

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

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 2^3 . 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 $9,74 \times 10^{11}$ 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 $15,94 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e $12,35 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 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 $15.94 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ and $12.35 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 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*.

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 várias administrações por dia que podem ocasionar dor local e infecções que se agravam 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 às 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).

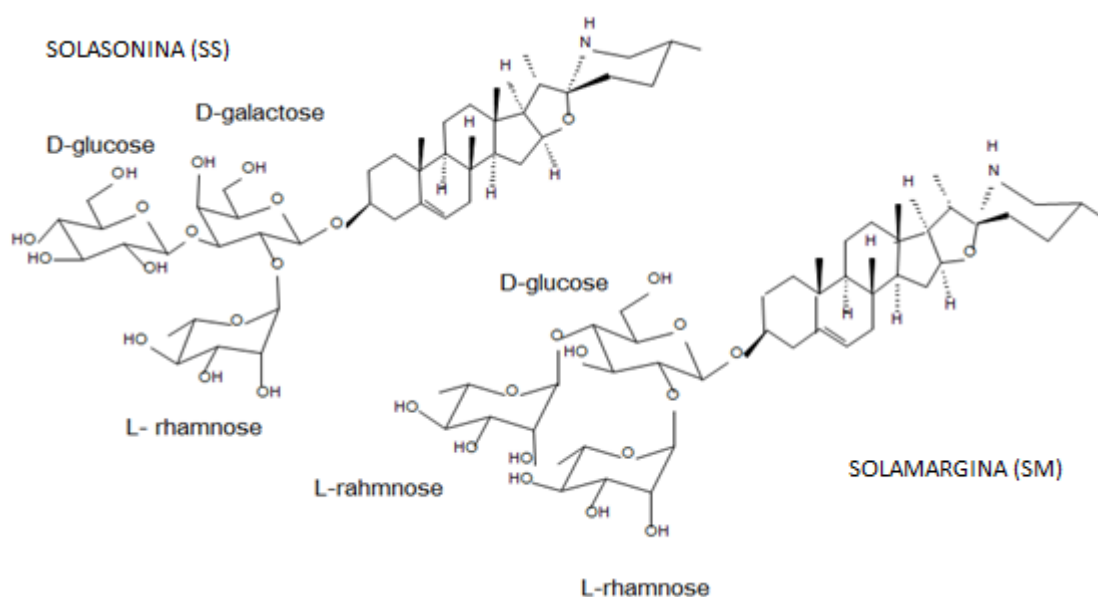
1.3 Glicoalcalóides: Solasonina e Solamargina

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 1. 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 glicoalcoóides 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 glicoalcoóides 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).

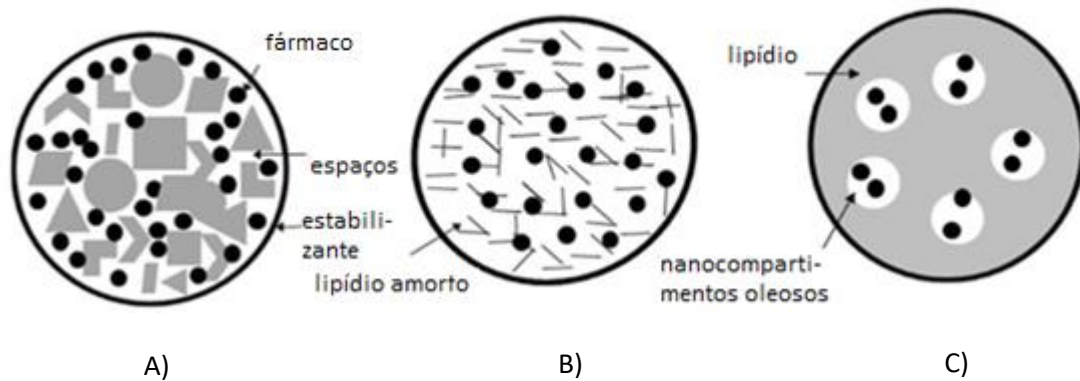
Os CLN dividem-se em três diferentes estruturas, o primeiro modelo, conhecido como “CLN imperfeito” (Figura 2A) consiste em uma mistura de glicerídeos compostos por diferentes ácidos graxos. Essa mistura aumenta a distância entre as cadeias de ácidos graxos dos glicerídeos ocasionando imperfeições no 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 2. 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 carreamento 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 no 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 doxorrubicina encapsulada em CLN e lipossoma em modelo animal de câncer de mama. Os resultados demonstraram melhor eficiência da doxorrubicina 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 carreamento 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 carreamento dos glicoalcalóides extraídos da *Solanum lycocarpum* e seu estudo na terapia do câncer de bexiga.

2. 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 IC_{50} de 10,94 $\mu\text{g/mL}$.
- 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 odora*. **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 badder cancer stem cells: onde 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 medicinal plant *Solanum lycocarpum*. **Journal of Natural Products**. v. 70, p.210-214. 2007.