



**UNICAMP**

CAROLINA RIBEIRO CAMERIN GRANDO

**“ENCAPSULAÇÃO, ESTABILIDADE E ABSORÇÃO INTESTINAL *EX VIVO*  
DO MITOTANO RACÊMICO EM  
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS”**

**Campinas – São Paulo  
2013**





**UNICAMP**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA**

CAROLINA RIBEIRO CAMERIN GRANDO

**“ENCAPSULAÇÃO, ESTABILIDADE E ABSORÇÃO INTESTINAL *EX VIVO*  
DO MITOTANO RACÊMICO EM  
NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS”**

Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de  
Engenharia Química como parte dos requisitos para  
a obtenção do título de Mestra em Engenharia Química.

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação de mestrado  
defendida pela aluna Carolina Ribeiro Camerin Grandó, e orientada  
pela Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana.

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana

**Campinas – São Paulo  
2013**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA ÁREA DE ENGENHARIA E ARQUITETURA - BAE - UNICAMP

C144e Camerin Grando, Carolina Ribeiro, 1984-  
Encapsulação, estabilidade e absorção intestinal ex vivo do mitotano racêmico em nanopartículas lipídicas sólidas / Carolina Ribeiro Camerin Grando. --Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Maria Helena Andrade Santana.  
Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Nanopartículas lipídicas sólidas. 2. Homogeneização à alta pressão. 3. Encapsulação. I. Santana, Maria Helena Andrade, 1951-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. III. Título.

Título em Inglês: Encapsulation, stability and ex vivo intestinal absorption of racemic mitotane in solid lipid nanoparticles

Palavras-chave em Inglês: Solid lipid nanoparticles, Homogenization at high pressure, Encapsulation

Área de concentração: Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

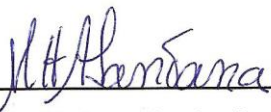
Titulação: Mestra em Engenharia Química

Banca examinadora: Marco Vinícius Chaud, Eneida de Paula

Data da defesa: 26-03-2013

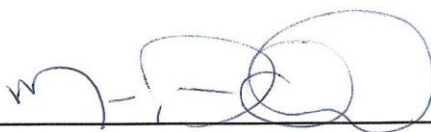
Programa de Pós Graduação: Engenharia Química

Dissertação de Mestrado defendida por Carolina Ribeiro Camerin Grandó e aprovada em 26 de março de 2013 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



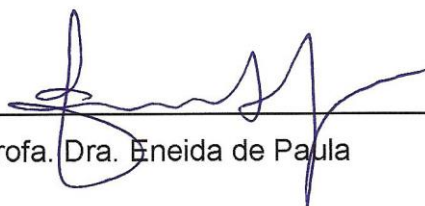
---

Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana



---

Prof. Dr. Marco Vinícius Chaud



---

Profa. Dra. Eneida de Paula



Dedico este trabalho à minha família  
Alvimar, Ana Isabel, Gabriela e Rogério  
por todo amor, carinho e ensinamentos que  
conceberam os alicerces da minha história.





## **Agradecimentos**

A Deus, que me deu o direito de viver com dificuldades e obstáculos, para que a cada superação, pudesse refletir e amadurecer.

À minha mãe Ana Isabel e a meu pai Alvimar, que me ensinaram que mesmo diante das adversidades da vida, devo permanecer sempre no caminho correto e com honestidade. Agradeço também pelo amor incondicional, apoio, coragem e paciência que sempre me transmitiram.

À minha irmã Gabriela e a meu marido Rogério, por sempre acreditarem em mim e me incentivarem a seguir em frente, independente dos obstáculos e das dores, sendo as fontes de minha segurança.

À minha querida orientadora Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana, por toda a dedicação, transmitindo-me os melhores e mais úteis ensinamentos, com paciência, atenção e confiança depositadas em meu trabalho. Sou muito grata por essa orientação que ultrapassa esta dissertação.

Ao Prof. Dr. Marco V. Chaud por ter despertado meu interesse pela pesquisa científica na graduação. Obrigado por ter me acompanhado e ajudado a vencer os desafios.

À Profa. Dr. Eneida de Paula, por gentilmente ceder o espaço físico dos laboratórios.

À Profa. Dr. Lucildes Mercuri e Jivaldo do Rosário Matos, por ceder os equipamentos para as análises térmicas e pela colaboração na interpretação. Muitíssimo obrigada pelas múltiplas e inestimáveis contribuições.

À Carla Aiolfi Guimarães por fazer parte deste trabalho, pelas contribuições neste trabalho, dedicação e pela valiosa amizade construída.

Ao técnico do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos, Gilson Barbosa Maia Jr., pela dedicação, amizade e paciência que em todos os momentos me ajudou com grande empenho.

Aos amigos do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos, Andréa, Amanda, Leandra, Caroline, Gabriela, Micaela, Fernanda, Marina, Tiago, Leandro, Felipe, Fernanda, Rafaela, Viviane, André, Patrícia, pelos dias que compartilhamos juntos e pela amizade.



Aos amigos de todos os momentos Daniela Santos, Jean, Ana Carolina Nascimento, Anayla, Absolon, Alex, Rafael, Ana Paula Bettini pela amizade e auxílio nas questões acadêmicas.

Aos funcionários e professores da FEQ.

A todas as pessoas que, direta ou indiretamente, tornaram esse trabalho agradável e ajudaram com a minha formação pessoal e profissional.

Às agências de fomento CNPQ, CAPES e FAPESP pelo auxílio concedido a esta pesquisa.



“Aprender é a única coisa de que  
a mente nunca se cansa, nunca  
tem medo e nunca se arrepende.”  
(Leonardo da Vinci)



## RESUMO

O mitotano, fármaco utilizado para a terapia medicamentosa do carcinoma adrenocortical, apresenta baixa solubilidade aquosa e baixa permeabilidade intestinal. Nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) e carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs) são úteis para a incorporação de fármacos com essas características. O objetivo deste trabalho foi preparar e caracterizar SLNs e NLCs encapsulando mitotano racêmico, estáveis durante a estocagem, como uma estratégia nanotecnológica para melhorar a solubilidade aquosa e permeação intestinal do mitotano. As SLNs foram compostas do lipídeo cetil palmitato e as NLCs de estearato de polioxietileno (40) e triacilgliceróis de ácido cáprico/caprílico e dos tensoativos polissorbato 80 e trioleato de sorbitano. A proporção mássica entre os tensoativos que conferiu estabilidade à fase oleosa foi determinada. Para avaliar estabilidade, as SLNs e NLCs foram caracterizadas através do diâmetro médio, polidispersidade, potencial zeta. A encapsulação do mitotano foi evidenciada por calorimetria diferencial de varredura e termogravimetria, e quantificada através da eficiência encapsulação e carregamento do fármaco pela matriz lipídica. Adicionalmente, as SLNs e NLCs foram avaliadas pela retenção do mitotano em diferentes pHs *in vitro* e permeação intestinal *ex vivo* através do modelo de saco intestinal invertido.

Os resultados experimentais mostraram que as composições mássicas que asseguraram a estabilidade durante 28 dias de armazenamento a 4 °C nas nanopartículas foram: cetil palmitato (10%), polissorbato 80 (2,35%) e trioleato de sorbitano (2,75%) nas SLNs. Em NLCs foi: estearato de polioxietileno (7%), triacilgliceróis (3%), polissorbato 80 (3,23%) e trioleato de sorbitano (1,76%). O diâmetro médio das SLNs isentas de fármaco foi  $185,20 \pm 1,39$  nm, polidispersidade 0,14 e potencial zeta  $-24,80 \pm 0,27$  mV. Nas mesmas condições, as NLCs tiveram diâmetro médio  $91,79 \pm 0,69$  nm, polidispersidade de 0,27 e potencial zeta e  $-11,50 \pm 0,92$  mV. A inclusão do mitotano aumentou o diâmetro médio das SLNs e NLCs para  $187,40 \pm 0,17$  nm e  $94,50 \pm 0,26$  nm, reduziu a polidispersidade para 0,12 e 0,22 bem como o potencial zeta  $-21,10 \pm 0,55$  mV e  $-8,05 \pm 0,20$  mV, respectivamente. Ambas as partículas apresentaram eficiências de encapsulação do mitotano superiores a 90%, porém o carregamento das NLCs (0,25 g mitotano /g nanopartículas) foi cinco vezes maior que as SLNs (0,05 g mitotano /g nanopartículas). O comportamento térmico evidenciou a internalização do mitotano nas partículas. Em condições de pH e tempo de residência que mimetizam o trato gastrointestinal (pHs 1,2 e 6,8, 3h), foi liberado, aproximadamente, 90% e 100% do mitotano das SLNs, 30% do mitotano das NLCs, em ambos os pHs. A pH 7,4, houve total liberação do mitotano em 15 minutos das SLNs, enquanto a liberação das NLCs foi aproximadamente 50% em 24 horas.

Os ensaios de permeação intestinal *ex vivo* mostraram que a absorção do mitotano das partículas foi maior quando comparados ao veiculado em óleo de oliva ou a partir do pó micronizado do fármaco.

Estes resultados sugerem que as NLCs sejam carreadores promissores para melhorar a biodisponibilidade oral do mitotano e melhorando o tratamento do carcinoma adrenocortical.





## ABSTRACT

Mitotane is used for adrenocortical carcinoma drug therapy and has low aqueous solubility and low intestinal permeability. Solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs) are useful for incorporation of drugs with these characteristics. The aim of this work was to prepare and to characterize SLNs and NLCs encapsulating racemic mitotane, stable during storage as a nanotechnology strategy to improve aqueous solubility and intestinal permeability of mitotane. The SLNs were composed by cetyl palmitate and the NLCs of polyoxyethylene (40) stearate and capric/caprylic triglycerides as lipids and the surfactants polysorbate 80 and sorbitan trioleate. The weight ratio between the surfactants that conferred storage stability to the oil phase was determined. To evaluate storage stability, the SLNs and NLCs were characterized by mean diameter, polydispersity index and zeta potential. Encapsulation of mitotane was evidenced by differential scanning calorimetry and thermogravimetry, and quantified using the encapsulation efficiency and drug loading by the lipid matrix. Additionally, the SLNs and NLCs were evaluated by the retention of mitotane *in vitro* and *ex vivo* intestinal permeation by everted gut sac model.

The experimental results showed that the mass compositions of the nanoparticles which ensured storage stability over 28 days of storage at 4 °C were: cetyl palmitate (10%), polysorbate 80 (2.35%) and sorbitan trioleate (2.75%) in SLNs. In NLCs was: polyoxyethylene (7%), triglycerides (3%), polysorbate 80 (3.23%) and sorbitan trioleate (1.76%). The mean diameter of the unloaded SLNs was  $185.20 \pm 1.39$  nm, polydispersity index 0.14 and zeta potential  $-24.80 \pm 0.27$  mV. At the same conditions, the NLCs had mean diameter  $91.79 \pm 0.69$  nm, polydispersity index 0.27 and zeta potential  $-11.50 \pm 0.92$  mV. The inclusion of mitotane increased the mean diameter of SLNs and NLCs to  $187.40 \pm 0.17$  nm and  $94.50 \pm 0.26$  nm, decreased the polydispersity index to 0.12 and 0.22 and so well the zeta potential to  $-21.10 \pm 0.55$  mV and  $-8.05 \pm 0.20$  mV, respectively. Both particles showed mitotane entrapment efficiencies greater than 90%, however drug loading of NLCs (0.25 g mitotane /g nanoparticles) were 5-fold higher than the SLNs (0.05 g mitotane /g nanoparticles). The thermal behavior showed internalization of mitotane in the particles. Under conditions of pH and residence time that mimic the gastrointestinal tract (pHs 1.2 to 6.8, 3h) mitotane was released approximately 90% and 100% from SLNs, 30% from NLCs at both pHs. At pH 7.4, there was a complete release of mitotane from SLNs over 15 minutes, while the release from NLCs was approximately 50% in 12 hours.

The *ex vivo* intestinal permeation assay showed that the absorption of mitotane by the particles were greater than dissolved in olive oil or from micronized powder.

These results suggest that NLCs might be promising carriers for improving the oral bioavailability of mitotane and treatment of adrenocortical carcinoma.



## SUMÁRIO

RESUMO .....	xv
ABSTRACT .....	xvii
LISTA DE FIGURAS .....	xxiii
LISTA DE TABELAS.....	xxvii
NOMENCLATURAS.....	xxxix
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>2 OBJETIVO E METAS.....</b>	<b>5</b>
2.1 Objetivo .....	5
2.2 Metas .....	5
<b>3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>6</b>
<b>3.1 Características físico-químicas e biodisponibilidade de fármacos .....</b>	<b>6</b>
3.1.1 Carreadores coloidais de fármacos.....	8
3.1.2 Nanopartículas lipídicas .....	9
3.1.3 Excipientes utilizados na produção das nanopartículas lipídicas.....	13
3.1.4 Métodos de preparação .....	15
3.1.5 Estabilidade das nanopartículas.....	16
3.1.6 Nanopartículas e administração por via oral .....	18
<b>3.2 Sobre a terapia oral do carcinoma adrenocortical com mitotano .....</b>	<b>19</b>
3.2.1 Carcinoma adrenocortical .....	19
3.2.2 Mitotano .....	25
<b>3.3 Nanopartículas lipídicas e fármacos usados no tratamento de câncer.....</b>	<b>30</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1 TWEEN 80 AND SPAN 85 OPTIMIZATION FOR STABILIZATION OF CETYL PALMITATE SLNS AND POLYOXYETHYLENE (40) STEARATE PLUS CAPRIC/CAPRYLIC TRIGLYCERIDE NLCS PREPARED BY HIGH PRESSURE HOMOGENIZATION .....</b>	<b>34</b>
<b>4.2 PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF SOLID LIPID NANOPARTICLES AND NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS LOADED WITH MITOTANE.....</b>	<b>50</b>
<b>4.3 <i>IN VITRO</i> MITOTANE RETENTION AND <i>EX VIVO</i> INTESTINAL ABSORPTION OF RACEMIC MITOTANE IN SOLID LIPID NANOCARRIERS .....</b>	<b>66</b>



<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>85</b>
<b>6</b>	<b>SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....</b>	<b>86</b>
<b>7</b>	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>87</b>
<b>8</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>104</b>
	<b>ANEXO I: ESTRUTURAS MOLECULARES DOS COMPONENTES DAS SLNS.....</b>	<b>104</b>
	<b>ANEXO II: ESTRUTURA MOLECULAR DOS COMPONENTES DA FORMULAÇÃO DE NLCS .....</b>	<b>105</b>
	<b>ANEXO III: CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO CEUA/UFSCAR.....</b>	<b>106</b>



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Estrutura química do o,p'-DDD (mitotano).....	2
<b>Figura 2:</b> Modelos de incorporação de fármacos em nanopartículas lipídicas sólidas, matriz homogênea (A), interior livre ou reduzido em fármaco com parede enriquecida (B) e interior enriquecido com o ativo com parede isenta ou reduzida em fármaco (C).....	11
<b>Figura 3:</b> Modelos de incorporação de fármacos em carreadores lipídicos nanoestruturados: cristal imperfeito (A), tipo amorfo (B) e modelo múltiplo (C).....	13
<b>Figura 4:</b> Fluxograma das etapas de produção de partículas lipídicas sólidas por homogeneização a frio e a quente.....	16
<b>Figura 5:</b> Representação esquemática das glândulas adrenais humanas.....	20
<b>Figura 6:</b> Hipótese de metabolização do mitotano para formação do ácido o,p'-diclorodifenilacético.....	26

### **Artigo 4.1 TWEEN 80 AND SPAN 85 OPTIMIZATION FOR STABILIZATION OF SLNS OF CETYL PALMITATE AND NLCS OF POLYOXYETHYLENE (40) STEARATE AND CAPRIC/CAPRYLIC TRIGLYCERIDE PREPARED BY HIGH PRESSURE HOMOGENIZATION**

<b>Figure 1:</b> Size distribution profiles of SLNs with different HLB values. SLNs HLB=8.00 (A and B); SLNs HLB=9.17 (C and D); SLNs HLB= 10.34 (E and F); SLNs HLB= 11.51 (G and H); SLNs HLB= 12.68 (I and J); SLNs HLB= 13.85 (K and L); SLNs HLB=15.00 (M and N). Intensity distributions (Left, A, C, E, G, I, K, and M). Number distributions (Right, B, D, F, H, J, L and N). The multiple curves represent individual measurements of different samples of SLNs.....	43
<b>Figure 2:</b> Size distribution profiles of NLCs with different HLB values. NLCs HLB=8.00 (A and B); NLCs HLB=9.17 (C and D); NLCs HLB= 10.34 (E and F); NLCs HLB= 11.51 (G and H); NLCs HLB= 12.68 (I and J); NLCs HLB= 13.85 (K and L); NLCs HLB=15.00 (M and N). Intensity distributions (Left, A, C, E, G, I, K and M); Number distributions (Right, B, D, F, H, J, L and N). The multiple curves represent individual measurements of different samples of NLCs.....	44





## **Artigo 4.2 PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF SOLID LIPID NANOPARTICLES AND NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS LOADED WITH MITOTANE**

**Figure 1:** Size distribution profiles of SLNs and NLCs. Unloaded SLNs (A and B); SLNs loaded with mitotane (C and D); unloaded NLCs (E and F); NLCs loaded with mitotane (G and H). Intensity distributions (Left, A, C, E and G). Number distributions (Right, B, D, F and H). The multiple curves represent individual measurements of different samples of SLNs and NLCs.....58

**Figure 2:** TG/DTG curves of mitotane drug free (MIT), mitotane loaded NLCs (NLCs-MIT), unloaded NLCs (NLCs-Free).....60

**Figure 3:** TG/DTG curves of mitotane drug free (MIT), mitotane loaded SLNs (SLNs-MIT), unloaded SLNs (SLNs-Free).....60

**Figure 4:** NLCs curves of mitotane (MIT), mitotane-loaded NLCs (NLCs), unloaded NLCs (NLCs-Free).....61

**Figure 5:** SLNs curves of mitotane (MIT), mitotane-loaded SLNs (SLNs-MIT), unloaded SLNs (SLNs-Free).....61

## **Artigo 4.3 *IN VITRO* MITOTANE RELEASE AND *EX VIVO* INTESTINAL ABSORPTION OF RACEMIC MITOTANE IN SOLID LIPID NANOCARRIERS**

**Figure 1:** Size distribution profiles of SLNs and NLCs. Unloaded SLNs (A and B); SLNs loaded with mitotane (C and D); unloaded NLCs (E and F); NLCs loaded with mitotane (G and H). Intensity distributions (Left, A, C, E and G). Number distributions (Right, B, D, F and H). The multiple curves represent individual measurements of different samples of SLNs and NLCs.....76

**Figure 2:** In vitro release of mitotane (MIT) from SLNs (A) and NLCs (B) in three different solubilization media: 0.1 M HCl, pH 1.2; phosphate buffer at pH 6.8 and pH 7.4. Data represent means  $\pm$  S.D., n = 6.....78



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS) e correlações <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i> .....	6
--	---

### **Artigo 4.1 TWEEN 80 AND SPAN 85 OPTIMIZATION FOR STABILIZATION OF SLNS OF CETYL PALMITATE AND NLCs OF POLYOXYETHYLENE (40) STEARATE AND CAPRIC/CAPRYLIC TRIGLYCERIDE PREPARED BY HIGH PRESSURE HOMOGENIZATION**

<b>Table 1:</b> HLB values obtained for different ratios of surfactants in the seven formulations used for production of SLNs and NLCs by high pressure homogenization.....	40
---	----

<b>Table 2:</b> Mean diameter (Z-average), polydispersity index (PI), zeta potential (ZP) of SLNs and NLCs with HLBs ranging from 8 to 15 (n=3).....	45
--	----

<b>Table 3:</b> Mean diameter (Z-average), polydispersity index (PI), zeta potential (ZP) of SLNs (HLB=8) and NLCs (HLB=10.34) for fresh dispersions (0 day) and at 2 and 28 days storage at 4°C (n=3).....	47
---	----

### **Artigo 4.2 PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF SOLID LIPID NANOPARTICLES AND NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS LOADED WITH MITOTANE**

<b>Table 1.</b> Composition of solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs) unloaded or loaded with mitotane* .....	55
--	----

<b>Table 2:</b> Mean diameter (Z-average), polydispersity index (PI), zeta potential (ZP) of unloaded and mitotane loaded SLNs and NLCs (n = 3).....	59
--	----

<b>Table 3:</b> Storage stability of SLNs and NLCs loading mitotane on the day preparation. after 1 to 28 days of preparation monitored by mean particle (Z-average), polydispersity index (PI) and zeta potencial (ZP) analysis (n=3).....	62
---	----



### **Artigo 4.3 *IN VITRO* PH-RESISTANCE AND *EX VIVO* INTESTINAL ABSORPTION OF RACEMIC MITOTANE IN SOLID LIPID NANOCARRIERS**

**Table 1.** Composition of solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs) unloaded or loaded with mitotane\*..... 72

**Table 2:** Mean diameter (Z-average), polydispersity index (PI), zeta potential (ZP) of unloaded and mitotane loaded SLNs and NLCs (n = 3)..... 77

**Table 3:** Quantification of mitotane (%) in the internal environment (the outer medium, %) and at the serosal side (permeated, %) by the everted gut sac method. Mitotane was administered in its free form, as a physical mixture (PM) in olive oil, and loaded in SLNs (MIT-SLNs) or NLCs (MIT-NLCs) (n=6)..... 79



## **NOMENCLATURAS**

**BCS:** Sistema de Classificação Biofarmacêutica

**CAC:** Carcinoma adrenocortical

**DSC:** Calorimetria diferencial de varredura

**FDA:** Food and Drug Administration

**HLB/ EHL:** Equilíbrio hidrofílico-lipofílico

**HPH:** Homogeneização à alta pressão

**K<sub>ow</sub>:** Coeficiente óleo-água

**MDR-I:** gene de resistência multi-droga

**NLCs:** Carreadores lipídicos nanoestruturados

**O/A:** Óleo/água

**o,p'-DDA:** ácido diclorodifenilacético

**o,p'-DDD:** mitotano

**o,p'-DDE:** diclorodifenildicloroetano

**PI:** Polidispersidade

**SLNs:** Nanopartículas lipídicas sólidas

**Span 85:** Trioleato de sorbitano

**TG:** Termogravimetria

**Tween 80:** Polisorbato 80

**ZP:** Potencial zeta





## 1 INTRODUÇÃO

O carcinoma adrenocortical (CAC) é uma neoplasia maligna que acomete o córtex das glândulas adrenais, atingindo, anualmente, 0,5 a 2 casos por milhão de habitantes no mundo, sendo sua prevalência é de 4-12 casos/ milhão de habitantes (PIANOVSKI *et al.*, 2006; MENAA & MENAA, 2012).

No sul do Brasil, em especial no Paraná, a incidência do CAC em pediatria é singular, atingindo de 3,4 a 4,2 casos por milhão de crianças. Este aumento está associado a uma mutação hereditária do gene *TP53* (R337H), detectada nas crianças acometidas pelo CAC (PIANOVSKI *et al.*, 2006). Apesar desta forte associação entre a mutação do gene *TP53* e o CAC, não são encontradas, na literatura científica, explicações para o surgimento de tal mutação.

O CAC ainda é reportado na literatura por grupos de pesquisa específicos e não existem dados disponíveis da sua incidência na Organização Mundial de Saúde, por ser uma neoplasia rara.

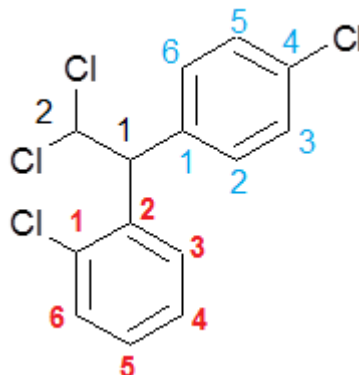
Pacientes acometidos pelo CAC possuem um prognóstico ruim, com uma taxa de sobrevida de 40% após 5 anos do diagnóstico (TERZOLO *et al.*, 2000). A presença de metástase reduz a sobrevida em 5 anos para menos de 10% dos pacientes (BARLASKAR & HAMMER, 2007).

Uma das características mais importantes das neoplasias malignas é o crescimento desenfreado e desorganizado de células, o que provoca um aumento do tamanho ou disfunção do tecido acometido.

A hiperplasia e a hiperfuncionalidade das glândulas adrenais no CAC podem causar excessos na biossíntese dos mineralocorticóides, glicocorticóides ou andrógenos e precursores de estrógenos, o que conduz a quatro síndromes clínicas distintas: a virilização, a síndrome de Cushing, uma forma mista (geralmente associação de virilização e síndrome de Cushing) e ainda a ausência de excessos hormonais, quando se observa apenas um efeito de massa (tumor palpável) (KOPF *et al.*, 2001).

O tratamento de primeira escolha do CAC é a retirada do tumor através de cirurgia, particularmente se a doença é detectada nos primeiros estádios, sendo esta a única opção potencialmente curativa (POMMIER & BRENNAN, 1992; SCHULICK & BRENNAN, 1999). Nos casos de CAC em que a ressecção cirúrgica completa não é possível, está indicado o uso de

mitotano (o,p'-diclorodifenildicloroetano ou o,p'-DDD ou, segundo a IUPAC, 1-cloro-2-[2,2-dicloro-1-(4-clorofenil)-etil]-benzeno) (**Figura 1**), associado a outros agentes antineoplásicos (BARLASKAR & HAMMER, 2007).



**Figura 1:** Estrutura química do o,p'-DDD (mitotano)

O mitotano (Lisodren<sup>®</sup>) é aprovado pelo *Food and Drug Administration* (FDA/EUA) para tratamento do carcinoma adrenocortical (CAC). É comercializado pela *Bristol-Myers Squibb* na forma de comprimidos contendo 500 mg de fármaco. Um dado não esclarecido pelo fabricante do mitotano é a existência de estereocentro (**Figura 1**, carbono **1** da cadeia etil), embora o carbono seja quiral, o que determina a existência de enantiômeros, R e S do mitotano, o fabricante não informa sobre a síntese estereoespecífica, o que indica, possivelmente, que o medicamento é fornecido na forma de mistura racêmica (BUSER & MUELLER, 1995; HUTCHISON *et al.*, 2004).

A posologia para crianças é de 1-2g/dia em doses divididas, aumentando gradualmente para 5-7 g/dia, em adultos é 2-6 g/dia divididos em 3-4 doses e, depois aumentada gradativamente até 9-10g/dia, em 3-4 doses (LACY *et al.*, 2009). Estas altas doses causam reações adversas gastrintestinais (anorexia, náuseas, vômitos e diarreia) em 80% dos pacientes e toxicidade neurológica (depressão do sistema nervoso central, tontura, vertigem, cefaleia, confusão, fraqueza, labilidade emocional) em 40% dos pacientes (HUTCHISON *et al.*, 2004; DAFFARA *et al.*, 2008).

Devido à característica lipofílica, o mitotano inicialmente se acumula no tecido adiposo e aparece em baixas concentrações no sangue (TERZOLO *et al.*, 2000). Podem ser necessários meses para a saturação do tecido adiposo, o que depende do índice de massa corpórea e do perfil metabólico de cada paciente, entre outros fatores.

A concentração plasmática máxima é obtida em 3 a 5 horas e o equilíbrio do mitotano no plasma e tecidos é alcançado no período de 12 horas. A meia-vida plasmática varia de 18 a 159 dias, com mediana de 42 a 63 dias (HUTCHISON *et al.*, 2004).

Fármacos lipofílicos, como o mitotano apresentam baixa solubilidade em água e baixa permeabilidade pelas barreiras celulares, limitando a sua absorção (ATTIVI, 2010). Apesar de serem fármacos reconhecidamente potentes no tratamento de várias doenças, estas limitações dificultam muito sua formulação e administração, de modo a não atingirem sua ação terapêutica máxima devido à baixa biodisponibilidade.

Atualmente, sistemas nanoestruturados são utilizados para a veiculação de fármacos com estas características. Ainda que utilizando um fármaco cuja ação e toxicidade já sejam conhecidas, sua veiculação em sistemas nanoestruturados pode modificar a farmacocinética do fármaco em relação à sua forma livre ou convencional, além de protegê-lo de agressões do meio biológico (KOKKONA *et al.*, 2000; SOUTO & MÜLLER, 2010). Esta é uma estratégia eficiente quanto ao bem-estar do paciente proporcionando aumento do índice terapêutico e reduzindo efeitos adversos pela redução da dose e da frequência de administração (ATTIVI, 2010).

Vários carreadores estão disponíveis comercialmente para a produção destes sistemas tais como: lipossomas, ciclodextrinas, cristais líquidos, nanopartículas poliméricas ou ainda micropartículas contendo domínios de dimensões da ordem de nanômetros (KOKKONA *et al.*, 2000; SOUTO & MÜLLER, 2010).

ZANCANELLA (2008) estudou a encapsulação de mitotano em lipossomas e realizou ensaios *ex vivo* e *in vivo*. Os resultados *ex vivo* obtidos pelo método do saco intestinal invertido, com o mitotano encapsulado em lipossomas mostraram maior permeação intestinal do que o fármaco livre e que a dieta enteral composta por triglicerídeos de cadeia média (formulação convencional). No ensaio *in vivo*, a administração crônica em ratos machos *Wistar*, o mitotano encapsulado em lipossomas também gerou concentrações plasmáticas maiores que as da formulação convencional. Nesse mesmo trabalho, os lipossomas mostraram-se carreador promissor para a veiculação do mitotano, por possibilitar a administração de menores doses, com melhor aproveitamento da dose administrada e, provavelmente, redução dos efeitos colaterais e frequência de administração.

Nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) e carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs) têm sido propostos como sistemas coloidais alternativos aos lipossomas e carreadores poliméricos para a encapsulação de fármacos lipofílicos por apresentarem vantagens como maior estabilidade, facilidade de escalonamento, menor toxicidade, liberação sustentada do ativo, direcionamento do fármaco ao sítio específico (YANG *et al.*, 1999; SERPE *et al.*, 2004; SEVERINO *et al.* 2012a).

Em estudos preliminares de nosso laboratório (SEVERINO *et al.*, 2011; SEVERINO *et al.*, 2012b) o mitotano foi encapsulado em SLNs e NLCs pelo processo de homogeneização de alto cisalhamento seguido de homogeneização a alta pressão. As SLNs eram compostas do lipídeo cetil palmitato e as NLCs de estearato de polioxietileno (40) e triacilgliceróis de ácido cáprico/caprílico e dos tensoativos polissorbato 80 (Tween<sup>®</sup> 80) e trioleato de sorbitano (Span<sup>®</sup> 85).

Os resultados mostraram que partículas encapsulando mitotano apresentaram diâmetros da ordem de 200 nm, polidispersidade menor que 0,3 e potencial zeta da ordem de -15 mV. Apesar das SLNs e NLCs serem promissoras para a encapsulação do mitotano, observações posteriores mostraram que o mitotano era liberado das partículas durante um curto tempo de estocagem (CAMERIN GRANDO *et al.*, 2012).

Essa limitação e a necessidade de estudos adicionais para comprovar a potencialidade dessas partículas como estratégia para melhorar as propriedades de solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal do mitotano deram origem ao desenvolvimento do presente trabalho.

## 2 OBJETIVO E METAS

### 2.1 Objetivo

O objetivo deste trabalho foi preparar e caracterizar SLNs e NLCs contendo mitotano racêmico, em termos de propriedades fisicoquímicas, estabilidade de estocagem e retenção do mitotano em diferentes pHs *in vitro* e permeação intestinal em modelo *ex vivo*, visando aplicação dessa estratégia nanotecnológica na administração do mitotano por via oral.

### 2.2 Metas

- Preparar e caracterizar em termos de propriedades fisicoquímicas, SLNs compostas de cetil palmitato (**Anexo I**) e NLCs contendo na proporção mássica: 70% estearato de polioxietileno (40) e 30% triacilgliceróis de ácido cáprico/caprílico, além de Tween<sup>®</sup> 80 e Span<sup>®</sup> 85 como tensoativos (**Anexo II**);
- Investigar a proporção dos tensoativos mais indicada para estabilidade de estocagem das SLNs e NLCs;
- Avaliar, *in vitro*, a retenção do mitotano nas nanopartículas, através da sua liberação das nanopartículas em diferentes pHs;
- Avaliar a influência das SLNs e NLCs na permeação intestinal do mitotano em modelo *ex vivo*.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Características físico-químicas e biodisponibilidade de fármacos

A ação terapêutica de um fármaco administrado por via oral depende de sua permeabilidade intestinal e de sua solubilidade em líquidos biológicos.

Devido à importância destes fatores, AMIDON *et al.* (1995) propôs o sistema de classificação biofarmacêutica (BCS) de substâncias ativas que é uma ferramenta desenvolvida para correlacionar a dissolução *in vitro* com a biodisponibilidade *in vivo*, a fim de verificar se o produto farmacêutico é sensível a alterações do processo produtivo, dos constituintes da formulação ou da concentração do fármaco.

Na BCS, os fármacos podem ser agrupados em quatro classes biofarmacêuticas, conforme **Tabela 1:**

**Tabela 1:** Sistema de Classificação Biofarmacêutica (BCS) e correlações *in vitro* / *in vivo* (AMIDON *et al.* 1995, BUMMER, 2004).

Classe	Permeabilidade	Solubilidade	Correlações <i>in vitro</i> / <i>in vivo</i>
I	Alta	Alta	Fármaco com janela terapêutica estreita
II	Alta	Baixa	Dissolução <i>in vitro</i> é similar à dissolução <i>in vivo</i>
III	Baixa	Alta	Absorção é fator limitante
IV	Baixa	Baixa	Difícil de estabelecer bioequivalência

A solubilidade é definida como a quantidade solvente necessária para solubilizar um as moléculas de um soluto. A solubilidade aquosa de fármacos é inversamente proporcional a sua partição entre octanol e água ( $K_{ow}$ ) e depende da formação de ligações de hidrogênio com a água. Um fármaco solúvel é aquele cuja mais alta dose clínica em seres humanos pode ser dissolvida em volumes iguais ou menores que 250 mL de água, em pH 1 a 7,5 e na temperatura corporal ( $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ ) (YU *et al.*, 2002).

A permeabilidade é definida como a quantidade real de fármaco que permeia a parede do jejuno. Na ausência de evidências que comprovem instabilidade no trato gastrointestinal, um fármaco é considerado altamente permeável quando a extensão de sua absorção intestinal é

igual ou superior a 90%. Uma absorção inferior a 90% caracteriza fármaco de baixa permeabilidade (AMIDON *et al.*, 1995, LÖBENBERG & AMIDON, 2000).

Apesar da determinação das propriedades fundamentais do fármaco, tais como a solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal, sejam centrais para qualquer estratégia de formulação oral, é importante não se concentrar somente nestes parâmetros. É necessário atentar-se a interação entre a droga e o ambiente gastrointestinal. Fatores fisiológicos complexos que influenciam a quantidade de fármaco na superfície intestinal, o processo de transporte pela membrana e a liberação para via sistêmica, também são importantes (LÖBENBERG & AMIDON, 2000).

Recentemente, WU & BENET (2005) reavaliaram a aplicação da classificação biofarmacêutica na disposição da droga (WU & BENET, 2005). Uma revisão dos medicamentos classificados nas classes I-IV pela BCS destacou que drogas em Classes I e II são metabolizadas e eliminadas, enquanto, Classes III e IV drogas são eliminadas inalteradas. Com base nisto, um sistema de classificação modificado, nomeado Sistema de Classificação Biofarmacêutica de Disposição dos Fármacos. Sob este sistema, a extensão do metabolismo (ou a principal via de eliminação da droga) substituiria a permeabilidade da membrana, como um critério de classificação. As vantagens propostas incluem classificação das drogas fazendo de maneira mais fácil, evitando a ambiguidade existente com a permeabilidade e bem como o metabolismo, reduzindo assim o número de fármacos referidos em mais do que uma categoria.

Este novo sistema de classificação pode ser uma maneira de distinguir mais claramente entre fármacos da classe II (metabolismo extenso) versus fármacos da classe IV (pouco metabolismo). Foi demonstrado que fármacos classificados como Classe II ou IV podem ser substratos para transportadores de efluxo, como a P-gp. Dados recentes têm mostrado que existem vários transportadores diferentes, tanto de absorção e efluxo, no intestino, que tem o potencial para alterar a captação e a disposição do fármaco (WU & BENET, 2005; CONSTANTINIDES & WASAN, 2007). WU & BENET (2005) sugeriram que os transportadores de efluxo são predominantes para fármacos da classe II, enquanto transportadores de efluxo e de absorção podem influenciar fármacos da classe IV (WU & BENET, 2005).

Muitos fármacos lipofílicos são também conhecidos por serem metabolizados pelas enzimas intestinais do citocromo P450, bem como acredita-se que este efeito seja conjunto com a P-gp (WU & BENET, 2005).

Em muitos casos, as refeições de alto teor de gordura podem aumentar significativamente a biodisponibilidade de fármacos lipofílicos das Classes II e IV (FLEISHER *et al.*, 1999). Esta absorção é melhorada devido a um grande grau de lipídeos endógenos no processo de digestão e de produtos da solubilização de lipídeos de digestão e do fármaco co-administrado, por sais biliares e micelas mistas (FLEISHER *et al.*, 1999).

Dados mais recentes mostraram que as refeições ricas em gordura inibem os transportadores e, conseqüentemente, podem aumentar substancialmente o grau de absorção de fármacos da Classe II que são substratos destes transportadores (WU & BENET, 2005).

Para estes fármacos altamente lipofílicos ( $\log P > 5$ , solubilidade em triglicerídeos de cadeia média  $> 50\text{mg.g}^{-1}$ ) ocorre associação a lipoproteínas linfáticas nos enterócitos, que conduz ao transporte via linfa intestinal, especialmente por quilomícrons. O tamanho físico das lipoproteínas faz com que a difusão pelo endotélio vascular seja limitado e que o acesso preferencial das lipoproteínas ocorra por via linfática. Os benefícios associados ao transporte linfático são: diminuição do metabolismo de primeira passagem e exposição linfática a concentrações de fármaco em maior magnitude, sendo importante para fármacos antineoplásicos, pois esta é a rota para metástase de tumores sólidos (YÁÑEZ *et al.*, 2011).

### **3.1.1 Carreadores coloidais de fármacos**

A descoberta de muitas substâncias potentes não é suficiente para assegurar a eficácia da terapia medicamentosa. Fármacos com baixa solubilidade aquosa e baixa permeação apresentam biodisponibilidade insuficiente e não atingem a concentração plasmática efetiva. A produção do respectivo pró-fármaco solúvel, a dispersão em matrizes hidrofílicas, o uso de tensoativos ou a encapsulação em carreadores promovem a dissolução de moléculas pouco solúveis, proporcionando adequada biodisponibilidade (ATTIVI, 2010).

Carreadores têm sido amplamente utilizados para encapsular fármacos que apresentam baixa biodisponibilidade, melhorando características biofarmacêuticas. Contudo, o carreador deve cumprir requisitos como não apresentar toxicidade, ter suficiente capacidade de carregamento, alterar a distribuição do fármaco, liberá-lo de forma sustentada, proporcionar



estabilidade física e química, ser passível de produção em grande escala e possibilitar a esterilização (KRISTL *et al.*, 2003; RADOMSKA-SOUKHAREV, 2007; FRICKER *et al.*, 2010).

Sistemas coloidais, particularmente aqueles na escala nanométrica, têm sido amplamente estudados nos últimos anos, pois cumprem os requisitos mencionados acima. A micronização é um dos métodos para aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade de ativos pertencentes às classes II e IV da BCS (AMIDON *et al.*, 1995). Dentre seus carreadores mais utilizados estão: os lipossomas, micro e nanoemulsões, nanocápsulas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas. Neste trabalho serão abordadas somente as nanopartículas lipídicas.

### **3.1.2 Nanopartículas lipídicas**

#### **3.1.2.1 Nanopartículas lipídicas sólidas**

Nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) são obtidas substituindo o óleo em uma emulsão óleo em água por um ou mais lipídeos biocompatíveis e biodegradáveis, no estado sólido (PARDEIKE *et al.*, 2009; WIECHERS & SOUTO, 2010). As SLNs foram desenvolvidas no início da década de 90 como sistemas carreadores alternativos combinando as vantagens das nanopartículas poliméricas (matriz sólida para liberação sustentada), lipossomas e emulsões, mas evitando algumas das suas desvantagens em relação à estabilidade, toxicidade e escalonamento (LUCKS & MÜLLER, 1991; KRISTL *et al.*, 2003; RADOMSKA-SOUKHAREV, 2007; FRICKER *et al.*, 2010). As SLNs apresentam tamanho coloidal entre 50 e 1000 nm (FRICKER *et al.*, 2010; VIGHI *et al.*, 2010). Alguns autores tem relatado (MÜLLER *et al.*, 2000; KAUR *et al.*, 2008) que pequenas partículas entre 120 e 200 nm dificilmente sofrem depuração pelas células do sistema reticulo-endotelial, evitando a filtração esplênica e hepática.

As SLNs apresentam excipientes com custo relativamente baixo, capacidade de serem produzidas em larga escala e amplo espectro de aplicação: oral, intravenosa, oftálmica, dérmica, ocular, tópica e transdérmica (RADOMSKA-SOUKHAREV, 2007; SOUTO & MÜLLER, 2010; PUGLIA & BONINA, 2012).

As SLNs são compostas por matriz lipídica sólida, tensoativo(s) e água. Dentre os lipídeos utilizados inclui triglicerídeos, esteróis, diglicerídeos, monoglicerídeos, ácidos graxos e ceras, em concentração de 0,1% (m/m) a 30% (m/m), dispersos em meio aquoso (WIECHERS & SOUTO, 2010). Estes lipídeos se encontram sólidos tanto a temperatura ambiente quanto a

temperatura corporal, proporcionando proteção às moléculas de fármaco neles incorporadas contra a degradação química, além de uma menor mobilidade dos ativos incorporados, podendo sustentar ou retardar a velocidade de liberação (MEHNERT & MÄDER, 2001).

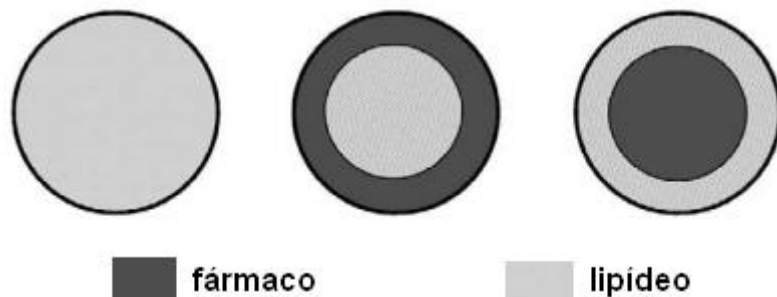
Todas as classes de tensoativos (catiônico, aniônico ou não-iônico, com diferentes pesos moleculares) têm sido utilizadas para estabilizar a dispersão lipídica, em concentrações que variam entre 0,5% (m/m) a 5% (m/m) e a sua escolha depende da via de administração (MEHNERT & MÄDER, 2001)

As SLNs podem ser utilizadas como sistema para incorporação de fármacos hidrofóbicos e, com menor capacidade de carregamento, para fármacos hidrofílicos (BATTAGLIA & GALLARATE, 2012). SOUTO & MÜLLER (2010) descrevem três modelos de incorporação de fármacos nas SLNs (**Figura 2**):

-SLNs do tipo I ou modelo da matriz homogênea: o fármaco está molecularmente distribuído, disperso no interior lipídico ou apresenta-se na forma de *clusters* amorfos (MEHNERT & MÄDER, 2001; SOUTO *et al.*, 2007). Este modelo é obtido usando taxas otimizadas de fármaco/lipídeo(s) e homogeneização a alta pressão (HPH) a quente ou a frio;

- SLNs do tipo II ou modelo da parede enriquecida (*“drug-enriched shell model”*): são obtidas quando a concentração do fármaco no lipídeo fundido é muito baixa. Após aplicar a técnica HPH a quente, durante o resfriamento da nanoemulsão homogeneizada, a fase lipídica precipita primeiro, conduzindo a uma concentração aumentada do fármaco no lipídeo fundido remanescente. Um interior, com concentração reduzida ou isenta de fármaco, é formado quando este está na sua concentração de saturação no lipídeo fundido remanescente. Este modelo não é adequado para liberação prolongada de fármacos, todavia pode ser utilizado para liberação imediata “burst” (SOUTO & MÜLLER, 2010b).

-SLNs do Tipo III ou modelo do núcleo enriquecido (*“drug-enriched core model”*): são formadas quando a concentração de fármaco é relativamente próxima à solubilidade do lipídeo fundido. No resfriamento da nanoemulsão, a solubilidade irá diminuir; quando a solubilidade de saturação é ultrapassada, o fármaco precipita e ele é coberto por uma couraça de lipídeo quase isenta de fármaco. Este tipo de SLNs é adequado para liberação sustentada de fármaco uma vez que este está imobilizado no interior lipídico (WESTESEN & BUNJES, 1995; SOUTO *et al.*, 2004a,b).



**Figura 2:** Modelos de incorporação de fármacos em nanopartículas lipídicas sólidas, matriz homogênea (A), interior livre ou reduzido em fármaco com parede enriquecida (B) e interior enriquecido com o ativo com parede isenta ou reduzida em fármaco (C). Adaptado de MÜLLER *et al.*, 2002.

A liberação do fármaco a partir da matriz lipídica sólida ocorre por difusão e, adicionalmente, pela degradação da nanopartícula lipídica (MENDOZA *et al.*, 2009).

O tipo de lipídeo e tensoativo utilizado no desenvolvimento das SLNs podem afetar consideravelmente a liberação do fármaco (MENDOZA *et al.*, 2009).

Em outro estudo, PALIWAL e colaboradores (2009) mostraram que, com a mesma concentração de lipídeos, a taxa de liberação do metotrexato a partir das SLNs contendo Gliceril dibehenato (19,0%) é cerca de 90% maior do que das SLNs contendo ácido esteárico (10,4%).

### 3.1.2.2 Carreadores lipídicos nanoestruturados

Carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs) são obtidos usando misturas de lipídeos sólidos e lipídeos líquidos. Para obter esta combinação, lipídeos sólidos são misturados a lipídeos líquidos, em uma proporção variável de 70:30 até 99,9:0,1 (m/m). Devido à presença de óleo nestas misturas, há um decréscimo na temperatura de fusão, comparado ao lipídeo sólido puro, mas as combinações obtidas também são sólidas à temperatura ambiente e corporal. O conteúdo sólido global pode alcançar até 95% em uma formulação (WIECHERS & SOUTO, 2010; PUGLIA & BONINA, 2012).

As NLCs surgiram no final da década de 90 para melhorar algumas características das SLNs, maximizar sua eficiência de encapsulação e minimizar a expulsão do ativo das partículas durante a estocagem (DAS & CHAUDHURY, 2010).

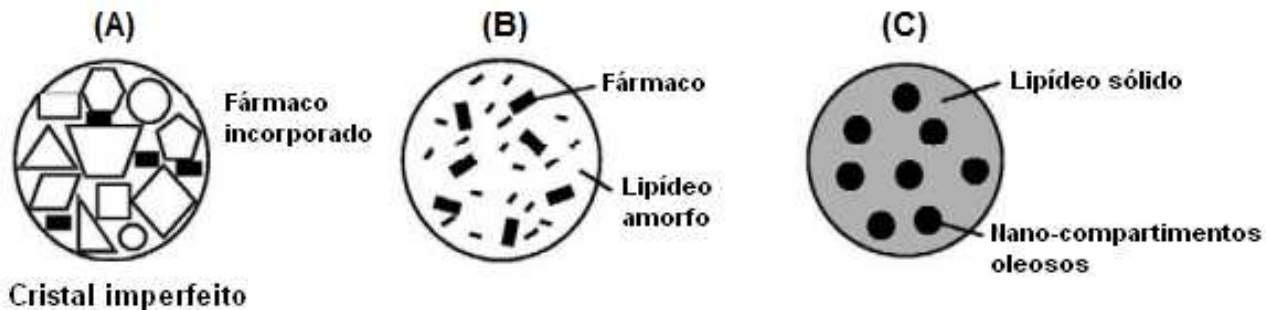
As NLCs apresentam 3 modelos de incorporação propostos (**Figura 3**), diferindo no tipo de componente lipídico usado para sua produção (SOUTO & MÜLLER, 2010):

-NLCs tipo I ou modelo do cristal imperfeito: consistem em uma matriz com muitos espaços vazios e livres, que podem acomodar o fármaco. Estas partículas são obtidas quando quantidade suficiente de lipídeos sólidos é misturada a lipídeos líquidos (óleos). Diante de diferentes comprimentos de cadeia dos ácidos graxos e mistura de mono-, di- e triacilgliceróis, a matriz das NLCs não consegue formar uma estrutura altamente organizada (MÜLLER *et al.*, 2002), criando imperfeições estruturais.

-NLCs tipo II ou modelo amorfo: são obtidas ao se misturar lipídeos especiais, que não recristalizam após homogeneização e resfriamento da nanoemulsão. Estes lipídeos criam matrizes amorfas que evitam ou protelam o fenômeno de recristalização dos lipídeos no resfriamento e durante o armazenamento, minimizando a expulsão do fármaco.

-NLCs Tipo III ou modelo múltiplo: são compostas por nano-compartimentos oleosos pequenos criados no interior da matriz lipídica sólida das nanopartículas pelo processo de separação de fases (MÜLLER *et al.*, 2002). Resultam da mistura de lipídeos sólidos com óleos de cadeias médias (HU *et al.*, 2006) e triacilgliceróis de cadeia longa (SOUTO *et al.*, 2004a) ou ácido oleico (HU *et al.*, 2005) em uma proporção na qual a solubilidade das moléculas oleosas no lipídeo sólido é excedida. Durante o resfriamento da nanoemulsão, o óleo precipita e formando gotas minúsculas. Subsequente, a solidificação do lipídeo sólido ao redor destas gotas leva à fixação dos nanocompartimentos oleosos. A vantagem deste modelo é o aumento da capacidade de carregamento para fármacos que tem maior solubilidade em lipídeos líquidos que em lipídeos sólidos (JENNING *et al.*, 2000).

Os modelos teóricos de NLCs foram propostos baseados em dados analíticos que permitem caracterizar fisicoquimicamente as matrizes das NLCs.



**Figura 3:** Modelos de incorporação de fármacos em carreadores lipídicos nanoestruturados: cristal imperfeito (A), tipo amorfo (B) e modelo múltiplo (C). Adaptado de MÜLLER *et al.*, 2002.

### 3.1.3 Excipientes utilizados na produção das nanopartículas lipídicas

#### 3.1.3.1 Tensoativos

Os tensoativos são empregados nas nanopartículas lipídicas na dispersão do lipídeo fundido na fase aquosa no processo de preparação, para estabilizar as nanopartículas depois do resfriamento. A molécula do tensoativo apresenta uma cabeça hidrofílica e cauda lipofílica, que lhe permite associar-se na interface das partículas e meio aquoso, reduzindo a tensão superficial entre as duas fases. O valor do equilíbrio hidrofílico-lipofílico (EHL) dos tensoativos é um parâmetro que revela a proporção relativa das partes hidrofílicas e lipofílicas da molécula (HOLMBERG *et al.*, 2003; POUTON & PORTER, 2008).

Os tensoativos utilizados nas nanopartículas lipídicas se dividem em quatro categorias: aniônico, catiônicos, zwitteriônicos e não iônicos. Em geral, os tensoativos iônicos apresentam repulsão eletrostática empregam uma abordagem eletrostática, enquanto os tensoativos não iônicos dependem da repulsão estérica para estabilizar as partículas (HOLMBERG *et al.*, 2003; POUTON & PORTER, 2008).

Vários fatores devem ser considerados na escolha de agentes tensoativos para estabilizar as nanopartículas lipídicas como o valor de EHL, via de administração das partículas, a toxicidade e tamanho das cadeias destes agentes (POUTON & PORTER, 2008).

Tensoativos com valores de EHL na faixa de 8-18 são adequados para a preparação de dispersão óleo-em-água. Os tensoativos não iônicos são adequados para as preparações orais e parenterais em detrimento aos iônicos, devido à sua menor toxicidade e irritação (POUTON & PORTER, 2008).

Outro fator importante é a influência variável de diferentes tensoativos sobre a biodegradação *in vivo* da matriz lipídica. Por exemplo, agentes tensoativos não iônicos são mais eficazes para a inibição da decomposição da matriz lipídica *in vivo* (POUTON & PORTER, 2008).

Finalmente, a escolha de tensoativos e suas misturas também afetam o tamanho das nanopartículas de lipídicas. SLNs preparadas com os mesmos lipídeos podem ter diferentes tamanhos, devido à utilização de diferentes tensoativos (ZHANG *et al.*, 2006)

### **3.1.3.2 Lipídeos**

A escolha dos lipídeos é crítica para se obter a adequada capacidade de carregamento das nanopartículas, estabilidade e liberação sustentada. O polimorfismo dos lipídeos também afeta as propriedades de nanopartículas (POUTON & PORTER, 2008).

Nanopartículas lipídicas compostas por ceras apresentam significativa expulsão do fármaco, devido a estrutura mais cristalina desses lipídeos sólidos. Além do tipo de lipídeo, outros fatores também podem afetar a cristalinidade lipídica, incluindo a condição de armazenamento e método de produção. Por exemplo, o processo de arrefecimento rápido pode ser benéfico para manter o lipídeo na matriz, em uma forma meta-estável (SOUTO & MÜLLER, 2008; MARCATO, 2009).

Para evitar os problemas de cristalinidade e polimorfismo observados nas SLNs, lipídeos líquidos foram incorporados a lipídeos sólidos na tentativa de perturbar a cristalinidade da matriz lipídica sólida além de proporcionar maior quantidade de espaços livres para o fármaco, as NLCs (SOUTO & MÜLLER, 2008; MARCATO, 2009).

Adicionalmente, a hidrofobicidade dos lipídeos varia com o balanço de grupos funcionais hidrofílicos e hidrofóbicos das moléculas, impactando na partícula. Os triglicerídeos são mais hidrofóbicos em relação aos mono e diglicerídeos, porque todos os três grupos hidroxil do glicerol foram substituídos por um éster graxo (BUMMER, 2004).

A solubilidade de fármacos na matriz lipídica foi proposta como um parâmetro da liberação oral de fármacos. Em geral, alta eficiência de carregamento nas nanopartículas pode ser obtida quando o fármaco tem alta solubilidade no lipídeo fundido ou alto coeficiente de partição entre o lipídeo fundido e a fase aquosa (BUMMER, 2004; MANJUNATH *et al.*, 2005).

### 3.1.4 Métodos de preparação

Atualmente, SLNs e NLCs são produzidas por diversos métodos como: homogeneização de alto cisalhamento; emulsificação/evaporação do solvente; ultrassom; microemulsão, difusão de solvente, homogeneização de alta pressão, subdividida em homogeneização fria e quente (WIECHERS & SOUTO, 2010; SOUTO & MÜLLER, 2010).

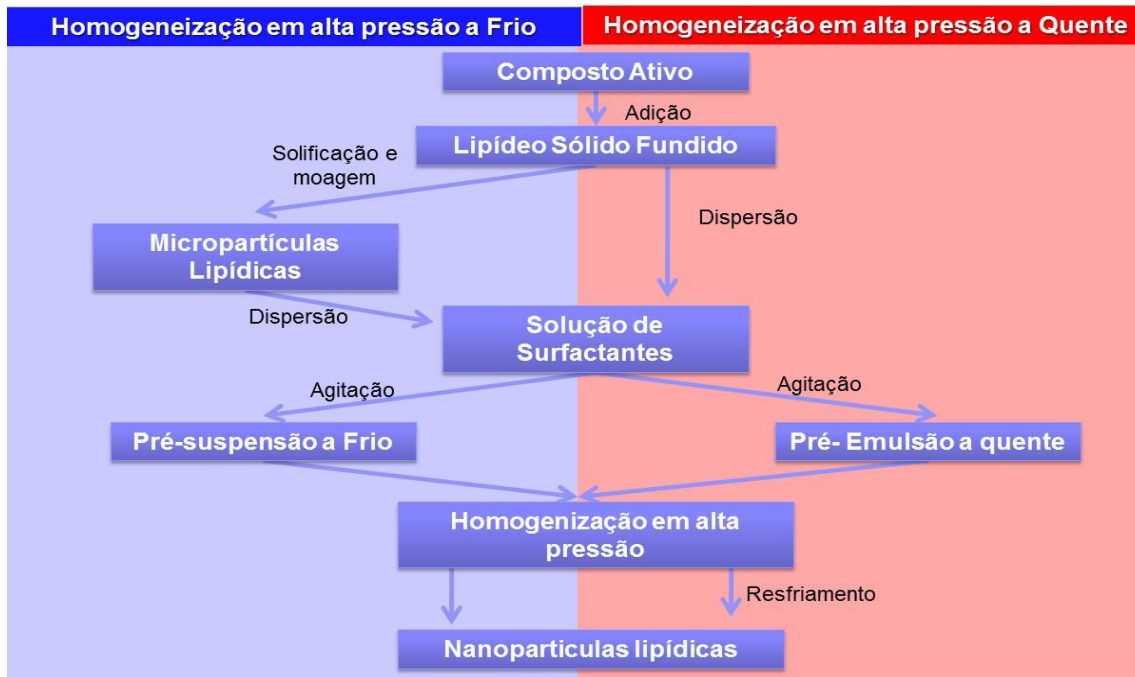
#### 3.1.4.1 Homogeneização à alta pressão

A técnica de homogeneização em alta pressão (HPH) desenvolvida por LUCKS & MÜLLER em 1991 (patente Europeia número 0605497), tem emergido como uma técnica confiável e poderosa para a preparação de nanopartículas. Em contraste às outras técnicas, o escalonamento é possível já que homogeneizadores de diferentes tamanhos estão disponíveis comercialmente, alcançando resultados semelhantes aos obtidos laboratorialmente.

Na HPH a quente, o fármaco é disperso ou solubilizado no lipídeo sólido fundido, normalmente 5–10 °C acima do ponto de fusão do lipídeo. Depois, a mistura fármaco-lipídeo fundida é dispersa em uma solução aquosa de tensoativo mantida na mesma temperatura e agitada a alta velocidade, formando uma pré-emulsão óleo/água (O/A). Esta emulsão é passada através do homogeneizador de alta pressão por um pistão estreito, de escala nanométrica e acelerada em uma curta distância, com alta velocidade ao encontro de uma barreira. Este fluido é submetido a um grande estresse no qual as forças de cavitação rompem as gotículas, gerando as nanogotículas (MEHNERT & MADER, 2001), na temperatura acima do ponto de fusão do lipídeo, obtendo-se nanoemulsão O/A quente. Esta dispersão é resfriada a uma temperatura abaixo da temperatura ambiente ocasionando assim a cristalização do lipídeo e formação das nanopartículas lipídicas (**Figura 4**). Neste processo, geralmente utiliza-se 3 ciclos de 500 bar ou 2 ciclos de 800 bar.

No método HPH a frio, a massa fundida lipídica com o fármaco é resfriada. Após a solidificação da massa é esmagada e moída formando micropartículas. As micropartículas lipídicas são então dispersas numa solução de surfactante fria produzindo uma pré-suspensão fria de partículas lipídicas micronizadas. Esta suspensão é passada através de homogeneizador sob pressão elevada à temperatura ambiente, aplicando geralmente 5-10 ciclos a 1500 bar (**Figura 4**). Este método minimiza a exposição do fármaco ao calor (embora

um rápido período de aquecimento seja necessário) e é mais adequado para fármacos termolábeis (WONG *et al.*,2007b).



**Figura 4:** Fluxograma das etapas de produção de partículas lipídicas sólidas por homogeneização a frio e a quente (adaptado de MÄDDER & MEHNERT, 2001).

Este método é utilizado principalmente na incorporação/encapsulação de ativos lipofílicos, porque, ativos hidrofílicos tendem a migrar para a fase aquosa durante a homogeneização resultando em uma baixa eficiência de encapsulação/incorporação (TEERANACHAIDEEKUL *et al.*, 2008; ATTAMA & MÜLLER-GOYMANN, 2008).

### 3.1.5 Estabilidade das nanopartículas

Um dos maiores problemas encontrados no desenvolvimento das SLNs e NLCs é a sua instabilidade na estocagem por longos períodos. Muitos autores relatam a expulsão do fármaco durante o período de estocagem destas formulações devido, principalmente, à composição das partículas, condições de armazenamento e de seus processos de produção (SOUTO & MÜLLER, 2008).

Durante a produção das SLNs e NLCs, a etapa de solidificação e cristalização dos lipídeos pode levar a imperfeições na matriz permitindo a acomodação das moléculas de



fármaco nos lipídeos e as cadeias de ácidos graxos (WISSING & MÜLLER, 2003; MÜLLER *et al.*, 2007). Esta cristalização ocorre principalmente com lipídeos de maior energia ( $\alpha$ ,  $\beta'$ ), e, conseqüentemente, mais instáveis. Sendo assim, durante a estocagem, estes lipídeos podem se reorganizar em formas de menor energia, mais estáveis e altamente organizadas (formas  $\beta$ ), expulsando o fármaco que estava localizado nas imperfeições dos cristais (MÜLLER *et al.*, 2007).

A preservação do arranjo de lipídeos durante a estocagem é necessária até a administração das SLNs e NLCs. Se a forma polimórfica  $\beta$  surgir no processo de armazenamento e proporcionar a expulsão do fármaco da matriz lipídica, este não poderá ser protegido contra degradação, nem terá uma liberação prolongada (WISSING *et al.*, 2004).

Dispersões aquosas de SLNs e NLCs de baixa viscosidade possuem potencial risco de transformação para um gel viscoso, proporcionando perda do tamanho coloidal e aumento do tamanho de partícula, ou seja, ocorrência de agregação. Na maioria destas situações esta transformação ocorre muito rapidamente podendo estar relacionada a diversos fatores, como: estresse mecânico durante manipulação e transporte da amostra; exposição a altas temperaturas, luz e atmosfera oxidante; formulação preparada com alta concentração de lipídeo e elevada força iônica transformações polimórficas durante a estocagem (WESTESEN & SIEKMANN, 1997; MEHNERT & MADER, 2001; HEURTAULT *et al.*, 2003; SOUTO, 2005).

A gelação pode ser minimizada pela adição de co-emulsificante (MEHNERT & MADER, 2001). Estocagem a temperaturas mais baixas que a temperatura ambiente (25°C), sob condições de escuro e atmosfera de nitrogênio podem prevenir o crescimento de partícula (FREITAS & MÜLLER, 1998).

A medida do tamanho de partícula e do potencial zeta também são ótimos indicadores da estabilidade das nanopartículas, da sua área superficial e carga disponíveis para interação com o meio externo. Sendo assim, estas são medidas muito utilizadas para caracterizar nanopartículas e, em geral, predizer algumas características macroscópicas da formulação. Em relação às SLNs, a formulação adequada deve possuir baixa polidispersidade e tamanho médio menor que 1  $\mu\text{m}$  (LIPPACHER *et al.*, 2002). Já o potencial zeta, permite prever a estabilidade coloidal e das interações que esta partícula possa ter com o fármaco e o meio. O potencial zeta reflete o potencial elétrico da camada difusa das partículas, que é influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos

funcionais na partícula ou da adsorção de espécies iônicas, presentes no meio aquoso de dispersão (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O potencial zeta também permite avaliar a potencial estabilidade da formulação, principalmente durante o seu período de estocagem. A agregação entre as partículas é menor quando há repulsão eletrostática entre elas. Para garantir a estabilidade das SLNs e NLCs, o potencial zeta deve ser superior ao módulo de 30 mV (MÜLLER *et al.*, 1995; FREITAS & MÜLLER, 1998;).

Técnicas termoanalíticas, como termogravimetria (TG) e calorimetria diferencial de varredura (DSC) são úteis para análise da estabilidade térmica de formulações e avaliação de interação fármaco/excipiente. A TG avalia a variação de massa de uma substância e/ou produtos de reação e é medida em função do tempo ou da temperatura enquanto a amostra é submetida a um aumento controlado de temperatura. Esta técnica também permite avaliar a estabilidade térmica de insumos farmacêuticos, determinar os conteúdos de umidade, determinar a água de cristalização, estudar a cinética de degradação, controlar a qualidade de medicamentos, estabilidade à oxidação, entre outros (STORPIRTIS *et al.*, 2011). A DSC fornece informações em relação à temperatura e à energia associada à fusão, cristalização, entalpia e transformações polimórficas (HEURTAULT *et al.*, 2003).

### **3.1.6 Nanopartículas e administração por via oral**

As nanopartículas lipídicas podem ser administradas por diversas vias sendo a via oral a mais atrativa, devido ao seu grande potencial comercial, à facilidade e maior adesão do paciente ao tratamento. Entretanto, a absorção oral é limitada por várias barreiras fisiológicas, que necessitam ser moduladas para alterar a baixa e variável biodisponibilidade oral de vários fármacos (ROGER *et al.*, 2009). A incorporação de fármacos em nanopartículas lipídicas sólidas abre perspectivas para aumentar a biodisponibilidade e prolongar os níveis plasmáticos de fármacos (GASCO, 2007; ROGER *et al.*, 2010).

Há três mecanismos primários pelos quais lipídeos e excipientes lipofílicos afetam a absorção, biodisponibilidade e disposição de fármacos após administração oral. São eles: (a) aumento da solubilização de fármacos no meio intestinal através de alterações na composição e características do ambiente fisiológico; (b) diminuição do transporte baseado em enterócito e processos metabólicos que nele ocorrem, alterando potencialmente absorção, efluxo, disposição e a formação de metabólitos do fármaco dentro dos enterócitos; (c) estimulação do

transporte linfático intestinal para a circulação sistêmica (PORTER *et al.*, 2007; MENDONZA *et al.*, 2009; FRICKER *et al.*, 2010).

A capacidade de liberar eficientemente fármacos altamente lipofílicos a partir de formulação lipídica tem renovado o interesse no transporte linfático de fármacos, uma vez que reduzem o metabolismo hepático do fármaco e aumentam sua biodisponibilidade oral (PORTER *et al.*, 2007; FRICKER *et al.*, 2010).

PANDEY e colaboradores (2005) estudaram o uso de SLNs na encapsulação de antibióticos utilizados no tratamento da tuberculose. As partículas foram preparadas pelo método de difusão de solvente, utilizando o lipídeo ácido esteárico. A eficiência de encapsulação foi de 51%, 45% e 41% para, respectivamente, rifampicina, isoniazida e pirazinamida. Estas partículas foram administradas oralmente a ratos e a farmacocinética desses fármacos foi avaliada. Um dia após a administração dos fármacos não encapsulados, estes não foram mais detectados na corrente sanguínea, enquanto que, os fármacos encapsulados em SLNs, foram detectados até 9 dias após a administração. Além disto, os fármacos foram detectados no pulmão, fígado e baço após o décimo dia da administração oral das SLNs contendo os fármacos. Já na administração dos fármacos não encapsulados, após 48 horas, estes não foram detectados nestes órgãos. Estes resultados mostram o efeito de liberação sustentada do ativo, que aumentou de 10-29 vezes o tempo de residência dos fármacos, quando encapsulados em SLNs, em relação ao fármaco não encapsulado.

Apesar das nanopartículas apresentarem estas vantagens, devido às condições hostis do trato gastrointestinal, grande parte dos fármacos encapsulados não atinge concentrações efetivas. A estabilidade das nanopartículas frente às mudanças de pH e degradação por enzimas devem ser melhor estudadas.

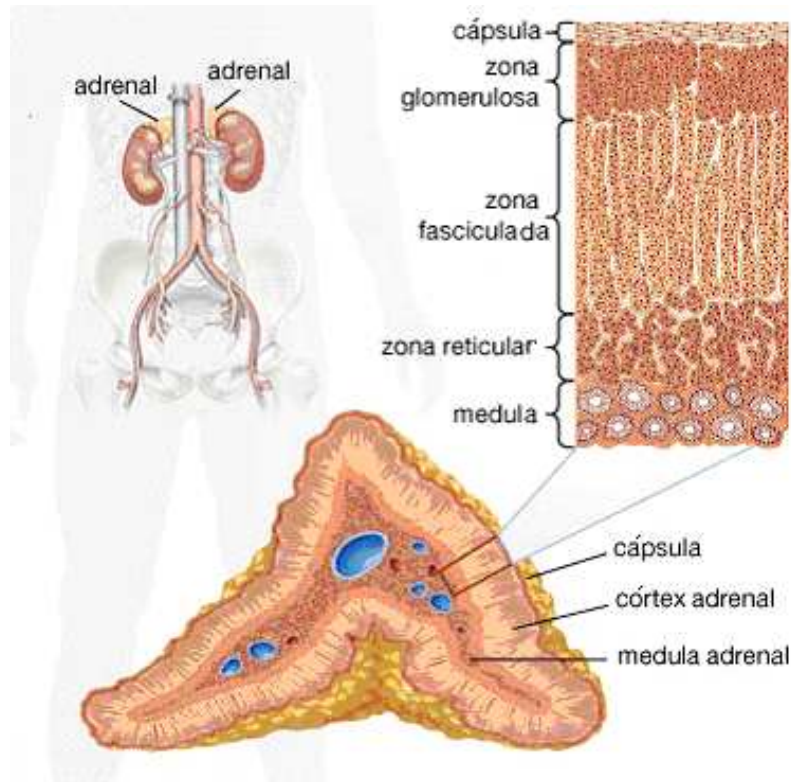
## **3.2 Sobre a terapia oral do carcinoma adrenocortical com mitotano**

### **3.2.1 Carcinoma adrenocortical**

#### **3.2.1.1 Glândulas Adrenais**

As glândulas adrenais (**Figura 5**), localizadas nos polos superiores dos rins, são divididas anatomicamente em córtex (externamente) e medula (internamente) os quais são recobertos por uma cápsula. Esta glândula é responsável pela secreção de glicocorticóides,

mineralocorticóides e precursores de hormônios sexuais. Os glicocorticóides, cujo principal representante é o cortisol, são essenciais à vida por atuar no metabolismo glicídico, protéico e lipídico. Os mineralocorticóides, cujo principal representante é a aldosterona, afetam os eletrólitos extracelulares, em especial sódio e potássio, com efeitos diretos sobre a pressão arterial. Já, os precursores de esteróides sexuais (principais representantes: androgênios e estrogênios) contribuem para a gênese e manutenção dos caracteres sexuais secundários (GUYTON & HALL, 2002; BORON & BOULPAEP, 2009; SHERWOOD, 2010).



**Figura 5:** Representação esquemática das glândulas adrenais humanas.

Fonte: Adaptada da Enciclopédia Britânica.

### 3.2.1.2 Epidemiologia e patogênese

O carcinoma adrenocortical (CAC) é uma neoplasia endócrina rara, agressiva e com prognóstico desfavorável, que acomete o córtex da adrenal humana. Sua prevalência mundial é de 4 a 12 casos/milhão de habitantes e sua incidência estimada é de aproximadamente 0,5 a 2 casos/milhão/ano, atingindo principalmente mulheres acima de 50 anos (uma taxa de 3 mulheres/ 2 homens). Contudo, há estudos que apontam a incidência em crianças abaixo de 5

anos de idade (MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004; ALLOLIO & FASSNACHT, 2006; PEREIRA, 2007; MENAA & MENAA, 2012).

No sul do Brasil, foi observada incidência excepcionalmente alta em crianças abaixo de 15 anos (3,4 a 4,2 casos/milhão de crianças) enquanto a taxa mundial é de 0,3 casos/milhão de crianças nesta faixa etária (RIBEIRO *et al.*, 2001; MICHALKIEWICZ *et al.*, 2004; PIANOVSKI *et al.*, 2006).

Apesar haver estudos recentes que abordam a patogênese molecular do CAC, pouco se compreende sobre o desenvolvimento deste tumor (MAYER *et al.*, 1997; ALLOLIO & FASSNACHT, 2006). Entretanto, acredita-se que as células de CAC sejam de origem monoclonal, ou seja, que o progresso do tumor seja consequência de mutações genéticas intrínsecas em *loci* específicos no genoma (BARZON *et al.*, 1999; HANNA *et al.*, 2008).

Os genes envolvidos nas alterações moleculares podem ser classificados como supressores tumorais (inativados na patologia, ou oncogenes, sendo ativados, favorecendo o desenvolvimento tumoral (MAYER *et al.*, 1997; HANNA *et al.*, 2008). Algumas mutações cromossômicas relacionadas e frequentemente observadas no CAC são: mutações inativadoras no *locus* 17p13, incluindo o gene *TP53*, mutações no *locus* 11q13 e no 11p15 causando a hiperexpressão do fator insulínico de crescimento II (HANNA *et al.*, 2008, MAYER *et al.*, 1997) assim como ganhos nos cromossomos 4, 5, 12 e 19 e perdas nos cromossomos 1, 2, 3, 4, 6, 9, 11, 13, 15, 17, 18, 22 e X (WEST *et al.*, 2007; HANNA *et al.*, 2008; ANTONINI *et al.*, 2011).

A mutação germinativa R337H no éxon 10 do gene *TP53* foi detectada em pacientes pediátricos com CAC no Paraná (RIBEIRO *et al.*, 2001; ALLOLIO & FASSNACHAT, 2006). Apesar da forte associação de CAC e a mutação do gene *TP53*, não há na literatura científica estudos que expliquem a incidência singular nesta região (PIANOVSKI *et al.*, 2006).

As síndromes genéticas como Li-Fraumeni, Wiedemann-Beckwith, complexo de Carney, neoplasia endócrina múltipla, McCune-Albright e Gardner têm importante relação com o aumento da susceptibilidade ao CAC e também têm sido identificados em pacientes diagnosticados com tumores adrenocorticais (SOON *et al.*, 2008).

### 3.2.2 Diagnóstico, Prognóstico e Terapia

O CAC caracteriza-se por mau prognóstico e alto risco de recidiva pós-terapia. A recorrência é de aproximadamente 49% após quimioterapia adjuvante e até 85% após a cirurgia sem tratamento adjuvante (TERZOLO *et al.*, 2007; BERRUTI *et al.*, 2010). Em torno de 40% dos casos, a recidiva da doença manifesta-se no desenvolvimento de doença metastática para o pulmão, fígado ou osso no prazo de 6-24 meses após ressecção cirúrgica (ICARD *et al.*, 1992; ICARD *et al.*, 2001; TERZOLO *et al.*, 2007; BERRUTI *et al.*, 2010). Três parâmetros principais estão relacionados à menor sobrevivência do paciente: idade mais avançada no momento do diagnóstico, diagnóstico do tumor em estágio mais avançado, a hipersecreção de hormônios adrenocorticais, em especial, o cortisol que está muito elevado em 60% dos pacientes – especialmente em crianças (em torno de 90% dos casos) (TERZOLO *et al.*, 2007; BERRUTI *et al.*, 2010).

A virilização é secundária à hipersecreção de hormônios andrógenos produzidos nas adrenais, como dehidroepiandrosterona, a androstenediona e testosterona. É observada em 20% a 30% dos casos em adultos e em 72% dos casos em crianças com CAC funcional acompanhada ou não da Síndrome de Cushing. Nas mulheres, a produção de androgênios acima dos níveis normais leva à calvície temporal, indução de hirsutismo, engrossamento da voz, acne, aumento da massa muscular, clitoromegalia e oligoaminorréia, além da possibilidade de puberdade precoce em meninas. Já em homens, a produção exacerbada de estrógenos, leva a ginecomastia e atrofia testicular (FASSNACHT *et al.*, 2004; RANG *et al.*, 2004; LATRONICO & PRANDO, 2006).

A diferenciação entre lesões adrenais benignas ou malignas é baseada em características como: peso do tumor, presença de hemorragia e se a cápsula que envolve o tumor está intacta; o diagnóstico microscópico considera a presença de células com núcleo atípico, mitoses frequentes e atípicas e/ou necroses, em exames de imagem; lesões supra-renais heterogêneas, com realce e margens irregulares após contraste intravenoso e pela pontuação de Weiss, baseada em critérios histológicos e de imagem, amplamente utilizada para este fim. O tamanho do tumor é o melhor indicador pré-operatório de malignidade, com incidência de CAC aumentando a 25% em tumores acima de 6 cm (ALLOLIO & FASSNACHT, 2006).

A mais recente classificação de CAC estabelecida pela Organização Mundial de Saúde, em meados de 2004 é baseada nesta classificação: estádios I e II descrevem tumores localizados, com menos de 5 cm e maiores que 5 cm de diâmetro, respectivamente. Tumores locais invasivos ou com nódulos linfáticos metastáticos são classificados no estágio III, enquanto estágio IV consiste em tumores invadindo órgãos adjacentes e apresentando metástase distante. Os estádios III e IV estão associados a uma sobrevida de 5 anos (ALLOLIO & FASSNACHT, 2006; LATRONICO & PRANDO, 2006). Esta classificação é muito útil para determinar o prognóstico e a terapêutica (LATRONICO & PRANDO, 2006).

Nos estádios I-III opta-se por completa remoção do tumor com linfadenectomia, sendo importante manter a cápsula do tumor intacta para que não haja proliferação do tumor, reduzindo também o risco local de recorrência, apesar de pacientes com estadiamento III terem alta probabilidade de recorrência e doença metastáticas nos primeiros 5 anos após a ressecção cirúrgica (DACKIW *et al.*, 2001).

A ressecção completa é a única técnica capaz de curar ou prolongar a sobrevida, significativamente em especial nos estádios I e II, entretanto isto, geralmente refere-se a menos de 60% dos pacientes (ALLOLIO & FASSNACHT, 2006, LATRONICO & PRANDO, 2006).

A ressecção incompleta do tumor primário ou doença metastática não indicada à cirurgia estão associadas a um prognóstico particularmente ruim. Na maioria dos estudos a mediana de sobrevida é inferior a 12 meses (ALLOLIO & FASSNACHT, 2006).

A cirurgia para recidivas locais ou de doença metastática é aceita como uma opção terapêutica valiosa e foi associada a maior sobrevida em estudos retrospectivos (SCHTEINGART *et al.*, 2005; ALLOLIO & FASSNACHT, 2006).

A ablação por radiofrequência termal é uma técnica promissora para o tratamento de tumores sólidos podendo ser uma alternativa à cirurgia em alguns pacientes com CAC metastático e lesões menores que 5 centímetros de tamanho (WOOD *et al.*, 2003), entretanto, seus benefícios potenciais são comparáveis às suas possíveis complicações (RHIM *et al.*, 2004; BROWN, 2005; SCHTEINGART *et al.*, 2005).

A radioterapia tem sido frequentemente considerada ineficaz para tratamento de CAC, sendo utilizada como tratamento paliativo em pacientes com metástase em ossos e cérebro (ALLOLIO & FASSNACHT, 2006).

A quimioterapia envolvendo combinação de agentes citotóxicos tem sido utilizada para o tratamento de CAC. No entanto, apenas uma minoria dos pacientes responde aos protocolos atuais, com exceção ao regime de tratamento italiano que realiza uma combinação entre mitotano, etoposídeo, doxorrubicina e cisplatina. Neste caso, de acordo com os critérios da OMS, a taxa de resposta global em 72 pacientes foi de 48,6%, incluindo cinco pacientes com resposta completa, com desaparecimento de todas as evidências clínicas do tumor no exame físico ou na radiografia e trinta pacientes com resposta parcial, com pelo menos uma diminuição de 50% no tamanho geral do tumor por pelo menos 4 semanas (BERRUTI *et al.*, 2005).

O sucesso de BERRUTI e colaboradores (2005) deve-se a significativa toxicidade proporcionada por estes agentes, porém as exacerbadas reações adversas levaram KHAN e colaboradores (2000) a propor um protocolo menos tóxico, com a combinação de mitotano e estreptozotocina. Respostas completas ou parciais foram observadas em 36% dos pacientes com doença mensurável. O sucesso tanto do protocolo de Berruti como do Khan levou ao primeiro ensaio de fase III em CAC comparando diretamente estas opções de tratamento – a Primeira Triagem Randomizada Internacional na doença localmente avançada e tratamento do carcinoma metastático adrenocortical (FIRM-ACT) (BERRUTI *et al.*, 2005).

Outro estudo clínico internacional: o ADIUVO é uma triagem prospectiva randomizada de fase III, aprovado pela ENSAT, com previsão de término em 2014, visa avaliar a eficácia do mitotano como tratamento adjuvante versus observação em pacientes com CAC com risco de recorrência baixo a intermediário após ressecção radical (ENSAT, 2004; BERRUTI *et al.*, 2005; BERRUTI *et al.*, 2008).

A resposta limitada à terapia citotóxica em CAC tem sido ligada à elevada expressão do gene multirresistente MDR-1, resultando em elevadas concentrações de P-glicoproteína agindo como uma bomba de efluxo de drogas. Antagonistas dessa glicoproteína podem aumentar a eficácia da terapia citotóxica. Evidências *in vitro* mostraram que o mitotano pode reverter à resistência multidroga, sendo utilizado em combinação com outros fármacos para o tratamento citotóxico pela modulação do MDR e inibição P-glicoproteína que proporciona uma base racional para explorar seu uso com outros fármacos para o tratamento do carcinoma adrenocortical (ALLOLIO & FASSNACHT, 2006, PEREZ-TOMAS, 2006).



### 3.2.2 Mitotano

O mitotano (**Figura 1**), cuja fórmula molecular é  $C_{14}H_{10}Cl_4$ , massa molar  $320,5 \text{ g.mol}^{-1}$ , ponto de fusão na faixa de  $76-78^\circ\text{C}$ , coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ )  $5,870$ , pressão de vapor  $1,94E-06 \text{ mmHg}$ , solubilidade em água a  $25^\circ\text{C}$   $0,1\text{mg.L}^{-1}$ , solúvel em metanol, etanol, tetracloreto de carbono e isoctano (CDC, 2011; NLM, 2011).

Seu número de registro no Chemical Abstract Service (CAS) é 53-19-0.

#### 3.2.2.1 Uso clínico do mitotano e efeitos adversos

A terapia medicamentosa utilizando mitotano é indicada para o tratamento de CAC nos estádios III e IV (ALLOLIO & FASSNACHT, 2006).

No Brasil, o mitotano é comercializado sob a forma farmacêutica de comprimidos, sendo o nome comercial do medicamento de referência de Lisodren<sup>®</sup>, produzido pela *Bristol-Myers Squibb*. A posologia indicada para crianças é de 1-2 g/dia em doses divididas, aumentando gradualmente para 5-7 g/dia; em adultos a dosagem inicial é 2 a 6 g/dia divididos em 3-4 doses e, depois aumenta se gradativamente até  $9-10\text{g.dia}^{-1}$  divididos em 3-4 doses (ZANCANELLA, 2008; LACY *et al.*, 2009).

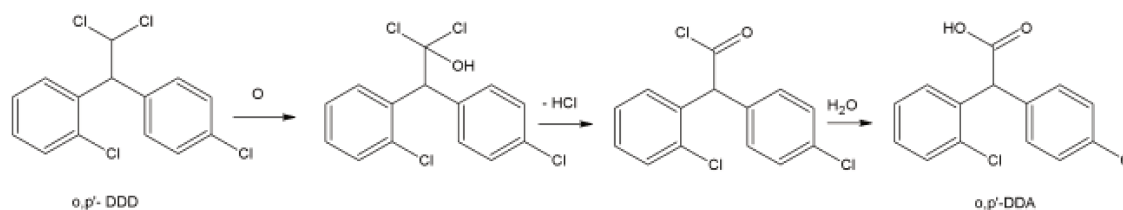
Vários estudos têm proposto o monitoramento das concentrações sanguíneas de mitotano a fim de avaliar sua eficácia e toxicidade. Alguns deles mostraram que a resposta tumoral real foi encontrada em pacientes com concentrações plasmáticas de mitotano entre  $14-20 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (ALLOLIO & FASSNACHT, 2006).

Devido à estreita janela terapêutica do mitotano, os efeitos adversos ocorrem com frequência, muitas vezes limitando a dose. Mais de 80% de todos os pacientes apresentam pelo menos um efeito indesejável. A probabilidade de efeitos adversos aumenta fortemente com o nível sanguíneo superior a  $20 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

Dentre eles destacam-se: efeitos gastrointestinais (anorexia, náuseas, vômitos, diarreia) ou no sistema nervoso central (depressão, tontura, vertigem, fraqueza, confusão, cefaléia). Em geral, os efeitos adversos são reversíveis após cessar a administração do mitotano. Devido à sua longa meia-vida, os níveis sanguíneos e os efeitos adversos normalmente aumentam ao longo do tempo, mesmo que a dose permaneça inalterada. Devido à sua atividade adrenolítica, o tratamento com mitotano induz insuficiência adrenal (ALLOLIO & FASSNACHT, 2006).

### 3.2.2.2 Mecanismo de ação

Não é bem esclarecido pelo qual o mitotano exerce efeito adrenolítico, sendo que o efeito farmacológico pode ser proporcionado pelo próprio mitotano ou pelos seus metabólitos formados (CAI *et al.*, 1995). Entretanto, acredita-se que a morte celular seja induzida pelo mitotano no córtex adrenal após uma hidroxilação catalisada pelo complexo citocromo P e subsequente desidro-halogenação espontânea da cadeia  $\beta$ -carbônica lateral deste fármaco. O metabólito produzido, haleto de acila, altamente reativo, pode acilar bionucleófilos adrenocorticais ou fornecer o ácido diclorodifenilacético (o,p'-DDA) (Figura 6) (CAI *et al.*, 1995).



**Figura 6:** Hipótese de metabolização do mitotano para formação do ácido o,p'-diclorodifenilacético.

Este mecanismo de morte celular causaria alterações na função mitocondrial das células, onde o mitotano seria ativado por um citocromo P450 adreno-específico. Ao se apresentar em sua forma ativada, ele bloquearia as reações mediadas pelo citocromo P450 como a 11- $\beta$ -hidroxilação de esteroides adrenais, modificando o metabolismo extra-adrenal do cortisol e de androgênios, resultando na diminuição da produção de glicocorticoides e causando necrose do tecido adrenocortical (CAI *et al.*, 1995; SCHTEINGART, 2007).

### 3.2.2.3 Características Farmacocinéticas

#### 3.2.2.3.1 Absorção e biodisponibilidade

Na administração por via oral, em torno de 60% da dose de mitotano é absorvida e devido a seu caráter lipofílico, cerca de 30% da quantidade absorvida acumula-se no tecido adiposo. Pequenas quantidades desse fármaco também já foram detectadas no cérebro,

adrenais, fígado, bile e soro (MOY, 1961; TERZOLO *et al.*, 2000; HUTCHISON & SHAHAN, 2004).

Em análise de fezes, 62-66% da forma não metabolizada do mitotano foi recuperado. MOOLENAAR e colaboradores (1981) avaliaram o impacto de diferentes formas de veiculação sobre o perfil do mitotano no plasma, pela quantificação da taxa de absorção. O mitotano foi administrado (por via oral, em dose única) em diferentes formas de veiculação: comprimidos de microgrânulos, leite, chocolate e emulsão lipídica. As concentrações plasmáticas mais elevadas foram observadas entre 5 e 10 horas com todas as formas administradas. Os menores níveis plasmáticos foram observados com microgrânulos de mitotano. Em todos os casos, a mistura em leite proporcionou a melhor absorção (MOOLENAAR *et al.*, 1981).

Outro estudo avaliou o efeito da alimentação na biodisponibilidade de mitotano em cães com carcinoma adrenocortical. Este estudo foi realizado em cães divididos em três grupos. Um grupo recebeu comprimidos de mitotano (Lisodren<sup>®</sup>), o segundo grupo, emulsões compostas por mistura de goma arábica, água, óleo de milho e de mitotano e, o último grupo, mitotano disperso em alimentação enriquecida em óleo de milho. A área sob a curva obtidas no grupo de cães alimentados na dieta enriquecida com o mitotano misturado com o óleo de milho foi a maior na ordem 63 mg.h.L<sup>-1</sup>. No caso da emulsão a área é de 40 mg.h.L<sup>-1</sup>, enquanto que o medicamento referência Lisodren<sup>®</sup>, levou a área de 2 mg.h.L<sup>-1</sup>. Este estudo confirma que a absorção de mitotano pode ser melhorada pela formulação farmacêutica e alimentos enriquecidos com óleo, contribuindo para melhorar a biodisponibilidade oral do mitotano (WATSON *et al.*, 1987).

Outros dois estudos (TERZOLO *et al.*, 2000; BAUDIN *et al.*, 2001) detectaram que os níveis sanguíneos de mitotano nos seres humanos correlacionam-se melhor com a dose cumulativa do que com a dose diária. Em alguns pacientes a administração de 2 g.dia<sup>-1</sup> de mitotano, por via oral, é suficiente para alcançar os níveis sanguíneos desejados enquanto, em outros, existe a necessidade de ingestão de doses superiores a 5 g.dia<sup>-1</sup> para alcançar os níveis terapêuticos desejados.

A maioria dos pacientes inicia o tratamento com 2 g.dia<sup>-1</sup> e aumenta rapidamente a dose, dependendo da tolerância gastrointestinal, a 5-6 g.dia<sup>-1</sup>. Este regime de alta dose requer a verificação dos níveis sistêmicos de mitotano, após 14 dias do início da terapia.

Posteriormente, a dose é ajustada de acordo com as concentrações plasmáticas de mitotano e a tolerabilidade (ZANCANELLA, 2008).

A concentração plasmática máxima, em humanos, ocorre de 3 a 5 horas após administração, sendo que o equilíbrio entre a concentração plasmática e a tecidual ocorre em 12 horas.

#### **3.2.2.3.2 Distribuição**

Em estudo de distribuição realizado por DE FRANCIA e colaboradores (2006) foi avaliada a acumulação de mitotano e de seus metabólitos em humanos e ratos. Nesta avaliação, as dosagens de mitotano foram feitas no plasma e em células vermelhas do sangue humano e em adipócitos, rim, fígado, cérebro, e glândulas supra-renais de ratos tratados com mitotano, durante 3 meses. Evidenciou que as células vermelhas do sangue e dos adipócitos são locais de armazenamento predominantes de mitotano.

HERMANSSON e colaboradores (2008) quantificou a acumulação do mitotano em tecidos de cobaias (porcos da Índia), em dose única, por 10 dias. Os animais receberam a administração oral de mitotano disperso em óleo de milho ( $30 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). As concentrações plasmáticas mostraram um pico de  $834 \text{ ng mitotano/g plasma}$  após 8 h de administração. A fase de eliminação foi extremamente longa, com uma meia-vida de 28 dias. A meia-vida longa pode ser explicada pelo armazenamento do fármaco no tecido adiposo, que atua como um reservatório de mitotano.

#### **3.2.2.3.3 Metabolização**

O metabolismo é dependente da espécie, sendo que humanos, cães e ratos são responsivos aos efeitos do mitotano. Este fármaco administrado em cães causa atrofia adrenal particularmente evidente em áreas fasciculada e reticular (CAZORLA & MONCLOA, 1962). Entretanto, nenhuma manifestação histológica é visível em ratos, camundongos, coelhos e macacos rhesus, mesmo após o tratamento prolongado (TULLNER, 1970). Estes resultados podem estar associados às diferenças no metabolismo em espécies sensíveis, que são capazes de formar metabólito reativo, o haleto de acila. As lesões adrenais ocorrem em cães no segundo dia de tratamento com  $100 \text{ mg.kg}^{-1}$ , com atrofia das zonas reticulada e fasciculada completa em 6 semanas, enquanto o glomérulo é afetado após 3 meses de tratamento. Da mesma maneira, as concentrações plasmáticas dos metabólitos do mitotano

(diclorodifenileno ou o,p'-DDE) apresenta uma cinética semelhante à do mitotano, com uma concentração máxima de  $1690 \text{ ng.g}^{-1}$  de plasma. Isto mostra que o perfil plasmático do o,p'-DDE é semelhante ao do mitotano na cobaia. Os autores especularam que após armazenamento no tecido adiposo, o mitotano é libertado gradualmente, metabolizado no fígado, por hidroxilação e oxidação em dois compostos o,p'-DDE e o,p'-DDA (KITAMURA *et al.* 2002).

Em estudos de HERMANSSON e colaboradores (2008) mostraram que as taxas de depuração do mitotano e o,p'-DDE são congruentes com as respectivas meias-vidas prolongadas. De acordo com os autores, o mitotano e o,p'-DDE acumulam no tecido adiposo e o o,p'-DDA difunde-se diretamente para o plasma e, em seguida, sofre excreção urinária (HERMANSSON *et al.*, 2008).

A meia-vida plasmática do mitotano varia entre 18 a 159 dias, com média de 42 a 63 dias (HUTCHISON & SHAHAN, 2004; ZANCANELLA, 2008).

Devido ao fato do mitotano apresentar meia-vida prolongada, janela terapêutica estreita e se acumular no tecido adiposo até sua saturação, alterações rápidas na concentração neste tecido podem resultar em nível subterapêutico ou em níveis tóxicos, mesmo que a dose administrada seja mantida (NG & LIBERTINO, 2003; PHAN, 2007).

#### **3.2.2.3.4 Eliminação**

Os primeiros dados disponíveis em animais após a administração de o,p'-DDD em cães e ratos demonstraram altas concentrações urinárias em o,p'-DDA (FINNEGAN *et al.*, 1949).

O estudo de MOY (1961) confirmou estas observações em seres humanos e também a ausência de o,p'-DDD na urina. Em urina de 24 horas, aproximadamente 10% da dose diária de o,p'-DDD, administrada foi encontrada sob a forma de o,p'-DDA sendo também encontrado na bile (MOY, 1961).

Nas fezes, é excretado principalmente o,p'-DDD que não tenha sido absorvido e uma pequena quantidade de o,p'-DDA, variando entre 1 e 17%. Concluiu-se que a presença de o,p'-DDA nas fezes é a prova de que há transformação metabólica de o,p'-DDD pela flora intestinal (WEDERMEYER, 1967).

Após administração de 100 mg de o,p'-DDD ratos, 1% da dose foi recuperada na urina em 6 horas e, apenas 7% após 8 dias. Por eliminação fecal, 50% foi encontrado em sua forma inalterada após 48 horas, o,p'-DDE também foi encontrado (REIF *et al.*, 1974).

### 3.3 Nanopartículas lipídicas e fármacos usados no tratamento de câncer

As nanopartículas lipídicas têm se mostrado promissoras como carreadores para agentes citotóxicos, pois a maior parte destes fármacos apresenta problemas relativos à sua absorção. Estes sistemas têm sido avaliados em linhas de culturas celulares e modelos animais quanto à atividade antineoplásica, estabilidade e/ou farmacocinética. Os estudos mostraram que as propriedades desejadas de uma nanopartícula encapsulando um agente no tratamento do câncer são:

- Melhorar a estabilidade do fármaco encapsulado;
- Ser capaz de encapsular mais de um fármaco, proporcionando um sistema de liberação de fármacos sinérgicos;
- Ter versatilidade em encapsular agentes citotóxicos com diversas características físico-químicas;
- Apresentar citotoxicidade *in vitro* aumentada contra células cancerígenas, inclusive aquelas refratárias à quimioterapia;
- Aumentar a eficácia do fármaco em modelos animais;
- Melhorar a farmacocinética e a biodistribuição do fármaco.

Geralmente, a maior parte dos agentes no tratamento do câncer é razoavelmente lipofílica e com baixa solubilidade aquosa (WONG *et al.*, 2007a,b). Estes incluem inibidores da topoisomerase I (campotecinas e irinotecan), taxanos (especialmente o paclitaxel) e agentes diversos, como o mitotano.

Em geral, estes componentes particionam razoavelmente bem na fase lipídica e podem ser eficientemente encapsulados em SLNs e NLCs.

Estudos realizados por YANG & ZHU (2002) mostraram que a técnica da encapsulação em SLNs da campotecina (um alcalóide muito lipofílico extraído da *Camptotheca acuminata*) com eficiência de encapsulação 99,3%, protegeu o grupo farmacofórico da hidrólise básica, mantendo o composto ativo até a sua liberação.

Outro exemplo é o paclitaxel, um fármaco que tem se tornado muito popular entre os oncologistas devido a sua efetividade no tratamento de vários tipos de câncer, até mesmo em monoterapia. Este fármaco é pouco solúvel em meio aquoso. É comercializado em suspensão micelar, não aquosa, composta por óleo de castor polioxietilado (Cremophor EL) e etanol absoluto. Entretanto, um dos componentes desta formulação, o Cremophor EL, causa sérias reações de hipersensibilidade e nefrotoxicidade em humanos. Com o objetivo de solubilizar o paclitaxel sem a necessidade de uso do Cremophor, algumas formulações de SLNs foram desenvolvidas (CHEN *et al.*, 2001; SERPE *et al.*, 2004). Em comparação com o óleo de castor, todas foram mais seguras para a administração parenteral.

Outro problema associado ao paclitaxel é sua baixa estabilidade física. No seu uso clínico, o paclitaxel é diluído em soluções salinas ou de dextrose. Esta diluição pode desestabilizar a formulação e precipitar o fármaco, sendo necessária a filtração antes da administração. Esta etapa adicional pode afetar a concentração do fármaco. Em estudo de SERPE e colaboradores (2004) usando cultura de células para a avaliação da citotoxicidade *in vitro*, não foi relatada a precipitação de fármaco em formulação de SLNs, mesmo diluída na faixa nanomolar.

KOZIARA e colaboradores (2006) estudaram o crescimento *in vitro* de cultura de células humanas da linhagem celular do adenocarcinoma de cólon (HCT-15) sensíveis e resistentes a paclitaxel na formulação disponível comercialmente e encapsulado em nanopartículas. Os estudos mostraram que o fármaco encapsulado nas nanopartículas pôde superar a resistência ao paclitaxel e apresentar efeito antiangiogênico quando comparado ao medicamento referência (Taxol).

SEVERINO e colaboradores (2012a,b) desenvolveram um planejamento fatorial  $2^2$  para a otimização do processo de produção de SLNs com matriz lipídica de cetil palmitato e NLCs com matriz lipídica composta de ácido esteárico e triacilgliceróis de cadeia média, por homogeneização de alto cisalhamento e homogeneização a quente a alta pressão. Na análise dos efeitos do processo de produção sobre o tamanho médio de partícula, índice de polidispersidade e potencial zeta, as SLNs e NLCs desenvolvidas mostraram-se promissoras como carreadores de fármacos.

Em outro estudo de SEVERINO e colaboradores (2011), o mitotano foi encapsulado em SLNs com a mesma composição do trabalho anterior, e NLCs compostas por cetil palmitato e

em mistura binária de estearato de polioxietileno (40) e triacilgliceróis de ácido cáprico/caprílico, ambas nas condições otimizadas do processo. Os resultados mostraram que as formulações de SLNs e NLCs foram carreadores potenciais para a veiculação do mitotano.

Estudos posteriores de CAMERIN GRANDO e colaboradores (2012) mostraram que o mitotano era liberado das partículas durante um curto tempo de estocagem, utilizando as formulações propostas por SEVERINO e colaboradores (2011). Essa limitação e a necessidade de estudos adicionais para comprovar a potencialidade dessas partículas como estratégias para melhorar a solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal do mitotano deram origem ao desenvolvimento do presente trabalho.



#### **4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Esta seção será apresentada na forma de capítulos, contendo os artigos submetidos a periódicos científicos.

**4.1 TWEEN 80 AND SPAN 85 OPTIMIZATION FOR STABILIZATION OF CETYL PALMITATE SLNS AND POLYOXYETHYLENE (40) STEARATE PLUS CAPRIC/CAPRYLIC TRIGLYCERIDE NLCS PREPARED BY HIGH PRESSURE HOMOGENIZATION**

ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO  
COLLOIDS AND SURFACES. B, BIOINTERFACES

**Tween 80 and Span 85 optimization for stabilization of cetyl palmitate SLNs and polyoxyethylene (40) stearate plus capric/caprylic triglyceride NLCs prepared by high pressure homogenization**

Carolina Ribeiro Camerin Grando <sup>a</sup>, Carla Aiolfi Guimarães <sup>a</sup> and Maria Helena Andrade Santana <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory for Development of Biotechnological Processes, School of Chemical Engineering, University of Campinas, Campinas, Brazil.

\*Corresponding author – Laboratory for Development of Biotechnological Processes, School of Chemical Engineering, University of Campinas, Campinas, Brazil  
+ 55 19 35213921 [lena@feq.unicamp.br](mailto:lana@feq.unicamp.br)

## **ABSTRACT**

The aim of this research was to optimize the surfactant composition for storage stability of formulations of solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs) produced by high pressure homogenization (HPH). The particles were composed of cetyl palmitate (SLNs) or polyoxyethylene (40) stearate and capric/caprylic triglyceride (NLCs), whose lipids were emulsified with a mixture of the surfactants polysorbate (Tween 80) and sorbitan trioleate (Span 85). By visual inspection, we monitored the phase separation after storage at room temperature (25 °C), 4 °C and 45 °C for 48 h. The criteria for stability were phase homogeneity, followed by maintenance of mean diameter, polydispersity index, and zeta potential at 2<sup>nd</sup> and 28<sup>th</sup> day of storage. The results from seven trial formulations for either SLNs or NLCs with combinations of surfactants with hydrophilic lipophilic balances (HLBs) in the range of 8 to 15 showed that all formulations generated nano-sized particles ranging from 150.0 to 185.2 nm (SLNs) and from 72.1 to 113.2 nm (NLCs) with zeta potentials from -15.0 to -24.8 mV (SLNs) and from -5.8 to -11.5 mV (NLCs). However, only the formulations with combinations of surfactants which HLBs were close to the required values (10 for SLNs and 13.4 for NLCs) showed stability at the three tested temperatures. Thus, the mass proportion of 46.97/53.03 for Tween 80/ Span 85 (HLB=8) stabilized cetyl palmitate SLNs while NLCs from polyoxyethylene (40) stearate and capric/caprylic triglyceride (70/30%, w/w) were stabilized by the mass proportion 64.70/35.30 of Tween 80/ Span 85 (HLB 10.34).

**Keywords:** Solid Lipid Nanoparticles, Nanostructured Lipid Nanoparticles, Surfactant coverage, Tween 80, Span 85, Polyoxyethylene (40) stearate, Capric/caprylic triglyceride, High pressure homogenization

## 1. Introduction

Nanoparticulate systems can be produced using different kinds of materials, such as biodegradable and biocompatible polymers, phospholipids, surfactants and lipids [1,2]. Nanoparticles from lipids have the demonstrated advantages of physical and chemical stability that provide greater protection against degradation of drugs, the capacity to carry hydrophobic drugs and hydrophilic biomacromolecules, biocompatibility, drug targeting, and modified drug release rates [3-6]. Among these nanostructures, solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs) have gained huge popularity in pharmaceutical formulations as reported by Battaglia and Gallarate [6].

Lipids such as triglycerides and their mixtures, fatty acids, and waxes have been used for the production of these kinds of lipid nanoparticles [7]. Cetyl palmitate is a wax produced by catalytic esterification of a fatty alcohol (cetyl alcohol) and fatty acids (palmitic acid) [8]. Surface active partial glycerides (mono- and diglycerides and their mixtures) may facilitate emulsification, forming more rigid surfactant films around the lipid nanoparticles and thus improving long term physical stability [9,10]. Polyoxyethylene (40) stearate is a synthetic polymer composed of stearic acid, a naturally occurring fatty acid, and polyethylene glycol (PEG), with surfactant activity. Chemical conjugation of fatty acids with PEG (PEGylation) is currently used for colloidal stabilization and is considered one of the most successful techniques to prolong *in vivo* residence time of particles in the blood stream by preventing their uptake by the reticuloendothelial system, due to the stealth effect [11, 12]. Medium chain triglycerides, such as capric/caprylic triglyceride, are neutral oils that display high stability against oxidation and good solubility [13]. All these lipids are considered non-toxic and are classified as "Generally Recognized as Safe" (GRAS) by the Food and Drug Administration (FDA).

Besides lipids, the influence of surfactants is of paramount importance to the physicochemical stability of lipid nanoparticles. Therefore, the concentration of surfactants must be optimized to allow for better coverage of the surface of the particles, thereby preventing instabilities such as aggregation during storage. On the other hand, an excess of surfactants may decrease the efficiency of encapsulation, inducing faster release of the drug and increasing toxicity. The combined use of more than one surfactant may produce mixed

films at the interface, contributing to improved surface coverage of the particles to ensure long-term stability of the formulation [13-15].

The stability of a disperse system, such as lipid nanoparticles, is influenced by different parameters, e.g., type and concentration of the lipids, stabilizers, and the production process. Until now, it has not been possible to predict the physical stability without practical investigations. However, the estimation of the “required hydrophilic lipophilic balance” (HLB), is a valuable tool to define the concentrations of surfactants. Ideally, the HLB of the stabilizer should match the required HLB of the inner lipid phase. Trials of adequate ranges of HLBs of surfactants, involving observation of phase separation at room temperature in addition to observing stresses induced by other temperatures, have been the usual strategy for evaluation of physical stability of dispersions [15]. Besides dispersions, Griffin’s method also has been adequate for evaluating cream type emulsions [15]. Severino *et al.* [16] optimized the HLBs of cetyl palmitate and also of the binary mixture of stearic acid and capric/caprylic triglyceride in emulsions prepared with sorbitan trioleate (Span 85) and polysorbate 80 (Tween 80) as surfactants.

The present study takes advantage of the earlier studies of HLBs, with the aim of experimentally optimizing the composition of Tween 80 and Span 85 for production of stable dispersions of SLNs and NLCs composed of cetyl palmitate (SLNs) and a binary mixture of polyoxyethylene (40) stearate and capric/caprylic triglyceride (NLCs). The stability of the particles was studied at 4 °C, 25 °C and 45 °C. In addition to Griffin’s method, the particles were produced by high pressure homogenization (HPH), which has been a useful technique for preparation of SLNs and NLCs due to its reproducibility, scalability, and low cost. Furthermore, the particles were characterized by the physical properties of average hydrodynamic diameter, polydispersity index, and zeta potential to assure the observed stability of the dispersions, as indicated by phase homogeneity. For the formulations that met the stability criteria, additional measurements of diameter and zeta potential were also performed on the 2<sup>nd</sup> and 28<sup>th</sup> day of storage. Besides the HPH production process, we examined differences in the relationship to previous work [16], using a PEGylated stearic acid (polyoxyethylene (40) stearate), with the aim of achieving long term stability and the stealth effect. We also evaluated the effect of temperature by observing the stability of the particles at 4 °C and 45 °C.

## 2. Material and Methods

### 2.1 Material

Cetyl palmitate (Crodamol<sup>®</sup> CP), Capric/caprylic triglycerides (Crodamol<sup>®</sup> GTCC) and sorbitan trioleate (Span<sup>®</sup> 85) were purchased from Croda (Brazil), polyoxyethylene (40) stearate was purchased from Sigma (USA), polysorbate 80 (Tween<sup>®</sup> 80) was purchased from Synth (Brazil). Ultrapurified water (Milli-Q Plus, Millipore) was used. All components had purity of ~ 99%.

### 2.2 Preparation of SLNs and NLCs

The technique of high shear followed by hot high pressure homogenization (HPH) was used for preparation of the aqueous SLNs and NLCs dispersions [17-19]. Briefly, the lipid was melted at a temperature 5 °C above its melting point (with no decomposition of the ingredients). Under mechanical stirring at 10,000 rpm using an Ultra-Turrax T25 (IKA, impeller 10G), the melted lipid phase was dispersed in a hot aqueous surfactant solution both at 75 °C for 60 s. The obtained pre-emulsion was homogenized at the optimized conditions (500 bar, three homogenization cycles, 75 °C), according to Severino *et al.* [20,21], using a GEA Niro Soavi, model NS1001L2K, Panda 2K homogenizer. After three homogenization cycles the obtained oil-in-water (o/w) nanoemulsion was cooled and SLNs and NLCs were generated by lipid recrystallization.

### 2.3 Lipids and required HLB

The particles were composed of cetyl palmitate (SLNs) and a binary mixture of polyoxyethylene (40) stearate and capric/caprylic triglyceride (NLCs) at the mass composition 70/30, respectively.

The required or theoretical HLBs were considered according to Griffin [15]. Thus, for SLNs, the HLB of cetyl palmitate, 10.0, was used [22]. For NLCs, the required HLB was calculated from the mass composition of the lipids, considering the HLB values 17.0 for polyoxyethylene 40 and 5.0 for capric/caprylic triglyceride [22, 23].

## 2.4 Tween 80 and Span 85 optimal coverage

In order to evaluate the coverage of the surfactants (Tween 80 (polysorbate 80) and Span 85 (sorbitan trioleate)) on the surface of the particles, seven lipid formulations for each type of particle were prepared over the range of HLBs from 8 to 15. The formulations were based on different compositions of the two surfactants according to **Table 1**. The mass concentrations in the formulations were: 5% of the surfactant mixture, 10% of oils or/and waxes and 85% water. The oil phase consisted of cetyl palmitate (SLNs) or a binary mixture of polyoxyethylene (40) stearate and capric/caprylic triglyceride, with the weight ratio of 70:30 and Span 85 (NLCs). The aqueous phase was composed of Tween 80 and water.

The Equations 1 and 2 were used for determination of the HLB values of the mixture of surfactants shown in **Table 1**, according to Griffin [15].

$$A = \frac{100 (x - \text{HLB}_B)}{(\text{HLB}_A - \text{HLB}_B)} \quad \text{Eq. A1}$$

$$B = 100 - A \quad \text{Eq. A2}$$

where A is the percentage concentration of the hydrophilic surfactant, B is the concentration of the hydrophobic surfactant and x is the required HLB of the lipids in SLNs and NLCs.

**Table 1:** HLB values obtained for different ratios of surfactants in the seven formulations used for production of SLNs and NLCs by high pressure homogenization.

Formulation	Surfactant mixtures		
	Span 85	Tween 80	mixture HLB
1	53.03	46.97	8.00
2	44.17	55.83	9.17
3	35.30	64.70	10.34
4	26.44	73.56	11.51
5	17.58	82.42	12.68
6	8.71	91.29	13.85
7	0.00	100.00	15.00

The HLB values used in the calculations were: Tween 80 = 15.0 and Span 85 = 1.8.



## 2.4 Physicochemical characterization of SLNs and NLCs

The SLNs and NLCs were characterized by mean hydrodynamic diameter, polydispersity index, and zeta potential. The mean diameter was determined by photon correlation spectroscopy (PCS) and dynamic light scattering (DLS) methods, using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) at a fixed angle of 90° and 25 °C. The dispersions were previously diluted in distilled water and filtered (cellulose ester membrane, 0.45 µm, Millipore, USA) to remove suspended impurities. The mean diameter was calculated as the *Z-average* and the polydispersity index as a measure of the width of the particle size distribution (n=3). The sizes were analyzed by the Intensity and Number distributions.

The zeta potential was determined through the electrophoretic mobility (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK) at 25 °C with samples that were filtered (cellulose ester membrane, 0.45 µm, Millipore, USA) and diluted the SLNs and NLCs dispersions with 0.1 mM KCl solution. All measurements were performed in triplicate.

## 2.5 Thermal stability

The physical stability of the SLNs and NLCs was evaluated according to Griffin's strategy [15] and criterion. Initially, the required or theoretical HLBs for stabilization of the lipids were known. Afterwards, seven trial formulations for both SLNs and NLCs were prepared by HPH with the HLBs of the surfactants in the range of 8 to 15 (**Table 1**) and they were evaluated at the second and twenty eighth day of storage. The formulations were stored at room temperature (25 °C) and were visually monitored for phase separation. Besides room temperature, the formulations were also monitored at 45 °C for stability, as well as under refrigeration at 4 °C, a typical storage temperature to reduce microbial contamination. We considered as stable only those formulations that maintained phase homogeneity at the three tested temperatures, for 2 days according to visual observation [15].

Furthermore, in this work, the stable formulations were characterized by mean diameter and zeta potential and compared with the initial values of these parameters in order to confirm the visual evaluation. These formulations were also characterized by mean diameter and zeta potential at the 2<sup>nd</sup> and 28<sup>th</sup> day of storage at 4 °C.

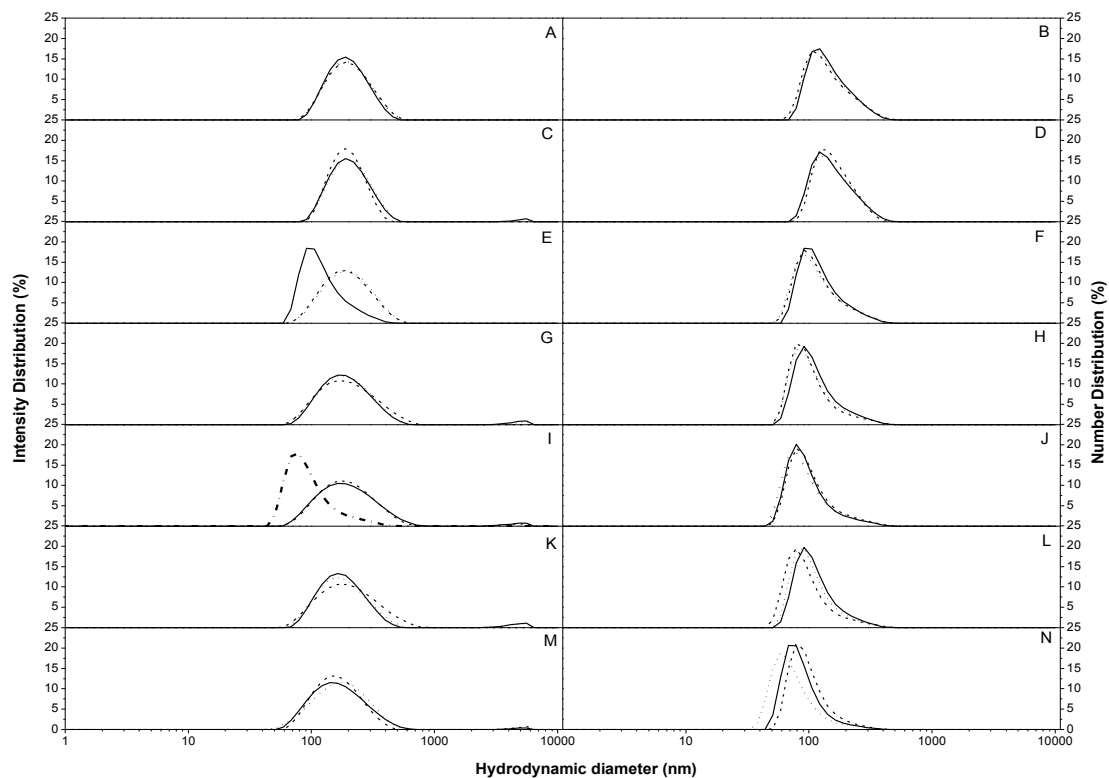
### 3. Results and Discussion

#### 3.1 Physicochemical characterization of SLNs and NLCs

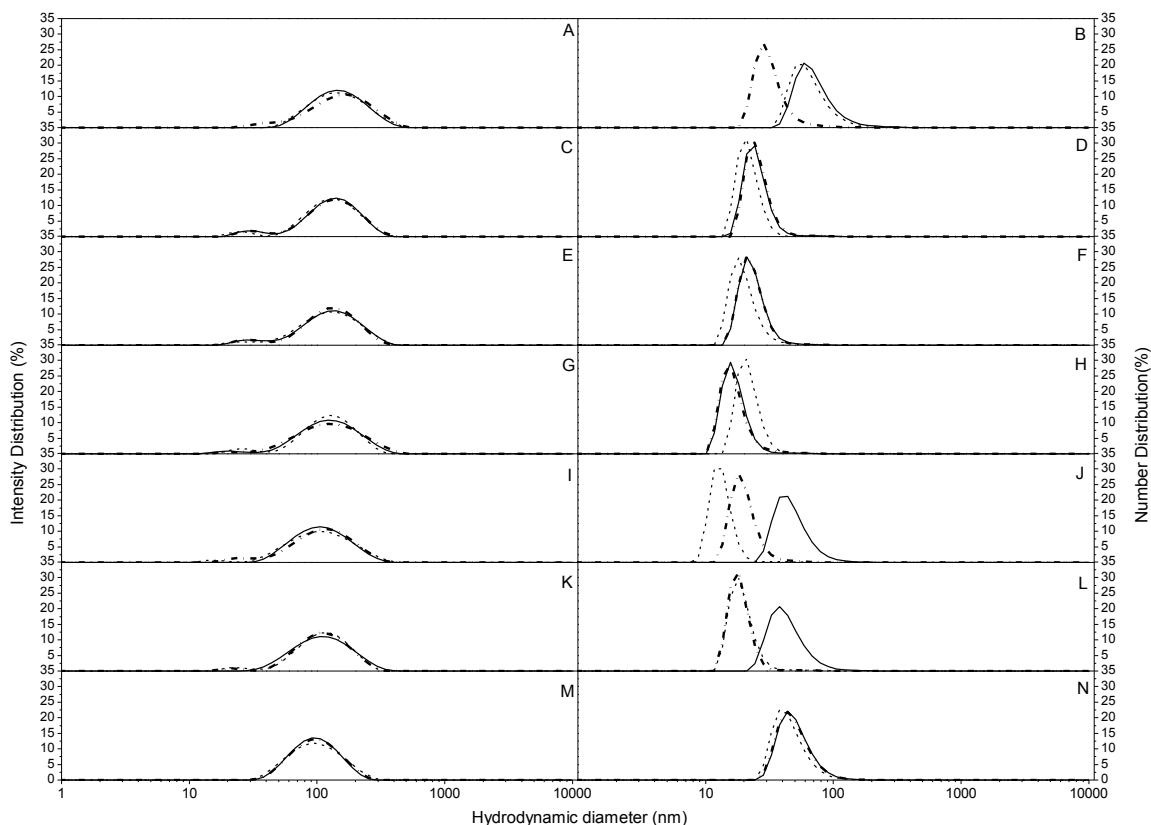
##### 3.1.1 Mean diameter, polydispersity index and zeta potential

**Figures 1** and **2** show the mean hydrodynamic diameters and size distributions for fresh SLNs and NLCs, respectively. For intensity distributions (I-distribution), the intensity is proportional to the particle diameter to the sixth power ( $I \propto D^6$ ) and underestimates small particles that appear in small proportion. In addition, the number distribution (distribution-N), converted through the Mie theory, shows the first order proportionality ( $N \propto D$ ) and reveals the predominant particle diameters. Thus, from these results, the SLNs formulations showed populations that ranged from 100 to 1000 nm, with predominant populations around 100 nm. The NLCs presented wider distributions, from 10 to 1000, with predominant populations around 20 nm.

The width of the distributions revealed the presence of micelles of the surfactants, nanoparticles, and aggregates in a dynamic equilibrium in the dispersions. The predominant diameters show the surfactants were better incorporated in SLNs than in NLCs. The small predominant diameters around 20 nm for NLCs are probably due to a population of mixed micelles of the surfactants and polyoxyethylene (40) stearate. The steric repulsion of the polyoxyethylene chains on the surface of the nanoparticles reduced the incorporation of the PEGylated lipid in the packed structure of NLCs, and induced the formation of mixed micelles. Thus, the polyoxyethylene (40) stearate remained in the mixed micelles and NLCs under the dynamic equilibrium. These effects are reflected in the multiple curves (**Figure 2- B to N**) of the distribution-N of NLCs.



**Figure 1:** Size distribution profiles of SLNs with different HLB values. SLNs HLB=8.00 (A and B); SLNs HLB=9.17 (C and D); SLNs HLB= 10.34 (E and F); SLNs HLB= 11.51 (G and H); SLNs HLB= 12.68 (I and J); SLNs HLB= 13.85 (K and L); SLNs HLB=15.00 (M and N). Intensity distributions (Left, A, C, E, G, I, K, and M). Number distributions (Right, B, D, F, H, J, L and N). The multiple curves represent individual measurements of different samples of SLNs.



**Figure 2:** Size distribution profiles of NLCs with different HLB values. NLCs HLB=8.00 (A and B); NLCs HLB=9.17 (C and D); NLCs HLB= 10.34 (E and F); NLCs HLB= 11.51 (G and H); NLCs HLB= 12.68 (I and J); NLCs HLB= 13.85 (K and L); NLCs HLB=15.00 (M and N). Intensity distributions (Left, A, C, E, G, I, K and M); Number distributions (Right, B, D, F, H, J, L and N). The multiple curves represent individual measurements of different samples of NLCs.

In a summary of the Z-average and zeta potential for SLNs and NLCs with different HLBs of the surfactants (Table 2), the values of Z-average were in concordance with the size distribution behavior of Figures 1 and 2. The size in the SLNs dispersions ranged from 150 to 185 nm, while in NLCs, the dispersions ranged from 72 to 113 nm. In both cases, the polydispersity index was lower than 0.3, indicating monomodal distributions. As expected, the zeta potential was smaller for NLCs than SLNs, due to the presence of the hydrophilic chains of polyoxyethylene 40 on the surface of the particles. In SLNs, the smallest Z-average was

associated with the highest HLBs (formulations 6 and 7). The higher the HLB, more hydrophilic is the coverage on the surface of the particles, favoring the formation of micelles in the equilibrium.

**Table 2:** Mean diameter (Z-average), polydispersity index (PI), zeta potential (ZP) of SLNs and NLCs with HLBs ranging from 8 to 15 (n=3).

Formulation*	SLNs			NLCs		
	Z-average (nm)	PI	ZP (mV)	Z-average (nm)	PI	ZP (mV)
1	185.20±1.39	0.14±0.01	-24.80±0.27	113.20±0.10	0.23±0.01	-6.89±0.60
2	181.10±1.65	0.14±0.01	-20.00±1.67	95.58±0.24	0.25±0.01	-9.47±0.54
3	177.20±1.17	0.16±0.01	-15.00±0.83	91.79±0.69	0.27±0.01	-11.50±0.92
4	174.20±1.57	0.19±0.01	-15.70±2.83	76.38±0.59	0.27±0.01	-9.83±3.46
5	168.60±0.55	0.20±0.02	-24.40±2.80	73.80±0.46	0.28±0.01	-7.42±0.93
6	166.50±1.11	0.18±0.01	-10.60±1.59	81.76±1.01	0.24±0.01	-5.81±0.85
7	150.00±0.53	0.17±0.01	-21.10±2.88	72.06±0.27	0.25±0.01	-6.58±3.74

\*Formulations of SLNs composed of cetyl palmitate and of NLCs of polyoxyethylene (40) stearate (70%) and capric/caprylic triglyceride (30%) with the surfactant compositions presented in Table 1.

### 3.2 Tween 80 and Span 85 optimal coverage

For the lipids used in this study, the required HLB was 10.0 for cetyl palmitate (SLNs) and 13.4 for the binary mixture of polyoxyethylene (40) stearate and capric/caprylic triglyceride. From the experimental formulations shown in **Table 1**, the most stable formulations for SLNs had an HLB of 8.0 (formulation 1-**Table 1**) and for the most stable NLCs, an HLB of 10.34 (formulation 3-**Table 1**). Although the experimental HLB values were close to the required ones, the results proved that the development of a physically stable dispersion of lipid nanoparticles is complex, and not fully predictable. Therefore, the optimum HLB cannot be achieved by simply using the required HLB values of the lipids. The packing of lipids in nanoparticles changes the exposure of lipids at the surface and consequently the interactions with surfactants, as compared with the free lipid molecules. Furthermore, the HLB changes the distribution of surfactants between the micelles and the coverage of the nanoparticles.

Additionally, for higher coverage efficiency, the HLB of the emulsifier combination employed should be substantially lower than the HLB value needed only for emulsification or solubilization.

Despite being composed of different lipids, the most stable NLCs formulation demanded a smaller amount of hydrophobic than the hydrophilic surfactant, 64.70/35.30 (Tween 80/Span 85), when compared to the SLNs formulation of 46.97/53.03 (Tween 80/Span 85). This is due to the presence of the polyoxyethylene (40) stearate, which provides a thick water layer around the surface of the particles. In this case, the steric protection imparted by the polyoxyethylene chains seems to be the main factor contributing to the stability of NLCs.

Severino *et al.* [16] found 9.72 to be the optimal HLB for stabilization of cetyl palmitate emulsified by Tween 80 and Span 85. For the same system, we obtained an optimal HLB of 8.0. The difference can be attributed to the HPH process and the formation of SLNs. In the case of the system of polyoxyethylene (40) stearate and capric/caprylic triglyceride (optimal HLB 10.34), in addition to the HPH process, this system's HLB value differs from the value of 12.36 found by Severino *et al.* [16] and this difference reflects the presence of the PEG chains in the polyoxyethylene (40) stearate, which give hydrophilic protection around the particles, as well as providing colloidal stability.

### **3.3 Thermal stability**

Phase separation at the three temperatures studied did not occur just for HLB 8.0 for SLNs and 10.34 for NLCs (formulations 1 and 3, respectively). Other formulations such as 2 and 3 (SLNs) and 4-6 (NLCs) were stable at 4 °C and 25 °C, but not at 45 °C.

The stable formulations at 4 °C were clear solutions. Table 3 shows the maintenance of the physical properties at the 2<sup>nd</sup> and 28<sup>th</sup> days of storage, as compared to the fresh preparations.

**Table 3:** Mean diameter (Z-average), polydispersity index (PI), zeta potential (ZP) of SLNs (HLB=8.0) and NLCs (HLB=10.34) for fresh dispersions (0 day) and at 2<sup>nd</sup> and 28<sup>th</sup> day of storage at 4°C (n=3).

Time (day)	SLNs			NLCs		
	Z-average (nm)	PI	ZP (mV)	Z-average (nm)	PI	ZP (mV)
0	185.20±1.39	0.14±0.01	-24.80±0.27	91.79±0.69	0.27±0.01	-11.50±0.92
2 <sup>nd</sup>	189.27±2.08	0.14±0.02	-21.90±0.43	92.80±0.55	0.26±0.01	-10.67±0.98
28 <sup>th</sup>	191.10±0.67	0.17±0.01	-20.10±2.34	93.80±0.66	0.25±0.01	-9.31±0.31

#### 4. Conclusions

The high-pressure homogenization technique proved to be effective for production of cetyl palmitate SLNs and NLCs from the mixture of polyoxyethylene (40) stearate and capric/caprylic triglyceride in the presence of Tween 80 and Span 85. The process for production of SLNs and NLCs, in addition to the lipid and surfactant compositions, determined the physical stability of the dispersions. Experimental trials were essential for optimization of the HLB of the surfactants for stability of the dispersions as well as for the additional thermal treatments at 45 °C or 4 °C. Furthermore, the physicochemical characterizations by mean diameter and zeta potential were valuable for confirming the stability of the systems as determined by visual inspection and also to determine the distribution of the surfactants in the micelles and in the lipid nanoparticles over 28 days. The stable formulations for SLNs and NLCs identified in this work (HLB=8.0 for SLNs and HLB=10.34 for NLCs) open opportunities for future explorations and applications involving drug delivery.

#### Acknowledgements

The authors acknowledge financial support obtained from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brazil) and Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP/Brazil).

## References

- [1] G. Fricker, T. Kromp, A. Wendel, A. Blume, J. Zirkel, H. Rebmann, C. Setzer, R.O. Quinkert, F. Martin and C. Müller-Goymann, Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery. *Pharm. Res.*, **27** (2006), pp. 1469–1486.
- [2] M. Üner, Preparation, characterization and physico-chemical properties of solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC): their benefits as colloidal drug carrier systems. *Pharmazie*, **61** (2006), pp. 375-86.
- [3] A. Saupe, K.C. Gordon and T. Rades, Structural investigations on nanoemulsions, solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by cryo-field emission scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. *Int. J. Pharm.*, **314** (2006), pp. 56–62.
- [4] P. Gershkovich and A. Hoffman, Effect of a high-fat meal on absorption and disposition of lipophilic compounds: the importance of degree of association with triglyceride-rich lipoproteins. *Eur. J. Pharm. Sci.*, **32** (2007), pp. 24–32.
- [5] M.R. Gasco, Lipid nanoparticles: perspectives and challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **59** (2007), pp. 377-378.
- [6] L. Battaglia and M. Gallarate. Lipid nanoparticles: state of art, new preparation methods and challenges in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.*, **9** (2012), pp. 497-508.
- [7] A.A. Attama, M.A. Momoh and P.F. Builders, Lipid Nanoparticulate Drug Delivery Systems: A Revolution in Dosage Form Design and Development, Recent Advances in Novel Drug Carrier Systems, 10.5772/50486 (2012)
- [8] A. Saupe, S.A. Wissing, A. Lenk, C. Schmidt and R.H. Müller, Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC)—structural investigations on two different carrier systems. *Biomed. Mater. Eng.*, **15** (2005), pp. 393–402.
- [9] K. Westesen, B. Siekmann, M.H. Koch, Investigations on the physical state of lipid nanoparticles by synchrotron X-ray diffraction. *Int. J. Pharm.*, **93** (1993), pp. 189–199.
- [10] H. Bunjes, M.H. Koch and K. Westesen, Influence of emulsifiers on the crystallization of solid lipid nanoparticles. *J. Pharm. Sci.*, **92** (2003), pp. 1509–1520.
- [11] D.D. Lasic, Liposomes: From physics to applications, Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam (1993).



- [12] P. Calicete and F.M Veronese, Pharmacokinetic and biodistribution proprieties of poly(ethyleneglycol)-protein conjugates, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **55** (2003), pp. 1261-77.
- [13] P.M. Bummer, Physical chemical considerations of lipid-based oral drug delivery – solid lipid nanoparticles. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **21** (2004), pp. 1-20.
- [14] M.D. Triplett, Enabling Solid Lipid Nanoparticle Drug Delivery Technology By Investigating Improved Production Techniques, (2004).
- [15] W.C. Griffin, Classification of surface active agents by HLB. *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **1** (1949), pp. 311–326.
- [16] P. Severino, M.H. Santana and E.B Souto, Polymorphism, crystallinity and hydrophilic-lipophilic balance of stearic acid and stearic acid-capric/caprylic triglyceride matrices for production of stable nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces*, **86** (2011)125-30.
- [17] W. Mehnert and K. Mäder, Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **47** (2001), pp. 165-96.
- [18] R.H. Müller and J.S. Lucks, *Medication vehicles made of solid lipid particles (solid lipid Nanospheres SLN)*. European Patent number 0605497, 1991.
- [19] H.I. Wong, X.Y. Wu, R. Bendayan, Y. Li, and M.A. Rauth, *Nanotechnology for Cancer Therapy*, CRC Press, Boston, (2007), pp. 741-776.
- [20] P. Severino, M.H. Santana and E.B Souto, Optimizing SLN and NLC by 2<sup>2</sup> full factorial design: Effect of homogenization technique. *Mater. Sci. Eng. C*, **32** (2012), pp. 1375–1379.
- [21] P. Severino, E.B Souto, S.C. Pinho and M.H. Santana, Hydrophilic coating of mitotane loaded lipid nanoparticles: Preliminary studies for mucosal adhesion. *Pharm. Dev. Technol*, (2011).
- [22] D.J. Hauss, *Oral lipid Based Formulations Enhancing the Bioavailability of Poorly Water Soluble Drugs*, Informa Healthcare, New York, (2007).
- [23] T. Schmidts, D. Dobler, C. Nissing and F. Runkel, Influence of hydrophilic surfactants on the properties of multiple W/O/W emulsions, *J. Coll. Interf. Sci.*, **338** (2009), pp. 184–192.

## **4.2 PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF SOLID LIPID NANOPARTICLES AND NANOSTRUCTURED LIPID CARRIERS LOADED WITH MITOTANE**

ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO  
EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES

**Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers loaded with mitotane**

Carolina Ribeiro Camerin Grando<sup>a</sup>, Carla Aiolfi Guimarães <sup>a</sup>, Samantha Cristina de Pinho<sup>b</sup>, Lucildes Pita Mercuri<sup>c</sup>, Jivaldo do Rosário Matos<sup>d</sup> and Maria Helena Andrade Santana <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory for Development of Biotechnological Processes, School of Chemical Engineering, University of Campinas, Campinas, Brazil.

<sup>b</sup>Biotechnology Laboratory– Department of Food Engineering– College of Animal Science and Food Engineering University of São Paulo, Brazil

<sup>c</sup>Department of Exact and Earth Sciences, Federal University of São Paulo, Diadema, São Paulo, Brazil

<sup>d</sup>Department of Fundamental Chemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

\*Corresponding author – Laboratory for Development of Biotechnological Processes, School of Chemical Engineering, University of Campinas, Campinas, Brazil

+ 55 19 35213921 [lana@feq.unicamp.br](mailto:lana@feq.unicamp.br)

## **ABSTRACT**

Mitotane is used for treatment of adrenocortical carcinoma but its low aqueous solubility and intestinal permeability limit the treatment causing low bioavailability and serious toxicity problems. Solid lipid nanoparticles (SLNs) and Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) are carriers and can help to improve solubilization and enhancement of mitotane performance *in vivo*. The aim of this research was to prepare and to characterize SLNs and NLCs loaded with mitotane prepared by high pressure homogenization technique (HPH). Cetyl palmitate and polyoxyethylene (40) stearate were used as solid lipids, capric/caprylic triglyceride as liquid lipid and a binary mixture of polysorbate 80 / sorbitan trioleate as surfactants. The prepared SLNs and NLCs loaded with mitotane were nano-sized particles with mean diameter of  $187.40 \pm 0.17$  nm and  $94.50 \pm 0.26$  nm, respectively, low zeta potentials (between -8 and -22 mV), polydispersity index of  $< 0.30$  and high entrapment efficiencies: 100% for SLNs and 81.46% for NLCs corresponding to a drug loading of 0.05 g mitotane/ g nanoparticles and 0.25 g mitotane/ g nanoparticles, respectively. Both particles were equally effective ( $p < 0.05$ ) after one month of storage at 4 °C, without mitotane crystals or particle agglomeration. The entrapped mitotane was completely solubilized within the structure of the nanoparticle matrices as characterized by dynamic scanning calorimetry and thermogravimetry. In conclusion, NLCs produced by HPH are valuable for mitotane loading and promising for future applications in adrenocortical carcinoma treatment.

## 1 Introduction

Nanoparticules can be produced using different kinds of materials, such as biodegradable and biocompatible polymers, phospholipids, surfactants and lipids (Gasco, 2007; Fricker *et al.*, 2010). Lipid nanoparticles have demonstrated several advantages, such as biocompatibility, lower cytotoxicity and modified release of drugs (Battaglia and Gallarate, 2012). Among these nanoparticles, solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs) have gained huge popularity in pharmaceutical formulations (Das and Chaudhury, 2012). These nanoparticles are colloidal lipid systems useful for oral, parenteral and topical administration routes, providing controlled release profiles for various drugs (Wissing *et al.*, 2004; Almeida and Souto, 2007; Schafer-Korting *et al.*, 2007; Hanafy *et al.*, 2007; Müller *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2007; Muchow *et al.*, 2008; Das and Chaudhury, 2011; Jaafar-Maalej *et al.*, 2012). Both types of particle are composed of natural lipids with a GRAS (Generally Recognized as Safe) status. SLNs contain lipids which are solid at room as well as at body temperature, meanwhile NLCs contain a mixture of solid and liquid lipids leading to imperfections in the crystal lattice.

In recent years, the development of SLNs and NLCs has attracted an increasing attention in pharmaceutical fields owing to the excellent tolerability and advantages compared to liposomes or other polymeric nanoparticles (Attama, 2011). These lipid nanoparticles are useful for increasing bioavailability of highly lipophilic molecules, preventing of degradation of sensitive molecules, promoting sustained release of entrapped drugs and minimizing adverse side effects. In addition, their size at nanoscale increases penetration by the biological barriers (Saupe *et al.*, 2006; Gershkovich and Hoffman, 2007; Das and Chaudhury, 2012).

Mitotane is an adrenolytic agent, widely used for adjuvant treatment of nonresectable and metastasized adrenocortical carcinoma (Hahner & Fassnacht, 2005). However, mitotane has poor solubility (log P 6,1) and low permeability after oral administration, leading to poor bioavailability (ca. 40%) in tablets (62 to 66.5 % excreted unchanged in feces (Moy, 1961). In addition, it is supplied at 500 mg/tablet and high cumulative doses of mitotane were usually required for 3 - 5 months to reach therapeutic levels; it causes several side effects and repetitive dosing which make this drug an interesting candidate for development of drug delivery system based on SLNs and NLCs.

High pressure homogenization (HPH) has shown to be a useful technique for preparation of SLNs and NLCs due to reproducibility, scalability and low costs. Therefore, we

started from the hypothesis that SLNs and NLCs would be useful for mitotane entrapment. In this work, we demonstrate the ability of SLNs and NLCs prepared by HPH, to encapsulate mitotane in their matrices with high efficiency, drug loading and stability. The particles were characterized by average hydrodynamic diameter, size distribution (by intensity and by number), polydispersity index, zeta potential, drug entrapment efficiency and the stability by the homogeneity of the formulation. The encapsulation of mitotane in the SLNs and NLCs matrices was characterized their thermal behavior by thermogravimetry and differential scanning calorimetry.

**Keywords:** *Solid lipid nanoparticles, Nanostructured lipid carriers, Mitotane, Characterization*

## **2. Material and Methods**

### **2.1 Materials**

Racemic mitotane was purchased from Yick-Vic Chemicals & Pharmaceuticals (China); Crodamol<sup>®</sup> CP (cetyl palmitate), Crodamol<sup>®</sup> GTCC (capric/caprylic triglyceride) and Span<sup>®</sup> 85 (sorbitan trioleate) were purchased from Croda (Brazil); polyoxyethylene (40) stearate was purchased from Sigma (USA); Tween<sup>®</sup> 80 (polysorbate 80) was purchased from Synth (Brazil). Ultrapurified water (Milli-Q Plus, Millipore) was used. All components had purity of ~ 99%.

### **2.2 Preparation of SLNs and NLCs**

The high shear followed by hot high pressure homogenization (HPH) technique were used for preparation of the aqueous SLNs and NLCs dispersions (Mehnert & Mader, 2001; Lucks & Müller, 1991; Wong *et al.*, 2007). Briefly, the lipid was melted at a temperature 5 °C above its melting point (with no decomposition of the ingredients) and mitotane was dissolved in this phase. Under mechanical stirring at 10,000 rpm using an Ultra-Turrax T25 (IKA, impeller 10G), the melted lipid phase was dispersed in a hot aqueous surfactant solution, both at 75 °C, during 60 s. The obtained pre-emulsion was homogenized at a high pressure, 500 bar, using a GEA Niro Soavi, model NS1001L2K, Panda 2K. After three homogenization cycles the obtained oil-in-water nanoemulsion was cooled and SLNs and NLCs were generated by lipid

recrystallization. The composition of the formulations was established in preliminary studies of our group is shown in **Table 1**.

**Table 1.** Composition of solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs) unloaded or loaded with mitotane\*

Formulation	Oil Phase				Aqueous Phase		
	CTP	PS40	TG	MIT	Span <sup>®</sup> 85	Tween <sup>®</sup> 80	Water q.s.
<b>SLNs<sub>unloaded</sub></b>	10.0	-	-	-	2.75	2.35	100
<b>SLNs<sub>Mitotane</sub></b>	10.0	-	-	0.5	2.75	2.35	100
<b>NLCs<sub>unloaded</sub></b>	-	7.0	3.0	-	1.76	3.23	100
<b>NLCs<sub>Mitotane</sub></b>	-	7.0	3.0	2.5	1.76	3.23	100

\*Values reported as percentage (% , w/w). CTP: cetyl palmitate; PS40: polyoxyethylene (40) stearate; TG: capric/caprylic triglyceride; MIT: mitotane.

## 2.3 Physicochemical characterization of SLNs and NLCs

### 2.3.1 Mean diameter, polydispersity index and zeta potential

The particle size of SLNs and NLCs, either nonloaded or loaded with mitotane were analyzed by photon correlation spectroscopy (PCS) and dynamic light scattering (DLS) methods, using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) at a fixed angle of 90° and at 25 °C. The SLNs and NLCs dispersions were diluted in distilled and filtered water (through 0.45 mm cellulose ester membrane, Millipore, USA) to remove suspended impurities or free mitotane. The mean diameter was calculated as the *Z-average* and the polydispersity index as a measure of the width of the particle size distribution (n=3). The sizes were also analyzed by intensity and number distributions.

The zeta potential was determined through the electrophoretic mobility (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK) at 25 °C with filtered (0.45 mm cellulose ester membrane, Millipore, USA) and diluted the SLNs and NLCs dispersions with 0.1 mM KCl solution. All measurements were performed in triplicate.

### 2.3.2 SLNs and NLCs stability

The stability of the SLNs and NLCs dispersions loaded with mitotane were evaluated along 28 days. Briefly, the samples were stored in amber glass at 4 °C. Samples were withdrawn after 1, 7, 14, 21 and 28 days and submitted to particle size analysis and zeta potential.

The stability of the dispersions also was monitored by visual observations to observe their homogeneity.

### 2.3.3 Mitotane quantification

Mitotane was quantified by spectrophotometry at 268 nm (Hitachi, model U2001), as described at the US Pharmacopoeia (2007). The samples were solubilized in methanol and the mitotane determined through a standard curve generated by absorbance measurements, recorded at different mitotane concentrations.

### 2.3.4 Entrapment efficiency and drug loading

For the quantitative determination of mitotane, a spectrophotometric method was used. The amount of mitotane loaded into the nanoparticles was determined as follows: lyophilized SLNs and NLCs were dissolved in methanol using a volume ratio of 1:3 (nanoparticles dispersion:methanol), submitted to ultrasonication (5 min), and stirred to extract the mitotane from the lipid matrices. Then, the mixture was centrifuged (30 min, 3186 g) to separate the nonsoluble components and the supernatant containing the extracted mitotane was analyzed as described in 2.3.3. The entrapment efficiency (EE) of mitotane in SLNs and NLCs was determined, as the ratio between actual and theoretical loading, by **Eq. A1**.

$$EE (\%) = \frac{\text{mass of entrapped mitotane}}{\text{initial mass of mitotane}} \times 100 \quad (\text{Eq. A 1})$$

Drug loading capacity (DL) was calculated by the ratio between the loaded mitotane and the total amount of the components of SLNs and NLCs (**Eq. A 2**).

$$DL = \frac{\text{mass of entrapped mitotane}}{\text{mass of nanoparticles}} \quad (\text{Eq. A 2})$$



### 2.3.5 Thermal behavior

The thermal behavior of unloaded and nanoparticles loaded with mitotane was characterized by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and thermogravimetry (TG) / Derivative thermogravimetry (DTG). DSC measurements were carried out on a DSC-50 cell (Shimadzu) using aluminum crucibles weighting about 1-2 mg each. The samples were heated between 25-300 °C at the rate of 10 °C.min<sup>-1</sup>, under dynamic nitrogen atmosphere at flow rate 50 mL.min<sup>-1</sup>. The DSC-50 cell was initially calibrated with metallic indium (mp 156.6 °C;  $\Delta fH^\circ = 28.54 \text{ J.g}^{-1}$ ) and zinc (mp 419.6 °C;  $\Delta fH^\circ = 115,8 \text{ J.g}^{-1}$ ). TG/DTG experiments were performed on a thermobalancemodel TGA-50 (Shimadzu) using platinum crucibles in which 0.4 mg (approx.) of each individual sample were heated between 25- 400 °C at the rate of 10 °C.min<sup>-1</sup>, under air atmosphere at the flow rate of 50 mLmin. The decomposition was monitored as a function of temperature and weight loss. The TGA-50 equipment was calibrated with a standard reference of calcium oxalate monohydrate (CaC<sub>2</sub>O<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O).

### 2.4 Statistical Analysis

The variance was analyzed by ANOVA method and the media compared by the Tukey's test at 5% probability level ( $p < 0.05$ ).

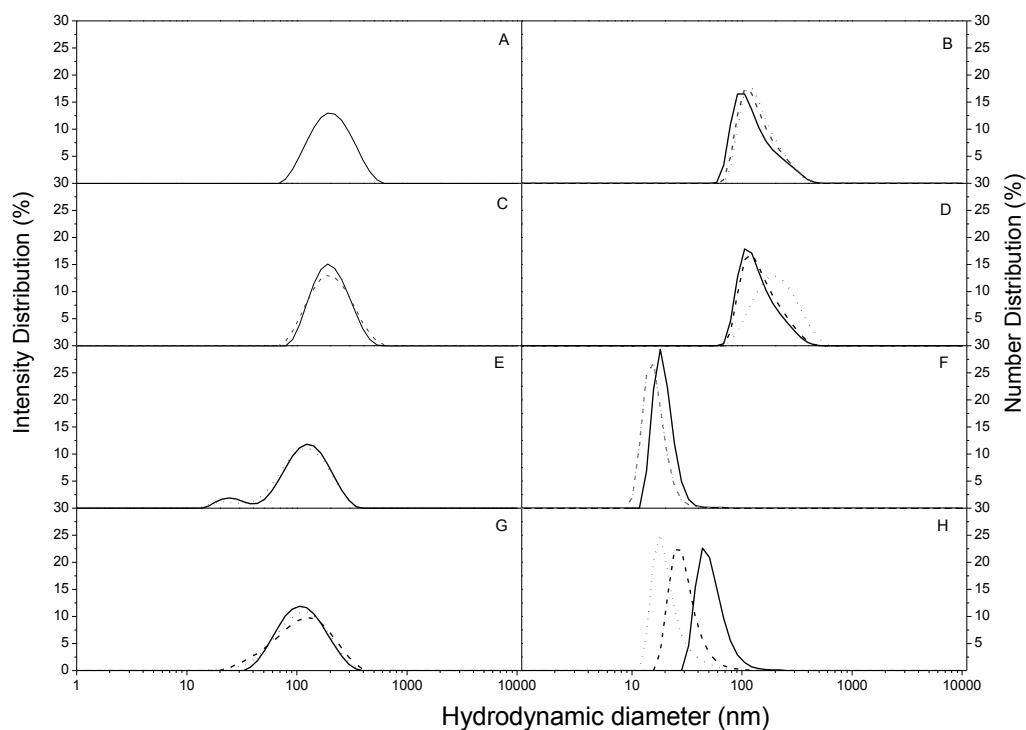
## 3 Results and Discussion

### 3.1 Physicochemical characterization of SLNs and NLCs

#### 3.1.1 Mean diameter, polydispersity index and zeta potential

The intensity distribution showed that the populations of SLNs and NLCs without drug loading ranged 100 to 1000 nm and 10 to 1000 nm, respectively. The entrapment of mitotane reduced the width of these distributions. Although a wide range of diameters was observed, the intensity distribution (distribution-I), which is proportional to the particle diameter is shown at the sixth power (D) ( $I \propto D^6$ ), underestimating the small particles that appear in a very small proportion. In addition, the number distribution (distribution-N) converted through the Mie theory shows a first order proportionality ( $N \propto D$ ) and revealed the predominant particle

diameters. The results showed the predominant populations at 100 nm for the unloaded and the loaded mitotane SLNs, and populations ranging from 10 to 100 nm for the NLCs (**Figure 1**).



**Figure 1:** Size distribution profiles of SLNs and NLCs. Unloaded SLNs (A and B); SLNs loaded with mitotane (C and D); unloaded NLCs (E and F); NLCs loaded with mitotane (G and H). Intensity distributions (Left, A, C, E and G). Number distributions (Right, B, D, F and H). The multiple curves represent individual measurements of different samples of SLNs and NLCs.

Smaller nanoparticles, higher polydispersity indices, and smaller zeta potentials were obtained for the unloaded compared to the mitotane loaded SLNs and NLCs. These differences indicate the entrapment of mitotane within the lipid matrices. The polydispersity was reduced for the particles loaded with mitotane, mainly for the NLCs, due to the presence of the amorphous lipophilic portions, in which mitotane is preferentially solubilized. The zeta potential was -24.80 and -11.50 mV for the unloaded SLNs and NLCs, respectively, and decreased in the module to -21.10 and -8.05 mV when mitotane was entrapped in both types of nanoparticles. These values indicated that the particles are stable in the dispersions in which

they are stored. Also, their negative charge is required for successful oral administration. Comparing unloaded nanoparticles to loaded one, they showed significant differences from statistical method ( $p < 0.05$ ). **Table 2** summarizes the mean diameter (Z-average) and zeta potential for unloaded and mitotane loaded SLNs and NLCs.

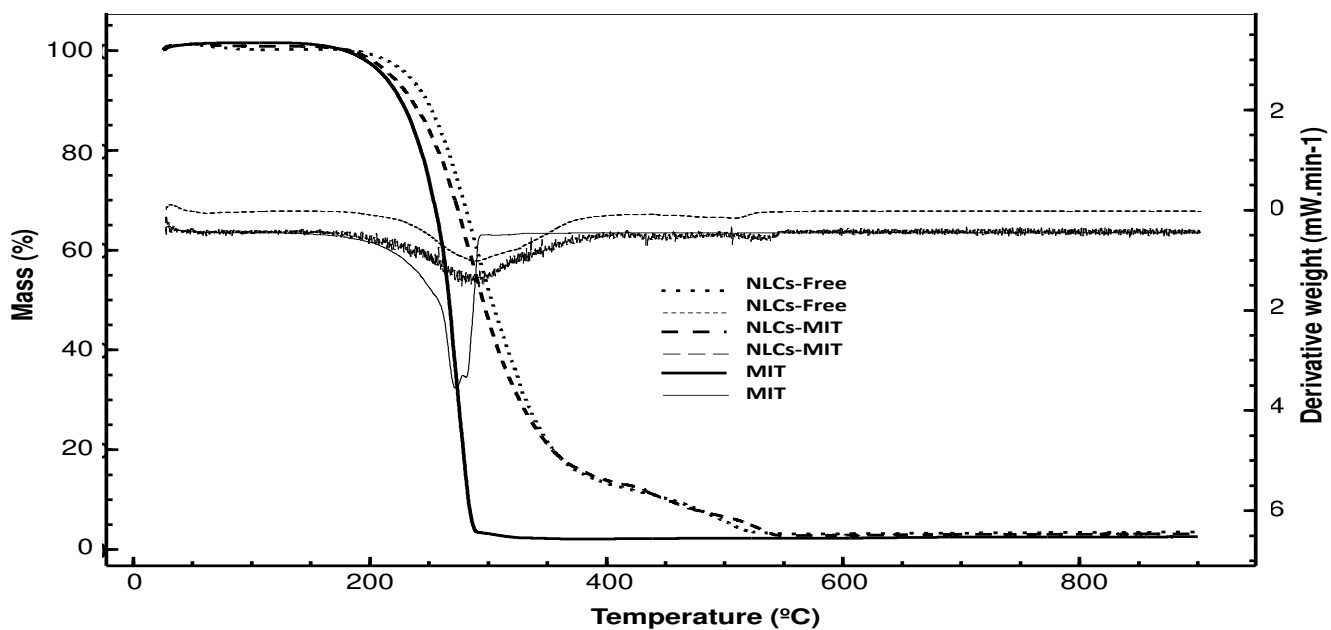
**Table 2:** Mean diameter (Z-average), polydispersity index (PI), zeta potential (ZP) of unloaded and mitotane loaded SLNs and NLCs (n = 3).

Formulation	Z-average (nm)	PI	ZP (mV)
SLNs <sub>unloaded</sub>	185.20±1.39	0.14±0.01	-24.80±0.27
SLNs <sub>Mitotane</sub>	187.40±0.17	0.12±0.03	-21.10±0.55
NLCs <sub>unloaded</sub>	91.79±0.69	0.27±0.01	-11.50±0.92
NLCs <sub>Mitotane</sub>	94.50±0.26	0.22±0.01	-8.05±0.20

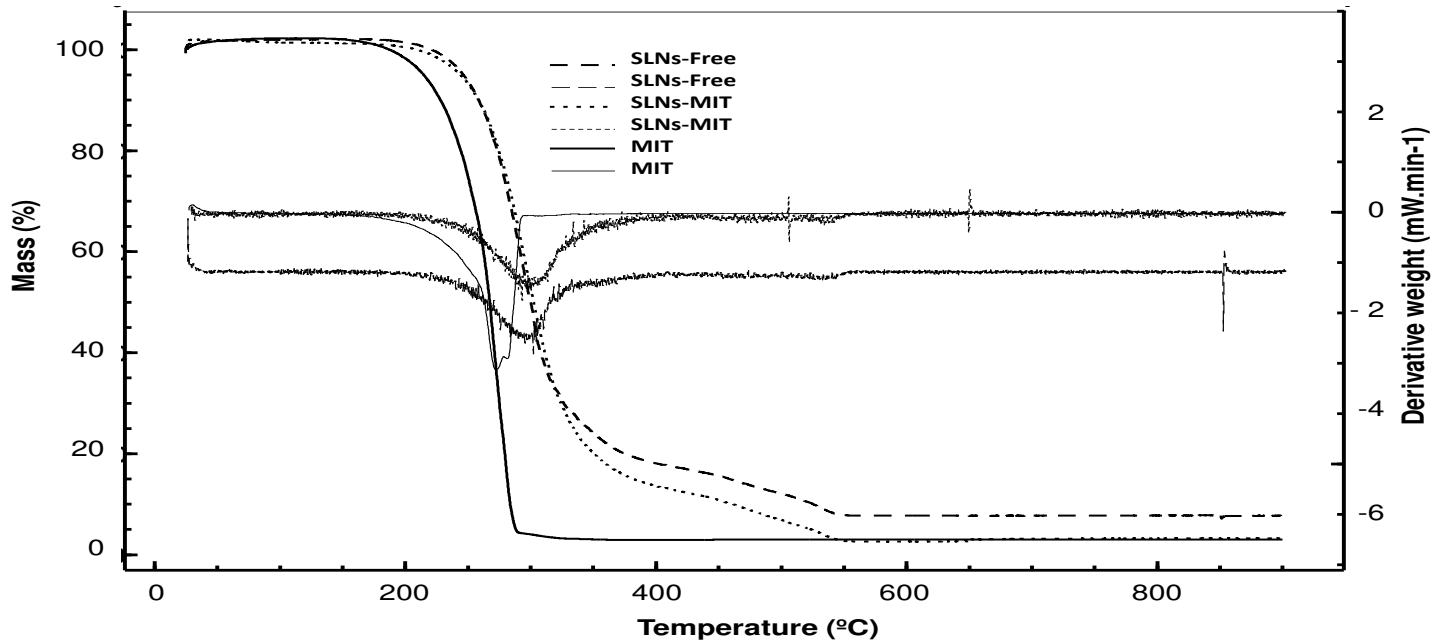
### 3.1.2 Differential scanning calorimetry (DSC) and Thermogravimetry (TG)

The TG and DTG curves for mitotane free powder, unloaded and SLNs and NLCs loaded with mitotane are shown in **Figures 2** and **3**. The TG/DTG curves showed the thermal decomposition steps and indicated that mitotane presented the lowest thermal stability regarding loaded and unloaded SLNs and NLCs. Comparing loaded to unloaded SLNs and NLCs, the thermal stability decreases in loaded SLNs and NLCs due to the presence of mitotane indicating that the drug was encapsulated in the lipid matrix.

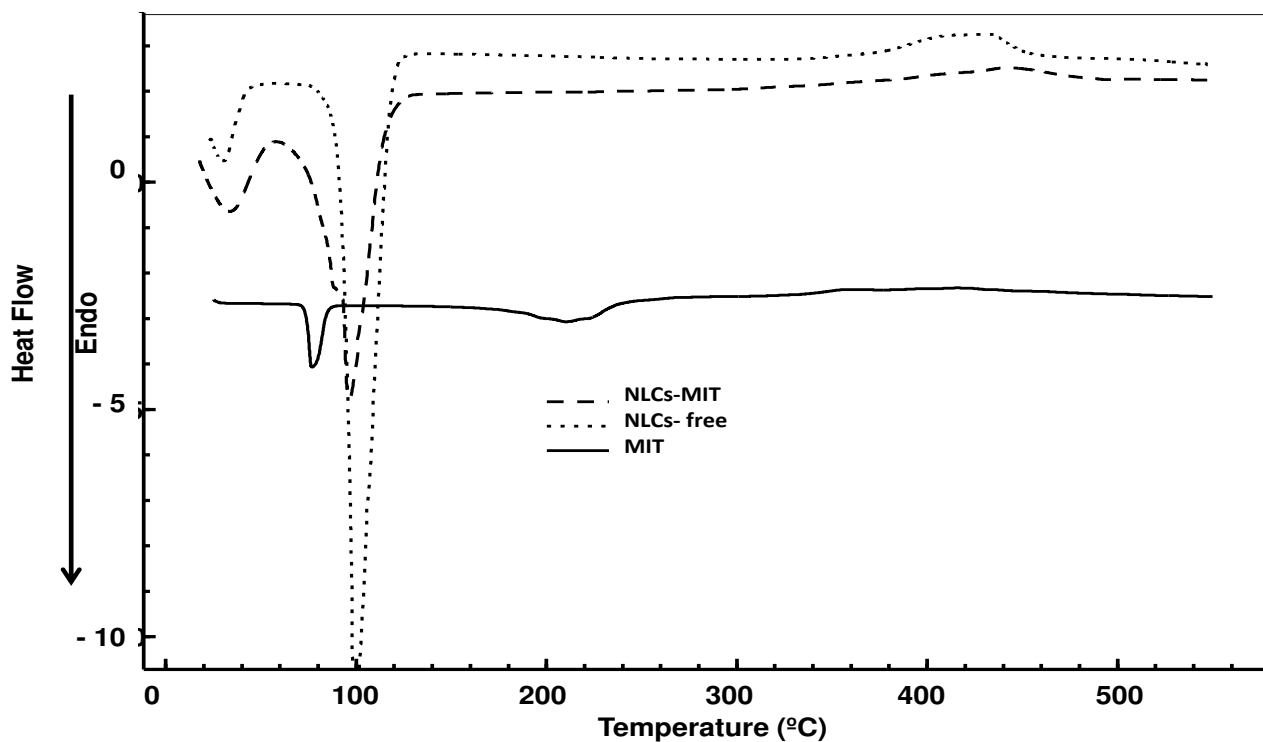
The mitotane free powder DSC curves, SLNs and NLCs unloaded and loading mitotane are shown in **Figure 4 and 5**. The mitotane free powder DSC curve shows an endothermic peak of melting at ~ 77°C followed by another endothermic event, referring to its the thermal decomposition at ~ 209°C, characteristic of this drug. NLCs loaded with mitotane show an endothermic peak at ~ 95°C and another exothermic event at ~422 °C while the unloaded NLCs has an endothermic peak at ~100°C and SLNs loaded with mitotane shows an endothermic peak at ~ 45°C and another endothermic event at ~310 °C while the NLCs unloaded has an endothermic peak at ~ 47°C, this slight shift in the peak was probably due to the mitotane encapsulation in lipid matrix. The absence of characteristic peaks of mitotane indicates either formation of amorphous dispersion in lipid matrix or its solubilization in lipid matrix after heating.



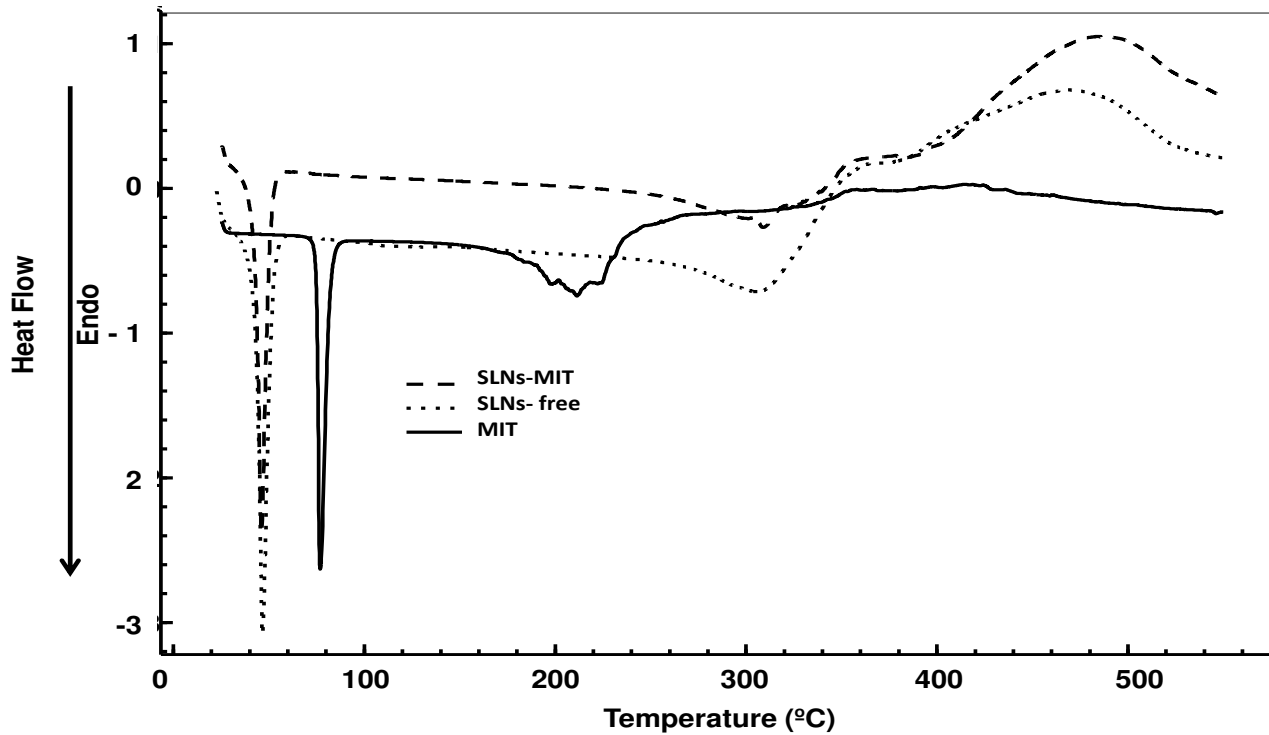
**Figure 2:** TG/DTG curves of mitotane drug free (MIT), mitotane loaded NLCs (NLCs-MIT), unloaded NLCs (NLCs-Free).



**Figure 3:** TG/DTG curves of mitotane drug free (MIT), mitotane loaded SLNs (SLNs-MIT), unloaded SLNs (SLNs-Free).



**Figure 4:** NLCs curves of mitotane (MIT), mitotane-loaded NLCs (NLCs), unloaded NLCs (NLCs-Free).



**Figure 5:** SLNs curves of mitotane (MIT), mitotane-loaded SLNs (SLNs-MIT), unloaded SLNs (SLNs-Free).

### 3.1.3 SLNs and NLCs storage stability

**Table 3** shows the initial properties of SLNs and NLCs loaded with mitotane were: mean diameters 187,40 nm and 94,50 nm with PI values below 0.3 and zeta potential -21.10 mV and -8.05 mV, respectively. These initial values practically didn't change during the monitored period of 28 days (**Table 3**), indicating the good performance of polysorbate 80 and sorbitan trioleate surfactants on stabilization of the particles in colloidal dispersion.

**Table 3:** Storage stability of SLNs and NLCs loaded with mitotane from 1 to 28 days of preparation, as monitored by mean particle (Z-average), polydispersity index (PI) and zeta potential (ZP) analysis (n=3).

Time (days)	SLNs			NLCs			
	Z-average (nm)	PI	ZP (mV)	Z-average (nm)	PI	ZP (mV)	
1	190.50±1.30	0.14±0.01	-18.00±0.95	96.78±0.61	0.22±0.01	-6.22±0.48	Th
7	189.60±1.65	0.15±0.01	-18.11±2.11	98.31±0.58	0.22±0.01	-8.35±0.69	e
14	191.70±1.00	0.13±0.02	-22.10±0.35	102.50±1.21	0.23±0.01	-8.80±0.34	lipi
21	202.50±1.51	0.18±0.02	-25.20±0.49	99.98±0.44	0.21±0.01	-7.49±0.38	ds
28	194.10±0.52	0.14±0.02	-20.10±0.36	100.30±0.66	0.22±0.01	-10.3±0.55	us

ed also contribute for the nanoparticles stabilization. Cetyl palmitate, the main component of SLNs, is a wax produced by the catalytic esterification of fatty alcohol (cetyl alcohol) and fatty acids (palmitic acid). It was suggested that surface active partial glycerides(mono-, and diglycerides and their mixtures) facilitate emulsification and form more rigid surfactant films around the lipid nanoparticles and thus improve storage stability. The mixture of medium chain triglycerides (e.g. capric/caprylic triglycerides- neutral oils) and stearate 40 polyoxyethylene (polyethoxylated derivatives of stearic acid), the main components of NLCs, have advantages like high stability against oxidation during storage and also on solubilization of hydrophobic drugs.

The constant bluish appearance of the dispersions, without any sedimentation during the storage also indicated the storage stability of the dispersions (by visual observations) along the 28 days of storage.

### 3.1.4 Entrapment efficiency and drug loading

In recent literature reports, several hydrophobic drugs have been successfully entrapped in SLNs and NLCs, e.g., camptothecin, doxorubicin, clotrimazole and ascorbyl palmitate (Jenning & Gohla, 2001; Huang *et al.*, 2008; Teeranachaideekul *et al.* 2008; Ma *et al.*, 2009; Das *et al.*, 2012). The imperfections and amorphous regions in NLCs promote better drug encapsulation as compared to SLNs (Das *et al.*, 2012). This outcome reflects the fact that the majority of lipophilic drugs solubilize better in oils than in solid lipids. These findings were also confirmed in our results, when the SLNs shown 100% entrapment efficiency for mitotane loading of only 0.05 g of mitotane/ g of nanoparticles, while the entrapment efficiency of NLCs was 81.46% for mitotane loaded NLCs, a factor of 5-fold higher (0.25 g of mitotane/ g of nanoparticles).

## 4. Conclusions

The present study demonstrated that mitotane was efficiently encapsulated and stable along 28 days at 4 °C of storage for SLNs and NLCs. NLCs had shown higher amounts of drug loading (0.25 g mitotane/g nanoparticles) compared to SLNs (0.05 g mitotane/ g nanoparticles). Therefore, NLCs loaded with mitotane are promising for future studies on its pharmacokinetics.

## Acknowledgements

The authors acknowledge financial support obtained from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brazil) and Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP/Brazil).

## References

- Almeida, A. J., Souto, E., 2007. Solid lipid nanoparticles as a drug delivery system for peptides and proteins. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 478–490.
- Attama, A. A., Müller-Goymann, C. C., 2008. Effect of beeswax modification on the lipid matrix and solid nanoparticle crystallinity. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects.* 315, 189-195.
- Battaglia, L., Gallarate, M., 2012. Lipid nanoparticles: state of art, new preparation methods and challenges in drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 9, 497-508.

Das, S., Chaudhury, A., 2011. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. *AAPS Pharm. Sci. Tech.* 12, 62–76.

Das, S., Ng, W. K., Tan, R. B. H., 2012. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? *Eur. J. Pharm. Sci.* 47,139–151.

Fricker, G., Kromp, T., Wendel, A., Blume, A., Zirkel, J., Rebmann, H., Setzer, C., Quinkert, R. O., Martin, F., Müller-Goymann, C., 2010. Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery. *Pharm. Res.* 27, 1469–1486.

Gasco, M. R., 2007. Lipid nanoparticles: perspectives and challenges. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 6, 377-378.

Gershkovich, P., Hoffman, A., 2007. Effect of a high-fat meal on absorption and disposition of lipophilic compounds: the importance of degree of association with triglyceride-rich lipoproteins. *Eur. J. Pharm. Sci.* 32, 24–32.

Hahner, S., & Fassnacht, M., 2005. Mitotane for adrenocortical carcinoma treatment. *Curr Opin Investig Drugs*, 6, 386-394.

Hanafy, A., Spahn-Langguth, H., Vergnault, G., Grenier, P., Tubic Grozdanis, M., Lenhardt, T., Langguth, P., 2007. Pharmacokinetic evaluation of oral fenofibrate nanosuspensions and SLN in comparison to conventional suspensions of micronized drug. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 419–426.

Huang, Z. R., Hua, S. C., Yang, Y. L., Fang, J. Y., 2008. Development and evaluation of lipid nanoparticles for camptothecin delivery: a comparison of solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, and lipid emulsion. *Acta Pharm. Sinic.* 29, 1094–1102.

Jaafar-Maalej, C., Elaissari, A., Fessi, H., 2012. Lipid-based carriers: manufacturing and applications for pulmonary route. *Expert. Opin. Drug Deliv.* 9, 1111-1127.

Jenning, V., Gohla, S., 2001. Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN). *J. Microencapsul.*, 18, 149–158.

Lucks, J. S., Müller, R. H., 1991. Medication vehicles made of solid lipid particles (solid lipid nanospheres-SLN). European Patent number 0605497.

Ma, P., Dong, X., Swadley, C. L., Gupte, A., Leggas, M., Ledebur, H. C., Mumper, R. J., 2009. Development of Idarubicin and Doxorubicin Solid Lipid Nanoparticles to Overcome Pgp-mediated Multiple Drug Resistance in Leukemia. *J. Biomed. Nanotechnol.*, 5, 151–161.



Mehnert, W., Mäder, K., 2001. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 47, 165-96.

Mitotane, in *United States Pharmacopeia 30/ National Formulary 25*, Rockville, 2007, Vol. 3, pp. 2674.

Moy, R. H., 1961. Studies of the pharmacology of o,p'-DDD in man. *J. Lab. Clin. Med.* 58, 296-304.

Muchow, M., Maincent, P., Muller, R.H., 2008. Lipid nanoparticles with a solid matrix (SLN, NLC, LDC) for oral drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 34, 1394–1405.

Müller, R. H., Petersen, R. D., Hommos, A., Pardeike, J., 2007. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 522–530.

Saupe, A., Gordon, K. C., Rades, T., 2006. Structural investigations on nanoemulsions, solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers by cryo-field emission scanning electron microscopy and Raman spectroscopy. *Int. J. Pharm.* 314, 56–62.

Schafer-Korting, M., Mehnert, W., Korting, H.C., 2007. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 427–443.

Souto, E. B., Wissing, S. A., Barbosa, C. M., Müller, R. H., 2004. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. *Int. J. Pharm.* 278, 71–77.

Wissing, S. A., Kayser, O., Muller, R. H., 2004. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 1257–1272.

Wong, H.L., Bendayan, R., Rauth, A.M., Li, Y., Wu, X.Y., 2007. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 491–504.

Wong, H.I., Wu, X. Y., Bendayan, R., Li, Y., Rauth, M. A., 2007. *Nanotechnology for Cancer Therapy*. CRC Press, Boston.

Teeranachaideekul, V., Souto, E. B., Müller, R. H., Junyaprasert, V. B., 2008. Physicochemical characterization and in vitro release studies of ascorbyl palmitate-loaded semi-solid nanostructured lipid carriers (NLC gels). *J. Microencapsul.* 25, 111-120.

**4.3 *IN VITRO* MITOTANE RETENTION AND *EX VIVO* INTESTINAL ABSORPTION OF RACEMIC MITOTANE IN SOLID LIPID NANOCARRIERS**

ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO  
JOURNAL OF BIOMEDICAL NANOTECHNOLOGY

***In Vitro* Mitotane Retention and *Ex Vivo* Intestinal Absorption of Racemic Mitotane in  
Solid Lipid Nanocarriers**

Carolina Ribeiro Camerin Grando<sup>a</sup>, Carla Aiolfi Guimarães<sup>a</sup>, Eneida de Paula<sup>b</sup>, Marco Vinícius Chaud<sup>c</sup> and Maria Helena Andrade Santana<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratory for Development of Biotechnological Processes, School of Chemical Engineering, University of Campinas, Campinas, Brazil

<sup>b</sup>Biomembranes Laboratory, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, Brazil

<sup>c</sup>Pharmaceutical Sciences Post-Graduate Program, Sorocaba University, Sorocaba, SP, Brazil

\*Corresponding author – Laboratory for Development of Biotechnological Processes, School of Chemical Engineering, University of Campinas, Campinas, Brazil

+ 55 19 35213921 [lena@feq.unicamp.br](mailto:lana@feq.unicamp.br)

## **Abstract**

Mitotane, an adrenolytic agent for the treatment of nonresectable and metastasized adrenocortical carcinoma, has low solubility and permeability in the gastrointestinal tract. The aim of this research was to evaluate the evaluation of *in vitro* retention of mitotane at different pHs and *ex vivo* intestinal permeation of solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs) loaded with mitotane, using the everted gut sac model. The SLNs and NLCs were composed of cetyl palmitate and polyoxyethylene (40) stearate as the solid lipids and capric/caprylic triglyceride as the liquid lipid, polysorbate 80 and sorbitan trioleate as surfactants, and were prepared by a technique using high shear followed by high pressure homogenization. The *ex vivo* intestinal permeation was evaluated across the duodenum of adult male *Wistar* rats. The prepared SLNs and NLCs loaded with mitotane were nano-sized particles with mean diameter of  $187.40 \pm 0.17$  nm and  $94.50 \pm 0.26$  nm, respectively, low zeta potentials (between -8 and -22 mV), polydispersity index of  $< 0.30$  and high entrapment efficiencies of 100% (SLNs) and 81.46% (NLCs) and drug loading of (0.05 and 0.25 g mitotane/g nanoparticles). The intestinal permeation indicated the absorption of mitotane in SLNs and NLCs was improved 3.0 to 3.5-fold compared to mitotane administered as micronized free powder or dissolved in olive oil. The nanoparticle formulations exhibited greater permeation across the gut for both enantiomers of mitotane than did the mitotane dissolved in olive oil. Only the (*S*) enantiomer was detected in the permeated material in studies using the solid free mitotane. NLCs were more resistant to pH in the range of 1.2 to 7.4, releasing only 30% of the loaded mitotane after 180 min, while SLNs released 88-100% under the same condition. Therefore, the potential of NLCs may be exploited as a promising delivery system for mitotane administration by the oral route.

**Keywords:** *Mitotane, Solid Lipid Nanoparticles, Nanostructured Lipid Carriers, Intestinal Permeation, drug release*

## **1. Introduction**

The oral route is the most widely used for drug administration since it is simple and leads to a greater adherence to treatment and better quality of life for the patients. However, around 30% of medicines on the market and 40% of new chemical entities in development showed insufficient aqueous solubility and/or low oral bioavailability.<sup>1</sup> Many strategies were developed to overcome these problems, such as reducing the powder particle size by micronization<sup>2</sup>, drug incorporation into cyclodextrins and solid dispersion<sup>3,4</sup>, use of permeation enhancers, surfactants or drug entrapment in lipid-based formulations.<sup>5, 6</sup> Currently, the nanotechnology-based drug delivery systems including biodegradable polymeric nanoparticles<sup>7,8</sup>, nanosuspensions<sup>9</sup>, nanoemulsions<sup>10</sup>, nanocrystals, solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid nanoparticles (NLCs)<sup>11</sup> have been extensively studied due to their benefits. In particular, SLNs and NLCs have been especially considered because they are composed of biocompatible and biodegradable lipids and they show biocompatibility, high bioavailability and controlled release capabilities.<sup>12-14</sup> Therefore, these colloidal systems have been used as efficient alternatives for the controlled delivery of drugs with low oral bioavailability.

Mitotane ((1-chloro-2-[2,2-dichloro-1-(4-chlorophenyl)ethyl]benzene) ethane, o,p'-DDD) is a widely used adrenolytic agent in the treatment of inoperable, recurrent and/or metastatic adrenocortical carcinoma and even seems to have a role in adjuvant treatment after complete resection.<sup>15</sup> However, mitotane presents poor solubility in the gastro-intestinal tract and low bioavailability. Generally, for lipophilic drugs of class IV in biopharmaceutical classification<sup>16</sup>, such as mitotane, an increase in water solubility allows improvements on bioavailability after oral administration. Some formulation strategies have been reported so far and also some nanosuspensions.<sup>17</sup> However, these formulations were not evaluated with biological assays. When mitotane was prepared in a self-emulsifying microemulsion, it showed a 3.4-fold improvement of its oral bioavailability in rabbits as compared to Lysodren<sup>®</sup>. This outcome points to a possible reduction of dosage and greater acceptance of treatment by patients.<sup>18</sup>

SLNs and NLCs are promising drug delivery systems because they offer possibilities for improving efficacy of drugs by markedly decreasing the side effects and enhancing the drug bioavailability and safety. These benefits make mitotane a good candidate for formulation in SLNs and NLCs. However, the nanoparticles must retain their integrity through the

gastrointestinal tract to promote intestinal absorption and to sustain the release of drugs in the blood stream.

The everted gut sac model is a useful tool for studying the physiological and molecular processes of absorption, providing physical and chemical information of the properties of the pharmaceuticals and ascertaining the role of the absorption facilitators and inhibitors of intestinal metabolism.<sup>19</sup> In this study, the everted gut sac technique in rats was used to evaluate the absorption behavior of SLNs and NLCs loaded with mitotane across the intestinal tissue.

After oral administration of mitotane capsules in humans (10 g/day), approximately 35 to 40% of the product was absorbed (about 65% is excreted unmetabolized in feces).<sup>20</sup> Moreover, Moolenaar *et al.* (1981) showed that after administration of a single dose of mitotane, serum levels were lower for the micronized form than for mitotane associated with lipid vehicles, such as tablets, milk, chocolate, or emulsions.<sup>21</sup>

Oil dispersed in water (O/W) microemulsions released mitotane into the mucin layer, without passage through the route of mixed micelle formation by bile, and efficiently increased permeation of mitotane across the intestinal membrane as compared conventional formulations.<sup>22</sup>

The aim of the present study was to evaluate the *in vitro* mitotane release and *ex vivo* intestinal absorption of SLNs and NLCs loaded with mitotane, prepared by high shear followed by hot high pressure homogenization technique.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1 Materials**

Racemic mitotane was purchased from Yick-Vic Chemicals & Pharmaceuticals (China); Crodamol<sup>®</sup> CP (cetyl palmitate), Crodamol<sup>®</sup> GTCC (capric/caprylic triglyceride) and Span<sup>®</sup> 85 (sorbitan trioleate) were purchased from Croda (Brazil); polyoxyethylene (40) stearate was purchased from Sigma (USA); Tween<sup>®</sup> 80 (polysorbate 80) was purchased from Synth (Brazil). Ultrapurified water (Milli-Q Plus, Millipore) was used. All components had purity of ~ 99%.

TC-199 is the designation of the solution used to incubate the everted gut sac and it was composed of 145.0 mM NaCl; 4.56 mM KCl; 1.25 mM CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O; 5.0 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 10.0 mM glucose.

The phosphate buffer solution was used at pH 6.8 and pH 7.4. The buffer composition at pH 6.8 was 53.0  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 46.3  $\mu\text{M}$   $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , and at pH 7.4 162.0 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and 43.3 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

## **2.2 Animals**

Male *Wistar* rats (180-200 g), obtained from ANILAB Animais de Laboratório, Criação e Comércio (Brazil), were maintained with water and food *ad libitum* prior to assays. Animals were fasted for 12 h prior to experiments. Studies were carried out in accordance with the provisions of the Guide to care and use of experimental animals in all experimental procedures, approved by CEUA/UFSCar Ethics in Research Committee, # 009/2012.

## **2.3 Preparation of SLNs and NLCs**

The technique of high shear followed by hot high pressure homogenization (HPH) was used for preparation of the aqueous SLNs and NLCs dispersions.<sup>23-25</sup> Briefly, the lipid was melted at a temperature 5 °C above its melting point (with no decomposition of the ingredients). Under mechanical stirring at 10,000 rpm using an Ultra-Turrax T25 (IKA, impeller 10G), the melted lipid phase was dispersed in a hot aqueous surfactant solution both at 75 °C for 60 s. The obtained pre-emulsion was homogenized at the optimized conditions (500 bar, three homogenization cycles, 75 °C), according to Severino *et al.*<sup>26,27</sup>, using a GEA Niro Soavi, model NS1001L2K, Panda 2K homogenizer. After three homogenization cycles the obtained oil-in-water (o/w) nanoemulsion was cooled and SLNs and NLCs were generated by lipid recrystallization.

The composition of the formulations was established in preliminary studies of our group is shown in **Table 1**.

**Table 1.** Composition of solid lipid nanoparticles (SLNs) and nanostructured lipid carriers (NLCs) unloaded or loaded with mitotane\*.

Formulation	Oil Phase				Aqueous Phase		
	CTP	PS40	TG	MIT	Span <sup>®</sup> 85	Tween <sup>®</sup> 80	Water q.s.
<b>SLN<sub>unloaded</sub></b>	10.0	-	-	-	2.75	2.35	100
<b>SLN<sub>Mitotane</sub></b>	10.0	-	-	0.5	2.75	2.35	100
<b>NLC<sub>unloaded</sub></b>	-	7.0	3.0	-	1.76	3.23	100
<b>NLC<sub>Mitotane</sub></b>	-	7.0	3.0	2.5	1.76	3.23	100

\*Values reported as percentage (% , w/w). CTP: cetyl palmitate; PS40: polyoxyethylene (40) stearate; TG: capric/caprylic triglycerides; MIT: mitotane.

## **2.4 Physicochemical characterization of SLNs and NLCs**

### **2.4.1 Mean diameter, polydispersity index, and zeta potential**

The particle size of SLNs and NLCs, either unloaded or loaded with mitotane were analyzed by photon correlation spectroscopy (PCS) and dynamic light scattering (DLS) methods, using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, UK) at a fixed angle of 90° and at 25 °C. The SLNs and NLCs dispersions were diluted in distilled and filtered water (cellulose ester membrane, 0.45 mm, Millipore, USA) to remove suspended impurities or free mitotane. The mean diameter was calculated as the *Z-average* and the polydispersity index as a measure of the width of the particle size distribution (n=3). The sizes were also analyzed by intensity and number distributions.

The zeta potential as determined through the electrophoretic mobility (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments, UK) was measured at 25 °C with filtered (cellulose ester membrane, 0.45 mm, Millipore, USA) and diluted the SLNs and NLCs dispersions with 0.1 mM KCl solution. All measurements were performed in triplicate.

### **2.4.2 Mitotane quantification**

Mitotane was quantified by spectrophotometry at 268 nm (Hitachi, model U2001), as described at US. Pharmacopeia (2007).<sup>28</sup> The samples were solubilized in methanol and the mitotane determined through a standard curve generated by absorbance measurements recorded at different mitotane concentrations.



### 2. 4.3 Entrapment efficiency and drug loading

The amount of mitotane loaded into the nanoparticles was determined as follows: lyophilized SLNs and NLCs were dissolved in methanol using a volume ratio of 1:3 (nanoparticles dispersion:methanol), submitted to ultrasonication (5 min), and stirred to extract the mitotane from the lipid matrices. Then, the mixture was centrifuged (30 min, 3186 g) to separate the nonsoluble components and the supernatant containing the extracted mitotane was analyzed as described in 2.4.2. The entrapment efficiency (EE) of mitotane in SLNs and NLCs was determined, as the ratio between actual and theoretical loading, by **Eq. A1**.

$$EE (\%) = \frac{\text{mass of entrapped mitotane}}{\text{Initial mass of mitotane}} \times 100 \quad (\text{Eq. A 1})$$

Drug loading capacity (DL) was calculated by the ratio between the loaded mitotane and the total amount of the components of SLNs and NLCs (**Eq. A 2**).

$$DL = \frac{\text{mass of entrapped mitotane}}{\text{Mass of nanoparticles}} \quad (\text{Eq. A 2})$$

### 2.5 Mitotane retention

The *in vitro* retention of mitotane was evaluated by the submission the SLNs and NLCs to different pHs, adapted by from Cruz *et al.*<sup>29</sup> and Luo *et al.*<sup>30</sup>. The assays were carried out in dialysis sacs in Erlenmeyer flasks that were maintained at 37 °C and 50 rpm by reciprocal shaking. The dialysis medium was composed by HCl aqueous solutions, at pH 1.2 or phosphate-buffer, pH 6.8 or 7.4, containing 67.8 mM Tween 80 to avoid saturation of the media according to preliminary adjustments. The released mitotane was quantified in the outer solution after 24 h. The dialysis bags (molecular weight cut off 12–14 kDa) were equilibrated in release medium for 12 h prior to the experiment. Samples of 1.5 mL of the SLNs or NLCs dispersions loaded with mitotane in 1.5 mL of dialysis media were placed into the bags which were immersed in 225 mL of the same medium. Aliquots (1.0 mL) were collected at the predetermined intervals of 15, 30, 60, 120, 180, 240, 360, 720 and 1440 min and the same volume of fresh medium was added to maintain a constant volume. These aliquots were diluted in methanol and analyzed according described in 2.4.2 section.

## **2.6 Evaluation of intestinal absorption**

The intestinal permeation of mitotane was evaluated using the everted gut sac model. The assay evaluated the permeation of mitotane from the loaded SLNs and NLCs, and compared these values with the absorption of pure mitotane and this drug dissolved in olive oil. The rats were anesthetized with by an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital and a duodenum segment (8 cm length from the pylorus) of the intestine was immediately dissected and flushed with TC-199 without 10Mm glucose; the solution was kept at 10 °C. The intestinal segment was gently everted with the aid of a flexible cotton swab with its extremity protected by a fine fabric (mini brush). One end of the segment was clamped and filled with fresh TC199 medium that contained no glucose and sealed with a second clamp in order to obtain a closed sac. Then, the everted sacs were placed in Erlenmeyer flasks containing the formulations at concentration of 75 µg/mL in 25 mL of the TC199 medium with the addition of 10 mM glucose; the solutions were maintained oxygenated ( $O_2:CO_2 = 95:5$ ) and incubated at 37 °C. The everted sacs were collected by removing the sacs from the flasks after 120 min, then they were externally washed with fresh TC199 medium.<sup>31,32</sup> The contents of the intestinal sac were filtered through a 45 µm pore membrane and diluted in methanol. The concentration of mitotane in the outside medium was determined as described in section 2.4.2.

The samples were previously filtered and diluted in methanol to eliminate biological interferences, afterwards submitted to ultrasonication for 5 min and centrifugation 3186 g for 15 min. The supernatant diluted in the mobile phase was used in these analyses.

Mitotane was quantified in the serosal (permeated) and mucosal (outside) sides of the sac. The permeability was calculated by the ratio between the mitotane concentration in the permeated and in the initial solution. The results were expressed in percentage.

## **2.7 Evaluation of mitotane enantiomers permeation**

A qualitative identification of mitotane enantiomers that permeated the gut membrane was performed by analysis of the permeated samples by HPLC with a UV/VIS detector (Shimadzu model SPD-10AV, Japan). Identification was based on comparison of their retention times as described by da Silva Jr *et al.*<sup>33</sup> Briefly, the semipreparative columns (1 cm inner diameter, 10 cm length) were packed with amylose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate) supported on a matrix of silica. The mobile phase was a mixture of acetonitrile and isopropanol

(1:3 v/v), detection was monitored at 270 nm (U.V.), temperature was kept at 25 °C, injection volume, 20 µL.

The samples used were obtained from everted gut sac model and diluted in the mobile phase 1:4 (v/v).

## **2.8 Statistical Analysis**

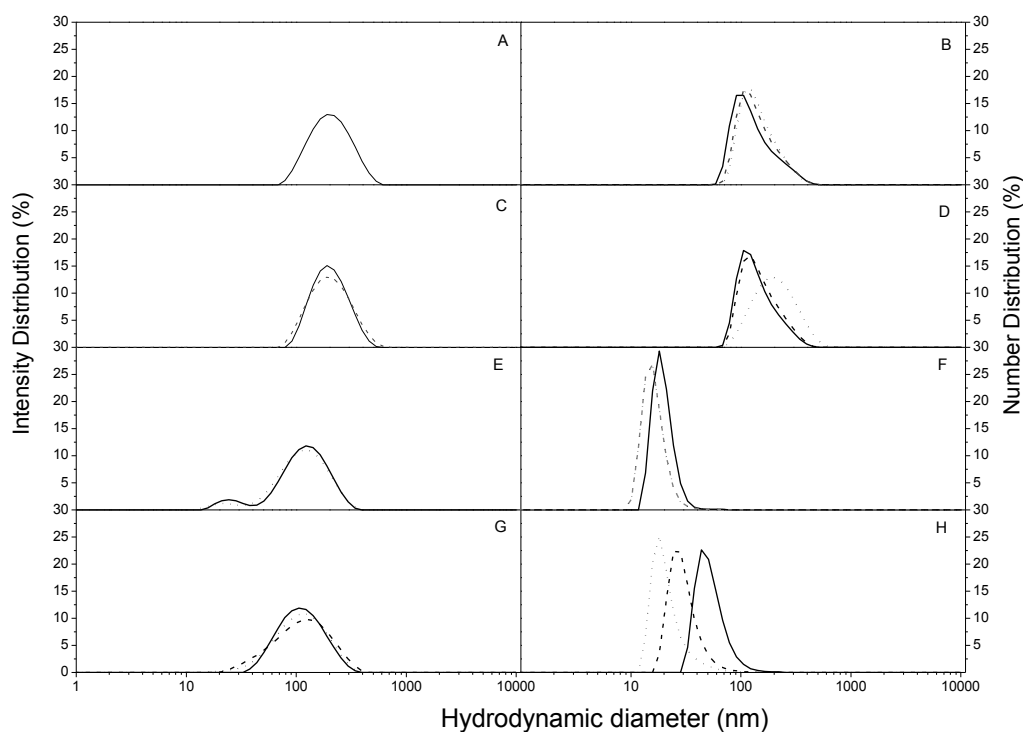
The statistical significance of the differences was tested by analysis of variance (ANOVA) and by the parametric Tukey test of independent experiments with a significance level of  $\alpha = 0.05$ .

## **3. Results and discussion**

### **3.1 Physicochemical characterization of SLNs and NLCs**

#### **3.1.1. Mean diameter, polydispersity index, and zeta potential**

The intensity distribution showed that the populations of SLNs and NLCs without drug loading ranged 100 to 1000 nm and 10 to 1000 nm, respectively. The entrapment of mitotane reduced the width of these distributions. Although a wide range of diameters was observed, the intensity distribution (distribution-I), which is proportional to the particle diameter is shown at the sixth power (D) ( $I \propto D^6$ ), underestimating the small particles that appear in a very small proportion. In addition, the number distribution (distribution-N) converted through the Mie theory shows a first order proportionality ( $N \propto D$ ) and revealed the predominant particle diameters. The results showed the predominant populations at 100 nm for the unloaded and the loaded mitotane SLNs, and populations ranging from 10 to 100 nm for the NLCs (**Figure 1**).



**Figure 1:** Size distribution profiles of SLNs and NLCs. Unloaded SLNs (A and B); SLNs loaded with mitotane (C and D); unloaded NLCs (E and F); NLCs loaded with mitotane (G and H). Intensity distributions (Left, A, C, E and G). Number distributions (Right, B, D, F and H). The multiple curves represent individual measurements of different samples of SLNs and NLCs.

Smaller nanoparticles, higher polydispersity indices, and smaller zeta potentials were obtained for the unloaded compared to the mitotane loaded SLNs and NLCs. These differences indicate the entrapment of mitotane within the lipid matrices. The polydispersity was reduced for the particles loaded with mitotane, mainly for the NLCs, due to the presence of the amorphous lipophilic portions, in which mitotane is preferentially solubilized. The zeta potential was -24.8 and -11.5 mV for the unloaded SLNs and NLCs, respectively, and decreased in the module to -21.10 and -8.05 mV when mitotane was entrapped in both types of nanoparticles. These values indicated that the particles are stable in the dispersions in which they are stored. Also, their negative charge is required for successful oral administration. Comparing unloaded nanoparticles to loaded one, they showed significant differences from statistical method ( $p < 0.05$ ). **Table 2** summarizes the mean diameter (Z-average) and zeta potential for unloaded

and mitotane loaded SLNs and NLCs.

**Table 2:** Mean diameter (Z-average), polydispersity index (PI), zeta potential (ZP) of unloaded and mitotane loaded SLNs and NLCs (n = 3).

Formulation	Z-average (nm)	PI	ZP (mV)
SLNs <sub>unloaded</sub>	185.20±1.39	0.14±0.01	-24.80±0.27
SLNs <sub>Mitotane</sub>	187.40±0.17	0.12±0.03	-21.10±0.55
NLCs <sub>unloaded</sub>	91.79±0.69	0.27±0.01	-11.50±0.92
NLCs <sub>Mitotane</sub>	94.50±0.26	0.22±0.01	-8.05±0.20

### 3.1.3 Entrapment efficiency and drug loading

In recent literature reports, several hydrophobic drugs have been successfully entrapped in SLNs and NLCs, e.g., camptothecin, doxorubicin, clotrimazole and ascorbyl palmitate.<sup>34-37</sup> The imperfections and amorphous regions in NLCs promote drug encapsulation as compared to SLNs.<sup>36</sup> This outcome reflects the fact that the majority of lipophilic drugs solubilize better in oils than in solid lipids. These findings were also confirmed in our results, when the SLNs shown 100% entrapment efficiency for mitotane loading of only 0.05 g of mitotane/ g of nanoparticles, while the entrapment efficiency of NLCs was 81.46% for mitotane loaded NLCs, a factor of 5-fold higher (0.25 g of mitotane/ g of nanoparticles).

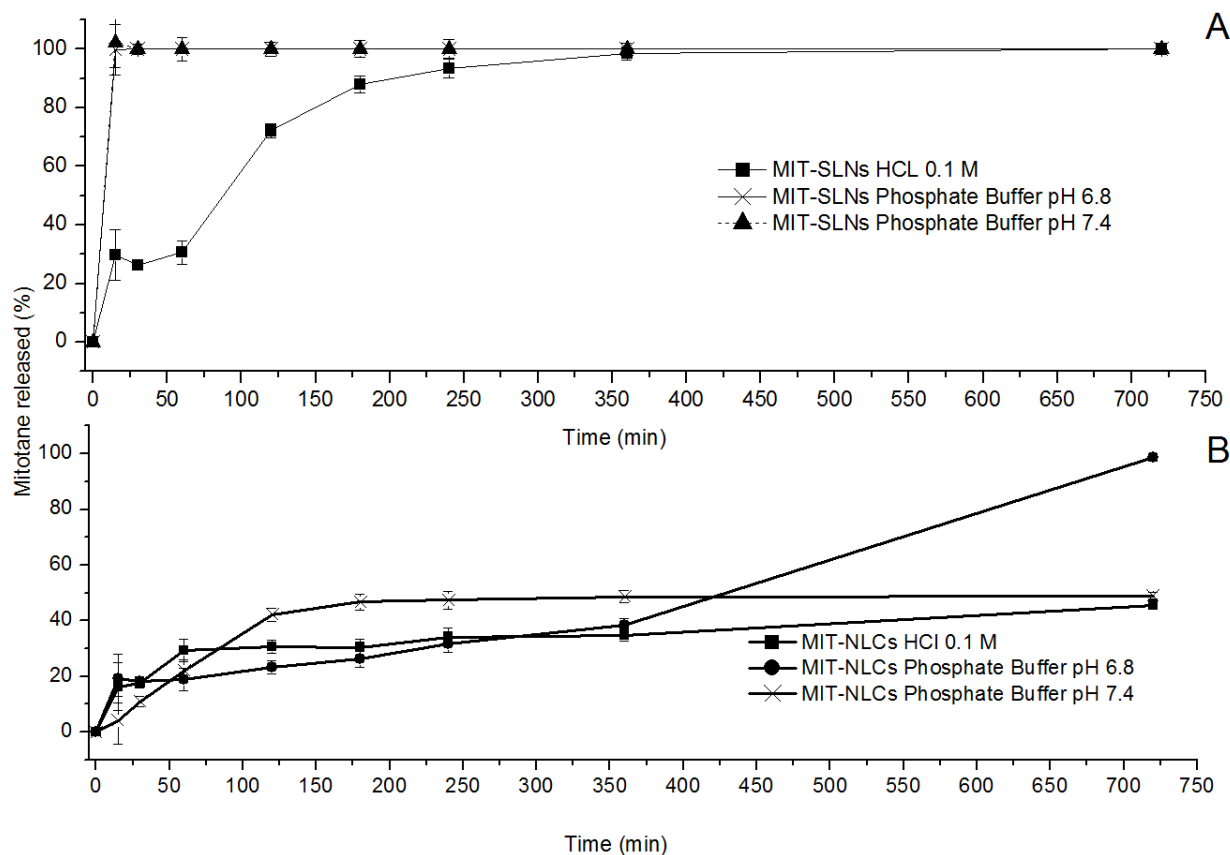
### 3.2 Mitotane retention

**Figure 2** show the *in vitro* mitotane released from SLNs and NLCs at the three different pHs. The profiles displayed a sustained release of mitotane only from NLCs during 3 h. Over this period, NLCs released 30% mitotane at pH 1.2 and 6.8 and 54% at pH 7.4. With SLNs, the release of mitotane was 88% and at pH 7.4, the total mitotane content had been released from SLNs. Cetyl palmitate and polyoxyethylene (40) stearate undergo hydrolysis at acid and basic pH values<sup>38</sup>, accounting for the faster release of mitotane from mainly SLNs caused by degradation of particles.

Extending these results to the *in vivo* behavior, we can predict a sustained release of mitotane from NLCs during three hours in the gastrointestinal tract (30%), while the other 70% was retained in the nanoparticle and could permeate the gastrointestinal tract and be released

into the blood stream. Although pharmacokinetics studies will be necessary, we can consider NLCs as a promising carrier for oral administration of mitotane.

Mitotane is stable mainly at acid pHs<sup>39</sup> at this period and these tests confirm its stability.



**Figure 2:** *In vitro* release of mitotane (MIT) from SLNs (A) and NLCs (B) in three different solubilization media: 0.1 M HCl, pH 1.2; phosphate buffer at pH 6.8 and pH 7.4. Data represent means  $\pm$  S.D., n = 6.

### 3.3 Evaluation of intestinal absorption

Table 3 presents the concentrations of mitotane determined on the serosal (permeated) and the mucosal sides of the everted gut preparation.

The data of accumulative intestinal permeation during 120 min showed that the nanoparticles were statistically different from the mitotane dissolved in olive oil, as well as the mitotane free powder ( $p < 0.05$ ).

The permeability of NLCs loaded with mitotane ( $26.12 \pm 4.20$  %) was not statically different from SLNs loading mitotane ( $23.30 \pm 1.25$  %). This slight difference might be attributed to the higher ability of the lipids of NLCs to encapsulate and solubilize mitotane as well as the smaller size of NLCs which may enhance its permeation. The excess of surfactants at the formulations also helped to enhance the permeation of mitotane from the nanoparticles.

Indeed, the absorption of mitotane depends on the balance of its solubility in the aqueous environment of the gastrointestinal lumen and its capacity to diffuse across the lipophilic apical membrane of enterocytes. Drugs must be dissolved in order to promote efficient bioavailability. Furthermore, drug solubility depends on its solid-state properties, e.g., particle size, the balance between crystalline and amorphous structures, wettability, and others factors.<sup>40</sup> A primary requirement of a lipid-based formulation is its ability to retain a poorly soluble substance in a solubilized state by enhancement of the solute-solvent interactions. Furthermore, the drug must remain soluble after mixing with endogenous solubilizers like acids or basic media, phospholipids produced naturally in the body, or after intra-luminal processing prior to absorption.

In the outer medium, mitotane free solid and this drug solubilized in olive oil floated in TC 199 buffer reducing the contact with the gut sac. The nanoparticles were dispersed in the buffer, making it possible higher amounts of mitotane soluble to be permeate.

**Table 3:** Quantification of mitotane (%) in the internal environment (the outer medium, %) and at the serosal side (permeated, %) by the everted gut sac method. Mitotane was administered in its free form, dissolved in olive oil (MIT+olive oil), and loaded in SLNs (MIT-SLNs) or NLCs (MIT-NLCs) (n=6). The average area of intestine was  $10.98 \text{ cm}^2$

	<b>% permeated</b>	<b>% outer medium</b>
Mitotane free	$7.68 \pm 3.22$	$22.83 \pm 0.61$
MIT+olive oil	$7.96 \pm 3.42$	$61.21 \pm 0.75$
MIT-SLNs	$23.30 \pm 1.25$	$48.23 \pm 3.86$
MIT-NLCs	$26.12 \pm 4.20$	$38.92 \pm 0.03$

### **3.4 Evaluation of mitotane enantiomers permeation**

Spectrophotometric analysis of the permeated solutions showed that the amount of permeated mitotane increased in the order from the free powder, oil mixture to SLNs and NLCs. The NLCs exhibited greater mitotane permeation than SLNs. Furthermore, HPLC analysis detected only the presence of the *S* enantiomer from the free powder permeation while the oil mixture and the particles allowed permeation of both enantiomers. Studies of Asp *et al.*<sup>41</sup> have shown that the presence of both enantiomers reduces cell viability and decreases cortisol and dehydroepiandrosterone secretion in the human adrenocortical cell line H295R.

### **4. Conclusion**

The lipid nanoparticles are valuable tools for oral administration of mitotane, specially NLCs prepared by high shear followed by pressure homogenization, opening new alternatives for the treatment of adrenocortical cancer.

### **Acknowledgements**

The authors acknowledge financial support obtained from the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq/Brazil), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES/Brazil) and Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP/Brazil).

### **References**

- <sup>1</sup>R. N. Gursoy, S. Benita, Self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) for improved oral delivery of lipophilic drug., *Biomed. Pharmacother.* 58, 173-182 (2004).
- <sup>2</sup>J. C. Chaumeil, Micronization: a method of improving the bioavailability of poorly soluble drugs., *Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 20, 3, 211 (1998).
- <sup>3</sup>T. Loftsson, D. Duchêne, Cyclodextrins and their pharmaceutical applications., *Int. J. Pharm.* 329, 1–11 (2007).
- <sup>4</sup>T. Vasconcelos, B. Sarmiento, and P. Costa, Solid dispersions as strategy to improve oral bioavailability of poor water soluble drugs., *Drug Discov.Today.* 12, 1068–1075 (2007).



- <sup>5</sup>Y. Takahashi, H. Kondo, T. Yasuda, T. Watanabe, S. I. Kobayashi, and S. Yokohama, Common solubilizers to estimate the Caco-2 transport of poorly water-soluble drugs., *Int. J. Pharm.* 246, 85–94 **(2002)**.
- <sup>6</sup>C. W. Pouton, C. J. H. Porter, Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: materials, methods and strategies., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 625–637 **(2008)**.
- <sup>7</sup>K. S. Soppimath, T. M. Aminabhavi, A. R. Kulkarni, and W. E. Rudzinski, Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices., *J. Control. Release* 70, 1–20 **(2001)**.
- <sup>8</sup>A. Kumari, S. K. Yadav and S. C. Yadav, Biodegradable polymeric nanoparticles based drug delivery systems., *Colloid Surf. B: Biointerfaces* 75, 1–18 **(2010)**.
- <sup>9</sup>B. E. Rabinow, Nanosuspensions in drug delivery., *Nat. Rev.* 3, 785–796 **(2004)**.
- <sup>10</sup>J. M. Gutiérrez, C. González, A. Maestro, I. Solè, C. M. Pey, and J. Nolla, Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation., *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 13, 245–251 **(2008)**.
- <sup>11</sup>R. H. Müller, C. M. Keck, Challenges and solutions for the delivery of biotech drugs – a review of drug nanocrystal technology and lipid nanoparticles., *J. Biotechnol.* 113, 151–170 **(2004)**.
- <sup>12</sup>V. Jannin, J. Musakhanian, and D. Marchaud, Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 60, 734–746 **(2008)**.
- <sup>13</sup>M. L. Chen, Lipid excipients and delivery systems for pharmaceutical development: a regulatory perspective., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 60, 768–777 **(2008)**.
- <sup>14</sup>D. J. Hauss, Oral lipid-based formulations., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 667–676 **(2007)**.
- <sup>15</sup>M. Terzolo, A. Angeli, M. Fassnacht, F. Daffara, L. Tauchmanova, P. A. Conton, R. Rossetto, L. Buci, P. Sperone, E. Grossrubatscher, G. Reimondo, E. Bollito, M. Papotti, W. Saeger, S. Hahner, A. C. Koschker, E. Arvat, B. Ambrosi, P. Loli, G. Lombardi, M. Mannelli, P. Bruzzi, F. Mantero, B. Allolio, L. Dogliotti, and A. Berruti, Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma., *N. Engl. J. Med.* 356, 2372-2380 **(2007)**.
- <sup>16</sup>G. L. Amidon, H. Lennernäs, V. P. Shah, and J. R. Crison, A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and *in vivo* bioavailability., *Pharm. Res.* 12, 413 **(1995)**.

- <sup>17</sup>M. Trotta, M. Gallarate, F. Pattarino, and S. Morel, Emulsions containing partially water-miscible solvents for the preparation of drug nanosuspensions., *J. Control. Release* 76, 119-128 **(2001)**.
- <sup>18</sup>D. Attivi, I. Ajana, A. Astier, B. Demore, S. Gibaud, Development of microemulsion of mitotane for improvement of oral bioavailability., *Drug Dev. Ind. Pharm.* 36, 421-427 **(2010)**.
- <sup>19</sup>A. M. Alam, F. I. Al-Jenoobi, and A. M. Al-Mohizea, Everted gut sac model as a tool in pharmaceutical research: limitations and applications., *J. Pharm. Pharmacol.* 64, 326–336 **(2012)**.
- <sup>20</sup>R. H. Moy, Studies of the pharmacology of o,p'-DDD in man., *J. Lab. Clin. Med.* 58, 296-304 **(1961)**.
- <sup>21</sup>A. J. Moolenaar, H. Van Slooten, A. P. Van Seters, and D. Smeenk, Blood levels of o,p'-DDD following administration in various vehicles after a single dose and during long-term treatment., *Cancer Chemother. Pharmacol.* 7, 51-54 **(1981)**.
- <sup>22</sup>H. Araya, M. Tomita, and M. Hayashi, The novel formulation design of self-emulsifying drug delivery systems (SEDDS) type O/W microemulsion III: The permeation mechanism of a poorly water soluble drug entrapped O/W microemulsion in rat isolated intestinal membrane by the using chamber method., *Drug Pharmacokinet.* 21, 45-53 **(2006)**.
- <sup>23</sup>W. Mehnert, K. Mäder, Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47, 165–196 **(2001)**.
- <sup>24</sup>J. S. Lucks, R. H. Müller, Medication vehicles made of solid lipid particles (solid lipid nanospheres – SLN). European Patent 0605497 **(1996)**.
- <sup>25</sup>H. L. Wong, R. Bendayan, A. M. Rauth, Y. Li, and X. Y. Wu, Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles., *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 491-504 **(2007)**.
- <sup>26</sup> P. Severino, E.B Souto, S.C. Pinho and M.H. Santana, Hydrophilic coating of mitotane loaded lipid nanoparticles: Preliminary studies for mucosal adhesion. *Pharm. Dev. Technol.*, **(2011)**.
- <sup>27</sup> P. Severino, M.H. Santana and E.B Souto, Optimizing SLN and NLC by 2<sup>2</sup> full factorial design: Effect of homogenization technique. *Mater. Sci. Eng. C*, 32, 1375–1379, **(2012)**.
- <sup>28</sup>Mitotane, in United States Pharmacopeia 30/ National Formulary 25, Rockville **(2007)**, Vol. 3, pp. 2674.

- <sup>29</sup>L. Cruz, E. Assumpção, S. F. Andrade, D. J. Conrado, S. S. Guterres, A. R. Pohlmann. Microencapsulation of sodium alendronate reduces drug mucosal damage in rats. *Drug Delivery*, 17, 231–237 (2010).
- <sup>30</sup>Y. Luo, D. Chen, L. Ren, X. Zhao, J. Qin. Solid lipid nanoparticles for enhancing vinpocetine's oral bioavailability *J. Control. Release*, 114, 53–59 (2006).
- <sup>31</sup>L. Barthe, J. Woodley, G. Houin, Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. *Fundament. Clin. Pharmacol.* 13, 154-168 (1999).
- <sup>32</sup>M. V. Chaud, P. Tamascia, A. C. Lima, M. O. Paganelli, M. P. D. Gremião, O. Freitas. Solid dispersions with hydrogenated castor oil increase solubility, dissolution rate and intestinal absorption of praziquantel. *Braz. J. Pharm. Sci.* 46, 473-480 (2010).
- <sup>33</sup>A. C. da Silva Jr., A. G. Salles Jr., R. F. Perna, C. R. D. Correia, and C. C. Santana, Chromatographic Separation and Purification of Mitotane Racemate in a Varicol Multicolumn Continuous Process., *Chem. Eng. Technol.* 35, 83-90 (2012).
- <sup>34</sup>Z. R. Huang, S. C. Hua, Y. L. Yang, and J. Y. Fang, Development and evaluation of lipid nanoparticles for camptothecin delivery: a comparison of solid lipid nanoparticles, nanostructured lipid carriers, and lipid emulsion., *Acta Pharm. Sinic.* 29, 1094-1102 (2008).
- <sup>35</sup>P. Ma, X. Dong, C. L. Swadley, A. Gupte, M. Leggas, H. C. Ledebur, and R. J. Mumper, Development of Idarubicin and Doxorubicin Solid Lipid Nanoparticles to Overcome Pgp-mediated Multiple Drug Resistance in Leukemia., *J. Biomed. Nanotechnol.* 5, 151–161 (2009).
- <sup>36</sup>S. Das, W. K. Ng, and R. B. Tan, Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs?, *Eur. J. Pharm. Sci.* 47, 139-151 (2012).
- <sup>37</sup>V. Teeranachaidekul, E. B. Souto, R. H. Müller, and V. B. Junyaprasert, Physicochemical characterization and *in vitro* release studies of ascorbyl palmitate-loaded semi-solid nanostructured lipid carriers (NLC gels)., *J. Microencapsul.* 25, 111-120 (2008).
- <sup>38</sup>R. C. Rowe, P. J. Sheskey, and M.E. Quin. *Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 6<sup>th</sup> Edition, Pharmaceutical Press, London (2009).
- <sup>39</sup>R. K. Kaja, K. V. Surendranath, P. Radhakrishnanand, P. V. V. Satyanarayana, A Validated Stability Indicating LC Method for Mitotane in Bulk Drugs and Pharmaceutical Dosage Forms., *Chromatographia* 69, 1407-1412 (2009).
- <sup>40</sup>E. M. Merisko-Liversidge. & G. G. Liversidge. *Drug nanoparticles: Formulating poorly*

water-soluble compounds. *Toxicol. Pathol.* 36, 43-48 **(2008)**.

<sup>41</sup>V. Asp, T. Cantillana, Å. Bergman, and I. Brandt, Chiral effects in adrenocorticolytic action of *o,p'*-DDD (mitotane) in human adrenal cells., *Xenobiotica* 40, 177–183 **(2010)**.

## **5 CONCLUSÕES**

Analisando os resultados obtidos com a produção das SLNs e NLCs para encapsulação do mitotano, pode-se concluir que ambas as nanopartículas foram estáveis e que a massa encapsulada e liberação sustentada do mitotano nas NLCs foi superior quando comparada às SLNs. Sugere-se que as NLCs sejam carreadores promissores para melhorar a biodisponibilidade oral do mitotano no tratamento do CAC.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Para futuros trabalhos na linha de SLNs e NLCs, e de encapsulação do mitotano, sugere-se os seguintes estudos:

- Caracterização do polimorfismo e cristalinidade destas formulações.
- Lipólise *in vitro* das SLNs e NLCs com as composições desenvolvidas neste trabalho.
- Farmacocinética *in vivo*.
- Outras composições lipídicas para melhorar o carregamento de mitotano.

## 7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLOLIO, B., FASSNACHT, M. Adrenocortical Carcinoma: Clinical Update. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.91, n.6, p.2027–2037, 2006.

AMIDON, G. L., LENNERNÄS, H., SHAH, V. P., CRISON, J. R. A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and *in vivo* bioavailability. **Pharmaceutical Research**, v.12, p.413, 1995.

ANTONINI, S. R. R., COLLI, L. M., FERRO, L., MERMEJO, L., CASTRO, M. Tumores adrenocorticais na criança: da abordagem clínica à avaliação molecular. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.55, n.8, p.599-606, 2011.

ATTAMA, A. A., MÜLLER-GOYMANN, C. C. Effect of beeswax modification on the lipid matrix and solid nanoparticle crystallinity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.315, n.1-3, p.189-195, 2008.

ATTIVI, DAVID. **Mise en forme et amélioration de la biodisponibilité d'un anticancéreux destiné à la voie orale : Exemple du mitotane**. Paris: Universidade Henri Poincare, 2010. Tese (Doutorado).

BARLASKAR, F. M., HAMMER, G. D. The molecular genetics of adrenocortical carcinoma. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders**, v.8, p.343-348, 2007.

BARZON, L., SCARONI, C., SONINO, N., FALLO, F., PAOLETTA, A., BOCARO, M. Risk Factors and long-term follow-up of adrenal incidentalomas. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, n. 2, p.520-526, 1999.

BATTAGLIA, L., GALLARATE, M. Lipid nanoparticles: state of art, new preparation methods and challenges in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 9, p. 497-508, 2012.

BAUDIN, E., PELLEGRITI, G., BONNAY, M., PENFORNIS, A., LAPLANCHE, A., VASSAL, G., SCHLUMBERGER, M. Impact of monitoring plasma 1,1-dichlorodiphenildichloroethane (o,p'-DDD) levels on the treatment of patients with adrenocortical carcinoma. **Cancer**, v.92, p.1385–1392, 2001.

BERRUTI, A., FASSNACHT, M., BAUDIN, E., HAMMER, G., HAAK, H., LEBoulLEUX, S., SKOGSEID, B., ALLOLIO, B., TERZOLO, M. Adjuvant therapy in patients with adrenocortical carcinoma: a position of an international panel. **Journal of Clinical Oncology**, v.28, p.401-402, 2010.

BERRUTI, A., FERRERO, A., SPERONE, P., DAFFARA, F., REIMONDO, G., PAPOTTI, M., DOGLIOTTI, L., ANGELI, A., TERZOLO, M. Emerging drugs for adrenocortical carcinoma. **Expert Opinion on Emerging Drugs**, v.13, p.497-509, 2008.

BERRUTI, A., TERZOLO, M., SPERONE, P., PIA, A., CASA, S. D., GROSS, D. J., CARNAGHI, C., CASALI, P., PORPIGLIA, F., MANTERO, F., REIMONDO, G., ANGELI, A., DOGLIOTTI, L. Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: a large prospective phase II trial. **Endocrine-Related Cancer**, v.12, p.657–666, 2005.

BORON, W. F., BOULPAEP, E. L. **Medical Physiology**. 2<sup>a</sup> Ed. Filadélfia: Saunders Elsevier, 2009.

BROWN, D. B. Concepts, considerations, and concerns on the cutting edge of radiofrequency ablation. **Journal of Vascular Interventional Radiology**, v.16, p.597–613, 2005.

BUMMER, P. M. Physical chemical considerations of lipid-based oral drug delivery – solid lipid nanoparticles. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.21, p.1-20, 2004.

BUSER, H. R., MUELLER, M. D. Isomer-selective and enantiomer selective determination of ddt and related-compounds using chiral high-resolution gas chromatography mass-



spectrometry and chiral high-performance liquid chromatography. **Analytical Chemistry**. v.67, p.2691-2698, 1995.

CAI, W., COUNSELL, R. E., DJANEGARA, T., SCHTEINGART, D. E., SINSHEIMER, J. E., WOTRING, L. L. Metabolic activation and binding of mitotane in adrenal cortex homogenates. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.84, n.2, p.134-1389, 1995.

CAMERIN GRANDO, C. R., GUIMARÃES, C.A., MERCURI, L. P., MATOS, J. R., SANTANA, M.H.A. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with racemic mitotane. **Journal of Colloid Science and Biotechnology**. In press

CARZOLA, A., MONCLOA, F. Action of 1,1-dichloro-2-p-chlorophenyl-2-o-chlorophenylethane on dog adrenal cortex. **Science**, v.136, p.47, 1962.

CHARMAN, W. N. **Lymphatic drug delivery system**. United States Patent Application Publication. Pub. No. US 20050209345A1, 2005.

CHEN, D. B., YANG, T. Z., LU, W. L., ZHANG, Q. In vitro and *in vivo* study of two types of long-circulating solid lipid nanoparticles containing paclitaxel. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.49, p.1444-1447, 2001.

CONSTANTINIDES, P.P., WASAN, K.M. Lipid formulation strategies for enhancing intestinal transport and absorption of P-glycoprotein (P-gp) substrate drugs: in vitro/*in vivo* case studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.96, p. 235–248, 2007.

DACKIW, A. P., LEE, J. E., GAGEL, R. F., EVANS, D. B. Adrenal cortical carcinoma. **World Journal of Surgery**, v.25, p.914–926, 2001.

DAFFARA, F., FRANCIA, S., REIMONDO, G., ZAGGIA, B., AROASIO, E., PORPIGLIA, F., VOLANTE, M., TERMINE, A., DI CARLO, F., DOGLIOTTI, L., ANGELI, A., BERRUTI, A.,

TERZOLO, M. Prospective evaluation of mitotane toxicity in adrenocortical cancer patients treated adjuvantly. **Endocrine-Related Cancer**, v.15, p.1043–1053, 2008.

DAS, S., CHAUDHURY, A. Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v.12, n.1, p.62–76, 2010.

DE FRANCIA, S., PIRRO, E., ZAPPIA, F., DE MARTINO, F., SPRIO, A. E., DAFFARA, F., TERZOLO, M., BERRUTI, A., DI CARLO, F., GHEZZO, F. A new simple hplc method for measuring mitotane and its two principal metabolites tests in animals and mitotane-treated patients. **Journal of Chromatography B Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v.837, n.1-2, 69-75, 2006.

ENSAT. IN: European Network for the Study of Adrenal Tumors. Disponível em: <<http://www.ensat.org/clinicaltrials.htm>>. Acesso em: 26/10/2012.

FASSNACHT, M., KENN, W., ALLOLIO, B. Adrenal tumors: how to establish malignancy? **Journal of Endocrinological Investigation**, v.27, p.387–399, 2004.

FINNEGAN, J. K., HAAG, H. B., LARRSON, P. S. Tissue distribution and elimination of DDD and DDT following oral administration to dogs and rats. **Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine**, v.72, n.2, p.357-360, 1949.

FLEISHER, D., LI, C., ZHOU, Y., PAO, L.H., KARIM, A. Drug, meal and formulation interactions influencing drug absorption after oral administration—clinical implications. **Clinical Pharmacokinetics**, v.36, p. 233–254, 1999.

FREITAS, C., MÜLLER, R. H. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticles (SLN<sup>TM</sup>) dispersions. **International Journal of Pharmaceutics**, v.168, p.221-229, 1998.

FRICKER, G., KROMP, T., WENDEL, A., BLUME, A., ZIRKEL, J., REBMANN, H., SETZER, C., QUINKERT, R. O., MARTIN, F., MÜLLER-GOYMANN, C. Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery. **Pharmaceutical Research**, v.27, p.1469–1486, 2010.

GASCO, M. R. Lipid nanoparticles: perspectives and challenges. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v.59, n.6, p.377-378, 2007.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. H. **Tratado de fisiologia médica**. 10<sup>a</sup> Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002.

HANNA, A. M., PHAM, T. H., ASKEGARD-GIESMANN, J. R., GRAMS, J. M., IGBAL, C. W. STALVO, P., MOIR, C. R. Outcome of adrenocortical tumors in children. **Journal of Pediatric Surgery**, n.43, p.843-849, 2008.

HERMANSSON, V., CANTILLANA, T., HOVANDER, L., BERGMAN, A., LJUNGVALL, K., MAGNUSSON, U., TORNEKE, K., BRANDT, I. Pharmacokinetics of the adrenocorticolytic compounds 3-methylsulphonyl-dde and o,p'-ddd (mitotane) in minipigs. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v.61, n.2, p.267-274, 2008.

HEURTAULT, B., SAULNIER, P., PECH, B., PROUST, J. E.; BENOIT, J. P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v.24, p.4283–4300, 2003.

HOLMBERG, K., JONSSON, B., KROMBERG, B., LINDMAN, B. **Surfactants and Polymers in Aqueous Solution**. 2<sup>a</sup> Ed. Inglaterra: John Wiley & Sons Ltda, 2003, 562 p.

HU, F.Q., JIANG, S. P., DU, Y.Z., YUAN, H., YE, Y. Q., ZENG, S. Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. **Colloids Surfaces B: Biointerfaces**, v.45, p.167–173, 2005.

HU, F.Q., JIANG, S. P., DU, Y.Z., YUAN, H., YE, Y. Q., ZENG, S. Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v.314, p.83–89, 2006.

HUTCHISON, T. A.; SHAHAN, D.R. **DRUGDEX System**. Eletronic version, v. 120, MICROMEDEX, Inc. Greenwood Village, Colorado, 2004.

ICARD, P., GOUDET, P., CHARPENAY, C., ANDREASSIAN, B., CARNAILLE, B., CHAPUIS, Y., COUGARD, P., HENRY, J. F., PROYE, C. Adrenocortical carcinomas: surgical trends and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons Study Group. **World Journal of Surgery**, v.25, p.891-897, 2001.

ICARD, P., LOUVEL, A., CHAPUIS, Y. Survival rates and prognostic factors in adrenocortical carcinoma. **World Journal of Surgery**, v.16, p.753-758, 1992.

JENNING, V., THÜNEMANN, A.F., GOHLA, S.H. Characterization of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based and binary mixtures of liquid and solid lipids. **International Journal of Pharmaceutics**, v.199, n.2, p.167-177, 2000.

KAUR, I. P., BHANDARI, R., BHANDARI, S., KAKKAR, V. Potential of solid lipid nanoparticles in brain targeting. **Journal of Controlled Release**, v.127, p.97-109, 2008.

KHAN, T. S., IMAM, H., JUHLIN, C., SKOGSEID, B., GRONDAL, S., TIBBLIN, S., WILANDER, E., OBERG, K., ERIKSSON, B. Streptozocin and o,p'-DDD in the treatment of adrenocortical cancer patients: long-term survival in its adjuvant use. **Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology**, v.11, p.1281–1287, 2000.

KITAMURA, S., SHIMIZU, Y., SHIRAGA, Y., YOSHIDA, M., SUGIHARA, K., OHTA, S. Reductive metabolism of p,p'-ddt and o,p'-ddd bay rat liver cytochrome p 450. **Drug Metabolism and Disposition**, v.30, n.2, p.113, 2002.

KOPFT, D., GORETZKI, P. E., HENDRIK, L. Clinical Management of malignant adrenal tumors. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, n.127, p.143-455, 2001.

KOKKONA, M., KALLINTERI, P., FATOUROS, D., ANTIMISIARIS, S. G. Stability of SUV liposomes in the presence of cholate salts and pancreatic lipases: effect of lipid composition. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.9, n.3, p.242-252, 2000.

KOZIARA, J. M., WHISMAN, T. R., TSENG, M. T., MUMPER, R. J. *In-vivo* efficacy of novel paclitaxel nanoparticles in paclitaxel-resistant human colorectal tumors. **Journal of Controlled Release**, v.112, n.3, p.312-319, 2006.

KRISTL, J., VOLK, B., AHLIN, P., GOMBAC, K., SENTJURC, M. Interactions of solid lipid nanoparticles with model membranes and leukocytes studied by EPR. **International Journal of Pharmaceutics**, v.256, p.133–140, 2003.

LACY, C. F., ARMSTRONG, L. L., GOLDMAN, M. P., LANCE, L. L. **Medicamentos Lexi-Comp Manola: uma fonte abrangente para médicos e profissionais da saúde**. Barueri: Manole, 2009, 933 p.

LATRONICO, A. C. & PRANDO, A. Tumores Adrenocorticais. *Projeto Diretrizes da Sociedade brasileira de endocrinologia e metabologia*, 2006, 3-8 p.

LIPPACHER, A., MÜLLER, R.H., MADER, K. Semisolid SLN dispersion for topical application: influence of formulation and production parameters on viscoelastic properties. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.53, n.2, p.155-160, 2002.

LÖBENBERG, R., AMIDON, G. L. Modern bioavailability, bioequivalence and biopharmaceutics classification system. New scientific approaches to international regulatory standards. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.50, p. 3–12, 2000.

LUCKS, J. S., MÜLLER, R. H. **Medication vehicles made of solid lipid particles (solid lipid Nanospheres SLN)**. European Patent n. 000605497, 1991.

MANJUNATH, K., REDDY, J. S., VENKATESWARLU, V. Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems. **Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology**, v.27,p.127-144, 2005.

MARCATO, P. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.VI, n.2, p.1-37, 2009.

MAYER, S. K., OLIGNY, L. L., DEAL, C., YAZBECK, S., GAGNÉ, N., BLANCHARD, H. Childhood adrenocortical tumors: Case series and reevaluation of prognosis—A 24-year experience. **Journal of Pediatric Surgery**, v.32, n.6, p.911-915, 1997.

MENAA, F, MENAA, B. Development of Mitotane Lipid Nanocarriers and Enantiomers: Two-in-One Solution to Efficiently Treat Adreno-Cortical Carcinoma. **Current Medicinal Chemistry**, v.19, p.5854-5862, 2012.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.47, p.165–196, 2001.

MENDOZA, A. E. H.; CAMPANERO, M. A.; MOLLINEDO, F.; BLANCO-PRIETO, M. J. Lipid nanomedicines for anticancer drug therapy. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.5, p.323-343, 2009.

MICHALKIEWICZ, E.; SANDRINI, R.; FIGUEIREDO, B.; MIRANDA, E. C.; CARAN, E.; OLIVEIRA-FILHO, A. G.; MARQUES, R.; PIANOVSKI, M. A.; LACERDA, L.; CRISTOFANI, L. M.; JENKINS, J.; RODRIGUEZ-GALINDO, C.; RIBEIRO, R. C. Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors: a report from the International Pediatric Adrenocortical Tumor Registry. **Journal of Clinical Oncology**, v.22, p.838–845, 2004.

MITOTANE. IN: CDC. CHEMICAL AND PHYSICAL INFORMATION of DDT, DDE and DDD. Disponível em: <<http://www.atsdr.cdc.gov/ToxProfiles/tp35-c4.pdf>>. Acesso em: 26/01/2012.

MITOTANE. IN: NLM UNITED STATES NACIONAL LIBRARY OF MEDICINE. Disponível em: <[http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/ProxyServlet?objectHandle=Search&actionHandle=getAll3DMViewFiles&nextPage=jsp%2Fcommon%2FChemFull.jsp%3FcalledFrom%3Dlite&chemid=0000053190&formatType=\\_3D](http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemidplus/ProxyServlet?objectHandle=Search&actionHandle=getAll3DMViewFiles&nextPage=jsp%2Fcommon%2FChemFull.jsp%3FcalledFrom%3Dlite&chemid=0000053190&formatType=_3D)>. Acesso em: 29/01/2012.

MOOLENAAR, A. J., VAN SLOOTEN, H., VAN SETERS, A. P., SMEENK, D. Blood levels of o,p'- ddd following administration in various vehicles after a single dose and during long-term treatment. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v.7, n.1, p.51-54, 1981.

MOY, R. H. Studies of the pharmacology of o,p'DDD in man. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v.58, p.296-304, 1961.

MÜLLER, R. H., MEHNERT, W., LUCKS, J. S., SCHWARZ, C., ZUR MÜHLEN, A., WEYHERS, H., FREITAS, C., RÜHL, D. Solid lipid nanoparticles (SLN) – an alternative colloid carrier system for controlled drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.41, p.62-69, 1995.

MÜLLER, R. H.; PETERSEN, R. D., HOMMOSS, A., PARDEIKE, J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, n.6, p.522–530, 2007.

MÜLLER, R. H., RADTKE, M., WISSING, A. S. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.54, p.S131–S155, 2002.

NG, L., LIBERTINO, J. M. Adrenocortical carcinoma: diagnosis, evaluation and treatment. **Journal of Urology**, v.169, p.5-11, 2003.

PALIWAL, R., RAI, S., VAIDYA, B., KHATRI, K., GOYAL, A. K., MISHRA, N., MEHTA, A., VYAS, S. P. Effect of lipid core material on characteristics of solid lipid nanoparticles designed for oral lymphatic delivery. **Nanomedicine**, v.5, p.184–191, 2009.

PANDEY, R., SHARMA, S., KHULLER, G. K. Oral solid lipid nanoparticle-based antitubercular chemotherapy. **Tuberculosis**. v.85, n.3-6, p.415–420, 2005.

PARDEIKE, J., HOMMOSS, A., MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. **International Journal of Pharmaceutics**, v.366, p. 170-184, 2009.

PEREIRA, A. G. **Mecanismos moleculares implicados na fisiopatogênese do tumor de córtex adrenal de crianças**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2007. Tese (Doutorado).

PEREZ-TOMAS, R. Multidrug Resistance: Retrospect and Prospects in Anti-Cancer Drug Treatment. **Current Medicinal Chemistry**, v.13, n.16, p1859-1876, 2006.

PHAN, A. T. Adrenal cortical carcinoma – Review of current knowledge and treatment practices. **Hematology – Oncology Clinics of North America**, v.21, p.489, 2007.

PIANOVSKI, M. A., MALUF, E. M., DE CARVALHO, D. S., RIBEIRO, R. C.; RODRIGUEZ-GALINDO, C., BOFFETTA, P., ZANCANELLA, P., FIGUEIREDO, B. C. Mortality rate of adrenocortical tumors in children under 15 years of age in Curitiba, Brazil. **Pediatric Blood & Cancer**, v.47, p.56-60, 2006.

POMMIER, R. F., BRENNAN, M. F. An eleven-year experience with adrenocortical carcinoma. **Surgery**, v.6, n.112, p.963-71, 1992.



PORTER, C. J. H., TREVASKIS, N. L., CHARMAN, W. N. Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. **Nature Reviews**, v.6, p.231-248, 2007.

POUTON, C. W., PORTER, C. J. H. Formulation of lipid-based delivery systems for oral administration: Materials, methods and strategies. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.60, p.625–637, 2008.

PUGLIA, C., BONINA, F. Lipid nanoparticles as novel delivery systems for cosmetics and dermal pharmaceuticals. **Expert Opinion**, v.9, n.4, p. 429-441, 2012.

RADOMSKA-SOUKHAREV, A. Stability of lipid excipients in solid lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, p.411–418, 2007.

RANG, H. P., DALE, M. M., RITTER, J. M., MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

REIF, V. D., SINSHEIMER, J. E., WARD, J. C., SCHTEINGART, D. E. Aromatic hydroxylation and alkyl oxidation in metabolism of mitotane (o,p'-DDD) in humans. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.63, n.11, 1974.

RHIM, H., DODD, G.D., CHINTAPALLI, K.N., WOOD, B.J., DUPUY, D.E., HVIKZA, J.L., SEWELL, P.E., GOLDBERG, S.N. Radiofrequency thermal ablation of abdominal tumors: lessons learned from complications. **Radiographics**, v.24, p.41–52, 2004.

RIBEIRO, R. C., SANDRINI, F., FIGUEIREDO, B., ZAMBETTI, G. P., MICHALKIEWICZ, E., LAFFERTY, A. R., DELACERDA. L., RABIN, M., RABIN, M., CADWELL, C., SAMPAIO, G., CAT, I., STRATAKIS, C. A., SANDRINI, R. An inherited p 53 mutation that contributes in a tissue-specific manner to pediatric adrenal cortical carcinoma. IN: **Proceedings of the National Academy Sciences of the United States of America**, 2001, v.98, n.16, p. 9330-9335.

ROGER, E., LAGARCE, F., BENOIT, J. P. The gastrointestinal stability of lipid nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**. v.379, p.260-265, 2009.

ROGER, E., LAGARCE, F., GARCION, E., BENOIT, J. P. Biopharmaceutical parameters to consider in order to alter the fate of nanocarriers after oral delivery. **Nanomedicine**, v.5, n.2, p.287-306, 2010.

SCHAFFAZICK, S. R., POHLMANN, A. R., DALLA-COSTA, T., GUTERRES, S. S. Freeze-drying polymeric colloidal suspensions: nanocapsules, nanospheres and nanodispersion. A comparative study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.56, n.3, p.501-505, 2003.

SCHTEINGART, D. E. Adjuvant Mitotane Therapy of Adrenal Cancer – Use and Controversy. **The New England Journal of Medicine**, v.356, n.23, p.2415-2418, 2007.

SCHTEINGART, D. E., DOHERTY, G. M., GAUGER, P. G., GIORDANO, T. J., HAMMER, G. D., KOROBKIN, M., WORDEN, F. P. Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference. **Endocrine-Related Cancer**, v.12, p.667–680, 2005.

SCHULICK, R. D., BRENNAN, M. F. Long-term survival after complete resection and repeat resection in patients with adrenocortical carcinoma. **Annals of Surgical Oncology**, n.6, v.8, 719-726, 1999.

SERPE, L., CATALANO, M. G., CAVALLI, R., UGAZIO, E., BOSCO, O., CANAPARO, R., MUNTONI, E., FRAIRIA, R., GASCO, M. R., EANDI, M., ZARA, G. P. Cytotoxicity of anticancer drugs incorporated in solid lipid nanoparticles on HT-29 colorectal cancer cell line. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.58, p.673-680, 2004.

SEVERINO, P. **Desenvolvimento e Caracterização Físico-Química de Nanopartículas Lipídicas Sólidas Para Encapsulação de Proteínas**. Campinas: Faculdade de Engenharia Química, Universidade de Campinas, 2012. 202 p. Tese (Doutorado)

SEVERINO, P., ANDREANI, T. MACEDO, A. S., FANGUEIRO, J. F. SANTANA, M.H.A., SILVA, A.M., SOUTO, E.B. Current State-of-Art and New Trends on Lipid Nanoparticles (SLN and NLC) for Oral Drug Delivery. **Journal of Drug Delivery**, v.12, p.10, 2012a

SEVERINO, P., SANTANA, M. H. A., SOUTO, E. B. Optimizing SLN and NLC by 2<sup>2</sup> Full Factorial Design: Effect of Homogenization Technique. **Materials Science and Engineering: C**, v.32, n.6, p.1375–1379, 2012b.

SEVERINO, P., SOUTO, E. B., PINHO, S., SANTANA, M. H. A. Hydrophilic coating of mitotane-loaded lipid nanoparticles: Preliminary studies for mucosal adhesion. **Pharmaceutical Development Technology**, 2011, doi:10.3109/10837450.2011.614250.

SHERWOOD, L. **Human Physiology From Cells to Systems**. 7<sup>a</sup> Ed. Canadá: Brooks/Cole, Cengage Learning, 2010, 119, 698, 705-707 p.

SOON, P. S., MCDONALD, K. L., ROBINSON, B. G., SIDHU, S. B. Molecular markers and the pathogenesis of adrenocortical cancer. **Oncologist**, v.13, p.548- 561, 2008.

SOUTO, E. B. **SLN and NLC for topical delivery of antifungals**. Berlin: Universidade Livre de Berlin, 2005. 25 - 46 p. Tese (Doutorado).

SOUTO, E. B., ALMEIDA, A. J., MÜLLER, R. H. Lipid nanoparticles (SLN<sup>®</sup>, NLC<sup>®</sup>) for cutaneous drug delivery: structure, protection and skin effects. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.3, p.317–331, 2007.

SOUTO, E. B., MÜLLER, R. H. Cosmetic features and applications of lipid nanoparticles (SLN<sup>®</sup>, NLC<sup>®</sup>). **International Journal of Cosmetic Science**. v.30, n.3, p.157–165, 2008.

SOUTO, E. B., MÜLLER, R. H. Lipid Nanoparticles: Effect on Bioavailability and Pharmacokinetic Changes. **Handbook of Experimental Pharmacology**. v.197, p.115-141, 2010.

SOUTO, E. B., WISSING, S. A., BARBOSA, C. M., MÜLLER, R. H. Comparative study between the viscoelastic behaviors of different lipid nanoparticle formulations. **Journal of Cosmetic Science**, v.55, p.463–471, 2004.

SOUTO, E. B., WISSING, S. A., BARBOSA, C. M., MÜLLER, R. H. Development of a controlled release formulation based on SLN and NLC for topical clotrimazole delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v.278, p.71–77, 2004.

STORPIRTIS, S., GONÇALVES, J. E., CHIANN, C., GAI, M.N. **Biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011.

TEERANACHAIDEEKUL, V., BOONME, P., SOUTO, E. B., MÜLLER, R. H., JUNYAPRASERT, V. B. Influence of oil content on physicochemical properties and skin distribution of Nile red-loaded NLC. **Journal of Controlled Release**, v.128, n.2, p.134-141, 2008.

TERZOLO, M., ANGELI, A., FASSNACHT, M., DAFFARA, F., TAUCHMANOVA, L., CONTON, P.A., ROSSETTO, R., BUCI, L., SPERONE, P., GROSSRUBATSCHER, E., REIMONDO, G., BOLLITO, E., PAPOTTI, M., SAEGER, W., HAHNER, S., KOSCHKER, A.C., ARVAT, E., AMBROSI, B., LOLI, P., LOMBARDI, G., MANNELLI, M., BRUZZI, P., MANTERO, F., ALLOLIO, B., DOGLIOTTI, L., BERRUTI, A. Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma. **New England Journal of Medicine**, v.356, p.2372-2380, 2007.

TERZOLO, M., PIA, A., BERRUTI, A., OSELLA, G., ALI, A., CARBONE, V., TESTA, E., DOGLIOTTI, L., ANGELI, A. Low-dose monitored mitotane treatment achieves the therapeutic

range with manageable side effects in patients with adrenocortical cancer. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.85, n.6, p.2234–2238, 2000.

TULLNER, W. Adrenal atrophy effects in animals. IN: **Proceedings of the chemotherapy conference on ortho para´DDD**. 1970. Cancer Therapy Evaluation Branch, 6-16.

VIGHI, E., RUOZI, B., MONTANARI, M., BATTINI, R., LEO, E. pDNA condensation capacity and in vitro gene delivery properties of cationic solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.389, p.254–261, 2010.

WATSON, A. D., RIJNBERK, A., MOOLENAAR, A. J. Systemic availability of o,p'-DDD in normal dogs, fasted and fed, and in dogs with hyperadrenocorticism. **Research in Veterinary Science**, v.43, n.2, p.160-165, 1987.

WEDERMEYER, G. Dechlorination of 1,1,1-trichloro-2,2-bis (p-chlorophenyl)ethane by aerobacter aerogenes. **Applied and Environmental Microbiology**, v.15, n.3, p.569-574, 1967.

WEST, A. N., NEALE, G. A., POUNDS, S., FIGUEREDO, B. C., RODRIGUEZ GALINDO, C., PIANOVSKI, M. A., OLIVEIRA FILHO, A. G., MALKIN, D., LALLI, E., RIBEIRO, R., ZAMBETTI, G. P. Gene expression profiling of childhood adrenocortical tumors. **Cancer Research**, v.67, n.2, p.600-608, 2007.

WESTESEN, K., SIEKMANN, B. Investigation of the gel formation of phospholipid-stabilized solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.151, p.35–45, 1997.

WESTESEN, K., BUNJES, H. Do nanoparticles prepared from lipids solid at room temperature always possess a solid lipid matrix? **International Journal of Pharmaceutics**, v.115, p.129-131, 1995.

WIECHERS, J.W., SOUTO, E.B. Delivering Actives via Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers: Part I. *Cosmetics & Toiletries*, out. 2010. Disponível em: <<http://www.cosmeticsandtoiletries.com/formulating/ingredient/delivery/104011199.html>>.

Acesso em: 14/01/2011.

WISSING, S.A., MÜLLER, R.H. The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity *in vivo* study. **European Journal of Pharmaceutical Biopharmaceutics**, v.56, n.1, p.67–72, 2003.

WISSING, S. A., MÜLLER, R. H., MANTHEL, L., MAYER, C. Structural characterization of Q10-loaded solid lipid nanoparticles by NMR spectroscopy. **Pharmaceutical Research**, v.21, n.3, p.400–405, 2004.

WONG, H. L., BENDAYAN, R., RAUTH, A. M., LI, Y., WU, X. Y. Chemotherapy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, p.491-504, 2007 a.

WONG, H. L., WU, X. Y., BENDAYAN, R., LI, Y., RAUTH, M. A. **Nanotechnology for Cancer Therapy** . Boston, CRC Press, 2007b, 741-776 p.

WOOD, B. J., ABRAHAM, J., HVIKZA, J. L., ALEXANDER, H. R., FOJO, T. Radiofrequency ablation of adrenal tumors and adrenocortical carcinoma metastases. **Cancer**, v.97, p.554–560, 2003.

WU, C.Y., BENET, L. Z. Predicting drug disposition via application of BCS: Transport/absorption/elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system, **Pharmaceutical Resesearch**, v. 22, p. 11–23, 2005.

YÁÑEZ, J. A., WANG, S. W. J., KNEMEYER, I. W., WIRTH, M. A., ALTON, K. B. Intestinal lymphatic transport for drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.63, p.923–942, 2011.

YANG, S. C., ZHU, J. B. Preparation and characterization of camptothecin solid lipid nanoparticles. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.28, p.265-274, 2002.

YANG, S., ZHU, J., LU, Y., LIANG, B., YANG, C. Body distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain. **Journal of Controlled Release**, v.59, n.3, p.299-307, 1999.

YU, L. X., AMIDON, G. L., POLLI, J. E., ZHAO, H., MEHTA, M. U., CORNNER, D. P., SHAH, V. P., LESKO, L. J., CHEN, M. L., LEE, V. H. L., HUSSAN, A. S. Biopharmaceutics Classification System: The Scientific Basis for Biowaiver Extensions. **Pharmaceutical Research**, v.19, n.7, p.921-925, 2002.

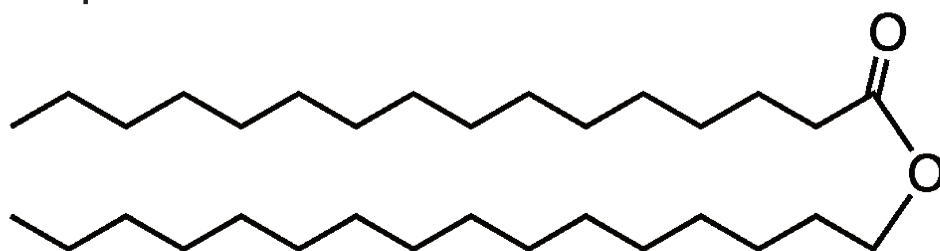
ZANCANELLA, P. **Mitotano: Metabolismo enantioselectivo, encapsulação em lipossomas e avaliação in vitro e in vivo**. Curitiba: Faculdade de Química, Universidade Federal do Paraná, 2008. Tese (Doutorado).

ZHANG, N., PING, Q., HUANG, G., XU, W., CHENG, Y., HAN, X. Lectin-modified solid lipid nanoparticles as carriers for oral administration of insulin. **International Journal of Pharmaceutics**, v.327, p.153–159, 2006.

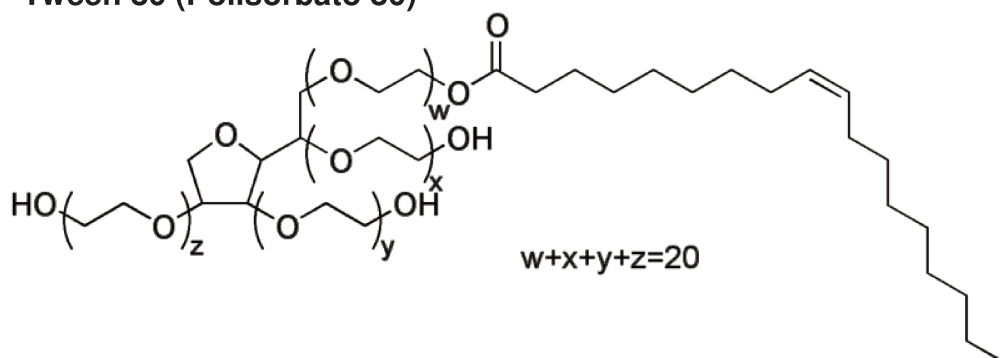
## 8 ANEXOS

### ANEXO I: ESTRUTURAS MOLECULARES DOS COMPONENTES DAS SLNS

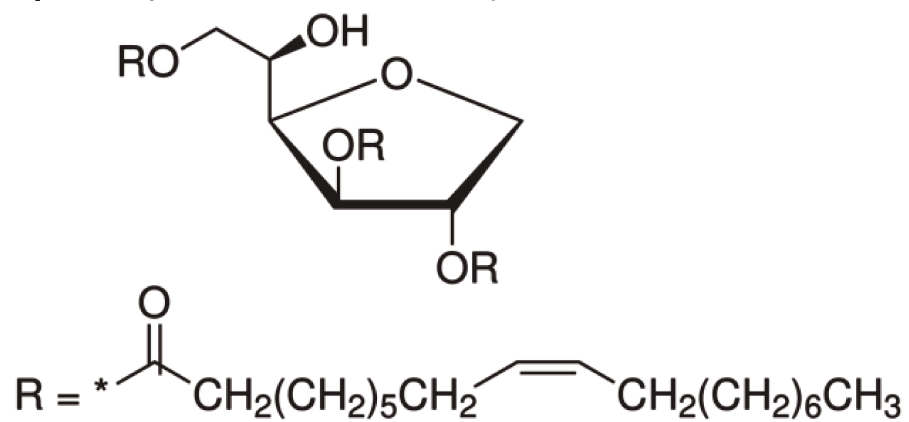
#### -Cetilpalmitato



#### -Tween 80 (Polisorbato 80)



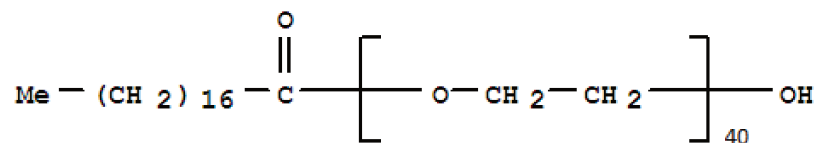
#### -Span 85 (Trioleato de sorbitano)



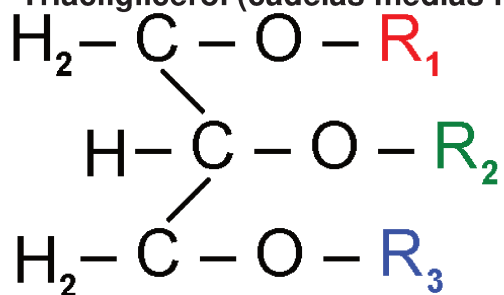


## ANEXO II: ESTRUTURA MOLECULAR DOS COMPONENTES DA FORMULAÇÃO DE NLCS

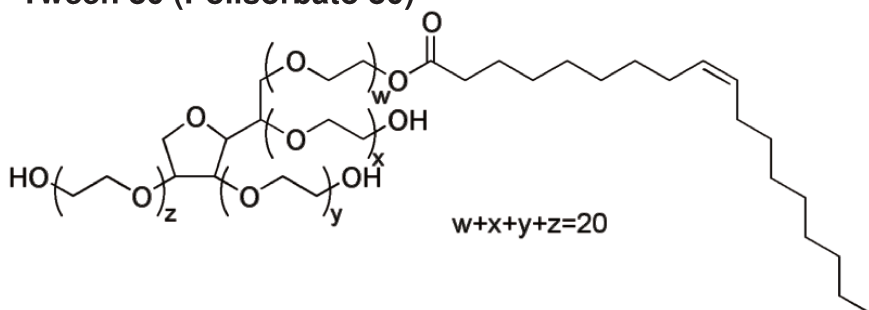
-Esterato de Polioxietileno (40)



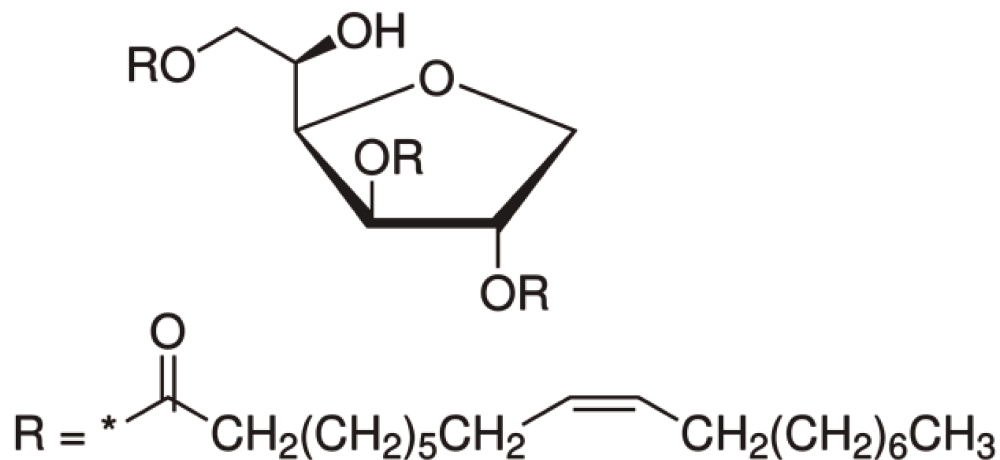
-Triacilglicerol (cadeias médias R=C8-C10)



-Tween 80 (Polisorbato 80)



-Span 85 (Trioleato de sorbitano)



## ANEXO III: CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO CEUA/UFSCAR



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA  
*Comissão de Ética no Uso de Animais*  
Via Washington Luís, km. 235 - Caixa Postal 676  
Fones: (016) 3351.8025 / 3351.9679  
Fax: (016) 3351.8025  
CEP 13560-970 - São Carlos - SP - Brasil  
[ceua@ufscar.br](mailto:ceua@ufscar.br) - [www.propq.ufscar.br](http://www.propq.ufscar.br)

---

### Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais n° 013/2012

Protocolo n°. 009/2012

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos - CEUA/UFSCar **APROVOU** o projeto de pesquisa intitulado *"Incorporação, estabilidade e absorção intestinal ex vivo do mitotano racêmico em nanopartículas lipídicas sólidas"*, submetido pela pesquisadora *Carolina Ribeiro Camerin*.

São Carlos, 31 de maio de 2012.

  
Prof. Dra. Luciana Thie Seki Dias  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais