



**UNICAMP**

CARLA AIOLFI GUIMARÃES

**CARACTERIZAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO  
MITOTANO E DA FORMA ENANTIOMÉRICA (S)-(-)-  
O,P-DDD ENCAPSULADA EM CARREADORES  
LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS**

**Campinas  
2013**





UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA QUÍMICA  
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE MATERIAS E BIOPROCESSOS

CARLA AIOLFI GUIMARÃES

**CARACTERIZAÇÃO DOS ENANTIÔMEROS DO  
MITOTANO E DA FORMA ENANTIOMÉRICA (S)-(-)-  
O,P-DDD ENCAPSULADA EM CARREADORES  
LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS**

Orientador: Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana

Co-Orientadora: Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós  
Graduação em Engenharia Química da Faculdade de  
Engenharia Química da Universidade Estadual de Campinas  
para a obtenção do título de Doutor em Engenharia Química

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE  
DEFENDIDA PELA ALUNA CARLA AIOLFI GUIMARÃES  
E ORIENTADA PELO PROF. DR. CESAR COSTAPINTO SANTANA

Assinatura do orientador

Prof. Dr. Cesar C. Santana

**Campinas  
2013**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Área de Engenharia e Arquitetura  
Rose Meire da Silva - CRB 8/5974

G947c Guimaráes, Carla Aiolfi, 1981-  
Caracterização dos enantiômeros do mitotano e da forma enantiomérica (s)-(-)-o,p'-DDD encapsulada em carreadores lipídicos nanoestruturados / Carla Aiolfi Guimaráes. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Cesar Costapinto Santana.  
Coorientador: Maria Helena Andrade Santana.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia Química.

1. Agentes antineoplásicos. 2. Antineoplásico. 3. Enantiômeros. 4. Nanopartículas. I. Santana, Cesar Costapinto, 1948-. II. Santana, Maria Helena Andrade, 1951-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Characterization of mitotane enantiomers and enantiomeric form (s)-(-)-o,p'-DDD encapsulated in nanostructured lipid carriers

**Palavras-chave em inglês:**

Antineoplastic agents  
Antineoplastic  
Enantiomers  
Nanoparticles

**Área de concentração:** Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos

**Títuloção:** Doutora em Engenharia Química

**Banca examinadora:**

Cesar Costapinto Santana [Orientador]  
Vinicius de Veredas  
Marco Vinicius Chaud  
Lucildes Pita Mercuri  
Bonald Cavalcante de figueiredo

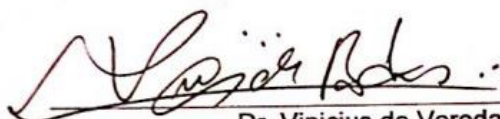
**Data de defesa:** 09-09-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Engenharia Química

Tese de Doutorado defendida por Carla Aiolfi Guimarães e aprovada em nove de Setembro de 2013 pela banca examinadora constituída pelos doutores:



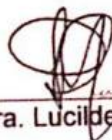
Prof. Dr. – Cesar Costapinto Santana (Orientador)



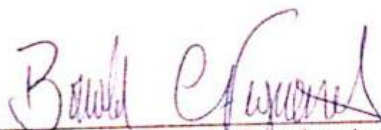
Dr. Vinicius de Veredas



Prof. Dr. Marco Vinicius Chaud



Profa. Dra. Lucildes Pita Mercuri



Prof. Dr. Bonald Cavalcante de Figueiredo



## RESUMO

O carcinoma adrenocortical (CAC) é uma neoplasia rara e maligna que surge no córtex das glândulas adrenais. A terapia mais utilizada é o tratamento com mitotano, um derivado do inseticida, que possui uma baixa solubilidade aquosa e permeabilidade intestinal. O mitotano é administrado como uma mistura racêmica composto de dois enantiômeros: R-(+) - *o,p'*-DDD e S-(-) - *o,p'*-DDD. Os carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs) são utilizados como suporte para a encapsulação de agentes ativos lipofílicos como é o caso do mitotano, ajudando a aumentar sua solubilidade. O objetivo deste trabalho foi caracterizar os enantiômeros e preparar NLCs encapsulando a forma enantiomérica (S) - (-) - *o,p'*-DDD, pela técnica de homogeneização de alta pressão a quente, caracterizar a formulação, estudar sua estabilidade, avaliar a permeação intestinal *ex vivo* pelo modelo do saco intestinal invertido e a retenção do enantiômero (S) - (-) - *o,p'*-DDD nas NLCs expostas em diferentes valores de pH *in vitro*. Foi utilizado NLCs contendo mitotano racêmico como controle. NLCs encapsulando (S) - (-) - *o,p'*-DDD tiveram diâmetro médio 95,36 nm, polidispersidade 0,288 e potencial zeta baixo -20,9 mV com uma eficiência de encapsulação alta. Os resultados de absorção intestinal *ex vivo* indicaram que a absorção das NLCs encapsulando o (S) - (-) - *o,p'*-DDD foi maior em comparação com o (S) - (-) - *o,p'*-DDD na forma livre e com a NLCs encapsulando o mitotano racêmico. No entanto, o teste com pH mostrou que cerca de 70% do (S) - (-) - *o,p'*-DDD encapsulado ficou retido nas NLCs durante 3h. Estes resultados indicaram que a formulação de NLCs produzida foi eficiente como carreador da forma S(-)-*o,p'*-DDD, podendo ser explorada como uma possível formulação alternativa para o tratamento do CAC.





## ABSTRACT

The adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare malignant neoplasm that appears in the adrenal cortex. The main pharmacological choice is mitotane, a insecticide derivative, which has low aqueous solubility and low intestinal permeability. Mitotane is administered as a racemic mixture composed of two enantiomers R-(+) - *o*, *p'*-DDD and S-(-) - *o*, *p'*-DDD. The nanostructured lipid carriers (NLCs) are used as support for the encapsulation of lipophilic actives such as mitotane to improve their solubility. The aim of this work was to characterize the enantiomers and prepare the NLCs encapsulating the enantiomeric form (S) - (-) - *o*, *p'*-DDD by high pressure homogenization method and than characterize, study the stability, evaluate the *ex vivo* intestinal permeation by gut sac model and the retention of enantiomer (S) - (-) - *o*, *p'*-DDD in the NLCs in different pH values *in vitro*. NLCs encapsulating racemic mitotane was used as a control. The mean diameter and polydispersity index of NLCs encapsulating (S) - (-) - *o*, *p'*-DDD was 95.36 nm and 0.288 with a low zeta potential -20.9 mV and Higher entrapment efficiency. The *ex vivo* intestinal absorption results indicated that the absorption of NLCs loading(S)-(-)- *o*,*p'*-DDD was greatly improved compared to micronized free powder and when compared to NLCs loading mitotano racemic. However, the pH test showed that about 70% of (S) - (-) - *o*, *p'*-DDD encapsulated was retained in the NLCs for 3h. These results indicated that the NLC produced was effective as S (-)-*o*, *p'*-DDD carrier and could potentially be exploited as a possible alternative formulation for the ACC treatment.



## SUMÁRIO

DEDICATORIA.....	XIII
AGRADECIMENTO.....	XV
EPIGRAFE .....	XVII
LISTA DE FIGURAS .....	XIX
LISTA DE TABELA .....	XXI
LISTA DE SIGLAS SIMBOLOS E ABREVEATURAS .....	XXIII
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVO E METAS .....	5
2.1 Objetivo .....	5
2.2 Metas.....	5
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	7
3.1 Carcinoma adrenocortical.....	7
3.1.1 O tumor de córtex adrenal.....	7
3.1.2 Incidência do carcinoma adrenocortical .....	9
3.1.3 Terapia do carcinoma adrenocortical .....	10
3.2 Mitotano.....	12
3.2.1 Mitotano: uso terapêutico .....	12
3.2.2 Mecanismo de ação do mitotano.....	13
3.2.3 Mitotano e quiralidade .....	15
3.2.4 Absorção e biodisponibilidade do mitotano .....	20
3.3 Carreadores coloidais de fármacos .....	23
3.4 Nanopartículas Lipídicas .....	25
3.4.1 Carreadores lipídicos nanoestruturados.....	25
3.4.2 Excipientes utilizados na produção das nanopartículas .....	27
3.4.2.1 Tensoativos .....	27
3.4.2.2 Lipídeos.....	28
3.4.3 Processos de produção das NLCs .....	29
3.4.4 Estabilidade das nanopartículas.....	32
3.5 Nanopartículas e administração por via oral .....	34

3.6 Nanopartículas e uso na terapia do câncer .....	35
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	39
4.1. Caracterização dos enantiômeros do mitotano por análise térmica, dicroísmo circular e polarimetria .....	41
4.2. Avaliação de carreadores lipídicos nanoestruturados carregados com S (-)-o, p'-DDD.....	51
4.3. Permeação intestinal <i>ex-vivo</i> e resistência ao pH de carreadores lipídicos nanoestruturados carregados com S (-)-o, p'-DDD .....	73
5. CONCLUSÕES .....	93
6. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS.....	95
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>97</b>
ANEXO	
ANEXO I: CARTA DE APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO CEUA/UFSCAR.....	109
ANEXO II: ESTRUTURA MOLECULAR DOS COMPONENTES DA FORMULA DE NLCs .....	111

Dedico esse trabalho em especial aos meus pais Antonio Carlos e Vilma a quem devo minha vida e formação meu reconhecimento e gratidão pelo amor que sempre me dedicaram e pelo apoio constante nessa jornada.



## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar agradeço a Jesus que é a maior razão da minha vida e de muitas vitórias, por sempre me guiar e fortalecer, por me conceder a vida com muita saúde e proporcionar a realização de mais uma etapa em minha vida.

Aos meus pais, Antonio Carlos e Vilma pelos cuidados, dedicação, ensinamentos e sobre tudo pelo amor incondicional.

À minha família em especial meu irmão Arthur, minha cunhada Louise, minha avó Hermínia, meu namorado Everton, pela participação em mais esta conquista, pelo apoio, incentivo, orações e principalmente pelo amor. Ao Peter meu cachorrinho companheiro.

À amiga Thaís Almeida por compartilhar esses anos de doutorado comigo me incentivando, ajudando, apoiando, obrigada pela dedicação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Cesar Costapinto Santana, pela oportunidade de desenvolver este trabalho. Agradeço a confiança e respeito.

À minha querida co-orientadora Profa. Dra. Maria Helena Andrade Santana, por me acolher, pela confiança depositada, por toda a dedicação, atenção e por partilhar seus preciosos ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Jivaldo do Rosário Matos pela disposição do laboratório e equipamentos e aos colegas do LATIG (IQ)-USP.

À querida Profa. Dra. Lucildes Pita Mercuri, pela disponibilização dos equipamentos, pelas valiosas contribuições nas discussões dos resultados, pelo tempo dispensado e por partilhar seus conhecimentos para a realização desta tese.

Ao Prof. Dr. Marco V. Chaud, pelas valiosas contribuições nas discussões dos resultados, contribuindo para a realização deste trabalho.

À Profa. Dr. Eneida de Paula, por gentilmente ceder o espaço físico dos laboratórios (IB)-UNICAMP.

Ao técnico do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos, Gilson Barbosa Maia Jr., pela ajuda, dedicação, amizade e paciência.

Aos Colegas do Laboratório de Desenvolvimento de Processos Biotecnológicos e do Laboratório de Biosseparação. Em especial Aos amigos Ana Carolina, Ricardinho, Anayla, Rafael, Luisa, Jean, por me permitirem partilhar um pouco mais da vida de vocês, pessoas maravilhosas que me acolheram com tanto carinho, obrigada pela amizade.

À Carolina Ribeiro Camerin Grando por fazer parte deste trabalho, pelas valiosas contribuições, dedicação e pela amizade construída.

Aos funcionários e professores da FEQ.

À Coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

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

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



“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito para seu próprio prazer pessoal e para proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”

Albert Einstein



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> representação esquemática das glândulas adrenais.....	7
<b>Figura 2:</b> Incidência de TAC em diferentes países.....	9
<b>Figura 3:</b> Hipótese de metabolização do mitotano para formação do ácido o,p'-diclorodifenilacético.....	14
<b>Figura 4:</b> Estrutura molecular do mitotano. (1*) indica o carbono quiral.....	16
<b>Figura 5:</b> Estrutura dos enantiômeros (R) e (S) do mitotano.....	17
<b>Figura 6:</b> Classes biofarmacêuticas dos fármacos, de acordo com a solubilidade e a permeabilidade.....	20
<b>Figura 7:</b> Modelos de incorporação de fármacos em carreadores lipídicos nanoestruturados: cristal imperfeito (A), tipo amorfo (B) e modelo múltiplo (C)....	27
<b>Figura 8:</b> Esquema das etapas de produção de partículas lipídicas solidas por homogeneização a quente.....	31

### **Artigo 4.1 Characterization of enantiomers of mitotane using thermal analysis, circular dichroism and polarimetry**

<b>Figure 1:</b> Chromatograms of mitotane enantiomers in 75% of isopropyl alcohol and 25% of acetonitrile mobile phase, detected by circular dichroism and ultraviolet (UV) detection; injection of 20 uL of solution, concentration of 0.2 g / L, flow rate of 1.0 mL / min, wavelength 268 nm, and 25 °C.....	46
<b>Figure 2:</b> Curves TG/DTG from mitotane racemic and the mitotane enantiomeric form S and R.....	47
<b>Figure 3:</b> Curves DSC from mitotane racemic and the mitotane enantiomeric form S and R.....	48

### **Artigo 4.2 Preparation and characterization of Nanostructured Lipid Carriers loading S(-)-o,p'-DDD**

**Figure 1:** Size distribution profiles of NLCs. Unloaded NLCs (a and b); NLCs loaded with o,p'-DDD (c and d) and NLCs loaded with S(-)-o,p'-DDD (e and f). Intensity distributions (Left, a, c and e); Number distributions (Right, b, d and f).

The multiple curves represent individual measurements of different samples of NLCs.....61

**Figure 2:** (a) Schematic representation of the lipid packing of the polyoxyethylene chains on the surface of NLCs and the balance of forces in the structure. (b) Dynamic equilibrium of the pegylated lipid in the structure of NLCs and in micelles.....63

**Figure 3:** Optical microscopy images of (a) S(-)-*o,p'*-DDD free powder; (b) fresh S(-)-*o,p'*-DDD loaded NLCs.....65

**Figure 4:** DSC curves and heating rate for S(-)-*o,p'*-DDD (free drug), polyoxyethylene (40) stearate (PEG-40), S(-)-*o,p'*-DDD loaded NLCs and unloaded NLCs (empty NLC). The curve of S(-)-*o,p'*-DDD loaded NLCs moves toward the S(-)-*o,p'*-DDD and PEG-40 curves, demonstrating the entrapment of S(-)-*o,p'*-DDD in the NLCs and also the association of PEG 40.....66

**Figure 5:** TG (a) and DTG (b) curves of S(-)-*o,p'*-DDD (free drug), S(-)-*o,p'*-DDD loaded NLCs, unloaded NLCs (free NLCs) showing an affinity between the enantiomer and the lipids, which promoted its encapsulation in the lipid matrix.....68

**Artigo 4.3 *ex-vivo* Intestinal absorption and *in-vitro* pH resistance of (S)-(-)-*o,p'*-DDD loaded in Nanostructured Lipid Carriers**

**Figure 1:** Size distribution profiles of NLCs. Unloaded NLCs (A and B); NLCs loaded with *o,p'*-DDD (C and D) and NLCs loaded with S(-)-*o,p'*-DDD (E and F). Intensity distributions (Left, A,C and E); Number distributions (Right, B, D and F). The multiple curves represent individual measurements of different samples of NLCs.....84

**Figure 2:** *In-vitro* release of S(-)-*o,p'*-DDD from NLCs in three different dissolution media: 0.1 M HCl; phosphate buffer at pH6.8 and pH 7.4. Data are means  $\pm$  S.D., *n* = 6.....86

**Figure 3:** *In-vitro* release of mitotane (MIT) from NLCs in three different dissolution media: 0.1 M HCl; phosphate buffer at pH6.8 and pH 7.4. Data are means  $\pm$  S.D., *n* = 6.....87

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Classificação do CAC em estágios e tratamentos indicados.....11

### **Artigo 4.1 Characterization of enantiomers of mitotane using thermal analysis, circular dichroism and polarimetry**

**Table 1:** DSC curve data: peak temperatures, melting and enthalpy.....48

### **Artigo 4.2 Preparation and characterization of Nanostructured Lipid Carriers loading S(-)-o,p'-DDD**

**Table 1:** Z-average, polydispersity index (PI) and zeta potential (ZP) for unloaded, S(-)-o,p'-DDD loaded with NLCs and o,p'-DDD loaded with NLCs.....62

**Table 2:** Stability profile of S(-)-o,p'-DDD loaded NLCs on the day of preparation and after 1, 7, 14, 21, and 28 days post-preparation (n=3)..... 64

**Table 3:** DSC curve data.....67

**Table 4:** Data for TG and DTG curves.....69

### **Artigo 4.3 *ex-vivo* Intestinal absorption and *in-vitro* pH resistance of (S)-(-)-o,p'-DDD loaded in Nanostructured Lipid Carriers**

**Table 1:** The Z-average, polydispersity index and zeta potential for unloaded, S(-)-o,p'-DDD and o,p'-DDD loaded with NLCs.....85

**Table 2:** Mitotane and S(-)- o,p'-DDD percentage in its free form and loaded in NLC quantified in the internal environment (the outer medium %) and at serosal side (permeated%) by everted gut sac method (n=6).....88



## LISTA DE SIGLAS, SIMBOLOS E ABREVEATURAS

CAC - Carcinoma Adrenocortical  
CAS - *Chemical Abstract Service*  
CD - *Circular Dichroism*  
CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência  
DDT - Diclorodifeniltricloroetano  
DSC - *Differential Scanning Calorimetry*  
DTG - *Derivative thermogravimetry*  
EE - *Entrapment Efficiency*  
EHL - Equilíbrio hidrofílico-lipofílico  
FDA - *Food and Drug Administration*  
K<sub>ow</sub> - Coeficiente de Partição Octanol-Água  
LBDD - *Lipid Based Drug Delivery*  
ME- Microemulsões  
NE - Nanoemulsões  
NLCs - Carreadores Lipídicos Nanoestruturados  
o,p'DDA - Ácido o,p'-diclorodifenilacético  
o,p'-DDD - Mitotano  
ORD - *Optical Rotatory Dispersion*  
PI - *polydispersity index*  
SCB - Sistema de Classificação Biofarmacêutica  
SLNs - Nanopartículas Lipídicas Sólidas  
Span<sup>®</sup> 85 - Trioleato de Sorbitano  
TAC – Tumor Carcinoma Adrenocortical  
TG - *Thermogravimetry*  
Tween<sup>®</sup> 80 - Tensoativos Polissorbato 80  
ZP - *Zeta Potential*





## 1. INTRODUÇÃO

O carcinoma adrenocortical (CAC) é uma neoplasia maligna que se origina no córtex das glândulas adrenais. Apesar de ser uma doença rara, a região sul do Brasil apresenta índices em crianças, que chegam a atingir 10 a 15 vezes a média mundial (PIANOVSKI, et al, 2006; CUSTÓDIO et al., 2013). O tratamento primário para este câncer consiste na ressecção cirúrgica. Nos casos em que ressecção cirúrgica completa não é possível, devido ao estágio avançado do tumor ou metástase, está indicado o uso do quimioterápico mitotano (ZANCANELLA et al., 2008).

O uso do mitotano no tratamento do carcinoma adrenocortical levou a *Food and Drug Administration* a aprovar o uso em humano, apesar do conhecimento limitado sobre o modo de ação, efeitos colaterais e metabolismo. O mitotano é análogo ao diclorodifeniltricloroetano (DDT), de característica lipofílica, causando dificuldades na sua administração e dosagem pois apresenta baixa solubilidade em água e baixa permeabilidade nas barreiras celulares, limitando a sua absorção. Por ser uma molécula semelhante ao DDT, o mitotano é muito tóxico, e aplicado em altas doses na quimioterapia convencional causa reações adversas gastrointestinais e neurológicas.

O mitotano possui um centro assimétrico, que pressupõe a existência de enantiômeros, R e S, isso indica que o medicamento é fornecido na forma de mistura (racêmica), o que pode ser extremamente preocupante do ponto de vista da saúde.

Estudos recentes que tiveram como objetivo avaliar os efeitos das frações enantioméricas, indicaram que o enantiômero (S)-(-)-o,p-DDD pode ser mais efetivo em menor concentração quando comparado com o enantiômero (R)-(+)-o,p-DDD na citotoxicidade da célula do tumor do córtex adrenal (H-295R), o que justifica sua purificação (ASP et al. 2010). Embora alguns estudos demonstrem a relação entre os enantiômeros do mitotano e a citotoxicidade, não há estudos conclusivos na literatura sobre possíveis diferenças na ação farmacológica e

reações adversas dos enantiômeros. Por isso é necessário o estudo de possíveis diferenças farmacológicas e/ou tóxicas entre os enantiômeros.

Para contornar os problemas de absorção e melhorar a eficiência de ação de fármacos, atualmente vêm sendo usados sistemas nanoestruturados para a sua veiculação com o intuito de melhorar a biodisponibilidade e promover maiores concentrações do ativo nos locais onde ele deve exercer seus efeitos farmacológicos, usando doses menores assim diminuindo a toxicidade para os tecidos não específicos, diminuindo também o número diário de doses e consequentemente obtendo-se uma maior adesão dos pacientes adultos e principalmente os pediátricos.

Nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) e carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs) têm sido propostos como sistemas coloidais alternativos para a encapsulação de fármacos lipofílicos como é o caso do mitotano por apresentar vantagens como uma estabilidade maior, facilidade de escalonamento, menor toxicidade e liberação sustentada do ativo, direcionamento do fármaco ao sítio específico.

Em estudos preliminares em nosso laboratório (SEVERINO et al. 2011) o mitotano foi encapsulado em SLNs e NLCs pelo processo de homogeneização de alto cisalhamento seguido de homogeneização a alta pressão. 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 (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 na 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. Essas limitações geraram outro trabalho com intuito de comprovar a potencialidade dessas partículas como estratégia para melhorar as propriedades biofarmacêuticas do mitotano, e os resultados mostraram que o mitotano foi eficientemente encapsulado nas NLCs.

Apesar dos avanços no estudo do CAC, o prognóstico continua muito deficiente. Embora bons resultados de novas terapias tenham sido obtidos em laboratório, a sua aplicação na prática tem sido decepcionante. Considerando a heterogeneidade biológica dessa neoplasia novas estratégias para superar as limitações terapêuticas atuais, são de extrema necessidade para o tratamento do CAC. Devido à elevada toxicidade causada em pacientes sob tratamento com mitotano, faz-se necessária a pesquisa de alternativas que possam aumentar a possibilidade de cura e reduzir os efeitos colaterais.

Com base nessas informações, nesse trabalho foi inicialmente realizada a caracterização dos enantiômeros do mitotano obtidos da separação utilizando a cromatografia de leito móvel simulado com comprimento de Zona Variável (VARICOL), realizado no laboratório de Biosseparação da FEQ/UNICAMP. Em uma segunda etapa, foi estudada a encapsulação da forma enantiomérica (S)-(-)-o,p-DDD em carreadores lipídicos sólido. Contudo a influencia desta preparação na permeação intestinal (*ex vivo*) e na resistência ao pH (*in vitro*) foi avaliada.



## 2. OBJETIVO E METAS

### 2.1 Objetivo

O objetivo deste trabalho foi caracterizar os enantiômeros do mitotano e a forma enantiomérica (S)-(-)-*o,p*-DDD encapsulada em carreadores lipídicos nanoestruturados, visando uma nova alternativa de formulação para o tratamento do carcinoma adrenocortical (CAC).

### 2.2 Metas

- Caracterização dos enantiômeros do mitotano racêmico: (R)-(+)-*o,p*-DDD e (S)-(-)-*o,p*-DDD.
- Preparação e caracterização físico-química de NLCs encapsulando o enantiômero (S)-(-)-*o,p*-DDD A estrutura molecular da formulação encontra-se no anexo II.
- Avaliação da estabilidade de estocagem durante 28 dias à 4°C.
- Avaliação da retenção do enantiômero (S)-(-)-*o,p*-DDD nas NLCs em diferentes valores de pHs.
- Caracterização da permeação intestinal *ex vivo* do (S)-(-)-*o,p*-DDD encapsulado nas NLCs em comparação com o mitotano racêmico encapsulado no mesmo tipo de partículas. A carta de aprovação do comitê de ética para esse trabalho encontra-se no anexo I.



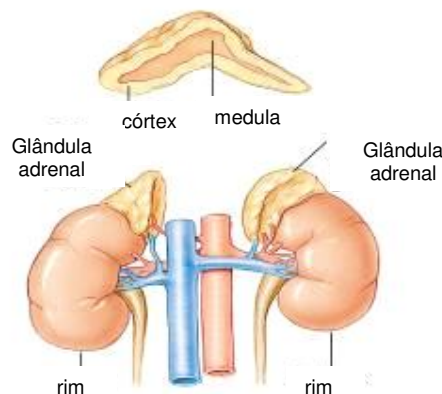
### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 Carcinoma adrenocortical

##### 3.1.1 O tumor de córtex adrenal

O córtex da glândula suprarrenal humana pode ser afetado por processos neoplásicos benignos ou malignos. Estes tumores podem se desenvolver em ambos os sexos e em qualquer faixa etária. A grande parte dos tumores adrenocorticais, no entanto, é pequena e de comportamento benigno. Em contraposição, os tumores adrenocorticais malignos ou carcinomas adrenocorticais são raros, agressivos e com prognóstico desfavorável (PEREIRA, 2007).

As glândulas adrenais, localizadas nos polos superiores dos rins, são divididas anatomicamente em córtex e medula e são recobertas por uma cápsula, e estão esquematicamente representadas na Figura 1. As adrenais são responsáveis pela biossíntese de hormônios esteróides da classe dos glicocorticóides, mineralocorticóides e precursores dos hormônios sexuais, que levam ao desenvolvimento dos caracteres sexuais secundários de meninos e meninas na adolescência. O principal representante dos glicocorticóides é o cortisol, hormônio essencial à vida, tendo ação sobre praticamente todos os sistemas do organismo. O principal representante dos mineralocorticóides é a aldosterona, cuja principal função é manter o equilíbrio hidroeletrolítico, com efeitos diretos sobre a pressão arterial (ORTH et al. 1992).



**FIGURA 1:** Representação esquemática das glândulas adrenais fonte: disponível em <http://www.bartleby.com>

Uma das características mais importantes das neoplasias malignas é o crescimento desenfreado e desorganizado de células, o que provoca um aumento do tamanho e da funcionalidade do órgão ou 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 Cushing) e ainda a ausência de excessos hormonais, quando se observa apenas um efeito de massa (tumor palpável) (KOPF et al. 2001).

Apesar de estudos recentes abordando a patogênese molecular do CAC, pouco se compreende sobre o desenvolvimento deste tumor (ALLOLIO E FASSNACHT, 2006; MAYER et al. 1997). 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 (HANNA et al. 2008; BARZON et al.1999).

Os genes envolvidos nas alterações moleculares podem ser classificados como supressores tumorais e serem inativados, ou oncogenes, sendo ativados, favorecendo o desenvolvimento tumoral (HANNA et al. 2008; MAYER et al. 1997). Mutações no gene TP53 associados com síndrome de Li-Fraumeni, é caracterizada por um aumento do risco de câncer, incluindo pediátrico que é chamado de tumor carcinoma adrenocortical (TAC). Essa mutação no gene TP53, é responsável por 3% de todos os tumores que ocorrem em qualquer idade e por 10% dos tumores que ocorrem na infância, assim essa mutação parece aumentar a predisposição nas crianças. Embora o TAC é freqüentemente observada em famílias que têm suscetibilidade ao câncer. Algumas mutações cromossômicas relacionadas e freqüentemente 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 (ANTONINI et al.

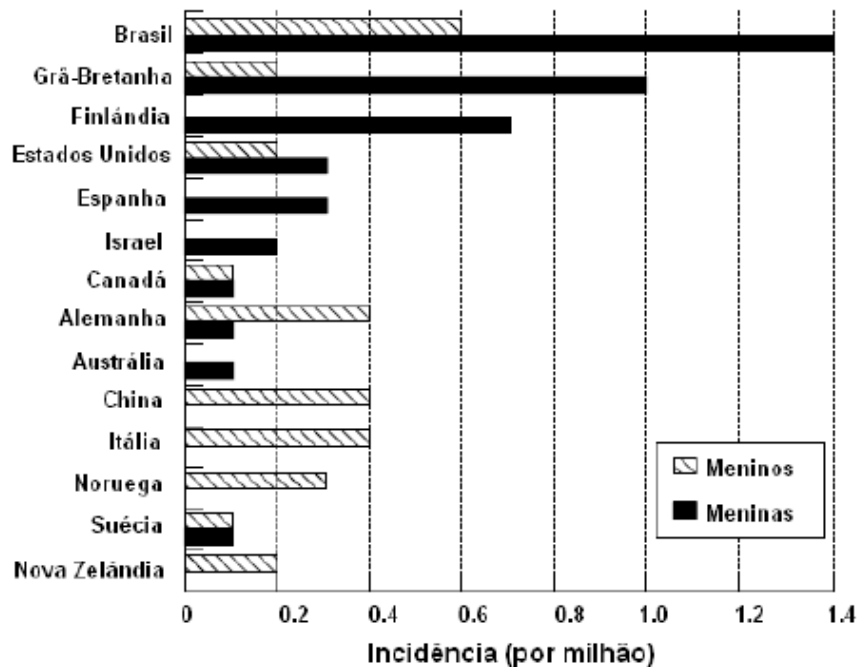


2011; HANNA et al. 2008; WEST et al. 2007, FIGUEIREDO et al. 2006, CUSTÓDIO et al. 2011 ).

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

### 3.1.2 Incidência do carcinoma adrenocortical

A incidência anual dos carcinomas adrenocorticais são de 0,5 a 2 casos por milhão no mundo e sua prevalência é de 4-12 casos por milhão de habitantes, resultando em 0,2% das mortes por câncer nos Estados Unidos. Contudo, uma elevada incidência dos tumores adrenocorticais afetando crianças tem sido observada nas regiões sul e sudeste do Brasil (PIANOVSKI et al. 2006). A incidência estimada dos tumores adrenocorticais, em crianças brasileiras provenientes da região sul, é 10 a 15 vezes maior que a incidência mundial (figura 2) (PIANOVSKI et al. 2006, CUSTÓDIO et al. 2013).



FONTE: Modificado a partir de RIBEIRO et al. 2006  
**FIGURA 2:** Incidência de tAC em diferentes países

O carcinoma adrenocortical é uma neoplasia maligna que atinge, anualmente, 0,2 a 0,3 crianças por milhão de crianças até 15 anos no mundo (PARKEN et. al. 1985; DESANDES et. al. 2004). No sul do Brasil, a incidência do CAC em pediatria é singular, vitimando de 2,9 a 4,2 novos casos por milhão de crianças. Este aumento de casos no sul do Brasil está associado a uma mutação hereditária do gene *Tp53* (R337H), detectada em todas as crianças acometidas pelo CAC (PIANOVSKI et al. 2006; RIBEIRO et al. 2001). Apesar dessa forte associação entre a mutação do gene *Tp53* e o CAC, não são encontrados, na literatura científica, explicações para o surgimento de tal mutação e para a incidência singular no sul do Brasil. O CAC possui um prognóstico ruim, com uma taxa de sobrevida de 5 anos após o diagnóstico de 40 % (TERZOLO E BERRUTI, 2008; MICHALKIEWICZ et al. 2004). A presença de metástase reduz a sobrevida em 5 anos para menos do que 10 % (BARLASKAR E HAMMER, 2007).

### **3.1.3 Terapia do carcinoma adrenocortical**

O tratamento das neoplasias malignas é estabelecido em função do tamanho do tumor no local de surgimento (sítio primário), presença de tumor em linfonodos (circulação linfática) e grau de acometimento de outros órgãos e tecidos (metástase), o que é expresso através da classificação em estágios. As opções terapêuticas do CAC em função dos estágios estão descritas na Tabela 1.

**TABELA 1** – Classificação do CAC em estágios e tratamento indicado

ESTÁGIO	DESCRIÇÃO	TRATAMENTO INDICADO
I	Tumor pesando menos que 200 g, que tenha sido totalmente retirado através de cirurgia; ausência de metástase	Cirurgia para retirada do tumor
II	Tumor pesando mais que 200 g, que tenha sido totalmente retirado através de cirurgia; ausência de metástase	Cirurgia, com retirada de linfonodos retroperitoneais
III	Tumor residual ou que não pode ser retirado através de cirurgia (excessivamente grande)	Cirurgia (retirada de linfonodos retroperitoneais)
IV	Metástase	associada a mitotano e antineoplásicos (C, E, D)

FONTE: MICHALKIEWICZ et al. 2004

NOTAS: C – cisplatina; E – etoposida; D – doxorrubicina.

O tratamento de primeira escolha do CAC é a retirada do tumor por meio de cirurgia, se a doença é detectada nos estágios I e II sendo esta a única opção potencialmente curativa (POMMIER E BRENNAN, 1992; SCHULICK E BRENNAN, 1999). Nos casos de CAC em que a ressecção cirúrgica completa não é possível (estágios III e IV), está indicado o uso de **mitotano** associado a outros antineoplásicos (BARLASKAR E HAMMER, 2007).

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 a resistência multidroga, sendo utilizado em combinação com outros fármacos para o tratamento citotóxico pela modulação do MDR e inibição de *glicoproteína permeabilidade* (P-glicoproteína) que proporciona uma base para explorar seu uso com outros fármacos para o tratamento do carcinoma adrenocortical (ALLOLIO e FASSNACHT, 2007, PEREZ-TOMAS, 2006).

Vários regimes quimioterápicos têm sido combinados com o mitotano, os quais teoricamente aumentam a eficácia ao agente citotóxico por bloqueio celular do efluxo (MALUF et al. 2011).

Os regimes quimioterápicos mais comuns combinados com mitotano são: cisplatina/etoposídeo e cisplatina/etoposídeo/doxorubicina (ZANCANELLA et al., 2008). Outra alternativa é um regime de estreptozotocina associado ao mitotano tem induzido a taxa de resposta de 35% com tempo médio de sobrevida de 16 meses (CIFTI et al., 2001; PHAN, 2007).

Entretanto, nenhum tratamento tem provado ser unicamente tão eficaz quanto o mitotano. Pacientes que são responsivos ao mitotano apresentam melhor prognóstico do que aqueles nos quais a doença progride (PHAN, 2007; HEILMANN et al. 2001; JAROLIM et al. 2003). Uma das limitações para a terapia com mitotano para o tratamento do CAC são os efeitos tóxicos resultantes (STIGLIANO, 2012).

### **3.2 Mitotano**

Mitotano (1,1-dicloro-2-(o-clorofenil)-2-(p-clorofenil)-etano ou o', p'-DDD), é um isômero do inseticida DDT, é um pó branco, com fórmula molecular  $C_{14}H_{10}Cl_4$ , massa molecular de 320,05 g/mol, ponto de fusão entre 76 e 78 °C, coeficiente de partição octanol-água ( $K_{ow}$ ) de 5,87, solubilidade de 0,1 mg/L em água (a 25 °C), sendo solúvel em etanol, isoctano, diclorometano. Ele está registrado no *Chemical Abstract Service* (CAS) sob o número 53-19-0 (ZANCANELLA, 2008).

#### **3.2.1 Mitotano: Uso terapêutico**

A primeira descrição sobre a utilização do mitotano foi em 1948, quando foi demonstrado que ele produz atrofia adrenal em cães (NELSON e WOODARD, 1948). O mitotano (Lisodren<sup>®</sup>) é aprovado pelo *Food na Drug Administration* (FDA) para o uso específico no tratamento do cacinoma adrenocortical. É comercializado pela *Bristol Myers Squibb* na forma de comprimidos contendo 500 mg de fármaco.

A posologia para crianças é de 1-2 g/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 9-10 g/dia, em 3-4 doses (LACY et al. 2009). Estas altas doses causam reações adversas gastrointestinais (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 e SHAHAN, 2004; BOLLEN e LANSER, 1992).

O mitotano exerce seus efeitos na redução do volume do CAC principalmente quando as concentrações plasmáticas do fármaco são superiores a  $14 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (VAN SLOOTEN et al. 1984; HAAK et al. 1994). As reações adversas são mais severas, mais frequentes e mais persistentes quando as concentrações plasmáticas de mitotano ultrapassam  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (BOLLEN E LANSER, 1992). Assim, a literatura define como terapêutica a concentração plasmática de mitotano entre  $14$  e  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Devido à severidade e à frequência das reações adversas e à relação existente entre a concentração plasmática (entre  $14$  e  $20 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e as respostas terapêuticas, a determinação e o acompanhamento da concentração plasmática do mitotano ao longo do tratamento é muito importante (MOOLENAR et al. 1981, VAN SLOOTEN et al. 1984; HAAK et al. 1994; LUTON et. al. 1990; ANDERSEN et al. 1995; DICKSTEIN et al. 1998; KHORRAM-MANESH et al. 1998; TERZOLO et al. 2000; KASPERLIK-ZALUSKA, 2000; BAUDIN et al. 2001; ABRAHAM et al. 2002).

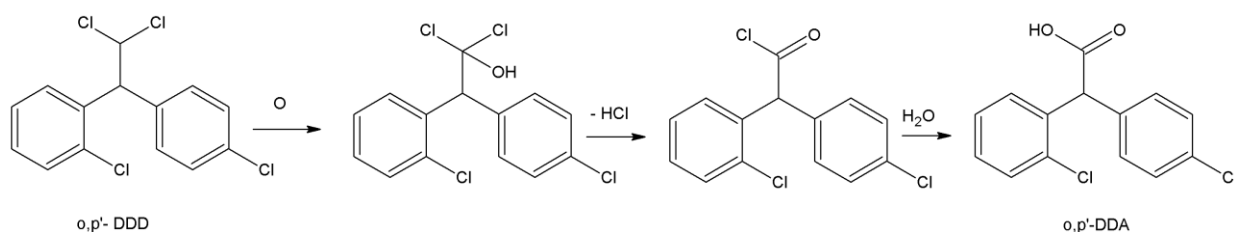
### **3.2.2 Mecanismo de ação do mitotano**

Após a administração oral do mitotano, 60 % da dose é absorvida e 20 a 30 % é armazenada nos tecidos, principalmente adiposo. Uma concentração plasmática máxima é obtida em 3 a 5 horas e um 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, 2004). Devido à característica lipofílica, inicialmente o mitotano se acumula no tecido adiposo e

aparece em baixas concentrações no sangue (TERZOLO et al., 2000). Podem ser necessários meses para a saturação da gordura, o que depende do índice de massa corpórea e do perfil metabólico de cada paciente, entre outros fatores.

O mitotano é excretado na urina, na forma metabolizada, em concentrações de 10 - 25 %, e quantidades pequenas e variáveis foram detectadas no cérebro, suprarrenais, fígado, bile e soro. Não foi observado acúmulo preferencial do medicamento nas adrenais, entretanto sabe-se que o percentual de gordura é relativamente elevado no CAC. O mitotano é convertido em metabólitos solúveis em água, não sendo encontrado o fármaco inalterado na bile nem na urina (HUTCHISON, 2004). O cloreto do ácido *o,p'*-diclorodifenilacético (*o,p'*DDA), um derivado do mitotano, é o responsável pela ação terapêutica (CAI et al., 1995).

A ação adrenocorticolítica do mitotano não é bem esclarecida, sendo que o efeito farmacológico pode ser atribuído ao próprio mitotano (na forma de mistura racêmica ou a um dos seus enantiômeros) ou aos metabólitos formados. A hipótese mais aceita é de que a morte celular induzida pelo fármaco no córtex adrenal ocorre após uma hidroxilação catalisada pelo complexo citocromo P e uma subsequente desidro-halogenação espontânea na cadeia  $\beta$ -carbônica lateral do Mitotano (*o,p'*-DDD) (Figura 3). O metabólito resultante haleto de acila é altamente reativo liga-se covalentemente às proteínas mitocondriais reagindo com macromoléculas de células do córtex adrenal (CAI et al. 1995).



**FIGURA 3-** Hipótese de metabolização do mitotano para formação do ácido *o,p'*-diclorodifenilacético.

Este mecanismo adrenolítico proporcionaria alterações na função mitocondrial, na qual o mitotano seria ativado por um citocromo P450 adreno-específico. Ao apresentar em sua forma ativada, ele bloqueia 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 glicocorticóides e causando necrose do tecido adrenocortical (CAI et al. 1995; SCHTEINGART, 2007).

Ao exercer sua ação citotóxica sobre as mitocôndrias das células das glândulas adrenais, normais e neoplásicas, o mitotano causa insuficiência de adrenal em praticamente todos os pacientes (SCHULICK e BRENNAN, 1999). A crise aguda de insuficiência da adrenal é um quadro grave que pode rapidamente conduzir ao choque e ao óbito. Este quadro pode se instalar em situações de estresse, como infecções, cirurgias, traumas, quando há um aumento na demanda por glicocorticóides, ou períodos de vômitos e diarreia após infusões de antineoplásicos, que comprometem a absorção da reposição hormonal oral. Para prevenir e minimizar as crises agudas é necessária a reposição de mineralocorticóides e glicocorticóides (WAJCHENBERG et al. 2000; ABRAHAM et al. 2002).

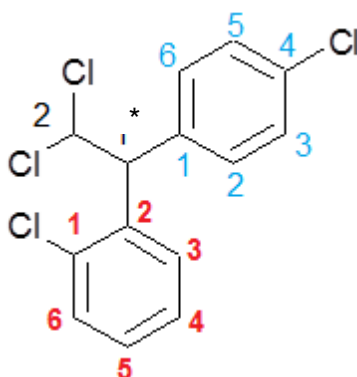
### **3.2.3 Mitotano e quiralidade**

Compostos quirais que apresentam um ou mais estereocentros, também conhecidos como enantiômeros (R e S), são idênticos na sua constituição atômica e ligação, porém, por se tratar de imagens especulares não podem ser sobrepostos. Enantiômeros são designados como (+) ou (-) conforme a direção de rotação do plano da luz polarizada, direita e esquerda, respectivamente (MARTIGNONI et al. 2006).

Em função da quiralidade, fármacos podem diferir em suas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas; a ação dos enantiômeros separados representa uma prova farmacológica útil para desvendar mecanismos de ação, assim como rotas metabólicas. É possível que um enantiômero possa ser inativo,

ao passo que o outro seja responsável pela ação farmacológica ou também, um enantiômero pode inibir ou modificar os efeitos adversos ou tóxicos do outro isômero. A relevância clínica do fenômeno é particularmente importante para fármacos de baixo índice terapêuticos administrados como racematos. A substituição de fármacos racêmicos pelo enantiômero puro vem crescendo gradativamente (BROCKS, 2006).

Mitotano (o,p'-diclorodifenildicloroetano ou o,p-DDD ou segundo a IUPAC, 1-cloro-2- [2,2-dicloro-1-(4-clorofenil)-etil]-benzeno) (Figura 4)



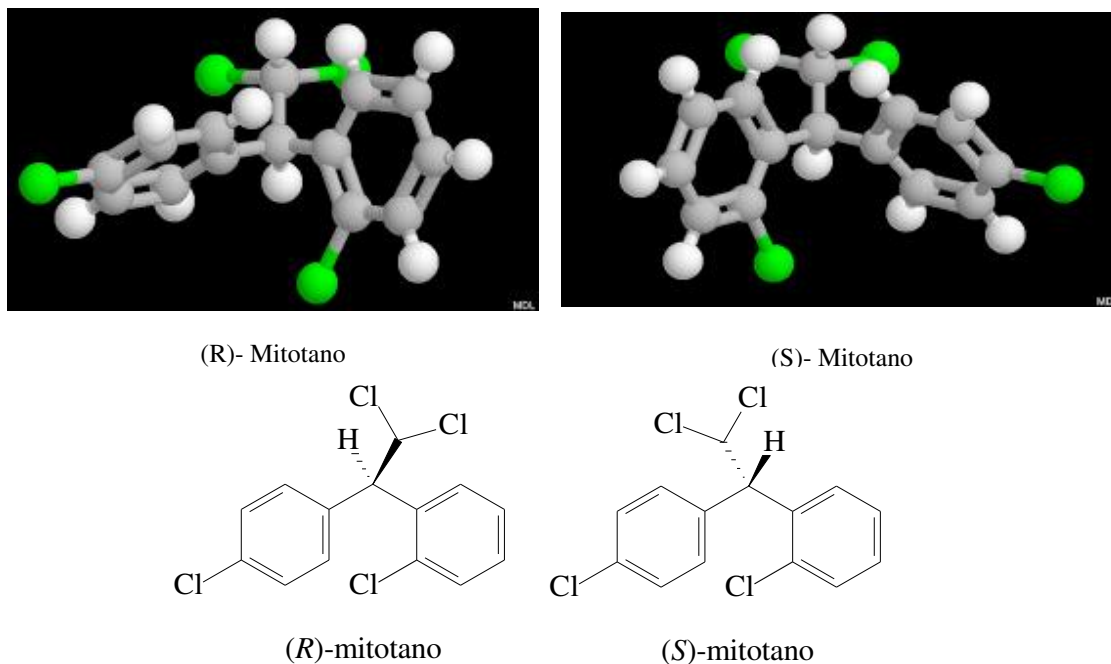
**FIGURA 4** - Estrutura molecular do mitotano. (1\*) indica o carbono quiral.

O mitotano (o,p'-diclorodifenildicloroetano) é uma molécula quiral com um estereocentro (**Figura 4**, carbono 1\* da cadeia etil) e, portanto, pode existir como enantiômeros nas formas R e S. A influência da quiralidade da molécula sobre seu efeito farmacológico ainda não foi bem estudada. A monografia do mitotano não menciona a atividade óptica do produto e é provável que a droga seja fornecida na forma racêmica (mistura 1:1 dos enantiômeros R e S). Não existem também informações sobre os aspectos estereoquímicos da metabolização do mitotano.

Como ocorre para outras drogas é possível que exista diferença farmacológica entre os enantiômeros. Uma forma de verificar esta hipótese é determinar a proporção entre os enantiômeros no plasma dos pacientes (ZANCANELLA 2008).



A estrutura da molécula de mitotano apresenta um carbono assimétrico, por isto, existem duas formas enantioméricas (*R* e *S*) desta substância, como ilustrado na Figura 5.



**FIGURA 5** – Estrutura dos enantiômeros (*R*) e (*S*) do mitotano.

De acordo com Ali e About-Enein, apenas um dos enantiômeros de um composto quiral pode ter a potência ou ação farmacológica desejada, enquanto o outro pode ser inativo ou tóxico. Da mesma forma, a transformação biológica de compostos quirais pode ser estéreo-seletiva, levando a uma absorção, metabolização, excreção e possivelmente, ação terapêutica e/ou tóxica diferenciadas (ALI e ABOUT-ENEIN, 2002). O *Food and Drug Administration* (FDA, EUA) passou a exigir que os fabricantes investigassem os efeitos farmacológicos e toxicológicos de cada enantiômero e produzissem apenas um deles, se houvesse diferenças farmacocinéticas ou tóxicas que alterassem substancialmente as doses recomendadas e/ou as reações adversas (REKOSKE, 2001).

As vantagens do tratamento utilizando fármacos enantiomericamente puros incluem a possível redução na dose a ser prescrita, que reflete no fato de poder

oferecer maior eficácia por dose; o uso de enantiômeros puros pode reduzir variações farmacocinéticas e farmacodinâmicas entre diferentes pacientes, além de reduzir a toxicidade do estereoisômero terapeuticamente inativo. O uso do mitotano em casos de câncer adrenal sugere uma investigação dos enantiômeros e metabólitos hipotéticos destes compostos (INOI, et al. 1962).

Embora alguns estudos demonstrem a relação entre os enantiômeros do mitotano e a citotoxicidade, não há estudos conclusivos na literatura sobre possíveis diferenças na ação farmacológica e reações adversas dos enantiômeros. Desta forma, investigação de possíveis diferenças farmacológicas e/ou tóxicas entre os enantiômeros pode ser muito útil e extremamente importante (FANG, 2010; LOANNIDES, 2010).

Estudos recentes do grupo de pesquisa do Prof. Brás Oliveira revelaram um resultado bastante curioso e interessante. Após a administração do fármaco em pacientes com grau avançado de CAC, examinaram seus plasmas a fim de quantificar as formas enantioméricas do mitotano. O ensaio qualitativo realizados com amostras de plasma de pacientes por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com coluna quiral de ciclodextrina, indicaram que existe um excesso enantiomérico para o (R) (+), sugerindo que o (S) (-) é metabolizado em maior proporção. Com base nestes resultados, é importante a investigação de possíveis diferenças terapêuticas e tóxicas entre os enantiômeros do mitotano (ZANCANELLA, 2008).

Cantilana e colaboradores apresentaram resultados de estudos farmacocinéticos em cinco mini-porcos, a onde foi identificada as frações dos enantiômeros em plasma e tecido, após a administração oral da mistura racêmica (forma comercial dissolvida em óleo de milho). Os resultados indicaram polimorfismo na disposição dos enantiômeros do mitotano. Sendo que três mini-porcos apresentaram mais rápida metabolização e eliminação do enantiômero S - (-) enquanto os outros dois mini-porcos apresentaram mais rápida metabolização e eliminação do enantiômero R -(+) (CANTILANA et al. 2009).

Estudos em placentas de mulheres saudáveis expostas ao mitotano presente no ambiente, apresentaram uma relação enantiomérica inferior a 1, o que

indica que a distribuição e/ou a cinética dos dois enantiômeros foram diferentes, sugerindo uma eliminação mais rápida do primeiro eluente do que do segundo eluente (SHEN et al. 2006). Outro estudo reporta a investigação da enantioseletividade a partir da volatilização de pesticidas quirais, vindos do solo agrícola para a atmosfera, sendo mitotano (o,p'-DDD) um deles, os resultados sugerem depleção preferencial de uma fração enantiomérica do mitotano sobre a outra (VENIER et al. 2007).

ASP e colaboradores encontraram pequenas diferenças entre a potência dos enantiômeros (R)-(+)-o,p-DDD e (S)-(-)-o,p-DDD. Ambos causam concentração-dependência na citotoxicidade na célula do tumor de córtex adrenal (H-295R) após 72h, as curvas de concentração-resposta são significativamente diferentes, mesmo os dois enantiômeros tendo uma potência semelhante, o enantiômero (S)-(-)-o,p-DDD foi mais efetivo em menor concentração quando comparado com o enantiômero (R)-(+)-o,p-DDD, porém quando comparados com a inibição da secreção do cortisol, o enantiômero (R)-(+)-o,p-DDD foi mais potente que o (S)-(-)-o,p-DDD. A contribuição dos enantiômeros sobre o efeito na viabilidade celular e na secreção do hormônio se mostrou diferente da mistura racêmica. Enquanto o impacto da mistura racêmica foi mais potente que nas frações enantioméricas, isso implica que (R)-(+)-o,p-DDD e (S)-(-)-o,p-DDD são citotóxicos através de mecanismos diferentes (ASP et al. 2010).

Avaliação da citotoxicidade dos enantiômeros R(+) e S(-) comparados à mistura racêmica através do cultivo das seguintes células humanas: fibroblasto, hepatócito e célula do tumor de córtex adrenal (H-295R), obtiveram resultados que mostram que os enantiômeros não sofrem rotas metabólicas diferentes. Entretanto não pode-se concluir diferenças de metabolização em cultivo celular e extrapolar para (MALUF, 2012).

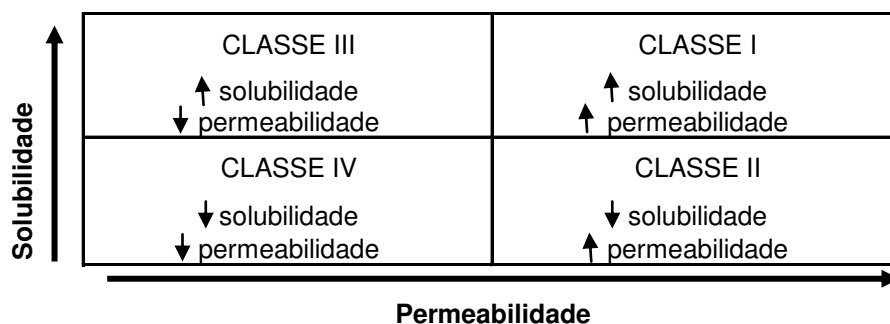
Se tais diferenças interindividuais e polimorfismo entre os enantiômeros do mitotano também existirem em humanos, a administração de um dos enantiômeros pode se tornar uma opção de tratamento atrativa (ASP et al. 2010).

Testes clínicos, das formas enantioméricas enriquecidas, representa um trabalho bastante promissor no campo farmacológico. A avaliação do

comportamento de cada enantiômero no organismo pode ainda identificar os efeitos colaterais causados pela administração do fármaco na forma racêmica e, se comprovado como sendo causado por um ou outro enantiômero, pode-se fazer um estudo para minimizar tais efeitos, levando a um tratamento menos danoso ao paciente.

### 3.2.4 Absorção e biodisponibilidade do mitotano

A ação terapêutica de fármacos depende da sua biodisponibilidade que, por sua vez, depende da permeabilidade (intestinal), da solubilidade, da absorção e da forma farmacêutica administrada. Reconhecendo que a solubilidade da substância e a permeabilidade intestinal são os parâmetros fundamentais relacionados à taxa e à extensão da absorção, foi proposta uma classificação biofarmacêutica de substâncias ativas para correlacionar a solubilidade com a biodisponibilidade. Amidon e colaboradores propuseram o sistema de classificação biofarmacêutica (SCB), que permitiu a classificação dos fármacos com base nos parâmetros de solubilidade e permeabilidade. Quando combinado com a dissolução do fármaco, o SCB leva em consideração três fatores importantes que afetam a velocidade e extensão da absorção de formas farmacêuticas sólidas de liberação imediata: dissolução, solubilidade e permeabilidade gastrointestinal. Nessa classificação, os fármacos podem ser agrupados em quatro classes biofarmacêuticas, conforme apresentado na Figura 6 (AMIDON et. al. 1995).



**FIGURA 6** – Classes biofarmacêuticas dos fármacos, de acordo com a solubilidade e a permeabilidade. fonte: AMIDON, LENNERNÄS, SHAH, CRISONJ (1995)

Por definição, a solubilidade é a extensão na qual as moléculas de um sólido são removidas por um solvente. A solubilidade aquosa pode ser medida pela provável dispersão entre octanol e água ( $K_{ow}$ ), e depende da habilidade para formar ligações de hidrogênio com a molécula de água (MARTINEZ e AMIDON, 2002). A solubilidade é definida como a razão dose/solubilidade, e um fármaco solúvel é definido como aquele cuja mais alta dose pretendida para humanos pode ser dissolvida em 250 mL de água (ou menos), em pH de 1 a 8 e temperatura corporal ( $37 \pm 0,5$  ° C) (YU, et al. 2002).

A permeabilidade é definida como a permeabilidade real da parede do jejuno para uma substância ativa. Uma substância ativa é considerada altamente permeável quando a extensão da absorção intestinal é  $\geq 90$  %, geralmente não associada com instabilidade documentada no sistema gastrointestinal. Permeação intestinal inferior a 90 % é característica de substâncias pouco permeáveis (YU, et al. 2002; MARTINEZ e AMIDON, 2002).

Fármacos com baixa solubilidade em água e baixa permeabilidade (classe IV), como é o caso do mitotano, apresentam vários problemas para uma administração oral efetiva, sendo a capacidade de permear as barreiras celulares a etapa limitante de sua absorção. Muitos fármacos são, reconhecidamente, potentes no tratamento de várias doenças. Porém, a otimização de seu uso é limitada pelas características de solubilidade e permeabilidade (AMIDON, et al., 1995).

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 e SHAHAN, 2004).

Em análise de fezes, o mitotano foi recuperado 62-66% da forma não metabolizada. Em estudo de Moolenaar *et al.* (1981) avaliaram o impacto da dieta sobre o perfil de mitotano no plasma, pela quantificação da taxa de absorção. Mitotano foi administrado (por via oral, em dose única) em diferentes formas de veiculação: comprimidos de microgrânulos, leite, chocolate e emulsão lipídica. As

concentrações 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 (MOOLENAR 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 foi disperso em alimentação enriquecida com óleo de milho. A área sob a curva obtidos no grupo de cães alimentados na dieta enriquecida com o mitotano misturado com o óleo de milho é a que obteve uma ordem maior de  $63 \text{ mg.h.L}^{-1}$ . No caso da emulsão é de  $40 \text{ mg.h.L}^{-1}$ , enquanto o medicamento referência Lisodren<sup>®</sup>, obteve apenas  $2 \text{ mg.h.L}^{-1}$ . Este estudo confirma que a absorção de mitotano pode ser melhorada pela formulação farmacêutica e alimentar enriquecidos com óleo, contribuindo para melhorar a biodisponibilidade oral do mitotano (WATSON et al. 1987).

Em outros dois estudos (BAUDIN et al. 2001; TERZOLO et al. 2000) sugeriram 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  $2 \text{ g.dia}^{-1}$  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  $5 \text{ g.dia}^{-1}$  para alcançar estes níveis terapêuticos desejados.

A maioria dos pacientes inicia o tratamento com  $2 \text{ g.dia}^{-1}$  e aumenta rapidamente a dose, dependendo da tolerância gastrointestinal, a  $5\text{-}6 \text{ g.dia}^{-1}$ . 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.

### **3.3 Carreadores coloidais de fármacos**

A descoberta de muitas substâncias potentes através de novas tecnologias não é suficiente para assegurar a eficácia da terapia medicamentosa, pois fármacos com baixa solubilidade e baixa absorção apresentam biodisponibilidade insuficiente e não atingem a concentração plasmática efetiva. Portanto, há a necessidade crescente de desenvolver sistemas carreadores de fármacos para superar estas dificuldades (ATTIVI, 2010).

O carreador não deve apresentar toxicidade, deve ter capacidade suficiente de carregamento, alterar a distribuição do fármaco, liberar de forma sustentada, proporcionar estabilidade física e química, ser passível de produção em grande escala e possibilitar a esterilização (FRICKER et al. 2010; KRISTL et al. 2003; LUCKS e MÜLLER, 1991; RADOMSKA-SOUKHAREV, 2007).

Sistemas coloidais, particularmente aqueles na escala nanométrica, tem sido amplamente estudados nos últimos anos. A redução do tamanho é um dos métodos para aumentar a solubilidade e a biodisponibilidade de ativos pertencentes às classes II e IV da classes biofarmacêuticas dos fármacos (AMINDON et al. 1995). Dentre seus representantes estão: os lipossomas, micro e nanoemulsões, nanocápsulas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas.

Carreadores coloidais diferem entre si em função da sua composição, capacidade de incorporar fármacos e aplicabilidade. Entre os carreadores nanoestruturados destacam-se as nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs), as nanoemulsões (NE) e as microemulsões (ME). Estes sistemas nanoestruturados são constituídos por lipídios altamente purificados e misturas complexas de glicerídeos apresentando tamanho de partícula variável (NEMEN e LEMOS-SENNA, 2011).

Suas principais características incluem excelente estabilidade física, capacidade de proteção de fármacos instáveis quanto à degradação, capacidade de controle de liberação, excelente tolerabilidade, além de não apresentar

problemas relacionados à produção em grande escala e à esterilização. Enquanto as SLNs são sistemas matriciais organizados obtidos a partir de triglicerídeos sólidos, as NEs submicrônicas são obtidas como dispersões óleo em água, apresentando elevada estabilidade cinética, em decorrência do seu reduzido tamanho de gota. As MEs, por outro lado, são sistemas isotrópicos, transparentes, de baixa viscosidade e termodinamicamente estáveis, obtidas quando uma mistura de surfactantes apropriada é usada (NEMEN e LEMOS-SENNA, 2011).

Os sistemas coloidais para transporte de fármacos, entre eles as nanopartículas lipídicas sólidas, têm sido empregados com sucesso na área farmacêutica, por possuírem a capacidade de compartimentalizar, de maneira eficiente, diversos grupos de agentes farmacêuticos, especialmente os com caráter altamente lipofílico.

Carreadores nanoparticulados como, por exemplo, lipossomas, emulsões óleo em água, nanopartículas poliméricas e nanopartículas lipídicas sólidas são extensivamente estudadas por promoverem muitas vantagens em relação a formulações tradicionais, como liberação controlada de ativos, solubilizar ativos lipofílicos, aumentar a estabilidade e diminuir a toxicidade (MARCATO, 2009).

Absorção de fármacos é limitada por uma série de barreiras fisiológicas. (ROGER, 2009). Sistemas carreadores nanoestruturados para fármacos, pode ser uma alternativa para a administração oral. Na Literatura, muitos estudos têm demonstrado uma melhora na biodisponibilidade de fármacos encapsulados em nano carreadores e em alguns casos, ocorre um aumento na permeabilidade através da barreira intestinal, eles podem proteger contra a degradação gastrointestinal, bem como difundir dentro do muco, aumentando a capacidade do fármaco ser absorvido.

No entanto, estudos recentes demonstraram que apenas algumas partículas administradas por via oral são absorvidas através do epitélio intestinal, tendo assim a chance de alcançar a corrente sanguínea e ser capaz de atingir o seu alvo farmacológico, mantendo sua estrutura inicial. O desafio atual é desenvolver partículas que permanecem intactos da boca para a corrente sanguínea. A biodistribuição de um nanocarreador depende das suas



propriedades físicas e químicas. Fatores que aumentam a absorção das partículas têm sido extensivamente descritos incluindo o tamanho e a carga superficial (ROGER et al., 2009 ).

Tamanho de partícula e distribuição de tamanho são as características mais importantes das nanopartículas relacionado com as suas propriedades de biodistribuição. O tamanho é um parâmetro importante que rege a entrada das nanopartículas nas células e seu destino em domínios subcelulares (ROGER et al., 2009 ).

As nanoemulsões lipídicas foram introduzidas nos anos 50 em produtos de nutrição parenteral. Nos últimos anos, este carreador passou a ser utilizado no transporte de fármacos lipofílicos. As vantagens das nanoemulsões incluem segurança toxicológica e o fácil escalonamento da produção deste carreador por homogeneização à alta pressão (ROGER et al. 2009).

O grande diferencial do uso de lipídio, em relação aos demais carreadores, é sua excelente estabilidade físico-química que proporciona maior proteção contra degradação de fármacos. Podendo ser utilizado para encapsulação de fármacos lipofílicos, hidrofílicos e proteínas. Além disso, apresenta biocompatibilidade e baixa toxicidade (MÜLLER et al. 1995, HEURTAULT et al. 2002).

### **3.4 Nanopartículas lipídicas**

#### **3.4.1 Carreadores lipídicos nanoestruturados**

Carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs) surgiram no final da década de 90, como uma segunda geração de nanopartículas lipídicas, para melhorar algumas características das SLNs, maximizar sua eficiência de encapsulação e minimizar a expulsão do ativo das partículas durante a estocagem (DAS e CHAUDHURY, 2010).

As NLCs são obtidas usando misturas de lipídeos sólidos e lipídeos líquidos. Para obter esta combinação os lipídeos sólidos são misturados a lipídeos líquidos (óleos), com uma taxa variável de 70:30 até 99,9:0,1. 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 e SOUTO, 2010).

A principal diferença quando comparada as SLNs é que as NLCs possuem a matriz lipídica reestruturada através da inclusão dos lipídios líquidos em mistura com os lipídios sólidos componentes das SLNs (As SLNs são formadas por lipídios sólidos à temperatura ambiente e corporal, e estabilizadas por tensoativos.). O resultado é uma matriz lipídica menos ordenada e contendo imperfeições em sua estrutura, capaz de acomodar uma maior quantidade de fármaco e assim minimizar a sua expulsão durante a estocagem, modulando também o seu padrão de liberação (MÜLLER et al., 2002).

Estas nanopartículas também apresentam 3 modelos de incorporação propostos (**Figura 7**), diferindo no tipo de componente lipídico usado para sua produção (SOUTO e MÜLLER, 2010):

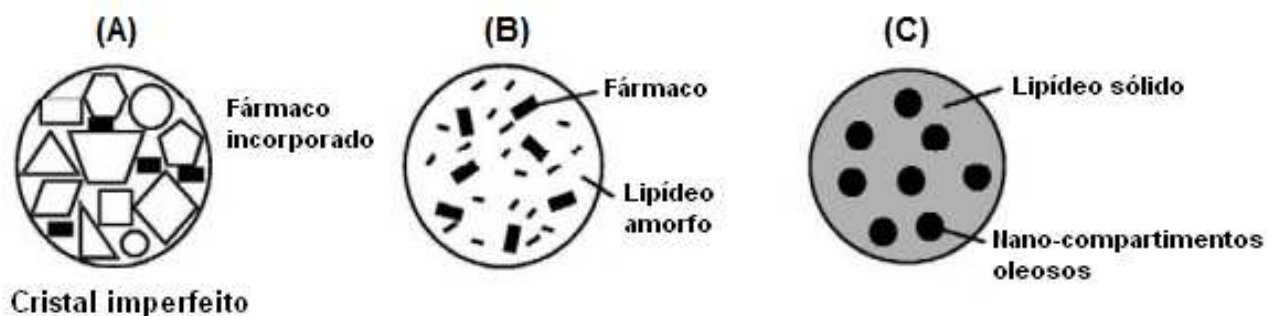
-NLCs tipo I ou modelo do cristal imperfeito: consistem em uma matriz com muitos espaços vazios e livres, que podem acomodar o fármaco. Estas partículas são obtidas quando quantidades suficientes de lipídeos sólidos são misturadas a lipídeos líquidos (óleos). Diante de diferentes comprimentos de cadeia 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 da mistura de lipídeos especiais, que não se recristalizam após homogeneização e resfriamento da nanoemulsão. Estes lipídeos criam matrizes amorfas que evitam, protelam o fenômeno de recristalização dos lipídeos tanto no resfriamento quanto 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. 2004) 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 formando gotas de óleo 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 do que em lipídeos sólidos (JENNING et al. 2000).

Estes modelos teóricos de NLCs foram propostos baseados em dados analíticos que podem ser usados para caracterizar físico-quimicamente a matriz das NLCs.



**Figura 7-** 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).

### 3.4.2 Excipientes utilizados na produção das nanopartículas:

#### 3.4.2.1 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. O tensoativo apresenta em sua molécula uma cabeça hidrofílica e cauda lipofílica para reduzir a tensão superficial entre as duas fases. O valor do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) dos tensoativos representa a proporção relativa das partes hidrofílicas e lipofílicas da molécula (POUTON e PORTER, 2008; HOLMBERG et al. 2003).

Os tensoativos utilizados nas nanopartículas lipídicas se dividem em quatro categorias: aniônico, não-iônicos e anfóteros. Em geral, os tensoativos iônicos empregam uma abordagem eletrostática enquanto os tensoativos não-iônicos dependem da repulsão estérica para estabilizar as partículas. Entre eles, grande parte dos tensoativos não-iônicos consiste numa fração hidrofóbica (a cadeia de hidrocarboneto) e uma fração hidrofílica. Tensoativos anfóteros apresentam ambos os grupos positivamente e negativamente carregados e exibem características do agente tensoativo catiônico em pH baixo e aniônica em pH elevado (POUTON e PORTER, 2008; HOLMBERG et al. 2003)

Vários fatores devem ser considerados na escolha dos agentes tensoativos para estabilizar as nanopartículas lipídicas, como o valor de EHL, via de administração, a toxicidade e tamanho de partícula (POUTON e 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 comparação aos iônicos, devido à sua menor toxicidade e irritação (POUTON e 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 e PORTER, 2008).

A escolha de surfactantes e co-surfactantes também afeta o tamanho das nanopartículas de lipídicas. Nanopartículas preparadas com os mesmos lipídeos podem ter diferentes tamanhos, devido à utilização de diferentes surfactantes (ZHANG et al. 2006)

#### 3.4.2.2 Lipídeos

A escolha dos lipídeos é crítica para obter a adequada capacidade de carregamento das nanopartículas, estabilidade e liberação controlada. O polimorfismo dos lipídeos, também afeta as propriedades das nanopartículas. Em geral, os lipídeos com cadeias de ácidos graxos mais longas têm transição de fase mais lenta em relação a aqueles com cadeias menores (POUTON e PORTER, 2008).

Nanopartículas lipídicas compostas por ceras apresentam significativa expulsão do fármaco devido a sua estrutura mais cristalina. Além do tipo de lipídeos, outros fatores também podem afetar a cristalinidade lipídica, incluindo a condição de armazenamento e método de produção (SOUTO e MÜLLER, 2008; MARCATO, 2009).

Para evitar problemas de cristalinidade e polimorfismo, lipídeos líquidos, como por exemplo, triacilgliceróis de ácido caprílico / cáprico ou ácido oleico, 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 (SOUTO e MÜLLER, 2008; MARCATO, 2009).

Adicionalmente, a hidrofobicidade dos lipídeos varia com o balanço de grupos funcionais hidrofílicos e hidrofóbicos das moléculas impactando no caráter da partícula. Os triglicerídeos são mais hidrofóbicos em relação aos mono e diglicerídeos, porque todos os três grupos hidroxil são hidrofílicos e 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).

### **3.4.3 Processos de produção dos carreadores lipídicos nanoestruturados**

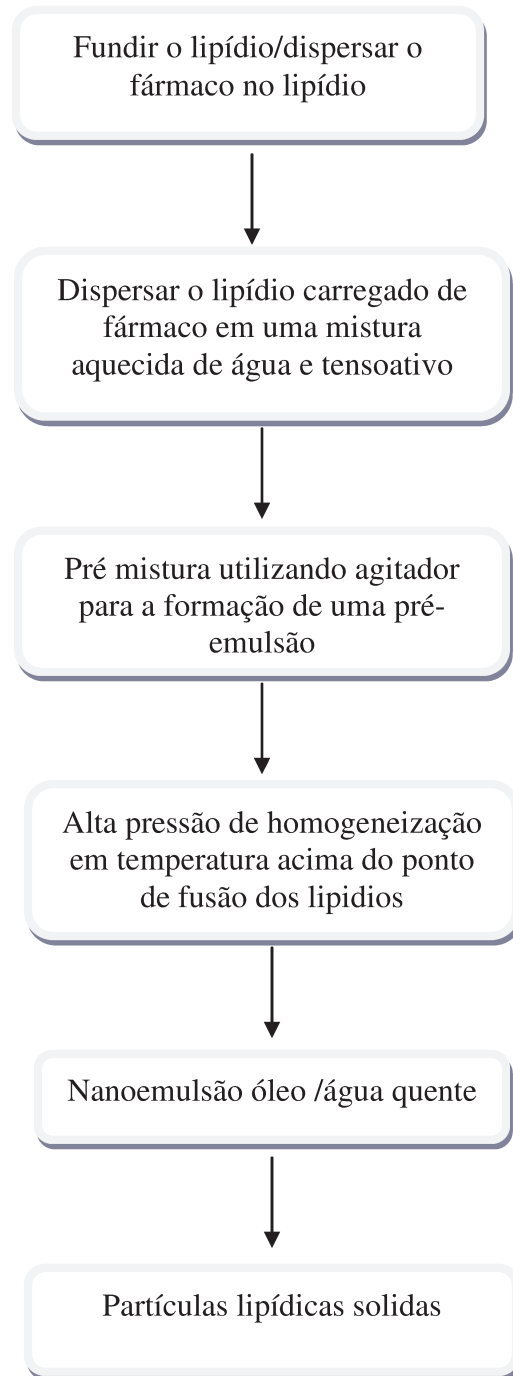
Diversas técnicas foram desenvolvidas para a produção de nanopartículas lipídicas (WISSING et al. 2004). As mais utilizadas são as técnicas de homogeneização a alta pressão, a quente e a frio, microemulsão, evaporação – emulsificação, evaporação e inversão de fase. Dependendo da composição lipídica as técnicas podem produzir SLNs ou NLCs.

A técnica de homogeneização em alta pressão foi desenvolvida por Müller e Luck em 1993 (patente Europeia numero 0605497) o processo de produção pelo equipamento consiste em puxar o líquido em alta pressão (100-2000 Bar), por um

pistão estreito de escala nanométrica acelerado em uma curta distancia, com alta velocidade ao encontro de uma barreira. A colisão com a barreira possibilita a formação de nanoparticulas com diâmetro reduzido. Este fluido é submetido a um grande estresse onde forças de cavitação rompem as gotículas gerando as nanogotículas. (MEHNERT e MADER, 2001).

No processo de homogeneização à quente, o ativo primeiro é dissolvido no lipídio fundido. Em seguida, esta mistura é adicionada em uma solução quente de tensoativo sob alta agitação, formando uma pré-emulsão (óleo em água). Esta pré-emulsão é homogeneizada em um homogeneizador de alta pressão (de 100 a 2000 bar). Em geral é suficiente três ciclos para formar as nanoparticulas. Em seguida esta dispersão é resfriada a uma temperatura abaixo da temperatura ambiente ocasionando assim a cristalização do lipídio e formação das nanopartículas lipídicas (figura 8).

Este método é utilizado principalmente na encapsulação de ativos lipofílicos, isto porque, no caso de ativos hidrofílicos, este migra para a fase aquosa durante a homogeneização resultando em uma baixa eficiência de encapsulação (TEERANACHAIDEEKUL et al. 2008; ATTAMA e MÜLLER-GOYMANN, 2008).



**FIGURA 8:** Esquema das etapas de produção de partículas lipídicas solidas por homogeneização a quente (adaptado de MEHNERT e MADER, 2001).

### **3.4.4 Estabilidade térmica das nanopartículas**

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

Durante a produção das NLCs, a etapa de solidificação e cristalização dos lipídeos pode levar a imperfeições na matriz permitindo a acomodação das moléculas de fármaco entre as camadas lipídicas e as cadeias de ácidos graxos (WISSING et al. 2004; MÜLLER et al. 2007). Esta cristalização ocorre principalmente com polímeros 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 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 NLCs, de baixa viscosidade possuem um risco potencial de transformação para um gel viscoso, proporcionando perda do tamanho coloidal e aumento do tamanho de partícula, ou seja, formação de agregação. Na maioria destas situações esta transformação ocorre muito rapidamente podendo estar relacionada a diversos fatores, como: aumento externo das forças de cisalhamento, ou seja, estresse mecânico, durante a 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



(HEURTAULT et al. 2002; MEHNERT E MADER, 2001; SOUTO, 2005; WESTESEN e SIEKMANN, 1997).

A estocagem em temperaturas mais baixas que a temperatura ambiente (25°C), sob abrigo da luz e atmosfera de nitrogênio podem prevenir o crescimento de partícula (FREITAS e 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 (LIPPACHER et al. 2002). Já o potencial zeta, permite prever a estabilidade coloidal 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 superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas, presentes no meio aquoso de dispersão (SCHAFFAZICK et al. 2003). Ela também permite avaliar a potencial estabilidade da formulação, principalmente durante o seu período de estocagem. Geralmente, a agregação entre as partículas é menor quando há repulsão eletrostática entre elas. Para garantir a estabilidade das NLCs, o potencial zeta deve ser superior ao módulo de 30 mV (FREITAS e MÜLLER, 1998; MÜLLER et al. 1995).

A DSC é uma das técnicas mais utilizadas para o estudo do comportamento térmico dos lipídeos e suas misturas. Essa técnica fornece informações em relação à temperatura e a energia associada com a fusão, cristalização, entalpia e transformações polimórficas (HEURTAULT et al. 2002).

A difração de raios X é utilizada como complemento do DSC, sendo uma ferramenta essencial para elucidar as propriedades dos lipídeos e suas misturas, útil para investigar o arranjo das camadas das moléculas de lipídeos e a sua cristalinidade.

### 3.5 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 de aumentar a biodisponibilidade e prolongar os níveis plasmáticos de fármacos (GASCO, 2007; ROGER et al. 2010).

Atualmente, vem sendo dispensada grande atenção ao estudo de matrizes lipídicas para o aumento da biodisponibilidade de fármacos administrados por via oral. Tal abordagem é chamada de *Lipid Based Drug Delivery* (LBDD) e tem sido intensivamente explorada na área farmacêutica na última década, utilizando-se de diferentes sistemas com matrizes lipídicas, como sistemas auto-emulsificantes, emulsões secas, dispersões sólidas, lipossomas, micro e, claro, as nanopartículas lipídicas sólidas. Tal estratégia deriva do fato amplamente conhecido que a ingestão de lipídios pode aumentar a absorção e a biodisponibilidade de bioativos hidrofóbicos (JEONG et al. 2007; JANNIN et al. 2008).

Há três mecanismos primários pelos quais lipídeos e excipientes lipofílicos afetam a absorção, biodisponibilidade e disponibilidade 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) transporte baseado em enterócito e processos metabólicos, alterando potencialmente absorção, efluxo, disponibilidade e a formação de metabólitos do fármaco dentro dos enterócitos; (c) estimulação do transporte linfático intestinal para a circulação sistêmica (FRICKER et al. 2010; MENDONZA et al. 2009; PORTER et al. 2007).

Pandey e colaboradores 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 em 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, 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 estes foram encapsulados em SLNs em relação ao fármaco não encapsulado (PANDEY et al. 2005).

Contudo, devido às condições hostis do trato gastrointestinal, grandes partes dos fármacos encapsulados não atingem concentrações efetivas. A estabilidade das nanopartículas frente às mudanças de pH, degradação por enzimas devem ser estudadas.

### **3.6 Nanopartículas e uso na terapia do câncer**

Em relação ao uso das SLNs e NLCs na terapia de câncer, ainda há poucos relatos na literatura, especialmente em quimioterapia por via oral (YANG et al. 1999; MEI et al. 2003). No entanto, as características do sistema lipídico coloidal apresentado, bem como as necessidades requeridas pela quimioterapia do CAC utilizando o mitotano, indicam fortemente o uso das nanopartículas lipídicas sólidas como sistema carreador deste fármaco hidrofóbico.

Embora possa apresentar-se com diferentes características estruturais, o núcleo lipídico das nanopartículas confere a este tipo de sistema coloidal uma enorme capacidade de encapsulação de ativos hidrofóbicos. Inúmeros exemplos da encapsulação deste tipo de ativo podem ser encontrados na literatura (MAIA et al. 2000; HU et al. 2005; LIM et al. 2002; PANDEY et al. 2005; LAI et al. 2006; MÜLLER et al. 2006; CASTRO et al. 2007), sendo administrados pelas diferentes

vias (transdérmica, parenteral e oral) (Müller *et al.*, 2002; MÜLLER *et al.*, 2007). Kaur e colaboradores conseguiram em seu trabalho resumir as vantagens do uso das nanopartículas lipídicas sólidas, como carreadores de ativos para uso farmacêutico. Possuem uma grande capacidade de encapsulação de ativos, especialmente hidrofóbicos (KAUR *et al.* 2008).

As qualidades das NLCs as tornam particularmente atrativas para carreadores de agentes quimioterápicos para câncer. Fármacos anti-tumorais, especialmente compostos citotóxicos que são usados como quimioterápicos convencionais, são únicos quando comparados com outras classes de fármacos em números de áreas como forte toxicidade que é típica de drogas citotóxicas podendo comprometer os efeitos terapêuticos. As características físico-químicas favoráveis da NLCs como a liberação controlada, fazem com que a maioria dos fármacos anti-tumor possam ser eficientemente levados até os tecidos cancerígenos, enquanto mantém os tecidos saudáveis intactos sem exposição aos agentes altamente tóxicos. Outro ponto é que muitos dos compostos que podem ser usados para reduzir as células cancerígenas são lipofílicos (WONG, 2006).

Fármacos lipofílicos, como o mitotano, apresentam baixa solubilidade em água e baixa permeabilidade nas barreiras celulares, limitando a sua absorção (AMIDON, LENNERNÄS *et al.* 1995). Apenas 60% da dose administrada por via oral é absorvida, por isso o desenvolvimento de novas formulações tem o intuito de contornar o problema de absorção.

Os sistemas coloidais têm sido empregados para a encapsulação de princípios ativos com o intuito de melhorar a biodisponibilidade, promover maiores concentrações do ativo nos locais onde ele deve exercer seus efeitos farmacológicos, obtidas com menores doses, diminuindo a toxicidade para os tecidos não específicos, diminuir o número diário de doses e, conseqüentemente, à adesão dos pacientes adultos e principalmente os pediátricos (KOKKONA, KALLINTERI *et al.* 2000).

Um estudo de paclitaxel *in vivo* encapsulado em NLCs mostrou um aumento na biodisponibilidade oral por um fator de 3. Entretanto, a razão para esta melhora ainda não é entendida. A primeira barreira a atravessar depois da

administração oral é constituída por um ambiente físico-químico do trato gastrointestinal. O fármaco deve então ser transportado pelo epitélio intestinal. Algumas partículas poliméricas já tem apresentado degradação no trato gastrointestinal devido a variação do nível de pH, presença de enzimas ou sais biliares. Deste modo, o trato gastrointestinal é uma barreira física e biológica que pode limitar a absorção das NLCs (ROGER, 2009).

Koziara e colaboradores, assim como, Zhan e colaboradores estudaram o crescimento *in vitro* de cultura sensíveis e resistentes a paclitaxel na formulação disponível comercialmente e encapsulado em SLNs e NLCs. Os estudos mostraram concentrações de inibição similares para o fármaco encapsulado em carreadores lipídicos enquanto para formulação disponível comercialmente foi necessária uma concentração 30 vezes maior para matar as células resistentes (KOZIARA et al. 2006; ZHAN et al. 2008).

Severino e colaboradores encapsularam o mitotano em SLNs e NLCs compostas por cetilpalmitato e em mistura binária de estearato de polioxietileno (40) e triacilglicerois de ácido cáprico/caprílico, por homogeneização de alto cisalhamento seguida de homogeneização a quente. Os resultados mostraram que as SLNs e NLCs encapsulando o mitotano são carreadores potenciais para a veiculação deste fármaco (SEVERINO et al. 2011).



#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

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





#### **4.1. Caracterização dos enantiômeros do mitotano por análise térmica, dicroísmo circular e polarimetria**

*Characterization of enantiomers of mitotane using thermal analysis, circular dichroism and polarimetry*

Artigo submetido ao periódico

*Thermochimica Acta*

## Characterization of enantiomers of mitotane using thermal analysis, circular dichroism and polarimetry

Carla A. Guimarães<sup>1</sup>, Carolina R. Camerin<sup>1</sup>, Lucildes P. Mercuri<sup>2\*</sup>, Ana Carolina Nascimento<sup>1</sup>, Jivaldo R. Matos<sup>3</sup>, Cesar C. Santana<sup>1</sup>

<sup>1</sup> School of Chemical Engineering, Department of Biotechnological Processes, State University of Campinas - Campinas, SP - Brazil, [carlaaiolfig@gmail.com](mailto:carlaaiolfig@gmail.com)

<sup>2</sup> Environmental Sciences Institute, Chemical and Pharmaceutical, UNIFESP, Diadema, Brazil, [lpmercuri@pq.cnpq.br](mailto:lpmercuri@pq.cnpq.br)

<sup>3</sup> Chemistry Institute, USP, São Paulo, Brazil, [jdrmatos@gmail.com](mailto:jdrmatos@gmail.com)

\*Corresponding author – Environmental Sciences Institute, Chemical and Pharmaceutical, UNIFESP, Diadema, Brazil, [lpmercuri@pq.cnpq.br](mailto:lpmercuri@pq.cnpq.br)

### ABSTRACT

Mitotane is a chiral and synthetic drug and has been used in the chemotherapy treatment of the adrenocortical carcinoma, the asymmetric center in the mitotane molecule indicates the existence of the R and S enantiomers. In order to characterize the enantiomers of mitotane, pure enantiomers were previously isolated. The objectives of this work were to contribute to the determination of the absolute configuration of the mitotane enantiomeric forms and evaluate the thermoanalytical properties of the racemic mitotane and its enantiomeric forms. The application of circular dichroism (CD) and polarimetry show that the first eluting enantiomer was as S (-). Racemic mitotane has a  $T_{\text{onset}}$  at 76.3 °C while R has  $T_{\text{onset}}$  at 86.5 °C. The melting point of enantiomer S is 72.8 °C. The results contribute to determination of the absolute configuration for the mitotane enantiomers and confirm the importance of thermoanalytical characterization of racemic mitotane and its enantiomeric forms.

**Keywords:** Mitotane, enantiomers, circular dichroism, polarimetry, thermal analysis.

## 1. INTRODUCTION

Chiral drugs comprise more than one-half of drug approved worldwide and depending on the nature of the racemic species, different resolution techniques may be employed for the separation of the opposite enantiomers [1]. Separation of enantiomers is one of the most challenging tasks of modern chemistry and is important for comparative biologic tests concerning collateral effects.[2]. The need for obtaining the pure individual enantiomers at the first steps in the development of a chiral drug has been promoted by the fact that a pair of enantiomers often show different pharmacological and toxicological profiles, and so, they must be tested and regulated separately [3]. Characterization of the racemic species is a prerequisite for the design of industrial-scale resolution processes.

The mitotane or 1,1-dichloro-2-(*o*-chlorophenyl)-2(*p*-chlorophenyl)ethane (*o,p'*-DDD) is a chiral and synthetic drug derivative of the insecticide dichloro-*o*-diphenyltrichloroethane (DDT) [4]. Mitotane is a chiral drugs and it has been use for 40 years in chemotherapy treatment of the adrenocortical carcinoma, a relatively rare and aggressive cancer tumor. The mitotane racemic mixture is commercially available and their R and S enantiomers has been structurally characterized earlier [5]. The efficacy and potency of the racemic mixture is however low, and *o,p'*-DDD treatment is frequently associated with severe side effects [6].

Questions arise as to the thermodynamic basis for the formation of different racemic species and as to the ability of the thermodynamic properties of chiral systems to serve as a reliable tool for the identification of racemic species and their enantiomers. Taking into account the significant differences in the melting behavior of these species, their thermodynamic properties must differ. These differences may be used to characterize the racemic species and their enatiomers [1].

Chiroptical methods are optical methods that can differentiate between two enantiomers. They include polarimetry, optical rotatory dispersion (ORD), and circular dichroism (CD). Detection is based on the interaction between a chiral

center in the analyte and the incident polarized electromagnetic radiation. Early applications dealt primarily with elucidation of molecular structures, particularly of natural products for which a technique capable of confirming or establishing the absolute stereochemistry was critical [7].

The aim of the present work was to evaluate the thermal characterization of the racemic mitotane mixture and its enantiomeric forms (S) and (R) by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and thermogravimetry (TG)/Derivative thermogravimetry (DTG). The obtained data can contribute to the study of the absolute configuration and chiroptical rotation of the mitotane enantiomers pre isolated.

## **2. MATERIALS AND METHODS**

### **2.1 Materials**

Pure mitotane (racemic mixture) was purchased from Yick-Vic Chemicals & Pharmaceuticals (Hong Kong). The mitotane enantiomers were separated by a variation of the multicolumn continuous chromatographic separation process named simulated moving bed (SMB). The chromatographic process is known as Varicol and used Chiralpak<sup>®</sup> AD columns as the stationary phase and acetonitrile - isopropyl alcohol 25:75 (v/v) solutions as mobile phase. The separation work was carried out at the Bioseparation Laboratory, at School of Chemical Engineering – Unicamp by Silva and co-works [8].

### **2.2 Circular dichroism and polarimetry**

The experiments of dichroism were performed on a high performance liquid chromatography (HPLC), consisting of a pump LC-20 AT (Shimadzu) equipped with an detector model CD-2095 Plus (Jasco), with UV-Vis detection coupled with a circular dichroism and the software LCsolution (Shimadzu). The Chiral column (100 x 10 mm) used in the experiments was a Chiralpak<sup>®</sup> AD furnished by Chiral Technologies. Chiralpak<sup>®</sup> AD column was packed with 20 µm of particle diameter of silica-gel which is covalent bonded with amylose tris (3,5-dimethylphenylcarbamate). Solutions 0,2 g/L of racemic mitotane were in the

mobile phase, composed of 75% of isopropyl alcohol and 25% of acetonitrile both of HPLC grade. Specific rotations of enantiomers of the chiral analytes dissolved in methanol were measured at 268 nm on a P-1010 polarimeter (JASCO) equipped with a halogen lamp and a filter sodium at 20 °C and the optical path length was 10 cm.

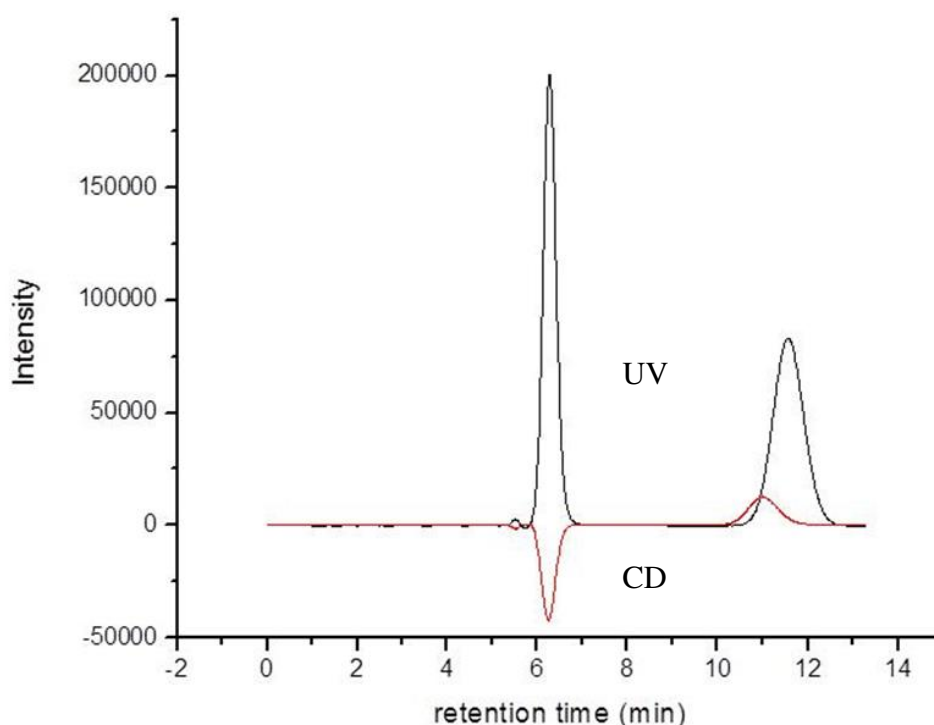
### **2.3 Differential Scanning Calorimetry and thermogravimetry/Derivative thermogravimetry**

The thermal behavior of mitotane racemic and the enantiomeric forms (S) and (R) 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 25-500 °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;  $\Delta H_{\text{melt}}^{\circ} = 28.54 \text{ Jg}^{-1}$ ) and zinc (mp 419.6 °C;  $\Delta H_{\text{melt}}^{\circ} = 115,8 \text{ Jg}^{-1}$ ). TG/DTG experiments were performed on a thermobalance model TGA-50 (Shimadzu) using platinum crucibles in which 0.4 mg (approx.) of each individual sample were heated between 25- 310 °C at the rate of 10 °C min<sup>-1</sup>, under air atmosphere at the flow rate of 50 mL min<sup>-1</sup>. 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).

## **3. RESULTS AND DISCUSSION**

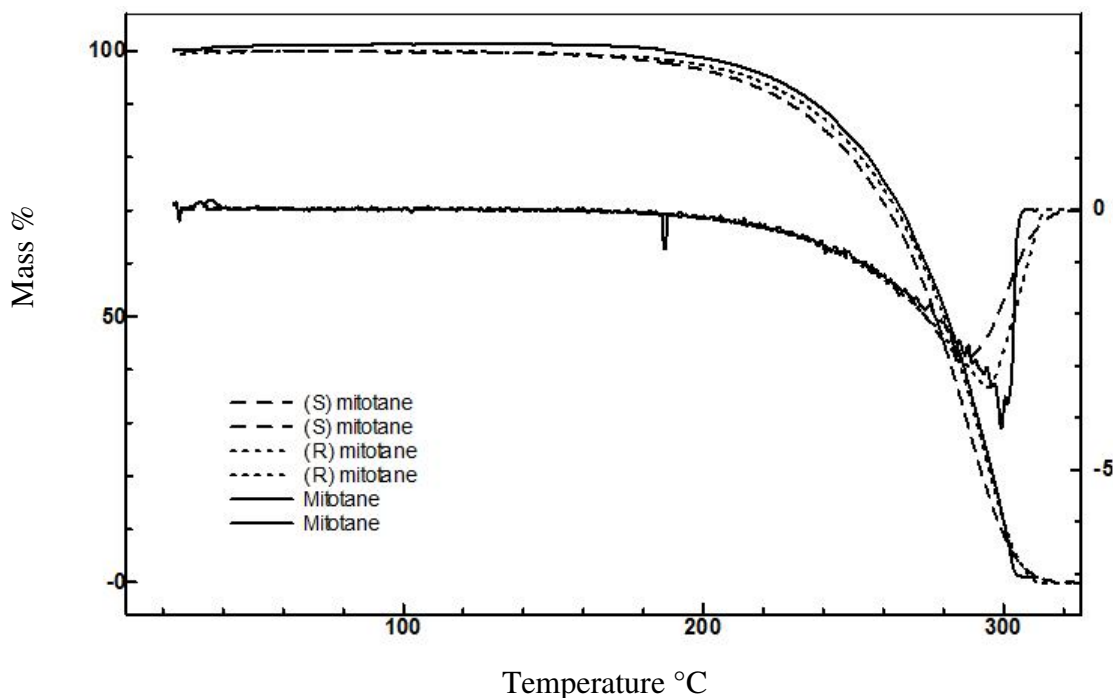
The pure enantiomers obtained by the multicolumn process in the work of by Silva Jr and co-works [8] were studied using polarimetry and circular dichroism. The  $[\alpha]_D$  at 25°C, was determined for the first eluting and the values obtained were very similar to those previously reported [9,10]. The specific rotation for the first eluting was identified as (-)-  $[\alpha]_D = -128$ . The order of elution of the mitotane

enantiomers was determined with a circular dichroism detector with a UV-VIS detector. Signals from the two peaks formed by CD and UV-VIS were detected and recorded. Fig. 1 shows that the first enantiomer eluted from the Chiralpak<sup>®</sup> AD column presented a negative sign and was identified as S. Hence, the second enantiomer presented a positive sign and was identified as R in the chromatogram of circular dichroism at 268 nm. This results is in agreement with the work done by Buser and Muller [9] and Cantillana and Eriksson [10].



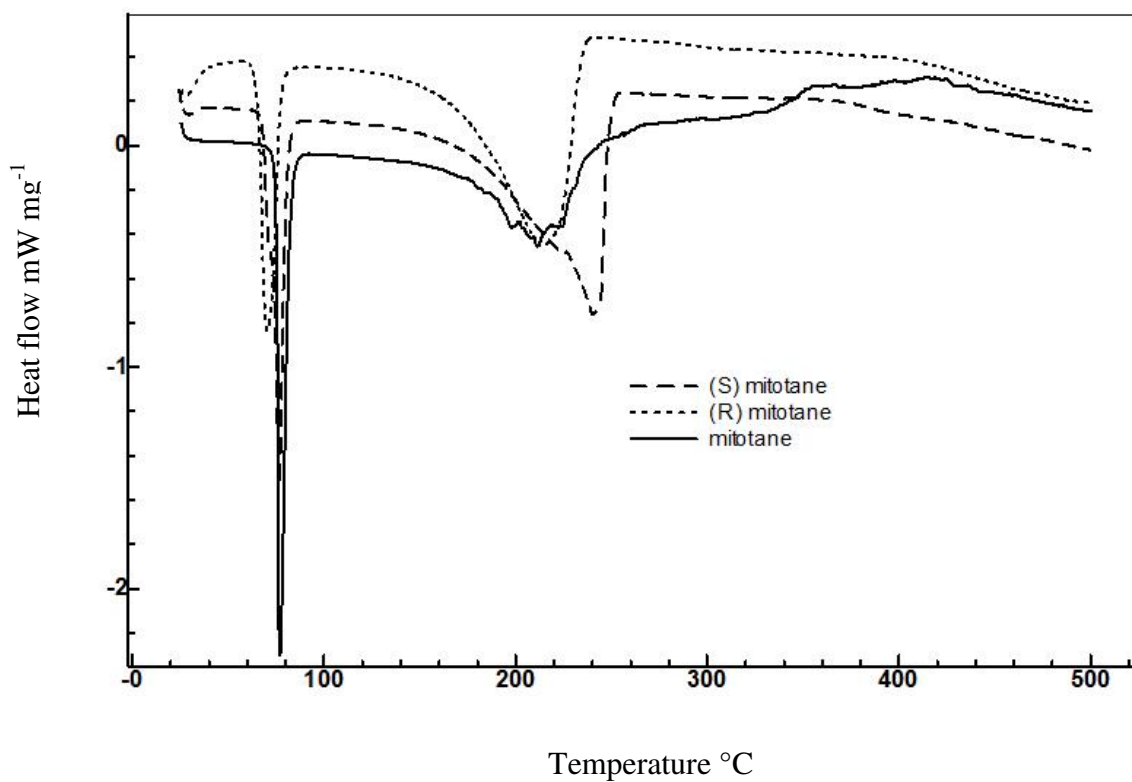
**Fig. 1.** Chromatograms of mitotane enantiomers in 75% of isopropyl alcohol and 25% of acetonitrile mobile phase, detected by circular dichroism and ultraviolet (UV) detection; injection of 20  $\mu\text{L}$  of solution, concentration of 0.2 g / L, flow rate of 1.0  $\text{mL min}^{-1}$ , wavelength 268 nm, and 25  $^{\circ}\text{C}$ .

The Fig. 2 depicts the TG / DTG curves of racemic mitotane and the enantiomers (S) and(R) forms, the curves showed that these samples are thermally stable up to  $\sim 180^\circ\text{C}$  and exhibit similar profiles of thermal decomposition.



**Fig. 2.** TG/DTG curves from mitotane racemic and the mitotane enantiomeric form S and R.

The Fig. 3 also shows a similarity in the thermal profiles of the samples, the DSC curves reports an endothermic event characteristic of melting followed by another endotherm event, in this case, concerning the thermal decomposition of these materials. However, the curves shows a small displacement of the melting peak and enthalpy between the three samples, as shown in Table 1.



**Fig. 3.** DSC curves from mitotane racemic and the mitotane enantiomeric form S and R.

**Table 1**

DSC curve data: peak temperatures, melting and enthalpy

Sample	$\Delta H$ (J/g)	$T_{\text{onset}}$ (°C)	$T_{\text{peak}}$ (°C)
Mitotano	78.68	76.3	77.1
Mitotano S	76.4	72.8	78.8
Mitotano R	73.1	86.5	70,4



#### **4. CONCLUSIONS**

The results contribute to determination of the absolute configuration for the mitotane enantiomers obtained by Silva Jr. and co-works [8]. Were for the first eluting was as S (-) and for the second eluting as R by the application of CD and polarimetry. The thermal behavior of mitotane and its enantiomers R and S showed different values in the peak and melting temperatures, as well as, enthalpy variation obtained by DSC curves, confirming structural differences between these compounds. Thus, the results show that the application of DSC provides a powerful tool to identify the enantiomeric species, however, TG / DTG does not allow such differentiation.

#### **Acknowledgments**

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] Z.J. Li, M. T. Zell, E. J. Munson, D. J.W. Grant, Characterization of racemic species of chiral drugs using thermal analysis, thermodynamic calculation and structural studies, *J. Pharm. Sci.* 88 (1999) 337-346..
- [2] W. Weng, Q.H. Wang, B.X. Yao, Q.L. Zeng, Enantioseparation of amino acid derivatives on an immobilized network polymer derived from l-tartaric acid, *J. Chromatogr. A.* 1042 (2004) 81-87.
- [3] L. Toribio, M.J. Nozal, J.L. Bernal, E.M. Nieto, Use of semipreparative supercritical fluid chromatography to obtain small quantities of the albendazole sulfoxide enantiomers, *J. Chromatogr. A.* 1011 (2003) 155-161.

- [4] F. Antelo, C.C. Santana, T.L.M Alves, A.G. Barreto, Thermodynamic Study of Enantioseparation of Mitotane by Supercritical Fluid Chromatography, *Sep. Sci. Technol.* 47 (2012) 636–640.
- [5] S.K. Arora, R.B. Bates, Crystal structure of 1-(o-chlorophenyl)-1-(p-chlorophenyl)-2,2-dichloroethane, *J. Org. Chem.* 41(1976) 554–556.
- [6] B. Allolio, M. Fassnacht, Adrenocortical Carcinoma: Clinical Update, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91(2006) 2027-2037.
- [7] N. Purdie, K.A, Analytical applications of polarimetry optical rotator dispersion, and circular dichroism, *Anal. Chem.* 61(1989)77-89.
- [8] A.C. Silva Jr, A.G. Salles Jr, R.F. Perna, C.R.D. Correia, C.C. Santana, Chromatographic Separation and Purification of Mitotane Racemate in a Varicol Multicolumn Continuous Process, *Chem. Eng. Technol.* 35 (2012) 83-90.
- [9] H.R. Buser, M.D. Muller, Isomer-selective and enantiomer-selective determination of DDT and related compounds using chiral high-resolution gas chromatography/mass spectrometry and chiral HPLC. *J. Anal. Chem.* 67(1995)2691-2698.
- [10] T. Cantillana, L. Eriksson, (2S)-1,1-Dichloro-2-(2-chlorophenyl)-2-(4-chlorophenyl)ethane, *Acta Crystallogr. Sect. E: Struct. Rep. Online.* E65(2009)297.

## **4.2. Avaliação de carreadores lipídicos nanoestruturados carregados com S**

**(-)-o, p'-DDD**

*Assessment of the S(-)-o,p'-DDD loading in Nanostructured Lipid Carriers*

Artigo submetido ao periódico  
*Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*

## **Assessment of the S(-)-*o,p'*-DDD loading in Nanostructured Lipid Carriers**

Carla Aiolfi Guimarães<sup>1,2</sup>, Carolina Ribeiro Camerin Grando<sup>1</sup>, Lucildes Pita Mercuri<sup>3</sup>, Jivaldo do Rosário Matos<sup>4</sup>, Cesar Costapinto Santana<sup>2</sup> and Maria Helena Andrade Santana<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory for Development of Biotechnological Processes, School of Chemical Engineering, University of Campinas, Campinas, Brazil

<sup>2</sup> School of Chemical Engineering, University of Campinas, Campinas, Brazil

<sup>3</sup>Department of Exact and Earth Sciences, Federal University of São Paulo, Diadema, São Paulo, Brazil

<sup>4</sup>Department of Fundamental Chemistry, Institute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

\*Corresponding author - Department of Biotechnological Processes, School of Chemical Engineering, State University of Campinas (UNICAMP), Av. Albert Einstein, 500 São Paulo, Campinas 13083-970, Brazil.

e-mail: lena@feq.unicamp.br+ 55 19 35213921



## Abstract

The aim of this work was to determine the capability of nanostructured lipid carriers (NLCs) to encapsulate the enantiomeric form, S(-)-*o,p'*-DDD, of mitotane (*o,p'*-DDD). The S(-)-*o,p'*-DDD enantiomer was the most effective at producing limited cytotoxicity on the human adrenocortical cell line because it required the lowest concentration as reported in the literature. The NLCs were prepared by the high pressure homogenization method using a binary mixture of polyoxyethylene (40) stearate and capric/caprylic triglyceride (70:30, w/w) as lipids and Tween80/Span 85 as surfactants. The S(-)-*o,p'*-DDD loaded NLCs were characterized by mean diameter, zeta potential (ZP), polydispersity index (PI), differential scanning calorimetry (DSC), thermogravimetry (TG)/ derivative thermogravimetry (DTG) and scanning electron microscopy. DSC and TG/DTG studies indicated complete drug encapsulation within the nanoparticle matrix as an amorphous form. The mean diameter and polydispersity index of S(-)-*o,p'*-DDD loaded NLCs were  $95.36 \pm 0.18$  nm and 0.29, respectively; while its zeta potential was higher than the unloaded or *o,p'*-DDD loaded NLCs. A higher entrapment efficiency (100%) and drug loading (0.31) was obtained for S(-)-*o,p'*-DDD loaded NLCs compared with *o,p'*-DDD loaded NLCs (81.46% and 0.25, respectively) for the same initial drug concentration. Similar to the *o,p'*-DDD loaded NLCs, NLCs loaded with S(-)-*o,p'*-DDD were stable for 28 days of storage at 4°C. Hence, NLCs are promising carriers for encapsulating S(-)-*o,p'*-DDD and for future comparative studies on the intestinal absorption of racemic *o,p'*-DDD and the S(-)-*o,p'*-DDD enantiomer. The obtained results will contribute to enhancing adrenocortical carcinoma therapy.

Keywords: nanostructured lipid carriers, S(-)-*o,p'*-DDD, mitotane, zeta potential, thermal analysis.

## 1. Introduction

Lipid-based drug delivery systems are promising oral carriers due to their potential to increase the solubility and improve the oral bioavailability of poor water-soluble and/or lipophilic drugs [1].

Nanostructure lipid carriers (NLCs) are composed of a solid lipid matrix associated with a liquid lipid. NLCs are used for the delivery of lipophilic actives, which decreases the degree of organization of the solid lipid matrix and increases the drug loading capacity through the presence of amorphous imperfections or the generation of multiple states in the lipid matrix. Therefore, NLCs are able to accommodate a larger amount of drugs and reduce the drug outflow during storage compared to solid lipid nanoparticles. The NLC system also possesses many advantages, such as biocompatibility, sustained release, and the possibility of production on large industrial scale [2].

The racemic mitotane (*o,p'*-DDD) is used as a pharmacological choice for adjuvant therapy of adrenocortical carcinoma (ACC) [3]. *o,p'*-DDD is a chiral molecule with two enantiomers: R-(+)- *o,p'*-DDD and S-(-)- *o,p'*-DDD. As a registered drug for ACC treatment, *o,p'*-DDD is administered as a racemic mixture with an enantiomeric ratio equal to 1 [4]. This racemic mixture has been identified as a metabolism-activated toxicant in the adrenal cortex in several species including human [5], dog [6], mink [7] and bird [8]; however, its high toxic effects limits the response rates in ACC therapy.

Cantilana et al. [4] presented results from a pharmacokinetic study in Göttingen minipigs that indicate polymorphisms in the disposition of *o,p'*-DDD enantiomers. A study in placentas from healthy women (exposed to *o,p'*-DDD present in the environment) found an enantiomeric ratio of below 1, which implied that the distribution and/or kinetics of the two enantiomers were different and suggested a more rapid elimination of the first eluting enantiomer than the second [9]. Another study reported an enantiomer fraction of *o,p'*-DDD in the atmosphere (air and soil), suggesting a preferential depletion of one enantiomer over the other [10]. Asp et al. [11] found small differences in potency between the (R)-(+)-*o,p'*-DDD and (S)-(-)-

*o,p*-DDD enantiomers in cell culture. Both enantiomers caused concentration-dependent cytotoxicity in the human adrenocortical cell line. However, the (S)-(-)-*o,p*-DDD enantiomer was more effective at a lower concentration when compared with the (R)-(+)-*o,p*-DDD enantiomer.

In our previous *ex vivo* everted gut sac studies, we found that only S(-)-*o,p'*-DDD was detected in the permeated material from the free powder of the racemic mixture. Furthermore, the hydrophilicity of the drug limited its permeation to only 7%.

Considering the cytotoxicity of *o,p'*-DDD, the hydrophobic drug loading efficiency of NLCs and the effectiveness of S(-)-*o,p'*-DDD in tumor cells, the aim of this study was to investigate the capability of S(-)-*o,p'*-DDD loading of nanostructured lipid carriers (NLCs). The efficiency of *o,p'*-DDD loading of NLCs was used as a control.

## **2. Experimental Methods**

### **2.1. Materials**

*o,p'*-DDD was purchased from Yick-Vic Chemicals & Pharmaceuticals (China). S(-)-*o,p'*-DDD was obtained from the Laboratory of Bioseparation Process–Unicamp (Campinas, Brazil). The separation used was previously described by Silva et al. [12]. Crodamol<sup>®</sup> GTCC (capric/caprylic triacylglycerides) and Span<sup>®</sup> 85 (sorbitan trioleate) were purchased from Croda (Brazil), polyoxyethylene (40) stearate (PEG 40 stearate) was purchased from Sigma (USA), and Tween<sup>®</sup> 80 (polysorbate 80) was purchased from Synth (Brazil). Ultrapurified water (Milli-Q Plus, Millipore) was used. All components had a purity of ~ 99%.

### **2.2. Methods**

#### **2.2.1 NLC Preparation**

The high shear homogenization followed by hot high pressure homogenization (HPH) technique was used for preparation of the aqueous NLC dispersions [13,14,15]. Briefly, the lipid phase, which is composed of polyoxyethylene (40)



stearate (7.0%, w/w), capric/caprylic triacylglycerols (3.0% w/w) and Span<sup>®</sup> 85 (1.76%, w/w), was melted at a temperature 5 °C above its melting point, and S(-)-*o,p'*-DDD (2.5%, w/w) 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, which was composed of Tween<sup>®</sup> 80 (3.23%, w/w) and water (q.s. 100%, w/w), at 75 °C for 60 s. The obtained pre-emulsion was homogenized at a high pressure, 500 bar, using a GEA NiroSoavi, model NS1001L2K, Panda 2K. After three homogenization cycles, the obtained o/w nanoemulsion was cooled at 25 °C and NLCs were generated by lipid recrystallization. The same protocol was used for unloaded and *o,p'*-DDD (2.5%, w/w) loaded NLCs.

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

The particle size of the NLCs, either unloaded or loaded with S(-)-*o,p'*-DDD or *o,p'*-DDD was analyzed with 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 NLC dispersions were diluted in distilled and filtered water (cellulose ester membrane, 0.45 mm, Millipore, USA) to remove suspended impurities and free S(-)-*o,p'*-DDD or *o,p'*-DDD. 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) was also calculated. The NLC particle size was also analyzed by intensity and number distribution.

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

### 2.2.3 Entrapment efficiency and drug loading

For the quantitative determination of S(-)-*o,p'*-DDD and *o,p'*-DDD, a spectrophotometric method was used. The amount of S(-)-*o,p'*-DDD or *o,p'*-DDD loaded into the nanoparticles was determined as follows: lyophilized NLCs were dissolved in methanol using a volume ratio of 1:3 (nanoparticle dispersion:methanol), submitted to ultrasonication (5 min), and stirred to extract the mitotane from the lipid matrices. Then, the mixture was centrifuged (30 min, 5000 rpm) to separate the nonsoluble components, and the supernatant containing the extracted S(-)-*o,p'*-DDD or *o,p'*-DDD. The entrapment efficiency (EE) of S(-)-*o,p'*-DDD and mitotane in NLCs was determined, as the ratio between actual and theoretical loading, by equation.

$$\text{EE (\%)} = \frac{\text{mass of entrapped S(-)-}o,p'\text{-DDD or mitotane} \times 100}{\text{Initial mass of S(-)-}o,p'\text{-DDD or mitotane}} \quad (1)$$

Drug loading capacity (DL) was calculated by the ratio between the loaded S(-)-*o,p'*-DDD or mitotane and the total amount of the components of NLCs using the following equation .

$$\text{DL} = \frac{\text{mass of entrapped S(-)-}o,p'\text{-DDD or mitotane}}{\text{Mass of nanoparticles}} \quad (2)$$

### 2.2.3. S(-)-*o,p'*-DDD quantification

S(-)-*o,p'*-DDD was quantified by spectrophotometry at a 268 nm wavelength (Hitachi, model U2001), as described for mitotane according to the U.S. Pharmacopoeia (2007) [17]. The samples were solubilized in methanol and the amount of S(-)-*o,p'*-DDD or *o,p'*-DDD was determined through a standard curve generated by absorbance measurements recorded at different *o,p'*-DDD concentrations.

#### **2.2.4. Evaluation of short term temperature stability**

The stability of the dispersions of NLCs loaded with S(-)-*o,p'*-DDD was evaluated for 28 days. Briefly, the samples were stored in the 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 calculation. The physical stability of the dispersions was also monitored by visual observations and by optical microscopy (Bel, model B3), in which the presence of S(-)-*o,p'*-DDD crystals in non-stable dispersions was detected without the necessity of drying. The presence of suspended unloaded S(-)-*o,p'*-DDD crystals was detected by scanning electron microscopy (SEM) (Quanta 600 FEG, FEI, Hillsboro, USA) with an EDS detector (SDD Technology, Bruker, Bremen, Germany) coupled with a software analyzer (Esprit, Bruker, Bremen, Germany). The samples were previously metalized with a coating system (MED-020, Bal-tec, Balzers, Liechtenstein).

#### **2.2.5. Thermal analysis of S(-)-*o,p'*-DDD loaded NLCs**

The thermal behavior of unloaded and S(-)-*o,p'*-DDD loaded nanoparticles 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 weighing approximately 1-2 mg each. The samples were heated between 25-300 °C at a rate of 10 °C min<sup>-1</sup>, under a dynamic nitrogen atmosphere at a flow rate of 50 mL min<sup>-1</sup>. The DSC-50 cell was initially calibrated with metallic indium (mp 156.6 °C;  $\Delta H^{\circ}_{\text{melt}} = 28.54 \text{ Jg}^{-1}$ ) and zinc (mp 419.6 °C;  $\Delta H^{\circ}_{\text{melt}} = 115,8 \text{ Jg}^{-1}$ ). TG/DTG experiments were performed on a thermobalance (model TGA-50, Shimadzu) using platinum crucibles in which 0.4 mg (approx.) of each individual sample were heated between 25- 400 °C at a rate of 10 °C min<sup>-1</sup> under an air atmosphere at a flow rate of 50 mL min<sup>-1</sup>. 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).

### 2.3. Statistical Analysis

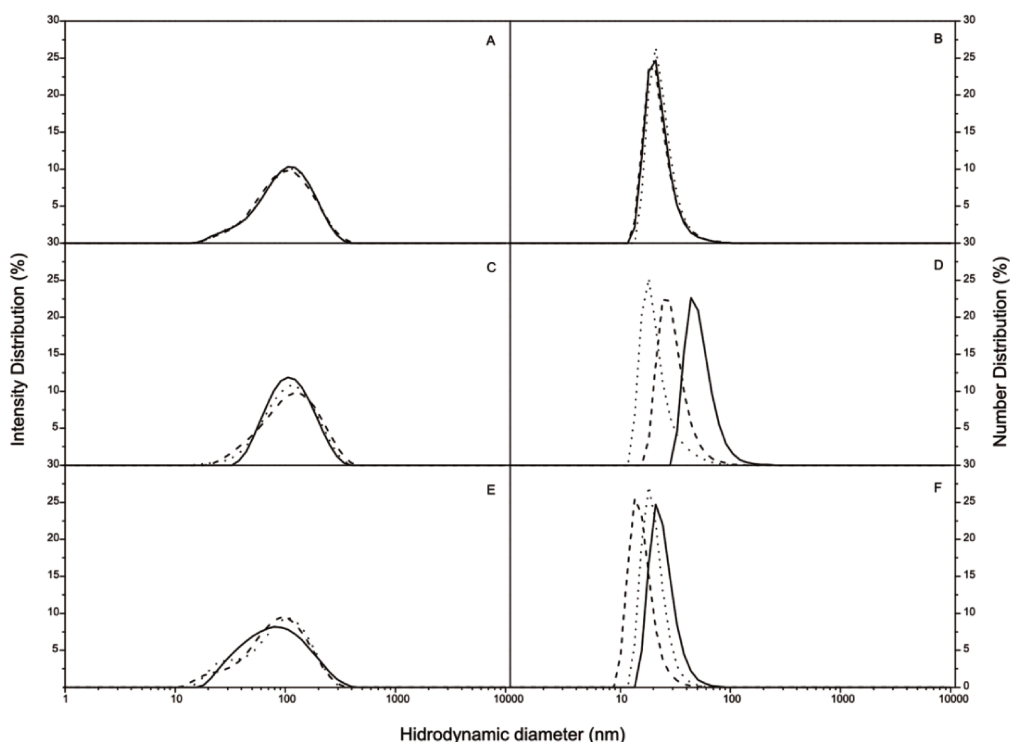
The variance was analyzed by the ANOVA method, and the media was compared with Tukey's post-hoc test at a 5% probability level ( $p < 0.05$ ).

## 3. Result and Discussion

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

The intensity distribution showed populations that ranged from 10 to 1000 nm for unloaded NLCs, and the width of the intensity distribution of NLCs loaded with S(-)-o,p'-DDD and o,p'-DDD was reduced. The intensity distributions (I-distributions) whose intensity was proportional to the particle diameter to the sixth power ( $I \propto D^6$ ) underestimated the number of small particles that appeared in a 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 the results, the NLC formulations showed populations that ranged from 10 to 1000 nm, with predominant populations approximately 20 nm (Fig. 1).

The width of the distributions reveals the presence of surfactant micelles, nanoparticles and aggregates in a dynamic equilibrium in the dispersions. The small predominant NLC diameters of approximately 20 nm are most likely due to the population of mixed micelles of surfactants and polyoxyethylene (40) stearate. The steric repulsion of the polyoxyethylene chains on the surface of the nanoparticles reduces the incorporation of the pegylated lipid in the packed structure of NLCs, and induces the formation of the mixed micelles. Thus, the polyoxyethylene (40) stearate remains in the mixed micelles and NLCs under dynamic equilibrium. These effects are reflected in the multiple curves (Fig. 1 b, d and f) of the distribution-N of the NLCs.



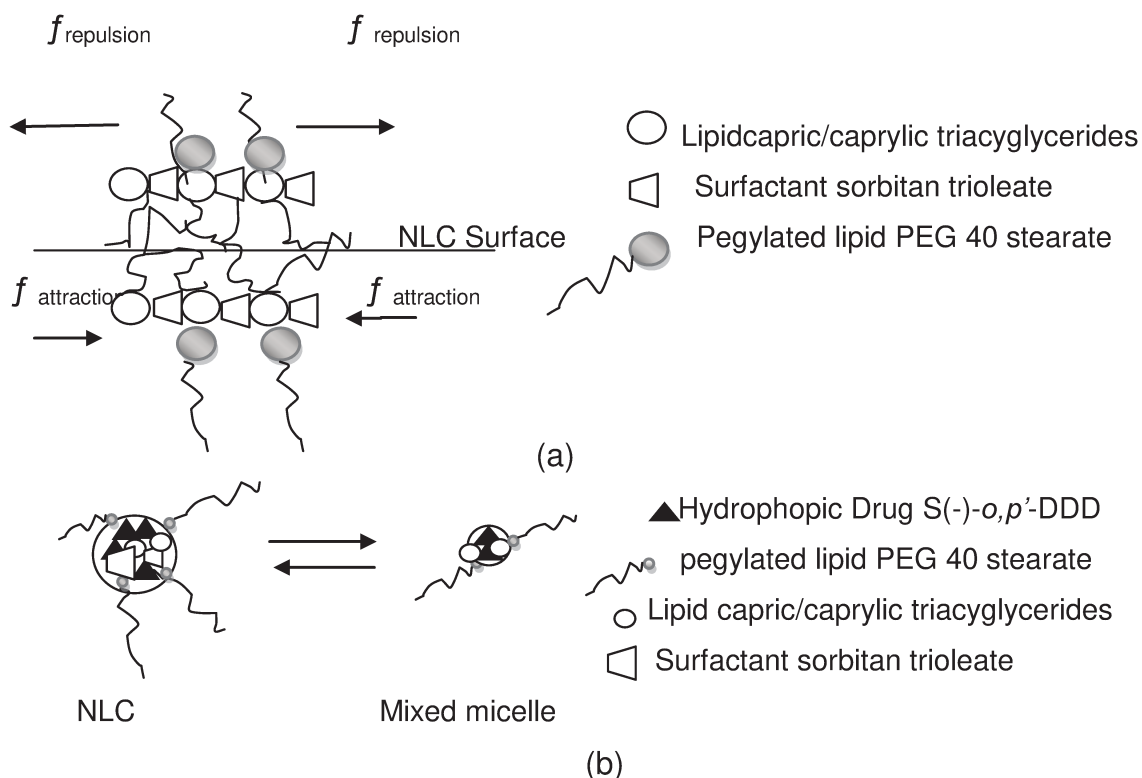
**Fig. 1.** Size distribution profiles of NLCs. Unloaded NLCs (a and b); NLCs loaded with *o,p'*-DDD (c and d); and NLCs loaded with *S(-)-o,p'*-DDD (e and f). Intensity distributions (Left, a, c and e) and number distributions (Right, b, d and f).

The multiple curves represent individual measurements of different samples of NLCs. Smaller nanoparticles with a low polydispersity index were obtained for unloaded *o,p'*-DDD compared with unloaded *S(-)-o,p'*-DDD. These differences in the polydispersity index indicate the entrapment of *S(-)-o,p'*-DDD in the lipid matrices. The NLCs loaded with *S(-)-o,p'*-DDD showed the presence of a small population with smaller particles when compared with NLCs loaded with *o,p'*-DDD. Table 1 summarizes the Z-average, polydispersity index (PI) and zeta potential (ZP) for unloaded, *S(-)-o,p'*-DDD loaded NLCs and *o,p'*-DDD loaded NLCs.

**Table 1.** Z-average, polydispersity index (PI) and zeta potential (ZP) of unloaded, S(-)-o,p'-DDD loaded NLCs and o,p'-DDD loaded NLCs.

<b>Formulation</b>	<b>Z-average (nm)</b>	<b>PI</b>	<b>ZP (mV)</b>
<b>NLC<sub>unloaded</sub></b>	91.79±0.690	0.265±0.004	-11.5±0.917
<b>NLC<sub>o,p'-DDD</sub></b>	94.5±0.264	0.223±0.014	-8.1±0.200
<b>NLC<sub>S(-)-o,p'-DDD</sub></b>	95.36±0.18	0.288±0.001	-20.9±0.586

The zeta potential was -11.5 mV for the unloaded NLCs and -8.1 mV for NLCs loaded with o,p'-DDD. The zeta potential increased to – 20.9 mV when S(-)-o,p'-DDD was entrapped in the NLCs. These zeta potential values indicate that the encapsulation of S(-)-o,p'-DDD causes changes in the distribution of lipids in the structure of the particles, generating a zeta potential much lower than NLCs loaded with o,p'-DDD or unloaded NLCs. This effect is most likely due to the greater affinity between the S enantiomer and the triacylglycerol, disfavoring incorporation of the pegylated lipid on the surface of the NLCs. As a consequence, the pegylated lipid leaves the surface of the NLCs and increases the zeta potential (in an absolute value) of the particles. Figure 2 shows a qualitative representation of the lipids in the particle structure (Figure 2a) and the dynamic equilibrium of the pegylated lipid in the particles and micelles (Figure 2b). Additionally, the highest zeta potential (in module) of the S(-)-o,p'-DDD loaded NLCs benefits the stability of storage due to the repulsion among the particles.



**Fig. 2** (a) Schematic representation of the lipid packing of the polyoxyethylene chains on the surface of NLCs and the balance of forces in the structure. (b) Dynamic equilibrium of the pegylated lipid in the structure of NLCs and in micelles.

### 3.1.2. Entrapment efficiency and drug loading

The NLCs show an 81.46% entrapment efficiency for initial *o,p'*-DDD (2.5 g) and a 0.25 drug loading of *o,p'*-DDD / g of nanoparticles, while the entrapment efficiency was 100% for initial S(-)-*o,p'*-DDD (2.5 g) and a drug loading of 0.31 of S(-)-*o,p'*-DDD / g of nanoparticles, indicating a 24% increase compared with NLCs loaded with *o,p'*-DDD. These results show that the S(-)-*o,p'*-DDD enantiomer has a higher affinity for the lipid compared with *o,p'*-DDD.

The imperfections and amorphous regions in NLCs are an advantage for drug encapsulation [18]. This is because the majority of lipophilic drugs solubilize better in amorphous than in crystalline domains.

### 3.1.3. Evaluation of storage stability

During the 28 day observation period at 4 °C, the z-average, PI and ZP did not change, indicating good performance of the surfactants Tween 80 and Span 85 on stabilization of the particles in a colloidal dispersion (Table 2).

The lipids used also contribute to stabilization of the nanoparticles. The mixture of medium chain triglycerides (e.g., capric/caprylic triglycerides, which are neutral oils) and stearate 40 polyoxyethylene (polyethoxylated derivatives of stearic acid), the main components of NLCs, has advantages like high stability against oxidation during storage and on solubilization of hydrophobic drugs.

**Table 2.** Stability profile of S(-)-*o,p'*-DDD loaded NLCs on the day of preparation and after 1, 7, 14, 21, and 28 days post-preparation (n=3).

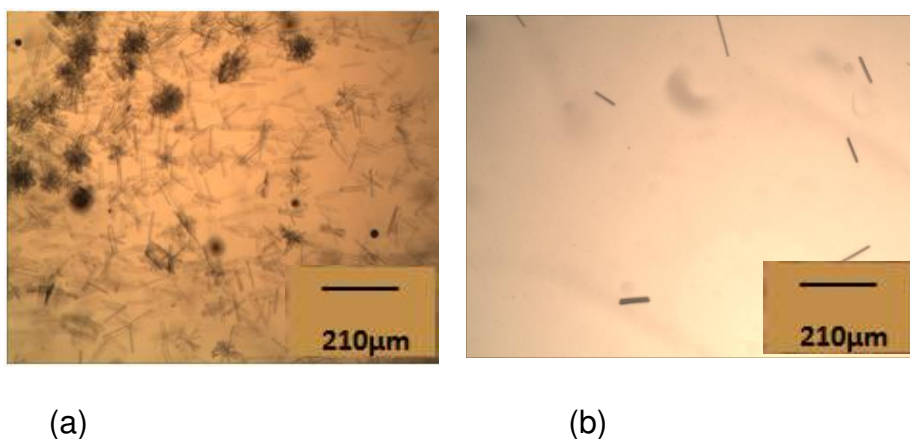
Time (days)	Z-average (nm)	PI	ZP (mV)
Fresh	95.36±0.18	0.288±0.001	-20.9±0.586
7	95.03±0.56	0.261±0.003	-17.8±0.35
14	95.86±0.23	0.272±0.004	-22.0±0.709
21	97,51±0.41	0.256±0.001	-20.6±0.346
28	98.25±0.43	0.252±0.004	-17.5±0.666

The physical stability was also monitored by macroscopic observation. Visual observation of the S(-)-*o,p'*-DDD loaded NLC dispersions for 28 days indicated stability through a constant bluish appearance of the dispersions without any crystal sedimentation during storage. A similar stability was found for the *o,p'*-DDD loaded NLCs.



SEM images confirm that crystal structures were absent in the NLC dispersions, which suggest the absence of unencapsulated S(-)-*o,p'*-DDD. The requirement of an aqueous-free preparation for SEM analysis necessitates the drying of lipid nanoparticle formulations, and this process caused NLC agglomeration (data not shown).

Optical microscopy (Fig. 3 A and B) was also used as an additional method to confirm the absence of agglomerates and the S(-)-*o,p'*-DDD crystal structure in this nanoparticle dispersion, and it also confirmed the stability of the formulation.



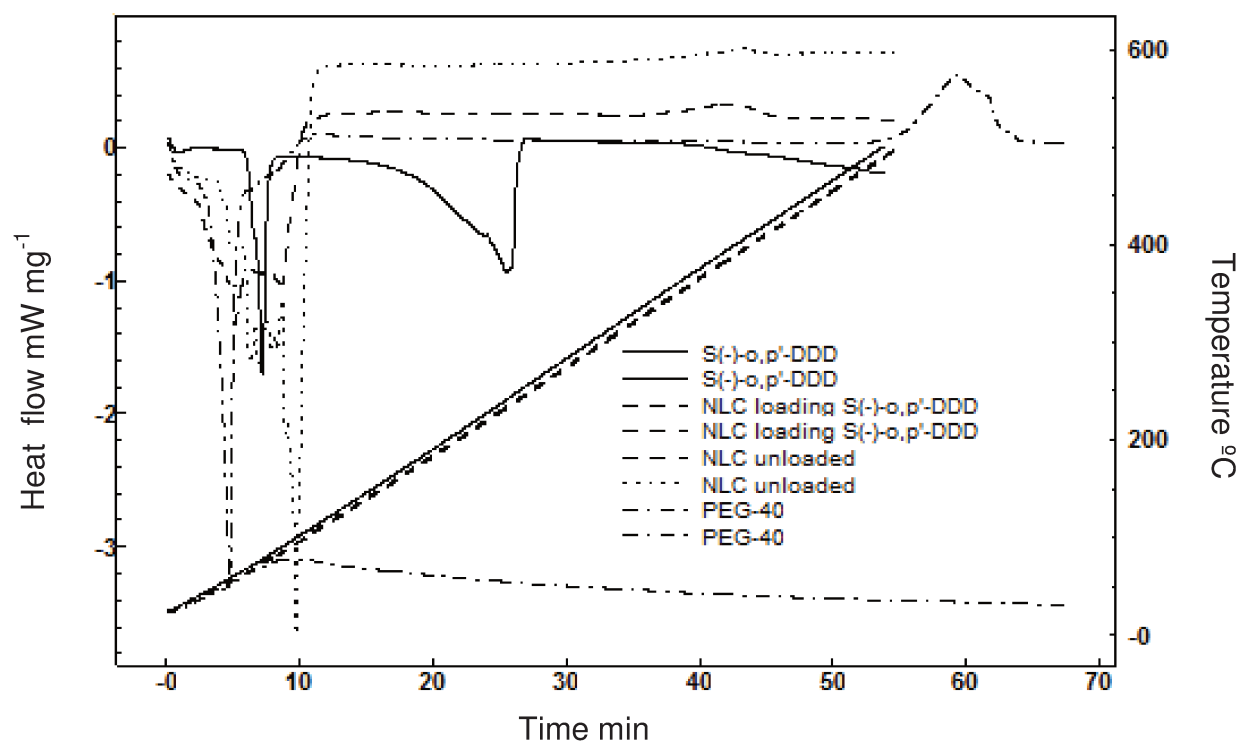
**Fig. 3** Optical microscopy images of (a) S(-)-*o,p'*-DDD free powder; (b) fresh S(-)-*o,p'*-DDD loaded NLCs.

#### 3.1.4. Thermal analysis of S(-)-*o,p'*-DDD in NLCs

The DSC curves for S(-)-*o,p'*-DDD, PEG 40, fresh unloaded NLCs and S(-)-*o,p'*-DDD loaded NLCs are shown in Figure 4. The data obtained from these curves are shown in Table 3. Figure 4 also includes the heating rate used in the assays. The S(-)-*o,p'*-DDD DSC curve shows an endothermic peak of melting at  $\sim 78.8$  °C followed by another endothermic event, in this case one that refers to the thermal decomposition characteristic, at  $\sim 237.66$  °C [19]. The polyoxyethylene (40) stearate (PEG-40) shows an endothermic peak of melting at  $\sim 49.3$  °C. S(-)-*o,p'*-DDD loaded NLCs show two endothermic peaks: the first at  $\sim 66.8$  °C and another at  $\sim 83.1$  °C, and an exothermic event at  $\sim 381$  °C, while the unloaded NLCs show endothermic peaks at  $\sim 69.5$ ,  $68.1$  and  $86.3$  °C. The S(-)-*o,p'*-DDD loaded NLCs

show an interaction between S(-)-*o,p'*-DDD and NLC lipids by changes in peak temperatures and their corresponding enthalpies. Comparing the unloaded and S(-)-*o,p'*-DDD loaded NLC curves, it was observed that the curve of the S(-)-*o,p'*-DDD loaded NLCs moves toward the S(-)-*o,p'*-DDD and PEG-40 curves, indicating the dynamic equilibrium depicted in Figure 2 and confirming the result of the increase in the absolute value of the zeta potential (Table 1).

The absence of an endothermic event relative of the thermal decomposition of S(-)-*o,p'*-DDD indicates the formation of an amorphous dispersion of S(-)-*o,p'*-DDD in the lipid matrix.

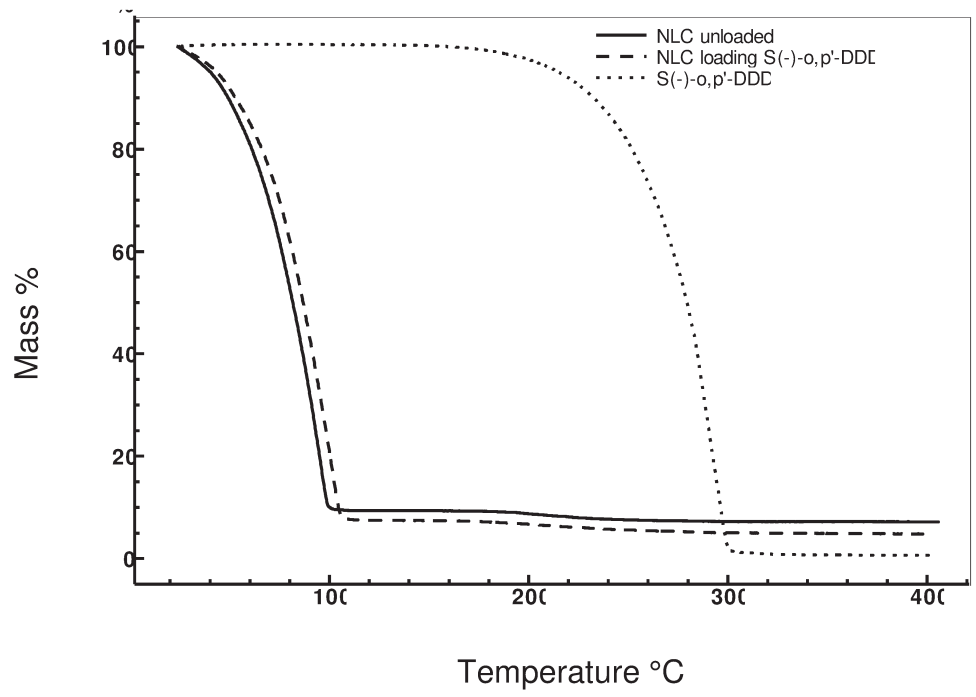


**Figure 4.** DSC curves and heating rate for S(-)-*o,p'*-DDD (free drug), polyoxyethylene (40) stearate (PEG-40), S(-)-*o,p'*-DDD loaded NLCs and unloaded NLCs (empty NLC). The curve of S(-)-*o,p'*-DDD loaded NLCs moves toward the S(-)-*o,p'*-DDD and PEG-40 curves, demonstrating the entrapment of S(-)-*o,p'*-DDD in the NLCs and also the association of PEG 40.

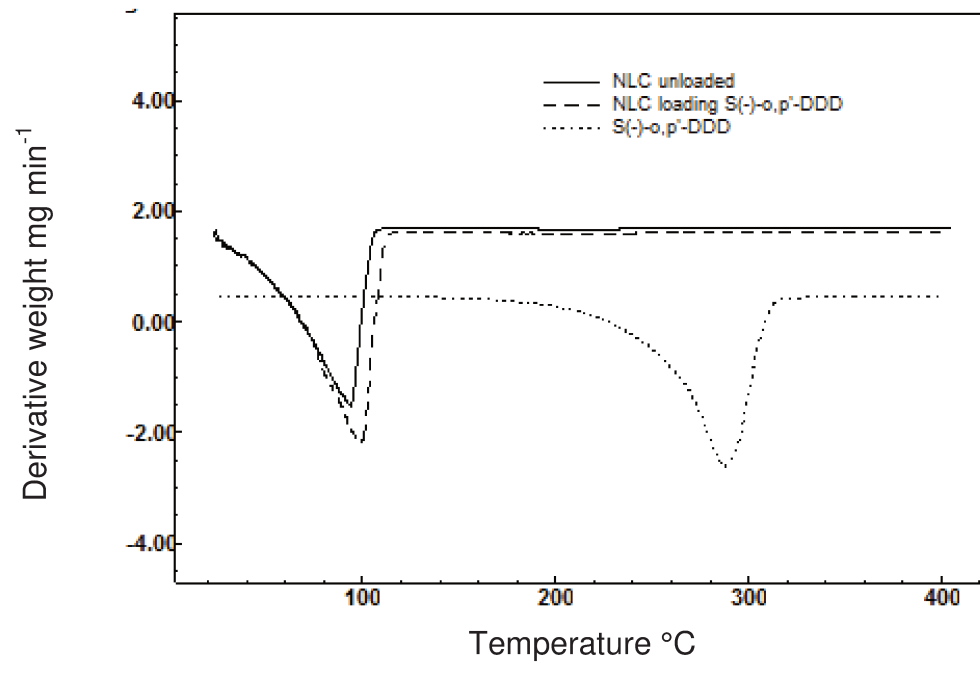
**Table 3.** DSC curve data.

	$\Delta H/$ (J/g)			$T_{\text{onset}}/^{\circ}\text{C}$			$T_{\text{peak}}/^{\circ}\text{C}$		
	$\Delta H_1$	$\Delta H_2$	$\Delta H_3$	$T_{\text{onset}1}$	$T_{\text{onset}2}$	$T_{\text{onset}3}$	$T_{\text{peak}1}$	$T_{\text{peak}2}$	$T_{\text{peak}3}$
<b>S(-)-<i>o,p'</i>-DDD</b>	76.4			72.8			78.8		
<b>PEG-40</b>	182.3			43.6			49.3		
<b>NLC</b> <sub>S(-)-<i>o,p'</i>-DDD-load</sub>	63.6	17.7		63.9	78.1		66.8	83.1	
<b>NLC</b> <sub>unloaded</sub>	1.4	7.1	138.9	61.3	61.6	82.8	69.5	68.1	86.3

The TG and DTG curves shown in Figure 5 showed the thermal decomposition steps of the S(-)-*o,p'*-DDD, unloaded NLCs and S(-)-*o,p'*-DDD loaded NLC, and the data obtained from the curves are shown in Table 4. The S(-)-*o,p'*-DDD loaded and unloaded NLCs had a lower thermal stability compared with free S(-)-*o,p'*-DDD. Comparing loaded with unloaded NLCs, the thermal stability increased in loaded NLCs due to the presence of S(-)-*o,p'*-DDD, which indicated that the affinity between the enantiomer and the lipids promoted its encapsulation in the lipid matrix.



(a)



(b)

**Fig. 5** TG (a) and DTG (b) curves of S(-)-o,p'-DDD (free drug), S(-)-o,p'-DDD loaded NLCs, unloaded NLCs (free NLCs) showing an affinity between the enantiomer and the lipids, which promoted its encapsulation in the lipid matrix.

**Table 4.** Data for the TG and DTG curves.

	$\Delta m / \%$	$\Delta T / ^\circ\text{C}$	$T_{\text{peak}} / ^\circ\text{C}$
S(-)- <i>o,p'</i> -DDD	98.3%	180-320	294.4
<b>NLC</b> <sub>S(-)-<i>o,p'</i>-DDD-load</sub>	92.6%	22-120	96.4
<b>NLC</b> <sub>unloaded</sub>	90.7%	22-120	99.0

#### 4. Conclusions

The S(-)-*o,p'*-DDD enantiomer was more efficiently encapsulated into NLCs than racemic *o,p'*-DDD, producing particles with a zeta potential with a higher negative value. The NLCs were stable for 28 days at 4 °C, and therefore, the NLCs developed in this study are promising carriers to encapsulate S(-)-*o,p'*-DDD for future comparative studies on the pharmacokinetics of the racemic and the S(-)-*o,p'*-DDD forms of *o,p'*-DDD.

#### Acknowledgements

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

#### References

- [1] O'Driscoll CM, Griffin BT. Biopharmaceutical challenges associated with drugs with low aqueous solubility-The potential impact of lipid-based formulation. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2008;60:617-24.
- [2] Müller RH, Radtke M, Wissing SA. Solid nanoparticle (SLN) and nanostructured lipid carrier (NLC) in cosmetic and dermatological preparation. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2002. 54:131-55.
- [3] Khan TS, Imam Juhlin HC, Skogseid B, Gröndal S, Tibblin S, Wilander E, Öberg K, Eriksson B. Streptozocin and *o,p'*DDD in the treatment of adrenocortical cancer patients: long-term survival in its adjuvant use. *Ann Oncol.* 2000;11:1281-7.

- [4] Cantillana T, Lindström V, Eriksson L, Brandt I, Bergman A. Interindividual differences in *o,p'*DDD enantiomer kinetics examined in Göttingen minipigs. *Chemosphere*. 2009;76:16772.
- [5] Lindhe Ö, Skogseid B, Brandt I. Cytochrome P450- Catalyzed binding of 3-methylsulfonyl-DDE and *o,p'*-DDD in human adrenal *Zona Fasciculata/Reticularis*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2002;87:1319-26.
- [6] Nelson AA, Woodard G. Severe adrenal cortical atrophy (cytotoxic) and hepatic damage produced in dogs by feeding 2,2-bis(parachlorophenyl)-1,1-dichloroethane (DDD or TDE). *Arch Pathol Lab Med.* 1949;48: 387-94.
- [7] Jönsson CJ, Lund BO, Brandt I. Adrenocorticolytic DDT-metabolites: studies in mink, *Mustela vison* and otter, *Lutra lutra*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1993 2:41-53.
- [8] Jönsson CJ, Lund BO, Brunström B, Brandt I. Toxicity and irreversible binding of two DDT-metabolites - 3-methylsulphonyl-DDE and *o,p'*-DDD - in adrenal interrenal cells in birds. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 1994;13:1303-10.
- [9] Shen H, Virtanen HE, Main KM, Kalevac M, Andersson AM, Skakkebæk NE, Topparic J, Schramma KW. Enantiomeric ratios as an indicator of exposure processes for persistent pollutants in human placentas. *Chemosphere*. 2006;62:390-95.
- [10] Venier M, Hites RA. Chiral organochlorine pesticides in the atmosphere. *Atmos. Environ.* 2007;41:768-75.
- [11] Asp V, Cantillana T, Bergman Å, Brandt I. Chiral effects in adrenocorticolytic action of *o,p'*-DDD (*o,p'*-DDD) in human adrenal cells. *Xenobiotica*. 2010;40:177-83.
- [12] Silva Jr AC, Salles Jr AG, Perna RF, Correia CRD, Santana CC. Chromatographic Separation and Purification of *O,p'*-DDD Racemate in a Varicol Multicolumn Continuous Process. *Chem Eng Technol.* 2012;35:83-90.
- [13] Mehnert W, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv. Drug Delivery Rev.* 2001;47:165-96.
- [14] Müller RH, Lucks JS. Azneitoffträger aus festen Lipidteilchen: feste Lipid Nanosphären (SLN).1996. European Patent number: 0605497.
- [15] Wong HI, Wu XY, Bendayan R, Li Y, Rauth MA, Nanotechnology for Cancer Therapy. CRC Press. 2007:741-776.

[16] Severino P., Santana MH, Souto EB. Optimizing SLN and NLC by 2<sup>2</sup> full factorial design: Effect of homogenization technique. *Mater. Sci. Eng., C*. 2012;32:1375–79.

[17] United States Pharmacopeia. United States Pharmacopeial Convention: National Formulary vol. 3 Rockville MD; 2007.pp. 2674.

[18] Das S, Ng WK, Tan RB. 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*. 2012;47:139-51.

[19] Yu-Hsin L, Yu-Shao C, Tzu-Chin W, Li-jen C. Enhancement of dissolution rate of mitotano and warfarin prepared by using microemulsion systems. *Colloids Surf., B*. 2011;85:366-72.





**4.3. Permeação intestinal *ex-vivo* e resistência ao pH de carreadores  
lipídicos nanoestruturados carregados com S (-)-o, p'-DDD**

*Ex-vivo* Intestinal permeation and *in-vitro* pH resistance of (S)-(-)-o,p-DDD loaded  
in Nanostructured Lipid Carriers

Artigo a ser submetido ao periódico  
journal of Pharmaceutical Sciences

***Ex-vivo* Intestinal permeation and *in-vitro* pH resistance of (S)-(-)-*o,p*-DDD loaded in Nanostructured Lipid Carriers**

Carla Aiolfi Guimarães<sup>1,2</sup>, Carolina Ribeiro Camerin Grando<sup>1</sup>, Eneida de Paula<sup>3</sup>  
Cesar Costapinto Santana<sup>2</sup> and Maria Helena Andrade Santana<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratory for Development of Biotechnological Processes, School of Chemical Engineering, University of Campinas, Campinas, Brazil

<sup>2</sup>Laboratory of bioseparation, School of Chemical Engineering, University of Campinas, Campinas, Brazil

<sup>3</sup>Biomembranes Laboratory, School of Biology, 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**

Adrenocortical carcinoma is a malignant disease and the medical therapy treatment is mitotane, an insecticide derivative, is administered as a racemic mixture with two enantiomers: R-(+)-*o,p'*-DDD and S-(-)-*o,p'*-DDD. As reported in the literature the S-(-)-*o,p'*-DDD form was more effective with lower concentration in the cytotoxicity in adrenocortical cell line. Nanostructure Lipid Carriers (NLCs) are the nanostructure lipid which are used for the delivery of lipophilic actives which help to increase the solubility of poorly water soluble drugs. This study aimed to prepare NLCs of (S)-(-)- *o,p'*-DDD in order to evaluate the intestinal permeation and retention of (S) - (-) - *o, p'*-DDD in the NLCs in different pH values. The results showing that NLCs was nano-size particles of 95.36 nm, polydispersity index 0.288, with low zeta potential  $-20.9 \pm$  mV with high encapsulation efficiency. The intestinal permeation indicated that the NLCs loading (S)-(-)- *o,p'*-DDD was greatly improved compared to micronized free powder and increased 3.4 the intestinal absorption when compared to NLCs loading mitotane. However, the pH test showed that around 70% of the (S)-(-)-*o,p'*-DDD loaded was retained in the NLCs for 3h. These results indicated that the NLC produced could potentially be exploited as a carrier with improved entrapment.

**Keywords:** Adrenocortical carcinoma, mitotane, S(-)-*o,p'*-DDD, Nanostructure Lipid Carriers, everted gut sac model, in vitro models, Intestinal absorption, Lipids, Permeability, Cancer , Nanoparticles.

## **Abbreviations used:**

Adrenocortical carcinoma (ACC), Nanostructure Lipid Carriers (NLCs), polydispersity index (PI), zeta potential (ZP) were analyzed by dynamic laser scattering (DLS), MDR1 (multidrug resistance protein or P-glycoprotein), entrapment efficiency (EE), Drug loading capacity (DL).

## Introduction

Adrenocortical carcinoma (ACC) is a rare malignant disease with poor prognosis and an estimated incidence between 1 and 2 per million population annually.<sup>1-4</sup> there is a considerable incidence in southern Brazil with 3.4–4.2 cases per million children under 15 years, a rate 12–18 times higher than worldwide incidence.<sup>5,6</sup> This neoplasm is characterized by a high risk of recurrence and a dismal prognosis owing to unsatisfactory over all 5-year survival that ranges between 23% and 60%.<sup>7, 8-10</sup>

The clinical picture and the prognosis of patients affected by ACC appear to be rather disappointing. Following recent data acquisition, it is now established the opinion that ACC requires a multidisciplinary management. The crucial first therapeutic step is radical surgery.<sup>2, 11, 12</sup> However, the most widely used medical therapy for patients that the surgery is unsuitable is treatment with mitotane, an insecticide derivative o',p'-DDD (ortho, para', dichloro-, diphenyl-, dichloroethane) either alone or in combination with chemotherapeutic agents.<sup>10,13, 14, 15-21</sup> Unfortunately, given the high toxic effects resulting from mitotane therapy, the response rates are rather low in ACC.<sup>10,17,22</sup>

The growing interest in this neoplasia has encouraged molecular biology and pharmacology studies. In recent years research efforts have focused on the identification of molecular biomarkers of this neoplasia. The purpose of these studies is to improve the diagnostic and therapeutic options in ACC. Despite advances in the studies of ACC, prognosis remains very poor. Although exciting results have been obtained in lab regarding new therapies, their application in clinical practice has been disappointing.<sup>23</sup>

The adrenocortical cancer is resistant to classic chemotherapy. The cause of this resistance has been attributed to the presence of high levels of a protein called MDR1 (multidrug resistance protein or P-glycoprotein) encoded by the ABCB1 gene. This membrane glycoprotein acts as a drug efflux pump, which pumps out chemotherapeutic agents<sup>4</sup>. Normal cells as well as cancerous adrenal cortical cells

have high levels of MDR1 protein. The success of Mitotane in treatment of ACC is due in part to its ability to inhibit the MDR1 protein. Clinical trials with other MDR1 inhibitor compounds combined with standard chemotherapeutic agents have shown only modest benefits. This indicates that there may be other MDR1-independent drug-resistance mechanisms which are responsible for the resistance.<sup>24</sup>

Mitotane is poorly absorbed (ca. 40 - 60%) due to its lipophilicity, a significant amount (ca. 40%) is stored mainly in adipose tissue and also in liver, brain and adrenal tissues. This is the major factor responsible for the need of mitotane high dose administration (up to 4-6 g/day) and the toxicity events related to the treatment.<sup>25, 26</sup>

In the literature, many studies have demonstrated the enhancement of bioavailability of lipophilic drugs encapsulated in nanocarriers and in some cases, an increase of permeability across the intestinal barrier has been established. Indeed, due to their small size, nanocarriers offer several advantages for oral administration. They can protect the drug against gastrointestinal degradation, as well as diffuse within the mucus, enhancing the ability for the nanocarrier-associated drug to be absorbed. These carriers can transport drug across the epithelial membrane serving as a vehicle for the drug.<sup>2, 3</sup> thus having a chance to reach the blood stream and being able to attain their pharmacological target while keeping their native structure.

Nanostructure Lipid Carriers (NLCs) are the nanostructure lipid dispersions with solid contents produced by high pressure homogenization. Lipid drug conjugate provide high loading capacity for lipophilic drugs for oral delivery which in turns help to increase the solubility of poorly water soluble drugs<sup>27, 28</sup>. We recently prepared and characterized lipid nanoparticle formulation for mitotane and the results showed that mitotane was efficiently encapsulated into the NLCs.

As a registered drug for ACC treatment, mitotane is administered as a racemic mixture with two enantiomers: R-(+)-*o,p'*-DDD and S-(-)-*o,p'*-DDD.<sup>29</sup> Establish innovative strategies that could be used to optimise the ACC treatment are

necessary. Moreover previous studies showed that enantiomeric separation of mitotane could be one interesting alternative for treatment of this cancer.

Pharmacokinetic study in Göttingenminipigs indicate polymorphisms in the disposition of mitotane enantiomers.<sup>29</sup> A study on placentas from healthy women (exposed to mitotane present in the environment) found an enantiomeric ratio of below 1, implying that the distribution and/or kinetics of the two enantiomers were different, suggesting a more rapid elimination of the first eluting enantiomer than the second.<sup>30</sup> Another study reported enantiomer fraction of mitotane in the atmosphere (air and soil) suggesting a preferential depletion of one enantiomer over the other.<sup>31</sup> Asp and co-workers<sup>32</sup> showed small but statistically significant differences in the effects on cell viability in potency between (R)-(+)-o,p-DDD and (S)-(-)-o,p-DDD, both caused concentration-dependent cytotoxicity in the human adrenocortical cell line. Although the (S)-(-)-o,p-DDD is more effective with lower concentration when compared to (R)-(+)-o,p-DDD. In our previous *ex vivo* everted gut sac studies found by HPLC analysis that from free powder of the racemic mixture just S(-)-o,p'-DDD was detected in the permeated material.

Considering the biological heterogeneity of this neoplasia, new therapeutic strategies and innovative approaches to overcome these current therapeutic limitations, could be the future in ACC treatment. Specifically, the aim of this paper is to prepare NLCs loaded with S(-)-o,p'-DDD by high shear followed by hot high pressure homogenization technique and evaluate the influence of these preparations on the *ex vivo* intestinal permeation and *in vitro* pH-resistance using NLCs loaded with mitotane as control.

## **Materials and Methods**

### **Materials**

Mitotane was purchased from Yick-Vic Chemicals & Pharmaceuticals (China); S(-)-o,p'-DDD was obtained at Laboratory of Bioseparation Process –Unicamp (Campinas, Brazil) the separation as described by Silva and co-workers.<sup>33</sup> Crodamol<sup>®</sup> GTCC (capric/caprylic triacylglycerides) 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 of glucose.

## **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 (CEUA/UFSCar Ethics in Research Committee, # 009/2012).

## **Preparation of NLCs**

The high shear homogenization followed by hot high pressure homogenization (HPH) technique were used for preparation of the aqueous NLCs dispersions.<sup>34,35,21</sup> Briefly, the lipids phase composed of polyoxyethylene (40) stearate (7.0%, w/w), triacylglycerols (3.0% w/w) and Span<sup>®</sup> 85 (1.76%, w/w) were melted at a temperature 5°C above its melting point and S(-)-*o,p'*-DDD (2.5%, w/w) 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, composed by Tween<sup>®</sup> 80 (3.23%, w/w) and water (q.s.100 %, w/w), both at 75 °C, during 60 s. The obtained pre-emulsion was homogenized at a high pressure, 500 bar, using a GEA NiroSoavi, model NS1001L2K, Panda 2K. After three homogenization cycles the obtained o/w nanoemulsion was cooled and NLCs were generated by lipid recrystallization. The same protocol was used for unloaded and mitotane (2.5%, w/w) loaded with NLCs.

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

The particle size of NLCs, either unloaded or loaded with S(-)-*o,p'*-DDD or 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 NLCs dispersions were diluted in distilled and filtered water (cellulose ester membrane, 0.45 mm, Millipore, USA) to remove suspended impurities or free S(-)-*o,p'*-DDD or 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 with 0.1 mM KCl solution the NLCs dispersions. All measurements were performed in triplicate.

### **S(-)-*o,p'*-DDD and mitotane quantification**

S(-)-*o,p'*-DDD was quantified by spectrophotometry at wavelength 268 nm (Hitachi, model U2001), as described for the mitotane at U.S. Pharmacopoeia (2007).<sup>36</sup> The samples were solubilized in methanol and the S(-)-*o,p'*-DDD or mitotane were determined through a standard curve generated by absorbance measurements recorded at different mitotane concentrations.

### **Entrapment efficiency and drug loading**

For the quantitative determination of S(-)-*o,p'*-DDD and mitotane, a spectrophotometric method was used. The amount of S(-)-*o,p'*-DDD or mitotane loaded into the nanoparticles was determined as follows: lyophilized 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, 5000 rpm) to separate the nonsoluble components and the supernatant containing the extracted S(-)-*o,p'*-DDD or mitotane was quantified as described. The entrapment



efficiency (EE) of S(-)-*o,p'*-DDD and mitotane in NLCs was determined, as the ratio between actual and theoretical loading, by equation.

$$\text{EE (\%)} = \frac{\text{mass of entrapped S(-)-}o,p'\text{-DDD or mitotane}}{\text{Initial mass of S(-)-}o,p'\text{-DDD or mitotane}} \times 100 \quad (1)$$

Drug loading capacity (DL) was calculated by the ratio between the loaded S(-)-*o,p'*-DDD or mitotane and the total amount of the components of NLCs using the following equation .

$$\text{DL} = \frac{\text{mass of entrapped S(-)-}o,p'\text{-DDD or mitotane}}{\text{Mass of nanoparticles}} \quad (2)$$

### Evaluation of *in vitro* NLCs pH resistance

The *in vitro* pH resistance was evaluated by the release of S(-)-*o,p'*-DDD or mitotane from NLCs. 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<sup>®</sup> 80. The released S(-)-*o,p'*-DDD or 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 NLCs dispersions loaded with S(-)-*o,p'*-DDD or 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 min and the same volume of fresh medium was added to maintain a constant volume. These aliquots were diluted in methanol and analyzed.

## Evaluation of intestinal permeation

The intestinal permeation of S(-)-*o,p'*-DDD and mitotane was evaluated using the everted gut sac model. The assay evaluated the permeation of S(-)-*o,p'*-DDD from the loaded NLCs, and compared these values with the absorption of pure S(-)-*o,p'*-DDD, NLCs loaded with mitotane and mitotane 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: cylindrus area 6 cm x 0,5 mn) of the intestine was immediately dissected and flushed with TC-199 without glucose; the solution was kept at 10 °C. The intestinal segment was gently everted with the aid of a flexible cotton swab (with 25 mm diameter) 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 of the mitotano or S(-)-*o,p'*-DDD in 25 mL of the TC199 medium with the addition of 10 mM glucose; the solutions were oxygenated (O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> = 95:5) and incubated at 37 °C. The everted sacs were collected by removing the sacs from the flasks after 120 min and externally washed with fresh TC199 medium. The contents of the intestinal sac were filtered through a 45 µm pore membrane. The concentration of S(-)-*o,p'*-DDD and mitotane in the outside medium was determined as described in S(-)-*o,p'*-DDD and mitotane quantification.

The samples were previously filtered and diluted in methanol to eliminate interferences (biological and nanoparticles compounds), afterwards submitted to ultrasonication for 5 min and centrifugation 5000 rpm for 15 min. The supernatant was used in these analyses. S(-)-*o,p'*-DDD and mitotane was quantified in the serosal (permeated) and mucosal (outside) sides of the sac. The permeability was calculated by the ratio between the S(-)-*o,p'*-DDD and mitotane concentration in the permeated and in the initial solution. The results were expressed in percentage

## **Statistical Analysis**

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

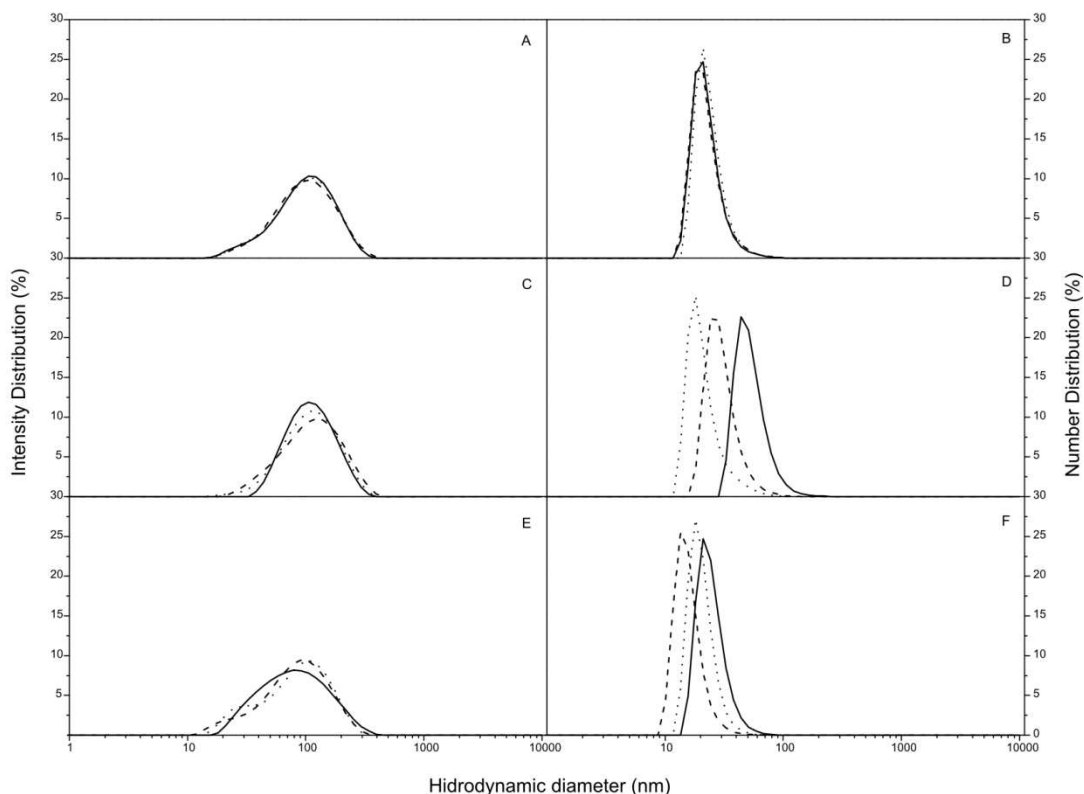
## **Results and discussion**

### **Characterization of NLCs**

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

The Intensity distribution showed populations that ranged 10 to 1000 for unloaded NLCs. The loaded with S(-)-o,p'-DDD and mitotane reduced the width of the distribution.

Intensity distributions (I-distribution) whose intensity is proportional to the particle diameter to sixth power ( $I \propto D^6$ ) under estimating small particles that appear in a 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 the results, the NLCs formulations showed populations that ranged from 10 to 1000 nm, with predominant populations around 20 nm (Fig. 1).



**Figure 1** Size distribution profiles of NLCs. Unloaded NLCs (A and B); NLCs loaded with o,p'-DDD (C and D) and NLCs loaded with S(-)-o,p'-DDD (E and F). Intensity distributions (Left, A, C and E); Number distributions (Right, B, D and F). The multiple curves represent individual measurements of different samples of NLCs.

The width of the distributions reveals the presence of micelles of the surfactants, nanoparticles and aggregates in a dynamic equilibrium in the dispersions. The small predominant diameters around 20 nm for NLCs are probably due to the population of mixed micelles of the surfactants and polyoxyethylene (40) stearate. The steric repulsion of the polyoxyethylene chains on the surface of the nanoparticles reduces the oration of the pegylated lipid in the packed structure of NLCs, and induces to the formation of the mixed micelles. Thus, the polyoxyethylene (40) stearate remains in the mixed micelles and NLCs under dynamic equilibrium. These effects are reflected in the multiple curves (Fig. 1- B, D and F) of the distribution-N of NLCs.

Smaller nanoparticles, with low polydispersity index were obtained for the unloaded and NLCs loaded with mitotano compared to NLCs loaded with S(-)-o,p'-DDD (Table 1). These differences indicate the entrapment of S(-)-o,p'-DDD in the lipid matrices. The NLCs loaded with S(-)-o,p'-DDD showed the presence of a small population with smaller particles when compared to NLCs loaded with o,p'-DDD.

**Table 1** The Z-average, polydispersity index and zeta potential for unloaded, S(-)-o,p'-DDD and o,p'-DDD loaded with NLCs.

<b>Formulation</b>	<b>Z-average (nm)</b>	<b>PI</b>	<b>ZP (mV)</b>
<b>NLC<sub>unloaded</sub></b>	91.79 ±0.690	0.265 ±0.004	-11.5 ±0.917
<b>NLC<sub>mitotane</sub></b>	94.5 ±0.264	0.223 ±0.014	-8.1 ±0.200
<b>NLC<sub>S(-)-o,p'-DDD</sub></b>	95.36 ±0.180	0.288 ±0.001	-20.9 ±0.586

Zeta potential was -11.5 mV for the unloaded NLCs and -8.1 mV for o,p'-DDD loaded with NLCs increased in module to - 20.9 mV when S(-)-o,p'-DDD was entrapped in NLCs. The values indicate the encapsulation of S(-)-o,p'-DDD causes changes in the distribution of lipids in the structure of the particles, generating a zeta potential much lower than o,p'-DDD loaded with NLCs or the unloaded NLCs. which Additionally the zeta potential benefits the stability of storage due to the repulsion among the particles. This effect is probably due to the greater affinity between the S enantiomer and the triacylglycerol, disfavoring incorporation of the pegylated lipid on surface of the NLCs. As a consequence, the pegylated lipid leaves the surface of NLC and increase of the zeta potential (in absolute value) of the particles.

### **Entrapment efficiency and drug loading**

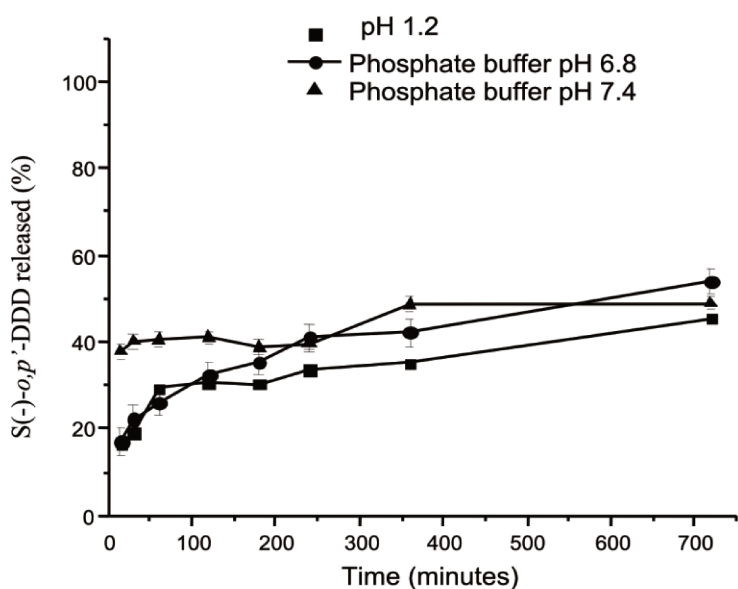
The NLCs shown 81.46 % entrapment efficiency for initial mitotano 2.5 g, performing the drug loading 0.25 of mitotane/ g of nanoparticles, while the entrapment efficiency of NLCs were 100 % for initial S(-)-o,p'-DDD (2.5 g) and the drug loading 0.31 of S(-)-o,p'-DDD/ g of nanoparticles, 24 % higher than NLCs

loaded with mitotane. This results showed that the S(-)-*o,p'*-DDD have higher affinity for the lipid when compared with mitotane.

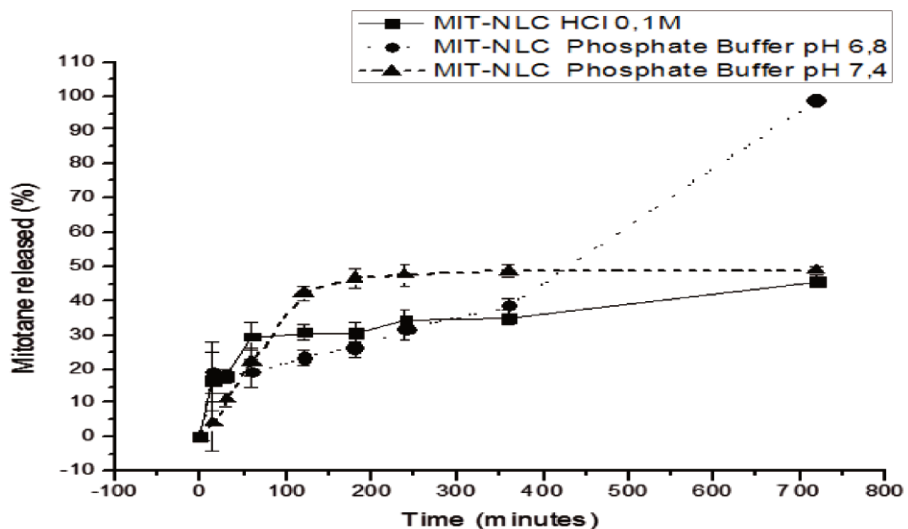
The imperfections and amorphous regions in NLCs benefit drug encapsulation [18]. This is due to the majority of lipophilic drugs solubilize better in amorphous than in crystalline domains.

### Evaluation of *in vitro* NLCs pH resistance

Figure 2 show the *in vitro* S(-)-*o,p'*-DDD resistance from NLCs over the range of pH values studied. The profiles displayed a release of S(-)-*o,p'*-DDD from NLCs over a period of 3 hours. The S(-)-*o,p'*-DDD was 70 % retained in the NLCs at pH 1.2 and 6.8 and 60 % at pH 7.4. The total S(-)-*o,p'*-DDD content had been release from polyoxyethylene (40) stearate undergo slight hydrolysis at acid and basic pH values, accounting for the release of S(-)-*o,p'*-DDD from NLCs caused by degradation of particles. Similar *in vitro* mitotane release from NLCs in the range of pHs was found ( Fig. 3).



**Figure 2** pH resistance of S(-)-*o,p'*-DDD from NLCs in three different dissolution media: 0.1 M HCl pH 1.2; phosphate buffer at pH 6.8 and 7.4. Data are means  $\pm$  S.D.,  $n = 6$ .



**Figure 3** pH resistance of mitotane (MIT) from NLCs in three different dissolution media: 0.1 M HCl pH 1.2; phosphate buffer at pH 6.8 and 7.4. Data are means  $\pm$  S.D.,  $n = 6$ .

The goal of this study was to investigate the influence of pH in the NLCs. However, in future work, it could be interesting to study the stability in simulated intestinal and gastric medium and *in vivo* studie because the characteristic of gastrointestinal media can modify the transit conditions.

According the literature after oral administration of mitotane tablets in humans (10 g/day), approximately 35 to 40 % of the product was absorbed (about 65 % is excreted unmetabolized in feces). 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.<sup>37</sup> In our case 30 % of S(-)-*o,p'*-DDD and mitotano was realized in the nanoparticle and even with 70 % of the drug in the nanoparticle could be more permeate in the gastrintestinal tract and be released into the blood stream than the tablets, thus the use of nanoparticles can increases the amount of permeation drugs like this have a reduction of dosage leaving less mitotane free and reducing the toxicity and greater acceptance of treatment by patients.

## Evaluation of intestinal absorption

The everted gut sac model is useful tool for studying physiological and molecular processes of absorption, providing physical and chemical information on the properties of the pharmaceuticals and ascertaining the role of the permeation facilitators and inhibitors of intestinal metabolism.

The permeation depends on the balance of its solubility in the aqueous environment of the gastrointestinal lumen and its capability to diffuse across the lipophilic apical membrane of enterocytes. Generally, drugs have to be dissolved in order to promote sufficient bioavailability. The solubility of a given drug directly depends on its solid-state properties, e.g. particle size, crystalline or amorphous state, wettability, and others. A primary requirement of a lipid-based formulation is its ability to retain a poorly soluble substance in a solubilized state at its matrix and to enhance solute-solvent interactions also after mixing with endogenous solubilizers like acids or basic medium, phospholipids produced naturally in the body or after intra-luminal processing prior to absorption.

The concentration ratios of S-(-)-*o,p'*-DDD and mitotane between serosal side (permeated) and mucosal side are shown in table 2.

**Table 2.** Mitotane and S-(-)-*o,p'*-DDD percentage in its free form and loaded in NLC quantified in the internal environment (the outer medium %) and at serosal side (permeated%) by everted gut sac method (n=6).

	% permeated	% outer médium
Mitotane free	7.68 ±3.22	22.83 ±0.61
Mitotane+olive oil	7.96 ±3.42	61.21 ±0.75
Mitotane NLCs	26.12 ±4.20	38.92 ±0.03
S-(-)- <i>o,p'</i> -DDD Free	5,11 ±0,94	61,21 ±0,99
S-(-)- <i>o,p'</i> -DDD NLC	89,89 ±8,61	5,84 ±1,02



The intestinal permeation during 120 minutes of S(-)-*o,p'*-DDD and mitotane free powder has no statistic difference. However the nanoparticles when compared to free powder were statistically different.

The surface charge and more especially the surface properties of nanocarriers seem to influence their transport by intestinal cells. More hydrophobic particles increase mucus transport in comparison to more hydrophilic particles.<sup>38</sup>

The intestinal permeation of NLCs loading S(-)-*o,p'*-DDD increased 3.4 times the intestinal permeation when compared to NLCs loading mitotano, 17.6 times when compared to of pure S(-)-*o,p'*-DDD and 11.3 when compared to mitotane dissolved in olive oil. This due to the higher entrapment efficiency and drug loading showed for S(-)-*o,p'*-DDD and greater affinity between the S(-)-*o,p'*-DDD and the triacylglycerol. disfavoring incorporation of the pegylated lipid on surface of the NLCs. As a consequence, NLCs becomes more hydrophobic thereby increasing the intestinal absorption.

## **Conclusion**

In this study NLCs were successfully prepared by the hot high pressure homogenization technique demonstrated reasonable S(-)-*o,p'*-DDD solubilization capacity. The lipophilic drug S(-)-*o,p'*-DDD was efficiently encapsulated into the nanoparticles. The permeation of NLCs in rat small intestine was greatly improved compared with that from free S(-)-*o,p'*-DDD and NLCs loaded with mitotane. However, NLCs showed increased stability against pH variations these results suggested that NLCs could be a promising carrier systems to improve the oral bioavailability of S(-)-*o,p'*-DDD and be a new therapeutic strategy for ACC treatment. More studies are needed to assess the biopharmaceutical properties of this formulation.

## 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. Cutler SJ, Young JL 1975. Third National Cancer Survey: Incidence Data. National Cancer Institute monograph 41, DHEW publication (N1H). Washington, DC: United States Government Printing Office. p 75–787.
2. Dackiw APB, Lee JE, Gagel RF, Evans DB. 2001. Adrenal cortical carcinoma. *World J Surg.* 25(7):914–926.
3. Bielinska M, Parviainen H, Kiiveri S, Heikinheimo M, Wilson DB. 2009. Origin and molecular pathology of adrenocortical neoplasms. *Vet Pathol.* 46(2):194–210.
4. Patalano A, Brancato V, Mantero F. 2009. Adrenocortical cancer treatment. *Horm Res Paediatr.* 71(1): 99–104.
5. Custódio G, Parise GA, Kiesel Filho N, Komechen H, Sabbaga CC, Rosati R, Grisa L, Parise IZ, Pianovski MA, Fiori CM, Ledesma JA, Barbosa JR, Figueiredo FR, Sade ER, Ibañez H, Arram SB, Stingham ST, Mengarelli LR, Figueiredo MM, Carvalho DC, Avilla SG, Woiski TD, Poncio LC, Lima GF, Pontarolo R, Lalli E, Zhou Y, Zambetti GP, Ribeiro RC, Figueiredo BC. 2013. Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. *J Clin Oncol.* 20:2619-26.
6. Michalkiewicz E, Sandrini R, Figueiredo B, Miranda EC, Caran E, Oliveira-Filho AG, Marques R, Pianovski MA, Lacerda L, Cristofani LM, Jenkins J, Rodriguez-Galindo C, Ribeiro RC. 2004. Clinical and outcome characteristics of children with adrenocortical tumors. An analysis of 254 cases from the International Pediatric Adreno-cortical Tumor Registry. *J Clin Oncol.* 22: 838-845.
7. Pianovski MA, Maluf EM, Carvalho DS de, Ribeiro RC, Rodriguez-Galindo C, Boffetta P, Zancanella P, Figueiredo BC. 2006. Mortality rate of adrenocortical tumors in children under 15 years of age in Curitiba, Brazil. *Pediatr Blood Cancer.* 47:56-60.
8. Wajchenberg BL, Pereira MAA, Medonca BB, Latronico AC, Carneiro PC, Alves VAF, Zerbini MCN, Liberman B, Gomes GC, MA Kirschner. 2000. Adrenocortical carcinoma: clinical and laboratory observations. *Cancer.* 88:711-736.
9. Bilimoria KY, Shen WT, Elaraj D, Bentrem DJ, Winchester DJ, Kebebew E, Sturgeon C. 2008. Adreno-cortical carcinoma in the United States: treatment utilization and prognostic factors. *Cancer.* 113:3130-3136.
10. Icard P, Goudet P, Charpenay C, Andreassian B, Carnaille B, Chapuis Y, Cougard P, Henry JF, Proye C. 2001. Adrenocortical carcinomas: surgical trends

and results of a 253-patient series from the French Association of Endocrine Surgeons study group. *World J Surg.* 25:891-897.

11. Allolio B, Hahner S, Weismann D, Fassnacht M. 2004. Management of adrenocortical carcinoma. *J. Clin. Endocrinol.* 60(3): 273–287.

12. Crucitti F, Bellantone R, Ferrante A, Boscherini M, Crucitti P. 1996. The Italian registry for adrenal cortical carcinoma: analysis of a multiinstitutional series of 129 patients. *Surgery.* 119(2):161–170.

13. Schteingart DE, Doherty GM, Gauger PG, Giordano TJ, Hammer GD, Korobkin M, Worden FP. 2005. Management of patients with adrenal cancer: recommendations of an international consensus conference. *Endocr Relat Cancer.* 12(3): 667–680.

14. Berruti A, Terzolo M, Sperone P, Pia A, Della Casa S, Gross DJ, Carnaghi C, Casali P, Porpiglia F, Mantero F, Reimondo G, Angeli A, Dogliotti L. 2005. Etoposide, doxorubicin and cisplatin plus mitotane in the treatment of advanced adrenocortical carcinoma: a large prospective phase II trial. *Endocr Relat Cancer.* 12(3): 657–666.

15. Bergenstal D, Lipsett M, Moy R, Hertz R: Regression of adrenal cancer and suppression of adrenal function in men by o, p'-DDD. 1959. *Trans Assoc Am Physicians.* 72:341.

16. Luton JP, Cerdas S, Billaud L, Thomas G, Guilhaume B, Bertagna X, Laudat MH, Louvel A, Chapuis Y, Blondeau P, Bonnin A, Bricaire H. 1990. Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy. *N Engl J Med.* 322(17):1195-1201.

17. Bukowski RM, Wolfe M, Levine HS, Crawford DE, Stephens RL, Gaynor E, Harker WG. 1993. Phase II trial of mitotane and cisplatin in patients with adrenal carcinoma: a Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol.* 11(1):161-165.

18. Khan TS, Imam H, Juhlin C, Skogseid B, Gröndal S, Tibblin S, Wilander E, Öberg K, Eriksson B. 2000. Streptozocin and o,p'DDD in the treatment of adrenocortical cancer patients: long-term survival in its adjuvant use. *Ann Oncol.* 11(10):1281–1287.

19. Schteingart DE. 2000. Conventional and novel strategies in the treatment of adrenocortical cancer. *Braz J Med Biol Res.* 33(10):1197–1200.

20. Hahner S, Fassnacht M. 2005. Mitotane for adrenocortical carcinoma treatment. *Curr Opin Invest Drugs.* 6(4): 386–394.

21. Terzolo M, Angeli A, Fassnacht M, Daffara F, Tauchmanova L, Conton PA, Rossetto R, Buci Li, Sperone P, Grossrubatscher E, Reimondo G, Bollito E, Papotti M, Saeger W, Hahner S, Koschker AC, Arvat E, Ambrosi B, Loli P, Lombardi G, Mannelli M, Bruzzi P, Mantero F, Allolio B, Dogliotti L, Berruti A. 2007. Adjuvant mitotane treatment for adrenocortical carcinoma. *N Engl J Med.*,356 (23):2372-2380.

22. Wooten MD, King DK: Adrenal cortical carcinoma. Epidemiology and treatment with mitotane and a review of the literature. *Cancer,* 1993, 72:3145–3155.

23. Stigliano A; Cerquetti L; Sampaoli C; Bucci B; Toscano V. 2012. Current and Emerging Therapeutic Options in Adrenocortical Cancer Treatment. *J Oncol.* <http://dx.doi.org/10.1155/2012/408131>.
24. Saif MW, Syrigos KN. 2012. Is there a Role of Targeted Agents in the Management of Adrenocortical Cancers? *Case Rep Endocrinol.* 2012:875764.
25. Heilmann P, Wagner P, Nawroth PP, Ziegler R. 2001. Therapy of the adrenocortical carcinoma with Lysodren (o,p'-DDD). Therapeutic management by monitoring o,p'-DDD blood levels. *Med Klin.* 96:371-377.
26. Phan AT. 2007. Adrenal cortical carcinoma-review of current knowledge and treatment practices. *Hematol Oncol Clin North Am.* 21:489-507.
27. Üner M, Wissing SA, Yener G, Müller RH. 2005. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for application of ascorbylpalmitate. *Die Pharmazie.* 60:577-582.
28. Bhatt DA, Pethe AM (2010): Lipid technology- a promising drug delivery system for poorly water soluble drugs. *Int J Pharm Sci Rev Res.* 2(7):online: [http://www.researchgate.net/publication/228467810\\_Lipid\\_technologyA\\_promising\\_drug\\_delivery\\_system\\_for\\_poorly\\_water\\_soluble\\_drugs](http://www.researchgate.net/publication/228467810_Lipid_technologyA_promising_drug_delivery_system_for_poorly_water_soluble_drugs).
29. Cantillana T, Lindström V, Eriksson L, Brandt I, Bergman A. 2009. Interindividual differences in o,p'-DDD enantiomer kinetics examined in Göttingenminipigs. *Chemosphere.* 76:167-172.
30. Shen H, Virtanenc HE, Main KM, Kalevac M, Anderssonb AM, Skakkebæk NE, Topparic J, Schramma KW. 2006. Enantiomeric ratios as an indicator of exposure processes for persistent pollutants in human placentas. *Chemosphere.* 62(3):390-395.
31. Venier M, Hites RA. 2007. Chiral organochlorine pesticides in the atmosphere. *Atmos. Environ.* 41(4): 768-775.
32. Asp V, Cantillana T, Bergman Å, Brandt I. 2010. Chiral effects in adrenocorticolytic action of o,p'-DDD (mitotane) in human adrenal cells, *Xenobiotica.*, 40 (3):177-183,.
33. Silva Jr AC, Salles Jr AG, Perna RF, Correia CRD, Santana CC. 2012. Chromatographic Separation and Purification of Mitotane Racemate in a Varicol Multicolumn Continuous Process, *Chem. Eng. Technol.* 35(1):83-90.
34. Chen ML. 2008. Lipid excipients and delivery systems for pharmaceutical development: a regulatory perspective. *Adv. Drug Deliv.Rev.* 60:768–777.
35. Hauss DJ. 2007. Oral lipid-based formulations. *Adv. Drug Deliv.Rev.* 59: 667–676.
36. United States Pharmacopeia. 2007. [National Formulary, vol 3.] Mitotane. Rockville MD: United States Pharmacopeial Convention, Inc, p 2674.
37. Moy RH. 1961. Studies of the pharmacology of o,p'-DDD in man. *J. Lab. Clin. Med.* 58:296-304.
38. Singh M, O'Hagan D. 1998. The preparation and characterization of polymeric antigen delivery systems for oral administration. *Adv Drug Deliv Rev.* 1(34):285-304.

## 5. CONCLUSÕES

Analisando os resultados obtidos pode-se concluir que o S (-)-*o*, *p'*-DDD foi eficientemente encapsulado nas NLCs com uma razão fármaco lipídio de 0.31 de S(-)-*o*,*p'*-DDD / g de nanoparticulas. As NLCs tiveram o seu diâmetro médio, polidispersidade e potencial zeta inalterado durante 28 dias de estocagem a 4°C. O S(-)-*o*,*p'*-DDD permaneceu retido nas NLCs, 60% quando exposto ao pH do intestino (6,8) e 70% nos pHs 1,2 (do estômago) e 7,4 (da corrente sanguínea), todos durante 24h. A permeação intestinal ex vivo da forma S(-)-*o*,*p'*-DDD encapsulada em NLCs foi superior (80,65%) em relação à sua forma livre e (50,56%) em relação ao mitotano racêmico encapsulado nas mesmas NLCs. Portanto, as NLCs são carreadores promissores para uma nova alternativa para o tratamento do CAC.



## **6. PERSPECTIVAS PARA TRABALHOS FUTUROS**

- 1.** Realizar ensaios *in vivo* para estudos da farmacocinética, biodisponibilidade, saturação, nível terapêutico, efeito antitumoral e toxicidade;
- 2.** Caracterizar as nanopartículas pela técnica DRX;
- 3.** Avaliar a cristalinidade da matriz lipídica por microscopia de luz polarizada.





## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, F.; BAKKE, S.; RUTT, A. et al. A phase II trial of combination chemotherapy and surgical resection for the treatment of metastatic adrenocortical carcinoma. **Cancer**, v.94, n.9, p. 2333-2343, 2002.

ALI, I.; ABOUT-ENEIN, H.I. Determination of chiral ratio of o,p-DDT and o,p'-DDD pesticides on polysaccharides chiral stationary phases by HPLC under reversed-phase mode. **Environment Toxicology**, v.7, n.4, p.329-333, 2002.

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

AMIDON G., LENNERNÅS, H., SHAH, V.P., CRISON, J.R. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vivo drug product dissolution and in vivo bioavailability. **Pharm. Res**, v.12, p.413-420, 1995.

ANDERSEN, A.; WARREN, D.J.; NOME, O. et al. A high-pressure liquid chromatography method for measuring mitotane [1,1-(o-p'-dichlorodiphenyl)-2-2-dichloroethane] and its metabolite 1,1-(o-p1'-Dichlorodiphenyl)-2-2-dichloroethene in plasma. **Ther Drug Monit**, v.17, n.5, p. 526-531, 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.

ASP V., CANTILLANA T., BERGMAN Å., BRANDT I., Chiral effects in adrenocorticolytic action of o,p'-DDD (o,p'-DDD) in human adrenal cells, **Xenobiotica**. V.40, n. 3, p. 177-183, 2010.

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**.2010, tese de doutorado. Universidade Henri Poincare, Paris, 2010.

BARLASKAR, F. M.; HAMMER, G. D. The molecular genetics of adrenocortical carcinoma. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders** [S.l.], 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.

BAUDIN, E.; PELLEGRITI, G.; BONNAY, M. et al. Impact of Monitoring Plasma 1,1-Dichlorodiphenilchloroethane (o,p'DDD) Levels on the Treatment of Patients with Adrenocortical Carcinoma. **Cancer**, v.92, n.6, p.1385-1392, 2001.

BOLLEN, E.; LANSER, J.B.K. Reversible mental deterioration and neurological disturbances with o,p'-DDD therapy. **Clin Neurol Neurosurg**, v.94, p.S49-S51, 1992.

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.

BROCKS, D.R. Drug disposition in three dimensions an update on stereoselectivity in pharmacokinetics. **Biopharm. Drug. Dispos.** V.27, p.387-406, 2006.

CAI, W.; COUNSELL, R.E.; DJANEGARA, T. et al. Metabolic activation and binding of mitotane in adrenal cortex homogenates. **J Pharm Sciences**, v.84, n.2, p.134-1389, 1995.

CANTILLANA, T., LINDSTRÖM, V., ERIKSSON, L., BRANDT, I., BERGMAN, A. Interindividual differences in o,p'-DDD enantiomer kinetics examined in Göttingen minipigs. **Chemosphere**. v. 76. p. 167-72, 2009.

CASTRO, G.A.; ORÉFICE, R.L.; VILELA, J.M.C.; ANDRADE, M.S.; FERREIRA, L.A.M.. Development of a new solid lipid nanoparticle formulation containing retinoic acid for topical treatment of acne. **Journal of Microencapsulation**, v. 24, 395-407, 2007.

CIFTCI, A.O., SENOCAK, M.E., TANYEL, F.C., BÜYÜKPAMUKÇU, B. Adrenocortical tumors in children. **Journal of Pediatric Surgery**. v. 36, p. 549-554, 2001.

CUSTODIO G.; TAQUES G.R.; FIGUEIREDO B.C.; GUGELMIN E.S.; OLIVEIRA FIGUEIREDO M.M.; WATANABE F.; PONTAROLO R.; LALLI E.; TORRES L.F. "Increased incidence of choroid plexus carcinoma due to the germline TP53 R337H mutation in southern Brazil." **Plosone**. V. 6 e:18015, 2011.

CUSTÓDIO G.; PARISE G.A.; KIESEL FILHO N.; KOMECHEN H.; SABBAGA C.C.; ROSATI R.; GRISA L.; PARISE I.Z.; PIANOVSKI M.A.; FIORI C.M.; LEDESMA J.A.; BARBOSA J.R.; FIGUEIREDO F.R.; SADE E.R.; IBAÑEZ H.; ARRAM S.B.; STINGHEN S.T.; MENGARELLI L.R.; FIGUEIREDO M.M.; CARVALHO D.C.; AVILLA S.G.; WOISKI T.D.; PONCIO L.C.; LIMA G.F.; PONTAROLO R.; LALLI E.; ZHOU Y.; ZAMBETTI G.P.; RIBEIRO R.C.; FIGUEIREDO B.C. Impact of neonatal screening and surveillance for the TP53 R337H mutation on early detection of childhood adrenocortical tumors. **Journal of Clinical Oncology**. V. 31 p. 2619-26, 2013.

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.

DESANDES E.; CLAVEL J.; BERGER C.; BERNARD J. L.; BLOUIN P.; LUMLEY L.; DEMEOCQ F.; FREYCON F.; GEMBARA P.; GOUBIN A.; LE GALL E.; PILLON P.; SOMMELET D.; TRON I.; LACOUR B. **Pediatric Blood & Cancer** v. 43, p. 749–757, 2004.

DICKSTEIN, G.; SHECHNER, C.; ARAD, E.; et al. Is there a Role for Low Doses of Mitotane (o,p'-DDD) as Adjuvant Therapy in Adrenocortical Carcinoma. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.83, n.9, p.3100-3103, 1998.

FANG, H.; DONG, B.; YAN, H.; TANG, F.; YU, Y. Characterization of a bacterial strain capable of degrading DDT congeners and its use in bioremediation of contaminated soil. **Journal of Hazardous Materials**. v. 184, p. 281-89, 2010.

FIGUEIREDO B.C.; SANDRINI R.; ZAMBETTI G.P.; PEREIRA R.M.; CHENG C.; LIU W.; LACERDA L.; PIANOVSKI M.A.; MICHALKIEWICZ E.; JENKINS J.; RODRIGUEZ-GALINDO C.; MASTELLARO M.J.; VIANNA S.; WATANABE F.; SANDRINI F.; ARRAM S.B.; BOFFETTA P.; RIBEIRO R.C. "Penetrance of adrenocortical tumours associated with the germline TP53 R337H mutation." **journal of Medical Genetics**. v. 43, p. 91-96, 2006.

FREITAS, C., MÜLLER, R.H. Spray-drying of solid nanoparticles (SLN TM). **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v.46, n.2, p. 145-151, 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.

HAAK, H. R.; HERMANS, J; VAN DE VELDE, C. J. H. et al. Optimal treatment of adrenocortical carcinoma with mitotane: results in a consecutive series of 96 patients. **British Journal of Cancer**, v.69, n.5, p.947-951, 1994.

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.

HEILMANN, P., WAGNER, P., NAWROTH, P.P., ZIEGLER, R. Therapy of carcinoma with lysodren (o,p'-DDD): Experience in therapeutical management by monitoring of o,p'-DDD blood levels. **Medizinische Klinik**. v. 96, p. 371-377, 2001.

HEURTAULT B, SAULNIER P, PECH B, PROUST JE, BENOIT JP. A novel phase inversion-based process for the preparation of lipid nanocarriers. **Pharmaceutical Research** Jun;19(6):875-880, 2002.

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

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. Electronic version, vol. 120, **Micromedex, Inc**. Greenwood Village, Colorado, 2004.

INOI, T.; GERICKE, P. ; HORTON, W. J. ; 1,1-dichloro-2-(o-chlorophenyl)-2-(p-chlorophenyl). **Ethane and Related Compounds**.v. 27, p. 4597-4600, 1962.

IUPAC Compendium of Chemical Terminology, Electronic version, <http://goldbook.iupac.org/E02070.html>; acesso em 18/07/2008.

JANNIN, V.; MUSAKHANIAN, J.; MARCHAUD, D. Approaches for the development of solid and semi-solid lipid-based formulations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 60, 734-746, 2008.

JAROLIM, L., BREZA, J., WUNDERLICH, H. Adrenal tumors. **European Urology**, v. 43, p. 1-10, 2003.

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.

JEONG, S.H.; PARK, J.H.; PARK, K. **Formulation issues around lipid-based oral and parenteral delivery systems**. In: WASAN, K.M. (Ed). Role of lipid excipients in modifying oral and parenteral drug delivery. Wiley-Interscience, Hoboken, New Jersey, EUA, 2007.

KASPERLIK-ZALUSKA, A. A. Clinical Results of the Use of Mitotane for Adrenocortical Carcinoma. **Brazilian Journal Medical and Biological Research**, v.33, p.1191-1196, 2000.

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

KHORRAM-MANESH A.; AHLMAN, A.; JANSSON, S. et al. Adrenocortical carcinoma: surgery and mitotane for treatment and steroid profiles for follow-up. **World Journal Surgery**, n.22, p.605-612, 1998.

KOKKONA M.; KALLINTERI P.; FATOUROS D.; ANTIMISIARIS SG. 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.

KOPF, 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.

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.

LAI, F.; WISSING, S.A.; MÜLLER, R.H.; FADDA, A.M. Artemisia arorescens L. essential oil-loaded solid lipid nanoparticles for potential agricultural application: preparation and characterization. **AAPS PharmSciTech**, 7, E1-E9, 2006.

LIM, S.J.; KIM, C.K. Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid. **International Journal of Pharmaceutics**, 243, 135-146, 2002.

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.

LOANNIDES, C. Chiral effects in adrenocorticolytic action of o,p'-DDD (mitotane) in human adrenal cells. **Xenobiotica**. v. 40, n.3, p.177-83, 2010.

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

LUTON, J.P.; CERDAS, S.; BILLAUD, L. et al. Clinical features of adrenocortical carcinoma, prognostic factors, and the effect of mitotane therapy. **The New England Journal of Medicine**. v.322, n.17, p.1195-1201, 1990.

MAIA, C.S.; MEHNERT, W.; SCHÄFER-KORTING, M. Solid lipid nanoparticles as drug carriers for topical glucocorticoids. **International Journal of Pharmaceutics**, 196, 165-167, 2000.

MALUF, DANIELA FLORÊNCIO. **Síntese de metabólitos do mitotano para monitoramento em amostras humanas e avaliação do metabolismo enantiosseletivo em cultivo celular e por fungos**. 2012 – Tese de doutorado Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.

MALUF, D. F.; OLIVEIRA, B.H.; LALLI, E. Therapy of adrenocortical cancer: present and future. **American Journal of Cancer Research**. v. 1, n. 2, p. 222-232, 2011.

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.D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanoparticulas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 6 n. 2, p.1-37, 2009.

MARTIGNONI, M.; GROOTHUIS, G.M.M.; KAMTER, R.D. Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human cyp-mediated drug metabolism,

inhibition, and induction. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**. v. 2(6), p. 875-894, 2006.

MARTINEZ M.N., AMIDON G.L.; A Mechanistic Approach to Understanding the Factors Affecting Drug Absorption: A Review of Fundamentals. **Journal of Clinical Pharmacology**. v.42; p.620-643, 2002.

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.

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

MEI, Z.; CHEN, H.; WENG, T.; YANG, Y.; YANG, X. Solid lipid nanoparticle and microemulsion for topical delivery of triptolide. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 56, 189-196, 2003.

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.

MOOLENAR, A.J.; SLOOTEN, H.; VAN SETERS, A. P. et al. Blood levels of o,p'DDD following administration in various vehicles after a single dose and during long-term treatment. **Cancer Chemother Pharmacol**, 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**, 41, 62-69, 1995.

MÜLLER, R.H.; PETERSEN, R.D.; Hommos, A.; Pardeike, J. Nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic dermal products. **Advanced Drug Delivery Reviews**, 59, 522-530, 2007.

MÜLLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advances in Drug Delivery Research**, 54, S131-S155, 2002.

MÜLLER, R.H.; RUNGE, S.; RAVELLI, V.; MEHNERT, W.; THÜNEMANN, A.F.; SOUTO, E.B. Oral bioavailability of cyclosporine: solid lipid nanoparticles (SLN) versus drug nanocrystals. **International Journal of Pharmaceutics**, 317, 82-89, 2006.

NELSON, G. WOODARD, "Adrenal cortical atrophy and liver damage produced in dogs by feeding," **Federation Proceedings**, vol. 7, no. 1, part 1, p. 277, 1948.

NEMEN D., LEMOS-SENNA E. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Química Nova**, Vol. 34, No. 3, 408-413, 2011.

ORTH, D.N.; KOVACS, W.J.; DEBOLD, C.R. **The Adrenal Cortex**. In: Williams Textbook of Endocrinology. 8. ed. W. B. Saunders Company, Pensilvânia, p.489-591, 1992.

PARKER L. N.; LEVIN E. R.; LIFRAK E. T.; Evidence for Adrenocortical Adaptation to Severe Illness. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 60 n. 5, p 947-952, 1985

PANDEY, R.; SHARMA, S.; KHULLER, G.K. Oral solid-lipid nanoparticle-based antitubercular chemotherapy. **Tuberculosis**, 85, 415-420, 2005.

PEREIRA, Giovanna Assis, **mecanismos moleculares implicados na fisiopatogênese do tumor de córtex adrenal de crianças**. 2007. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2007.

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 BC. Mortality rate of adrenocortical tumors in children under 15 years of age in Curitiba, Brazil. **Pediatric Blood & Cancer**, v.47, n.1, 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.

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

REKOSKE, J. A., Chiral separation. **AIChE Journal**, v.47, n.1, p.2-5, 2001.

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**, v.98, n.16, p. 9330-9335, 2001.

RIBEIRO, R. C. et al. **Pediatric Malignancies : Uncommon Endocrine Tumors in Children and Adolescents**. RAGHAVAN, D. ; BRECHER, M. L. ; JOHNSON, D. H. et al. (Ed.). Textbook of Uncommon Cancer, 3a ed. Nova York : John Wiley & Sons, Ltd., p.775-790, 2006.

ROGER, E. **Mise au point de nouveaux vecteurs colloïdaux pour ameliorer l'absorption digestive de médicaments anticancereux**. 2009, tese de doutorado. Ecole de Doctorale D'Angers. Angers-França, 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.

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.

SCHAFFAZICK, S.R., POHLMANN, A.R., DALLA-COSTA,T., GUTERRES, S.S. freeze-drying polymeric colloidal suspension: nonocapsules, 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.

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.

SHEN H., VIRTANENC H.E., MAIN K. M., KALEVAC, M. ANDERSSON A.M.B, SKAKKEBÆKB N. E., TOPPARIC J., SCHRAMMA K-W., “Enantiomeric ratios as an indicator of exposure processes for persistent pollutants in human placentas,” **Chemosphere**. Vol. 62, no. 3, pp. 390-395, 2006.

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., 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.

SOUTO, E.B.M. **SLN and NLC for topical delivery of antifungals**. Tese (Doutorado) – Departamento de Biologia, Química e Farmácia, Freie Universität Berlin, Berlim, Alemanha, 2005.

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.

STIGLIANO, A., CERQUETTI, L., SAMPAOLI, C., BUCCI, B., TOSCANO, V. Current and Emerging Therapeutic Options in Adrenocortical Cancer Treatment. **Journal of Oncology**, V. 2012, Article ID 408131, 13 pages, 2012.

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., BERRUTI A. Adjunctive treatment of adrenocortical carcinoma. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity**, n.15, p.21–226, 2008.

TERZOLO, M; PIA, A.; BERRUTI, A. et al. Low-Dose Monitored Mitotane Treatment Achieves the Therapeutic Range With Managable Side Effects in Patientes with Adrenocortical Cancer. The **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v.85, n.6, p.2234-2238, 2000.

VAN SLOOTEN, H.; MOOLENAAR, A. J; VAN SETERS, A. P. et al. The Treatment of Adrenocortical Carcinoma with o,p'DDD: Prognostic Implications of Serum Level Monitoring. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**. v.20; n.1, p.47-53, 1984.

VENIER M., HITES R.A., Chiral organochlorine pesticides in the atmosphere. **Atmospheric Environment**. Vol.41, no. 4, pp. 768-775, 2007.

WAJCHENBERG, B.L.; PEREIRA, M. A. A.; MENDONÇA, B.B.; LATRONICO, A.C.; CARNEIRO P.C.; ALVES, V.A.F.; ZERBINI, M.C.N.; LIBERMAN, B.; GOMES, C.G.; KRISCHNER M.A. **Adrenocortical Carcinoma**. *Cancer*, v. 88, n 4, p 771-736, 2000.

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.

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.

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., 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. **Solid lipid nanoparticles for antitumor drug delivery**. In: Amiji M, editor. *Nanotechnology for cancer therapy*. USA: CRC Press; p. 714-76, 2006.

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** [S.l.], v. 59, n. 3, p. 299-307, 1999.

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

ZANCANELLA, P. **Mitotano: metabolismo anantioseletivo, encapsulação em lipossomas e avaliação in vitro e in vivo**, 2008. Tese de doutorado. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

ZHAN, X. G., MIAO, J., DAI, Y. Q., DU, Y. Z. P., YUAN, H., HU, F. Q. Reversal activity of nanostructured lipid carriers loading cytotoxic drug in multi-drug resistant cancer cells. **International Journal of Pharmaceutics**, v.361, n.1-2, p.239-244, 2008.

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.

## ANEXO I

### 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.

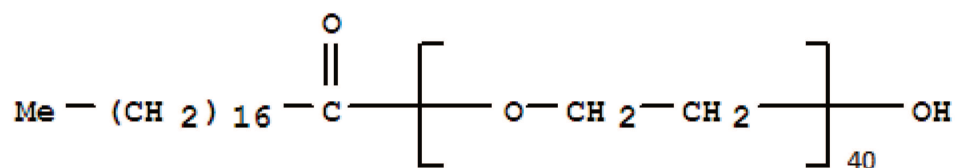
  
Prof. Dra. Luciana Thie Seki Dias  
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais



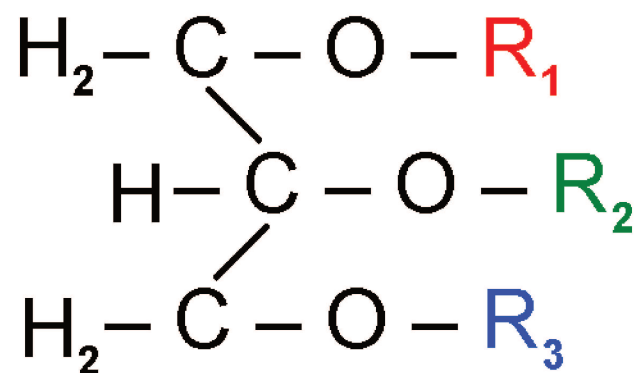
## ANEXO II

### ESTRUTURA MOLECULAR DOS COMPONENTES DA FORMULAÇÃO DE NLCS

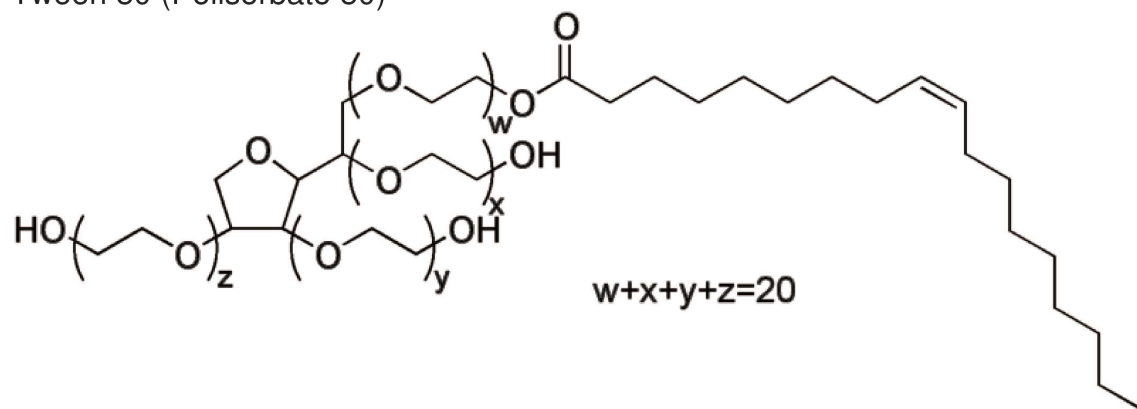
Estearato de Polioxietileno (40) cas: 9004-99-3



Triacilglicerol (cadeias medias C8-C10)



Tween 80 (Polisorbato 80)



Span 85 (Trioleato de sorbitano)

