

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Nanoemulsões de uso tópico contendo cumestrol:  
Estudos de formulação e permeação cutânea**

**DÉBORA FRETES ARGENTA**

**PORTO ALEGRE, 2011**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**Nanoemulsões de uso tópico contendo cumestrol:  
Estudos de formulação e permeação cutânea**

Dissertação apresentada por **Débora Fretes Argenta** para obtenção do GRAU DE MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof. Dr. Helder Ferreira Teixeira

Porto Alegre, 2011

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 28 de março de 2011, pela Banca Examinadora constituída por:

Profa. Dra. Leticia Scherer Koester

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Nádia Maria Volpato

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa. Dra. Simone Gonçalves Cardoso

Universidade Federal de Santa Catarina

A689n Argenta, Débora Fretes  
Nanoemulsões de uso tópico contendo cumestrol: estudos de  
formulação e permeação cutânea / Débora Fretes Argenta. – Porto  
Alegre: UFRGS, 2011. – xvii, 85 p. : il.

Dissertação (mestrado). UFRGS. Faculdade de Farmácia.  
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Cumestrol. 2. Isoflavonóides. 3. Nanoemulsões. 4. Permeação  
cutânea. 5. Hidroxietilcelulose. I. Teixeira, Helder Ferreira. II. Título.

CDU: 615.4

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Desenvolvimento Galênico (606) da Faculdade de Farmácia da UFRGS



Dedico esse trabalho aos meus pais, Laércio e Dory, pelo amor, exemplo, educação, oportunidades, por terem compreendido e aliviado os momentos difíceis que passei e, principalmente, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.





## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Helder Teixeira, pela amizade, orientação e dedicação, pela confiança em mim depositada, pelo suporte dado durante todas as etapas de percurso deste trabalho e pelos valiosos conselhos e ensinamentos.

Aos meus pais, pelo constante incentivo, amor e apoio nos momentos difíceis.

Aos meus irmãos Filipe e Vinícius, pelo amor, amizade e, principalmente, paciência.

Ao Mauricio, pelo amor, companheirismo, compreensão e incentivo constante.

À Prof. Dra. Mônica Cristina de Oliveira, do departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia da UFMG, pela colaboração nos experimentos de caracterização físico-química das nanoemulsões.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFRGS, pela oportunidade de aperfeiçoamento científico.

Aos professores do corpo docente da UFRGS, pelos ensinamentos transmitidos.

A todos os meus colegas e amigos do LDG, Alexandre, Bethânia, Bárbara, Cristiane, Daiane, Francini, Laura, Lísias, Juliana Bidone, Juliana Carini, Pedro, Regina, Samuel, Simone, Vinícius sem os quais a realização dessa dissertação teria sido bem mais difícil. Obrigada pela amizade, momentos de descontração e contribuição no desenvolvimento deste trabalho.

À Juliana Bidone e Regina pelas ideias e trocas de conhecimento para o planejamento e construção deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro recebido durante a realização deste trabalho.



## RESUMO

O cumestrol é um isoflavonóide presente em diferentes leguminosas como a alfafa, soja e trevo vermelho. Estudos demonstraram uma relevante atividade antioxidante e estrogênica deste composto. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi desenvolver nanoemulsões contendo cumestrol visando a sua aplicação tópica. Na primeira fase, nanoemulsões foram obtidas por emulsificação espontânea. Tal procedimento conduziu à obtenção de nanoemulsões monodispersas, confirmado por microscopia eletrônica de transmissão. A viscosidade das formulações permaneceu similar, enquanto que o potencial zeta foi influenciado pela presença dos tensoativos. Após espessamento, as formulações demonstraram um comportamento não-Newtoniano pseudoplástico. Na segunda etapa, o teor de cumestrol nas formulações foi determinado por CLAE. O método foi específico, linear, preciso e exato para quantificação de cumestrol nas formulações desenvolvidas. Os perfis de liberação do cumestrol, através de membrana artificial, demonstraram uma liberação imediata para todas as formulações. Por fim, estudos de permeação/retenção do cumestrol através de pele de orelha suína foram realizados utilizando-se células de difusão de Franz. Os resultados obtidos demonstram um fluxo lento do cumestrol através da pele. O conjunto de resultados obtidos demonstra o efeito da composição sobre as propriedades das formulações e distribuição do cumestrol através das camadas da pele.

**Palavras chave:** cumestrol, nanoemulsão, hidroxietilcelulose, permeação cutânea, validação



## ABSTRACT

Coumestrol is an isoflavonoid present in various legumes such as alfalfa, soybeans, and red clovers. Studies have shown significant estrogenic and antioxidant activities for this compound. With this in mind, the main purpose of this study was to develop nanoemulsion containing coumestrol for topic application. In the first phase, nanoemulsions were obtained by spontaneous emulsification. This procedure yielded monodisperse nanoemulsions, confirmed by transmission electron microscopy. The viscosity of the formulations remained similar, while the zeta potential was influenced by the surfactants. After thickening, the formulations showed a pseudoplastic non-Newtonian behavior. In the second step, the coumestrol content in the formulations was determined by HPLC. The method was specific, linear, precise, and accurate for coumestrol quantification in the developed formulations. The coumestrol release profile through artificial membrane showed immediate release for all formulations. Finally, studies of coumestrol permeation/retention through porcine ear skin were performed using Franz diffusion cells. The results showed a slow flow of coumestrol through the skin. The overall results show the effect of the composition on the properties of the formulations and coumestrol distribution through the layers of the skin.

**Keywords:** coumestrol, nanoemulsion, hydroxyethyl cellulose, skin permeation, validation



## LISTA DE FIGURAS

---

### CAPÍTULO I

- Figure 1. A pele humana com suas três camadas: epiderme, derme e hipoderme... 11
- Figure 2. Estrutura química do cumestrol..... 16
- 

### CAPÍTULO II

- Figure 1. Typical chromatograms of coumestrol (A) and blank formulations H-NE (B) or H-CNE (C).....52
- 

### CAPÍTULO III

- Figure 1. Transmission electronic microscopy images of coumestrol-loaded nanoemulsions NE (A) or CNE (B) and coumestrol-loaded nanoemulsions after thickened with hydroxyethyl cellulose H-NE (C) or H-CNE (D).....71
- Figure 2. Representative rheograms ascendant and descendant curves of coumestrol-loaded nanoemulsions dispersed in hydroxyethyl cellulose: H-CNE (●) and H-NE (○)..... 72
- Figure 3. Representative spreadability curves of coumestrol-loaded nanoemulsions dispersed in hydroxyethyl cellulose: H-NE (○) and H-CNE (●)..... 73
- Figure 4. Coumestrol released from nanoemulsions (NE and CNE) before and after thickening with hydroxyethyl cellulose (H-NE and H-CNE) through cellulose membranes ..... 74
- Figure 5. Chromatograms obtained from the analysis of samples from skin layers. (A) Sample spiked with COU solution, (B) Non-spiked sample..... 75
- Figure 6. In vitro skin permeation study of coumestrol-loaded nanoemulsions (A) and coumestrol-loaded nanoemulsions incorporated in hydroxyethyl cellulose (B) after 8 and 24 h ..... 78
-

## LISTA DE TABELAS

---

### **CAPÍTULO II**

Table 1. Final composition of formulations (% w/w) .....	49
Table 2. Accuracy of coumestrol in the presence of formulation excipients.....	53
Table 3. Intra- and inter-day precision of LC assay of coumestrol .....	53
Table 4. Coumestrol content in formulations.....	54

---

### **CAPÍTULO III**

Table 1. Final composition of formulations (% w/w) .....	65
Table 2. Physicochemical properties of nanoemulsions .....	69
Table 3. Coumestrol content in nanoemulsions dispersed in hydroxyethyl cellulose just after preparation and after 60 days of storage .....	70
Table 4. <i>In vitro</i> release characteristics of coumestrol through cellulose membrane	75
Table 5. Precision, accuracy and recovery data for skin samples .....	76

---



## SUMÁRIO

---

<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
-------------------------	----------

---

<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>Revisão da literatura</b> .....	<b>9</b>

---

Envelhecimento cutâneo .....	11
Atividades biológicas dos flavonóides/cumestanos .....	14
Sistemas nanoemulsionados para uso tópico.....	21
Permeação cutânea .....	26

---

<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>Determinação do cumestrol incorporado em nanoemulsões através de cromatografia líquida</b> .....	<b>41</b>

---

Resumo .....	43
Artigo .....	45
Abstract .....	46
Introduction.....	47
Experimental .....	48
Materials.....	48
Preparation and characterization of the nanoemulsions.....	48
Apparatus and Chromatographic conditions.....	49
Method validation .....	49
Determination of coumestrol content.....	50
Results and Discussion .....	51
Method development.....	51
Method validation .....	51
Method application .....	53
References .....	54

---

---

## **CAPÍTULO III**

### **Desenvolvimento de formulações semi-sólidas contendo nanoemulsões de cumestrol..... 57**

---

Resumo.....	59
Artigo .....	61
Abstract.....	62
Introduction .....	63
Materials and methods.....	64
Materials .....	64
Preparation of formulations.....	64
Characterization of nanoemulsions.....	65
Characterization of semisolid formulations .....	66
Coumestrol assay .....	66
Coumestrol release.....	67
Skin permeation and retention .....	67
Results and discussion .....	69
Formulation study .....	69
Analytical study.....	75
Skin permeation/retention .....	77
References .....	79

---

### **CONCLUSÕES ..... 83**

---

## INTRODUÇÃO

---



As plantas produzem uma grande variedade de metabólitos secundários que, dependendo da via biossintética, resultam em diferentes compostos com diversas atividades biológicas. Estudos de avaliação da potencialidade terapêutica de extratos, frações e/ou compostos isolados de produtos vegetais têm crescido de maneira considerável nos últimos anos (SIMÕES et al., 2004).

Os flavonóides são compostos polifenólicos biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides, presentes em relativa abundância entre os metabólitos secundários. Neste grupo, uma classe que tem sido investigada, devido as suas propriedades biológicas, é a dos isoflavonóides. Os isoflavonóides apresentam distribuição taxonômica restrita no reino vegetal e subdividem-se em diferentes subclasses, incluindo a dos cumestanos. O cumestrol é um composto de destaque no grupo, sendo isolado principalmente da família Fabaceae (SIMÕES et al., 2004).

Estudos prévios demonstraram que o cumestrol apresenta uma potente atividade antioxidante atribuída à doação de hidrogênio/elétrons das hidroxilas fenólicas (MITCHELL et al., 1998; LEE et al., 2006). Considerando que existem diversos alvos na pele que podem sofrer danos oxidativos provocados pelas radiações solares, como lipídios, proteínas e DNA (ICHIHASHI et al., 2003), essa propriedade do cumestrol pode ser explorada na prevenção do fotoenvelhecimento e da fotocarcinogênese. De fato, a aplicação tópica de produtos antioxidantes tem sido considerada como uma estratégia promissora para reduzir os danos oxidativos mediados pela radiação UV na pele (SAIJA et al., 1998; 2000; PINNEL, 2003).

Além da propriedade antioxidante, o coumestrol possui potente atividade estrogênica devido ao fato de possuir características estruturais semelhantes as dos estrogênios naturais (NOGOWSKI, 1999; HAVSTEEN, 2002). Os receptores de estrogênio possuem dois subtipos: ER $\alpha$  e ER $\beta$ . Os ER $\beta$  são mais comumente distribuídos na pele do que os ER $\alpha$ , sendo que o ER $\beta$  é amplamente expresso na epiderme, especialmente nos queratinócitos, vasos sanguíneos e fibroblastos dérmicos (THORNTON et al., 2003; HALL e PHILLIPPS, 2005). Assim, por apresentar relevante atividade antioxidante e estrogênica, o cumestrol revela-se uma substância de interesse para o desenvolvimento de formulações destinadas ao uso tópico.

Contudo, a incorporação de moléculas de reduzida hidrossolubilidade, como é o caso do cumestrol, em formas farmacêuticas de uso tópico, geralmente em base aquosa, representa um desafio farmacotécnico. Neste sentido, a incorporação de moléculas com essas características em nanoemulsões de uso tópico tem sido considerada por diversos autores (DUNCAN et al., 1990; FRIEDMAN et al., 1995; PIEMI et al., 1999; FERNANDEZ et al., 2000; ALVES et al., 2005; SILVA, et al., 2007). Nanoemulsões podem ser definidas como sistemas nos quais gotículas oleosas de tamanho nanométrico estão uniformemente dispersas em uma fase aquosa externa estabilizada por um sistema tensoativo adequado (ANTON e VANDAMME, 2010). Os compostos de reduzida hidrossolubilidade encontram-se preferencialmente dispersos e/ou adsorvido na interface óleo/água (WASHINGTON, 1996; TROTTA et al., 2002; SONNEVILLE – AUBRUN et al., 2004). A incorporação de moléculas bioativas em sistemas nanoestruturados pode modular a permeação/retenção destes compostos através da pele. Tal fato pode estar relacionado ao prolongamento do tempo de permanência nas camadas superiores da pele, à maior área de superfície de contato e à baixa tensão superficial das gotículas de óleo (KLANG e BENITA, 1998; BENITA, 1998; FOLDORI, 2000; GUTERRES et al., 2007). Recentemente, descrevemos a viabilidade de incorporação de compostos flavonoídicos em nanoemulsões de uso tópico, como a quercetina, metilquercetina e genisteína (FASOLO et al., 2007; SILVA, et al., 2009; VARGAS et al., 2011). Estudos de permeação cutânea, utilizando células de difusão de Franz, demonstraram que os compostos veiculados nesse sistema carreador apresentaram baixo fluxo através da pele de orelha suína. Esses resultados podem ser relacionados com as propriedades físico-químicas dos compostos, os quais apresentam valores semelhantes de coeficiente de partição, entre 2 e 3, associado às propriedades do sistema nanoestruturado, apontando para uma potencial aplicação destes produtos para tratamento tópico.

Devido à reconhecida atividade estrogênica e antioxidante apresentada pelos isoflavonóides, a presente dissertação de mestrado teve por objetivo preparar e caracterizar as nanoemulsões de uso tópico contendo cumestrol, bem como avaliar a influência da composição das nanoestruturas sobre a permeação/retenção do cumestrol, em pele de orelha suína. A dissertação está estruturada em três capítulos:

- O capítulo I trata da revisão da literatura acerca do tema da dissertação, resumindo quatro aspectos principais tratados ao longo do trabalho, envelhecimento cutâneo, atividades biológicas dos flavonóides/cumestanos, sistemas nanoemulsionados para uso tópico e permeação cutânea;
- O capítulo II apresenta os resultados da validação de uma metodologia analítica por cromatografia líquida visando à determinação do cumestrol em diferentes nanoemulsões, antes e após o espessamento;
- O capítulo III investiga o efeito da composição das nanoemulsões sobre as propriedades físico-químicas e reológicas das formulações, bem como sobre a cinética de liberação do cumestrol através de membranas artificiais e pele de orelha suína, utilizando células de difusão de Franz.

## Referências

- ALVES, M. P.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Pharmazie**, v. 60, p. 900-904, 2005.
- ANTON, N.; VANDAMME, T.F. Nano-emulsions and Micro-emulsions: Clarifications of the Critical Differences. **Pharmaceutical Research**. In press 2010.
- BENITA, S. **Submicron Emulsion in Drug Targeting and Delivery**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, p. 340, 1998.
- DUNCAN, J. I.; PAYNE, S. N. L.; WINFIELD, A. J.; ORMEROD, A. D.; THOMSON, A. W. Enhanced percutaneous absorption of a novel topical cyclosporin A formulation and assessment of its immunosuppressive activity. **British Journal of Dermatology**, v. 123, p. 631-640, 1990.
- FASOLO, D.; SCHWINGEL, L.; HOLZSCHUH, M. H.; BASSANI, V.; TEIXEIRA, H. F. Validation of an isocratic LC method for determination of quercetin and methylquercetin in topical nanoemulsions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.44, p.1174 - 1177, 2007.
- FERNANDEZ, C.; MARTI-MESTRES, G.; RAMOS, J.; MAILLOS, H. LC analysis of benzophenone-3: II application to determination of in vitro and in vivo skin penetration from solvents, coarse and submicron emulsions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 155-165, 2000.
- FOLDVARI, M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v.12, p. 417-425, 2000.
- FRIEDMAN, D. I., SCHWARZ, J. S.; WEISSPAPIR, M. Submicron emulsion vehicle for enhanced transdermal delivery of steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 84, p. 324-329, 1995.
- GUTERRES, S. S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous application. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.
- HALL, G; PHILLIPS, T. J. Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. **Journal of American Academy of Dermatology**, Boston, v. 53, p. 555-68, 2005.
- HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medicinal significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v.96, p. 67-202, 2002.
- TSURU, K.; HORIKAWA, T. UV-induced skin damage. **Toxicology**, v. 189, p. 21-39, 2003.
- KLANG, S.; BENITA, S. Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration. In: BENITA, S. **Submicron emulsions**



**in drug targeting and delivery.** Amsterdam:, Harwood Academic Publishers, p. 340, 1998.

ICHIHASHI, M.; UEDA, M.; BUDIYANTO, A.; BITO, T.; OKA, M.; FUKUNAGA, M.; LEE, J. H.; LEE, B. W.; KIM, J. H.; JEONG, T. S.; KIM, M. J.; LEE, W. S.; PARK, K. H. LDL-Antioxidant Pterocarpanes from Roots of *Glycine max* (L.) Merr. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2057-2063, 2006.

MITCHELL, J. H.; GARDNER, P. T.; MCPHAIL, D. B.; MORRICE, P. C.; COLLINS, A. R.; DUTHIE, G. G. Antioxidant Efficacy of Phytoestrogens in Chemical and Biological Model Systems. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 360, p. 142–148, 1998.

NOGOWSKI, L. Effects of phytoestrogen – coumestrol on lipid and carbohydrate metabolism in Young ovariectomized rats may be independent of its estrogenicity. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 10, p. 664-669, 1999.

PIEMI, M. P. Y.; KORNER, D.; BENITA, S.; MARTY, J. P. Positively and negatively charged submicron emulsion for enhanced topical delivery of antifungal drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 58, p. 177-187, 1999.

PINNEL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 48, p. 1-19, 2003.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; GIACCHI, M.; De PASQUALE, A.; BONINA, F. Influence of different penetration enhancers on in vivo photoprotective effect of flavonoids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 175, p.85-94, 1998.

SAIJA, A.; TOMAINO, A.; TROMBETTA, D.; De PASQUALE, A.; UCCELLA, N.; BARBUZZI, T.; PAOLINO, D.; BONINA, F. In vitro and in vivo evaluation of caffeic and ferulic acids as topical photoprotective agents. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 199, p. 39-47, 2000.

SILVA, A. P. C., KOESTER, L. S., MAYORGA, P., BASSANI, V, TEIXEIRA, H. F. Development and validation of a LC method for determination of genistein in topical nanoemulsions. **Die Pharmazie**, v.62, p.732 - 734, 2007.

SILVA, A. P. C.; NUNES, B. R.; OLIVEIRA, M.; KOESTER, L. S.; MAYORGA, P.; BASSANI, V.; TEIXEIRA, H. F. Development of topical nanoemulsions containing isoflavone genistein. **Die Pharmazie**, v.63, p.32 - 35, 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 5ª edição. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC e UFRGS, 2004.

SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J. T.; L'ALLORET, F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 20, p. 145-149, 2004.

THORNTON, M. J.; TAYLOR, A. H.; MULLIGAN, K.; AL-AZZAWI, F.; LYON, C. C.; O'DRISCOLL, J.; MESSENGER, A. G. Oestrogen receptor beta is the predominant oestrogen receptor in human scalp skin. **Experimental Dermatology**, v. 12, p. 181-90, 2003.

TROTTA, M.; PATTARINO, F.; IGNONI, T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 53, p. 203-208, 2002.

VARGAS, B. A.; ARGENTA, D. F.; BORGHETTI, G.; KOESTER, L.; BASSANI, V.; TEIXEIRA, H. Validation of an LC method to determine skin retention profile of genistein from nanoemulsions incorporated in hydrogels. **Journal of Chromatographic Science**. In press 2011.

WASHINGTON, C. Stability of lipid emulsion for drug delivery. **Advanced Drug Delivery**, v. 20, p. 131-145, 1996.

**CAPÍTULO I**  
**Revisão da literatura**

---



## **Envelhecimento cutâneo**

A pele é o maior órgão do corpo humano em extensão e peso, sendo composta por três principais camadas: epiderme, derme e hipoderme (Figura 1). Além de revestir a superfície externa do corpo, protegendo-o de agressores do ambiente externo, esse órgão possui outras funções, como o controle de temperatura corporal, absorção da radiação ultravioleta, síntese de vitamina D, bem como a absorção e eliminação de substâncias químicas (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999; HARRIS, 2003).

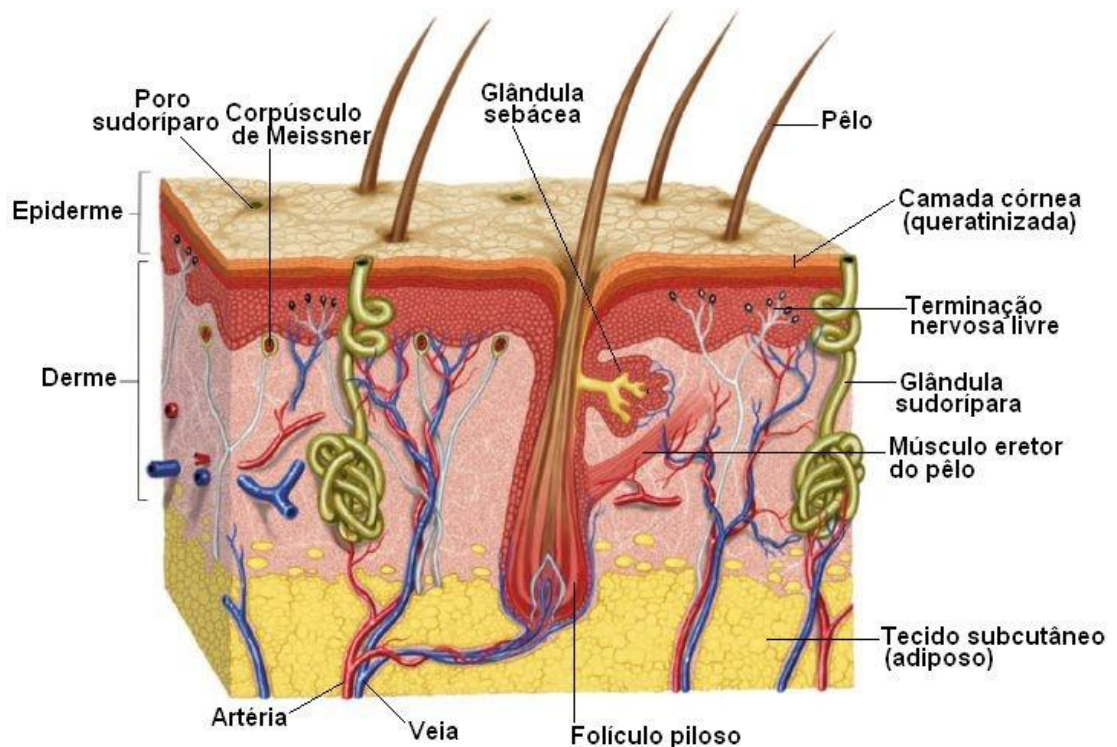


Figura 1: A pele humana com suas três camadas: epiderme, derme e hipoderme  
Fonte: <http://www.afh.bio.br/sentidos/sentidos10.asp>

A epiderme é um epitélio formado por várias camadas de células achatadas justapostas, denominadas queratinócitos, que têm origem na camada basal germinativa, sendo que, na medida em que envelhecem, essas células tornam-se mais achatadas e passam a produzir e acumular queratina. As células mais superficiais (corneócitos), repletas de queratina, morrem e formam um revestimento

resistente ao atrito e impermeável à água, o estrato córneo. A derme, localizada abaixo da epiderme, é um tecido conjuntivo com característica elástica que contém fibras protéicas, colágeno, fibras de elastina, vasos sanguíneos e linfáticos, terminações nervosas, órgãos sensoriais, glândulas e outros anexos como pêlos e unhas. A derme possui espessura de cerca de 250 µm e sua principal função é fornecer nutrientes e oxigênio à epiderme, por difusão (HERNANDEZ e MERCIER-FRESNEL, 1999; JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999; RIBEIRO, 2010).

Ao longo dos anos, a pele sofre alterações que levam ao seu envelhecimento. Tais alterações podem levar a uma aparência seca e flácida, com presença de rugas e alterações na pigmentação cutânea. As modificações na pele devido ao envelhecimento podem ser observadas em todas as camadas. Na epiderme, há desorganização da camada basal germinativa, tornando esta menos espessa e a camada córnea torna-se laminar e quebradiça. Também há diminuição na produção de células de Langerhans, com consequente redução da defesa imune. Na derme, a capacidade replicativa dos fibroblastos decresce, as fibras de colágeno tornam-se rígidas e as de elastina sobrecarregam-se de lipídeos e perdem a elasticidade. Na hipoderme, a fragilidade dos septos acarreta o aparecimento de rugas (HERNANDEZ e MERCIER-FRESNEL, 1999; RIBEIRO, 2010).

O envelhecimento cutâneo é resultante do conjunto de transformações decorrentes do envelhecimento intrínseco e extrínseco, que modificam o aspecto da pele. No envelhecimento intrínseco, também chamado de envelhecimento cronológico, há queda das funções vitais do corpo, renovação celular comprometida e função imunológica diminuída (REBELLO, 2005).

Um dos fatores ligados ao envelhecimento intrínseco é o declínio de hormônios de estrogênio em mulheres no período pós-menopausa. Esteticamente, a redução dos níveis de estrogênio está associada à pele seca, afinamento da epiderme, redução da camada córnea, diminuição do colágeno na derme, formação de rugas e da flacidez (RIBEIRO, 2010). A terapia da reposição hormonal, além de reduzir os efeitos característicos da menopausa, tem gerado efeitos benéficos na pele pelo aumento de colágeno e da espessura dérmica. Também se observou uma

maior hidratação da pele e aumento da atividade das glândulas sebáceas (PHILLIPS et al., 2001; SATOR et al., 2001; RAINE-FENNING et al., 2003).

A pele é o maior alvo não reprodutível no qual agem os estrogênios. Esses hormônios exercem sua ação através de sua ligação aos receptores estrogênicos, podendo produzir efeitos agonistas ou antagonistas fracos, dependendo de sua concentração, estado do receptor, disponibilidade de estrógenos endógenos e do órgão-alvo (TAPIERO et al., 2002). Os receptores estrogênicos (ER) são divididos em dois subtipos: ER $\alpha$  e ER $\beta$ . Os ER $\beta$  são mais comumente distribuídos na pele que os ER $\alpha$ . O ER $\beta$  é amplamente expressado na epiderme, vasos sanguíneos e fibroblastos dérmicos. Já nas glândulas sebáceas, a expressão dos receptores ER é semelhante. Na epiderme, os ER $\beta$  são fortemente expressos nos queratinócitos do estrato basal e estrato espinhoso, e em menor grau, no estrato granuloso. Também se observou forte presença dos ER $\beta$  na derme papilar da pele do couro cabeludo humano. Ambos os receptores ER $\alpha$  e ER $\beta$  influenciam a regulação da ação de estrógenos na pele (THORNTON et al., 2003; HALL e PHILLIPS, 2005).

Estudos epidemiológicos têm indicado uma relação entre hormônios estrogênicos e câncer de pele. Alguns estudos mostram que a taxa de mortalidade por câncer de pele do tipo não melanoma e melanoma é significativamente menor em mulheres do que em homens (WEINSTOCK, 1994; MILLER e MAC, 1997). WIDYARIN e colaboradores (2006) avaliaram a ação do equol sobre os receptores estrogênicos. Os resultados encontrados levaram os autores a sugerir que a associação desse fitoestrógeno com os ER provoca modulação na resposta imunológica, ativando proteínas antioxidantes e assim, diminuindo a imunossupressão induzida por radiação ultravioleta. Contudo, os mecanismos envolvidos ainda não estão completamente esclarecidos.

O envelhecimento extrínseco é decorrente de fatores ambientais que interagem com a pele, como poluição ambiental, fumo, abuso do álcool, má nutrição e, principalmente, exposição exagerada à radiação solar (REBELLO, 2005; RIBEIRO, 2010). De um modo geral, o envelhecimento cutâneo é atribuído aos radicais livres (RL), compostos altamente reativos e instáveis que reagem com moléculas do organismo causando danos às células (REBELLO, 2005). Os radicais

de oxigênio são originários de fontes metabólicas (cadeia respiratória ou oxidações catalisadas por oxigenases) e agentes externos que têm como principal fonte a radiação ultravioleta (UV) (HAVSTEEN, 2002).

A radiação UV é dividida em três categorias dependendo do comprimento de onda, sendo a radiação UVB (280-320 nm) o principal fator etiológico da fotocarcinogênese. Já a radiação UVA (320-400 nm) é mais citotóxica e gera mais estresse oxidativo que a UVB (F'GUYER et al., 2003; AFAQ e MUKHTAR, 2006; PINNEL, 2003). Em relação à absorvidade das radiações, a radiação UVB é praticamente toda absorvida na epiderme, enquanto que os raios UVA são capazes de alcançar a derme e, até mesmo, afetar as células sanguíneas circulantes (PINNEL, 2003).

O corpo humano possui antioxidantes naturais com capacidade de reduzir as reações provocadas pela ação solar, principalmente pela radiação ultravioleta. Essa proteção natural da pele ocorre por meio de antioxidantes enzimáticos como a glutathione peroxidase, a glutathione reductase, a catalase e a superóxido dismutase ou por meio de antioxidantes não enzimáticos, como o ácido ascórbico, vitamina E, ubiquinol e  $\alpha$ -tocoferol. Embora substâncias antioxidantes possam chegar à pele através da alimentação e suplementação oral, as etapas de absorção, solubilidade e transporte limitam a quantidade liberada para a pele, não sendo, muitas vezes, suficiente para eliminar os radicais livres gerados, levando ao dano oxidativo. Este, quando severo, acarreta em apoptose ou morte celular necrótica (PINNEL, 2003; XU e FISHER, 2005).

### ***Atividades biológicas dos flavonóides/cumestanos***

Os flavonóides compreendem o maior grupo de metabólitos secundários de plantas. Essa classe de compostos, amplamente distribuída no reino vegetal, possui, em sua maioria, representantes contendo 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos (SIMÕES et al., 2004). Dentre o grupo dos flavonóides, a classe dos isoflavonóides se destaca pelas propriedades estrogênicas apresentadas pelas subclasses isoflavona e cumestano (SIMÕES et al., 2004). Devido a essa propriedade, esses compostos são comumente referenciados como fitoestrogênios, denominação dada



a todas as substâncias que produzem efeitos análogos aos hormônios estrogênicos em animais e humanos (MUELLER, 2002).

Os fitoestrogênios podem ser divididos em três classes principais: isoflavonas (encontradas em soja e outros legumes, tendo como principais ativos a genisteína e daidzeína); lignanas (encontradas na linhaça e outras sementes oleosas, os principais ativos são o enterodiol e enterolactona) e os cumestanos (encontrados no trevo vermelho, brotos e sementes de feijão, sendo o cumestrol seu principal ativo). A atividade estrogênica desses compostos está relacionada à semelhança estrutural que esses compostos possuem com os estrogênios naturais e sintéticos (KNIGHT e EDEN, 1996; CARUSI, 2000). Essas substâncias são capazes de modular o efeito de estrogênios endógenos ao competir pela ligação nos receptores estrogênicos, atuando como antiestrógenos ao impedir que esses hormônios exerçam seus efeitos. Porém, na ausência de estrogênio essas substâncias se ligam aos receptores e apresentam efeitos estrogênicos, aliviando os sintomas indesejáveis da menopausa, além de reduzir o risco de doenças cardiovasculares e osteoporose advindos da ausência do hormônio (KURZER e XU, 1997).

Há evidências de que mulheres que consomem uma dieta rica em fitoestrogênios apresentam menor intensidade e frequência de sintomas vasomotores, característicos do período pós-menopausa (DALAIS et al., 1998; SCAMBIA et al., 2000). Embora a diferença nos sintomas pós-menopausa possa ser devido a vários fatores, ADLERCREUTZ e colaboradores (1992) sugerem que as ações estrogênicas de uma dieta rica em fitoestrógenos poderia explicar a reduzida frequência dos sintomas da menopausa em mulheres japonesas. A osteoporose, assim como a menopausa, também tem sido relacionada à diminuição da produção gonadal de esteróides. Desse modo, o efeito dos fitoestrógenos tem sido proposto para prevenir a reabsorção óssea e promover o aumento da densidade óssea. TSUTSUMI (1995) realizou estudo com o cumestrol em culturas de células embrionárias de fêmur de pintos, demonstrando que, além da inibição da reabsorção óssea houve um aumento no teor de cálcio, indicando que esse fitoestrógeno também pode atuar estimulando a mineralização óssea.

Os cumestanos são uma importante classe de produtos naturais aromáticos oxigenados que possuem em suas estruturas o anel 6H-benzofuro[3,2-c]benzopiran-6-ona. Além da propriedade estrogênica, foram relatadas outras atividades para as substâncias pertencentes a essa classe, como atividade anti-tumoral (YANG et al., 1996) e inibidora da fosfolipase A<sub>2</sub> (DIOGO et al., 2009). O cumestrol (Figura 2), principal representante desse grupo, é designado pelos seguintes nomes químicos: 3,9-dihidroxi-6H-benzofuro[3,2-c][1]benzopiran 6-ona; ácido 2-(2,4-dihidroxifenil)-6-hidroxi-3-benzofurancarboxílico δ-lactona e 7'6'-dihidroxicoumarino(3',4', 3, 2) coumarona (THE MERCK INDEX, 1996).

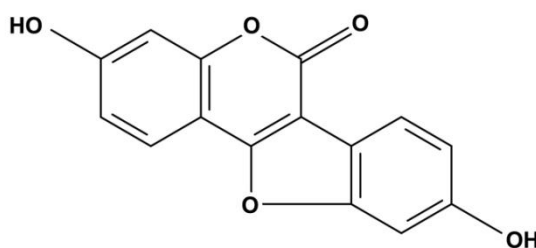


Figura 2. Estrutura química do cumestrol

Nas plantas, o cumestrol é formado a partir da via dos fenilpropanóides: Fenilalanina - ácido p-hidroxicinâmico Co-A - 7,4'-hidroxiflavanona - daidzeína - composto intermediário - cumestrol. Esse composto foi identificado e caracterizado estruturalmente por Bickoff, em 1958. Com relação à síntese do cumestrol, ALMAHARIK e BOTTING (2004) descrevem um método rápido e fácil de ser executado, consistindo em duas etapas: condensação catalisada do acetato de fenila com cloreto de benzoila, seguido de dimetilação e ciclização intramolecular.

O cumestrol se apresenta na forma de cristais que sublimam em 325 °C e, em alto vácuo, próximo à 175 °C. Os máximos de absorção do cumestrol na região ultravioleta (em metanol) ocorrem em 208, 243 e 343 nm. Em meio alcalino forte, esse composto exibe fluorescência azul. Quanto à solubilidade, o cumestrol é praticamente insolúvel em água, em pH ácido ou neutro; pouco solúvel em água, em pH alcalino (pH 11-12); ligeiramente solúvel em metanol, clorofórmio e éter e muito levemente solúvel em tetracloreto de carbono e benzeno (THE MERCK INDEX, 1996).

As fontes vegetais de cumestrol incluem muitas frutas, grãos, sementes (feijão, ervilha, soja) e café. As maiores concentrações desse composto têm sido encontradas em trevos (*Trifolium pratense*, leguminosae – 56411 mg/Kg) e alfafas (*Medicago sativa*, Leguminosae – 1,2 mg/Kg), em particular nos brotos de alfafa em concentrações de 720 mg/Kg. Cabe ressaltar que nos casos de contaminação por fungos, a concentração de cumestrol pode ser aumentada nessas plantas (PATRI et al., 2006).

Em relação às suas propriedades biológicas, o cumestrol é um agonista estrogênico, mas também exibe atividade antiestrogênica dose-dependente. Estudos mostram que os fitoestrogênios, incluindo o cumestrol, inibem a ligação específica do 17 $\beta$ -estradiol aos receptores de estrogênios localizados no útero e em glândula mamária de ratos e humanos de uma forma dose dependente (0,1-10 mM) (HODGERT et al., 2000; BENASSAYAG et al., 2002; MARKAVERICH e ALEJANDRO, 1998).

Segundo WHITTEN e colaboradores (2002), o cumestrol, mesmo em pequenas quantidades, é capaz de inibir a ligação do 17 $\beta$ -estradiol aos receptores estrogênicos neurais, sendo que os efeitos produzidos são opostos àqueles do estradiol, em relação à secreção de hormônios e comportamento sexual, por ação em ambos os tipos de receptores. PATISAUL e colaboradores (1999) sugerem, ainda, que o tipo de ação do cumestrol nos receptores, se agonista ou antagonista, pode ser tecido-específico e, os efeitos estrogênicos/antiestrogênicos dos isoflavonóides podem ser explicados pelas diferentes ligações em posições terminais dos receptores estrogênicos.

Os fitoestrogênios possuem afinidades diferentes em relação ao tipo de receptor estrogênico (ER), porém menor do que a do 17 $\beta$ -estradiol para ambos os subtipos (ER $\beta$  e ER $\alpha$ ). Segundo BENASSAYAG e colaboradores (2002) o 17 $\beta$  - estradiol possui afinidade de ligação por ER $\beta$  igual a ¼ da afinidade de ligação por ER $\alpha$  e o cumestrol mostrou maior afinidade por ER $\beta$  que por ER $\alpha$  (20-30 vezes maior). O cumestrol apresenta maior afinidade de ligação pelos ER do que a isoflavona genisteína (AL-MAHARIK e BOTTING, 2004; KUIPER et al., 1998).

KUIPER e colaboradores (1998) avaliaram a atividade estrogênica de fitoestrogênos, incluindo o cumestrol. Os experimentos foram realizados através de ensaios de competição pela ligação às proteínas dos receptores ER $\alpha$  e ER $\beta$  e por expressão transiente de gene, usando células nas quais a resposta estrogênica aguda foi criada por co-transfecção com culturas de DNA recombinante humano de ER $\alpha$  e ER $\beta$ . Utilizando concentrações de 1 a 10 nM, os autores obtiveram o seguinte ranking de potência estrogênica: 17 $\beta$ -estradiol >> zearalenol = cumestrol > genisteína > daidzeína > biochanina A > quercetina para receptores ER  $\alpha$  e 17 $\beta$ -estradiol > genisteína > cumestrol > zearalenol > daidzeína > biochanina A > quercetina para receptores ER  $\beta$ . Porém, a comparação da potência estrogênica entre esses compostos deve considerar também a quantidade de hormônio estradiol circulante, a disponibilidade dos receptores no tecido alvo e a concentração do fitoestrógeno administrado para então se obter um perfil mais exato (HUNTLEY e ERNST, 2004).

Devido à influência do estrogênio sobre a imunidade celular e humoral, e sabendo-se que o cumestrol possui afinidade pelos receptores estrogênicos, SCHOENROTH e colaboradores (2004) avaliaram o efeito deste composto na doença autoimune lupus eritematoso. Doses baixas de cumestrol revelaram diminuição de células autoimunes e uma certa regressão da doença, demonstrando um efeito benéfico desse isoflavonóide. Porém, sugere-se mais estudos para confirmar esses resultados.

NDEBELE e colaboradores (2010) avaliaram os efeitos estrogênicos do cumestrol, dicloro-difenil-tricloroetano (DDT) e 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina em células de câncer de útero (células HeLa), utilizando os seguintes parâmetros: proliferação, ciclo celular e apoptose. Todos os compostos, inclusive o 17 $\beta$ -estradiol, suprimiram a proliferação de células HeLa de forma dose dependente (20 – 120 nM), demonstrando efeito citotóxico. Cumestrol e 17 $\beta$ -estradiol produziram aumento de células HeLa na fase mitótica e, posteriormente, induziram apoptose. Esses resultados não foram observados para o DDT e 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina. Com base nesses resultados, os autores concluíram que o cumestrol é capaz de afetar a viabilidade e induzir a morte celular dessas células. No entanto, SAKAMOTO e colaboradores (2010), investigaram os efeitos de alguns

fitoestrogênios, dentre eles o cumestrol, em células de câncer de mama (MCF-7). Os resultados mostraram um efeito significativo no crescimento de células MCF-7 quando expostos ao  $17\beta$ -estradiol e um efeito moderado para o cumestrol. Os fitoestrogênios resveratrol e gliciteína reduziram o crescimento celular.

Além da ligação aos receptores estrogênicos, o cumestrol tem ação inibitória sobre a enzima citocromo P450 aromatase devido a sua ação antioxidante. Essa atividade revela o cumestrol como um possível agente na prevenção ou tratamento de câncer relacionado a estrógenos. A enzima citocromo P450 aromatase é responsável pela transformação de androstenediona e testosterona em estrona e  $17\beta$ -estradiol, respectivamente, acarretando a redução da concentração de estrógenos no sangue (HONG et al., 2007). Os inibidores da aromatase disponíveis para o tratamento do câncer de mama e câncer de ovário em mulheres pós-menopausa podem ser de dois tipos: inibidores esteroidais irreversíveis, como o exemestane ou inibidores não-esteroidais, que incluem o anastrozol e letrozol (MOKBEL, 2002).

Quanto a sua toxicidade, trabalhos têm sido conduzidos para determinar se a exposição ao cumestrol, durante os períodos de desenvolvimento, exerce efeitos a longo prazo sobre o sistema reprodutivo, mesmo após o término da exposição. No ovário, os estrogênios aumentam o crescimento folicular, o peso do ovário e do índice mitótico das células granulosas, e regulam a apoptose de células da camada granulosa (BENDELL e DORRINGTON, 1990; RICHARDS, 1980). Após indução de 0,1 mg de cumestrol por dia, durante 5 dias, BURROUGHS e colaboradores (1990), relataram as seguintes observações em camundongos: abertura vaginal precoce, cornificação vaginal persistente ovário-independente, ausência de corpos lúteos e folículos ovarianos hemorrágicos. Um estudo mais recente de MOON e colaboradores (2009) avaliou os efeitos no tamanho do ovário e indução de apoptose nas células ovarianas de ratas adultas, após exposição com doses crescentes de cumestrol, administradas diariamente, durante 21 dias. Os resultados revelaram uma redução significativa do peso dos ovários após cerca de 80 dias de vida, ocorrendo um aumento da apoptose das células do tecido ovariano após 140 dias de vida.

Além da atividade estrogênica, o cumestrol apresenta propriedade antioxidante, a qual é bem relatada para o grupo dos flavonóides. A atividade antioxidante dos flavonóides se dá por suas propriedades quelantes de ferro, sequestrantes de radicais livres, por sua capacidade de inibição de enzimas como as oxidases que são diretamente envolvidas nos processos oxidativos, como pela inibição de enzimas envolvidas indiretamente nesses processos, além de sua capacidade de aumentar a disponibilidade de antioxidantes endógenos (TRUEBA, 2003). A análise da estrutura química dos flavonóides indica que a retirada de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pode ocorrer através da presença de uma orto-hidroxilação no anel B da molécula, do número de grupos hidroxilas livre, uma ligação dupla no anel C, C2-C3, ou da presença de um grupo 3-hidroxila, sendo geralmente classificados como condições de atividade antioxidante e anti-radical (BURDA e OLESZEK, 2001).

Em relação à atividade antioxidante do cumestrol, o estudo de BURDA e OLESZEK (2001) avaliou a habilidade de inibição da oxidação do sistema composto por  $\beta$ -caroteno e ácido linoléico, além da capacidade de remoção dos radicais livres 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) de vários grupos de flavonóides. Os resultados revelaram uma potente atividade antioxidante apresentada pelos flavonóis. O cumestrol, único cumestano estudado, apresentou atividade antioxidante moderada, porém maior que das outras classes de flavonóides estudadas (flavonas, flavanonas, dihidroflavonóis, isoflavonas, biflavanonas).

MITCHELL e colaboradores (1998) avaliaram a atividade antioxidante de alguns fitoestrógenos, incluindo o cumestrol, e constataram que o mecanismo de ação antioxidante ocorre por meio da doação de hidrogênio/elétrons dos grupos hidroxilas fenólicas. Isso evidencia a possibilidade do cumestrol atuar como removedor de radicais livres, prevenindo danos oxidativos e até inibir o desenvolvimento de algumas doenças. Os autores relataram uma capacidade inibitória de peroxidação dezesseis vezes mais alta para os cumestanos em relação ao alfa tocoferol (antioxidante não-enzimático natural). Porém, essa potência não descarta a possibilidade de ser encontrada ação pró-antioxidante, de acordo com a concentração empregada.

LEE e colaboradores (2006) avaliaram a ação inibitória da oxidação de LDL induzido por íons cobre. Para isso, foi isolada uma série de dez flavonóides de raízes de *Glycine max*. O cumestrol apresentou potente atividade antioxidante, sendo essa pelo menos 20 vezes maior que das isoflavonas genisteína e daidzeína. Outro trabalho, realizado por BROZIC e colaboradores (2006), evidenciou uma maior atividade antioxidante para o cumestrol em relação à genisteína sobre a redução dependente de NADPH de 9,10-fenantrenequinona e progesterona. A atividade inibitória sobre 9,10-fenantrenequinona foi identificada devido a presença de hidroxilas nos carbonos 5 e 7 dos compostos testados.

Os estudos utilizando cumestrol revelam uma diversidade de ações e potências dessa molécula, atuando em enzimas do metabolismo de hormônios, receptores estrogênicos e nos tecidos que expressam esses receptores. Ainda há controvérsias em relação aos dados encontrados na literatura sobre os possíveis efeitos do cumestrol, porém os mecanismos de ação abrangem alterações na proliferação celular, expressão de receptores, ocorrência de apoptose, quebras de DNA, entre outras alterações celulares. Apesar de o cumestrol apresentar potencial atividade antioxidante, essa propriedade ainda é pouco explorada. Os estudos realizados até o momento, que incluem o cumestrol, não esclarecem os mecanismos de ação antioxidante, mas apenas avaliam de forma genérica a atividade antioxidante dos flavonóides.

### ***Sistemas nanoemulsionados para uso tópico***

Sistemas nanoemulsionados são emulsões que se caracterizam por apresentar gotículas de fase interna de tamanho nanométrico. Do ponto de vista farmacêutico, esses sistemas podem ser conceituados como dispersões compostas de gotículas oleosas de tamanho, geralmente, entre 100 e 300 nm, uniformemente dispersas em uma fase aquosa externa, estabilizadas por tensoativos e co-tensoativos adequados (BENITA, 1998; TROTTA et al., 2002; WASHINGTON, 1996). O diâmetro das gotículas é dependente, principalmente, do método de preparação e dos componentes da formulação. Não há especificação de faixa de tamanho que caracterize uma nanoemulsão, porém alguns autores consideram 500

nm como o limite máximo de diâmetro de gotícula para esses sistemas (CAPEK, 2004).

Nanoemulsões de uso tópico têm recebido grande atenção devido ao seu potencial uso como carreadores de substâncias de reduzida hidrossolubilidade, visto que esses sistemas podem proporcionar um aumento da solubilidade destes compostos lipofílicos. As nanoemulsões apresentam-se como líquidos de aspecto leitoso e pouco viscoso, sendo que o composto lipofílico pode ser dissolvido no núcleo oleoso e/ou adsorvido na interface óleo/água da nanoestrutura (FRONZA et al., 2004; SAKULKU et al., 2009; SONNEVILLE – AUBRUN et al., 2004). Esse nanosistema apresenta diversas aplicações, entre elas a administração tópica de compostos biologicamente ativos, visando tanto uma atividade sistêmica quanto uma atividade local. Sendo assim, a composição e as características físico-químicas apresentadas por essas formulações podem modular a permeação transdérmica de fármacos, podendo proporcionar aumento da permeação e do tempo de permanência do fármaco na pele (BENITA, 1999; ALVES et al., 2007; FASOLO et al., 2007; FASOLO et al., 2009; SILVA et al., 2009; RUKTANONCHAI et al., 2009). Com isso, esses sistemas apresentam como vantagens, quando de uso tópico, a modulação da barreira do estrato córneo, possível controle da penetração cutânea; o aumento da interação do ativo com a pele, devido à grande área superficial e a baixa tensão superficial das gotículas de óleo; e o aumento da estabilidade química do ativo (ALVES et al., 2007; FASOLO et al., 2009; JUNYAPRASERT et al., 2009).

Os principais componentes das nanoemulsões são os óleos e os tensoativos, que formam o núcleo oleoso das nanoemulsões, correspondendo de 5 a 20% da formulação. O óleo a ser utilizado e a sua concentração depende da solubilidade do fármaco nestes componentes (ZEEVI et al., 1994; FRIEDMAN et al., 1995; BENITA, 1999; PIEMI et al., 1999). Óleo de origem vegetal e/ou semi-sintética, constituído principalmente de triglicerídeo de cadeia média (TCM) tem sido correntemente utilizado para compor a fase interna da nanoemulsão, tendo como características favoráveis: boas propriedades de espalhabilidade, propriedades emoliente e promotor de permeação cutânea. TCM são ésteres de triglicerídeos, com 8 a 12 átomos de carbono, ligados ao glicerol, com grande capacidade de dissolver fármacos lipossolúveis (MUCHTAR et al., 1997; KLANG e BENITA, 1998).



Por serem biocompatíveis e conferirem propriedades hidratantes à pele, as lecitinas são os tensoativos mais utilizados para estabilizar a interface de nanoemulsões (SCHMID e KORTING, 1993; KOMMURU et al., 2001). Lecitinas são misturas complexas de fosfolípidios extraídos da gema de ovo ou da soja, cujo componente majoritário é a fosfatidilcolina (BENITA, 1998; KIBBE, 2000), empregadas, normalmente, na concentração de 1 a 3% em nanoemulsões. A associação da lecitina com tensoativos de natureza não iônica como polissorbatos, poloxâmero e polietilenoglicóis tem sido relatada na literatura (STRICKLEY, 2004; HAN et al., 2004). Dentre os co-tensoativos mais usados destaca-se o polissorbato 80. Esse tensoativo forma uma barreira estérica na interface impedindo a agregação das partículas (BENITA e LEVY, 1993; CUNHA JUNIOR et al., 2003).

Estudos com nanoemulsões carregadas positivamente têm sido propostos com o objetivo de promover a permeação/retenção cutânea de fármacos (PIEMI et al., 1999; YILMAZ e BORCHERT, 2006). Isso ocorre porque as células epiteliais apresentam cargas negativas, advindas de resíduos de proteínas carregados negativamente nas membranas externas das células e bombas ativas de íons (ROJANASAKUL et al., 1992). Com isso, a carga de superfície positiva das nanoemulsões conduz a um aumento significativo da penetração intracelular de fármacos incorporados nesse sistema, em decorrência das interações com as membranas celulares carregadas negativamente. Estearilamina, brometo de cetil trimetilamônio (CTAB) e fitoesfingosina são exemplos de tensoativos utilizados em nanoemulsões para conferir carga positiva a estas, devido aos grupamentos amônio ionizados, de maneira pH dependente ou não (EZRA et al., 1996; BENITA, 1999; PIEMI et al., 1999; YILMAZ e BORCHERT, 2005).

Em relação ao preparo das nanoemulsões, o método mais comumente usado é o da homogeneização por alta pressão. Esta técnica é realizada em duas etapas, primeiramente a fase aquosa contendo os componentes hidrofílicos e a fase oleosa contendo os componentes lipofílicos são aquecidas separadamente a uma temperatura de aproximadamente 70°C e, após, homogeneizadas com o uso de homogeneizadores de alta velocidade, obtendo-se assim, uma dispersão submicrométrica. Na segunda etapa, o tamanho é reduzido na faixa nanométrica

através do uso de homogeneizadores de alta pressão (YILMAZ e BORCHERT, 2006; TEERANACHAIDEEKUL et al., 2007).

Outra técnica que tem sido descrita na literatura e que vem sendo bastante aplicada é da emulsificação espontânea. Esta técnica apresenta a vantagem de ser simples e rápida, além de possuir baixo custo e permitir o preparo de pequenas quantidades de amostra em baixa temperatura. O uso de baixas temperaturas permite incorporar fármacos termolábeis nas formulações e também evita a degradação por hidrólise dos fosfolípidios, fenômeno este que pode ocorrer como descrito por RABINOVICH-GUILATT e colaboradores (2005). Esta técnica consiste em verter a fase oleosa solubilizada em um solvente orgânico, de forma contínua e lenta, sobre a fase aquosa, sob agitação constante e moderada. Após, o solvente orgânico é removido com a utilização de rota evaporador a baixa pressão à temperatura de 40 a 70°C. A formação das gotículas das nanoemulsões ocorre quando a fase orgânica é vertida na aquosa devido a turbulência interfacial durante a difusão do solvente na água, observando-se rápido espalhamento da interface, como resultado da difusão mútua entre os solventes, o que fornece energia suficiente para a formação das gotículas (FASOLO et al., 2007; SILVA et al., 2007).

Dentre as principais propriedades dos sistemas nanoemulsionados encontram-se o diâmetro médio das gotículas e o índice de polidispersão (IP), que descreve a distribuição do diâmetro das partículas, sendo que, geralmente valores de IP entre 0,2 a 0,3 indicam uma boa homogeneidade das gotículas na amostra (ALVES et al., 2007). Os principais fatores que influenciam o tamanho de gotícula são a composição da formulação e o procedimento de preparação. SILVA e colaboradores (2009) avaliaram a influencia dos óleos TCM e octildodecanol (ODD) sobre o diâmetro de gotículas de nanoemulsões contendo genisteína. Nesse estudo, foi constatado que o óleo de maior viscosidade (ODD) gerou tamanhos de partículas maiores. A técnica mais empregada para analisar esta propriedade é a espectroscopia de correlação de fótons (PCS), também conhecida como espalhamento de luz dinâmico (BENITA e LEVY, 2003; HASKELL, 1998). Técnicas complementares a esta, como microscopia eletrônica de transmissão (MET), têm sido empregadas para avaliar a morfologia e o tamanho das gotículas (FRIEDMAN et al., 1995; HATZIANTONIOU et al., 2007; RUKTANONCHAI et al., 2009).

O potencial zeta é o parâmetro utilizado para avaliar a carga de superfície das partículas nas nanoemulsões e fornece informações sobre a estabilidade do sistema, devido ao efeito barreira das forças eletrostáticas alterarem a velocidade de coalescência das gotículas. Valores de potencial zeta maiores que 30mV, em módulo, garantem repulsão entre as gotículas evitando assim flocação e coalescência (YILMAZ e BORCHERT, 2005; TEERANACHAIDEEKUL et al., 2007; RUKTANONCHAI et al., 2009). O potencial zeta reflete a composição da interface da nanoemulsão, seja em relação aos tensoativos formadores do filme, a presença de fármacos ou outras moléculas associadas à interface (SCHAFFAZICK et al., 2003). A sua determinação é realizada através de técnicas eletroforéticas específicas.

A lecitina, um dos tensoativos mais empregados, possui carga negativa devido à presença de fosfolipídeos, tais como, ácido fosfatídico e fosfatidilserina. Com isso, formulações contendo esse tensoativo apresentam elevado potencial zeta negativo em pH próximo da neutralidade (SILVA et al., 2009; PRIMO et al., 2008). Outro estabilizador de emulsão que propicia carga negativa à interface das partículas é o ácido oléico. Sua ionização no pH das formulações, conduz a elevados valores de potencial zeta negativo, podendo alcançar valores próximos a - 99 mV, atuando como bom estabilizador do sistema (FANG et al., 2004).

Além de valores de potencial zeta negativos, nanoemulsões podem apresentar elevado potencial zeta positivo, através do uso de tensoativos catiônicos como a estearilamina e brometo de cetil trimetilamônio (CTAB), que conduzem a valores de potencial zeta superiores a 50mV (ZEEVI et al., 1994),. A fitoesfingosina, um co-tensoativo, é outro componente que conduz a valores positivos de potencial zeta por apresentar seus grupos amino protonados em pH inferior a 9 (YILMAZ e BORCHERT, 2005). YILMAZ e BORCHERT (2006) desenvolveram nanoemulsões contendo fitoesfingosina com o objetivo de avaliar os efeitos da carga positiva na hidratação e elasticidade da pele. Nesse estudo, foram observados valores de potencial zeta de 35 a 38 mV, indicando boa estabilidade do sistema, além de aumento da umidade e elasticidade da pele pela ligação dos grupamentos positivos da molécula de fitoesfingosina com a superfície da pele carregada negativamente.

A avaliação do pH é outro parâmetro importante a ser considerado no desenvolvimento da nanoemulsão. O pH pode afetar a carga de superfície das nanoemulsões e conseqüentemente a estabilidade destes sistemas (YILMAZ e BORCHERT, 2005). Sendo assim, o pH final das nanoemulsões deve levar em consideração a estabilidade da forma farmacêutica, a estabilidade do fármaco no veículo, e a via de administração. O estudo realizado por MUCHTAR e colaboradores (1997) mostrou a influência do pH final sobre a ionização da indometacina, a qual se mantém não ionizada em pH ácido e, preferencialmente, solubilizada na fase oleosa. Normalmente, as nanoemulsões apresentam viscosidade entre 1,5 a 2 cP e fluxo newtoniano (FASOLO et al., 2007; SILVA et al., 2007). Estas características são desfavoráveis à aplicação tópica, uma vez que a maioria dos produtos dermatológicos e cosméticos apresenta comportamento plástico não newtoniano e para ser conveniente à aplicação tópica a viscosidade deve ser cerca de 100 cP (SCHWARZ et al., 1995).

Para adequar as formulações para uso tópico, muitos trabalhos têm adicionado polímeros com o objetivo de espessar o produto final. Entre os polímeros utilizados para esse fim, o Carbolpol 940® é o mais referenciado (SCHWARZ et al., 1996; ALVES et al., 2005; YILMAZ e BORCHERT, 2005; YILMAZ et al., 2006). Outros espessantes, como a goma xantana, também são descritos na literatura (SCHWARZ et al. 1995). Segundo JUNYAPRASERT e colaboradores (2009) o uso da goma xantana como espessante de nanoemulsões não altera os valores de potencial zeta após a incorporação no hidrogel. Isto ocorre devido às cargas similares negativas da goma xantana e da nanoemulsão, sendo que os valores não se alteraram para a formulação antes e após adequação ao uso tópico. Após adquirirem consistência adequada, as nanoemulsões normalmente apresentam-se como fluido não-newtoniano (ALVES et al., 2005) e com comportamento plástico ou pseudo-plástico tornando-se ideais para aplicação tópica (SCHWARZ et al., 1995). O pH final das formulações é ajustado entre 5,5 a 8,0 para adequar ao uso tópico (SCHWARZ et al., 1996).

### ***Permeação cutânea***

A propriedade de barreira da pele é baseada principalmente na camada mais externa da epiderme, o chamado estrato córneo. Essa camada é formada por células queratinizadas e anucleadas, e por uma camada lipídica composta por ceramidas, colesterol, ésteres de colesterol, ácidos graxos e uma pequena fração de sulfato de colesterol em forma de bicamadas que cercam os corneócitos (FERNANDEZ et al., 2000; FOLDVARI, 2000). Sendo assim, regiões hidrofílicas e lipofílicas são encontradas no interior desta matriz tornando o estrato córneo a principal barreira na absorção percutânea de fármacos aplicados topicamente (YILMAZ e BORCHERT, 2006; ALVES et al., 2007).

A pele representa uma via atrativa e acessível para administração de substâncias em relação às vias oral e parenteral, já que a liberação tópica de moléculas ativas pode evitar ou reduzir a toxicidade sistêmica (GUTERRES et al., 2007). A permeação de fármacos através da pele ocorre por difusão através da epiderme e pelos apêndices cutâneos, como os folículos pilares e glândulas sudoríparas, porém a contribuição dos apêndices é considerada pequena. Durante a difusão de moléculas pelo estrato córneo, há dois caminhos que podem ser identificados: a rota lipídica intercelular entre os corneócitos e a rota através dos corneócitos e dos lipídios. Sendo que, a principal via de permeação cutânea é a intercelular. Dessa forma, a substância permeante difundirá obrigatoriamente pela matriz lipídica, reconhecida como a maior determinante do transporte percutâneo (ILLEL, 1997; POTTS e GUY, 1992).

A integridade do estrato córneo, a idade da pele, o fluxo sanguíneo e o metabolismo são fatores que podem alterar a permeação de moléculas pela pele. As características físico-químicas das substâncias ativas, como grau de lipofilia e coeficiente de partição, além do veículo e da forma farmacêutica ou cosmética também influenciam a penetração/absorção (AULTON, 2005). Apesar de atrativa, a administração de fármacos pela via tópica, através de formulações convencionais, pode apresentar limitações devido à baixa taxa de penetração/permeação apresentada. Nesse sentido, quando a penetração/permeação de componentes ativos é limitada devido à característica de baixa absorção dos próprios compostos, a absorção dessas moléculas pode ser aumentada através de estratégias de desenvolvimento de formulação. Dentre as alternativas, destacam-se a adição de

promotores de permeação às formulações como, por exemplo, azona, terpenos, ácidos graxos, dimetilsulfóxido e alcoóis. Esses compostos provocam uma desorganização do estrato córneo e, conseqüentemente, diminuem a resistência da pele à difusão do fármaco (MARTINS e VEIGA, 2002). Porém o uso dessas substâncias, muitas vezes, é irritante ou mesmo tóxico (HADGRAFT e LANE, 2005). Dessa forma, outra alternativa correntemente relatada nos últimos anos é o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos, como as nanoemulsões (DUNCAN et al., 1990; FRIEDMAN et al., 1995). Esses sistemas, particularmente os sistemas nanoestruturados, têm recebido grande atenção devido ao seu potencial em aumentar a taxa de permeação/retenção de compostos na pele. Por outro lado, esses carreadores podem promover uma liberação controlada de fármacos através das camadas da pele, suprindo a pele com o fármaco por um período de tempo prolongado (JALÓN et al., 2001).

Devido às características físico-químicas apresentadas pelas nanoemulsões, como diâmetro de partícula e carga de superfície, ocorre uma maior interação dessas nanoestruturas pelos componentes da pele, e com isso há influência na velocidade e extensão de permeação de substâncias veiculadas nesses sistemas (BENITA, 1999). Além disso, os componentes das nanoemulsões (óleos e tensoativos) podem promover a penetração de moléculas através da fluidização natural da pele (SONNEVELLE-AUBRUN et al., 2004). Sendo assim, as nanoemulsões têm sido amplamente descritas como veículo para a liberação de fármacos pouco hidrossolúveis na pele, podendo ter efeito na superfície (protetores solares, cosméticos e antiinflamatórios), efeito cutâneo (corticoesteroides) ou efeito sistêmico (antiinflamatórios não esteroidais) (JUNYAPRASERT et al., 2009). O seu reduzido diâmetro de gotícula apresenta-se como vantagem em relação aos sistemas convencionais de uso tópico, pois permite a aplicação de um depósito uniforme na pele resultando em uma elevada superfície de contato do sistema com este órgão.

O estudo realizado por FERNANDEZ e colaboradores (2000) comparou o perfil de permeação cutânea *in vitro* da benzofenona-3 incorporada em três formulações, sendo duas emulsões convencionais e uma nanoemulsão composta pelos óleos TCM e óleo de coco e pelos estabilizantes: estearato de sorbitano,

monooleato de sorbitano e ou sepigel. Os resultados demonstraram que a nanoemulsão aumentou mais de três vezes a concentração de benzofenona-3 na pele após 8h de experimento, em comparação com as outras formulações. Logo, neste estudo, as nanoestruturas lipídicas atuaram como promotores de permeação cutânea da benzofenona-3.

Para avaliar a extensão da absorção de compostos e sua quantificação nas diversas camadas da pele, estudos de difusão em células de Franz têm sido amplamente utilizados (SILVA et al., 2009; FASOLO et al., 2009). Atualmente, o modelo de pele mais usado para os experimentos de permeação *in vitro* é a pele suína, devido a maior semelhança histológica dessa com a pele humana, quando comparada a outros modelos (TOUITOU et al., 1998; MOSER et al., 2001). Além dos estudos com permeação em pele, esse dispositivo é utilizado na avaliação do perfil de liberação de fármacos a partir de formas farmacêuticas tópicas através de membranas sintéticas, como as de celulose. Os experimentos com membranas sintéticas são realizados com o intuito de apresentar indicativos da avaliação da difusão de fármacos, fornecendo modelos úteis para avaliação da absorção cutânea (OECD, 2004). A célula de difusão de Franz é constituída de um compartimento doador e um receptor, separados pela membrana ou pele. A formulação é colocada no compartimento doador, sobre a pele, e o compartimento receptor é preenchido com uma solução (fluido receptor), na qual o composto de interesse tenha condições sink garantida. A homogeneidade deste fluido é assegurada por agitação magnética e a temperatura da célula é mantida pela camisa dupla. Nesse sentido, através desse método, pode-se quantificar a substância de interesse nas camadas da pele e a quantidade permeada no fluido receptor (OECD, 2004; BARTH, 2010).

SILVA e colaboradores (2009) avaliaram a permeabilidade percutânea da genisteína a partir de nanoemulsões compostas de TCM ou ODD e de lecitina de ovo. Os experimentos foram realizados em células de difusão de Franz, tendo como fluido receptor solução metanólica (50% v/v). Os experimentos foram mantidos em temperatura de 37°C por 8 horas. A quantidade total de genisteína permeada a partir do reservatório volátil (acetona) foi de aproximadamente 60  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  com um fluxo de 13  $\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ . Independente do núcleo oleoso usado a permeação cutânea da genisteína a partir da nanoemulsão foi mais lenta do que a partir da acetona

(permeabilidade intrínseca). A incorporação de genisteína em nanoemulsões parece reduzir o valor de fluxo da mesma na pele, isto pode ser atribuído às interações entre a genisteína e os fosfolípidios da lecitina de ovo. Os resultados também mostraram que a permeação através da pele da genisteína incorporada em ODD foi maior que a incorporada em TCM ( $21\text{mg}/\text{cm}^2$  e  $15\text{mg}/\text{cm}^2$ , respectivamente), de fato o valor de fluxo foi 1,4 vezes maior para a nanoemulsão com ODD. Em continuidade, recentemente, VARGAS e colaboradores (2011) avaliaram a distribuição da genisteína a partir das nanoemulsões desenvolvidas nas camadas da pele de orelha suína *in vitro*, antes e após a sua incorporação em hidrogéis, demonstrando a retenção preferencial da genisteína na epiderme, em acordo com os resultados obtidos na cinética de permeação.

Em estudo recente, ZHENG e colaboradores (2010) desenvolveram nanoemulsões compostas de miristrato de isopropila (fase oleosa), Tween 85 (surfactante), etanol (co-surfactante) e 2,5% de cloridrato de granisetron. Os pesquisadores compararam a liberação transdérmica do fármaco a partir de formulações contendo diferentes quantidades de miristato de isopropila e avaliaram o efeito da adição do promotor de permeação n-metil pirrolidona na nanoemulsão nos estudos de permeação. Os experimentos de permeação cutânea foram realizados em células de difusão de Franz com peles de ratos, sendo usado solução salina 0,9% como fluido receptor. Os autores verificaram que a formulação contendo 4% de fase oleosa e 10% do promotor foi a que apresentou maior taxa de permeação cutânea ( $85,39 \pm 2,90 \mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{h}$ ) e maior quantidade permeada total de cloridrato de granisetron ( $891,8 \pm 2,86 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ). A permeabilidade do fármaco aumentou em 4 vezes, comparado com a solução composta de 20% de Tween 85, 20% de etanol e 2,5% de cloridrato de granisetron.

Estudos têm demonstrado o efeito de nanoemulsões carregadas positivamente na avaliação da permeação cutânea de fármacos (PIEMI et al., 1999; FANG et al., 2004; FASOLO et al., 2009; HOELLER et al., 2009). PIEMI e colaboradores (1999) realizaram estudos de permeação *in vitro* com os antifúngicos econazol e miconazol (ambos na forma de nitrato), incorporados em nanoemulsões carregadas negativamente ou positivamente. As nanoemulsões carregadas positivamente mostraram-se mais eficientes em termos de permeação em relação às



carregadas negativamente, para ambas as moléculas, demonstrando que a presença da carga positiva promoveu a penetração. Os autores atribuíram este fato à carga negativa apresentada pela pele em pH neutro, e consequente interação desta com a formulação carregada positivamente.

FASOLO e colaboradores (2009) desenvolveram nanoemulsões contendo os flavonóides quercetina e 3-O-metilquercetina, compostas de ODD como fase oleosa e lecitina de ovo como tensoativo e nanoemulsões carregadas positivamente devido inclusão de brometo de cetiltrimetilamonio (CTAB) como tensoativo. Os autores avaliaram o perfil de permeação na pele destas moléculas a partir de solução de acetona e das nanoemulsões, através da utilização de células de Franz. Para este ensaio utilizou-se pele de orelha de suína e solução hidroetanólica (50%, v/v) como fluido receptor. O fluido receptor foi mantido a 37°C e sob agitação durante o experimento (8h), e as amostras foram coletadas em tempos pré-determinados e analisadas por HPLC. Os resultados indicaram que, independente da formulação a permeação dos flavonóides é reduzida, com acúmulo das moléculas na pele. A permeação dos flavonóides a partir da nanoemulsão carregada positivamente apresentou um aumento significativo em relação à nanoemulsão carregada negativamente.

HOELLER e colaboradores (2009) avaliaram o efeito de nanoemulsões carregadas negativamente e positivamente, contendo acetato de fludrocortisona ou pivalato de flumetasona como fármacos modelos, lecitina, vitamina E e surfactantes não-iônicos laurato de sacarose ou polissorbato 80. Fitoesfingosina foi adicionada ao sistema para gerar nanoemulsões carregadas positivamente. Após o desenvolvimento das formulações, realizou-se estudos de permeação cutânea em células de difusão de Franz com peles suínas e tampão fosfato pH 7,4 como fluido receptor. Os resultados desses estudos mostraram que, em relação aos surfactantes as formulações contendo polissorbato 80 apresentaram maiores taxas de permeação, sendo que a fitoesfingosina foi capaz de aumentar a taxa de permeação cutânea de acetato de fludrocortisona independente do surfactante usado.

## **Referências**

ADLERCREUTZ, H.; GORBACH, S.; GOLDIN, B. Dietary phyto-oestrogens and the menopause in Japan. **Lancet**, v. 339, p.1233, 1992.

AL-MAHARIK, N.; BOTTING, N. P. A new short synthesis of coumestrol and its application for the synthesis of [6,6a-11a -13 C3] coumestrol. **Tetrahedron**, v. 60, p. 1637-42, 2004.

ALVES, M. P.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R. Semisolid topical formulations containing nimesulide-loaded nanocapsules, nanospheres or nanoemulsion: development and rheological characterization. **Pharmazie**, v. 60, p. 900-904, 2005.

ALVES, M. P.; SCARRONE, A. L.; SANTOS, M.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S. S. Human skin penetration and distribution of nimesulide from hydrophilic gels containing nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 341, p. 215-220, 2007.

AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Botanical antioxidants in the prevention of photocarcinogenesis and photoaging. **Experimental Dermatology**, v. 15, p. 678-684, 2006.

AULTON, M. E. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 2 ed. Porto Alegre: ArtMed, 2005. Cap. 33. p. 504-536.

BARTH, A. B. **Metodologia analítica aplicada ao controle de qualidade do antifúngico cloridrato de butenafina na forma de creme e à avaliação da sua penetração cutânea in vitro**. 2010. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas). Curso de pós-graduação em Ciências farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BENASSAYAG, C.; PERROT-APPLANAT, M.; FERRE, F. Phytoestrogens as modulator of steroid action in target cells. **Journal of Chromatography B**, v. 777, p. 233-48, 2002.

BENDELL, J.J.; DORRINGTON, J. Estradiol-17 beta stimulates DNA synthesis in rat granulosa cells: action mediated by transforming growth factor-beta. **Endocrinology**, v. 5, p. 2663-2665, 1990.

BENITA, S.; LEVY, M.Y. Submicron Emulsion as colloidal Drug for Intravenous Administration: Comprehensive Physicochemical Characterization. **Journal of Pharmaceutical sciences**, V.87, n.11, p. 1069-1079, 1993.

BENITA, S. **Submicron Emulsion in Drug Targeting and Delivery**. Amsterdam: Harwood Academic Publishers, p. 340, 1998.

BENITA, S. Prevention of topical and ocular oxidative stress by positively charged submicron emulsion. **Biomed & Pharmacotherapy**, v. 53, p. 193-206, 1999.

BICKOFF, E. M.; LYMAN, R. L.; LIVINGSTON, A. L.; BOOTH, A. N. Characterization of Coumestrol, a Naturally Occurring Plant Estrogen. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, p. 3969-3971, 1958.

BROZIC, P.; SMUC, T.; GOBEC, S.; RIZNER, T. L. Phytoestrogens as inhibitors of the human progesterone metabolizing enzyme AKR1C1. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 259, p. 30-42, 2006.

BURDA, S.; OLESZEK, W. Antioxidant and Antiradical Activities of Flavonoids, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.6, p.49, 2001.

BURROUGHS, C.D.; MILLS, K.T.; BERN, H.A. Reproductive abnormalities in female mice exposed neonatally to various doses of coumestrol. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 2, p. 105-22, 1990.

CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable O/W emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 107, p. 125-155, 2004.

CARUSI, D. Phytoestrogens as hormone replacement therapy: an evidence-based approach. **Primary Care Update Ob/Gyn**, v. 7, p. 253-259, 2000.

CUNHA JUNIOR, A.S.; FIALHO, S.L.; CARNEIRO, L.B. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v.66, p.385-391, 2003.

DIOGO, L.C.; FERNANDES, R.S.; MARCUSSI, S.; MENALDO, D.L.; ROBERTO, P.G.; MATRANGULO, P.V.F.; PEREIRA, P.S.; FRANÇA, S.C.; GIULIATTI, S.; SOARES, A.M.; LOURENÇO, M.V. Inhibition of snake venoms and phospholipases A<sub>2</sub> by Extracts from native and genetically modified *Eclipta alba*: Isolation of active coumestans. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 104, p. 293-299, 2009.

DALAIS, F. S.; RICE, G. E.; WAHLQVIST, M. L.; GREHAN, M.; MURKIES, A. L.; MEDLEY, G.; AYTON, R.; STRAUSS, B. J. Effects of dietary phytoestrogens in postmenopausal women. **Climacteric**, v. 1, p. 124-129, 1998.

DUNCAN, J. I.; PAYNE, S. N. L.; WINFIELD, A. J.; ORMEROD, A. D.; THOMSON, A. W. Enhanced percutaneous absorption of a novel topical cyclosporin A formulation and assessment of its immunosuppressive activity. **British Journal of Dermatology**, v. 123, p. 631- 640, 1990.

EZRA, R.; BENITA, S.; GINSBURG, I.; KOHEN, R. Prevention of oxidative damage in fibroblast cell cultures and rat skin by positively-charged submicron emulsion of tocopherol. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 42, p. 291-298, 1996.

FANG, J-Y.; LEU, Y-L; CHANG, C-C. Lipid nano/submicron emulsions as vehicles for topical flurbiprofen delivery. **Drug Delivery**, v.11, p. 97-105, 2004.

FASOLO, D.; LIEGE, S.; HOLZSCHUH, M.; BASSANI, V.; TEIXEIRA, H. Validation of an isocratic LC method for determination of quercetin and methylquercetin in topical nanoemulsions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 44, p. 1174-1177, 2007.

FASOLO, D.; BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. Development of topical nanoemulsions containing quercetin and 3-O-methylquercetin. **Pharmazie**, v. 64, p. 726-730, 2009.

FERNANDEZ, C.; MARTI-MESTRES, G.; RAMOS, J.; MAILLOLS, H. LC analysis of benzophenone-3: II application to determination of in vitro and in vivo skin penetration from solvents, coarse and submicron emulsions. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 24, p. 155-165, 2000.

F'GUYER, S.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Photochemoprevention of skin cancer by botanical agents. **Photodermatology, Photoimmunology & Photomedicine**, v. 19, p. 56-72, 2003.

FOLDVARI M. Non-invasive administration of drugs through the skin: challenges in delivery system design. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v.12, p. 417-425, 2000.

FRIEDMAN, D. I.; SCHWARZ, J. S.; WEISSPAPIR, M. Submicron emulsion vehicle for enhanced transdermal delivery of steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Journal of Pharmaceutical science**, v. 84, p. 324-329, 1995.

FRONZA, T., CAMPOS, A., TEIXEIRA, H. Nanoemulsões como sistemas de liberação para fármacos oftálmicos. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, n. 4, p. 558-556, 2004.

GUTERRES, S. S.; ALVES, M.P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules for cutaneous application. **Drug Target Insights**, v. 2, p. 147-157, 2007.

HADGRAFT, J.; LANE, M.E. Skin permeation: the years of enlightenment. International. **Journal of Pharmaceutics**, v. 305, p. 2-12, 2005.

HALL, G; PHILLIPS, T. J. Estrogen and skin: the effects of estrogen, menopause, and hormone replacement therapy on the skin. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 53, p. 555-68, 2005.

HAN, J.; DAVIS, S. S.; PAPANDREOU, C.; MELIA, C.D.; WASHINGTON, C. Design and Evaluation of an Emulsion vehicle for paclitaxel Physicochemical Properties and Plasma Stability. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 9, 2004.

HARRIS, M. I. N.C. **Pele: estrutura, propriedades e envelhecimento**. 1 ed. São Paulo: Senac, p. 21-35, 2003.

HASKELL, R.J. Characterization of Submicron System Via Optical methods. **Journal of Pharmaceutical sciences**, v.87, n.2, p. 125-129, 1998.

HATZIANTONIOU , S.; DELI , G.; NIKAS , Y.; DEMETZOS, C.; PAPAIOANNOU G. Scanning electron microscopy study on nanoemulsions and solid lipid nanoparticlescontaining high amounts of ceramides. **Microscopy in Nanobiotechnology**, v. 38, p. 819-823, 2007.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medicinal significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v.96, p. 67-202, 2002.

HERNANDEZ, M.; MERCIER-FRESNEL. **Manual de Cosmetologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Revinter, cap. 3 e 4, 1999.

HODGERT, J.H.; ZACHAREWSKI, T.R.; HAMMOND, G.L. Interactions between human plasma sex hormone-binding globulin and xenobiotic ligands. **Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 75 , p.167-176, 2000.

HOELLER S.; SPERGER A.; VALENTA C. Lecithin based nanoemulsions: A comparative study of the influence of non-ionic surfactants and the cationic phytosphingosine on physicochemical behaviour and skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 370, p. 181-186, 2009.

HONG Y.; CHO M.; YUAN Y.C.; CHEN S. Molecular basis for the interaction of four different classes of substrates and inhibitors with human aromatase. **Biochemical Pharmacology**, v. 75, p. 1161-1169, 2007.

HUNTLEY, AL.; ERNST, E. Soy for the treatment of perimenopausal symptoms-a systematic review. **Maturitas**, v. 47, p. 1–9, 2004.

ILLEL B. Formulation for transfollicular drug administration: some recent advances. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v.14, p.207-219, 1997.

JUNQUEIRA, L. C.; & CARNEIRO, J. **Histologia Básica**, 9 ed. São Paulo: Guanabara Koogan, cap.18, p. 303-314, 1999.

JALÓN, E. G.; BLANCO-PRIETO, M. J.; YGARTUA, P.; SANTOYO, S. PLGA microparticles: possible vehicles for topical drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 226, p. 181-184, 2001.

JUNYAPRASERT, V. B.; TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E. B.; BOONME, P. e MÜLLER, R. H. Q10-loaded NLC versus nanoemulsions: stability, rheology and in vitro skin permeation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 377, p. 207-214, 2009.

KIBBE, A. M. (Ed.). **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 3 ed. London: Pharmaceutical Press, 2000.

KLANG, S.; BENITA, S. Design and evaluation of submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration. In: BENITA, S. **Submicron emulsions in drug targeting and delivery**. Amsterdam:, Harwood Academic Publishers, p. 340, 1998.

KNIGHT, D. C.; EDEN, J. A. A review of the clinical effects of the phytoestrogens. **Obstetrics & Gynecology**, v. 87, p. 897–904, 1996.

KOMMURU, T.R.; GURLEY, B.; KHAN, M.A.; REDDY, I. K. Selfemulsifying drug delivery systems (SEDDS) of coenzyme Q10: formulation development and

bioavailability assessment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 212, p. 233–246, 2001.

KUIPER, G. J. M.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B.; CORTON, J. C.; SAFE, S. H.; SAAG, P. T.; BURG, B.; GUSTAFSSON, J. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor  $\beta$ . **Endocrinology**, v. 139, p. 4252-4263, 1998.

KURZER, M.,S.; XU, X. Dietary Phytoestrogens. **Annual Review of Nutrition**, v. 17, p. 353–381, 1997.

LEE, J. H.; LEE, B. W.; KIM, J. H.; JEONG, T. S.; KIM, M. J.; LEE, W. S.; PARK, K. H. LDL-Antioxidant Pterocarpanes from Roots of *Glycine max* (L.) Merr. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 2057-2063, 2006.

MARTINS, M. R. F. M.; VEIGA, F. Promotores de permeação para a liberação transdérmica de fármacos: uma nova aplicação para as ciclodextrinas. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, p. 1, 2002.

MARKAVERICH, B.M.; ALEJANDRO, M.A. Type II [3H]estradiol binding site antagonists: inhibition of normal and malignant prostate cell growth and proliferation **International Journal of Oncology**, v. 12, p. 1127-1135, 1998.

MILLER J.G.; MAC, N. S. Gender and cutaneous melanoma. **British Journal of Dermatology**, v. 136, p. 657 – 665, 1997.

MITCHELL, J. H.; GARDNER, P. T.; MCPHAIL, D. B.; MORRICE, P. C.; COLLINS, A. R.; DUTHIE, G. G. Antioxidant Efficacy of Phytoestrogens in Chemical and Biological Model Systems, **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 360, p. 142–148, 1998.

MOKBEL, K. The evolving role of aromatase inhibitors in breast cancer. **International Journal of Clinical Oncology**, v.7, p. 279–83, 2002.

MOON, H.J.; SEOK, J. H.; KIM, S. S.; RHEE, G. S.; LEE, R.; YANG, J. Y.; CHAE, S. Y.; KIM, S. H.; KIM, J. H.; CHUNG, J. Y.; KIM, J. M.; CHUNG, S. Y. Lactational Coumestrol Exposure Increases Ovarian Apoptosis in Adult Rats. **Archives of Toxicology** v.83, p. 601–608, 2009.

MOSER, K.; KRIWET, K.; NAIK, A.; KALIA, Y.N.; GUY, R.H. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 52, p. 103-206, 2001.

MUCHTAR, S.; ABDULRAZIK, M.; FRUCHTPERY, J.; BENITA S. Ex vivo permeation Study of indomethacin from a submicron emulsion through albino rabbit cornea. **Journal of controlled Release**, v.44, p. 55-64, 1997.

MUELLER, S. O. Overview of in vitro tools to assess the estrogenic and antiestrogenic activity of phytoestrogens. **Journal of Chromatography B**,

**Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences.** v. 777, p. 155-165, 2002.

NDEBELE, K.; GRAHAM, B.; TCHOUNWOU, P. B. Estrogenic Activity of Coumestrol, DDT, and TCDD in Human Cervical Cancer Cells. **International Journal Environment Research and Public Health**, v.7, p. 2045-2056, 2010.

OECD. Organization for Economic Cooperation and Development: Skin absorption: *in vitro* method, test guideline No 428. **Guidelines for the Testing of Chemicals**. Paris, OECD, v.1, p, 1-8, 2004.

PATISAUL, H.B.; WHITTEN, P.L.; YOUNG, L.J. Regulation of estrogen receptor beta mRNA in the brain: opposite effects of 17beta-estradiol and the phytoestrogen, coumestrol. **Molecular Brain Research**, v.67, p. 65 - 71, 1999.

PATRI, G.; SILANO, V.; ANTON, R. **Plants in Cosmetics: Potentially harmful components**, Council of Europe Publishing, v. 3, p. 37-38, 2006.

PHILLIPS T. J.; DEMIRCAZ Z.; SAHU M. Hormonal effects on skin aging. **Clinical Geriatric Medicine**, v. 17, p. 661–672, 2001.

PIEMI, M. P. Y.; KORNER, D.; BENITA, S.; MARTY, J. P. Positively and negatively charged submicron emulsion for enhanced topical delivery of antifungal drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 58, n. 2, p. 177-187, 1999.

PINNEL, S. R. Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. **Journal of American Academy of Dermatology**, v. 48, p. 1-19, 2003.

POTTS, R.O.; GUY, R.H. Predicting skin permeability. **Pharmaceutical Research**, v. 9, p. 663-669, 1992.

PRIMO, F. L.; RODRIGUES, M. M. A.; SIMIONI, A. R.; BENTLEY, M. V. L. B.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. In vitro studies of cutaneous retention of magnetic nanoemulsion loaded with zinc phthalocyanine for synergic use in skin cancer treatment. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 320, p. 211–214, 2008.

RABINOVICHGUILATT, L.; DUBERNET, C.; GAUDIN, K.; LAMBERT, G.; COUVREU, P.; CHAMINADE, P. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 61, p. 69-76, 2005.

RAINE-FENNING, N. J.; BRINCAT, M. P.; MUSCAT-BARON, Y. Skin aging and menopause: implications for treatment. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 4, p. 371–378, 2003.

REBELLO, T. Guia de **Produtos Cosméticos**, 6 ed. São Paulo: Senac, p. 131-132, 2005.

RIBEIRO, C. **Cosmetologia Aplicada a Dermoestética**, 2 ed. São Paulo: Pharmabooks, p. 17-26; 206-212, 2010.

RICHARDS, J.S. Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. **Physiological Reviews**, v. 60, p. 51-89, 1980.

ROJANASAKUL, Y.; WANG, L.Y.; BHAT, M.; GLOVER, D. D.; MALANGA, C. J.; MA, J. K. The transport barrier of epithelia: a comparative study on membrane permeability and charge selectivity in the rabbit. **Pharmaceutical Research**, v. 9, p.1029-1034, 1992.

RUKTANONCHAI, U.; BEJRAPHA, P.; SAKULKHU, U.; OPANASOPIT, P.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; JUNYAPRASERT, V.; PUTTIPIPATKHACHORN, S. Physicochemical Characteristics, Cytotoxicity, and Antioxidant Activity of Three Lipid Nanoparticulate Formulations of Alpha-lipoic Acid. **AAPS PharmSciTech**, v. 10, p. 227-234, 2009.

SAKAMOTO, T.; HORIGUCHI, H.; OGUMA, E.; KAYAMA, F. Effects of diverse dietary phytoestrogens on cell growth, cell cycle and apoptosis in estrogen-receptor-positive breast cancer cells. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 21, p. 856-864, 2010.

SAKULKU, U.; NUCHUCHUA, O.; UAWONGYART, N.; PUTTIPIPATKHACHORN, S.; SOOTTITANTAWAT, A.; RUKTANONCHAIU. Characterization and mosquito repellent activity of citronella oil nanoemulsion. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 372, p. 105-111, 2009.

SATOR, P. G.; SCHMIDT, J. B.; SATOR M. O.; HUBER, J. C.; HONIGSMANN, H. The influence of hormone replacement therapy on skin ageing. A pilot study. **Maturitas**, v. 39, p. 43-55, 2001.

SCAMBIA, G.; MANGO, D.; SIGNORILE, P. G.; ANSELMI, R. A.; PALENA, C.; GALLO, D.; BOMBARDELLI, E.; MORAZZONI, P.; RIVA, A.; MANCUSO, S. Clinical effects of a standardized soy extract in postmenopausal women: a pilot study. **Menopause**, v. 7, p. 105-111, 2000.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S.; POHLMANN, A. R.; FREITAS, L. L. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHIMID, M.H.; KORTING, H.C. Liposomes for atopic dry skin: the rational for a promising approach. **Clinical Investigation**, v. 71, p. 649-653, 1993.

SCHOENROTH, L. J.; HART, D. A.; POLLARD, K. M.; FRITZLER, M.J. The Effect of Phytoestrogen Coumestrol on the NZB/W F1 Murine Model of Systemic Lupus. **Journal of Autoimmunity**, v. 23, p. 323-332, 2004.

SCHWARZ, J. S.; WEISSPAPIR, M. R.; SHANI, A.; AMSELEM, S. Enhanced antiinflammatory activity of diclofenac in jojoba oil submicron emulsion cream. **Journal of Applied Cosmetology**, v. 14, p. 19-24, 1996.



SCHWARZ, J. S.; WEISSPAPIR, M. R.; FRIEDMAN, D. I. Enhanced transdermal delivery of diazepam by submicron emulsion (SME) creams. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 5, p. 687-692, 1995.

SILVA, A. P. C., KOESTER, L. S., MAYORGA, P., BASSANI, V, TEIXEIRA, H. F. Development and validation of a LC method for determination of genistein in topical nanoemulsions. **Die Pharmazie**, v.62, p.732 - 734, 2007.

SILVA, A. P. C.; NUNES, B. R.; OLIVEIRA, M. C.; KOESTER, L.S.; MAYORGA, P.; BASSANI, L.; TEIXEIRA, H. F. Development of topical nanoemulsions containing the isoflavone genistein. **Pharmazie**, v. 64, p. 32-35, 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 5ª edição. Florianópolis/Porto Alegre: UFSC e UFRGS, 2004.

SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J. T.; L'ALLORET, F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 20, p. 145-149, 2004.

STRICKLEY, R. G. solubilizing Excipients in Oral and Injectable Formulations. **Pharmaceutical Research**, v. 21, p. 201-230, 2004.

TAPIERO, H.; NGUYEN, BA. G.; TEW, K. D.. Estrogens and environmental estrogens. **Biomedical Pharmacotherapy**, v. 56, p. 36-44, 2002.

TEERANACHAIDEEKUL, V.; SOUTO, E. B.; JUNYAPRASERT, V. B.; MULLER, R. H. Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q(10) - development, physicochemical characterization and in vitro release studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, p. 141–148, 2007.

THE MERCK INDEX, **An Encyclopedia of Chemicals, Drugs and Biologicals**. 12th edition, New Jersey: Merck & CO Inc. 1996.

THORNTON, M. J.; TAYLOR, A. H.; MULLIGAN, K.; AL-AZZAWI, F.; LYON, C. C.; O'DRISCOLL, J.; MESSENGER, A. G. Oestrogen receptor beta is the predominant oestrogen receptor in human scalp skin. **Experimental Dermatology**, v. 12, p. 181-190, 2003.

TOUITOU, E.; MEIDAN, V. M.; HORWITZ, E. Methods for quantitative determination of drug localized in the skin. **Journal of Controlled Release**, v.56, p. 7-21, 1998.

TROTTA, M.; PATTARINO, F.; IGNONI, T. Stability of drug-carrier emulsions containing phosphatidylcholine mixtures. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 53, p. 203-208, 2002.

TRUEBA, G. P. Los flavonoides: Antioxidantes o prooxidantes. **Revista Cubana Investigaciones Biomédicas**, v. 22, p. 48-57, 2003.

TSUTSUMI, N. Effect of coumestrol on bone metabolism in organ culture. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 18, p. 1012–1015, 1995.

VARGAS, B. A.; ARGENTA, D. F.; BORGHETTI, G.; KOESTER, L.; BASSANI, V.; TEIXEIRA, H. Validation of an LC method to determine skin retention profile of genistein from nanoemulsions incorporated in hydrogels. **Journal of Chromatographic Science**. In press 2011.

XU, Y.; FISHER, G. J. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. **Journal of Dermatological Science**, v. 1, p. 1-8, 2005.

WEINSTOCK, M. A. Epidemiologic investigation of non melanoma skin cancer mortality: the Rhode Island Follow-Back Study. **Journal Investigative of Dermatology**, v. 102, p. 6 – 9, 1994.

WIDYARINI, S.; DOMANSKI, D.; PAINTER, N.; REEVE, V. E. Estrogen receptor signaling protects against immune suppression by UV radiation exposure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 34, p. 12837-12842, 2006.

WASHINGTON, C. Stability of lipid emulsion for drug delivery. **Advanced Drug Delivery**, v. 20, p. 131-145, 1996.

WHITTEN, P. L.; PATISAUL, H. B.; YOUNG, L. J. Neurobehavioral actions of coumestrol and related isoflavonoids in rodents. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 24, p. 47– 54, 2002.

YANG, Y.-M.; HYUN, J.-W.; SUNG, M.-S.; CHUNG, H.-S.; KIN, B.-K.; PAIK, W.-H.; KANG, S.-S. E PARK, J.-G. The Cytotoxicity of Psoralidin from *Psoralea corylifolia* **Planta Medica**, v. 62, p. 353-354, 1996.

YILMAZ, E.; BORCHERT, H-H. Design of a phytosphingosine-containing, positively charged nanoemulsion as a colloidal carrier system for dermal application of ceramides. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 60, p. 91-98, 2005.

YILMAZ, E.; BORCHERT, H. Effect of lipid-containing, positively charged nanoemulsions on skin hydration, elasticity and erythema – An in vivo study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 307, p. 232-238, 2006.

ZEEVI, A.; KLANG, S.; ALARD, V.; BROSSARD, F.; BENITA, S. The design and characterization of a positively charged submicron emulsion containing a sunscreen agent. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 108, p. 57-68, 1994.

ZHENG, W. W.; ZHAO, L.; WEI Y. M.; YE, Y.; XIAO, S. H. Preparation and the in vitro evaluation of nanoemulsion system for the transdermal delivery of granisetron hydrochloride. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 58, p. 1015-1019, 2010.

