UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas no
carreamento de extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* e
avaliação biológica *in vitro* em células de câncer de bexiga**

Ivana Pereira Santos Carvalho

Ribeirão Preto
2016

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas no
carreamento de extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* e
avaliação biológica *in vitro* em células de câncer de bexiga**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do título
mestre em Ciências.

Área de concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientada: Ivana Pereira Santos Carvalho

Orientadora: Prof^a Dr^a Priscyla Daniely
Marcato Gaspari

Ribeirão Preto

2016

LOMBADA

CARVALHO, I. P. S.	Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas no carreamento de extrato alcaloídico de <i>Solanum lycocarpum</i> e avaliação biológica <i>in vitro</i> em células de câncer de bexiga	Espaço de 2,5 cm reservado para etiqueta de localização da biblioteca	MESTRADO FCFRP-USP 2016
-----------------------	--	---	---------------------------------------

FICHA CATALOGRÁFICA

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

Carvalho, Ivana Pereira Santos.

Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas no carregamento de extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* e avaliação biológica *in vitro* em células de câncer de bexiga. Ribeirão Preto, 2016.

83p.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Gaspari, Priscyla Danielly Marcato.

1. Glicocalcalóides. 2. Nanopartículas lipídicas sólidas 3. Câncer de bexiga.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ivana Pereira Santos Carvalho

Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas no carreamento de extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* e avaliação biológica *in vitro* em células de câncer de bexiga.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos.

Orientador(a): Profa Dr^a Priscyla Daniely
Marcato Gaspari.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

**Dedico este trabalho à minha
família, especialmente aos meus
pais Luiz e Rita e ao meu irmão
Júnior.**

**“Não tenha medo de cometer erros.
Tenha medo de não aprender com eles.”
Peter Jones**

AGRADECIMENTOS

Á Deus e à minha família que mesmo de longe sempre me apoiaram e me deram forças para prosseguir.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP) pela infraestrutura e acolhimento.

As agencias de fomento: Capes, Cnpq e Fapesp (Proc. No. 2014/ 16727-0) pela bolsa concedida.

A todos os funcionários que auxiliaram de forma técnica e administrativa o desenvolvimento do trabalho.

À Professora Doutora Priscyla Daniely Marcato Gaspari por aceitar ser minha orientadora e confiar em mim para realização do projeto.

Aos grupos de pesquisa: Nanobiolab; Laboratório de Tecnologia Farmacêutica; Laboratório de cultivo de células e bioprocessos; Laboratório de Química Analítica; Laboratório de Farmacognosia.

RESUMO

CARVALHO, I. P. S. **Desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas no carregamento de extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* e avaliação biológica *in vitro* em células de câncer de bexiga**. 2016. 83f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Solanum lycocarpum é uma espécie brasileira conhecida por sua diversidade em glicoalcalóides (GA). Os GA solasonina (SS) e solamargina (SM), extraídos dos frutos desta planta, apresentaram propriedades antioxidantes e anticancerígenas atuando em diferentes mecanismos moleculares para a terapia do câncer. No entanto, a baixa solubilidade em água destas moléculas e a sua toxicidade limita a aplicação destes glicoalcalóides. Desta forma, o desenvolvimento de uma formulação nanoestruturada contendo GA pode possibilitar a sua aplicação clínica na terapia do câncer de bexiga (CB). Assim, este projeto visa o desenvolvimento e caracterização de carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) como sistemas de carregamento do extrato alcaloídico de *S. Lycocarpum* (EA), rico em GA, e avaliação da citotoxicidade *in vitro* em células de câncer de bexiga. Os CLN foram preparadas pelo método de emulsão à quente e sonicação e otimizados utilizando um planejamento fatorial 2³. No planejamento avaliou-se a influência de três variáveis independentes: tipo e quantidade de lipídio e tipo de surfactante nos fatores de resposta diâmetro e índice de polidispersão (PdI). CLNs foram caracterizadas de acordo com diâmetro médio, distribuição de tamanho e potencial zeta por espalhamento dinâmico de luz (DLS), índice de recristalização (IR) por calorimetria exploratória diferencial (DSC), porcentagem da eficiência de encapsulamento (EE%) por LC-MS/MS, avaliação morfológica por microscopia de força atômica (AFM), distribuição e concentração de nanopartículas por análise de rastreamento de nanopartículas (NTA), perfil de liberação do EA encapsulado em CLN pelo ensaio de perfil de liberação *in vitro* em células de Franz, e estabilidade ao longo do tempo. A citotoxicidade dos glicoalcalóides foi avaliada pelo ensaio de captura do corante de vermelho neutro utilizando células de câncer de bexiga (RT4). As células foram tratadas com EA livre e encapsulado no CLN nas concentrações de 5 µg/mL à 20 µg/mL, assim como CLN vazia no período de 24h e 48h e foram calculadas suas respectivas concentrações inibitórias médias (IC₅₀). O CLN desenvolvido apresentou tamanho inferior a 80 nm e potencial zeta negativo. O PdI foi inferior a 0,2 indicando uma baixa polidispersão. O CLN foi estável por 60 dias em relação ao tamanho, PdI e potencial zeta. O índice de recristalização (IR) do CLN com EA foi 47,23%, indicando uma estrutura menos cristalina do lipídio no CLN que propicia uma alta eficiência de encapsulamento de SS (86%) e SM (89,1%) e evita a expulsão dos ativos durante a estocagem. Os CLNs apresentaram-se semiesféricas como observado por AFM. A concentração de partículas, medida por NTA, foi de 9,74x 10¹¹ partículas/mL e o diâmetro médio foi de 125 nm. Os glicoalcalóides presentes no EA encapsulado em CLN apresentam perfil de liberação *in vitro* sustentado após 36 h de liberação em condição “sink”. O mecanismo de liberação dos GA foram diferentes, sendo que para o SS foi não-fickano enquanto que o SM foi fickano. O EA livre e encapsulado (CLN-EA) foi citotóxico frente células RT4, sendo que o CLN-EA foi mais citotóxico que o EA livre após 48h de tratamento. O IC₅₀ das CLN-EA, após 24h de tratamento, foi de 15,94 µg.mL⁻¹ e 12,35 µg.mL⁻¹ após 48 h de tratamento. Esta redução no valor do IC₅₀ está relacionada ao perfil de liberação dos glicoalcalóides SS e SM das nanopartículas. Os resultados demonstraram que a CLN desenvolvida é um sistema interessante para encapsular EA com potencial para futura terapia do câncer de bexiga.

Palavras-chave: Extrato alcaloídico; carreador lipídico nanoestruturado, citotoxicidade; *Solanum lycocarpum*.

ABSTRACT

CARVALHO, I. P. S. **Development of solid lipid nanoparticles in loading alcaloídico extract of *Solanum Lycocarpum* and biological evaluation in vitro in bladder cancer cells.** 2016. 83f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Solanum lycocarpum is a native species of the Brazilian savannah known for its diversity in glycoalkaloids (GA). The GA solasonine (SS) and solamargine (SM), extracted from the fruits of their plant, have antioxidant and antitumoral activity; acting on different molecular mechanisms interesting for cancer therapy. However, the low water solubility of these molecules and their toxicity limits their application. Thus, the development of a nanostructured formulation containing these glycoalkaloids may allow their clinical application in bladder cancer therapy (BC). Thus, this project aims at the development and characterization of nanostructured solid lipid (NLC) as carrier systems of alkaloidic extract of *S. lycocarpum* (AE), rich in GA, and their cytotoxic evaluation in order to obtain a nanostructured system for future intravesical therapy of bladder cancer. The NLC were prepared by the emulsion and sonication method and optimized using a factorial design 2^3 . The influence of three independent variables was evaluated as type and amount of lipid and type of surfactant in response factors diameter and polydispersity index (PdI). NLCs were characterized according to average diameter, size distribution and zeta potential by dynamic light scattering (DLS), recrystallization index (RI) by differential scanning calorimetry (DSC), percentage of encapsulation efficiency (EE%) by LC MS/MS, morphological analysis by atomic force microscopy (AFM), distribution and concentration of nanoparticles by nanoparticle tracking analysis (NTA), the in vitro release profile of GA from NLC was done by Franz's cells diffusion, and stability over time by DLS. Cytotoxicity assay was evaluated by neutral red uptake assay in bladder cancer cells (RT4). Cells were treated with different concentrations of GA free and encapsulated in NLC (5-40 $\mu\text{g/mL}$) and empty NLC for 24h, 48h and 72h. The NLC developed showed diameter smaller than 80 nm and zeta potential of -9.26 mV. The PdI was less than 0.2 indicating dispersion with low polydispersity. The NLC was stable for 60 days regarding to size, PdI and zeta potential. Recrystallization index (RI) of NLC-AE was 47.23%, indicating a less crystalline structure of the lipid in the particle, which provides high encapsulation efficiency of SS (86%) and SM (89.1%). This low RI prevents the expulsion of GA from NLC during the storage. NLCs exhibited semi-spherical form as observed by AFM. The particles concentration, measured by NTA, was 9.74×10^{11} particles/mL and the diameter was about 125 nm. The GA present in NLC-AE showed an *in vitro* sustained release profile after 36 h of release in a *sink* condition. The release mechanisms of SS and SM were different. The release mechanism of SS was non-Fickian while SM was Fickian. The AE free and NLC-AE was cytotoxic to RT4 cells, and the NLC-AE was more cytotoxic than the AE free after 48 hours of treatment. The IC_{50} of NLC-AE, after 24 hours of treatment, was $15.94 \mu\text{g.mL}^{-1}$ and $12.35 \mu\text{g.mL}^{-1}$ after 48 h of treatment. This reduction in IC_{50} value can be related to the release profile of the GA (SS and SM) of the nanoparticles. The results demonstrate that NLC developed is an interesting system to encapsulate AE with potential for future therapy of bladder cancer.

Keywords: alkaloidic extract (AE); Nanostructured lipid carrier, cytotoxicity; *Solanum lycocarpum*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química da Solasonina (SS) e Solamargina (SM).	04
Figura 2: Esquematização estrutural das nanopartículas: A) CLN imperfeito, B) CLN amorfo, C) Múltiplo CLN.	08
Figura 3: Espectro de Massas obtido para: A) solasonina (SS); B) solamargina (SM).	25
Figura 4: Fragmentação da molécula de solasonina (SS) por ESI.	26
Figura 5: Fragmentação da molécula de solamargina (SM) por ESI.	26
Figura 6: Perfis cromatográficos dos glicoalcalóides: A) solasonina (SS); B)e solamargina (SM); C) filtrado de CLN vazia.	27
Figura 7: Curva analítica referente à: A) solasonina (SS); B) e solamargina (SM) com seus respectivos gráficos de resíduos.	28
Figura 8: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados nos fatores resposta: A) diâmetro e B) PdI.	33
Figura 9: A) Perfil de distribuição de diâmetro da formulação F8 preparada com 1% de Tween 80 (curva verde) e F7, preparada com 1% de Pluronic (curva vermelha). B) Perfil de distribuição de diâmetro da formulação F3 preparada com 1,5% de Pluronic (curva vermelha) e F4 preparada com 1,5% de Tween 80 (curva verde).	35
Figura 10: A) Perfil de distribuição de diâmetro da formulação F8 preparada com 1% de Tween 80 (curva verde) e F4, preparada com 1,5% de Tween 80 (curva vermelha). B) Perfil de distribuição de diâmetro da formulação F5 preparada com 1% de pluronic (curva vermelha) e F1 preparada com 1,5% de pluronic (curva verde).	36
Figura 11: Diâmetro e índice de polidispersão (PdI) em função do tempo das nanopartículas obtidas pelo planejamento fatorial 2^3 .	38
Figura 12: A) Diâmetro e índice de polidispersão (PdI) dos CLN em função da concentração extrato alcaloídico de <i>Solanum lycocarpum</i> (EA); B) Potencial zeta dos CLN em função da concentrações do EA.	40
Figura 13: Distribuição de diâmetro do CLN-EA com 250µg/mL do extrato alcaloídico de <i>Solanum lycocarpum</i> (EA) (curva vermelha) e CLN-EA com 750 µg/mL de EA (curva verde).	40
Figura 14: Perfil de distribuição de tamanho dos CLN com extrato alcaloídico de <i>Solanum lycocarpum</i> (EA) (curva verde) e dos CLN sem EA (curva vermelha).	41

Figura 15: A) Diâmetro e PDI da CLN em função do tempo; B) Potencial zeta da CLN em função do tempo.	42
Figura 16: Perfil de diâmetro e potencial zeta dos CLN-EA em função do pH.	43
Figura 17: Termogramas do extrato alcaloídico de <i>Solanum lycocarpum</i> (EA), Manteiga de Illipê (MI), Carreador lipídico nanoestruturado (CLN) vazio e com EA (CLN-EA).	44
Figura 18: Perfil 3D da distribuição de diâmetro de CLN vazio (A) e CLN com extrato alcaloídico de <i>Solanum lycocarpum</i> (EA) (B) e perfil 2D de distribuição de diâmetro de CLN vazio (C) e CLN-EA (D).	46
Figura 19: Imagem topográfica em 3D de AFM de CLN-EA.	47
Figura 20: Perfil de liberação <i>in vitro</i> de solanonina (SS) e solamargina (SM) encapsulados em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) em função do tempo.	48
Figura 21: Curva analítica da mucina.	51
Figura 22: Coloração de amostras: A) carreador lipídico nanoestruturado (CLN) após interação com 0,5mg/mL mucina e reação de PAS; B) CLN após interação com 0,25 mg/mL de mucina e reação de PAS; C) CLN sem adição de mucina e após a reação de PAS.	51
Figura 23: Perfil de distribuição do diâmetro da CLN-mucina (curva em vermelho) e solução de mucina as 25mg/ml (curva em verde).	52
Figura 24: Viabilidade de células RT4 tratadas com diferentes concentrações do extrato alcaloídico de <i>Solanum lycocarpum</i> (EA). CN: controle negativo (célula + meio de cultura), CP: controle positivo (10% DMSO).	54
Figura 25: Foto das células RT4 em aumento de 10x após 24 horas de tratamento nas concentrações 5 µg/mL (A); 12 µg/mL (B) e 20 µg/mL (C).	54
Figura 26: Viabilidade de células RT4 tratadas com extrato alcaloídico de <i>Solanum lycocarpum</i> (EA) livre e encapsulado em CLN (CLN-EA).	56
Figura 27: Viabilidade células tratadas com CLN vazia nas mesmas diluições das concentrações utilizadas para CLN-EA.	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Variáveis utilizadas no planejamento fatorial 2^3 .	14
Tabela 2: Composição das nanopartículas lipídicas sólidas pelo planejamento Fatorial 2^3 .	14
Tabela 3: Gradiente de polaridade da fase móvel do método analítico desenvolvido.	18
Tabela 4: Modelos matemáticos de cinética de liberação usados na avaliação o perfil de liberação de SS e SM na CLN.	22
Tabela 5: Exatidão (%) e Precisão (CV%) para solasonina (SS) e solamargina (SM).	29
Tabela 6: Matriz do Planejamento Fatorial 2^3 .	30
Tabela 7: Análise de variância das interações das variáveis: tipo de lipídio, tipo de surfactante e porcentagem de surfactante no fator resposta Diâmetro.	31
Tabela 8: Análise estatística das interações das variáveis tipo de lipídio, tipo de surfactante e porcentagem de surfactante no fator resposta PdI.	32
Tabela 9: Análise estatística dos efeitos principais e secundários do fator resposta Diâmetro.	34
Tabela 10: Análise estatística dos efeitos principais e secundários do fator resposta PdI.	34
Tabela 11: Diâmetro médio, índice de polidispersão (PdI) e potencial zeta das NLS com e sem extrato alcaloídico de <i>Solanum lycocarpum</i> (EA) com respectivos desvios padrão (n=3).	41
Tabela 12: Valores de entalpia, ponto de fusão e índice de recristalização do CLN com e sem extrato alcaloídico de <i>Solanum lycocarpum</i> (EA) e do lipídio sólido manteiga de Illipê (MI).	45
Tabela 13: Coeficientes de correlação ajustado (R^2 adj) de análise de dados da cinética de liberação da solasonina (SS) e solamargina (SM) encapsulados em CLN.	49
Tabela 14: Valores de IC_{50} do extrato alcaloídico de <i>Solanum lycocarpum</i> (EA) livre e encapsulado em CLN com diferentes tempos de tratamento.	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CB	Carcinoma de bexiga urinária
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
BCG	Bacilo Calmette-Guerin
ESI	Electrospray
SS	Solasonina
SM	Solamargina
EA	Extrato alcaloídico de <i>Solanum lycocarpum</i>
IC ₅₀	50% da concentração inibitória máxima
TNF	Fator de necrose tumoral
NLS	Nanopartícula lipídica sólida
CLN	Carreador lipídico nanoestruturado
MI	Manteiga de Illipê
MM	Miristato de miristila

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas e siglas	vi
1.INTRODUÇÃO	01
1.1 Carcinoma de bexiga urinária (CB)	01
1.2 Bioprospecção de metabólitos vegetais e descoberta de substâncias bioativas	02
1.3 Glicoalcalóides: Solasonina e Solamargina.....	03
1.4 Nanopartículas Lipídicas Sólidas.....	06
2. OBJETIVOS	10
2.1 Objetivo geral	10
2.2 Objetivos específicos	10
3. MATERIAIS E MÉTODOS	11
3.1 MATERIAIS	11
3.1.1 Matérias-primas e Reagentes	11
3.1.2 Equipamentos	12
3.2 MÉTODOS	13
3.2.1 Obtenção das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)	13
3.2.1.1 Método de preparação das NLS	13
3.2.1.2 Planejamento Experimental para escolha da NLS	13
3.2.2 Distribuição de tamanho das partículas e Potencial Zeta	15
3.2.3 Avaliação do ph no diâmetro e potencial zeta	15
3.2.4 Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	16
3.2.5 NTA	16
3.2.6 AFM	16
3.2.7 Análise da Eficiência de Encapsulamento (EE)	16
3.2.7.1 Método analítico de quantificação dos glicoalcalóides	17
A.Seletividade	18
B.Linearidade	18
C. Limite de detecção e Limite de quantificação	19

D. Exatidão	19
E. Precisão	19
3.2.8 Ensaio de liberação <i>in vitro</i> do extrato alcaloídico	20
3.2.8.1 Escolha da solução receptora	20
3.2.8.2 Perfil de liberação de EA	20
3.2.8.3 Modelos matemáticos de cinética de liberação de fármacos	21
3.2.9 Ensaio de Mucoadesão <i>in vitro</i>	22
3.2.10 Citotoxicidade em Células de câncer de Bexiga	23
3.2.10.1 Cultivo das Células	23
3.2.10.2 Ensaio de captura do corante vermelho neutro	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
4.1 Avaliação do método analítico de quantificação de glicoalcalóides por LC-MS/MS.....	25
4.2 Obtenção das Nanopartículas	29
4.3 Caracterização dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN)	38
4.3.1 Otimização da concentração do extrato alcaloídico (EA) encapsulado	39
4.3.2 Avaliação do pH no diâmetro e potencial zeta	42
4.3.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)	43
4.3.4 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)	45
4.3.5 Microscopia de força atômica AFM	46
4.3.6 Avaliação do perfil de liberação <i>in vitro</i> do extrato alcaloídico de <i>Solanum lycocarpum</i> (EA)	47
4.3.7 Ensaio de mucoadesão <i>in vitro</i>	49
4.3.8 Citotoxicidade <i>in vitro</i> do EA livre e encapsulado em CLN em células de câncer de bexiga	53
5. CONCLUSÕES	58
6. REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma de bexiga urinária (CB)

O carcinoma da bexiga urinária (CB) é a segunda doença maligna mais comum do trato urinário (REIS et al., 2012). No Brasil estima-se o aparecimento de 7200 novos casos de câncer de bexiga para 2016 sendo que 3642 óbitos/ano decorrem deste tipo de câncer (INCA 2016). O CB é classificado como não-invasivo quando se desenvolve e se mantém na parede do urotélio e músculo-invasivo quando se distribui na lâmina própria ou na camada muscular da bexiga (ROCKENBACH et al., 2013; TAN et al., 2016). Mais de 70% da incidência de CB é superficial (pTa e pT1), tumor não-invasivo, e a ocorrência de uma doença invasiva é ocasional. Contudo, 50% dos tumores não-músculo invasivos recorrem em 4 anos após o tratamento e 11% evoluem para o fenótipo invasivo. Além disso, em geral, há 70% de recorrência pós-tratamento exclusivo com ressecção transuretral (RTU) (SHELLEY; MASON; KYNASTON, 2010; SHIMADA et al., 2011).

O tratamento do CB depende do grau de evolução da doença. Em casos mais avançados, pode-se optar pela cistectomia parcial ou radical que compreendem a retirada parcial ou completa da bexiga. No CB, caracterizado por lesões superficiais, o tratamento é realizado pela instilação intravesical do bacilo Calmette-Guerin (BCG) (TRABOULSI & KASSOUF, 2016). O tratamento com BCG foi inicialmente proposto por Morales et al. (1976) e desde então, utilizado como imunoterapia de escolha por apresentar melhores resultados (HERR; DALBAGNI; DONAT, 2011). No entanto, o uso desses organismos vivos ou atenuados causam efeitos colaterais, presentes em mais de 90% dos pacientes tratados com BCG. Os sintomas vão desde irritação leve do trato urinário até óbito, passando por complicações graves como instabilidade hemodinâmica, febre persistente ou reações alérgicas, comprometendo a utilização do BCG (SHELLEY; MASON; KYNASTON, 2010; TRABOULSI & KASSOUF, 2016).

Alguns quimioterápicos como a doxorrubicina e a cisplatina são utilizados como alternativa à instilação intravesical de BCG, apesar das altas taxas de recorrência após o tratamento (cerca de 80%). No caso de tumores superficiais, a administração sistêmica de quimioterápicos não é indicada, pois estes tumores estão localizados perto da superfície do urotélio que é pouco vascularizada (TSALLAS; JACKSON; BURT, 2011; TAN et al., 2016). Assim, a terapia intravesical com quimioterápicos é mais indicada, pois a administração do fármaco no local de ação pode aumentar a eficácia farmacológica e diminuir a dose necessária

para a obtenção do efeito desejado bem como diminuir os efeitos adversos (CAPAZ; SABAN; BONAMINI, 1988).

A bexiga é um órgão de fácil acesso e adequado para terapia local. Por esta via é possível expor a área lesionada (bexiga/tumores) diretamente ao fármaco e a quantidade de fármaco administrado pode ser facilmente controlada (ADIYAT; KATKOORI; SOLOWA, 2010). Entretanto, os medicamentos são constantemente removidos do urotélio devido ao esvaziamento e preenchimento periódico da urina na bexiga. São necessárias varias administrações por dia que podem ocasionar dor local e infecções que se agravar com o número de administrações. Outro desafio é a baixa permeabilidade do urotélio que é devido às células guarda-chuva superficial (altamente diferenciadas) que são caracterizadas pela sua alta resistência transepitelial (10000 a $75000 \Omega \text{ cm}^2$) (MUGABE et al., 2012; KURTOVA & CHAN, 2016).

Em função dos obstáculos desta via de administração, algumas estratégias têm sido desenvolvidas, como por exemplo, a nanotecnologia que possibilita a acumulação de fármaco de forma específica no estroma tumoral e a internalização dos mesmos pelas células cancerosas, através de agentes terapêuticos nanoencapsulados, para tornar a ação sítio seletiva e minimizar a internalização inespecífica e os efeitos adversos nocivos (MASTER & SENGUPTA, 2012). Ademais, os nanocarreadores podem aumentar a penetração do fármaco no urotélio, seu tempo de permanência na bexiga e apresentar uma liberação sustentada, o que possibilita diminuir o número de administrações.

Outra estratégia para aumentar a eficácia terapêutica do CB é a utilização de produtos naturais provenientes de metabolismo secundário de plantas. Dentre estes compostos estão os glicoalcalóides solasonina e a solamargina que apresentam propriedades interessantes para o combate do câncer como ação apoptótica, inibição da proliferação celular entre outras (WU et al., 2011; MUNARI et al., 2012; KENNY et al., 2013).

1.2 Bioprospecção de metabólitos vegetais e a descoberta de substâncias bioativas

Os vegetais têm sido utilizados na profilaxia e no tratamento de doenças que acometem os seres humanos desde os primórdios da civilização. Nos dias atuais sabe-se que isso se deve as substâncias sintetizadas pelas plantas, principalmente os metabólitos secundários. Cerca de 70% fármacos anticâncer aprovados pelo FDA são originados de plantas sendo a identificação de compostos bioativos uma área ativa na indústria farmacêutica (NEWMAN, 2008; CRAGG & NEWMAN, 2012).

O principal objetivo da bioprospecção é descobrir novas moléculas que sejam biologicamente ativas, bem como investigar a possibilidade de usá-las como protótipos para sintetizar análogos estruturais com propriedades farmacológicas mais eficientes (MONTANARI & BOLZANI, 2001; NEWMAN, 2008). Atualmente, existe uma tendência multidisciplinar visando o desenvolvimento de novos fármacos. Inicia-se tal estratégia pela bioprospecção de substâncias naturais bioativas, extraídas principalmente de plantas ou de microrganismos, seguida pela obtenção de seus análogos estruturais, o que pode ser realizado por métodos sintéticos ou biotecnológicos e que culmina com a avaliação de suas atividades farmacológicas, toxicológicas e determinação do mecanismo de ação (AMBRÓSIO et al., 2006; TIRAPELLI et al., 2008).

Os produtos naturais ainda desempenham um papel fundamental para o provimento de substâncias úteis ao tratamento de doenças em seres humanos e em animais mesmo com todas estas dificuldades (NEWMAN, 2008). Como exemplo, podemos citar o NCI (National Cancer Institute, USA) que tem avaliado mais de 50.000 extratos de plantas para a atividade anti-HIV e mais de 33.000 para a atividade anti-tumoral, além de diversos quimioterápicos eficazes como a vimblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®) e taxol (paclitaxel; Taxol®) que tiveram suas origens a partir do metabolismo secundário vegetal (TIRAPELLI et al., 2008; BIOACTIVE, 2016).

Baseado nestes exemplos de sucesso, a indústria farmacêutica aplica altos investimentos em pesquisas de bioprospecção, mesmo tendo em conta que a pesquisa de novos fármacos é um mercado de alto risco (NEWMAN, 2008). No Brasil, as pesquisas com plantas ainda encontram-se centradas principalmente nas universidades e os resultados obtidos tem contribuído, de forma significativa, para o descobrimento de substâncias farmacologicamente promissoras (MONTANARI & BOLZANI, 2001; ANTANASOV et al., 2015).

1.3 Glicoalcalóides: Solasonina e Solamargina

Solanum lycocarpum A. St.-Hil. (Solanaceae), também conhecido como fruto do lobo ou lobeira, é uma espécie nativa do Cerrado brasileiro pertencente ao gênero *Solanum*, que é conhecida por sua produção e diversidade em heterosídeos alcaloídicos, também conhecidos como glicoalcalóides (HARRISON, 1990, CHAM, 1994). Esses glicoalcalóides têm sido estudados quanto ao seu potencial antitumoral (CHAM; GILLIVER; WILSON, 1987; KUO et al., 2000; LEE et al., 2004, PUNJABI et al., 2008). Os glicoalcalóides extraídos majoritariamente dos frutos da espécie nativa *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. são a

solasonina e solamargina (HARRISON, 1990; YOSHIKAWA et al., 2007; MUNARI et al., 2012).

A solasonina e solamargina apresentam o mesmo núcleo esteroidal, a solasodina, porém diferenciam-se pela cadeia de açúcares associada à posição 3 do carbono deste núcleo (Figura 1). A solamargina é constituída por duas unidades de ramnose ligadas aos carbonos 2' e 4' da glicose e a solasonina composta por unidades de ramnose e glicose ligadas nas posições 2' e 3' da galactose, respectivamente (FEWELL; RODDICK; WEISSENBERG, 1994; BLANKEMEYER et al., 1998; TSIMOGIANNIS et al., 2007).

Figura 3. Estrutura química da Solasonina e Solamargina

Esses glicoalcalóides, solasonina e solamargina, foram avaliados *in vitro* quanto aos seus potenciais citotóxicos frente células de tumores de pele (A431, SCC4, SCC9 e SCC25) (WU et al., 2011), hepatoma (SMMC-7721 e HepG2) (DING et al., 2012), câncer de ovário (C180-135) e cervical (CHAM & DAUNTER, 1990), câncer de cólon (HT29) (LEE et al., 2004), osteosarcoma (U2OS) (LI et al., 2011) e câncer de mama (Bcap-37) (LI et al., 2016). Em estudos *in vitro* com linhagens de células de câncer de pulmão (H441, H520, H661 e H69), solamargina apresentou atividade citotóxica superior aos fármacos paclitaxel, cisplatina, etoposido e gencitabina (LIU et al., 2004). Ademais, também foi relatado por LIANG et al. (2008), que solamargina tem excelente atividade sinérgica com os fármacos antitumorais transtuzumabe e epirrubicina, inibindo a proliferação celular das linhagens H661 e H69 (WU et al., 2011). TIOSSI et al. (2014) desenvolveram uma formulação tópica contendo os glicoalcalóides extraídos da *Solanum lycocarpum* (solasonina e solamargina) e

verificaram que esta formulação tem potencial para o tratamento de câncer de pele já que houve a permeação cutânea dos dois glicoalcóides em camadas mais profundas da pele. MUNARI et al. (2012) verificaram o efeito antitumoral *in vivo* da solasonina e solamargina em modelo de câncer de cólon. Desta forma, os estudos pré-clínicos e clínicos dos glicoalcalóides SS e SM para diferentes tipos de câncer em humanos e em animais apresentaram resultados antineoplásicos satisfatórios quando administrado por via intravenosa, oral ou tópica, indicando o potencial destes compostos.

Com relação à atividade antitumoral da solamargina e solasonina, existem três hipóteses sobre seus possíveis mecanismos de ação, sendo que a primeira refere-se à interação de receptores de lectinas presentes na membrana celular de células tumorais com as cadeias de açúcares desses compostos (PUNJABI et al., 2008). Segundo CHANG et al. (1998) e CHAM (2007), as ramnoses presentes na solamargina e solasonina estão diretamente ligadas à atividade antitumoral destes compostos. A solamargina apresenta duas ramnoses sendo mais ativa que a solasonina, que apresenta apenas uma ramnose. A aglicona solasodina, que não possui cadeia de açúcar, não apresenta atividade antitumoral.

A segunda hipótese sugere que os heterosídeos alcaloídicos se difundem dentro da célula tumoral, fazendo com que a expressão dos receptores de fator de necrose tumoral (TNFR) sejam ativados. Por conseguinte, os TNFR se conjugam com os fatores de necrose tumoral (TNF), desencadeando uma cascata de reações que provocam a morte celular (PUNJABI et al., 2008). Assim sendo, vários estudos corroboram com a afirmação de que solamargina aumenta a expressão das proteínas apoptóticas TNFR, Fas, TRADD, FADD, Bax, citocromo c, caspase-8, -9 e -3, ao passo que inibe as proteínas anti-apoptose, Bcl-2 e Bcl-xL, sugerindo que a via extrínseca da apoptose pode estar envolvida na morte celular induzida por solamargina (LIANG et al., 2004; LIU et al., 2004; SHIU et al., 2007; LIANG et al., 2008; WU et al., 2011; DING et al., 2012; LI et al., 2016).

Por fim, a terceira hipótese foi constatada com o auxílio da técnica de citometria de fluxo, em que foi possível verificar que após o tratamento das células com solamargina houve uma drástica mudança da fase celular G2/M, correspondente a fase em que ocorre divisão celular, para a sub-G1, fase em que as células não se dividem e permanecem neste estágio até a morte. Portanto, esta mudança de fase celular também é considerada outra via de apoptose (KUO et al., 2000; LIU et al., 2004; SHIU et al., 2007). Dessa forma, nota-se que a apoptose se tornou um foco de interesse na oncologia, pois a alteração deste processo pode levar ao surgimento de malignidades (KUO et al., 2000; LIU et al., 2004).

A administração de fármacos requer a avaliação de alguns fatores relacionados às propriedades físico-químicas dos mesmos. Os fármacos ideais para administração intravesical

devem ter peso molecular acima de 200 g/mol, apresentar baixa ionização nos pH entre 6 e 7 e coeficiente de partição a baixo de 0,2 ou acima de 7,5 (GUHASARKAR & BANERJEE, 2010).

Segundo TIOSSI (2014), a solubilidade dos glicoalcalóides é favorecida pela diminuição do pH, sendo esta característica atribuída à ionização do grupo amino dos glicoalcalóides solasonina (SS) e solamargina (SM) deixando a base livre. Além disso, os glicoalcalóides são lipofílicos e apresentam pesos moleculares acima de 800, que confere os glicoalcalóides características favoráveis para administração local na bexiga (TSIMOGIANNIS et al., 2007).

Todos os estudos citados acima demonstrando o grande potencial dos glicoalcalóides da *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil. na terapia do câncer. Entretanto, alguns desafios ainda precisam ser superados como a baixa solubilidade destas moléculas em água, que limita a sua aplicação, e a sua toxicidade (MARUO, 2002; MARTINS, 2013). Desta forma, o encapsulamento destes glicoalcalóides em nanopartículas podem superar estes desafios aumentando assim a eficácia e segurança da terapia do câncer com estes glicoalcalóides. Cabe ressaltar, que até o presente momento, não há dados na literatura do encapsulamento destes dois glicoalcalóides em nanopartículas. Dessa forma, o estudo do encapsulamento destes glicoalcalóides em nanopartículas lipídicas sólidas e sua avaliação em células de câncer de bexiga é muito relevante podendo aumentar a eficácia do tratamento e diminuir os efeitos adversos e/ou tóxicos além de proporcionar uma liberação prolongada destas moléculas.

1.4 Nanopartículas Lipídicas Sólidas

Esforços significativos têm sido empregados no desenvolvimento de tecnologias para sistemas de liberação sustentada. Micelas, lipossomas, micro e nanopartículas poliméricas e nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) têm sido intensamente estudadas para este sistema com intuito de manter o efeito do fármaco no tecido alvo, solubilizar fármacos lipofílicos, aumentar a penetração cutânea de moléculas, melhorar a estabilidade física e química de agentes terapêuticos, minimizar os efeitos colaterais e reduzir a toxicidade (SCHWARZ; WEIXELBAUM; PAGITSCH, 2012).

Dentre os carreadores coloidais, as NLS são as mais promissoras, visto que combinam as vantagens das partículas sólidas e dos lipossomas em seu desenvolvimento. Dentre as vantagens, pode-se citar a alta estabilidade temporal, alta capacidade de encapsulamento, baixo custo de produção e o fácil escalonamento. Outra vantagem das NLS é que estas partículas quando administradas pela via intravesical apresentam maior estabilidade em

relação aos lipossomas, prevenindo a degradação do fármaco encapsulado e apresentando potencial para uso em doenças do trato urinário (GLOBOCAN 2008; TRABOULSI & KASSOUF, 2016). As NLS são biodegradáveis, biocompatíveis, formam filmes lipídicos e tem alta capacidade de carrear fármacos lipofílicos com controle da sua liberação.

As NLS são formadas por lipídios sólidos à temperatura ambiente e corporal, e estabilizadas por tensoativos. Os lipídios utilizados na preparação de NLS são triglicerídeos, mistura de glicerídeos ou ceras. O lipídio miristato de miristila tem sido utilizado na produção de NLS em alguns trabalhos (Ridolfi et al, 2012; Nafee et al, 2014; Islan et al, 2016), devido a facilidade de produção de NLS e não apresentarem toxicidade oral e cutânea

As NLS podem ser preparadas por diferentes técnicas como, por exemplo, microemulsão à quente, emulsificação e evaporação de solvente, difusão de solvente, spray-drying e homogeneização à alta pressão (MARCATO, 2009; SOUTO, 2011).

Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) fazem parte da segunda geração de nanopartículas lipídicas, sucedendo as nanopartículas lipídicas sólidas (NLS). Estes carreadores (CLN) foram desenvolvidos com o intuito de melhorar a eficiência de encapsulamento e minimizar a expulsão do ativo das partículas durante a estocagem, o que, em geral, ocorria com as NLS (GESZKE-MORITZ & MORITZ, 2016).

Os CLN dividem-se em três diferentes estruturas, o primeiro modelo, conhecido como “CLN imperfeito” (Figura 2A) consiste em uma mistura de glicerídeos compostos por diferentes ácidos graxos. Essa mistura aumenta a distância entre as cadeias de ácidos graxos dos glicerídeos ocasionando imperfeições no cristal. Essas imperfeições geram mais espaço para acomodar o ativo, aumentando, assim, a eficiência do encapsulamento. Este tipo de carreador pode ser preparado utilizando manteigas naturais como a manteiga de illipê. A manteiga de illipê (MI) é composta por diferentes ácidos graxos como o ácido esteárico (43,3%), o ácido oleico (37,4%) e o ácido palmítico (18%). A MI tem sido utilizada na indústria cosmética devido as propriedades de hidratação da pele e restauração da elasticidade. Ela é obtida a partir da semente das plantas do gênero *Shorea sp* encontradas na floresta de Bornéu no sudoeste Asiático (GANI, 2011; RAHMAN, 2011).

O segundo modelo é chamado de “CLN amorfo” (Figura 2B), é a mistura de lipídios sólidos com lipídios líquidos (óleo). Essa estrutura evita a expulsão do ativo das partículas durante a estocagem, já que o processo de cristalização do lipídio para a forma β não ocorre nessas condições. O terceiro modelo é chamado de “múltiplo CLN” (Figura 2C), que é composto pela dispersão de óleo em lipídio sólido. A solubilidade das moléculas de óleo no lipídio sólido é excedida levando a uma separação de fase e formação de nanocompartimentos de óleo dentro da matriz lipídica sólida (ÜNER; RADTKE; WISSING, 2007; TAMJIDI et al.,

2013). Diferentes óleos podem ser utilizados na preparação de CLN amorfo e múltiplo como por exemplo, óleo de coco, óleo de argan, triglicerídeo de ácido caprílico/cáprico (Miglyol).

O tipo de lipídio e/ou mistura de lipídeos influenciam diretamente a organização estrutural da NLS e/ou CLN alterando características físicas das dispersões como diâmetro, distribuição de tamanho, capacidade de encapsulamento de ativos entre outros.

Figura 4. Esquematização estrutural das nanopartículas: A) CLN imperfeito, B) CLN amorfo, C) Múltiplo CLN.

Fonte: TAMJIDI et al., 2013.

NLSs e CLNs têm sido investigadas como sistemas de carregamento de quimioterápicos, visando o tratamento de diferentes cânceres incluindo o câncer de bexiga. BÜYÜKKÖROGLU et al. (2016) produziram supositório vaginal com paclitaxel e siRNA para tratamento de câncer cervical. Foram preparadas NLS com paclitaxel e siRNA juntos e separados obtendo-se nanopartículas com diâmetros inferiores a 180 nm com potencial zeta positivo. As NLSs com siRNA e as com paclitaxel/siRNA foram mais tóxicas que NLS com paclitaxel e NLS vazia, mostrando o potencial da aplicação simultânea de paclitaxel e siRNA.

Em outro estudo, o flavonóide quercetina carregado em CLN (Q-CLN) teve sua atividade avaliada frente ao câncer de mama em linhagens celulares MCF-7 e MDA-MB-231. A dispersão de Q-CLN apresentou 32 nm de diâmetro e 95% de eficiência de encapsulamento. Nos ensaios de citotoxicidade pode-se observar que Q-NLC aumentou a citotoxicidade da quercetina de forma dose-dependente e induziu a apoptose, demonstrando o seu potencial no tratamento de câncer de mama (SUN et al., 2014).

FERNANDES et al. (2016) avaliou a atividade antitumoral da doxorubicina encapsulada em CLN e lipossoma em modelo animal de câncer de mama. Os resultados demonstraram melhor eficiência da doxorubicina encapsulada em CLN no controle do crescimento do tumor apresentando-se como alternativo na eficácia antitumoral.

Desta forma NLS e CLN evidenciam um potencial como sistema de carregamento de fármacos para a terapia do câncer. Além disso, cabe ressaltar que até o presente momento não há na literatura estudos sobre a utilização de nanopartícula lipídica sólida como sistema de carregamento dos glicoalcalóides extraídos da *Solanum lycocarpum* e seu estudo na terapia do câncer de bexiga.

2. OBJETIVOS:

2.1. Objetivo Geral

Desenvolvimento e caracterização nanopartículas lipídicas sólidas como sistema de carregamento do extrato alcaloídico, com alto teor dos glicoalcalóides solasonina e solamargina, extraídos do fruto da *Solanum lycocarpum*, e avaliação biológica *in vitro* deste sistema em células de câncer de bexiga.

2.2. Objetivos Específicos

- Otimização do preparo de nanopartículas lipídicas sólidas contendo extrato alcaloídico obtido do fruto de *Solanum lycocarpum* (EA);
- Caracterizar as nanopartículas com e sem o EA quanto ao diâmetro e potencial zeta por espalhamento de luz dinâmico (DLS);
- Caracterizar as partículas por microscopia de força atômica (AFM); por calorimetria exploratória diferencial (DSC) e análise de rastreamento de nanopartículas (NTA).
- Avaliar a influência do pH no diâmetro e potencial zeta das nanopartículas;
- Validar o método analítico de quantificação de solasonina (SS) e solamargina (SM);
- Avaliar a eficiência de encapsulamento do extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (EA);
- Avaliar o perfil de liberação de SS e SM encapsulada nas nanopartículas;
- Avaliar a propriedade de mucoadesão das nanopartículas;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do EA livre e encapsulado nas nanopartículas em modelo de cultivo de células de bexiga.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

3.1.1 Matérias-primas e Reagentes

- Acetonitrila (J.T.Baker)
- Ácido acético glacial (CH_3COOH – Synth)
- Ácido clorídrico - HCl (Synth)
- Ácido periódico (Sigma - Aldrich)
- Carbonato de cálcio - CaCO_2 (Merck)
- Células RT4 (BCRJ)
- Cloreto de potássio- KCl (Sigma-Aldrich)
- Cloreto de sódio – NaCl (Reagen)
- Corante vermelho neutro (Merck)
- Dimetilsulfóxido - DMSO (Sigma-Aldrich)
- Etanol - $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (Synth)
- Formaldeído – HCOH (Dinâmica)
- Fostato de sódio heptahidratado (Sigma-Aldrich)
- Hidróxido de sódio – NaOH (Sigma-Aldrich)
- Manteiga de Illipê (Lipex 106 – Polytechno)
- Meio McCoy (Sigma-Aldrich)
- Miristato de miristila (Cromadol MM – Merck)
- Mucina tipo II (Sigma-Aldrich)
- Penicilina e estreptomicina (Sigma Life Science)
- Pluronic F68 (Aldrich chemistry)
- Reagente de Schiff (Sigma – Aldrich)
- Solução de tampão pH4 (Imbralab)
- Solução de tampão pH7 (Imbralab)
- Solução Trypan azul 0,4% (Sigma-Aldrich)
- Soro fetal bovino (Sigma Life Science)
- Tampão fosfato salino 10x (PBS - Sigma-Aldrich)
- Tween 80 (Alkest TW80 – Oxiten)

3.1.2 Equipamentos

- AFM (SPM-9600 Shimadzu)
- Agitador magnético (Fisatam)
- Balança analítica (Shimadzu AUW220D)
- Banho termostático (SOLAB - SL152)
- Células de Franz automáticas (Hanson Research)
- Centrífuga MPW-352R (MPW instruments)
- DSC (DSC-50 – Shimadzu)
- Espectrômetro UV/VIS (Biosystems)
- Espectrômetro UV/VIS com leitor de placa (SPECTRA max plus – Molecular Davicas)
- Estufa de cultura e bacteriologia (Qualxtron)
- Filtros Amicon, 0,22nm (Sigma)
- Frezzer (Eletrolux – FE26)
- Geladeira (Eletrolux - RDE 30 super)
- LC-MS/MS (Shimadzu - Quatro-LC, Micromass)
- NTA (NanoSight NS300, Malvern)
- pHmetro (HANNA instruments – HI2221)
- Purificador de água (GEHAKA – Master all)
- Sonicador de ponta (Sonics Vibra Cell – CV334)
- Zetasizer (NanoZS Malvern)

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Obtenção das Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)

O extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* rico em glicoalcalóides, solasonina (42%) e solamargina (47%), foi cedido, gentilmente, pelo Prof. Dr. Jairo Kenupp Bastos, responsável pelo laboratório de Farmacognosia da FCFRP/USP. A preparação da formulação envolveu a elaboração de um planejamento fatorial para obtenção da nanopartículas lipídica sólida (NLS) e carreador lipídico nanoestruturado imperfeito (CLN) pelo método de emulsão à quente e sonicação como descrito abaixo.

3.2.1.1 Método de preparação das NLS

As NLS foram preparadas pelo método de emulsificação seguida de ultrasonicação. Neste método a emulsão é constituída por duas fases distintas sendo uma oleosa e a outra aquosa (SOUTO et al, 2011). A fase oleosa foi composta por um lipídeo sólido à temperatura ambiente (25°C), Miristato de Miristila (MM) ou Manteiga de Illipê (MI) e a fase aquosa foi composta por água destilada e um estabilizante (Pluronic F68 ou Tween 80). Ambas as fases foram aquecidas 10°C acima do ponto de fusão do lipídeo utilizado (50°C ou 60°C, respectivamente). Em seguida, a fase aquosa foi vertida sobre a fase oleosa e inserida no sonicador de ponta (VCX 700, Sonics) durante 10 minutos com 40% de amplitude para obtenção da emulsão. Posteriormente, as emulsões foram resfriadas à temperatura ambiente, para a solidificação do lipídeo, obtendo-se assim as NLS, no caso do lipídio MM ou CLN no caso da MI. O extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (EA) por apresentar compostos lipofílicos em sua constituição foi adicionado na fase oleosa logo após o aquecimento da mesma.

3.2.1.2 Planejamento Experimental para escolha da nanopartícula

Foi realizada uma análise experimental para determinar as melhores condições de obtenção das nanopartículas. Para este fim, o planejamento fatorial foi utilizado por permitir avaliação simultânea do efeito de variáveis com um número reduzido de ensaios experimentais (NETO et al. 2010; SUTO et al, 2015).

Neste estudo foi aplicado o planejamento fatorial 2^3 , no qual, avalia-se a influencia de três variáveis independentes em dois diferentes níveis, um superior (+) e outro inferior (-). As

variáveis e os respectivos níveis escolhidos estão representados na Tabela 1 e a composição das nanopartículas representada na Tabela 2. O delineamento 2^3 proporcionou a obtenção de oito experimentos combinados em duplicata, totalizando 16 experimentos. Os fatores de respostas utilizados foram diâmetro médio (z-average) e índice de polidispersão (PdI).

Tabela 1: Variáveis utilizadas no planejamento fatorial 2^3 .

Variáveis	Níveis	
	(+)	(-)
Lipídio sólido (A)	Manteiga de Illipê (MI)	Miristato de Miristila (MM)
Surfactante (B)	Pluronic F68	Tween 80
Proporção de Surfactante (C)	1,5%	1,0%

Tabela 2: Composição das NLS pelo planejamento Fatorial 2^3 .

	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	F8
Fase Oleosa								
1% Manteiga de Illipê (MI)			X	X			X	X
1% Miristato de Miristila (MM)	X	X			X	X		
Fase aquosa								
1,5% Pluronic	X		X					
1,5% Tween 80		X		X				
1% Pluronic					X		X	
1% Tween						X		X
Água destilada qsp	X	X	X	X	X	X	X	X

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente com auxílio do programa MINITAB 17[®] para nível de confiança de 95% ($p > 0,05$) podendo ser expresso pela Equação 1, na qual Y é o fator resposta (diâmetro e PdI); b_0 é a média dos efeitos na resposta Y; b_1 , b_2 e b_3 são os efeitos principais das variáveis A, B e C; b_{12} , b_{13} , b_{23} e b_{123} são os efeitos da interação entre os fatores das variáveis A, B e C.

$$Y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_{12}AB + b_{13}AC + b_{23}BC + b_{123}ABC \quad (1)$$

O efeito de uma variável no planejamento fatorial é a mudança ocorrida na resposta quando se muda do nível inferior (-) para um nível superior (+). Este efeito mostra a influência da variável independente no fator de resposta. O resultado do efeito de cada variável pode ser calculado pela Equação 2. (NETO et al., 2010; CUNICO et al., 2008).

$$\text{Efeito principal} = 2 [\sum y(+) - \sum y(-)] / 2^k \quad (2)$$

Em que: $y(+)$ é a média dos valores obtidos no nível superior para variável, $y(-)$ é a média dos valores obtidos no nível inferior para a variável e k é o número de variáveis independentes (CUNICO et al., 2008).

O efeito de interação é um efeito secundário caracterizado pela diferença entre o efeito médio de duas ou mais variáveis quando estão no mesmo nível $y(+)$ pelas variáveis quando estão em níveis diferentes ($y(-)$). As interações podem ser de dois fatores e três fatores, representadas no planejamento 2^3 como interações AB, AC, BC e ABC. O resultado do efeito secundário pode ser calculado pela Equação 3.

$$\text{Efeito secundário} = [y(+)_1 + y(+)_2 / 2] - [y(-)_3 + y(-)_4 / 2] \quad (3)$$

3.2.2 Distribuição de tamanho das partículas e Potencial Zeta

O diâmetro médio (z-average) das NLS e CLN foram determinados pela técnica de espalhamento de luz dinâmico utilizando o aparelho NanoSize ZS (Malvern) com ângulo de espalhamento de 90°. A carga superficial das nanopartículas (potencial zeta) foi avaliada por espalhamento de luz eletroforético utilizando o mesmo equipamento. Todas as medidas foram feitas com amostras diluída em solução de KCl 1mM (1:200). A estabilidade das dispersões também foi avaliada por estes métodos durante 60 dias mantendo as amostras a 4°C. Para isto foi adicionada na dispersão das nanopartículas os antimicrobianos metil e propilparabenos.

3.2.3 Avaliação da influência do pH no diâmetro e potencial zeta das partículas

A influência do pH no diâmetro e no potencial zeta das partículas foi realizado utilizando um titulador (Malvern) acoplado ao NanoSize ZS (Malvern). Hidróxido de sódio e ácido clorídrico foram utilizados como soluções titulantes nas concentrações: 0,1M NaOH; 0,25M NaOH e 0,1M HCl. O diâmetro e potencial zeta foram medidos na faixa 5 – 8 de pH.

3.2.4 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

A cristalinidade das nanopartículas foi avaliada por calorimetria exploratória diferencial (DSC). Os termogramas de DSC foram obtidos no Calorímetro da Shimadzu (DSC-50) usando porta-amostra padrão de alumínio selado. As análises foram realizadas em atmosfera de nitrogênio (fluxo de 50 mL.min⁻¹), na faixa de temperatura de 20°C a 300°C (taxa de aquecimento de 10°C/min). O índice de recristalização (IR) foi calculado pela Equação 4 descrita por Liu et al. (2007).

$$IR (\%) = (\Delta H_{\text{dispersão NLS}} / \Delta H_{\text{material}} \times \text{Concentração lipídico}) \times 100 \quad (4)$$

3.2.5 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

As medições das dispersões de CLN com e sem extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (EA) foram realizadas no equipamento NanoSight NS300 (Malvern, Reino Unido) equipado com laser vermelho (642 nm) e software NTA 3.1. As dispersões foram diluídas em água ultrapura (1:1000, v:v). As amostras foram avaliadas à temperatura de 25°C e 5 vídeos foram obtidos.

3.2.6 Microscopia de força atômica (AFM)

As imagens de AFM foram obtidas em um microscópio de força atômica SPM-9600 (Shimadzu) em modo “tapping” usando frequência de ressonância de 204 ± 497 kHz e constante de força de 10-130 N/m. Foram utilizadas pontas de silício (PPP-NCHR) de comprimento de $125 \pm 10 \mu\text{m}$ à temperatura ambiente (25°C). A dispersão de CLN com extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (CLN-EA) foi gotejada em mica recém-clivada seguida por secagem com jato de argônio.

3.2.7 Análise da Eficiência de Encapsulamento (EE)

A eficiência de encapsulamento dos glicoalcalóides solanonina (SS) e solamargina (SM) encapsulados nos CLNs foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) mediante método de quantificação previamente validado de acordo com a RE 899 de 2003, no qual se avaliaram os parâmetros

de linearidade, seletividade, precisão, exatidão, limite de quantificação e detecção como descrito no item 3.2.7.1 (ANVISA, 2003).

Para a quantificação da eficiência de encapsulamento, a dispersão de nanopartículas foi centrifugada a 4000 x g em um sistema de ultrafiltração Microcon com membrana de filtração com corte de massa molar de 10.000 g/mol (Millipore). O sobrenadante foi quantificado por LC-MS/MS e a eficiência de encapsulamento (EE) dos glicoalcalóides SS e SM foram determinadas segundo as Equações 5 e 6:

$$\% \text{ não encapsulada de SS} = ([SS]_{\text{solução filtrada}}/[SS]_{\text{inicial}}) \times 100 \quad (5)$$

$$\% \text{ não encapsulada de SM} = ([SM]_{\text{solução filtrada}}/[SM]_{\text{inicial}}) \times 100$$

$$EE (\%) = 100 - \% \text{ não encapsulada} \quad (6)$$

Cabe ressaltar que foi levado em consideração a porcentagem de SS e SM no extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (42% e 47% respectivamente), para o cálculo da concentração inicial de SS e SM da equação 5.

3.2.7.1 Método analítico de quantificação dos glicoalcalóides

A análise cromatográfica foi realizada usando um sistema de cromatografia líquida LC (Shimadzu, Japão), constituído por bombeamento binário com sistema de injeção automático, acoplado a um espectrômetro de massa triplo quadrupolo (Quatro-LC, Micromass, Reino Unido) conectado a uma fonte de ionização por eletronebulização ou electrospray (ESI) (LC-MS/MS), operando em modo positivo. Os dados foram processados pelo software Masslynx 4.0.

A fase móvel utilizada foi acetonitrila (ACN) e solução aquosa de ácido fórmico (AF) a 0,1% no modo de eluição gradiente (Tabela 3), vazão de 0,3 mL/min e fase estacionária composta pela coluna X-terra MS C18 (3,9 x 10mm, 3,5µm). A voltagem do cone e do extrator foram respectivamente, 50V e 2V. A energia do capilar foi 2 kV e a energia de colisão de 70 eV.

Tabela 3. Gradiente de polaridade da fase móvel do método analítico desenvolvido.

Tempo	Fase Móvel (%)	
Método analítico	ACN	AF 0,1%
0	25	75
7	40	60
9	25	75
12	25	75

A identificação dos compostos solasonina (SS) e solamargina (SM) do extrato do fruto da planta *Solanum lycocarpum* foi feita pela interpretação dos íons gerados pela fragmentação do analito durante análise no LC-MS/MS. Os íons monitorados durante análise foram íon m/z 884 e 414 para SS e íon m/z 868 e 414 para SM (TSIMOGIANNIS et al., 2007).

3.2.7.2 Validação do método analítico

Esta etapa do projeto foi realizada em parceria com a Prof. Dr. Jonas Augusto Rizzato Paschoal do Departamento de Química e Física da FCFRP-USP.

A. Seletividade

A seletividade avalia o grau de interferência de excipientes que possam estar presentes na amostra. Garante também que o pico de resposta seja exclusivo do composto em análise (RIBANI et al, 2004). A seletividade do método analítico foi determinada pela comparação do cromatograma do filtrado da matriz (CLN sem EA) filtrada no sistema Microcon, como descrito no item 3.2.7, com os cromatogramas da solasonina e solamargina livres.

B. Linearidade

A linearidade representa a capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância dentro de uma faixa de aplicação. Para determinação da linearidade foi desenvolvida uma curva analítica a partir da solução estoque contendo os padrões solasonina (SS) e solamargina (SM) (1000 µg/mL).

A partir da solução estoque foram preparadas soluções de referências que foram diluídas em água destilada na faixa de concentração de 0,1 - 5,0 µg/mL de SS e SM. As soluções padrões preparadas foram analisadas em triplicata por LC-MS/MS. A linearidade

para cada composto foi determinada através de seu coeficiente de determinação (R^2), das equações da reta obtidas por regressão linear e pelos gráficos de distribuição de resíduos (RIBEIRO, 2008).

C. Limite de detecção e Limite de quantificação

De acordo com a ANVISA (2003), o limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito que pode ser detectada, e o limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser medida. O LD e o LQ foram determinados a partir das curvas analíticas e calculados de acordo com as Equações 7 e 8.

$$LD = 3,3 \times s / S \quad (7)$$

$$LQ = 10 \times s / S \quad (8)$$

Em que: s = desvio padrão do coeficiente linear; S = coeficiente angular da curva analítica.

D. Exatidão

A exatidão do método analítico representa a proximidade do valor obtido com valor de referência, considerado verdadeiro, e o erro absoluto dessa medida. A exatidão do método foi determinada em três níveis diferentes de concentrações, alta (5,0 $\mu\text{g/mL}$), intermediária (3,0 $\mu\text{g/mL}$) e baixa (2,0 $\mu\text{g/mL}$) em triplicata. Sendo o parâmetro estimado pela relação do valor obtido com o teórico, como representado na Equação 9 (RIBEIRO, 2008, ANVISA 2003).

$$\text{Exatidão (\%)} = (\text{valor obtido} / \text{valor teórico}) \times 100 \quad (9)$$

E. Precisão

A dispersão dos valores medidos ao redor de um valor médio de uma amostra é chamada de precisão. A precisão é estimada pelo coeficiente de variação (CV) ou desvio padrão relativo (DPR) e pode ser avaliada através da repetibilidade (precisão intradia), que representa a concordância entre medições sucessivas em um mesmo dia; e pela precisão intermediária (precisão interdía) que avalia o efeito em dias diferentes de análise.

Para avaliar a precisão intradia do método foram preparadas 3 amostras nas concentrações alta (5,0 µg/mL), média (3,0 µg/mL) e baixa (2,0 µg/mL) que foram submetidas à análise em LC-MS/MS em triplicata. Para a precisão interdia as análises foram realizadas em 3 dias diferentes. Os dados obtidos para os dois níveis de precisão foram expressos em função do coeficiente de variação CV(%), segundo a Equação 10 (ANVISA, 2003; RIBEIRO, 2008).

$$CV (\%) = s / X_m \times 100 \quad (10)$$

Em que: s = desvio padrão; X_m = média dos valores obtidos.

3.2.8 Ensaio do perfil de liberação *in vitro* do extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (EA)

3.2.8.1 Escolha da solução receptora

A escolha do meio receptor tem grande importância no ensaio de liberação de fármacos pois, ela está diretamente relacionada com a manutenção das condições “sink”(quando a concentração do fármaco no sistema é 10% da concentração de saturação do mesmo) (BEART et al, 2010). Para isso foi escolhida solução tampão fosfato (50 mM) em pH 7,4 com diferentes concentrações de Tween 80 (1,0% e 0,5%) para realização do ensaio de saturação. Adicionou-se excesso do extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (EA) em 2 mL de tampão fosfato com 1% ou 0,5% de Tween 80. As soluções foram mantidas sob agitação magnética por 24 e 48 h à 25°C. Após estes períodos, o EA precipitado foi removido por centrifugação 5 000 g por 30 minutos, e o sobrenadante foi quantificado por LC-MS/MS.

3.2.8.2 Perfil de liberação do EA

O ensaio de liberação *in vitro* do EA encapsulado em carreador lipídico nanoestruturado (CLN) foi realizado utilizando células de difusão do tipo Franz em modelo automatizado Hanson Research®. Este sistema é composto por uma célula de vidro doadora e uma receptora separada por uma membrana de difusão de acetato de celulose (Milipore MWCO 4000-6000). A amostra foi depositada sob a membrana em contato com o meio receptor, permitindo a passagem dos glicoalcalóides SS e SM da parte doadora para a

receptora. A área de difusão das células foi de 1,77 cm² com 7 mL de volume do compartimento receptor.

Uma alíquota 300 µL da dispersão de CLN-EA possuindo aproximadamente 75 µg do extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (EA) foi depositada sob a membrana de difusão na parte doadora da célula de Franz. O meio receptor composto por tampão fosfato 50 Mm com Tween 80 a 0,5% (pH= 7,4) foi escolhido para manter a condição “sink” do sistema. Para o ensaio foram utilizadas 5 células de difusão do tipo Franz, mantidas à temperatura de 37°C sob agitação magnética a 400 rpm. Foram coletadas 14 alíquotas de 1 mL do compartimento receptor de cada célula nos tempos pré-definidos: 2; 4; 6; 8; 10; 12; 16; 20; 24; 30; 36; 42; 48 e 54 h, sendo o mesmo volume repostado automaticamente pelo equipamento com meio receptor.

Os glicoalcalóides majoritários, solasonina (SS) e solamargina (SM), foram quantificados por LC-MS/MS em concordância com sessão 3.2.7.1. Os dados obtidos foram plotados e analisados estatisticamente utilizando o software Origin®.

3.2.8.3 Modelos matemáticos de cinética de liberação de fármacos

Os percentuais cumulativos de solasonina (SS) e solamargina (SM) liberados com o tempo foram ajustados para cinco modelos matemáticos de cinética a fim de avaliar o mecanismo de liberação dos glicoalcalóides SS e SM das nanopartículas. Os modelos utilizados foram às equações de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Hixson-Crowell e Peppas-Korsmeyer, apresentadas na Tabela 4. Os dados foram analisados por ANOVA (software Origin®) em um nível de significância de $p < 0,05$ e ajustados a cada modelo. O modelo com maior coeficiente de regressão linear ajustado (R^2_{adj}) (Equação 11) foi escolhido como modelo de liberação do EA (COSTA; LOBO 2001; COSTA, 2002).

$$R^2_{adj} = 1 - [(n-1)/(p-1)] \cdot (1-R^2) \quad (11)$$

Tabela 4: Modelos matemáticos de cinética de liberação usados na avaliação o perfil de liberação de SS e SM da CLN.

Modelos matemáticos de cinética	Equações*
Ordem zero ¹	$Q_t = Q_0 + K_0 t$
Primeira ordem ²	$\ln Q_t = \ln Q_0 + K_1 t$
Higuchi ³	$Q_t = K_H \sqrt{t}$
Hixson-Crowell ⁴	$Q_0^{1/3} - Q_t^{1/3} = K_s t$
Korsmeyer- Peppas ⁵	$Q_t/Q_\infty = K_k t^n$

Legenda: * Para todas as equações, Q_t é a quantidade de fármaco liberado no tempo t e Q_0 é a quantidade inicial de fármaco; ¹ K_0 é constante da cinética de ordem zero; ² K_1 é constante de primeira ordem; ³ K_H é constante de dissolução de Higuchi; ⁴ K_s é constante da relação superfície-volume; ⁵ Q_t/Q_∞ é a fração de fármaco liberado no tempo t dividido pela quantidade liberada no tempo infinito, n é o expoente de liberação difusional que indica o mecanismo de transporte.

3.2.9 Ensaio de Mucoadesão *in vitro*

A propriedade de mucoadesão das nanopartículas foi realizada pelo método “Mucus Glycoprotein Assay” que se baseia em uma reação colorimétrica de ácido periódico com reagente Schiff (PAS) (MANTLE & ALEN, 1978). Este método possibilita determinar, de forma indireta, a quantidade de mucina adsorvida na superfície de nanopartículas.

O reagente ácido periódico foi obtido pela mistura de 10 µL de solução ácido periódico à 50% (m/v) com 7 mL de solução de ácido acético 7% (v/v) (BAPTISTA, 2013). Para construção da curva de calibração de mucina, soluções de mucina em água ultrapura foram preparadas em concentrações conhecidas (0,1; 0,2; 0,25; 0,5 e 0,6 mg/mL). 200 µL de ácido periódico foi adicionado nas diferentes concentrações de mucina e, em seguida, as amostras foram incubadas por 2 horas à 37°C em banho-maria. Posteriormente, foram adicionados 200 µL do reagente de Schiff em cada amostra e após 30 minutos foi realizada leitura da absorbância por espectrometria UV/Vis em 555 nm.

A mucoadesão dos CLNs com e EA foi obtida pelo mesmo procedimento. Para isto as nanopartículas foram dispersas por agitação magnética em diferentes concentrações de mucina por 60 minutos a 37 °C. Após este período, a dispersão foi filtrada 0,22 µm e o sobrenadante com mucina livre foi quantificado por espectrofotometria UV-Vis após a sua

reação com o reagente de Schiff. A porcentagem de mucina adsorvida foi calculada pela Equação 12.

$$(PA\%) = [(C_{\text{adicionada}} - C_{\text{filtrada}}) / C_{\text{adicionada}}] \times 100 \quad (12)$$

Em que: PA é a porcentagem adsorvida de mucina; $C_{\text{adicionada}}$ é a concentração de mucina inicial adicionada; C_{filtrada} é a concentração de mucina final filtrada.

3.2.10 Citotoxicidade em células de câncer de Bexiga

Esta etapa do projeto foi realizada em parceria com a Profa. Dra. Kamilla Swiech Antonietto da FCFRP-USP, do Laboratório de cultivo de células e bioprocessos (LaCCBio).

3.2.10.1 Cultivo das Células

Para o estudo foram utilizadas células de câncer de bexiga RT4 do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). As células foram mantidas em cultura contínua, através de repiques periódicos até atingirem a densidade de confluência. O cultivo foi realizado em meio McCoy 5A contendo 1% de antibiótico (Penicillin-Streptomycin), suplementado com 10% de soro fetal bovino. As células foram descoladas usando solução de tripsina 1x em PBS.

O número de células viáveis para o cultivo e plaqueamento foi determinado homogeneizando-se uma alíquota da suspensão celular com a quantidade equivalente de solução de Azul de Tripán a 0,4%, contando as células em câmara de Neubauer e excluindo as células que incorporam o corante. A incubação foi feita em estufa (COM-19AIC (UV), Panasonic) a 37 °C sob atmosfera úmida e contendo 5% de CO₂.

Para o ensaio de citotoxicidade, descrito a seguir, o plaqueamento foi realizado inoculando 5×10^4 células/mL em cada poço da placa (96 poços). Posteriormente, a placa foi incubada a 37°C por 24h (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008). As células foram tratadas com concentrações crescentes do extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (EA) livre e encapsulados no CLN (5 - 20 µg/mL), bem como com CLN vazia. Após 24, 48 e 72 horas foram avaliadas a citotoxicidade por ensaio de captura do corante vermelho neutro.

3.2.10.2 Ensaio de captura do corante vermelho neutro

O meio de cultura contendo as formulações (EA livres ou encapsuladas em CLN ou CLN vazia) foi removido e trocado por outro contendo o vermelho neutro na concentração de 50 µg/mL em meio McCoy 5A completo. Em seguida, as células foram incubadas por 3 h, tempo necessário para a incorporação do corante pelos lisossomos das células RT4 viáveis. Após este período, o meio foi retirado cuidadosamente e 200 µL da solução de fixação (formaldeído 1% / carbonato de cálcio 1% / 99% água deionizada) foram adicionados em cada poço.

Posteriormente, a solução de fixação foi descartada e todos os poços lavados com solução salina (0,9% NaCl) e, em seguida, a solução reveladora (Etanol 50%/ ácido acético glacial 1%/ água deionizada) foi adicionada aos poços. Para evitar a evaporação da solução reveladora, as placas foram envolvidas por plástico filme (Parafilm). As placas foram agitadas por 10 min em um agitador de placas e a absorbância das soluções foram medidas em um Microplate reader (Molecular Devices- SPECTRA max/ Plus384) a 540 nm (BORENFREUND & PUERNER, 1985).

Foram realizados ensaios independentes em sextuplicata, utilizando com controle negativo (CN) poços com células e Meio McCoy 5A e como controle positivo (CP) poços com células e solução de DMSO 10%. A dose citotóxica para 50% das células (IC₅₀) foi definida utilizando o método estatístico de curva dose resposta (BÉZIVIN et al., 2003; REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação do método analítico de quantificação de glicoalcalóides de *Solanum lycocarpum* por LC-MS/MS

As análises por LC-MS/MS fornecem dados sobre os fragmentos gerados pela quebra da molécula dos analitos durante a análise. Desse modo, é possível a identificação e separação dos compostos pela interpretação dos íons gerados pela fragmentação no eletrospray (ESI). Na ionização três íons são formados: íons moleculares, moléculas protonadas ($[M-H]^+$) ou desprotonadas ($[M-H]^-$), e moléculas cationizadas (exemplo: $[M+Na]^+$) ou anionizadas (exemplo: $[M+Cl]^-$). A presença de cada uma desses íons depende do equilíbrio das reações de redox e ácido/base que ocorrem no interior do capilar (DEMARQUE et al., 2016).

A ionização de um composto tem relação com a estrutura do analito e do solvente utilizado na análise. Compostos com grupamentos básicos como aminas e ésteres geralmente são analisados em modo positivo enquanto que compostos com grupamentos ácidos como ácido carboxilos e fenóis são analisados em modo negativo (CROTTI et al., 2006) Por isso, a solasonina (SS) e solamargina (SM) por apresentarem grupamentos ésteres nas cadeias de açúcares e grupamento amina no núcleo esteroidal foram analisadas em modo positivo. Os espectros de massas obtidos para os padrões de solasonina (SS) e solamargina (SM) estão demonstrados na Figura 3.

Figura 3: Espectro de Massas obtido para: A) solasonina (SS); B) solamargina (SM).

Fonte: Elaborado pelo autor.

No espectro de massas da SS observa-se como pico base o íon m/z 884, referente à molécula protonada $[M+H]^+$. A presença do íon m/z 414 indica a perda das moléculas de açúcares (uma glicose e duas ramanoses) (SILVERSTEIN ;WEBSTER; KIEMLE, 2007). Para SM o pico base obtido foi o íon m/z 868, referente à molécula protonada $[M+H]^+$. A presença do íon m/z 722 corresponde a perda de uma molécula de glicose e o íon m/z 576 corresponde à perda de uma molécula ramanose e uma glicose simultaneamente. Tais fragmentações podem ser observadas nas Figuras 4 e 5. Estes dados corroboram com os encontrados por DISTIL e WINK (2009) e TSIMOGIANNIS et al. (2007), indicando que os compostos analisados tratam-se da SM e SS.

Figura 4: Fragmentação da molécula de solasonina (SS) por ESI.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 5: Fragmentação da molécula de solamargina (SM) por ESI.

Fonte: Elaborado pelo autor.

A seletividade do método analítico foi determinada através da análise dos perfis cromatográficos do extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (rico em SS e SM) e do filtrado de CLN vazia como demonstrado na Figura 6. A SS e SM apresentam tempo de retenção de 7,14 minutos e 7,94 minutos, respectivamente. Pode-se observar que não há interferência dos compostos do CLN no tempo de retenção dos glicoalcalóides SS e SM.

Além disso, os componentes da nanopartícula não apresentam massa/carga (m/z) igual aos glicoalcalóides, indicando assim a seletividade do método.

Figura 6: Perfis cromatográficos dos glicoalcalóides: A) solasonina (SS); B) solamargina (SM); C) filtrado de CLN vazia.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O parâmetro linearidade evidencia a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003). Na Figura 7 estão mostradas as curvas analíticas da SS e da SM.

Analisando as curvas da SS e da SM observa-se que o método é linear sendo que para ambas as curvas o coeficiente de correlação foi acima de 0,99, que é o mínimo exigido pela RE 899/2003. Desta forma, a curva pode ser utilizada para interpolação de valores experimentais, visando à determinação quantitativa dos glicoalcalóides SS e SM encapsulados no CLN.

A equação da reta para a SS foi $y = 6640,58x + 450,238$ e $y = 1201,64x + 56,0606$ para a SM apresentando coeficiente correlação de (R^2) de 0,9975 e (R^2) de 0,9974,

respectivamente. Os limites de quantificação e de detecção calculados foram de 0,445 e 0,147 $\mu\text{g/mL}$ para a SS e 0,309 e 0,102 $\mu\text{g/mL}$ para a SM.

Figura 7: Curva analítica referente à: A) solasonina (SS); B) e solamargina (SM) com seus respectivos gráficos de resíduos.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O critério de aceitação para a recuperação obtida para que o método seja considerado exato e específico é de 90 a 107% da concentração da amostra, segundo Association of Official Analytical Chemists (2002). Como demonstrado na Tabela 5, a porcentagem de recuperação média de cada concentração de SM e SS ficou dentro do nível aceitável e, portanto, o método pode ser considerado exato.

Segundo a RE 899/2003, os resultados obtidos para as medições da precisão devem apresentar variações, que são expressas em coeficiente de variação, inferiores a 5%. Na Tabela 5 pode-se observar que todos os resultados encontrados se mantiveram dentro do critério de aceitação, sendo o método preciso para ambos os tipos de precisão avaliados. Logo, pode-se afirmar que o método é preciso.

Tabela 5: Exatidão (%) e Precisão (CV%) para solasonina (SS) e solamargina (SM).

Concentração teórica (µg/mL)	Concentração Média em µg/mL e (DP)*		Precisão (CV%)**		Exatidão (%)	
	SM	SS	SM	SS	SM	SS
2,0	2,02 (0,04)	1,99 (0,05)	2,05	2,49	100,96	99,28
3,0	3,02 (0,09)	3,13 (0,08)	2,79	3,16	100,54	104,43
5,0	4,97 (0,08)	4,88 (0,01)	1,59	0,10	99,34	97,5

Desvio padrão*; Coeficiente de variação**

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Obtenção das Nanopartículas

A composição das nanopartículas tem grande influencia nas características físico-químicas das partículas. A fase lipídica esta relacionada com a estabilidade do fármaco, que interage de forma diferente dependendo do tipo de lipídio usado. Em geral, o aumento da concentração do lipídio sólido pode formar dispersões mais polidispersas e aumentar o diâmetro da partícula, assim como maiores concentrações de surfactante pode diminuir tamanho de partícula (GESZKE-MORITZ & MORITZ, 2016; TAMJIDI et al., 2013). Desta forma, a avaliação da composição das partículas é relevante para o desenvolvimento de uma formulação nanoestruturada. Esta avaliação pode ser realizada utilizando planejamento experimental.

O planejamento experimental permite verificar a influência de uma ou mais variáveis sobre outra de interesse com um número reduzido de ensaios. Neste estudo, utilizando o planejamento fatorial, foi possível avaliar como os fatores resposta, diâmetro médio e índice de polidispersão (PdI), variaram com as mudanças na composição das partículas, permitindo determinar a melhor composição de lipídio e tensoativo para a formulação. Neste estudo, a quantidade de lipídio (1%) e volume final de 20 mL foi mantida em todos os experimentos.

Para o planejamento fatorial 2^3 , foram escolhidas três variáveis relacionadas à composição da nanopartícula (A: tipo de lipídio; B: tipo de estabilizante e C: concentração do estabilizante) obtendo-se oito formulações de nanopartículas diferentes como representado na Tabela 2. A escolha da composição da nanopartícula foi fundamentada na análise dos efeitos principais e secundários das variáveis independentes,

considerando a melhor nanopartícula a dispersão que apresentou menor diâmetro, baixo índice de polidispersão (PdI) e perfil de distribuição de diâmetro monomodal.

As oito formulações obtidas foram caracterizadas quanto ao diâmetro médio de partícula e índice de polidispersão (PdI). Os diâmetros variaram entre 50 nm e 200 nm e o PdI variou entre 0,1 à 0,3 como apresentado na Tabela 6.

Tabela 6: Matriz do Planejamento Fatorial 2³.

Experimentos	Tipo de lipídeo	Tipo de tensoativo	% de tensoativo	Diâmetro* (nm)	PdI*
F1	-	+	+	148,7	0,248
F2	-	-	+	131,3	0,164
F3	+	+	+	104,2	0,241
F4	+	-	+	132,6	0,133
F5	-	+	-	169,6	0,179
F6	-	-	-	134,9	0,134
F7	+	+	-	176,9	0,232
F8	+	-	-	72,1	0,115

Legenda: *n=2 experimentos

Fonte: Elaborado pelo autor.

Realizou-se análise estatística das interações das variáveis A (tipo de lipídio), B (tipo de surfactante), C (% de surfactante) e das interações combinadas AB, AC, BC e ABC nos fatores resposta diâmetro e PdI como representado na Tabela 7 e 8 (NETO, 2010; CAZO, 2012).

Observa-se na Tabela 7 que apenas a combinação AC (lipídio * % Surfactante) não é significativa no diâmetro, pois apresentou valor de *p* maior que 0,05 e valor de F calculado menor que F₀ (166,23), ou seja, todas as demais variáveis influenciaram diretamente na resposta diâmetro. Já na Tabela 8, verifica-se que apenas as variáveis B (tipo de surfactante) e C (% de surfactante) foram significativas na resposta PdI, visto que apresentaram valor de *p* menor que 0,05 e valor de F calculado maior que F₀ (10,50), assim, estas variáveis influenciam diretamente no PdI das nanopartículas.

Tabela 7: Análise de variância das interações das variáveis: tipo de lipídio, tipo de surfactante e porcentagem de surfactante no fator resposta diâmetro.

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor P
Modelo	7	16660,3	2380,04	166,23	0,000
Tipo de Lipídio (A)	1	2583,2	2583,18	180,41	0,000
Tipo de Surfactante (B)	1	4799,0	4799,03	335,17	0,000
% Surfactante (C)	1	222,8	222,76	15,56	0,004
Interação de 2 variáveis	3	5547,7	1849,24	129,15	0,000
Lipídio*Surfactante (AB)	1	212,4	212,43	14,84	0,005
Lipídio*% Surfactante (AC)	1	2,6	2,64	0,18	0,679
Surfactante*Proporção de Surfactante (BC)	1	5332,7	5332,65	372,44	0,000
Interação de 3 variáveis	1	5307,6	3507,6	244,98	0,000
Lipídio*Surfactante*% Surfactante (ABC)	1	3507,6	3507,6	244,98	0,000
Erro (resíduos)	8	114,5	14,32		
Total	15	16774,8			

Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 8: Análise estatística das interações das variáveis tipo de lipídio, tipo de surfactante e porcentagem de surfactante no fator resposta índice de polidispersão (PdI).

Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor- P
Modelo	7	0,062224	0,008889	10,50	0,002
Tipo de Lipídio (A)	1	0,002550	0,002550	3,03	0,120
Tipo de Surfactante (B)	1	0,044944	0,044944	53,42	0,000
% de Surfactante (C)	1	0,008836	0,008836	10,57	0,012
Interação de 2 variáveis	3	0,004704	0,001568	1,86	0,214
Lipídio*Surfactante (AB)	1	0,004160	0,004160	4,94	0,057
Lipídio*% Surfactante (AC)	1	0,000462	0,000462	0,55	0,480
Surfactante*% Surfactante (BC)	1	0,000081	0,000081	0,10	0,764
Interação de 3 variáveis	1	0,001190	0,001190	1,41	0,268
Lipídio*Surfactante*% Surfactante (ABC)	1	0,001190	0,001190	1,41	0,268
Erro (resíduos)	8	0,006731	0,000841		
Total	15	0,068955			

Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados mostrados no planejamento fatorial foram ilustrados em gráficos de Pareto para os fatores resposta diâmetro e PdI (Figura 8). Os gráficos de Pareto mostram que todos os efeitos que ultrapassam a linha no valor de p calculado de 2,31 para diâmetro e 2,306 para PdI são significantes. Desse modo pode-se confirmar que somente o efeito da interação AC não é significativo para o diâmetro assim como somente os efeitos A e B foram significantes para o PdI.

Figura 8: Gráfico de Pareto dos efeitos padronizados no fatores resposta: A) diâmetro e B) PdI.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os efeitos principais e secundários do fator resposta diâmetro e do índice de polidispersão (PdI) foram calculados e analisados estatisticamente como demonstram as Tabelas 9 e 10. Pode-se observar que a variável A (tipo de lipídio) tem efeito negativo no diâmetro (-25,413 nm) e PdI (-0,02525). Ou seja, quando há mudança do lipídio do nível inferior (-) (Miristato de Miristila (MM)) para o nível superior (+) (Manteiga de Ilipê (MI)) ocorre a redução do diâmetro e PdI o que indica a formação de partículas com diâmetros menores e menos polidispersas. Essa característica é confirmada pela presença de cristais lipídicos na superfície das formulações preparadas com o lipídio MM após processo de resfriamento. A presença desses cristais compromete a estabilidade do sistema e o encapsulamento de fármaco devido redução da quantidade de lipídio disponível para formação das partículas (COSTA, 2005; SAHU *et al.*, 2014).

Tabela 9: Análise estatística dos efeitos principais e secundários do fator resposta diâmetro.

Termo	Efeito	Coefficiente padronizado	Erro padrão	Valor T	Valor-P
Constante		133,394	0,946	141,01	0,000
Efeitos principais					
Tipo de Lipídio (A)	-25,413	-12,706	0,946	-13,43	0,000
Tipo de Surfactante (B)	34,638	17,319	0,946	18,31	0,000
% Surfactante (C)	-7,462	-3,731	0,946	-3,94	0,004
Efeitos secundários					
Lipídio*Surfactante (AB)	7,288	3,644	0,946	3,85	0,005
Lipídio* % Surfactante (AC)	0,813	0,406	0,946	0,43	0,679
Surfactante* % Surfactante (BC)	-36,512	-18,256	0,946	-19,30	0,000
Lipídio*Surfactante* % Surfactante (ABC)	-29,612	-14,806	0,946	-15,65	0,000

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os valores positivos (+) de efeito principal significam aumento das variáveis de resposta e os valores negativos, redução (-) das variáveis de resposta.

Tabela 10: Análise estatística dos efeitos principais e secundários do fator resposta índice de polidispersão (PdI).

Termo	Efeito	Coefficiente padronizado	Erro padrão	Valor T	Valor-P
Constante		0,17275	0,00725	23,82	0,000
Efeitos principais					
Tipo de Lipídio (A)	-0,02525	-0,01262	0,00725	-1,74	0,120
Tipo de Surfactante (B)	0,10600	0,05300	0,00725	7,31	0,000
% de Surfactante (C)	0,04700	0,02350	0,00725	3,24	0,012
Efeitos secundários					
Lipídio*Surfactante (AB)	0,03225	0,01613	0,00725	2,22	0,057
Lipídio* % Surfactante (AC)	0,01075	0,00537	0,00725	0,74	0,480
Surfactante* % Surfactante (BC)	-0,00450	-0,00225	0,00725	-0,31	0,764
Lipídio*Surfactante* % Surfactante (ABC)	-0,01725	-0,00862	0,00725	-1,19	0,268

Fonte: Elaborada pelo autor

Os valores positivos (+) de efeito principal significam aumento das variáveis de resposta e os valores negativos redução (-) das variáveis de resposta.

Em relação ao tipo de estabilizante (variável C), observa-se nas Tabelas 8 e 9 um efeito positivo no diâmetro em 34,638 nm e no PdI em 0,106. Desta forma, quando ocorre a transição do nível inferior (-) para o nível superior (+), isto é, mudando de Tween 80 para Pluronic F68, há um aumento do diâmetro e do PdI. Essa diferença de diâmetro pode estar associada ao tamanho da cadeia do estabilizante e sua massa molar. A massa molar do estabilizante Pluronic é de aproximadamente 1800 g/mol enquanto que a do Tween 80 é de 604,81g/mol. Esse fato é relevante devido ao método de determinação do diâmetro de partículas utilizado já que pelo DLS determina-se o diâmetro hidrodinâmico das partículas que consiste no diâmetro referente à partícula mais a capa estabilizadora (MARCATO, 2009; FLORENCE & ATTWOOD, 2011).

Desta forma, quanto maior a capa de estabilização e/ou quanto mais aberta as cadeias na superfície das partículas, maior será o seu diâmetro hidrodinâmico. Esses dados refletem a importância de como o tipo de estabilizante influencia nas características físicas das nanopartículas. Como demonstrado na Figura 9 A e B, as formulações preparadas com Pluronic F68 (F7 e F3) apresentaram perfil de distribuição de diâmetro bimodal e mais largo em comparação às nanopartículas preparadas com Tween 80, que apresentaram perfil de distribuição de diâmetro monomodal e mais estreito (F8 e F4).

Figura 9: A) Perfil de distribuição de diâmetro da formulação F8 preparada com 1% de Tween 80 (curva verde) e F7, preparada com 1% de Pluronic (curva vermelha). B) Perfil de distribuição de diâmetro da formulação F3 preparada com 1,5% de Pluronic (curva vermelha) e F4 preparada com 1,5% de Tween 80 (curva verde).

Fonte: Elaborada pelo autor.

As propriedades de superfície de carreadores lipídicos estão intrinsicamente relacionadas ao tipo e a concentração do estabilizante utilizado (ÜNER; RADTKE; WISSING, 2007). Concentrações altas de estabilizante podem causar instabilidade na dispersão devido a saturação da camada superficial. Quando isso acontece o estabilizante não consegue mais reduzir a tensão interfacial do sistema e formam pequenos agregados micelares que com o tempo pode causar separação de fases. (FLORENCE & ATTWOOD, 2011).

Desse modo, a porcentagem de estabilizante tem grande influencia nas características físicas das partículas bem como na estabilidade das mesmas. De acordo com as Tabelas 8 e 9 a concentração do estabilizante possui efeito negativo de 7,462 nm para o diâmetro e efeito positivo de 0,047 para o PDI quando compara-se 1,0% de estabilizante com 1,5%. Assim, o aumento da concentração do surfactante resulta na formação de nanopartículas com diâmetros menores que 200 nm, porém mais polidispersas.

Pode-se observar na Figura 10A, um perfil de distribuição de diâmetro monomodal para as partículas da formulação F8, preparada com 1% de estabilizante Tween 80 (curva verde) e F4, preparada com 1,5% de estabilizante Tween 80 (curva vermelha). Porém, a formulação F4 apresentou-se mais polidispersa por causa do alargamento do perfil de distribuição. O mesmo padrão pode ser observado na figura 10B que mostra o perfil de distribuição de diâmetro da formulação F5, preparada com 1% de Pluronic (curva vermelha). Entretanto, o aumento da porcentagem de Pluronic F68 para 1,5% ocasionou o alargamento do perfil de distribuição de diâmetro e uma distribuição bimodal (formulação F1) (curva verde).

Figura 10: A) Perfil de distribuição de diâmetro da formulação F8 preparada com 1% de Tween 80 (curva verde) e F4, preparada com 1,5% de Tween 80 (curva vermelha). B) Perfil de distribuição de diâmetro da formulação F5 preparada com 1% de pluronic (curva vermelha) e F1 preparada com 1,5% de pluronic (curva verde).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Pelos resultados analisados do planejamento experimental a formulação F8, composta por manteiga de illipê (MI) e 1% de Tween 80, foi a formulação que apresentou menor diâmetro (abaixo de 75 nm) e PdI (abaixo de 0,15), perfil de distribuição de diâmetro monomodal e não apresentou cristais lipídicos, indicando que esta é a melhor composição para a produção das partículas. Nesta composição são preparados carreadores lipídicas nanoestruturados (CLN) imperfeitos visto que a MI é composta por uma mistura de lipídios, o que gera imperfeições nas partículas e, consequentemente, aumenta a capacidade da partícula em encapsular fármaco além de evitar a expulsão do ativo durante a estocagem (TAMJIDI et al., 2013).

A literatura tem mostrado que NLS e CLN possuem uma particularidade de não serem estáveis em tempos prolongados quando em suspensão por processos de gelificação e cristalização do sistema (MARCATO, 2009; GESZKE-MORITZ, 2016). Por isso, se faz necessário a avaliação da estabilidade das nanopartículas. Desta forma, foi verificada a estabilidade física das 8 formulações do planejamento fatorial por período de 42 dias. O conjunto de gráficos de diâmetro e PdI em função do tempo das partículas estão apresentados na Figura 11. Nesta figura observa-se a formulação F8 foi a nanopartícula que apresentou menor diâmetro e PdI, mantendo as mesmas características físicas pelo período de tempo avaliado, confirmando escolha da F8 no planejamento fatorial.

Figura 11: Diâmetro e índice de polidispersão (PdI) em função do tempo das nanopartículas obtidas pelo planejamento fatorial 2^3 .

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Caracterização do carreador lipídico nanoestruturado (CLN) otimizado

A distribuição do diâmetro dos CLN foi determinada pela técnica de espalhamento de luz dinâmico onde é possível medir o diâmetro hidrodinâmico de nanopartículas em suspensão. A CLN (F8) obtida pelo planejamento fatorial apresentou diâmetro médio de aproximadamente $70,2 \pm 2,9$ nm com um índice de polidispersão (PdI) de $0,112 \pm 0,008$ ($n=3$). As análises de potencial zeta avaliadas pelo espalhamento de luz eletroforético indicaram a obtenção de partículas com carga superficial negativa de aproximadamente -10 mV. Apesar do valor do potencial zeta ser baixo, a formulação F8 mostrou-se estável no período avaliado (42 dias). Esta alta estabilidade dos CLNs, apesar do baixo valor da carga superficial das partículas, deve-se a estabilidade por impedimento estérico que o Tween 80 confere as partículas (PALLA & SHAH, 2002).

4.3.1 Otimização da concentração do extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (EA) encapsulado

A capacidade de encapsulamento do CLN foi testada adicionando-se concentrações crescentes de glicoalcalóides entre 250 à 1000 $\mu\text{g/mL}$. As dispersões foram avaliadas quanto ao diâmetro, PdI, potencial zeta, homogeneidade das dispersões e eficiência de encapsulamento. A Figura 12 apresenta os resultados de diâmetro, PdI e potencial zeta dos CLN preparadas com diferentes concentrações de extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (EA).

Pode-se observar na Figura 12 que o aumento da concentração de EA influenciou nos valores de diâmetro dos CLN e principalmente no PdI. Dentre os CLN-EA avaliados, a formulação contendo 1000 $\mu\text{g/mL}$ de EA (equivalente a 20 mg de EA) apresentou diâmetro de aproximadamente 90 nm e PdI acima de 0,3, indicando uma formulação mais polidispersa e, portanto, destacando-se das demais. Não foi observado variação no diâmetro e PdI dos CLN contendo 400 a 600 $\mu\text{g/mL}$ de EA (equivalente a 8 mg à 10 mg de EA). No entanto, estas formulações apresentaram perfil de distribuição de diâmetro com bandas largas e perfil bimodal com picos micrométricos, caracterizando assim formulações mais polidispersas (Figura 13). Já os CLNs contendo 250 $\mu\text{g/mL}$ de EA (equivalente a 5 mg) apresentaram perfil de diâmetro monomodal (Figura 13, curva vermelha).

Desta forma, os resultados sugerem que a quantidade máxima de EA que pode ser encapsulada nos CLN é 5 mg (250 $\mu\text{g/mL}$) já que as características físicas das partículas de diâmetro, perfil de distribuição de diâmetro e PdI foram similares ao da partículas sem EA como mostra a Tabela 11 e Figura 14. Pode-se observar que ambas as dispersões, CLN vazia e CLN-EA, apresentaram perfil de distribuição de diâmetro monomodal e que a CLN-EA apresentou um pequeno deslocamento para esquerda, isto é menor diâmetro em relação a CLN vazia. Esta diminuição do diâmetro provavelmente está relacionada à presença do extrato alcaloídico rico em solasonina e solamargina. Esses glicoalcalóides apresentam em sua estrutura química uma parte polar, formada pela cadeia de açúcares, e outra apolar, formada pelo núcleo esteroidal. Isto confere ao EA característica anfifílica como a de tensoativos contribuindo para a redução do diâmetro das nanopartículas.

Figura 12: A) Diâmetro e índice de polidispersão (PdI) dos CLN em função da concentração extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (EA); B) Potencial zeta dos CLN em função da concentração do EA.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 13: Distribuição de diâmetro do CLN-EA com 250 $\mu\text{g/mL}$ do extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (EA) (curva vermelha) e CLN-EA com 750 $\mu\text{g/mL}$ de EA (curva verde).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 11: Diâmetro, índice de polidispersão (PdI) e potencial zeta das NLS com e sem extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (EA) com respectivos desvios padrão (n=3).

CLN	Diâmetro (nm)	DP*	PdI	DP	Potencial zeta (mV)	DP*
CLN	72,2	2,9	0,112	0,008	-10,22	0,65
CLN – EA	56,81	1,1	0,17	0,02	-13,05	2,52

*DP- desvio padrão

Figura 14: Perfil de distribuição de tamanho dos CLN com extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (EA) (curva verde) e dos CLN sem EA (curva vermelha).

Fonte: Elaborada pelo autor.

A eficiência de encapsulação (EE) de solasonina (SS) e solamargina (SM) foram $86,03 \pm 2,94\%$ e $89,12 \pm 2,47\%$ respectivamente, quando 5 mg de EA foi utilizado na preparação de CLN. Este resultado demonstra a alta eficiência de encapsulamento dos CLN imperfeito que é favorecida por apresentarem imperfeições na partícula devido a mistura de lipídios presente na MI e devido a alta lipofilicidade do EA.

As dispersões de CLN podem ser estáveis por até um ano de estocagem, porém a luz e temperatura influenciam diretamente na sua estabilidade sendo as mesmas armazenadas à 4°C (GESZKE-MORITZ & MORITZ, 2016). Por isso, se faz necessário avaliar a estabilidade dos CLN contendo o extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (EA). O CLN escolhido durante planejamento fatorial (F8) com o EA foi submetida ao estudo de estabilidade por 60 dias. Foram avaliadas o diâmetro, PdI e potencial zeta. Conforme mostra a Figura 15, mesmo após 60 dias, o diâmetro, PdI e potencial zeta não apresentaram diferenças significativas com o tempo, para nível de confiança de 95% com $p > 0,05$.

Figura 15: A) Valores de diâmetro e índice de polidispersão (PdI) de carreador lipídico nanoestruturado com extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (CLN-EA) em função do tempo; B) Potencial zeta do CLN-EA em função do tempo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.2 Avaliação da influência do pH no diâmetro e potencial zeta de CLN-EA

A Figura 16 apresenta o gráfico de variação de diâmetro e potencial zeta das nanopartículas lipídicas com extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (CLN-EA) em função do pH. Pode-se observar que o diâmetro não variou com o aumento do pH enquanto que o potencial zeta tornou-se mais negativo em módulo. Porém esta variação não foi significativa. Assim, os resultados indicam a alta estabilidade dos CLN frente as alterações de pH.

Figura 16: Perfil de diâmetro e potencial zeta dos CLN-EA em função do pH.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.3 Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

O DSC é uma técnica que tem sido empregada na obtenção de informações sobre a cristalinidade das nanopartículas e das interações com os componentes da mesma. Cabe ressaltar que o estabilizante Tween 80 por apresentar-se líquido à temperatura ambiente não foi analisado isoladamente por DSC (COSTA, 2005; BUNJES, 2007).

A Figura 17 mostra os termogramas obtidos dos carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) sem e com o extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (EA), bem como, os termogramas da manteiga de Illipê (MI) e do EA livre. Pode-se observar que o lipídio MI puro apresenta apenas um pico endotérmico em 36,35°C (Tabela 12). Pode-se constatar também que o pico endotérmico demonstrado nos termogramas do CLN com e sem EA são pertinentes ao pico de fusão da MI pura ($\approx 34^\circ\text{C}$) (Tabela 12). Esse deslocamento da temperatura de fusão do lipídio está relacionado ao tamanho reduzido da partícula e consequente aumento da sua área superficial, sendo este evento conhecido como pré-fusão ou efeito Kevin, caracterizado pela diminuição da temperatura de fusão de partículas isoladas em relação ao material puro (MARCATO, 2009; SURESH et al., 2007).

Figura 17: Termogramas do extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (EA), Manteiga de Illipê (MI), Carreador lipídico nanoestruturado (CLN) vazio e com EA (CLN-EA).

Fonte: Elaborada pelo autor.

As nanopartículas lipídicas sólidas e os carreadores lipídicos nanoestruturados podem sofrer mudanças na estrutura cristalina durante a sua estocagem saindo de uma forma cristalina menos organizada (α) para uma forma cristalina mais organizada (β) com consequente expulsão do ativo encapsulado. Além disso, a produção de partículas muito cristalina, na forma polimórfica β , reduz a quantidade de fármaco encapsulado (LIU et al., 2007; SCHOENITZ et al., 2014). Desta forma, a avaliação da cristalinidade das partículas é muito relevante no desenvolvimento de formulações de NLS e CLN.

Na Tabela 12 pode-se observar que o índice de recristalização (IR) para o CLN com e sem EA foi inferior a 48% demonstrando o caráter pouco cristalino das partículas. Essa característica permite encapsular uma maior quantidade de ativo nos espaços entre as cadeias lipídicas do lipídeo MI e proporciona estabilidade em prevenir a expulsão do fármaco do CLN durante a estocagem (MARCATO, 2009; SALMINEN et al., 2014). Além disso, pode-se observar-se que quando os EA foram encapsulados no CLN o IR aumentou indicando uma maior cristalinidade destas partículas em relação ao CLN vazio. Esta diferença provavelmente ocorre pois, o ativo ocupa os defeitos da estrutura cristalina das partículas ou regiões amorfas, aumentando, assim, a cristalinidade das mesmas.

Tabela 12: Valores de entalpia, ponto de fusão e índice de recristalização do CLN com e sem extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (EA) e do lipídio sólido manteiga de Illipê (MI).

Material	Entalpia (J/g)	Ponto de fusão (°C)	Índice de recristalização (IR)
MI	135,7406	36,35	100
CLN	55,7829	33,89	41,1
CLN-EA	64,1172	34,26	47,23

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.4 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

O NTA avalia a distribuição de tamanho das partículas bem como a concentração de partículas na dispersão. A Figura 18 mostra o perfil de distribuição das nanopartículas com e sem EA. Pode-se observar que a adição do EA diminuiu o número de populações com diâmetro de partículas acima de 200 nm apresentando um perfil de diâmetro mais homogêneo. Esta diferença pode ser explicada pela característica anfifílica da SS e SM como discutido anteriormente. Foi obtido ainda pelo NTA, a concentração de partículas nas dispersões, sendo de $9,741 \times 10^{11}$ partículas/mL para CLN-EA e $8,26 \times 10^{11}$ partículas/mL para CLN vazia. A determinação da concentração de partículas é um parâmetro relevante para os estudos *in vitro* e *in vivo* já que a métrica recomendada é partículas/volume (KONG et al., 2011).

Figura 18: Perfil 3D da distribuição de diâmetro de CLN vazio (A) e CLN com extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (EA) (B) e perfil 2D de distribuição de diâmetro de CLN vazio (C) e CLN-EA (D).

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.5 Microscopia de força atômica AFM

A Figura 19 apresenta imagem de microscopia de força atômica (AFM) de CLN-EA. A dispersão de CLN-EA apresentou formato semiesférico. Usualmente os formatos das nanopartículas lipídicas são diretamente influenciados pela composição lipídica da matriz, podendo ser esferoidais, anisométricas ou achatadas. A existência de forma específica é determinada pelo tamanho da partícula. Partículas menores tendem a formar arranjos cristalinos mais compactos enquanto que partículas maiores apresentam formas polimórficas (BUNJES, 2007; MAZURYK, 2016).

Figura 19: Imagem topográfica em 3D de AFM de CLN-EA.

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.6 Avaliação do perfil de liberação *in vitro* do extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (EA)

A análise do perfil de liberação *in vitro* é interessante para obter informações sobre a disposição do fármaco nos sistemas de carregamento. O EA por possuir compostos lipofílicos (SS e SM) tende a se distribuir no núcleo lipídico da nanopartícula quando encapsulados. No entanto durante a obtenção do CLN parte dos glicoalcalóides (SS e SM) pode manter-se livre na dispersão lipídica e/ou apresentar-se adsorvido na superfície das nanopartículas. O perfil de liberação de um fármaco pode apresentar uma liberação inicial rápida ou “burst” seguida de uma liberação lenta e constante. Neste caso, o “burst” corresponde a parte do fármaco que está adsorvida na superfície do carreador ou não encapsulado; e a liberação lenta e constante refere-se ao fármaco que está encapsulado na nanopartícula. O burst só é indicado quando há necessidade de rápido início de ação do fármaco (MATTOS, 2013).

A Figura 20 mostra o perfil de liberação acumulado em porcentagem de SS e SM. Nesta figura, pode-se observar uma liberação sustentada dos glicoalcalóides SS e SM após 36 horas mantendo-se sustentada até fim do ensaio. SS e SM apresentaram liberação máxima de 10,9% em 36 h e 12,2% em 42h, respectivamente.

Figura 20: Perfil de liberação *in vitro* de solanonina (SS) e solamargina (SM) encapsulados em carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) em função do tempo.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Inicialmente, a liberação de SS foi maior do que SM para um mesmo período de tempo. Isso se deve, provavelmente, ao fato de a SS possuir menos interação com o núcleo lipídico já que apresenta estrutura química mais polar que SM devido ao maior número de hidroxila na cadeia de açúcares. Após 24 h, SM apresentou liberação maior do que SS mantendo-se constante até 54 h. Este resultado pode ser explicado pelo fato de a quantidade de SM ser maior que SS no extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (EA).

Os dados obtidos a partir do perfil de liberação do EA foram ajustados a modelos matemáticos para avaliar a cinética de liberação dos glicoalcalóides SS e SM. Os dados foram ajustados a modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Hixson-Crowell e Peppas-Korsmeyer. Na Tabela 13, é possível observar o coeficiente de correlação ajustado (R^2_{adj}) para os modelos cinéticos.

SS apresentou correlação próxima a 0,99 no modelo de difusão Peppas-Korsmeyer. Este modelo tem sido utilizado para a cinética de liberação do fármaco, em formas farmacêuticas de liberação controlada. Com este modelo pode-se calcular o valor de n que corresponde à natureza do mecanismo de liberação, isto é, se segue modelo de difusão de Fick ou não. SS segue modelo não-Fickiano de transferência de massa com $n = 0,888$. No modelo não-Fickiano a difusão envolve uma combinação de fenômenos de difusão (transporte Fickiano) e erosão (transporte de caso II) controlada. SM apresentou uma alta correlação ($R^2_{adj}=0,985$) com modelo de difusão de Higuchi. Este modelo tem sido utilizado para fármacos lipofílicos e hidrofílicos incorporados em matrizes sólidas e semi-sólidas utilizando

processo de difusão baseado na lei de Fick. Geralmente descreve a dissolução de fármacos a partir de formas farmacêuticas de liberação modificada, como sistemas transdérmicos (COSTA; LOBO 2001; COSTA, 2002).

Tabela 13: Coeficientes de correlação ajustado (R^2 adj) de análise de dados da cinética de liberação da solasonina (SS) e solamargina (SM) encapsulados em CLN.

Modelos matemáticos (R^2 adj)	CLN-EA	
	SS	SM
Ordem Zero	0,703	0,965
Primeira ordem	0,257	0,377
Higuchi	0,936	0,985
Hixson-Corwell	0,790	0,947
Peppas-Koresmeyer	0,946	0,945

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3.7 Ensaio de mucoadesão *in vitro*

Sistemas de carreamento de fármacos que apresentam mucoadesão podem prolongar o tempo de residência do ativo no local de ação mediante contato com a mucosa. Essa interação com a mucosa ocorre por estímulos como mudanças do pH, força iônica e temperatura, que propiciam alteração da estrutura do muco que facilita a interação com sistema de carreamento. O principal componente da mucosa é a mucina, que é composta por proteínas fortemente glicosiladas com característica-chave de formar géis, servindo como barreira química contra degradação proteolítica. A interação da nanopartícula com a mucina está diretamente relacionada com a estrutura química do polímero/lipídio utilizado na formação da nanopartícula. Grupos hidroxila, carboxila ou amina contribuem para ligações de hidrogênio com a mucina. Polímeros com grupos ionizáveis atuam com interação eletrostática com o muco carregado negativamente. (CARVALHO; CHORILLI; GRAMIÃO, 2014).

Existem diferentes teorias relacionadas ao processo de mucoadesão que envolvem a teoria da molhabilidade, onde componentes com baixa viscosidade ligam-se à superfície devido à mudança na energia superficial e interfacial; teoria da adsorção, no qual o sistema permanece conectado a mucosa por ligações de hidrogênio e de van der Waals; teoria eletrônica em que a interação ocorre quando a mucosa e o sistema apresentam diferentes

cargas superficiais, entre outros. No entanto, mecanismo básico envolvido na mucoadesão é dividido em contato direto do sistema mucoadesivo e a membrana promovendo a molhabilidade e o intumescimento do sistema, e a penetração do sistema no tecido ou mucosa. (MANSURI et al., 2016)

Existem vários métodos *in vitro* e *in vivo* para avaliar se um sistema nano ou microestruturado apresenta propriedades mucoadesiva como, por exemplo, técnicas baseadas na reologia dos materiais, na utilização de equipamento de imagem, testes colorimétricos, avaliação da força de escoamento e deslocamento, turbidimétricos entre outros (BONFERONI, 2010; MANSURI et al., 2016).

Neste estudo, foi utilizando o método colorimétrico de coloração de ácido periódico-Schiff (PAS). Neste método o ácido periódico oxida os resíduos de glicose da mucina produzindo aldeídos que ao entrarem em contato com o Reagente de Schiff produzem uma alteração na coloração (rosa/púrpura) que absorve no comprimento de onda de 555 nm, sendo a coloração proporcional à concentração de mucina (RIBEIRO, 2013). Esta reação PAS está demonstrada abaixo.

1º Etapa: Reação de oxidação

Mucina apresenta grupamento 1,2 glicol ($[-CHOH]_2$) $\longrightarrow$ Dialdeído ($[-CHO]_2$)

2º Etapa: Reação de Schiff

Dialdeído ($[-CHO]_2$) + Reagente de Schiff $\longrightarrow$ Coloração rosa/pupura

Primeiramente, foi obtida uma curva analítica de mucina em água ultrapura. Pode-se observar que o método foi linear com coeficiente de correlação acima de 0,99 como exigido pela RE 899/2003 (Figura 21). Assim, a curva foi utilizada na interpolação de valores experimentais, visando à determinação quantitativa de mucina livre. A equação da reta foi $y = 1,3125x + 0,1307$.

Figura 21: Curva analítica da mucina.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Posteriormente, foi realizada a análise de interação de concentrações crescentes de mucina com o CLN. Este ensaio mostrou-se irreprodutível, pois apresentou resultados de mucina livre maiores que de mucina adicionada ao sistema, obtendo-se porcentagem de adsorção de mucina negativa. BAPTISTA (2013) relatou o mesmo em seus experimentos com nanopartículas de gelucire-peceol interpretando este fenômeno como interferência da nanopartícula com o reagente de Schiff. Esta interferência pode ser observada na Figura 22, em que os CLNs sem acréscimo de mucina apresentam coloração rosa quando submetidas à reação PAS.

Figura 22: Coloração de amostras: A) carreador lipídico nanoestruturado (CLN) após interação com 0,5mg/mL mucina e reação de PAS; B) CLN após interação com 0,25 mg/mL de mucina e reação de PAS; C) CLN sem adição de mucina e após a reação de PAS.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Diante disso, buscou-se verificar se a adição de mucina à dispersão lipídica promoveria interação superficial mucina-CLN com a verificação do aumento do diâmetro das mesmas após adição de mucina pela técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS). Por

consequente, foi adicionado 1 mL de mucina (4 mg/mL) em 1mL de CLN sob agitação magnética por 30 minutos, após esse período o diâmetro das partículas foi medido por DLS para verificar se houve aumento do diâmetro das nanopartículas mediante a adição de mucina ao sistema (Figura 23).

A mucina apresentou um perfil de distribuição de diâmetro bimodal com população com diâmetro médio de 1753 nm (Figura 23A, curva verde). O perfil de distribuição de diâmetro de CLN-mucina foi bimodal com 86,7% das partículas com diâmetro médio de 70,46 nm que corresponde ao CLN e 12,3% com diâmetro médio de 288,1 nm correspondente à interação CLN-mucina. Desta forma, pode-se inferir que a CLN apresentou propriedade mucoadesiva devido aumento do diâmetro das partículas quando em contato com a mucina.

Figura 23: A) Perfil de distribuição do diâmetro da CLN-mucina (curva em vermelho) e solução de mucina a 2 mg/ml (curva em verde); B) Perfil de distribuição do diâmetro da CLN-mucina (curva em vermelho) e CLN vazia (curva em verde).

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.8 Citotoxicidade *in vitro* do EA livre e encapsulado em CLN em células de câncer de bexiga

O estudo de citotoxicidade *in vitro* dos glicoalcalóides na forma livre e encapsulados em CLN foi realizado por ensaio de captura de vermelho neutro por se tratar de um método mais sensível e de custo reduzido em comparação a outros testes que utilizam enzimas, proteínas e sais de tetrazólio. O mecanismo do método visa determinar a viabilidade através da incorporação do corante nos lisossomos de células viáveis. Essa incorporação acontece, pois

nos lisossomos existem gradientes de prótons que mantem o pH inferior ao do pH citoplasmático, aprisionando o corante (REPETTO; DEL PESO; ZURITA, 2008; BARBOSA, 2013).

Não tem sido relatado até o presente momento estudos sobre o potencial citotóxico dos glicoalcalóides no câncer de bexiga. No entanto, Segundo CHAM (2013), os glicoalcalóides, especialmente a mistura padronizada de SS e SM, em estudos *in vitro*, apresentaram atividade citotóxica específica em várias linhagens de células cancerígenas, como a de mama, pele, fígado, cólon, próstata, ovário e rins. Por isso, realizou-se uma triagem para escolher a faixa de concentração do extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (EA) que se aproximasse do IC₅₀ em células RT4. Utilizou-se uma faixa de concentração ampla de 300 µg/mL à 2,3 µg/mL do EA em células de câncer de bexiga (Figura 24).

Na Figura 24 observa-se que o EA reduz a viabilidade celular de células RT4 de forma dose-dependente, apresentando IC₅₀ de 15,24 µg/mL. O IC₅₀ indica a quantidade do ativo necessária para inibir um processo biológico em 50%, ou seja, a concentração do fármaco que lisa 50% das células. Os valores de IC₅₀ obtidos variam de acordo com o tipo de célula usado no ensaio e a sua determinação é importante para reduzir o número de animais necessários nos ensaios *in vivo*.

De acordo Instituto Nacional do Câncer extratos de plantas com valores de IC₅₀ menores que 30 µg/mL são considerados ativos (ITHARAT et al., 2004). Assim, este resultado indica que o EA é ativo em células de câncer de bexiga RT4 indicando o seu potencial no tratamento deste tipo de câncer. O uso de outros extratos de plantas tem sido relatado no tratamento de câncer de bexiga não músculo invasivo. ROSE et al (2015) em estudo clínico de fase I, avaliou a instilação intravesical do extrato de visco da família *Viscaceae* em 36 pacientes e observou que o extrato foi seguro e bem tolerado. Tetrandrina, isolada da raiz da planta *Stephania tetrandra* foi citotóxica frente células de câncer de bexiga T24 e 5637, induzindo apoptose e crescimento celular via ativação de caspases (LI et al., 2011).

Em outro estudo, a fração purificada da planta *Uncaria tomentosa*, rica em polifenóis e alcalóides também foram avaliados quanto à citotoxicidade em células de câncer de bexiga T24. Pode-se observar que a fração purificada diminuiu viabilidade celular e induziu apoptose com ativação da caspase-3 e fator de necrose tumoral (DIETRICH et al., 2014). A Figura 25 mostra a foto das células RT4 após tratamento com diferentes concentrações do EA representando o efeito citotóxico dose-depende do EA.

Figura 24: Viabilidade de células RT4 tratadas com diferentes concentrações do extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (EA). CN: controle negativo (célula + meio de cultura), CP: controle positivo (10% DMSO)

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 25: Foto das células RT4 em aumento de 10x após 24 horas de tratamento com extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (EA) nas concentrações de 5 µg/mL (A); 12 µg/mL (B) e 20 µg/mL (C).

Fonte: Elaborada pelo autor.

Alguns estudos sugerem que a raminose presente na cadeia de açúcares da SM e SS, tem relação direta com o potencial citotóxico dos glicoalcalóides em linhagens celulares. Já

que a solasodina (aglicona da SM e da SS) não apresenta efeito citotóxico em células de câncer (DAUNTER & CHAM, 1990; CHANG et al, 1998; MUNARI et al., 2012). O mecanismo de ação dos glicoalcalóides ainda não foi claramente elucidado, no entanto, há pesquisas que mostram o efeito antiproliferativo e apoptótico da SS e SM em células multirresistentes à fármacos, osteosarcomas e câncer de mama (XIA, 2011; LI, 2011; LI, 2016).

Tem se relatado que a SS e SM promovem ativação de fatores de necrose tumoral (TNF), desencadeando uma cascata de reações que provocam a morte celular (PUNJABI et al., 2008). LI et al., em 2011, demonstrou efeito apoptótico da SM em osteosarcomas mediada por mitocôndrias com mecanismos dependente e independente da transcrição do p53. Enquanto que LI et al., em 2016 demonstrou efeito antiproliferativo da SS em células Bcap-37 pela regulação dos níveis das proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-xL e pró-apoptóticas Bax.

Após triagem, realizou-se o ensaio na faixa de concentração escolhida de 5 – 20 µg/mL do EA livre e encapsulado em CLN. Na Figura 26 pode-se observa o efeito citotóxico dose-dependente do EA na sua forma livre e encapsulada após 24h (A), 48h (B) e 72h (C) de tratamento. Os IC₅₀ calculados para o EA livres e encapsulados estão representados na Tabela 14 para cada tempo de tratamento.

Analizando a Figura 26 e a Tabela 14 observa-se que o EA livre apresentou um efeito citotóxico maior que a formulação com EA encapsuladaa em CLN. Este resultado pode estar relacionado com o tempo de estímulo escolhido (24h) que pode ter sido insuficiente para que os glicoalcalóides SS e SM fossem liberados dos CLNs (LEE et al., 2004; MIRANDA, 2013). O mesmo não ocorre após 48 h e 72 h de tratamento, observando-se que o EA encapsulado apresentou ação citotóxica maior do que EA livre. Este resultado pode estar relacionado com o perfil de liberação dos glicoalcalóides das nanopartículas. CHEN et al (2016), observou que que cloridrato de topotecan apresentou maior citotoxicidade em células de cancer do colo do útero HeLa e SiHa quando encapsulado em NLS do que na forma livre, após 48h e 72h de tratamento. Esse evento foi atribuído à taxa gradual de liberação do fármaco a partir da nanopartícula resultando em um início de ação tardio.

Figura 26: Viabilidade de célula RT4 tratadas com extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (EA) livre e encapsulado em CLN (CLN-EA).

A) 24 h

B) 48 h

C) 72 h

Fonte: Elaborada pelo autor.

Tabela 14: Valores de IC₅₀ do extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum* (EA) livre e encapsulado em CLN em diferentes tempos de tratamento.

Tempo	IC ₅₀		
	24h	48h	72h
EA livre	12,33 ± 0,58 µg/mL	13,39 ± 0,32 µg/mL	13,03 ± 0,34 µg/mL
CLN-EA	14,26 ± 0,68 µg/mL	12,35 ± 0,60 µg/mL	12,66 ± 0,12 µg/mL

Fonte: Elaborado pelo autor.

Observa-se na Figura 27, que os CLN vazios apresentaram viabilidade celular superior a 98% nas mesmas diluições usadas para as concentrações de CLN contendo EA, demonstrando assim, que o CLN não influencia na ação citotóxica do EA.

Figura 27: Viabilidade células tratadas com CLN vazia nas mesmas diluições das concentrações utilizadas para CLN-EA.

Fonte: Elaborada pelo autor

5. CONCLUSÕES

- O carreador lipídico nanestruturado imperfeito (CLN) otimizado no planejamento fatorial apresentou diâmetro em torno de 70 nm com índice de polidispersão inferior a 0,2, potencial zeta negativo e morfologia semiesférica.
- O método de preparação do CLN foi favorável ao encapsulamento do extrato alcaloídico *Solanum lycocarpum* (EA), rico em glicoalcalóides solanonina (SS) e solamargina (SM), obtendo uma alta eficiência de encapsulamento dos glicoalcalóides SS (89%) e SM (86%).
- As nanopartículas apresentaram baixo índice de recristalização indicando organização mais amorfa do núcleo lipídico favorecendo o encapsulamento dos glicoalcalóides SS e SM.
- O encapsulamento do EA influenciou nas propriedades físicas das nanopartículas, reduzindo o diâmetro dos CLNs e formando uma dispersão menos polidispersa, devido, provavelmente, a característica anfifílica dos glicoalcalóides.
- A metodologia utilizada para avaliação da mucoadesão foi inaplicável para esse tipo de nanopartículas, pois os CLN vazios interferiram no método colorimétrico. Porém no estudo qualitativo por espalhamento de luz dinâmico, foi verificado um aumento do diâmetro do CLN quando o mesmo foi exposto à mucina indicando a propriedade mucoadesiva destas partículas.
- O perfil de liberação *in vitro* dos glicoalcalóides SS e SM encapsulados em CLN demonstrou-se sustentado até 54 h.
- O EA demonstrou ser ativo frente à célula de câncer de bexiga RT4 apresentando um IC₅₀ de 10,94 µg/mL.
- Desta forma, CLN-EA pode ser considerado um sistema pertinente para a futura terapia do câncer de bexiga.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADIYAT, K. T.; KATKOORI, D.; SOLOWA, M.S. Intravesical Chemotherapy. In: **Bladder Tumors: Molecular Aspect and Clinical Management**. Editores: Lokeshwar, V.B., Merseburger, A.S., Hautmann, S.H., Editora: Human Press; p. 253- 270, 2010.

AMBRÓSIO, S.R. et al. Kaurane and pimarane-type diterpenes from the *Viguiera* species inhibit vascular smooth muscle contractility. **Life Sciences**. v. 79, p. 925-933. 2006.

ANTANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. **Biotechnology Advances**. v. 33, p. 1582-1614. 2015.

ANVISA. Diário Oficial da União. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos realização. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, RE nº889, 2003.

AOAC, Association of Official Analytical Chemists. Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. 2002.

BAERT, B. et al. A New Discriminative Criterion for the Development of Franz diffusion Tests for Transdermal Pharmaceuticals. **Journal Pharmaceutical Science**. v. 13, p. 218 – 230. 2010.

BALUNAS, M.J.; KINGHORN, A.D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**. v. 78, p. 431-441, 2005.

BAPTISTA, B. **Ensaio de mucoadesão em sistemas híbridos nanoestruturados**. 2013. 137. Mestrado em Farmácia – Instituto superior de tecnologia da saúde de Lisboa. Lisboa, Portugal.

BARBOSA, R. M. et al. Cytotoxicity of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers containing the local anesthetic dibucaine designed for topical application. **Journal of Physics: Conference Series**. v. 429, p. 1-8, 2013.

BÉZIVIN, C. et al. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**. v. 10, p. 499-503, 2003.

BIOACTIVE natural products in cancer prevention and therapy: Progress and promise. In: **Seminars in Cancer Biology**. Elsevier, p. 40–41. 2016.

BLANKEMEYER, J. T. et al. Developmental toxicology of solamargine and solasonine glycoalkaloids in frog embryos. **Food Chemistry Toxicology**. v. 36, p. 383-389. 1998.

BONFERONI, M. C. et al. Comparison of different in vitro and ex vivo methods to evaluate mucoadhesion of glycol-palmitoyl chitosan micelles. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**. v. 20, p. 419-424, 2010.

BÜYÜKKÖROĞLU, G. et al. Preparation and in vitro evaluation of vaginal formulations including siRNA and paclitaxel-loaded SLNs for cervical cancer. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 109, p. 174–183. 2016.

CAPAZ, F. R.; SABAN, R.; BONAMINI, L. V. **Vias de administração de fármacos**. In: Farmacologia Integrada, São Paulo: Editora Atheneu; v. 1, p. 21-32, 1988.

CARVALHO, F. C. CHORILLI, M. GRAMIÃO, M. P. D. Plataformas Bio(muco) adesivas poliméricas baseadas em nanotecnologia para liberação controlada de fármacos – propriedades, metodologias e aplicações. **Polímeros**. v.24, p. 203-213. 2014.

CHAM, B. E. Drug therapy: Solamargine and other solasodine rhamnosyl glycosides as anticancer agents. **Modern Chemotherapy**. v. 9, p. 33-49. 2013.

CHAM, B. E. Solasodine glycosides as anti-cancer agents: Pre-clinical and clinical studies. **Journal of Pharmacology**. v. 9, p. 113-118. 1994.

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

CHAM, B. E.; DAUNTER, B. Solasodine glycosides. Selective cytotoxicity for cancer cells and inhibition of cytotoxicity by rhamnose in mice with sarcoma 180. **Cancer Letters**. v. 55, p. 221-225. 1990.

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

CHANG, L. C. et al. The rhamnose moiety of solamargina plays a crucial role in triggering cell death by apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 242, p. 21-25, 1998.

CHEN, Z. et al. Development and evaluation of topotecan loaded solid lipid nanoparticles: A study in cervical cancer cell lines. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 165, p. 182-188. 2016.

COSTA, I. M. **Estudo de pré-formulação com o composto polifenólico quercetina**. 2005. 192p. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas – UFRGS, Rio Grande do Sul.

COSTA, P. J. Avaliação in vitro da bioequivalência de formulações farmacêuticas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 38, n. 2, p. 141-153. 2002.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 13, p. 123-133. 2001.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- General Subjects**. v. 1830, p. 3670-3695. 2013.

CROTTI, A. E. M. et al. Espectrometria de massas com ionização por electrospray: processo químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**. v. 29, p. 287-292. 2006.

CUNICO, M. W. M. et al. Planejamento fatorial: uma ferramenta estatística valiosa para a definição de parâmetros experimentais empregados na pesquisa científica. **Visão Acadêmica**. v. 9, n. 1. 2008.

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

DEMARQUE, D.P. et al. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**. v. 33, p. 367-524. 2016.

DIETRICH, F. et al. Quinovic acid glycosides purified fraction from *Uncaria tomentosa* induces cell death by apoptosis in the T24 human bladder cancer cell line. **Food and Chemical Toxicology**. v. 67, p. 222-229. 2014.

DING, X. et al. Induction of apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells by solamargine from *Solanum nigrum* L. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 139, p. 599– 604. 2012.

DISTIL, M.; WINK, M. Identification and Quantification of Steroidal Alkaloids from Wild Tuber Bearing *Solanum* Species by HPLC and LC-ESI-MS. **Potato Research**. v. 52, p. 79-104. 2009.

FERNANDES, R.S. et al. Doxorubicin-loaded nanocarriers: A comparative study of liposome and nanostructured lipid carrier as alternatives for cancer therapy. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 84, p. 252–257. 2016.

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

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. 2ª ed. São Paulo: Phamabooks, 2011. 690p.

FREITAS, C., MÜLLER, R.H. Correlation between long-term stability of solid lipid nanoparticles (SLN) and crystallinity of the lipid phase. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 47, p. 125–132, 1999.

GANI, S. S. A. et al. Engkabung fat esters for cosmeceutical formulation. **Journal Surfactant Detergent**. v. 14, p. 227-233. 2011.

GESZKE-MORITZ, M.; MORITZ, M. Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles: composition, properties and therapeutic strategies. **Materials Science and Engineering C**. v. 68, p. 982-994. 2016.

GLOBOCAN 2008, <http://globocan.iarc.fr/>. Acesso em 01 de março de 2013.

GUHASARKAR, S. BANERJEE, R. Intravesical drug delivery: Challenges, current status, opportunities and novel strategies. **Journal of Control Release**. v. 148, p. 147-159. 2010.

HARRISON, D. M. Steroidal Alkaloids. **Natural Products Reports**. v.2, p.139-147. 1990.

HERR, H. W.; DALBAGNI, G.; DONAT, S. M. Bacillus calmette-guerin without maintenance therapy for hig-risk non-muscle-invasive bladder cancer. **European Urology**. v. 60, p. 32-36. 2011.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Incidência de câncer no Brasil – Estimativa 2016**. Brasília, 2016. 51 p.

ISLAN, G. A. et al. Smart lipid nanoparticles containing levofloxacin and DNase for lung delivery. Design and characterization. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 143, p. 168-176. 2016.

ITHARAT, A. et al. In vitro cytotoxic activity of Thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal of Ethnopharmacology**. 90. 33–38 p. 2004.

KENNY, O. M. et al. Cytotoxic and apoptotic potential of potato glycoalkaloids in a number of cancer cell lines. **Journal of Agricultural Science and Applications**. v. 2, P. 184-192. 2013.

KONG B. et al. Experimental considerations on the cytotoxicity of nanoparticles. **Nanomedicine**. v. 6, p. 929–941. 2011.

KUO, K. et al. Anticancer activity evaluation of *Solanum* glycoalkaloid solamargina: triggering apoptosis in human hepatoma cells. **Biochemical Pharmacology**. v. 60, p.1865-1873. 2000.

KURTOVA, A. V.; CHAN, K. S. In: Cancer stem cells. **Targeting bad cancer stem cells: one step closer to the clinic?** United States, 2016, p. 211-229.

LEE, K. et al. Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HEP G2) cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 52, p. 2832-2839. 2004.

LI, N. et al. Induction of solasonina on apoptosis of human breast cancer Bcap-37 cells through mitochondria-mediated pathway. **Chinese Herbal Medicines**. V. 8, n. 2, p. 164-172. 2016.

LI, X. et al. Tetrandrine induces apoptosis and triggers caspase cascade in human bladder cancer cells. **Journal of Surgical Research**. v. 166, p. 45-51. 2011.

LIANG, C. H. et al. Action of solamargina on TNFs and cisplatin-resistant human lung cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 322, p. 751-775. 2004.

LIANG, C. H. et al. Solamargine enhances HER2 expression and increases the susceptibility of human lung cancer H661 and H69 cells to trastuzumab and epirubicin. **Chemical Research in Toxicology**. v. 21, p. 393–399. 2008.

LIU J. et al. Solid lipid nanoparticles loaded with insulin by sodium cholate-phosphatidylcholine-based mixed micelles: Preparation and characterization. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 340, p. 153-162. 2007.

LIU, L. F. et al. Action of solamargine on human lung cancer cells – enhancement of the susceptibility of cancer cells to TNFs. **FEBS Letters**. v. 577, p. 67–74. 2004.

MANSURI, S. et al. Mucoadhesion: A promising approach in drug delivery system. **Reactive and Functional Polymers**. v.100, p.151-172. 2016.

MANTLE, M.; ALLEN, A. A colorimetric assay for glycoproteins based on the periodic acid/Schiff stain. **Biochemical Society Transactions**. v. 6, n. 3, p. 607-609. 1978.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 6, p. 1-37. 2009.

MARTINS, G.Z. **Estudo Farmacognóstico e Screening Biológico de *Solanum lycocarpum* St. Hill (Solanaceae)**. 2013. Tese de Doutorado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, São Paulo.

MARUO, V.M. **Estudo dos possíveis efeitos tóxicos da exposição à *Solanum lycocarpum* em ratos adultos e em sua prole**. 2002. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP, São Paulo.

MASTER, A. M.; SEN GUPTA, A. EGF receptor-targeted nanocarriers for enhanced cancer treatment. **Nanomedicine**. v. 7, p.1895-1906. 2012.

MATTOS, A.C. **Desenvolvimento tecnológico de nanopartículas de PLA e PLA-PEG contendo 5-fluorouracil, avaliação da citotoxicidade sobre células tumorais e farmacocinética pré-clínica**. 2013. 129p. Mestrado em Ciências Farmacêuticas - UNICENTRO, Paraná.

MIRANDA, M. A. et al. *In vitro* Leishmanicidal and Cytotoxic activities of the glycoalkaloids from *Solanum lycocarpum* (Solanacea) fruits. **Chemistry e Biodiversity**, v. 10. p. 642-648, 2013.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**. v. 24, p. 105-111. 2001.

MORALES, A.; EIDINGER, D.; BRUCE, A. W. Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of adenocarcinoma of the kidney. **Journal of Urology**. v. 115, p. 377-380, 1976.

MUGABE, C. et al. Tissue uptake of docetaxel loaded hydrophobically derivatized hyperbranched polyglycerols and their effects on the morphology of the bladder urothelium. **Biomaterials**. v. 33, p. 692-703. 2012.

MUNARI, C. C. et al. Evaluation of cytotoxic genotoxic and antigenotoxic potential of *Solanum lycocarpum* fruits glycoalkaloid extract in V79 cells. **Food and Chemical Toxicology**. v. 50, p. 3696-3701. 2012.

NAFEE, N. et al. Antibiotic-free nanotherapeutics: ultra-small: mucus-penetrating solid lipid nanoparticles enhance the pulmonary delivery and anti-virulence efficacy of novel quorum sensing inhibitors. **Journal Controlled Release**. v. 192, p. 131-140. 2014.

NETO, B. et al. **Como fazer experimentos**. 4ª Edição. Editora Bookman Companhia ED. 2010.

NEWMAN, J.D. Natural products as leads to potential drugs: An old process or the new hope for drug discovery? **Journal of Medicinal Chemistry**. v. 51, p. 2589 – 2599. 2008.

PALLA. B.J., SHAH, D. O. Stabilization of High Ionic Strength Slurries Using Surfactant Mixtures: Molecular Factors That Determine Optimal Stability. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 256, p. 143-152. 2002.

PUNJABI, S. et al. Solasodine glycoalkaloids: a novel topical therapy for basal cell carcinoma. A double-blind, randomized, placebocontrolled, parallel group, multicenter study. **International Journal of Dermatology**. v. 47, p. 78–82. 2008.

REIS, L.O. et al. Anti-angiogenic effects of the superantigen staphylococcal enterotoxin B and bacillus Calmette-Guérin immunotherapy for nonmuscle invasive bladder cancer. **Journal of Urology**. v.187, p.438-445, 2012.

REPETTO, G.; DEL PESO, A.; ZURITA, J. L. Neutral red uptake assay for the estimation of cell viability/cytotoxicity. **Nature Protocols**. v. 3, n. 7, p. 1125-31, 2008.

RIBANI, M. Validação Em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27, n. 5, 771-780. 2004.

RIBEIRO, L. N. M. **Síntese e caracterização de bionanocompósitos magnéticos para liberação controlada de fármacos**. 2013. 137p. Doutorado em Biotecnologia. Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, São Paulo.

RIDOLFI, D. M. et al. Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of tretinoin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces** . v. 93, p. 36-40. 2012.

ROCKENBACH, L. et al. Alterations in the extracellular catabolism of nucleotides are involved in the antiproliferative effect of quercetin in human bladder cancer T24 cells. **Urology Oncology**. v. 3, p.1204–12, 2013.

ROSE, A. et al. Mistletoe plant extract in patients with nonmuscle invasive bladder cancer: results of phase Ib/IIa single group dose escalation study. **The Journal of Urology**. v. 194, p.

939-943, 2015.

SAHU, A.K.; KUMAR, T.; JAIN, V. Formulation Optimization of Erythromycin Solid Lipid Nanocarrier Using Response Surface Methodology. **BioMed Research International**. v. 2014, 2014.

SALMINEN, H. et al. Influence of co-surfactants on crystallization and stability of solid lipid nanoparticles. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 426, p. 256-263.2014.

SCHOENITZ, M. et al. Controlled polymorphic transformation of continuously crystallized solid lipid nanoparticles in a microstructured device: A feasibility study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 86, p. 324-331. 2014.

SCHWARZ, J. C., WEIXELBAUM, A., PAGITSCH, E. Nanocarriers for dermal drug delivery: Influence of preparation method, carrier type and rheological properties. **International Journal Pharmaceutics**. v. 437, p. 83–88. 2012.

SHELLEY, M. D.; MASON, M. D.; KYNASTON, H. Intravesical therapy for superficial bladder cancer: a systematic review of randomized trial and meta-analyses. **Cancer Treatment Reviews**. v. 36, p. 295-205. 2010.

SHIMADA, K. et al. ROS generation via NOX4 and its utility in the cytological diagnosis of urothelial carcinoma of the urinary bladder. **BMC Urology**. v. 11, p. 22. 2011.

SHIU, L. Y. et al. Solamargine induces apoptosis and sensitizes breast cancer cells to cisplatin. **Food and Chemical Toxicology**. v. 45, p. 2155–2164. 2007.

SILVERSTEIN, R.M. ;WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7ªed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SOUTO, E. B. et al. Nanopartículas de lipídios sólidos: Métodos clássicos de produção laboratorial. **Química Nova**. v. 34, n, 10, p. 1762-1769. 2011.

SUN, M. et al. Quercetin-nanostructured lipid carriers: Characteristics and anti-breast cancer activities *in vitro*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 113, p.15-24. 2014.

SURESH, G. et al. Preparation, characterization, and in vitro and in vivo evaluation of lovastatin solid lipid nanoparticles. **AAPS Pharm.Sci.Tech.**; v. 8, p. E1-E9, 2007.

TAMJIDI, F. et al. Nanostructured lipis carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. v. 19, p. 29-43. 2013.

TAN, W. S. et al. Management of non-muscle invasive bladder cancer: A comprehensive analysis of guidelines from the United States, Europe and Asia. **Cancer Treatment Reviews**. v.47, p. 22-31. 2016.

TIOSSI, R.F. et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of the delivery of topical formulations containing glycoalkaloids of *Solanum lycocarpum* fruits. **European Journal of Pharmaceutical Biopharmaceutical**. v.1, p. 28-33. 2014.

TIRAPELLI, C.R. et al. Diterpenes: A therapeutic promise for cardiovascular diseases. **Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery**. v. 3, p.1-8. 2008.

TRABOULSI, S. L.; KASSOUF, W. A review of neoadjuvant and adjuvant chemotherapy for nonmetastatic muscle invasive bladder cancer. **Urology Practice Journal**. v. 3, p. 41-49. 2016.

TSALLAS, A.; JACKSON, J.; BURT, H. The uptake of paclitaxel and docetaxel into ex vivo porcine bladder tissue from polymeric micelle formulations. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**. v.68, p.431–444, 2011.

TSIMOGIANNIS, D. et al. Characterization of Flavanoid subgroups and hydroxy substitution by HPLC-MS/MS. **Molecules**. v.12, p. 593-606. 2007.

ÜNER, M.; RADTKE, M.; WISSING, S. A. Solid lipid nanoparticles and nanostructure lipid carriers. **Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, American Scientific Publishers**. v. 10, p. 43-56. 2007.

WU, C. H. et al. *Solanum incanum* extract (SR-T100) induces human cutaneous squamous cell carcinoma apoptosis through modulating tumor necrosis factor receptor signaling pathway. **Journal of Dermatological Science**. v. 63, p. 83-92. 2011.

YOSHIKAWA, M. et al. Structures of steroidal alkaloid oligoglycosides, robeneosides A and B, as antidiabetogenic constituents from the brazilian medicianl plant *Solanum lycocarpum*. **Journal of Natural Products**. v. 70, p.210-214. 2007.