens: Faulty theory or fault tests? **Mutat. Res.**, v. 492, p. 29 – 38, 2001.

Article

Effects of Liver S9 Enzymes on Somalargine and Solasodine Cytotoxicity and Mass Spectrometric Fragmentation

Karina Ponsoni ¹, Maria Stella Gonçalves Raddi ^{1,*}, Daniela V. de Almeida ^{1,†}, Adélia E. Almeida and Alberto C. Alcício ^{2,†}

¹ School of Pharmaceutical Sciences, UNESP - São Paulo State University, Araraquara, SP, Brasil; E-mails: karinaponsoni@gmail.com (K.P.); raddims@fcar.unesp.br (M.S.R); dany_voalm@hotmail.com (D.V.A); almeidaa@fcar.unesp.br

² Institute of Chemistry, UNESP - São Paulo State University, Araraquara, São Paulo, Brazil; albertoalecio@gmail.com (A.A.)

[†] These authors contributed equally to this work.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: raddims@fcar.unesp.br; Tel.: +55-16-3301-5270; Fax: +55-16-3322-0072.

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: The steroidal glycoalkaloid solamargine and its parent aglycone solasodine, isolated from *Solanum palinacanthum*, were studied *in vitro* for cytotoxicity and biotransformation by the hepatic S9 fraction. The MTT uptake assay was used to determine viability after 24 h in RAW 264.7 mouse macrophage-like and SiHa cells exposed to various concentrations of the alkaloids in the presence and absence of the hepatic S9 microsomal fraction. The dose–response curves were established for solamargine and solasodine in the presence and absence of external metabolizing system. From these data the cytotoxic index (IC₅₀) was calculated with mean values of 7.2 and 13.6 µg/mL for Raw cells and 8.6 and 26.0 µg/mL for SiRa cells, respectively. Mass spectrometry was performed to compare the fragmentation patterns of the alkaloids to predict metabolism by the S9 fraction. The mass spectra demonstrated a distinct fragmentation patterns for solamargine and solasodine after the addition of the S9 fraction, but our results show that the S9 fraction does not affect cytotoxicity. In the present study we demonstrate that the cytotoxic effect of solamargine or solasodine and the hydrolytic products prepared *in vitro* by biotransformation with the S9 fraction are similar. These findings suggest that the metabolic activation system S9 fraction may fail to contribute to the biotransformation processes of solamargine and solasodine to turn these alkaloids less toxic.

Keywords: solamargine; solasodine; S9 fraction; mass spectrometry

1. Introduction

Plants of the Solanaceae family are the subject of current scientific inquiry due to their medicinal properties – naturally producing compounds that are important for human nutrition and health [1]. In this family of approximately 96 genera and 3000 species, the *Solanum* genus is the most representative, containing many fruits and vegetables commonly found in the human diet [2]. Research has shown that members of the Solanaceae family synthesize both beneficial compounds and some toxic compounds [1,3]. Glycoalkaloids, a class of nitrogen-containing steroidal glycosides, are biologically active secondary plant metabolites commonly found in plants of the *Solanum* genus [4].

The toxicity of glycoalkaloids in humans is well documented, with solanine poisoning from blighted, green, or sprouted potatoes having been reported as early as 1980 [5]. Consumption of potatoes containing high levels of glycoalkaloids is reported to cause severe illness and even death. In cases of mild glycoalkaloid poisoning symptoms include headache, vomiting, and diarrhea. Neurological symptoms have also been reported, including apathy, restlessness, drowsiness, mental confusion, rambling, incoherence, stupor, hallucinations, dizziness, trembling, and visual disturbances [4]. Glycoalkaloids are largely unaffected by food processing, including baking, cooking, and frying [6,7].

Glycoalkaloids have been the subject of a great deal of study. The literature suggests that these compounds possess several beneficial properties, such as anticancer, anti-inflammatory, antinociceptive, antipyretic, anticholesterol, antifungal, and antibacterial effects [4]. However, with the exception of extensive pharmacological studies, few studies have examined the bioavailability, metabolism and pharmacokinetics of glycoalkaloids in humans. Solanidine, a steroidal aglycone, has been detected in the sera of people who had consumed compromised potatoes [8] and in human post-mortem liver [9]. Research has also demonstrated that the clearance of glycoalkaloids usually takes more than 24 h, which implies that the toxicants may accumulate with daily consumption, and this accumulation may lead to adverse health effects [10]. Because it is not known whether the glycosides or their hydrolytic products (metabolites) are the actual toxicants, there is a need to determine whether the hydrolysis of the oligosaccharide side chains occurs in the gut by hydrochloric acid or by digestive enzymes of the stomach and liver [11].

Biotransformation, a term synonymously used with metabolism, is the chemical alteration of a substance, usually a drug, within the body by the action of enzymes [11]. Studies evaluating the *in vitro* biotransformation of xenobiotic compounds in vertebrate systems are performed in either microsomal liver systems [12] or commercially available hepatocytes isolated from various animal species or human donors [13]. Liver metabolic enzymes (S9 fraction) containing cytochrome P450 with a heme iron center, a flavoprotein dependent on the reduction and oxidation of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) (cytosolic enzyme), can be utilized in a variety of models and is being accepted as a metabolic activator for *in vitro* tests [14]. The results obtained from such tests can help with the interpretation of toxicological and clinical studies.

The introduction of new analytical techniques, especially liquid chromatography/mass spectrometry (LC/MS), has made it possible to characterize metabolites that are experimentally generated with the use of animal and human recombinant enzymes, different livers and other tissue fractions such as microsomes and slices [15]. In general, MS is considered to be one of the most universal tools for the identification and determination of xenobiotics [11].

The glycoalkaloid solamargine [(22R, 25R)-spiro-5-en-3 β -yl- α -l-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2glu)-O- α -l-rhamnopyranosyl (1 $\rightarrow$ 4glu)- β -d-glucopyranose], isolated from the fruits of *Solanum*, has been shown to be very toxic. Pharmacological studies have revealed that solamargine can exert inhibitory effects on tumor cells, including human hepatoma, colon cancer and lung cancer cells [16-18]. The hydrolysis products of glycoalkaloids have been examined in a number of biological systems and have been compared with the bioactivity of the parent glycoalkaloid. The majority of cases have reported a reduction in biological activity [19,20].

Inhibitory concentrations are often used as an indication of the difference in the cytotoxicity of xenobiotics, ignoring the possibility that the substance may change after biotransformation [21]. Focusing on the *in vitro* drug metabolism, the present research assayed the cytotoxic activities of solamargine and solasodine from *Solanum palinacanthum* against RAW 264.7 macrophage-like and SiHA cells and the mass spectrometric analysis of the alkaloids using S9 fraction.

2. Results and Discussion

The cytotoxicity of solamargine and solasodine in RAW and SiHa cells was evaluated by MTT assay, where viable cells convert MTT into a formazan salt. Both alkaloids were cytotoxic, causing a dose-dependent decrease in cell viability. As shown in Table 1, the IC₅₀ values for solamargine and solasodine confirm their potent toxicity for both cell lines being more effective than cisplatin, a cytotoxic drug used as a conventional chemotherapeutic agent. One potential mechanism explaining the higher cytotoxicity of glycoalkaloids is the complex that forms with membrane 3 β -hydroxy sterols, which results in the disruption and loss of membrane integrity [22]. Other researchers have postulated that the removal of sugars might influence the transport of these compounds across cell membranes [19].

Table 1. Solamargine (SM), solasodine (SD) and cisplatin (CIS) cytotoxic index (IC₅₀) (μ g/mL) in the presence and absence of S9 fraction for RAW cells and SiHA cells evaluated by MTT assay.

	SM	SM with S9	SD	SD with S9	CIS	CIS with S9
Raw cells	7.2 $\pm$ 0.26	13.6 $\pm$ 1.00	9.8 $\pm$ 0.35	14.8 $\pm$ 1.88	35.7 $\pm$ 3.82	11.2 $\pm$ 0.01
SiRa cells	8.6 $\pm$ 0.96	26.0 $\pm$ 2.50	13.3 $\pm$ 0.59	21.1 $\pm$ 0.23	51.6 $\pm$ 6.50*	19.2 $\pm$ 0.41*

Values are the mean $\pm$ SE of four independent experiments carried out in triplicate. * p < 0.05

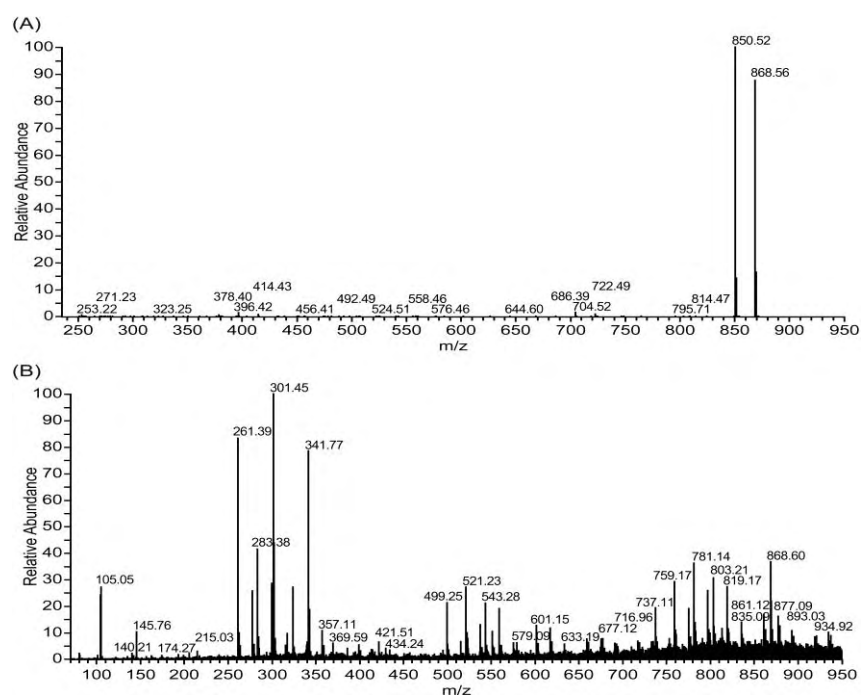
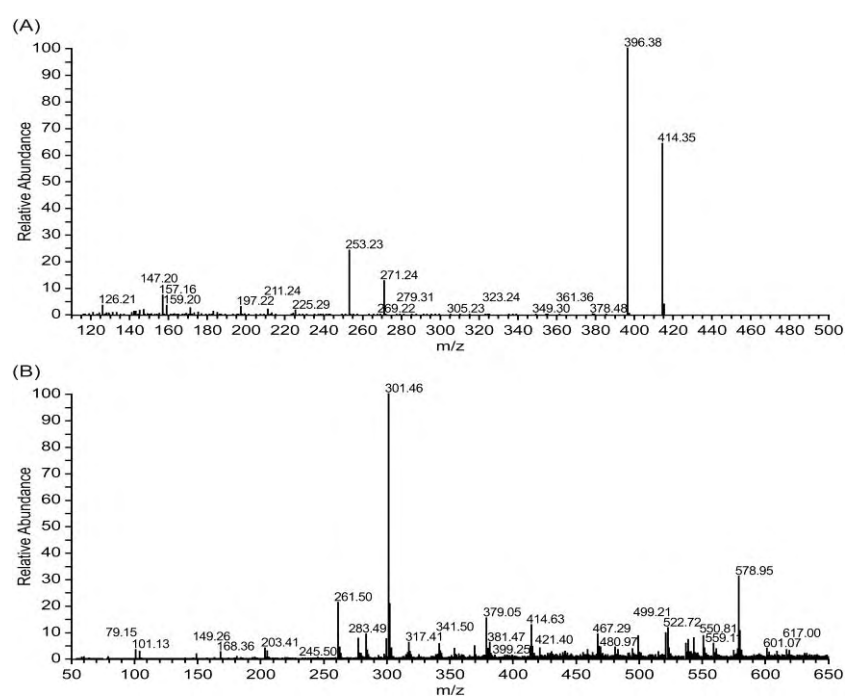
Because of the difficulties in differentiating glycoalkaloids, early poisonings by *Solanum* spp. were simply attributed to solanine present in *Solanum tuberosum*. Therefore, no investigations into the

bioavailability, metabolism, and pharmacokinetics of other *Solanum* glycoalkaloids have been performed [4]. Solamargine, a glycoalkaloid found in eggplants and other *Solanum* species, differs from the glycoalkaloids found in potatoes but only in the structure of the steroidal part of the molecule [23]. Our results show no difference between the cytotoxicity for solamargine and its parent aglycone solasodine, hence the trisaccharide side chain does not appear to be essential for this activity. Unlike potato glycoalkaloids, comparable anticancer activity was observed between aglycone solasodine and glycoalkaloid solasonine in human colon and liver cancer cells.¹⁷ Solamargine appears to kill cells by membrane disruption [24].

It is unknown whether the oligosaccharide side chains are hydrolyzed in the gut, either by hydrochloric acid or digestive stomach and liver enzymes, and whether the glycosides or the aglycones are the toxicants [25]. Studies indicate that the biotransformation of the parent glycoalkaloid into the aglycone solanidine and several unknown metabolites occurs in both the digestive tract and in other organs.¹ *In vitro* studies of metabolism-mediated cytotoxicity are evaluated through cell viability assays by including the test mixture hepatic S9 microsomal fraction. The S9 fraction (post-mitochondrial supernatant fraction) is a mixture of microsomes and cytosol. Accordingly, this fraction contains a wide variety of phase I and phase II enzymes [26]. The results from our study demonstrate that the cytotoxicity of solamargine and solasodine did not change upon incubation with the metabolizing S9 system (Table 1), which suggests that the metabolism by liver enzymes may not occur or that the hydrolytic products have the same cytotoxic activity as the parent alkaloids.

The structural changes caused by metabolic reactions clearly have an effect on the chromatographic behavior of the metabolites. The mass spectrum of solamargine performed in the mass range of m/z 50–950 in the positive mode shown in Figure 1A contains two fragments. The fragment at m/z 868 corresponds to solamargine, whereas the fragment at m/z 850 corresponds to the loss of water. The fragmentation pattern of solamargine incubated with the S9 fraction (Figure 2B) shows that the ions produced are not products of the fragmentation of the monosaccharides attached to the glycoalkaloid because there are no fragments with mass shift values that can be attributed to the loss of rhamnose (–180), and galactose (–164) moieties required to produce the aglycone solasodine.

The mass spectrum of solasodine shown in Figure 2A contains five main peaks. The m/z 414 corresponds to solasodine, and the m/z 396 corresponds to the loss of water. Three additional peaks were also identified, and their protonated molecular ions were detected at m/z 157, 253, and 271. The fragmentation patterns of the solasodine mixture after biotransformation with the S9 fraction (Figure 2B) contained three fragments at m/z 317, 379, and 381 that differed from the patterns obtained for solasodine without the S9 fraction. The MS spectrum of solasodine is dominated by a water loss ion (m/z 396) and ions from the fragmentation of the E-ring (m/z 271 and 253) and B-ring (m/z 157) as proposed by Cahill et al. [27]. This finding confirms that solamargine may not be hydrolyzed to solasodine by liver microsomes.

Figure 1. MS spectrum of (A) solamargine and (B) solamargine with S9 fraction.**Figure 2.** MS spectrum of (A) solasodine and (B) solasodine with S9 fraction.

3. Experimental Section

Chemicals

Fetal bovine serum (FBS) was purchased from Cultilab (Campinas, Brazil). S9 fraction was purchased from Molecular Toxicology Inc. (Annapolis, Maryland, USA). Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium (DMEM), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), dimethylsulfoxide (DMSO), and other chemicals of analytical grade were obtained from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Cisplatin was acquired from Tecnoplatin® 50 mg, Zodiac (lot 84696).

Plant material

The fruits of *Solanum palinacanthum* Dunal were obtained from plants grown at UNESP - São Paulo State University, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, Rodovia Araraquara/Jau Km 1, São Paulo, Brazil (21° 48' 53.39" S, 48° 12' 0.09" W), in January 2009. A voucher specimen (number 56873) was deposited at the Herbarium Rioclarense (HRCB) of UNESP - São Paulo State University, Rio Claro, SP, Brazil.

Isolation and purification of solamargine.

Air-dried and powdered fruits of *S. palinacanthum* (400.0 g) were subjected to an exhaustive extraction with ethanol (EtOH) at 1:5 (w/v) and 60 °C (4 X 24 h). Solvent was evaporated under reduced pressure, creating a crude glycoside extract (80.2 g). The extract was eluted using 5% aqueous acetic acid (v/v). After 24 h, the extract was subjected to preliminary purification by successive benzene extraction, and the pH was adjusted to 10 using ammonium hydroxide. After 24 h at room temperature, the precipitate was dried (19.4 g) and chromatographed on column chromatography-neutral aluminum oxide using aqueous ethanol 40% (v/v) as the eluent. The separation was monitored by thin-layer chromatography (TLC) analysis on silica-gel TLC plates on glass (20 × 20 cm), run with a solvent mixture composed of n-butanol : acetic acid : water (6 : 3 : 1, v : v : v), sprayed with 10% sulfuric acid solution and then heated to 150 °C for 5 min to develop the spot. Solamargine was repeatedly chromatographed and recrystallized, and its identity was verified by comparing physical and spectral data (mp, IR) with those described in the literature [28]. After recrystallization, the purified fraction produced 60 mg of pure compound that was later subjected to mass spectrometry.

Isolation of solasodine

Reflux chromatography, in which the eluent is continuously recycled by reflux, was used to obtain solasodine. Purified solamargine (0.5 mg) in 2N HCl-methanol solution was refluxed for 5 h, and the solvent was filtered and evaporated under reduced pressure. Next, the glycoalkaloid was resuspended in water, neutralized with sodium hydroxide, and subjected to reflux for 1 h. The residue was separated by filtration to produce pure solasodine (220 µg), identified by comparison (mp, TLC)

against a standard sample (courtesy of Professor M. Motidome, USP, SP, Brazil). The TLC analysis was conducted on silica-gel TLC plates on glass (20 × 20 cm), run with a solvent mixture composed of n-butanol : acetic acid : water (6 : 3 : 1, v : v : v), sprayed with 10% sulfuric acid solution and then heated to 150 °C for 5 min to develop the spot. Infrared (IR) spectroscopy was used to characterize solamargine and solasodine. The absorption data were obtained in the range 4000–400 cm⁻¹ using a Perkin-Elmer 567 spectrophotometer at room temperature. Melting points were determined on a FLUKE Mel-Temp II (Laboratory Devices, Holliston, Massachusetts, USA).

S9 fraction (metabolic activation system)

The metabolic activation system S9 fraction, prepared from the livers of Sprague–Dawley rats treated with the polychlorinated biphenyl mixture Aroclor 1254, consisted of 4% S9 fraction, 1% 0.4 M MgCl₂, 1% 1.65 M KCl, 0.5% 1 M d-glucose-6-phosphate disodium, 4% 0.1 M β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate sodium, 50% 0.2 M phosphate buffer and 39.5% sterile distilled water. The S9 fraction was added at a 10% level in DMEM.

Cytotoxicity assay

The alkaloids were stored as stock solutions at 2.0 mg/mL in DMSO. Immediately before use, serial dilutions of the stock solution with DMEM supplemented with 10% FBS and 10 mg/mL gentamicin were performed for cytotoxic assays, ranging in concentration from 6.25 µg/mL to 200 µg/mL. The final concentration of DMSO (2%) does not interfere with cell viability. Cisplatin, used as a reference, was diluted with DMEM supplemented with 10% FBS at 200 µg/mL. The test compounds were also prepared after reaction with 10% S9 fraction. The basal cytotoxicity and metabolism-mediated cytotoxicity of the alkaloids with and without the S9 system were evaluated using the MTT tetrazolium salt colorimetric assay [29]. RAW 264.7 macrophage-like (ATCC, TIB 71, Rockville, MD) and SiHA cells (ATCC HTB-35, squamous cervix cell carcinoma) were cultured in DMEM containing L-glutamine and glucose supplemented with 10% FBS and 10 mg/mL gentamicin at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO₂. RAW 264.7 or SiHA cells (1.0 × 10⁴ cells in 200 µL) were added to each well of a 96-well plastic plate (Corning Inc., Corning, NY, USA). After 72 h under consistent conditions, the medium was aspirated, and 200 µL of various concentrations of the test solution (solamargine, solasodine and cisplatin), DMSO (solvent), and unmodified medium were added to each well. After another 24 h, the plates were prepared for the MTT-tetrazolium assay. Following brief agitation, the optical density of each well was measured at 540 nm using a microplate reader (Spectra and Rainbow (Shell) Readers—Tecan, Austria). To assess the cytotoxicity with the exogenous metabolizing system (S9 fraction), the same protocol was performed with cells treated with different concentrations of alkaloids previously incubated in the presence of the activation system. Each concentration was tested in triplicate wells with appropriate controls (10% S9 fraction or DMSO). All experiments were performed at least four times using three wells for each test. The cytotoxicity data were normalized by determining the absorbance and chemical concentration. Linear regression analysis with a 95% confidence limit was used to establish the dose–response curve and to compute the chemical agent concentration needed to reduce the absorbance of the MTT by 50%, which

is the cytotoxic index (CI₅₀). The results are expressed as the means $\pm$ SD (standard deviation). A one-way analysis of variance (ANOVA) was performed to calculate the difference between treatment averages. Statistical significance was established at $p < 0.05$.

Spectral analysis

Solamargine and solasodine mass analyses were performed with and without the S9 fraction by electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) using an LCQ Fleet MS detector (Thermo Scientific). Standards and samples were dissolved in methanol containing, acetic acid (0.1% v/v) and formic acid (0.1% v/v) and injected into the LCQ Fleet with a syringe pump that delivers samples at a flow rate of 10 mL/min onto an electrospray interface operating in positive mode. The interface was set to the following conditions for analysis: 5 kV spray voltage, capillary temperature of 275 °C, 20 V capillary voltage, 100 V tube lens voltage, and a nebulizer gas flow (nitrogen) of 6 in arbitrary units. The fragmentation patterns were obtained in full scan with m/z between 50-950 for solamargine and 50-650 for solasodine.

4. Conclusions

Although *in vitro* experimental models can never resemble the complexity of a whole organism, in the present study we demonstrate that the cytotoxic effect of solamargine or solasodine and the hydrolytic products prepared *in vitro* by biotransformation with the S9 fraction are similar in RAW 264.7 macrophage-like and SiHA cells. These findings suggest that hepatic S9 microsomal fraction may fail to contribute to the overall transformation processes of solamargine and solasodine to turn these alkaloids less toxic.

Conflict of Interest

The authors declare no conflict of interest.

References and Notes

1. Freedman, M. Potato glycoalkaloids and metabolites: roles in the plants and in the diet. *J. Agric. Food Chem.* **2006**, *54*, 8655-8681.
2. Wink, M. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* **2003**, *64*, 3-19.
3. Friedman, M.; Kozukue, N.; Harden, L. Structure of the tomato glycoalkaloid tomatidenol-3- β -glucotetraose (dehydrotomatine). *J. Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 1541-1547.
4. Milner, S. E.; Bruton, N. P.; Jones, P. W.; O'Brien, N. M.; Collins, S. G.; Maguire, A. R. Bioactivities of glycoalkaloids and their aglycones from *Solanum* species. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 3454-3484.
5. Langkilde, S.; Schoder, M.; Stewart, D.; Meyer, O.; Conner, S.; Davies, H.; Poulsen, M. Acute toxicity of high doses of the glycoalkaloids, α -solanine and α -chaconine, in Syrian golden hamster. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 8753-8760.

6. Friedman, M.; Dao, L. Distribution of glycoalkaloids in potato plants and commercial potato products. *J. Agric. Food Chem.* **1992**, *40*, 419-423.
7. Friedman, M.; Levin, C. E. R-Tomatine content in tomato and tomato products determined by Hplc with pulsed amperometric detection. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 1507-1511.
8. Harvey, M. H.; McMillan, M.; Morgan, M. R. A.; Chan, W. H. S. Solanidine is present in serum of healthy individuals and in amounts dependent on their dietary potato consumption. *Hum. Toxicol.* **1985**, *4*, 187-194.
9. Claringbold, W. D. B.; Few, J. D.; Renwick, J. H. Kinetics of retention of solanidine in man. *Xenobiotica* **1982**, *12*, 393-302.
10. Menssinga, T. T.; Sips, A. J. A. M.; Rompelberg, C. J. M.; van Twillert, K.; Meulenbelt, J.; van den Top, H. J.; van Egmond, H. P. Potato glycoalkaloids and adverse effects in humans: an ascending dose study. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **2005**, *41*, 66-72.
11. Holcapek, M.; Kolarova, L.; Nobilis, M. High-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 59-78.
12. Guengerich, F. P. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* **2001**, *14*, 611-650.
13. Pelkonen, O.; Raunio, H. In vitro screening of drug metabolism during drug development: can we trust the predictions? *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* **2005**, *1*, 49-59.
14. Barile, F. A. *Introduction to in vitro cytotoxicology: mechanisms and methods*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1994; 222 p.
15. Baranczewski, P.; Stanczak, A.; Kautiainen, A.; Sandin, P.; Edlund, P. O. Introduction to early *in vitro* identification of metabolites of new chemical entities in drug discovery and development. *Pharmacol. Rep.* **2006**, *58*, 341-352.
16. 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. *Biochem. Pharmacol.* **2000**, *60*, 1865-1873.
17. Lee, K. R.; Kozukue, N.; Han, J. S.; Park, J. H.; Chang, E. Y.; Baek, E. J.; Chang, J. S.; Friedman, M. Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HepG2) cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 2832-2839.
18. 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 Lett.* **2004**, *577*, 67-74.
19. Rayburn, J. R.; Bantle, J. A.; Friedman, M. Role of carbohydrate side-chains of potato glycoalkaloids in developmental toxicity. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, *42*, 1511-1515.
20. Chang, L. C.; Tsai, T. R.; Wang, J. J.; Lin, C. N.; Kuo, K. W. The rhamnose moiety of solamargine plays a crucial role in triggering cell death by apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *242*, 21-25.
21. Chambers, J. E.; Carr, R. L. Biochemical mechanisms contributing to species differences in insecticidal toxicity. *Toxicol.* **1995**, *105*, 291-304.

22. Keukens, E. A.; de Vrije, T.; van den Boom, C.; de Waard, P.; Plasman, H. H.; Thiel, F.; Chupin, V.; Jongen, W. M.; de Kruijff, B. Molecular basis of glycoalkaloid induced membrane disruption. *Biochim. Biophys. Acta* **1995**, *1240*, 216-228.
23. Blankemeyer, J. T.; McWilliams, M. L.; Rayburn, J. R.; Weissenberg, M.; Friedman, M. Developmental toxicology of solamargine and solasonine glycoalkaloids in frog embryos. *Food Chem. Toxicol.* **1998**, *36*, 383-389.
24. van der Most, R. G.; Himbeck, R.; Aarens, S.; Carter, S. J.; Larma, I.; Robinson, C.; Currice, A.; Lake, R. A. Antitumor efficacy of the novel chemotherapeutic agent coramsine is potentiated by cotreatment with CpG-containing oligodeoxynucleotides. *J. Immunother.* **2006**, *29*, 134-142.
25. Friedman, M.; Lee, K. R.; Kim, H. J.; Lee, I. S.; Kozukue, N. Anticarcinogenic effects of glycoalkaloids from potatoes against human cervical, liver, lymphoma, and stomach cancer cells. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, *53*, 6162-6169.
26. Xiaodong L.; Lee, J. The conduct of drug metabolism studies considered good practice (II): *in vitro* experiments. *Curr. Drug Metab.* **2007**, *8*, 822-829.
27. Cahill, M. G.; Caprioli, G.; Vittori, S.; James, K. Elucidation of the mass fragmentation pathways of potato glycoalkaloids and aglycons using Orbitrap mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2010**, *45*, 1019-1025.
28. Fukuhara, K.; Kubo, I. Isolation of steroidal glycoalkaloids from *Solanum incanum* by two countercurrent chromatographic methods. *Phytochemistry* **1991**, *30*, 685-687.
29. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55-63.