UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Desenvolvimento, caracterização e atividade antitumoral de nanocarreador híbrido com extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum*

Ivana Pereira Santos Carvalho

Ribeirão Preto
2022

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

IVANA PEREIRA SANTOS CARVALHO

Desenvolvimento, caracterização e atividade antitumoral de nanocarreador hibrido com extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum*

Ribeirão Preto
2022

IVANA PEREIRA SANTOS CARVALHO

Desenvolvimento, caracterização e atividade antitumoral de nanocarreador hibrido com extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum*

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador(a): Profa. Dra. Priscyla Daniely Marcato Gaspari

Versão corrigida da Dissertação de Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas no dia 10/06/2022. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2022

LOMBADA

CARVALHO, I.P.S.

Desenvolvimento, caracterização e atividade antitumoral de nanocarreador hibrido com extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum*

Espaço de **2,5 cm** reservado para etiqueta de localização da biblioteca

DOUTORADO
FCFRPUSP
2022

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, caracterização e atividade antitumoral de nanocarreador hibrido com extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum*. Ribeirão Preto, 2022.
88 p.: il.; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.
Orientador: Gaspari, Priscyla D. Marcato

1. Extrato alcaloídico, 2. Nanocarreador hibrido, 3. Câncer de bexiga.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Ivana Pereira Santos Carvalho
Desenvolvimento, caracterização e atividade antitumoral de nanocarreador hibrido com extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum*.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração:
Medicamentos e Cosméticos.

Aprovado em: _____

Banca Examinadora

Prof.Dr._____

Instituição:_____

Assinatura:_____

Prof.Dr. _____

Instituição:_____

Assinatura:_____

Prof.Dr._____

Instituição:_____

Assinatura:_____

Prof.Dr. _____

Instituição:_____

Assinatura:_____

Agradecimento

Á Deus e à minha família que foram meu porto seguro dando forças para prosseguir apesar das dificuldades.

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

À agência de fomento, CAPES, pela bolsa concedida já que o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos funcionários que auxiliaram de forma técnica e administrativa o desenvolvimento do trabalho em especial aos técnicos Tais Nader, Henrique Diniz, Luciana Ambrosio, Juliana Moraes, Ivana Aparecida, José Orestes, Agnaldo da Silva, Eduardo Tozatto e Maria Perpétua.

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

Aos colegas de laboratório: Letícia, Caroline, Cristiane, Isabela, Andréia, Iasmin, Bianca, Rogério, Fernando e Robson.

Aos grupos de pesquisa: Gnanobio; Laboratório de Tecnologia Farmacêutica; Laboratório de cultivo de células e bioprocessos; Centro de Inovação em Sistemas Nanoestruturados e Administração tópica (NanoTop); Laboratório de Química Analítica; Laboratório de Farmacognosia; Laboratório de Imunologia Aplicada (UFSCar); Laboratório de Química Analítica e Bioinorgânica; Laboratório de Hematologia Clínica e Laboratório de Biossensores e Sistemas Nanoestruturados.

Ao LNNano / CNPEM pelo acesso às instalações de microscopia eletrônica e suporte técnico, na execução da proposta TEM-27233.

“Seja forte e corajoso! Não se apavore, nem se desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.”

Josué 1:9

RESUMO

CARVALHO, I. P. S. **Desenvolvimento, caracterização e avaliação da atividade antitumoral de nanocarreador hibrido com extrato alcaloídico de *Solanum lycocarpum*.** 2022. 88f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Solanum lycocarpum é uma espécie do cerrado brasileiro conhecida por sua diversidade em glicoalcalóides (GA). Os GA, solasonina (SS) e solamargina (SM), extraídos dos frutos desta planta, apresentam propriedades antitumorais. No entanto, a baixa solubilidade em água destas moléculas e a sua toxicidade limita a aplicação destes GA. O desenvolvimento de uma formulação nanoestruturada contendo GA poderá melhorar a ação antitumoral dos GA e potencializar o seu efeito na terapia do câncer de bexiga (CB). Assim, este projeto visa o desenvolvimento e caracterização de nanocarreador lipídico híbrido (NH), composto de carreador lipídico nanoestruturados revestidos com quitosana, como um sistema de liberação do extrato alcaloídico de *S. Lycocarpum* (EA), rico em GA, e avaliação antitumoral *in vitro* em cultura de 2D e 3D de células de câncer de bexiga. Os NH-EA foram preparados pelo método de emulsão e sonicação. NH-EA foram caracterizadas de acordo com diâmetro médio, distribuição de diâmetro, potencial zeta e influência do pH no potencial zeta por espalhamento de luz dinâmico (DLS) e a, distribuição e concentração de nanopartículas por analise de rastreamento de nanopartículas (NTA), porcentagem de eficiência de encapsulamento (EE%) por LC-MS/MS, morfologia por microscopia de força atômica (AFM) e microscopia eletrônica de transmissão (TEM), índice de recristalização por Calorimetria diferencial de varredura (DSC), avaliação da propriedade mucoadesivas por DLS. A citotoxidade do EA livre e encapsulado em NH foi avaliada pelo ensaio de resazurina (modelo 2D) e baseados em ATP (modelo 3D). Para ensaio em 2D foram utilizadas as linhagens de câncer de bexiga (T24 e RT4) com tratamentos de 24 h e 72h e fibroblastos de camundongos (3T3) com tratamento de 24h. Para o ensaio 3D foram utilizadas as células RT4 com tempo de tratamento de 24h. A internalização das nanopartículas foi avaliada por imagens de microscopia de confocal com varredura laser. Foi avaliado os níveis de expressão de proteínas pro e anti -apoptóticas por Western blot e PCR tempo real. Obteve-se NH-EA com tamanhos médios de 130,12 nm com índice de polidispersão de 0,224. Todas as nanopartículas apresentaram potencial zeta positivo indicando o seu revestimento pela quitosana. Este potencial é alterado com aumento do pH do meio. Por NTA foi confirmado a baixa polidispersão das NH-EA com concentração de partículas de 2,50 x 10^{12} partículas/mL. A EE% foi alta com 91,08% para SS e 88,35% para SM. NH-EA apresentou formato esférico com índice de recristalização de 36,58% indicando acomodação do EA nos espaços do núcleo lipídico. NH-EA demonstrou interação física com a mucina. As nanopartículas foram estáveis por 60 dias. O NH vazio não foi citotóxico. Já o EA no modelo 2D foi citotóxico tanto livre (IC_{50} de 5,08 µg/mL para T24 e 9,19 µg/mL para RT4) como encapsulado em NH (IC_{50} de 6,06 µg/mL para T24 e 8,5 µg/mL para RT4) após 24 h e 72h de tratamento. Por não ser sítio-específico o NH-EA apresentou baixa seletividade quando comparado com células 3T3. NH-EA, no modelo 3D, apresentou IC_{50} duas vezes menor do que o EA livre

representando o potencial de internalização do nanocarreador híbrido nos esferoides. O NH-EA demonstrou atividade citotóxica com indução da apoptose pela via intrínseca e extrínseca nas células RT4. Desta forma, os resultados deste trabalho indicam que o NH desenvolvido foi adequado para encapsular o EA com alta eficiência de encapsulamento e estabilidade, com propriedade mucoadesiva que é relevante para a administração intravesical, além de proporcionar o aumento do efeito citotóxico frente as células de câncer de bexiga em modelos 2D e 3D.

Palavras-chave: Extrato alcaloídico; Nanopartícula híbrida, quitosana; citotoxidade; *Solanum lycocarpum*; Câncer de bexiga.

1.0 INTRODUÇÃO

Plantas medicinais possuem em sua composição substâncias que apresentam efeito terapêutico na cura e prevenção de várias doenças. Elas têm sido utilizadas nos seres humanos desde os primórdios da civilização. Nos últimos 200 anos a descoberta de substâncias de origem natural evoluiu em virtude dos avanços de novos métodos e técnicas de identificação dos compostos. Atualmente, cerca de 25% dos medicamentos vigentes são derivados de forma direta ou indireta de plantas, demonstrando seu grande potencial para tratamento de várias doenças, incluindo o câncer. (FRIDLENDER, et al., 2015).

Alguns produtos de origem natural são eficazes contra vários tipos de cânceres demonstrando eficácia tanto no início como em estágios mais avançados do tumor, interrompendo os mecanismos de proliferação celular e angiogênese, e induzindo a apoptose. Exemplos clássicos desses produtos são a vimblastina (Velban®), vincristina (Oncovin®) e taxol (paclitaxel; Taxol®) que tiveram suas origens a partir do metabolismo secundário vegetal (TIRAPELLI *et al*, 2008; DUTTA, et al., 2019). 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.

O Brasil é o principal país dentre os países megadiversos, que apresentam mais de 5000 plantas endêmicas, sendo o detentor de 22% da diversidade da flora no mundo (MARQUES, et al., 2021). As pesquisas no Brasil ainda encontram-se centradas principalmente nas universidades. A Instituições de Ensino tem contribuído, de forma significativa, para o descobrimento de substâncias farmacologicamente promissoras (MONTANARI & BOLZANI, 2001; ANTANASOV et al., 2015). Um exemplo clássico é o produto natural 100% brasileiro Acheflan®, um antiinflamatório composto com óleo essencial de *Cordia verbenacea*, feito em parceria com a indústria farmacêutica Aché e as universidades: Universidade Federal de Santa Catarina, Unifesp, PUC-Campinas e Unicamp (MARQUES, et al., 2021).

Dentre os compostos de interesse farmacológicos estão os heterosídios alcaloídicos: solasonina e a solamargina presentes em diversas espécies do gênero *Solanum.* Estes são oriundos do metabolismo secundário das plantas e podem em alguns casos serem tóxicos (WU et al., 2011; MUNARI et al., 2012;

KENNY et al., 2013).

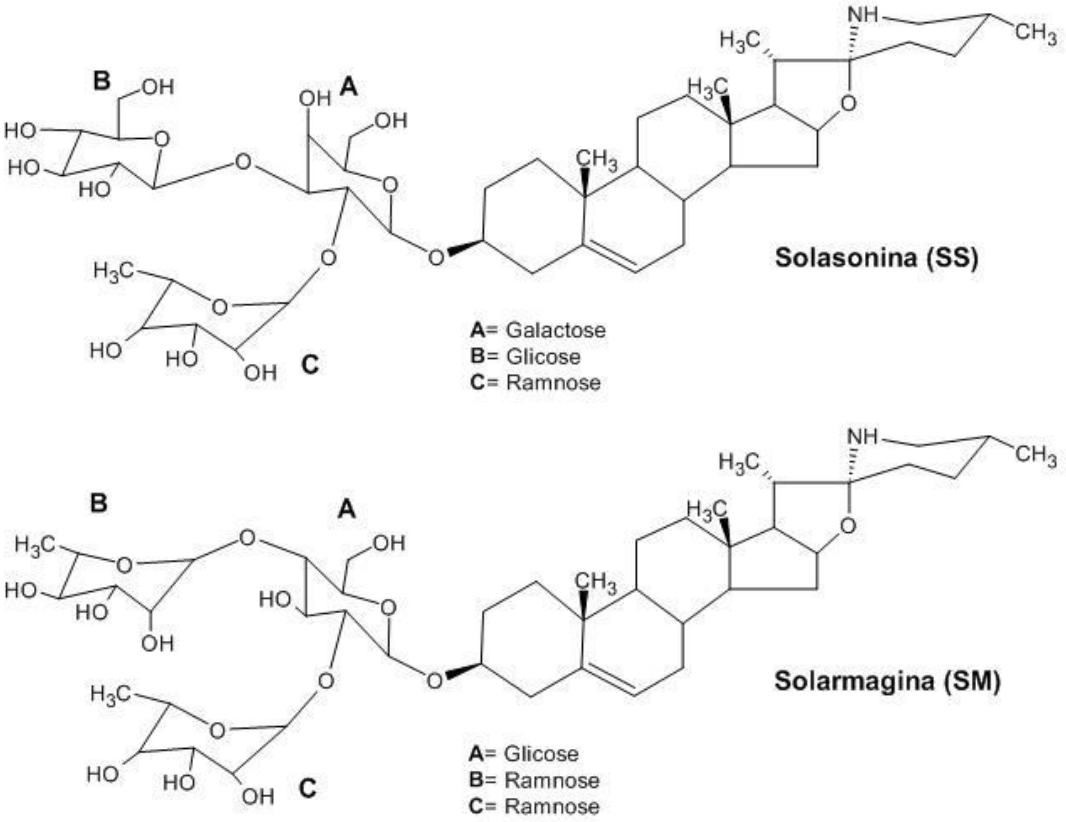
1.1 Glicoalcalóides: Solasonina e Solamargina

Solanum lycocarpum A. St.-Hil. (Solanaceae), é um exemplo de uma espécie do gênero *Solanum*, conhecida como “lobeira”, “jurubebão”, “fruto-do-lobo” e “berinjela-do-campo” é nativa do Cerrado brasileiro e possui uma diversidade em heterosídeos alcaloídicos, também conhecidos como glicoalcalóides (HARRISON, 1990; CHAM, 1994). Popularmente as folhas dessa planta são utilizadas no tratamento da epilepsia e dor abdominal e renal. As raízes desta planta são usadas no tratamento da hepatite e os frutos são comestíveis e relatados com medicinais tendo inúmeras indicações (anti-inflamatório; hipocolesterolêmico, hipoglicemiante, sedativo, controle da obesidade, etc.) (MIRANDA, 2010).

Os glicoalcalóides apresentam atividade biológica para tratamento de diversas doenças, no entanto, podem ser considerados tóxicos para animais e humanos em altas doses principalmente por agirem como fitoestrógenos causando anormalidades no desenvolvimento de fetos e promoverem a ruptura da membrana celular. Além disso podem causar hepatotoxicidade, doenças cardiovasculares e teratogenicidade (PATEL, et al., 2021; ZHAO, et al., 2021).

Uma das atividades mais relevantes dos glicoalcalóides está relacionada ao seu potencial antitumoral (CHAM; GILLIVER; WILSON, 1987; KUO et al., 2000; LEE et al., 2004, PUNJABI et al., 2008). A solasonina (SS) e a solamargina (SM) (Figura 1) são compostos majoritários dos frutos da *S. Lycocarpum* (HARRISON, 1990; YOSHIKAWA et al., 2007; MUNARI et al., 2012) e apresentam essa atividade.

Figura 1. Estrutura química da Solasonina (SS) e Solamargina (SM).



Fonte: Elaborado pelo autor

A solasonina (SS) e solamargina (SM) apresentaram citotoxicidade *in vitro* e *in vivo* contra diferentes linhagens de células cancerígenas como: 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; MUNARI, et al., 2012), osteosarcoma (U2OS) (LI et al., 2011) e câncer de mama (Bcap-37) (LI et al, 2016) e câncer de bexiga (RT4) (CARVALHO, et al, 2019; MIRANDA, et al, 2019).

A SM tem sido avaliada quanto a indução da apoptose em células cancerígenas pelas vias intrínsecas envolvendo a produção da proteína BAX, além de aumentar os níveis de pró-caspase 9, responsável por induzir a apoptose celular (ZHAO, et al., 2021). Em estudos *in vitro* com linhagens de células de câncer de pulmão (H441, H520, H661 e H69), solamargina apresentou atividade citotóxica superior à dos fármacos paclitaxel, cisplatina, etoposido e gencitabina, como também metotrexato e 5-fluoroucil em outros estudos. A

atividade antitumoral sinérgica da SM e SS e outros fármacos antitumorais como transtuzumabe, epirrubicina e cisplatina também tem sido relatada na literatura (LIU et al., 2004; WU, et al., 2011; ZHAO, et al., 2021; MIRANDA, et al, 2021).

Alguns estudos sugerem que tanto a porção aglicona (núcleo esteroidal) como as unidades glicosídicas (cadeia de açucares) são de vital importância para a atividade dos glicoalcalóides, sendo demonstrado que a presença de duas cadeias de ramnose na SM estão relacionadas a melhor atividade antitumoral quando comparada com a SS que apresenta apenas uma ramnose. Além disso, a aglicona (solasodina) não apresenta atividade antitumoral indicando a relevância da presença das unidades glicosídicas para a atividade antitumoral (CHANG, et al., 1998; CHAM, 2007; ZHAO, et al., 2021).

Os mecanismos de ação SS e SM não estão completamente elucidados, mas alguns estudos indicam a interação das cadeias de açúcares com receptores de lecitinas que estão expressos na membrana celular de células cancerígenas. Além disso há a teoria de que os glicoalcalóides são internalizados nas células tumorais por difusão desencadeando mudança nas fases celulares que podem induzir a apoptose celular. (PUNJABI et al., 2008; AL SINANI, ELTAYEB, 2017). Miranda, et al (2019) relatou pela primeira vez que houve um aumento significativo de Fase S em células RT4 tratadas com extrato de glicoalcalóides encapsulado em nanopartículas poliméricas. Esse estudo demonstra que as nanopartículas aumentam a captação celular do extrato e por conseguinte, aumentam a eficácia na parada do ciclo celular na fase S, ampliando o número de células apoptóticas.

Estudos pré-clínicos e clínicos dos glicoalcalóides SS e SM em diferentes tipos de câncer administrados por via intravenosa, oral ou tópica, indicando o potencial destes compostos na terapia do câncer. No entanto, os glicoalcalóides apresentam baixa solubilidade em água e toxicidade dose-dependente. (MARUO, 2002; MARTINS, 2013). Uma maneira de superar essa limitação é utilizando sistemas de liberação nanoestruturados que visam aumentar a eficácia e a segurança desses compostos. CARVALHO et al. (2019) desenvolveram carreadores lipídicos nanoestruturados com extrato rico em SS e SM e verificaram um efeito citotóxico *in vitro* superior ao extrato livre com indução das células de câncer de bexiga ao processo de apoptose. Miranda et al., (2020) avaliaram o potencial de nanopartículas poliméricas funcionalizadas

com folato como sistema de entrega de extrato alcaloídico de *S. lycocarpum* em células de câncer de mama e de bexiga verificando o aumento do efeito citotóxico quando o extrato está encapsulado.

Desta forma, para a presente pesquisa decidiu-se desenvolver um sistema híbrido lipídico-polimérico com o objetivo de unir as vantagens destes dois tipos de materiais para obter um sistema de entrega de extrato rico com SS/SM mais efetivo com menor custo e que apresente propriedade mucoadesiva que é relevante para a administração intravesical.

1.2 Sistemas nanoestruturados híbridos

O entendimento das propriedades físico-químicas dos nanomateriais possibilita prever o comportamento tanto *in vivo* como *in vitro* dos sistemas, permitindo realizar modificações racionais para administração de medicamentos. Uma dessas modificações refere-se ao desenvolvimento de sistemas nanoestruturados híbridos capazes de combinar diferentes materiais orgânicos-orgânicos ou orgânicos-inorgânicos (SOARES, et al. 2020).

A combinação de diferentes propriedades em sistemas híbridos pode possibilitar vantagens como o aumento do tempo de circulação da corrente sanguínea, maior eficiência de encapsulamento e cinética de liberação mais específica, possibilitando a solubilização de fármacos lipofílicos, aumento da penetração cutânea de moléculas, maior estabilidade física e química de agentes terapêuticos, além de reduzir efeitos colaterais e toxicidade (SCHWARZ; WEIXELBAUM; PAGITSCH, 2012; SOARES, et al. 2020).

Na presente pesquisa, os carreadores lipídicos nanoestruturados formados com lipídeo sólido de origem natural (manteiga de Illipê) foram revestidos com quitosana (polímero natural e biodegradável) produzindo nanopartículas híbridas. Os carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN) são a segunda geração de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e são formadas pela mistura de diferentes ácidos graxos sólidos ou pela associação de lipídios sólidos e líquidos, e estabilizadas por tensoativos. Os CLN foram desenvolvidos objetivando melhorar a eficiência de encapsulamento e evitar a expulsão do ativo durante a armazenamento (GESZKE-MORITZ & MORITZ, 2016).

Os CLN dividem-se em três diferentes estruturas, o primeiro modelo, conhecido como “CLN imperfeito” (matriz lipídica imperfeita): consiste em uma mistura de glicerídeos compostos por diferentes ácidos graxos, geralmente utiliza-se uma baixa concentração de óleo em comparação com lipídios sólidos. 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. (PUROHIT et al., 2016; GARG, et al. 2022).

O segundo modelo é chamado de “CLN amorfo”, é composto por uma mistura de lipídios sólidos com lipídios líquidos (óleo). Essa estrutura evita a expulsão do ativo das partículas durante a estocagem, já que não ocorre o processo de cristalização do lipídio ficando a matriz lipídica no estado amorfo. O terceiro modelo é chamado de “múltiplo CLN”, que é composto pela dispersão de óleo em lipídio sólido, utilizando uma alta concentração de óleo. Durante processo de cristalização, ocorre separação de fases dos dois lipídios. A certa temperatura, a miscibilidade entre eles leva a precipitação do nano-compartimento oleoso (ÜNER; RADTKE; WISSING, 2007; TAMJIDI et al., 2013; GARG, et al. 2022). 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).

A manteiga de Illipê (MI) foi utilizada nesta pesquisa com lipídio sólido. Ela é composta pelos ácidos graxos: ácido esteárico (43,3%), o ácido oleico (37,4%) e o ácido palmítico (18%) e, portanto, pode ser utilizada para obter CLN com baixa cristalinidade por apresentar um núcleo lipídico menos cristalino em comparação ao lipídio puro como já descrito por Carvalho et al. (2019). 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; TAMJIDI et al., 2013).

Já a quitosana utilizada no revestimento é um polissacarídeo natural e linear que possui grupamentos aminos, apresentando carga positiva em pH abaixo de 6,5. É um polímero biocompatível e biodegradável que apresenta

baixa toxicidade e imunogenicidade. Apresenta propriedades antibacterianas, emulsificante e quelante, capaz de promover o prolongamento de tempo de retenção de fármacos em mucosas devido a sua propriedade de bio/mucoadesão, além de agir na regeneração da matriz extracelular durante a reconstrução da pele e na cicatrização de feridas nas fases iniciais. A adição de quitosana na superfície de nanoestruturas visa conferir propriedades mucoadesivas e melhorar a liberação de fármacos (VIEIRA et al, 2018; CORDENONSI et al, 2019).

No estudo feito por Dawoud (2021), o docetaxel foi encapsulado em nanopartículas lipídicas sólidas revestidas com quitosana. Quando comparou-se as nanopartículas não revestidas com as revestidas com quitosana, observou-se um aumento do diâmetro médio das partículas de 143nm para 225 nm e mudança da carga negativa para positiva indicando o sucesso do revestimento. O revestimento também influenciou na liberação do docetaxel tornando-se mais lenta além de apresentar maior efeito citotóxico *in vitro* e *in vivo*.

NLS revestidas com quitosana foi desenvolvida para carrear óleo de cúrcuma Zedoary, um óleo volátil amarelo extraído da cúrcuma. Neste estudo foi verificado a melhora da biodisponibilidade do óleo pelo aumento da penetração do óleo através da mucosa prologando o tempo de permanência na região de absorção. No estudo *in vivo* foi verificado uma distribuição direcionada do óleo para fígado sendo capaz de manter uma maior concentração nos tecidos por mais tempo, podendo atuar no tratamento do câncer de fígado (YANG, et al. 2020).

Já o estudo desenvolvido por Silva, et al (2021) produziu carreadores lipídicos nanoestruturados revestidos com quitosana para imobilizar porfirinas de terceira geração para terapia fotodinâmica em câncer de bexiga. Os autores observaram que o processo de imobilização não alterou a fotoatividade da porfirina e minimizou a agregação das mesmas no meio de cultura celular, além disso as nanopartículas híbridas apresentaram alta estabilidade física e indicativo de propriedade mucoadesiva.

Assim como os trabalhos citados acima os glicoalcalóides encapsulados em nanopartículas híbridas poderão promover aumento da mucoadesão e biodisponibilidade com potencial para tratamento do câncer devido as

propriedades citotóxicas da solasonina (SS) e solamargina (SM) que podem ser potencializadas pelo seu encapsulamento nas nanopartículas híbridas (NH).

1.3 Carcinoma de bexiga urinária (CB)

O câncer de bexiga (CB) é uma das neoplasias mais comuns do trato urinário. Possui três tipos: carcinoma de células de transição, carcinoma de células escamosas e adenocarcinoma, podendo ser classificado como superficial (não invasivo) ou invasivo (REIS et al., 2012; SAGINALA, et al. 2020). Mais de 70% da incidência de CB é superficial. Contudo, 50% dos tumores não-músculo invasivos recorrem em 4 anos após o tratamento e 11% evoluem para o fenótipo invasivo. O tratamento é difícil devido à alta taxa de recorrência, assim, o acompanhamento a longo prazo é necessário. A sobrevida média de 5 anos para todos os estágios do câncer de bexiga é de 78%. (SHELLEY; MASON; KYNASTON, 2010; SHIMADA et al., 2011; TRAN, et al. 2021).

Os mecanismos de formação do CB são complexos e os detalhes ainda não são totalmente compreendidos. Mas sabe-se que a inflamação é frequentemente observada no câncer de bexiga, juntamente com a presença de muitas células imunes nos locais do câncer. Sendo a função normal interrompida devido a uma interação complexa de quimiocinas, proteases e citocinas não quimiotáticas, resultando na sobrevivência e proliferação de células cancerígenas (THOMPSON, et al. 2015).

De acordo com dados da GLOBOCAN, cerca de 573.278 pessoas foram diagnosticadas com câncer de bexiga em 2020, colocando o câncer de bexiga como o 10º câncer mais comumente diagnosticado no mundo. Já no Brasil, estima-se 10.640 novos casos de CB para cada ano do triênio 2020-2022, com uma prevalência maior no sexo masculino. O principal fator de risco para o CB é o tabagismo, sendo que fumantes tem um risco 6 vezes maior em desenvolver a doença. Além disso a exposição à compostos químicos como aminas aromáticas, azocorantes, benzeno, benzidina, cromo/cromato e fumo são considerados fatores de risco. (INCA, 2020).

No CB superficial, que é o foco desta pesquisa, o tratamento consiste da quimioterapia com alguns fármacos como a mitomicina C, gencitamina e doxorrubicina ou a imunoterapia bacilo Calmette-Guerin (BCG) pela via

intravesical (TRABOULSI & KASSOUF, 2016; TRAN, et al. 2021). No entanto, o uso de 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. (SHELLEY; MASON; KYNASTON, 2010; TRABOULSI & KASSOUF, 2016).

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). 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). Porém, a baixa permeabilidade do urotélio e a redução do tempo de permanência do tratamento na bexiga devido esvaziamento periódico pode ocasionar doses repetidas que geram dor no local e risco de infeções. (MUGABE et al., 2012; KURTOVA & CHAN, 2016).

Por isso o uso de um sistema híbrido, proposto pela pesquisa, que seja mucoadesivo e que promova uma liberação modificada com redução das doses aplicadas é interessante para tratamento do CB pois reduz as limitações inerentes à via de administração além de poder aumentar a permeação do ativo encapsulado nas células tumorais.

2. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que o desenvolvimento do nanocarreador híbrido (NH) foi adequado para encapsulamento do extrato alcaloídico de *S. lycocarpum* apresentando alta eficiência e capacidade de encapsulamento para os marcadores solasonina e solamargina. Essa alta capacidade de encapsulamento do NH pode estar relacionada a baixa cristalinidade do nanocarreador (índice de recristalização de 15%) verificado por DSC, que permite acomodar uma quantidade de fármaco maior, além da afinidade do extrato lipofílico com os lipídios do NH.

O NH desenvolvido foi obtido com sucesso pelo método de emulsão à quente e sonicação, um método de baixo custo, em uma única etapa sendo facilmente escalonável. Foi confirmado por crio-TEM e pelo valor positivo do potencial zeta dos NH-EA que esses carreadores são do tipo core-shell sendo um núcleo lipídico (core) revestido por quitosana (shell). Por DSC e FTIR foi verificado a interação dos componentes lipídicos com a quitosana corroborando com os dados de crio-TEM.

Os NH-EA apresentaram diâmetro reduzido (~ 130 nm) e baixa polidispersão (PdI $<$0,2) como verificado por DLS e NTA. Além disso, apresentaram morfologia esférica e não foi observado agregados dos nanocarreadores tanto por AFM quanto por crio-TEM confirmando os dados de baixa polidispersão do nanocarreador híbrido. NH-EA demonstrou interação com a mucina indicando propriedade mucoadesiva relacionada a diferença de carga entre a NH-EA (positivo) e a mucina (negativo), característica relevante para a administração intravesical desta formulação em modelos *in vivo*.

Nos estudos biológicos foi verificado que o EA livre foi citotóxico contra as células de câncer de bexiga RT4 e T24 e que o seu encapsulamento aumentou o efeito citotóxico do EA após 72h de tratamento no modelo de cultivo celular 2D. Nos estudos em cultivo celular 3D que mimetizam o microambiente tumoral nativo e são mais parecidos com o modelo *in vivo*, foi verificado um aumento dos valores de IC_{50} em relação ao modelo de cultivo celular 2D. Além disso, foi verificado, por microscopia confocal, que o NH-EA é capaz de permear todo o esferoide e entregar os glicoalcalóides nas partes mais profundas da células tumorais proporcionando aumento do efeito biológico do extrato com redução de

2x no valor de IC_{50}. Verificamos por western blotting e PCR de tempo real que o efeito citotóxico do NH-EA nas células de câncer de bexiga ocorre por indução da apoptose, principalmente pela ativação da via intrínseca (mitrocondrial).

Todos os resultados desta pesquisa demonstraram o grande potencial do nanocarreador híbrido do tipo core-shell como um tratamento alternativo para o câncer de bexiga.

3. REFERÊNCIAS

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.

ALMADA, M. et al. Interaction and Cytotoxic Effects of Hydrophobized Chitosan Nanoparticles on MDA-MB-231, HeLa and Arpe-19 Cell Lines, **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 692-701, 2014.

AL SINANI, S.S.S., ELTAYEB, E.A. The steroidal glycoalkaloids solamargine and solasonine in Solanum plants. **South African Journal of Botany**, v. 112 , p. 253–269, 2017.

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.

ALGUACIL, J., et al. Urinary pH, cigarette smoking and bladder cancer risk. **Carcinogenesis**, v. 32(6), p. 843–847, 2011.

AMARAL, R. L. F. et al. Comparative Analysis of 3D Bladder Tumor Spheroids Obtained by Forced Floating and Hanging Drop Methods for Drug Screening. **Frontiers in physiology**, v. 8, 2017.

AMARAL, R. L. F. **Análise comparativa de diferentes sistemas de cultivo tridimensionais para estabelecimento de um modelo in vitro de câncer de bexiga para ensaios de eficácia terapêutica**. 2020. Tese de doutorado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

ASTM E2834-12. **Standard Guide for Measurement of Particle Size Distribution of Nanomaterials in Suspension by Nanoparticle Tracking Analysis (NTA).** Estados Unidos da América: American Society for Testing and Materials, 2018. 11p.

AZEVEDO, R. et al. Emerging antibody-based therapeutic strategies for bladder cancer: a systematic review. **Journal of Controlled Release**. v. 214, p. 40-61, 2015.

BÁCSKAY, I. et al. Role of Cytotoxicity Experiments in Pharmaceutical development. 2018. Doi: http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.72539.

BAGREZAEI, F. et al. Expression of Inhibitor of Apoptosis Gene Family Members in Bladder Cancer Tissues and the 5637 Tumor Cell Line, **Asian Pac J Cancer Prev**. v. 19, p.529–532, 2018.

BASHIRI, S, et al. Preparation and characterization of chitosan-coated nanostructured lipid carriers (CH-NLC) containing cinnamon essential oil for enriching milk and anti-oxidant activity. **LWT**. v. 119, 2020. doi: https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108836.

BASTOS, M. L. C. **Avaliação da citotoxicidade e seletividade do extrato, frações e alcaloide de Geissospermum sericeum (Apocynaceae) em linhagens celulares ACP02, HepG2 e VERO.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, Pará, 2017.

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.

BORRA, R.C. et al. A simple method to measure cell viability in proliferation and cytotoxicity assays. **Braz Oral Res**, v. 23, p. 255-262, 2009.

BUNJES, et al,. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry X-ray and neutron scattering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 379–402, 2007.

BURIN, S. M. **Efeito da L- aminoácido oxidase de Calloselasma rhodostoma (CR-LAAO) na indução de apoptose e modulação de microRNAs em células Bcr-Abl positivas**. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, São Paulo, 2015.

BUSS, J. H, et al. Lapatinib-Loaded Nanocapsules Enhances Antitumoral Effect in Human Bladder Cancer Cell. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 1-10, 2019.

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, I. P. S. et al. In vitro Anticancer Activity and Physicochemical Properties of Solanum lycocarpum Alkaloidic Extract Loaded in Natural Lipid-Based Nanoparticles. **Colloid and Interface Science Communications**. v. 28, p. 5-14, 2019.

CHAM, B. E. Drug therapy: Solamargine and other solasodine rhamnosyl glycosides as anticancer agents. **Modern Chemotherapy**, v. 9, n. 2, p. 33-49, 2013.

CHAM, B. E.; DAUNTER, B.; EVANS, R. A. Topical treatment of malignant and premalignant skin lesions by very low concentrations of standard mixture (BEC) of solasodina glycosides. **Cancer Letters**, v. 59, p. 183-192, 1991.

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

CHAM, B. E. Solasodine rhaminosyl 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. Solasodine rhaminosyl 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 odomaeum. **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.

CORDENONSI, L. M., et al. The role of chitosan as coating material for nanostructured lipid carriers for skin delivery of fucoxanthin. **International Journal of pharmaceutics**. V. 567, p. 118487, 2019.

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.

DAS, S. et al. Oral delivery of ursolic acid-loaded nanostructured lipid carrier coated with chitosan oligosaccharides: Development, characterization, in vitro and in vivo assessment for the therapy of leishmaniasis. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 102, p. 996-1008, 2017. Doi: https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.04.098.

DANESHMAND, S. et al. Encapsulation challenges, the substantial issue in solid lipid nanoparticles characterization. **J Cell Biochem**. v. 119, p. 4251–4264, 2018.

DAWOUD, M. Chitosan coated solid lipid nanoparticles as promising carriers for docetaxel. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 62, p.1-10, 2021.

DING, X.; ZHU, F. S.; LI, M.; GAO, S. G. Induction of apoptosis in human hepatoma SMMC-7721 cells by solamargine from Solanum nigrum L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 599– 604, 2012.

DUTTA, S. et al. Natural products: An upcoming therapeutic approach to cancer. **Food and Chemical Toxicology**, v. 128, p. 240-255, 2019.

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.

FRIDLENDER, M. et al. Plant derived substances with anti-cancer activity: from folklore to practice, **Frontiers in Plant Science,** v. 6, p. 1-9, 2015.

GANI, S. S. A. et al. Engkabang 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.

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

IDE, H., et al. Urinary pH is an independent predictor of upper tract recurrence in non-muscle-invasive bladder cancer patients with a smoking history. **Scientific Reports**, v. 11, p. 1-9, 2021.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2019. Site: https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf.

ISO 19430: 2016 - Particle size analysis — Particle tracking analysis (PTA) method.

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.

KIJANSKA, M. et al. In vitro 3D Spheroids and Microtissues: ATP-based Cell Viability and Toxicity Assays. **Assay Guidance Manual**, p 321-334, 2016.

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 sten cells. Targeting badder cancer stem cells: onde step closer to the clinic? United States, 2016, p. 211-229.

LEE, K.; KOZUKUE, N.; HAN, J.; PARK, J.; CHANG, E.; BAEK, E.; CHANG, J. FRIEDMAN, M. Glycoalkaloids and metabolites inhibit the growth of human colon (HT29) and liver (HEP G2) cancer cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2832-2839, 2004.

LI, 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.; SHIU, L. Y.; CHANG, L. C.; SHEU, H. M.; TSAI, E. M.; KUO, K.W. Solamargine enhances HER2 expression and increases the susceptibility of human lung cancer H661 and H69 cells to trastuzumab and epirubicin. **Chemical Research in Toxicology**, v. 21, p. 393–399, 2008.

LIU, L. F. 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.

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, H, et al. Biophysical Characterization of Bladder Cancer Cells with Different Metastatic Potential. **Cell Biochem Biophys**. 2013. Doi: 10.1007/s12013-013-9702-9.

LOUTFY, S. A., et al. Synthesis, characterization and cytotoxic evaluation of chitosan nanoparticles: in vitro liver cancer model. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 7, p. 1-9, 2016.

LUO, Y. et al. Solid lipid nanoparticles for oral drug delivery: Chitosan coating improves stability, controlled delivery, mucoadhesion and cellular uptake. **Carbohydrate Polymers.** v. 122, p. 211-229, 2015**.**

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.

MARQUES, L. G. A., et al. O impacto da bioprospecção para o descobrimento de novas moléculas terapêuticas. **Revista Fitos**, p. 1-22, 2021.

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**. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina Veteriana e Zootecnia, USP, 2002.

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

MAZURYK, J. et al. Rapamycin-loaded solid lipid nanoparticles: Morphology and impact of the drug loading on the phase transition between lipid polymorphs. **Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp**. v.502 p. 54–65, 2016.

MENDES, L. P. et al. Biodegradable nanoparticles designed for drug delivery: The number of nanoparticles impacts on cytotoxicity. **Toxicology in Vitro**. V. 29, P. 1268-1274. 2015.

MIRANDA, M. A. **Avaliação do potencial antiparasitário do extrato alcaloídico e de alcalóides esteroidais dos frutos de Solanum lycocarpum A. St.-Hil**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências) –Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

MIRANDA, M.A. et al. Targeted uptake of folic acid-functionalized polymeric nanoparticles loading glycoalkaloidic extract in vitro and in vivo assays. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 192, 2020.

MIRANDA, M. A. et al. Cytotoxic and chemosensitizing effects of glycoalkaloidic extract on 2D and 3D models using RT4 and patient derived xenografts bladder cancer cells. **Materials Science & Engineering C**, v. 119, 2021.

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

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 glicoalkaloid extract in V79 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, p. 3696-3701, 2012.

OBENG, E. Apoptosis (programmed cell death) and its signals - A review. **Brazilian Journal of Biology**, v. 81, p.1133-1143, 2021.

PATEL, P. et al. Updates on steroidal alkaloids and glycoalkaloids in Solanum spp.: Biosynthesis, in vitro production and pharmacological values. In: **Studies in Natural Products Chemistry**. Índia: Elsevier, 2021. p. 99 - 127.

PIAZZINI, V. et al. Solid Lipid Nanoparticles and Chitosan-coated Solid Lipid Nanoparticles as Promising Tool for Silybin Delivery: Formulation, Characterization, and In vitro Evaluation. **Current Drug Delivery**, v. 16, p. 142-152, 2019.

PRADO-AUDELO, M. L. D. et al. Chitosan-decorated nanoparticles for drug delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v 59, p. 1-17, 2020.

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.

RAHMAN, N. F. A, et al. High yield lipase-catalyzed synthesis of Engkabang fat esters for the cosmetic industry. **Bioresource Technology**. v.102, p. 2168-2176, 2011.

REIS, L.O.; FERREIRA, U.; BILLIS, A.; CAGNON, V. H.; FÁVARO, W. J. Anti-angiogenic effects of the superantigen staphylococcal enterotoxin B and bacillus Calmette-Guérin immunotherapy for nonmuscle invasive bladder cancer. **J Urol.,** v.187, p.438-445, 2012.

RENÇBER, S. et al. Development, characterization, and in vivo assessment of mucoadhesive nanoparticles containing fluconazole for the local treatment of oral

candidiasis. **International Journal of Nanomedicine**, v. 11, p. 2641–2653, 2016.

RIBEIRO, L. M.N., et al. Use of nanoparticle concentration as a tool to understand the structural properties of colloids. **Scientific Reports**. v. 8, p. 1-8, 2018. doi:10.1038/s41598-017-18573-7.

RISS, T.L. et al. Cell viability assays. **Assay Guidance Manual**, 2013.

ROCKENBACH, L.; BAVARESCO, L.; FERNANDES, F. P.; CAPPELLARI, A.R.; BARRIOS, C. H.; BUENO, M. F.; OLIVEIRA, B. A. M. Alterations in the extracellular catabolism of nucleotides are involved in the antiproliferative effect of quercetin in human bladder cancer T24 cells. **Urol. Oncol**., v. 3, p.1204–12, 2013.

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.

SAGINALA, K. et al. Epidemiology of Bladder Cancer, **Medical Sciences**, v. 15, n.8, p. 1-12, 2020.

SAMADIAN, H.; HOSSEINI-NAMI, S.;KAMRAVA, S.K.; GHAZNAVI, H.; SHAKERIZADEH, A. Folate-conjugated gold nanoparticle as a new nanoplatform for targeted cancer therapy. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 142, n. 11, p. 1–13, 2016.

SANDRI, G. et al. C. Halloysite and chitosan oligosaccharide nanocomposite for wound healing, **Acta Biomaterials**. v. 57, p. 216–224, 2017.

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

SEO, H. K., et al. Recommended oral sodium bicarbonate administration for urine alkalinization did not affect the concentration of mitomycin-C in non-muscle invasive bladder cancer patients. **Oncotarget**, v. 8, p. 96117-96125, 2017.

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.; FUJII, T.; ANAI, S.; FUJIMOTO, K.; KONISHI, N. 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.

SILVA, L. B. et al. Hybrid Nanoparticles as an Efficient Porphyrin Delivery System for Cancer Cells to Enhance Photodynamic Therapy. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 9, p. 1-15., 2021.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 8ª ed. Rio de Janeiro: LTC, 2019.

SOARES, D. C. F. et al. Polymer-hybrid nanoparticles: Current advances in biomedical applications. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 131, p. 1-13, 2020.

SOUZA, J. R. **Estudo da desacetilação de quitosana e obtenção de suas nanopartículas para aplicação em Engenharia de tecidos.** Dissertação de Mestrado, Escola Politécnica. Universidade de São Paulo. 2017.

SURESH, G. et al. Preparation, characterization, and in vitro and in vivo evaluation of lovastatin solid lipid nanoparticles. **AAPS Pharmeutics Science Technology**, 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; DA COSTA, J.C; MIRANDA, M.A; PRAÇA, F.S; MCCHESNEY, JD; BENTLEY, MV; BASTOS JK. In vitro and in vivo evaluation of the delivery of topical formulations containing glycoalkaloids of *Solanum lycocarpum* fruits. **European Journal of Pharmaceutical Biopharmaceutics,** v. 14, 2014.

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

TOGNON-RIBEIRO, R. **Alterações da expressão de apoptomirs, de genes e proteínas pró- e anti-apoptóticos em Mielofibrose e Trombocitemia Essencial.** 2011. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2011.

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.

TRAN, L. et al. Advances in bladder cancer biology and therapy. **Nature Reviews**, v. 21, p. 104-121, 2021.

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.

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.

YANG, B. et al. Chitosan mediated solid lipid nanoparticles for enhanced liver delivery of zedoary turmeric oilin vivo. **International Journal of biological macromolecules**, v. 149, p. 108-115, 2020.

YANG, Y. et al. Bladder cancer cell viability inhibition and apoptosis induction by baicalein through targeting the expression of anti-apoptotic genes, **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, p. 1478-1482, 2018.

YAO, Q. et al. Preparation, Characterization, and Cytotoxicity of Various Chitosan Nanoparticles. **Journal of Nanomaterials**, v. 2013, p. 1- 6, 2013.

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.

YOSTAWONKUL, J. et al. Surface modification of nanostructure lipid carrier (NLC) by oleoyl-quaternized-chitosan as a mucoadhesive nanocarrier. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 149, p. 301-311, 2017.

YU, Q.; ZHANG, J.; ZHANG, G.; GAN, Z. Synthesis and functions of well-defined polymer-drug conjugates as efficient nanocarriers for intravesical chemotherapy of bladder cancer. **Macromolecular Bioscience**, v. 15, n. 4, p. 509–520, 2015.

VIEIRA, A. C. C. et al. Lipid nanoparticles coated with chitosan using a one-step association method to target rifampicin to alveolar macrophages. **Carbohydrate Polymers**. v. 252, 2021.

VIEIRA, A. C. C., et al. Mucoadhesive chitosan-coated solid lipid nanoparticles for bettermanagement of tuberculosis. **International Journal of Pharmaceutics**, v.536, p. 478-485, 2018.

ZHAO, Z. et al. Inhibition of T24 and RT4 Human Bladder Cancer Cell Lines by Heterocyclic Molecules**. Medical Science Monitor**, v. 23, p. 1156–1164, 2017.

ZHAO, D. et al. Solanum steroidal glycoalkaloids: structural diversity, biological activities, and biosynthesis. **The Royal Society of Chemistry**, v. 38, p. 1423-1444, 2021.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

SCIENTIA VINCES