

JESSICA RIBEIRO NUNES

Avaliação de nanoemulsões para administração tópico-transdérmica de fenretinida como estratégia para prevenção farmacológica e tratamento adjuvante do câncer de mama

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

São Paulo

2023

JESSICA RIBEIRO NUNES

Avaliação de nanoemulsões para administração tópico-transdérmica de fenretinida como estratégia para prevenção farmacológica e tratamento adjuvante do câncer de mama

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação em farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia.

Orientador: Profa. Dra. Luciana Biagini Lopes

Versão parcial.

São Paulo

2023

RESUMO

Nunes, JR. Avaliação de nanoemulsões para administração tópico-transdérmica de fenretinida como estratégia para prevenção farmacológica e tratamento adjuvante do câncer de mama [Dissertação (Mestrado em Farmacologia)] – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2023.

A fim de contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas localizadas para prevenção do desenvolvimento e recorrência e tratamento adjuvante do câncer de mama, foi proposto neste trabalho o desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões (NE) tópicas para veiculação do retinóide fenretinida na pele das mamas. O monoterpene limoneno foi incorporado à nanoemulsão com o duplo objetivo de atuar como promotor de absorção e potencializador da citotoxicidade. Avaliou-se a influência do tipo de lipídeo líquido usado como fase oleosa (miristato de isopropila ou tricaprilina) e a concentração de terpeno (1-5% m/m) sobre as características físico-químicas do sistema. De maneira geral, todas as NE apresentaram gotículas com diâmetro inferior a 200 nm, PDI abaixo de 0,2 e potencial zeta aniônico (aproximadamente -10 mV). Os diâmetros das gotículas foram semelhantes independentemente do lipídeo utilizado como fase oleosa. Com o aumento da concentração de limoneno, houve uma tendência de redução de diâmetro com ambas as fases oleosas. As NEs se mostraram não irritantes no modelo HET-CAM, independentemente da concentração de limoneno, entretanto, apenas os sistemas contendo miristato de isopropila e limoneno a 1 e 2,5% se mostraram estáveis por 6 meses, além de permitirem incorporação da fenretinida a 1%. A penetração da fenretinida na pele aumentou em função do tempo de tratamento e da concentração de limoneno, sendo que a 2,5% do terpeno, maiores quantidades do fármaco foram observadas nas camadas viáveis da pele (5,8 vezes comparado à solução controle após 12 h). A combinação de fenretinida com limoneno aumentou a citotoxicidade do fármaco comparado a nanoemulsão sem limoneno (reduzindo valores de IC₅₀ em 2 a 4 vezes), contudo houve pouca diferença comparado a solução do fármaco. Além disso, a NE com limoneno e fenretinida foi capaz de diminuir significativamente (2 vezes, comparado à formulação sem fármaco) a migração de células tumorais, demonstrando seu potencial para os objetivos propostos.

Palavras chaves: câncer de mama, quimioprevenção, nanoemulsão, fenretinida, tópico, transdérmico.

ABSTRACT

Nunes, JR - Evaluation of nanoemulsions for local topical-transdermal administration of fenretinide for pharmacological prevention and adjuvant therapy for breast cancer [Dissertation (Master's thesis in Pharmacology)] – Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, 2023.

To contribute to the development of new local pharmacological strategies for prevention and adjuvant treatment of breast cancer, nanoemulsions (NE) were studied for topical-transdermal delivery of the retinoid fenretinide to the breast skin. The monoterpene limonene was incorporated with the dual role of enhancing penetration and cytotoxicity. The influence of the type of liquid lipid used as oil phase and concentration of limonene on the physicochemical properties of the nanoemulsion were studied. All nanoemulsions displayed a diameter below 200 nm, low polydispersity ($PDI < 0.2$) and anionic zeta potential (approximately -10 mV). Higher terpene concentrations showed a tendency to reduce diameter. The nanoemulsions did not show signs of local irritation in the HET-CAM model, regardless of limonene concentration. However, only the systems containing isopropyl myristate with limonene at 1 and 2.5% remained stable for 6 months, and enabled fenretinide incorporation at 1%. The skin penetration of fenretinide, assessed in Franz diffusion cells and porcine ear skin, increased with time and limonene concentration, with 2.5% of limonene providing higher quantities of the drug in viable layers of the skin (5.8-fold compared to the control solution at 12 h). Additionally, the combination of limonene and fenretinide resulted in an increased drug cytotoxicity compared with the nanoemulsion without limonene (a decrease in 2 to 4-fold IC_{50} values). However, few differences are shown compared to the drug solution. The NE with limonene and fenretinide was also capable of significantly reduce breast cancer cells migration (in 2-fold compare with the NE with limonene without drug), confirming its potential applicability for the proposed aims.

Key words: breast cancer, chemoprevention, nanoemulsion, fenretinide, topical administration, skin penetration.

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o tipo de câncer mais incidente entre as mulheres ¹, dispendo de demasiada importância clínica. De acordo com o GLOBOCAN, no ano de 2020 foram 2,2 milhões de mulheres diagnosticadas, sendo que 684.996 vieram a óbito, e considerando os diagnósticos realizados no período de 2015 a 2020, estimou-se que 7,8 milhões de mulheres viviam com esta neoplasia em todo o mundo ². Para o ano de 2040 estima-se que haverá 3 milhões de novos diagnósticos por ano e 1 milhão de óbitos em todo o mundo em decorrência da doença ²⁻³. Esta neoplasia corresponde à principal causa de morte por câncer em mulheres ⁴. No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA), estimou que no ano de 2020 ocorreram 66.280 novos casos, representando 43,74 casos por 100.000 mulheres ⁵; em homens, a incidência de câncer de mama é considerada rara, abrangendo <1% dos casos de cânceres diagnosticados em homens em todo o mundo ⁶⁻⁷.

O câncer de mama possui alta heterogeneidade ⁸ e alguns fatores podem ser considerados de risco por aumentarem as chances para o desenvolvimento desta neoplasia. Esses fatores podem ser divididos em intrínsecos e extrínsecos. Compreendem fatores intrínsecos: fatores genéticos (histórico familiar), lesões pré-tumorais na mama, idade e fatores reprodutivos (menarca de início antecipado, menopausa de início tardio, nuliparidade ou concepção do primeiro filho após os 30 anos) ⁹⁻¹⁰⁻¹¹. Os fatores extrínsecos estão relacionados ao estilo de vida, tais como o alto consumo de álcool, baixa prática de exercícios físicos, obesidade e a utilização de terapia hormonal com progesterona e estrogênio ⁹. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), o controle dos fatores extrínsecos reduz em cerca de 30% a chance do desenvolvimento da doença ².

Além de apresentar alta incidência, a doença é bastante heterogênea, apresentando diversas formas e subtipos. Na classificação do câncer de mama são considerados diversos fatores, tais como: características histológicas, grau de diferenciação celular, proliferação, características morfológicas relacionadas com sua origem e o tipo de células afetadas ¹²⁻¹³⁻¹⁴. São comumente categorizados em carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo ou infiltrado ¹⁴; entretanto há diversos subgrupos e a OMS reconhece a existência de pelo menos 18 tipos de câncer de mama invasivo ¹³.

Clinicamente, o câncer de mama pode ser caracterizado de acordo com propriedades imuno-histoquímicas, ou seja, a partir da identificação da expressão de receptores de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e o fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) ¹⁵⁻¹⁶. No geral, os tumores RE positivos são mais comuns, apresentam menor tamanho, sem acometimento dos linfonodos quando comparados aos tumores RE negativos ¹⁷, além de possuírem a expressão de RP dependente da expressão de RE ¹⁸⁻¹⁹.

Mutações no oncogene ERBB2 (Erythroblastosis oncogene B), responsável por codificar o receptor de tirosina quinase HER2, resulta em amplificação do oncogene e expressão exacerbada desses receptores na superfície celular, o que acarreta a ativação das vias de sinalização envolvidas e aumento da proliferação celular, angiogênese e invasividade tumoral ²⁰. Sendo a expressão exacerbada de HER2 presente em 15-20% dos casos de câncer de mama ²¹⁻²².

A ausência de receptores hormonais (RP e RE) e do oncogene HER2 caracteriza um tipo de tumor mais agressivo: o câncer de mama triplo negativo ²³. Este tipo de neoplasia acomete principalmente mulheres na pré-menopausa, com até 40 anos ²⁴, sendo frequentemente associado à mutação ou depleção dos genes TP53, RB1, BRCA1 e PIK3CA ²⁵. Estima-se que 15-20% dos casos de cânceres invasivos de mama correspondem ao tipo triplo negativo ²⁶, o qual geralmente se qualifica com um pior prognóstico, comportamento clinicamente agressivo, com alto risco de metástases em sítios próximos e/ou distantes e maior chance de óbito em 5 anos após o diagnóstico inicial ²⁵.

A despeito da sua alta incidência, há poucas estratégias com o intuito de prevenir o desenvolvimento de câncer de mama em pacientes considerados de alto risco, além de prevenir sua reincidência. Geralmente, pacientes com risco aumentado de desenvolverem esta neoplasia apresentam os seguintes fatores de risco: (i) histórico familiar, que pode dobrar as chances de uma mulher desenvolver câncer de mama caso haja um histórico familiar de primeiro grau (mãe, irmã e/ou filha) ¹⁰, (ii) mutações no gene BRCA1 e BRCA2, que aumentam as chances em 55-65% de desenvolvimento da doença ao longo de sua vida ²⁷, (iii) elevada densidade do tecido mamário, evidenciada nos exames de mamografia ¹⁰, e (iv) histórico de hiperplasias atípicas, hiperplasia ductal ou o carcinoma lobular *in situ* ²⁷.

Considerando as abordagens disponíveis, pacientes com alto risco de desenvolvimento/reincidência do câncer de mama possuem algumas opções com o intuito de prevenir o desenvolvimento e evolução da doença, como cirurgia, tratamento farmacológico e mudanças no estilo de vida ²⁸. Dentre as opções não farmacológicas utilizadas para a prevenção do câncer de mama destaca-se a mastectomia profilática bilateral. No entanto, esta abordagem é considerada muito invasiva, além de uma alternativa drástica com implicações na autoestima e saúde mental da paciente ²⁹. Alguns estudos ainda sugerem que a cirurgia pode diminuir, mas não eliminar o risco do desenvolvimento do tumor; sendo assim, alguns pacientes podem não experimentar benefícios a longo prazo ³⁰⁻³¹.

Abordado pela primeira vez por Sporn *et al.* ³², o tratamento farmacológico com o intuito de prevenir/reverter o desenvolvimento do câncer de mama e/ou reduzir o risco de recorrências da doença é conhecido como quimioprevenção. Contudo, a aplicação da quimioprevenção ainda se trata de um desafio, possuindo barreiras de aceitação com médicos, pacientes e o sistema de saúde ³³. As classes farmacológicas mais empregadas para a prevenção do desenvolvimento do câncer de mama em pacientes de alto risco, além de reduzir o risco de recorrências (quando não há o acometimento de linfonodos ³⁴), são os moduladores seletivos de estrogênio, como o tamoxifeno, e inibidores da aromatase, como anastrozol ³⁵. Estes são administrados por via oral e aplicáveis a pacientes cujo tumor apresenta expressão de receptor de estrogênio. Ambas as classes de fármacos são mais conhecidas pelo uso como terapia adjuvante (auxiliando na prevenção de recorrências), após remoção cirúrgica e radioterapia, devendo ser administrados por período de 5 a 10 anos ³⁶. É descrito que o uso adjuvante de tamoxifeno por via oral por 5-10 anos reduz em 50% o risco de câncer de mama contralateral ³⁷.

Moduladores do receptor de estrogênio, como o tamoxifeno, constituem a primeira escolha de fármaco em mulheres em fase pré-menopausa, e atuam inibindo competitivamente a ligação do estrogênio em seus receptores ³⁸ gerando um bloqueio da atividade transcricional dos RE ³⁹. Como consequência, modulam a expressão de genes controlados por estrogênio, como fatores de crescimento (incluindo o fator de crescimento transformador, TGF- α) ⁴⁰ e fatores angiogênicos secretados pelo tumor para estimulação de seu crescimento autócrino ou parácrino ⁴¹, o que promove uma desaceleração na proliferação celular. Além disso, são descritos mecanismos não

dependentes dos receptores de estrógeno como a modulação de TGF- β , proteína quinase C e a via da MAP quinase ⁴⁰. Por 50 anos, o tamoxifeno foi considerado padrão ouro para o tratamento adjuvante de câncer de mama RE positivo ⁴², e a escolha desta classe farmacológica advém da literatura bem estabelecida que evidencia benefícios do bloqueio da sinalização de estrógeno na incidência do câncer de mama ⁴³⁻⁴⁴.

Os inibidores da aromatase são utilizados em mulheres pós menopausa, uma vez que a enzima aromatase é a principal produtora de estrógeno ⁴⁵, esta enzima está presente no tecido do ovário, adiposo, mamário e no músculo ⁴⁵⁻⁴⁶. Em mulheres pós menopausa, a produção de estrógeno ocorrerá principalmente pelas enzimas presentes no tecido periférico, como o tecido adiposo ⁴⁵. Os inibidores da aromatase podem ser antagonistas competitivos ⁴⁶ ou atuarem como inibidores irreversíveis da enzima ⁴⁷ e tais interações variam de acordo com a estrutura química dos compostos ⁴⁶⁻⁴⁷. Ao interagirem com a aromatase, esta classe farmacológica atua inibindo a conversão de andrógeno a estrógeno ⁴⁸.

Porém, o uso oral dessas moléculas é associado a graves efeitos adversos sistêmicos, que incluem o risco do desenvolvimento do câncer endometrial, derrame, embolia pulmonar e trombose ⁴⁹⁻⁵⁰. Esses efeitos, associados às dificuldades de estimar o risco de desenvolvimento da doença com precisão e a ausência de aconselhamento individualizado para estimular pacientes a aderirem a estratégias de quimioprevenção, limitam a aceitação e adesão a essa estratégia ⁵¹.

Um estudo realizado utilizando tamoxifeno e raloxifeno por Roche *et al.* ⁵¹ evidencia a problemática pela aceitação da quimioprevenção. Em um grupo de 387 mulheres elegíveis para a quimioprevenção, 187 (48%) não aceitaram fazer parte do estudo, relatando baixo interesse em usar a medicação ou medo dos efeitos adversos associados. Similar a esses achados, Roetzheim *et al.* ⁵², iniciaram um estudo com 219 pacientes elegíveis à quimioprevenção, mas 45,6% (101 mulheres) não aceitaram participar do estudo, enquanto 49% (58 mulheres) que inicialmente aceitaram participar, não deram continuidade ou interromperam o tratamento devido aos efeitos adversos. Juntamente, a idade está relacionada à aceitação da terapêutica, uma vez que mulheres mais velhas parecem estar mais suscetíveis a tratamentos com terapia endócrina ⁵³.

Assim, fica claro que a decisão de aderir à quimioprevenção é complexa, depende de múltiplos fatores demográficos e do entendimento de pacientes sobre a gravidade da doença ³¹. Além disso, moduladores de estrógeno só podem ser utilizados em pacientes com RE positivo, e tumores com este fenótipo usualmente não apresentam um mau prognóstico ou elevada taxa de mortalidade prematura. Assim, embora tal abordagem apresente objetivo válido em termos de redução de sobrecarga para o sistema de saúde, mulheres e suas famílias ²⁸, não contempla outros pacientes cujos tumores não expressem RE.

Esse cenário demonstra a carência e a necessidade de desenvolvimento de novas estratégias farmacológicas eficazes, seguras e bem aceitas que possam ser utilizadas para prevenção farmacológica do câncer de mama na população de alto risco independente da expressão de receptores hormonais, como tratamento adjuvante pós-cirurgia e redução do risco de recorrência em mulheres que já apresentaram a doença. Este trabalho tem por objetivo contribuir com o desenvolvimento destas estratégias.

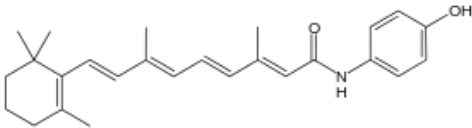
Considerando que quantidades suficientes de fármacos seriam necessárias apenas na mama para reverter o processo de carcinogênese mamária, que o tecido mamário é localizado logo abaixo da pele e, portanto, tem acesso mais fácil comparado a outros tecidos, a administração de fármacos na pele das mamas pode representar uma estratégia de boa aceitação, eficácia e segurança para pacientes de alto risco que sejam elegíveis para a quimioprevenção e como tratamento adjuvante pós-cirúrgico para evitar a reincidência do câncer de mama. Com base nesse contexto, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de nanoemulsões para administração tópico-transdérmica na pele das mamas do retinoide fenretinida.

1.1 Fenretinida e câncer de mama

Dentre as opções farmacológicas para prevenir o desenvolvimento do câncer estão os retinoides naturais e sintéticos, derivados da vitamina A, que demonstram um papel crucial na diferenciação celular e tecidual ⁵⁴. Sua capacidade de inibir a carcinogênese têm os tornado agentes quimiopreventivos de interesse em diversos estudos clínicos e pré-clínicos ⁵⁵⁻⁵⁶⁻⁵⁷⁻⁵⁸.

Entre os retinoides, destaca-se a fenretinida ou N-(4-Hidroxifenil) retinamida/4-HPR ⁵⁹, um retinoide sintético análogo do ácido retinoico, que desde seu desenvolvimento em 1960 pela R. W. Johnson Pharmaceuticals não foi aprovado para uso em decorrência principalmente da baixa biodisponibilidade devido à alta lipofilicidade. A tabela 1 apresenta as características físico-químicas da molécula.

Tabela 1 - Características físico-químicas da fenretinida ⁶⁰.

Estrutura Química	
Fenretinida (N-(4-Hidroxifenil) retinamida/4-HPR)	
Peso Molecular	391,3
LogP	5,8
Solubilidade em Água (25° C)	(2,71 ×10 ⁻⁴ g/L)

Os retinoides desempenham um papel essencial na diferenciação celular e tecidual devido à sua capacidade de ativar ou reprimir genes específicos através da dimerização induzida por ligantes de seus receptores nucleares (RARs e RXRs) e, conseqüentemente, suprimir o desenvolvimento tumoral ⁶¹. Entretanto, apesar de ser descrita uma ação da fenretinida em induzir apoptose, seu efeito parece não depender exclusivamente de sua interação com RARs. A fenretinida induz a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) e produção de óxido nítrico ⁶¹, o aumento do nível de ceramidas ⁶² e a ativação da via das caspases ⁶³, eventos associados à apoptose ^{62,64}. Também são descritos outros mecanismos promovidos pela fenretinida ligados ao aumento da expressão da fração RAR-β e capacidade de afetar diversas vias de transdução, como as vias do TGF-β ⁶⁵ e IGF ⁵⁴, contudo o mecanismo de ação ainda não parece ter sido completamente elucidado.

A fenretinida se mostra relevante como uma nova opção para os objetivos aqui propostos por duas razões. A primeira é o fato de seus efeitos não envolverem a interação com receptores hormonais, ou seja, seu uso para prevenção da doença não estaria limitado a tumores que expressam ER ou PR. A segunda razão é que ela e seu

principal metabolito o N-(4-metoxifenil)retinamida (4-MPR) mostraram seletividade em se acumular no tecido mamário humano ⁵⁴. Isso é evidenciado em estudos, no qual a concentração de 4-MPR foi 5 vezes maior no tecido mamário do que no plasma em doses de 200 mg/dia ^{55,66}. Esse acúmulo pode ser justificado pela lipofilicidade ainda maior do metabólito quando comparado à fenretinida ⁶⁶, o que propicia seu depósito em tecidos ricos em gordura, como a mama. Contudo, o mecanismo envolvido no acúmulo ainda não está totalmente elucidado ⁵⁵.

Diversos estudos clínicos foram conduzidos com a fenretinida para quimioprevenção, nos quais ela foi administrada por via oral em concentrações de 100-300 mg diárias ⁵⁴. Porém, por esta via, a fenretinida possui baixa absorção e biodisponibilidade e, para aumentar sua concentração plasmática, foram necessárias várias administrações ao dia ou a utilização de cápsulas muito grandes ⁶⁷. Apesar desses problemas, a molécula demonstrou eficácia em estudos em mulheres. Um estudo clínico conduzido por Veronesi *et al.* ⁶⁸ mostrou que a administração oral de 200 mg diárias de fenretinida em mulheres por 5 anos reduziu em 17% a reincidência do tumor. Quando esses dados foram analisados de acordo com a idade, em mulheres na pré-menopausa, foi observada uma redução de 38% da incidência tumoral 15 anos após o tratamento. A idade de início do tratamento parece relevante, sendo observada redução em 50% do risco de desenvolvimento da neoplasia em mulheres com 40 anos ou menos ⁶⁹. Além disso, a fenretinida foi descrita como um agente protetor também contra o desenvolvimento do câncer de ovário e a reincidência de tumor mamário em mulheres que foram tratadas para prevenção ou no início de lesões tumorais ⁷⁰.

Apesar da administração oral ser considerada uma via de administração confortável e conveniente para a administração de fármacos ⁷¹, em diversos estudos, a baixa eficácia de agentes quimiopreventivos em modelos pré-clínicos e clínicos é resultado de baixa biodisponibilidade, o que acarreta em aumento das doses para promover o efeito terapêutico ⁷². Ainda que a administração por via intravenosa da fenretinida culmine em um aumento de sua concentração plasmática ⁷³, esta via apresenta baixa aceitação em geral e requer profissionais treinados, tornando-a menos atrativa como uma alternativa para a quimioprevenção. Além disso, a administração intravenosa, assim como a oral, resulta em exposição sistêmica, ou seja, todo o organismo é exposto a efeitos desejados e indesejados dos fármacos, resultando no aparecimento de efeitos adversos, como a diminuição da adaptabilidade

ao escuro ⁶¹, pele e mucosa secas, pruridos, urticária, desconforto gastrointestinal e alteração na superfície ocular ⁷⁴.

Assim, tornam-se evidente as vantagens da utilização de vias alternativas que permitam a localização de fenretinida no tecido mamário. Considerando que a pele é de fácil acesso e que o tecido mamário é localizado logo abaixo do cutâneo, a administração da fenretinida na pele por meio da terapia tópico-transdérmica se apresenta como uma estratégia promissora.

1.2 Terapia tópico-transdérmica

Com a terapia tópico-transdérmica (TTT), é almejado o aumento da penetração cutânea profunda do fármaco de modo que ele seja capaz de se difundir até o tecido mamário, a fim de maximizar as quantidades de fármacos no seu alvo. Porém, é impossível prevenir totalmente a permeação e absorção transdérmica de uma fração da dose administrada na pele. Estima-se que parte da dose absorvida consiga alcançar/retornar ao tecido mamário por meio da circulação, contribuindo para aumentar a quantidade de fármaco que chega ao tecido mamário.

Essa abordagem torna-se mais interessante se considerarmos algumas características do tecido mamário que parecem favorecer que compostos aplicados na pele das mamas permaneçam no tecido mamário, especialmente aqueles de baixa hidrofiliabilidade. Essas características incluem a origem embrionária da mama como apêndice da pele ⁷⁵, presença de circulação linfática interna bem desenvolvida, de tecido subcutâneo e envelope adiposo ⁷⁶. Considerando a vasta área de superfície, a pele é acessível, sendo uma excelente candidata a eleição para administração de fármacos ⁷⁷. Além destas propriedades, essa via torna-se especialmente interessante para a fenretinida que, como descrito anteriormente, apresenta retenção no tecido mamário favorecida ⁵⁴.

Estudos anteriores mostram que fármacos aplicado na pele das mamas apresentaram concentrações plasmáticas inferiores comparadas às obtidas após administração oral ⁷⁸, o que nos permite inferir um menor número de efeitos adversos devido a uma menor exposição sistêmica de fármacos. Para exemplificar, um estudo randomizado, duplo-cego, no qual foi comparado tamoxifeno oral com gel

transdérmico de 4-hidroxitamoxifeno (um metabólito ativo do tamoxifeno) em mulheres com carcinoma ductal *in situ*, demonstrou que o efeito antiproliferativo do gel aplicado na pele da mama foi semelhante ao do tamoxifeno oral, mas os efeitos indesejados nos parâmetros endócrinos e de coagulação foram reduzidos ⁷⁹. Concentrações mais elevadas de diclofenaco também foram observadas no tecido mamário quando aplicado topicamente na pele da mama em comparação com sua administração na pele abdominal, enquanto as concentrações plasmáticas do fármaco foram menores quando comparado à via oral ⁸⁰.

Um outro estudo pré-clínico conduzidos por Lee *et al.* ⁸⁰ demonstrou vantagens da aplicação transdérmica de compostos quando comparado a outras vias de administração locais, como a administração subcutânea. Com a administração de géis transdérmicos foi possível alcançar concentrações 3-26 vezes maiores no tecido mamário de acordo com sua região de aplicação comparado à administração pela via subcutânea, além de obter concentrações plasmáticas similares entre os grupos. Fármacos como diclofenaco ⁸⁰, acetato de telapristona ⁸¹, bexaroteno ⁸² e paclitaxel ⁸³, já foram estudados para sua administração tópica e transdérmica em estudos clínicos e pré-clínicos.

Com o emprego da TTT, evita-se ainda o rápido metabolismo hepático (efeito de primeira passagem) ao qual alguns compostos estão sujeitos. Esta abordagem consiste em uma via não invasiva, autoadministrável e sem dispositivos caros para aplicação, tornando-a amplamente aplicável e podendo aumentar a aceitação para promoção da quimioprevenção por mulheres ⁸⁰.

Contudo, a principal dificuldade de aplicação da TTT se dá pela função barreira da pele. A pele humana é composta por 2 camadas distintas: a epiderme e a derme, sendo que cada camada possui diferentes propriedades, adicionando funcionalidade geral ao órgão ⁸⁴. A epiderme é avascular, possuindo uma estrutura multilamelar que representa diferentes níveis de diferenciação celular. Sua camada mais superficial é conhecida como estrato córneo, sendo composto por corneócitos (células queratinizadas densas e funcionalmente sem viabilidade) rodeados por bicamadas lipídicas multilamelares, correspondendo de 10-20 µm da epiderme ⁸⁵.

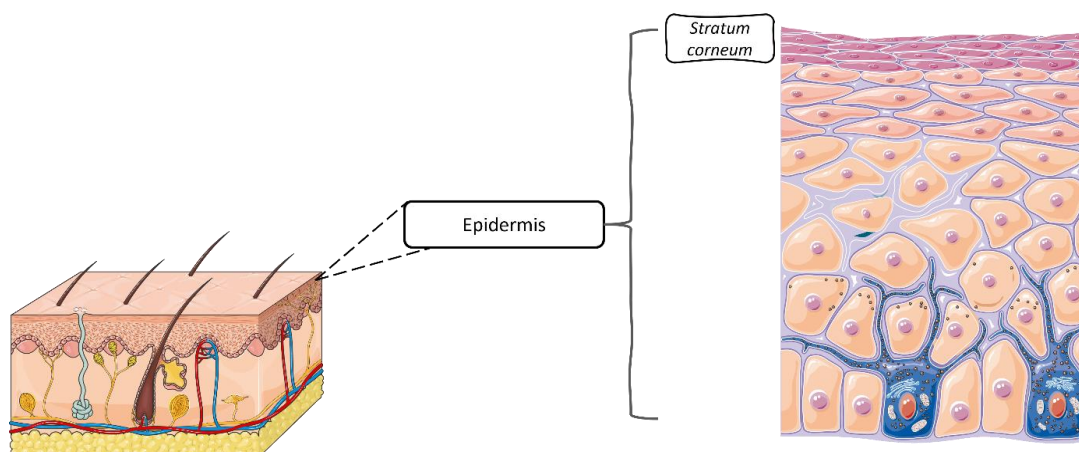


Figura 1 - Esquemática da estrutura da pele com ênfase a epiderme e estrato córneo.

Fonte: Figura criada com elementos disponibilizado em “*dermatology*” de Servier Medical Art by Servier, licença Creative Commons Attribution 3.0 Unported License. (Feito pela autora)

O estrato córneo possui como principal propriedade a função barreira, e essa propriedade se deve à composição e arranjo estrutural formado pela matriz lipídica intercelular e o envelope lipídico que envolve as células, formando um modelo de tijolo (corneócitos) e argamassa (matriz lipídica) ⁸⁵⁻⁸⁶. A epiderme viável apresenta um teor de água mais elevado que o estrato córneo, sendo responsável pela geração das células que constituirão o estrato córneo ⁸⁷.

Substâncias absorvidas por meio da pele atingem a corrente sanguínea por meio de capilares localizados na derme e a penetração através da epiderme pode se dar por 3 vias principais: transcelular, intercelular ou através de apêndices cutâneos, na qual o composto se difunde por folículos e glândulas sudoríparas que cruzam toda a epiderme ⁸⁸⁻⁸⁹. Na via transcelular, o fármaco atravessa os corneócitos e a matriz lipídica, alternando ambientes polares e apolares, enquanto na via intercelular, há o transporte dos compostos entre os corneócitos, isto é, pela matriz lipídica apenas. Assim, em ambas as vias, a substância permeante deverá difundir-se, em algum momento, através da matriz intercelular lipídica, que hoje é reconhecida como o principal determinante na taxa de transporte cutâneo ⁸⁵. Assim, a principal barreira a ser superada por fármacos para atingir camadas viáveis da pele é a camada mais externa, o estrato córneo, embora toda a epiderme tenha papel importante como barreira ⁸⁷.

Se considerarmos as características físico-químicas da molécula de fenretinida apresentadas na Tabela 1, é possível verificar que embora ela não tenha elevado peso molecular, apresenta alta lipofilicidade, o que dificulta sua penetração cutânea ⁹⁰⁻⁹¹. Assim, para vencer a barreira imposta pelo estrato córneo e garantir que ela se difunda pela pele, é importante utilizar-se de estratégias de promoção da penetração, dentre as quais os sistemas nanoestruturados apresentam-se como uma alternativa viável.

1.3 Nanoemulsões

Para veiculação do fármaco e promoção da TTT, visamos ao desenvolvimento de nanoemulsões, um sistema de gotículas coloidais dispersas, com tamanho até cerca de 500 nm ⁹², em que dois líquidos imiscíveis são misturados formando um sistema de única fase por meio de um agente emulsificante. Atuam como carreadores de fármacos, mas não possuem estabilidade termodinâmica e, por isso, podem sofrer separação de fases ao longo do tempo, embora, em geral, apresentem boa estabilidade cinética ⁹³. Para sua produção, geralmente são utilizados métodos de alta energia, promovendo a emulsificação entre as fases e formando gotículas na faixa nanométrica ⁹⁴.

Os principais atrativos da nanoemulsão são sua facilidade de produção, alta capacidade de encapsulação de fármacos lipofílicos, aumento da biodisponibilidade (principalmente quando consideradas outras vias de administração sistêmicas) e proteção do fármaco de fatores que possam induzir sua degradação, além de ser passível de administração por múltiplas vias como oral, intravenosa, ocular, nasal, e no caso deste trabalho, tópica ⁹⁵⁻⁹⁶⁻⁹⁷. Além disso, a nanoemulsão pode auxiliar na solubilização e veiculação de fármacos com baixa solubilidade em água em sistemas aquosos ⁹⁸. Como a fenretinida é um fármaco extremamente lipofílico (com log P superior a 5), o emprego de nanoemulsões pode permitir a dispersão do fármaco em um ambiente aquoso e a incorporação de maiores quantidades comparado a outras formulações ricas em água (como géis), uma vez que nanoemulsões são conhecidas por sua capacidade de solubilizar fármacos lipofílicos ^{87,93}. O sistema de nanoemulsões possui gotículas de pequeno tamanho com maior área de superfície, proporcionando maior superfície de transferência de fármacos, o que geralmente é associado com maior transporte através de barreiras biológicas. Além disso,

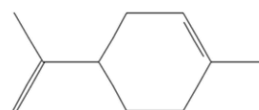
nanoemulsões podem ser formuladas para compor diferentes tipos de formas farmacêuticas finais como espumas, líquidos, sprays e géis ⁹³.

Para exemplificar, a incorporação e veiculação cutânea de fármacos lipofílicos, estudos conduzidos por Shakeel *et al.* ⁹⁹ demonstraram que nanoemulsões são capazes de incorporar o celecoxibe (fármaco lipofílico com baixa solubilidade ¹⁰⁰) e promover aumento na sua penetração na pele de murinos. Nanoemulsões foram recentemente desenvolvidas para administração intraductal de ceramidas, com boa biocompatibilidade e capacidade de prolongar a retenção do fármaco no tecido mamário ¹⁰¹. Quimioterápicos como tamoxifeno, paclitaxel e dacarbazina vêm sendo encapsulados em nanoemulsões para aumentar sua citotoxicidade, diminuir efeitos adversos e a resistência a múltiplos fármacos ⁹⁸.

Na constituição da nanoemulsão incluímos o monoterpeneo limoneno, que além de ser um conhecido promotor de penetração ¹⁰², teve sua ação quimioterápica e quimiopreventiva demonstrada em estudos anteriores ¹⁰³⁻¹⁰⁴. Em modelos animais, o limoneno mostrou-se capaz de inibir ou diminuir a taxa de crescimento de tumores do tipo linfoma, mamário, gástrico, hepático, pulmonar e de próstata ¹⁰³.

Tabela 2 - Características da estrutura do monoterpeneo limoneno ²⁰¹.

Limoneno



Estrutura química

Características estruturais do limoneno

Monoterpeneo monocíclico encontrado em abundância na casca de frutas cítricas, em sua estrutura possui um centro quiral, sendo um ativo ótico com dois existentes enantiômeros, (R)/(S) – limoneno.

O limoneno e seus metabólitos, como o álcool perilíco, demonstram notáveis efeitos bioquímicos como agentes antitumorais. Esses compostos são capazes de induzir apoptose por meio do aumento da expressão de fatores pró-apoptóticos ¹⁰⁵. Estudos demonstram que o limoneno, administrado localmente em modelo murino de

câncer de pele, foi capaz de inibir a via de sinalização Ras-ERK, a inflamação e o estresse oxidativo celular ¹⁰⁶. Em modelos de carcinogênese mamária em ratos, o limoneno demonstrou efeito de regressão tumoral associado ao aumento do receptor de fator de crescimento de insulina II (IGF-2) e TGF- β ¹⁰⁷. Tais mudanças levaram à parada de ciclo celular na fase G1, o que acarreta a apoptose e supressão tumoral ¹⁰⁸. O papel de TGF- β na regulação tumoral é ambíguo, e evidências sugerem que em estágios iniciais, o TGF- β atua de maneira predominante como um agente supressor tumoral. Contudo em estágios tumorais mais avançados, ocorre uma mudança no contexto genético e epigenético no ambiente tumoral e a resposta ao TGF- β passa a ser alterada, acarretando uma atividade promotora ¹⁰⁹.

Um estudo conduzido por Miller *et al.* ¹¹⁰, no qual a administração de 1 g de limoneno foi realizada oralmente em mulheres antes da ressecção cirúrgica de tumores na mama, mostra um acúmulo preferencial do terpeno no tecido mamário, quando comparado ao plasma. O composto produziu uma diminuição pronunciada de ciclina D1, uma proteína importante na progressão do ciclo celular, e que pode levar à parada do ciclo celular e, conseqüentemente, diminuição da proliferação celular. Vigushin *et al.* ¹¹¹, ao administrar oralmente cápsulas contendo limoneno, em um estudo clínico fase 1 com pacientes com carcinomas refratários ou metastáticos, observou a redução em 50% do tamanho do tumor em pacientes com câncer de mama.

O limoneno também apresenta efeito promotor de penetração cutânea, uma característica frequente em óleos essenciais. Esse efeito decorre de três mecanismos: ruptura da estrutura lipídica altamente ordenada do estrato córneo, aumento da difusão do fármaco e/ou aumento da partição do fármaco no tecido ¹¹². O limoneno mostrou-se capaz de aumentar a penetração de compostos lipofílicos e anfifílicos na pele ¹¹³, como a imipramina ¹¹⁴ e tamoxifeno ¹¹⁵.

De maneira geral, o limoneno é caracterizado como um composto seguro como aromatizante sintético; contudo, em altas concentrações pode promover irritação e erupção cutânea ¹¹⁶. Em murinos, a administração cutânea de limoneno com doses de 0,5 g culminou em eventos irritativos leves, mostrando baixo potencial de irritação ¹¹⁷; em mulheres a administração de 0,14 g de limoneno diluído em óleos para

aplicação tópica por 4 semanas diariamente apresentou um perfil seguro para aplicação ¹¹⁸.

Porém, o limoneno é um composto volátil na presença de ar, umidade e altas temperaturas ¹¹⁹, e pode sofrer oxidação em armazenamento ¹²⁰, por isso a sua incorporação em sistemas coloidais, inclusive nanoemulsões ^{119,121} pode ser vantajosa a fim de preservar sua integridade e concentração em compostos.

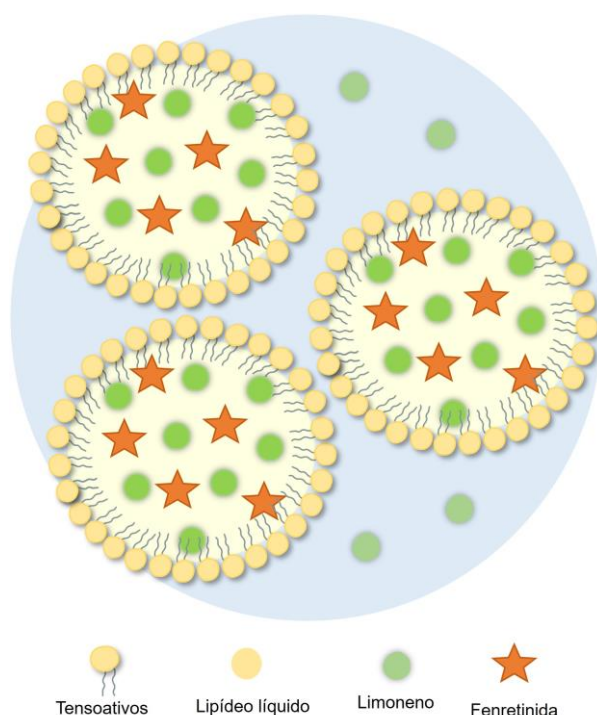


Figura 2- Representação esquemática da estrutura da NE e sua composição.

Fonte: Elaborado pela autora.

Com base nestas evidências, o limoneno foi incorporado à nanoemulsão com o duplo objetivo de melhorar a penetração cutânea da fenretinida e potencializar seu efeito citotóxico. Associando-se a nanoemulsão com uma via de administração não invasiva, visamos contribuir para vencer as problemáticas existentes na utilização da fenretinida para a prevenção farmacológica local do desenvolvimento, recorrências e tratamento adjuvante do câncer de mama.

2 CONCLUSÃO

Neste estudo, foi possível desenvolver e caracterizar sistemas nanodispersos ricos em água para a incorporação de um fármaco altamente lipofílico. Foi demonstrado que o tipo de lipídeo líquido utilizado como fase oleosa influencia as características físico-químicas do sistema, culminando em alterações no diâmetro, viscosidade e a estabilidade cinética. Obtivemos um sistema estável por 180 dias quando composto por miristato de isopropila, com baixa variação de diâmetro e PDI no sistema. De maneira semelhante, a concentração de limoneno foi relevante: embora quando incorporado até 5% não promova eventos irritativos em ensaio HET-CAM, NE estáveis foram obtidas apenas com concentrações de até 2,5% do terpeno na presença de fenretinida.

A incorporação de 2,5% de limoneno nas NE foi capaz de aumentar em 9 e 3,4 vezes a permeação e penetração cutânea da fenretinida, respectivamente, demonstrando a vantagem da incorporação do monoterpene enquanto promotor de permeação. Nesta concentração de terpeno na NE, o limoneno mostrou-se capaz de potencializar a citotoxicidade da fenretinida dependendo do tempo de tratamento e da linhagem: reduções de até 4 vezes no IC₅₀ do fármaco em linhagens de câncer de mama puderam ser observadas comparado à nanoemulsão sem limoneno. Mesmo que a magnitude deste efeito seja inferior ao esperado quando comparado ao fármaco livre, é importante ressaltar que maiores quantidades de fenretinida poderão chegar ao tecido devido ao efeito promotor de penetração da NE com limoneno. Um efeito interessante foi a redução da migração celular, que foi mais pronunciada na presença do terpeno em células MDA-MB-231. Assim, esses resultados sugerem benefícios da combinação entre fenretinida e limoneno em nanoemulsões para veiculação cutânea desses ativos, principalmente quanto ao aumento da penetração cutânea, mas os efeitos de potencialização da citotoxicidade e migração mostraram-se variar com o tipo celular e tempo de tratamento.

REFERÊNCIAS

1. Siegel RL, Miller KD, Wagle NS, et al. Cancer statistics, 2023. *CA Cancer J Clin* 2023; 73: 17–48.
2. World Health Organization (WHO), <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer> (2021).
3. GLOBOCAN. Global Cancer Observatory: Cancer Tomorrow, <https://gco.iarc.fr/> (2020, accessed 1 March 2021).
4. Duggan C, Trapani D, Ilbawi AM, et al. National health system characteristics, breast cancer stage at diagnosis, and breast cancer mortality: a population-based analysis. *Lancet Oncol* 2021; 22: 1632–1642.
5. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). *Estimativa 2023: Incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro, 2022.
6. Parise CA, Caggiano V. The association of race/ethnicity in male breast cancer survival within similar comorbidity cohorts. *Cancer*. Epub ahead of print 2023. DOI: 10.1002/cncr.34592.
7. Ottini L, Palli D, Rizzo S, et al. Male breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010; 73: 141–155.
8. Viale G. The current state of breast cancer classification. *Ann Oncol*; 23. Epub ahead of print 2012. DOI: 10.1093/annonc/mds326.
9. Momenimovahed Z, Salehiniya H. Epidemiological characteristics of and risk factors for breast cancer in the world. *Breast Cancer Targets Ther* 2019; 11: 151–164.
10. Kleibl Z, Kristensen VN. Women at high risk of breast cancer: Molecular characteristics, clinical presentation and management. *Breast* 2016; 28: 136–144.
11. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, et al. Risk factors and preventions of breast cancer. *Int J Biol Sci* 2017; 13: 1387–1397.
12. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: The role of histological grade. *Breast Cancer*

- Res; 12. Epub ahead of print 2010. DOI: 10.1186/bcr2607.
13. Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: Is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol* 2009; 6: 718–730.
 14. Malhotra GK, Zhao X, Band H, et al. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol Ther* 2010; 10: 955–960.
 15. Reis-Filho JS, Pusztai L. Gene expression profiling in breast cancer: Classification, prognostication, and prediction. *Lancet* 2011; 378: 1812–1823.
 16. American Cancer Society. Understanding a Breast Cancer Diagnosis, Types of Breast Cancer. American Cancer Society. *Underst a Breast Cancer Diagnosis* 2016; 1–42.
 17. Tao ZQ, Shi A, Lu C, et al. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochem Biophys* 2015; 72: 333–338.
 18. Trabert B, Sherman ME, Kannan N, et al. Progesterone and breast cancer. *Endocr Rev* 2019; 41: 320–344.
 19. Liu S, Chia SK, Mehl E, et al. Progesterone receptor is a significant factor associated with clinical outcomes and effect of adjuvant tamoxifen therapy in breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 119: 53–61.
 20. Nami B, Maadi H, Wang Z. Mechanisms underlying the action and synergism of trastuzumab and pertuzumab in targeting HER2-positive breast cancer. *Cancers (Basel)*; 10. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.3390/cancers10100342.
 21. Asgari-Karchekani S, Aryannejad A, Mousavi SA, et al. The role of HER2 alterations in clinicopathological and molecular characteristics of breast cancer and HER2-targeted therapies: a comprehensive review. *Med Oncol* 2022; 39: 1–15.
 22. Harari D, Yarden Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. *Oncogene* 2000; 19: 6102–6114.
 23. Kumar P, Aggarwal R. An overview of triple-negative breast cancer. *Arch Gynecol Obstet* 2016; 293: 247–269.
 24. Howard FM, Olopade OI. Epidemiology of Triple-Negative Breast Cancer.

Cancer J 2021; 27: 8–16.

25. Collignon J, Lousberg L, Schroeder H, et al. Triple-negative breast cancer: Treatment challenges and solutions. *Breast Cancer Targets Ther* 2016; 8: 93–107.
26. Lyons TG. Targeted Therapies for Triple-Negative Breast Cancer. *Curr Treat Options Oncol*; 20. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1007/s11864-019-0682-x.
27. Feng Y, Spezia M, Huang S, et al. Breast cancer development and progression: Risk factors, cancer stem cells, signaling pathways, genomics, and molecular pathogenesis. *Genes Dis* 2018; 5: 77–106.
28. Britt KL, Cuzick J, Phillips KA. Key steps for effective breast cancer prevention. *Nat Rev Cancer* 2020; 20: 417–436.
29. Piot-Ziegler C, Sassi ML, Raffoul W, et al. Mastectomy, body deconstruction, and impact on identity: A qualitative study. *Br J Health Psychol* 2010; 15: 479–510.
30. Metcalfe KA, Semple JL, Narod SA. Time to reconsider subcutaneous mastectomy for breast-cancer prevention? *Lancet Oncol* 2005; 6: 431–434.
31. Kaplan CP, Kim SE, Wong ST, et al. Willingness to use tamoxifen to prevent breast cancer among diverse women. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 133: 357–366.
32. Sporn, Michael B. and Suh N. Chemoprevention of cancer. *Carcinogenesis* 2000; 21: 525–530.
33. Ball S, Arevalo M, Juarez E, et al. Breast cancer chemoprevention: An update on current practice and opportunities for primary care physicians. *Prev Med (Baltim)* 2019; 129: 105834.
34. Pan H, Gray R, Braybrooke J, et al. 20-Year Risks of Breast-Cancer Recurrence after Stopping Endocrine Therapy at 5 Years. *N Engl J Med* 2017; 377: 1836–1846.
35. Cuzick J, DeCensi A, Arun B, et al. Preventive therapy for breast cancer: A

- consensus statement. *Lancet Oncol* 2011; 12: 496–503.
36. American Cancer Society. Breast Cancer: Treating Breast Cancer. *Am Cancer Soc* 2019; 1–120.
 37. Bouchard-Fortier A, Provencher L, Blanchette C, et al. Prognostic and predictive value of low estrogen receptor expression in breast cancer. *Curr Oncol* 2017; 24: e106–e114.
 38. Jordan VC. Long-term adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 1990; 15: 125–136.
 39. Bekele RT, Venkatraman G, Liu RZ, et al. Oxidative stress contributes to the tamoxifen-induced killing of breast cancer cells: Implications for tamoxifen therapy and resistance. *Sci Rep* 2016; 6: 1–17.
 40. Mandlekar S, Kong ANT. Mechanisms of tamoxifen-induced apoptosis. *Apoptosis* 2001; 6: 469–477.
 41. Osborne CK. Tamoxifen in the Treatment of Breast Cancer. *N Engl J Med* 1998; 339: 1609–1618.
 42. Bogush TA, Polezhaev BB, Mamichev IA, et al. Tamoxifen Never Ceases to Amaze: New Findings on Non-Estrogen Receptor Molecular Targets and Mediated Effects. *Cancer Invest* 2018; 36: 211–220.
 43. Yue W, Yager JD, Wang JP, et al. Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. *Steroids* 2013; 78: 161–170.
 44. Jordan VC. Tamoxifen (ICI46,474) as a targeted therapy to treat and prevent breast cancer. *Br J Pharmacol* 2006; 147: 269–276.
 45. Nelson LR, Bulun SE. Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol* 2001; 45: S116–S124.
 46. MILLER W. Aromatase inhibitors: mechanism of action and role in the treatment of breast cancer. *Semin Oncol* 2003; 30: 3–11.
 47. Saad ED, Bromberg S, Katz A, et al. Inibidores da aromatase no câncer de mama: da doença metastática ao tratamento adjuvante. *Rev Bras Cancerol*

- 2002; 48: 555–567.
48. Chumsri S, Howes T, Bao T, et al. Aromatase, aromatase inhibitors, and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2011; 125: 13–22.
 49. Ropka ME, Keim J, Philbrick JT. Patient Decisions about Breast Cancer Chemoprevention: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Clin Oncol* 2010; 28: 3090–3095.
 50. Waters EA, McNeel TS, Stevens WM, et al. Use of tamoxifen and raloxifene for breast cancer chemoprevention in 2010. *Breast Cancer Res Treat* 2012; 134: 875–880.
 51. Roche CA, Tang R, Coopey SB, et al. Chemoprevention acceptance and adherence in women with high-risk breast lesions. *Breast J* 2019; 25: 190–195.
 52. Roetzheim RG, Lee JH, Fulp W, et al. Acceptance and adherence to chemoprevention among women at increased risk of breast cancer. *Breast* 2015; 24: 51–56.
 53. Makubate B, Donnan PT, Dewar JA, et al. Cohort study of adherence to adjuvant endocrine therapy, breast cancer recurrence and mortality. *Br J Cancer* 2013; 108: 1515–1524.
 54. Cazzaniga M, Varricchio C, Montefrancesco C, et al. Fenretinide (4-HPR): A preventive chance for women at genetic and familial risk? *J Biomed Biotechnol*; 2012. Epub ahead of print 2012. DOI: 10.1155/2012/172897.
 55. Salata GC, Malagó ID, Carvalho Dartora VFM, et al. Microemulsion for Prolonged Release of Fenretinide in the Mammary Tissue and Prevention of Breast Cancer Development. *Mol Pharm* 2021; 18: 3401–3417.
 56. Apolinário AC, Hauschke L, Nunes JR, et al. Design of multifunctional ethosomes for topical fenretinide delivery and breast cancer chemoprevention. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*; 623. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2021.126745.
 57. Bensa V, Calarco E, Giusto E, et al. Retinoids delivery systems in cancer: Liposomal fenretinide for neuroectodermal-derived tumors. *Pharmaceuticals*;

14. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.3390/ph14090854.
58. Decensi A, Zanardi S, Argusti A, et al. Fenretinide and risk reduction of second breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol* 2007; 4: 64–65.
59. Moon RC, Thompson HJ, Becci PJ, et al. N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide A New Retinoid for Prevention of Breast Cancer in the Rat. *Cancer Res* 1979; 39: 1339–1346.
60. Hauschke L, Ribeiro J, Lourenço FR, et al. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects Design of multifunctional ethosomes for topical fenretinide delivery and breast cancer chemoprevention ~ o Apolin a c. 623. Epub ahead of print 2021. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2021.126745.
61. Bonanni B, Lazzeroni M, Veronesi U. Synthetic retinoid fenretinide in breast cancer chemoprevention. 2007; 423–432.
62. Fazi B, Bursch W, Fimia GM, et al. Fenretinide induces autophagic cell death in caspase-defective breast cancer cells. *Autophagy* 2008; 4: 435–441.
63. Wu JM, Dipietrantonio AM, Hsieh TC. Mechanism of fenretinide (4-HPR)-induced cell death. *Apoptosis* 2001; 6: 377–388.
64. Malone W, Perloff M, Crowell J, et al. Fenretinide : a prototype cancer prevention drug. 2003; 1829–1842.
65. Zanardi S, Serrano D, Argusti A, et al. Clinical trials with retinoids for breast cancer chemoprevention. *Endocr Relat Cancer* 2006; 13: 51–68.
66. Sabichi AL, Modiano MR, Lee JJ, et al. Breast tissue accumulation of retinamides in a randomized short-term study of fenretinide. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2400–2405.
67. Kokate A, Li X, Jasti B. Transport of a novel anti-cancer agent, fenretinide across Caco-2 monolayers. *Invest New Drugs* 2007; 25: 197–203.
68. Veronesi U, Mariani L, Decensi A, et al. Fifteen-year results of a randomized phase III trial of fenretinide to prevent second breast cancer. *Ann Oncol* 2006; 17: 1065–1071.
69. Bonanni B, Lazzeroni M. Retinoids and Breast Cancer Prevention. In: Senn H-

J, Kapp U, Otto F (eds) *Cancer Prevention II*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 77–81.

70. Hail N, Kim HJ, Lotan R. Mechanisms of fenretinide-induced apoptosis. *Apoptosis* 2006; 11: 1677–1694.
71. Sonaje K, Lin KJ, Wang JJ, et al. Self-assembled pH-sensitive nanoparticles: A platform for oral delivery of protein drugs. *Adv Funct Mater* 2010; 20: 3695–3700.
72. Bansal SS, Goel M, Aqil F, et al. Advanced drug delivery systems of curcumin for cancer chemoprevention. *Cancer Prev Res* 2011; 4: 1158–1171.
73. Mohrbacher AM, Yang AS, Groshen S, et al. Phase I Study of Fenretinide Delivered Intravenously in Patients with Relapsed or Refractory Hematologic Malignancies: a California Cancer Consortium Trial. *Clin Cancer Res* 2017; 186717: 1–24.
74. Mittal N, Malpani S, Dyson M, et al. Fenretinide: A novel treatment for endometrial cancer. *PLoS One* 2014; 9: 1–9.
75. Ackerman AB, Kessler G, Gyorfı T, et al. Contrary view: The breast is not an organ per se, but a distinctive region of skin and subcutaneous tissue. *Am J Dermatopathol* 2007; 29: 211–218.
76. Lee O, Ivancic D, Chatterton RT, et al. In vitro human skin permeation of endoxifen: potential for local transdermal therapy for primary prevention and carcinoma in situ of the breast. *Breast cancer (Dove Med Press)* 2011; 3: 61–70.
77. Garcês A, Amaral MH, Sousa Lobo JM, et al. Formulations based on solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) for cutaneous use: A review. *Eur J Pharm Sci* 2018; 112: 159–167.
78. Lee O, Khan SA. *Novel routes for administering chemoprevention: Local transdermal therapy to the breasts*. Elsevier. Epub ahead of print 2016. DOI: 10.1053/j.seminoncol.2015.09.003.
79. Lee O, Page K, Ivancic D, et al. A randomized phase II presurgical trial of transdermal 4-hydroxytamoxifen gel versus oral tamoxifen in women with ductal carcinoma in Situ of the breast. *Clin Cancer Res* 2014; 20: 3672–3682.

80. Lee O, Ivancic D, Allu S, et al. Local transdermal therapy to the breast for breast cancer prevention and DCIS therapy: Preclinical and clinical evaluation. *Cancer Chemother Pharmacol* 2015; 76: 1235–1246.
81. Khan SA, Zhao F, Goldstein LJ, et al. Early Local Therapy for the Primary Site in De Novo Stage IV Breast Cancer: Results of a Randomized Clinical Trial (EA2108). *J Clin Oncol* 2022; 40: 978–987.
82. Thomas PS, Patel AB, Lee JJ, et al. Phase I Dose Escalation Study of Topical Bexarotene in Women at High Risk for Breast Cancer. *Cancer Prev Res (Phila)* 2023; 16: 47–55.
83. Hosmer JM, Steiner AA, Lopes LB. Lamellar liquid crystalline phases for cutaneous delivery of paclitaxel: Impact of the monoglyceride. *Pharm Res* 2013; 30: 694–706.
84. Lai-Cheong JE, McGrath JA. Structure and function of skin, hair and nails. *Med (United Kingdom)* 2013; 41: 317–320.
85. Moser K, Kriwet K, Naik A, et al. Passive skin penetration enhancement and its quantification in vitro. *Eur J Pharm Biopharm* 2001; 52: 103–112.
86. Trommer H, Neubert RHH. Overcoming the stratum corneum: The modulation of skin penetration. A review. *Skin Pharmacol Physiol* 2006; 19: 106–121.
87. Selzer D, Abdel-Mottaleb MMA, Hahn T, et al. Finite and infinite dosing: Difficulties in measurements, evaluations and predictions. *Adv Drug Deliv Rev* 2013; 65: 278–294.
88. Schaefer H, Redelmeier TE, Lademann J. Skin Penetration. In: *Contact Dermatitis*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, pp. 215–227.
89. Nafisi S, Maibach HI. *Skin penetration of nanoparticles*. Elsevier Inc. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.1016/B978-0-323-40016-9.00003-8.
90. Hadgraft J, Lane ME. Skin permeation: The years of enlightenment. *Int J Pharm* 2005; 305: 2–12.
91. Wiedersberg S, Guy RH. Transdermal drug delivery: 30 + years of war and still fighting! *J Control Release* 2014; 190: 150–156.

92. Pagar KR, Darekar AB. Nanoemulsion: A new concept of Delivery System. *Asian J Res Pharm Sci* 2019; 9: 39.
93. Jaiswal M, Dudhe R. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system. 2015; 123–127.
94. Apolinário A, Salata G, Bianco A, et al. ABRINDO A CAIXA DE PANDORA DOS NANOMEDICAMENTOS: HÁ REALMENTE MUITO MAIS ‘ESPAÇO LÁ EMBAIXO. *Quim Nova* 2020; 43: 212–225.
95. Giacone D V., Dartora VFMC, de Matos JKR, et al. Effect of nanoemulsion modification with chitosan and sodium alginate on the topical delivery and efficacy of the cytotoxic agent piplartine in 2D and 3D skin cancer models. *Int J Biol Macromol* 2020; 165: 1055–1065.
96. Carvalho VFM, Migotto A, Giacone D V., et al. Co-encapsulation of paclitaxel and C6 ceramide in tributyrin-containing nanocarriers improve co-localization in the skin and potentiate cytotoxic effects in 2D and 3D models. *Eur J Pharm Sci* 2017; 109: 131–143.
97. Tayeb HH, Sainsbury F. Nanoemulsions in drug delivery: Formulation to medical application. *Nanomedicine* 2018; 13: 2507–2525.
98. De Campos VEB, Ricci-Júnior E, Mansur CRE. Nanoemulsions as delivery systems for lipophilic drugs. *J Nanosci Nanotechnol* 2012; 12: 2881–2890.
99. Shakeel F, Baboota S, Ahuja A, et al. Skin permeation mechanism and bioavailability enhancement of celecoxib from transdermally applied nanoemulsion. *J Nanobiotechnology* 2008; 6: 1–11.
100. Jouyban-Gharamaleki V, Soleymani J, Jouyban-Gharamaleki K, et al. Solubilization of celecoxib, lamotrigine and phenytoin using ethanol and a nonionic surfactant. *J Mol Liq* 2017; 243: 715–719.
101. Migotto A, Carvalho VFM, Salata GC, et al. Multifunctional nanoemulsions for intraductal delivery as a new platform for local treatment of breast cancer. *Drug Deliv* 2018; 25: 654–667.
102. Takayama K, Nagai T. Limonene and related compounds as potential skin

- penetration promoters. *Drug Dev Ind Pharm* 1994; 20: 677–684.
103. Miller JA, Thompson PA, Hakim IA, et al. D-Limonene: A bioactive food component from citrus and evidence for a potential role in breast cancer prevention and treatment. *Oncol Rev* 2011; 5: 31–42.
 104. Crowell PL, Ayoubi AS, Burke YD. Antitumorigenic Effects of Limonene and Perillyl Alcohol Against Pancreatic and Breast Cancer. pp. 131–136.
 105. Mukhtar YM, Adu-Frimpong M, Xu X, et al. Biochemical significance of limonene and its metabolites: Future prospects for designing and developing highly potent anticancer drugs. *Biosci Rep* 2018; 38: 1–12.
 106. Jia SS, Xi GP, Zhang M, et al. Induction of apoptosis by D-limonene is mediated by inactivation of Akt in LS174T human colon cancer cells. *Oncol Rep* 2013; 29: 349–354.
 107. Jirtle RL, Haag JD, Ariazi EA, et al. Advances in Brief Increased Mannose 6-Phosphate / Insulin-like Growth Factor II Receptor and Transforming Growth Factor β Levels during Monoterpene-induced Regression of Mammary Tumors. *PLoS One* 2017; 12: e0172384.
 108. Shojaei S, Kiumarsi A, Moghadam AR, et al. *Perillyl Alcohol (Monoterpene Alcohol), Limonene*. 1st ed. Elsevier Inc. Epub ahead of print 2014. DOI: 10.1016/B978-0-12-802215-3.00002-1.
 109. Cao Y, Karin M. NF- κ B in Mammary Gland Development and Breast Cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2003; 8: 215–223.
 110. Miller JA, Lang JE, Ley M, et al. Human breast tissue disposition and bioactivity of limonene in women with early-stage breast cancer. *Cancer Prev Res* 2013; 6: 577–584.
 111. Vigushin DM, Poon GK, Boddy A, et al. Phase I and pharmacokinetic study of D-limonene in patients with advanced cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 1998; 42: 111–117.
 112. Jiang Q, Wu Y, Zhang H, et al. Development of essential oils as skin permeation enhancers: Penetration enhancement effect and mechanism of action. *Pharm*

Biol 2017; 55: 1592–1600.

113. Aqil M, Ahad A, Sultana Y, et al. Status of terpenes as skin penetration enhancers. *Drug Discov Today* 2007; 12: 1061–1067.
114. Sandig AG, Campmany ACC, Campos FF, et al. Transdermal delivery of imipramine and doxepin from newly oil-in-water nanoemulsions for an analgesic and anti-allodynic activity: Development, characterization and in vivo evaluation. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2013; 103: 558–565.
115. El-Kattan AF, Asbill CS, Kim N, et al. The effects of terpene enhancers on the percutaneous permeation of drugs with different lipophilicities. *Int J Pharm* 2001; 215: 229–240.
116. Ravichandran C, Badgujar PC, Gundev P, et al. Review of toxicological assessment of d-limonene, a food and cosmetics additive. *Food Chem Toxicol* 2018; 120: 668–680.
117. Kim YW, Kim MJ, Chung BY, et al. Safety evaluation and risk assessment of D-limonene. *J Toxicol Environ Heal - Part B Crit Rev* 2013; 16: 17–38.
118. A. Miller J, A. Thompson P, A. Hakim I, et al. Safety and Feasibility of Topical Application of Limonene as a Massage Oil to the Breast. *J Cancer Ther* 2012; 03: 749–754.
119. Akhavan-Mahdavi S, Sadeghi R, Faridi Esfanjani A, et al. Nanodelivery systems for d-limonene; techniques and applications. *Food Chem* 2022; 384: 132479.
120. Li Y, Zhang Z, Yuan Q, et al. Process optimization and stability of d-limonene nanoemulsions prepared by catastrophic phase inversion method. *J Food Eng* 2013; 119: 419–424.
121. Li PH, Lu WC. Effects of storage conditions on the physical stability of D-limonene nanoemulsion. *Food Hydrocoll* 2016; 53: 218–224.
122. Carvalho VFM, Salata GC, de Matos JKR, et al. Optimization of composition and obtainment parameters of biocompatible nanoemulsions intended for intraductal administration of piperlongumine (piperlongumine) and mammary tissue targeting. *Int J Pharm*; 567. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2019.118460.

123. Borges VR de A, Simon A, Sena ARC, et al. Nanoemulsion containing dapsona for topical administration: A study of in vitro release and epidermal permeation. *Int J Nanomedicine* 2013; 8: 535–544.
124. Levi S, Rac V, Manojlovi V, et al. Limonene encapsulation in alginate/poly (vinyl alcohol). *Procedia Food Sci* 2011; 1: 1816–1820.
125. Lopes LB. Overcoming the cutaneous barrier with microemulsions. *Pharmaceutics* 2014; 6: 52–77.
126. Passos JS, Martino LC de, Dartora VFC, et al. Development, skin targeting and antifungal efficacy of topical lipid nanoparticles containing itraconazole. *Eur J Pharm Sci* 2020; 149: 105296.
127. Mojeiko G, de Brito M, Salata GC, et al. Combination of microneedles and microemulsions to increase celecoxib topical delivery for potential application in chemoprevention of breast cancer. *Int J Pharm* 2019; 560: 365–376.
128. Costa-Fernandez S, Matos JKR, Scheunemann GS, et al. Nanostructured lipid carriers containing chitosan or sodium alginate for co-encapsulation of antioxidants and an antimicrobial agent for potential application in wound healing. *Int J Biol Macromol* 2021; 183: 668–680.
129. Praça FSG, Medina WSG, Eloy JO, et al. Evaluation of critical parameters for in vitro skin permeation and penetration studies using animal skin models. *Eur J Pharm Sci* 2018; 111: 121–132.
130. Yang S, Zhou Q, Yang X. Caspase-3 status is a determinant of the differential responses to genistein between MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 2007; 1773: 903–911.
131. Kogai T, Schultz JJ, Johnson LS, et al. Retinoic acid induces sodium/iodide symporter gene expression and radioiodide uptake in the MCF-7 breast cancer cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 8519–8524.
132. Molani Gol R, Kheirouri S. The Effects of Quercetin on the Apoptosis of Human Breast Cancer Cell Lines MCF-7 and MDA-MB-231: A Systematic Review. *Nutr Cancer* 2022; 74: 405–422.

133. Schneider SM, Offterdinger M, Huber H, et al. Activation of retinoic acid receptor α is sufficient for full induction of retinoid responses in SK-BR-3 and T47D human breast cancer cells. *Cancer Res* 2000; 60: 5479–5487.
134. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 1983; 65: 55–63.
135. Wooster TJ, Golding M, Sanguansri P. Ripening Stability. *Langmuir* 2008; 24: 12758–12765.
136. Honary S, Zahir F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). 2013; 12: 265–273.
137. De Blasio C. Fundamentals of biofuels engineering and technology: Thermogravimetric Analysis (TGA). *Green Energy Technol* 2019; 91–102.
138. Khoshakhlagh K, Koocheki A, Mohebbi M, et al. Development and characterization of electrosprayed Alyssum homolocarpum seed gum nanoparticles for encapsulation of D-limonene. *J Colloid Interface Sci* 2017; 490: 562–575.
139. Wang X, Luo Z, Xiao Z. Preparation, characterization, and thermal stability of β -cyclodextrin/soybean lecithin inclusion complex. *Carbohydr Polym* 2014; 101: 1027–1032.
140. Cirri M, Maestrelli F, Mennini N, et al. Influence of the preparation method on the physical-chemical properties of ketoprofen-cyclodextrin-phosphatidylcholine ternary systems. *J Pharm Biomed Anal* 2009; 50: 690–694.
141. Kishore RSK, Pappenberger A, Dauphin IB, et al. Degradation of Polysorbates 20 and 80: Studies on Thermal Autoxidation and Hydrolysis. *J Pharm Sci* 2011; 100: 721–731.
142. Myristate M, Myristate I. Final Report on the Safety Assessment of Myristyl Myristate and Isopropyl Myristate. *Int J Toxicol* 1982; 1: 55–80.
143. Claramonte MDC, Vilchez FG, Vialard AP. Thermal behaviour and heat capacity of some high molecular weight alcohols and esters used in pharmaceutical

- preparations. *Thermochim Acta* 1993; 222: 209–218.
144. Ulu A, Birhanlı E, Köytepe S, et al. Chitosan/polypropylene glycol hydrogel composite film designed with TiO₂ nanoparticles: A promising scaffold of biomedical applications. *Int J Biol Macromol* 2020; 163: 529–540.
 145. Kollamaram G, Williams GR. The effect of the composition of polysorbate 80 grades on their physicochemical properties. *J Excipients Food Chem* 2021; 12: 32–40.
 146. Schmidt G, Müller S, Lindner P, et al. Shear orientation of lyotropic hexagonal phases. *J Phys Chem B* 1998; 102: 507–513.
 147. Pinnagoda J, Tupkek RA, Agner T, et al. Guidelines for transepidermal water loss (TEWL) measurement. *Contact Dermatitis* 1990; 22: 164–178.
 148. Lu WC, Chiang BH, Huang DW, et al. Skin permeation of d-limonene-based nanoemulsions as a transdermal carrier prepared by ultrasonic emulsification. *Ultrason Sonochem* 2014; 21: 826–832.
 149. Theodossiou TA, Ali M, Grigalavicius M, et al. Simultaneous defeat of MCF7 and MDA-MB-231 resistances by a hypericin PDT–tamoxifen hybrid therapy. *npj Breast Cancer*; 5. Epub ahead of print 2019. DOI: 10.1038/s41523-019-0108-8.
 150. Zhu Y, Yao Y, Shi Z, et al. Synergistic effect of bioactive anticarcinogens from soybean on anti-proliferative activity in MDA-MB-231 and MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Molecules*; 23. Epub ahead of print 2018. DOI: 10.3390/molecules23071557.
 151. Hida T. Brownian Motion. In: *Brownian Motion*. New York, NY: Springer US, pp. 44–113.
 152. Bhattacharjee S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? *J Control Release* 2016; 235: 337–351.
 153. Phan TT, Harwell JH, Sabatini DA. Effects of triglyceride molecular structure on optimum formulation of surfactant-oil-water systems. *J Surfactants Deterg* 2010; 13: 189–194.
 154. Ontiveros JF, Pierlot C, Catté M, et al. Classification of ester oils according to

- their Equivalent Alkane Carbon Number (EACN) and asymmetry of fish diagrams of C10E4/ester oil/water systems. *J Colloid Interface Sci* 2013; 403: 67–76.
155. Von Corswant C, Söderman O. Effect of adding isopropyl myristate to microemulsions based on soybean phosphatidylcholine and triglycerides. *Langmuir* 1998; 14: 3506–3511.
 156. Nikolic I, Mitsou E, Pantelic I, et al. Microstructure and biopharmaceutical performances of curcumin-loaded low-energy nanoemulsions containing eucalyptol and pinene: Terpenes' role overcome penetration enhancement effect? *Eur J Pharm Sci* 2020; 142: 105135.
 157. Goodrum JW, Eiteman MA. Physical properties of low molecular weight triglycerides for the development of bio-diesel fuel models. *Bioresour Technol* 1996; 56: 55–60.
 158. Nastiti CMRR, Ponto T, Mohammed Y, et al. Novel nanocarriers for targeted topical skin delivery of the antioxidant resveratrol. *Pharmaceutics*; 12. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.3390/pharmaceutics12020108.
 159. Alehosseini E, Jafari SM, Shahiri Tabarestani H. Production of D-limonene-loaded Pickering emulsions stabilized by chitosan nanoparticles. *Food Chem* 2021; 354: 129591.
 160. Clará RA, Marigliano ACG, Sólamo HN. Density, viscosity, and refractive index in the range (283.15 to 353.15) K and vapor pressure of α -pinene, d-limonene, (\pm)-linalool, and citral over the pressure range 1.0 kPa atmospheric pressure. *J Chem Eng Data* 2009; 54: 1087–1090.
 161. Hidajat MJ, Jo W, Kim H, et al. Article effective droplet size reduction and excellent stability of limonene nanoemulsion formed by high-pressure homogenizer. *Colloids and Interfaces*; 4. Epub ahead of print 2020. DOI: 10.3390/colloids4010005.
 162. Ribeiro EF, Borreani J, Moraga G, et al. Digestibility and Bioaccessibility of Pickering Emulsions of Roasted Coffee Oil Stabilized by Chitosan and Chitosan-Sodium Tripolyphosphate Nanoparticles. *Food Biophys* 2020; 15: 196–205.
 163. Marze S. Refining in silico simulation to study digestion parameters affecting the

- bioaccessibility of lipophilic nutrients and micronutrients. *Food Funct* 2015; 6: 115–124.
164. Limited MI. Zeta potential: An Introduction in 30 minutes. *Zetasizer Nano Serles Tech Note MRK654-01* 2011; 2: 1–6.
165. Pederzoli F, Tosi G, Vandelli MA, et al. Protein corona and nanoparticles: how can we investigate on? *Wiley Interdiscip Rev Nanomedicine Nanobiotechnology* 2017; 9: 1–23.
166. Owen H, Graham S, Werling JO, et al. Anion effects on electrostatic charging of sterically stabilized , water insoluble drug particles. 2009; 368: 154–159.
167. Guttoff M, Saberi AH, McClements DJ. Formation of vitamin D nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous emulsification: Factors affecting particle size and stability. *Food Chem* 2015; 171: 117–122.
168. Mendoza R, Savin I, Thornton K, et al. Topological complexity and the dynamics of coarsening. *Nat Mater* 2004; 3: 385–388.
169. Voorhees PW. Ostwald Ripening of Two-Phase Mixtures. *Annu Rev Mater Sci* 1992; 22: 197–215.
170. Kabalnov A. Ostwald ripening and related phenomena. *J Dispers Sci Technol* 2001; 22: 1–12.
171. Salata GC, Lopes LB. Phosphatidylcholine-Based Nanoemulsions for Paclitaxel and a P-Glycoprotein Inhibitor Delivery and Breast Cancer Intraductal Treatment. *Pharmaceuticals*; 15. Epub ahead of print 2022. DOI: 10.3390/ph15091110.
172. Mojeiko G, Apolinário AC, Salata GC, et al. Optimization of nanoemulsified systems containing lamellar phases for co-delivery of celecoxib and endoxifen to the skin aiming for breast cancer chemoprevention and treatment. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* 2022; 646: 128901.
173. Vieira Nunes Cunha I, Machado Campos A, Passarella Gerola A, et al. Effect of invasome composition on membrane fluidity, vesicle stability and skin interactions. *Int J Pharm* 2023; 646: 123472.

174. Hoppel M, Caneri M, Glatter O, et al. Self-assembled nanostructured aqueous dispersions as dermal delivery systems. *Int J Pharm* 2015; 495: 459–462.
175. Spielmann H. HET-CAM test. *Methods Mol Biol* 1995; 43: 199–204.
176. Mehanna MM, Abla KK, Elmaradny HA. Tailored limonene-based nanosized microemulsion: Formulation, physicochemical characterization and in vivo skin irritation assessment. *Adv Pharm Bull* 2021; 11: 274–285.
177. Daneluti ALM, Velasco MVR, Baby AR, et al. Thermal behavior and free-radical-scavenging activity of phytic acid alone and incorporated in cosmetic emulsions. *Cosmetics* 2015; 2: 248–258.
178. Fahr A, Hoogevest P Van, May S, et al. Transfer of lipophilic drugs between liposomal membranes and biological interfaces: Consequences for drug delivery. *Eur J Pharm Sci* 2005; 26: 251–265.
179. Jones MN. The surface properties of phospholipid liposome systems and their characterisation. *Adv Colloid Interface Sci* 1995; 54: 93–128.
180. Fatouros DG, Antimisiaris SG. Effect of amphiphilic drugs on the stability and zeta-potential of their liposome formulations: A study with prednisolone, diazepam, and griseofulvin. *J Colloid Interface Sci* 2002; 251: 271–277.
181. Binder L, Mazál J, Petz R, et al. The role of viscosity on skin penetration from cellulose ether-based hydrogels. *Ski Res Technol* 2019; 25: 725–734.
182. Fang JY, Fang CL, Liu CH, et al. Lipid nanoparticles as vehicles for topical psoralen delivery: Solid lipid nanoparticles (SLN) versus nanostructured lipid carriers (NLC). *Eur J Pharm Biopharm* 2008; 70: 633–640.
183. Nagelreiter C, Raffeiner S, Geyerhofer C, et al. Influence of drug content, type of semi-solid vehicle and rheological properties on the skin penetration of the model drug fludrocortisone acetate. *Int J Pharm* 2013; 448: 305–312.
184. Apolinário AC, Salata GC, de Souza MM, et al. Rethinking Breast Cancer Chemoprevention: Technological Advantages and Enhanced Performance of a Nanoethosomal-Based Hydrogel for Topical Administration of Fenretinide. *AAPS PharmSciTech* 2022; 23: 104.

185. Dragicevic-Curic N, Winter S, Stupar M, et al. Temoporfin-loaded liposomal gels: Viscoelastic properties and in vitro skin penetration. *Int J Pharm* 2009; 373: 77–84.
186. Giacone D V., Carvalho VFM, Costa SKP, et al. Evidence That P-glycoprotein Inhibitor (Elacridar)-Loaded Nanocarriers Improve Epidermal Targeting of an Anticancer Drug via Absorptive Cutaneous Transporters Inhibition. *J Pharm Sci* 2018; 107: 698–705.
187. Zhao K, Singh J. Mechanisms of percutaneous absorption of tamoxifen by terpenes: Eugenol, D-limonene and menthone. *J Control Release* 1998; 55: 253–260.
188. Ramawat KG, Mérillon JM. Natural products: Phytochemistry, botany and metabolism of alkaloids, phenolics and terpenes. *Nat Prod Phytochem Bot Metab Alkaloids, Phenolics Terpenes* 2013; 1–4242.
189. Erdal MS, Peköz AY, Aksu B, et al. Impacts of chemical enhancers on skin permeation and deposition of terbinafine. *Pharm Dev Technol* 2014; 19: 565–570.
190. Damasco JA, Ravi S, Perez JD, et al. Understanding nanoparticle toxicity to direct a safe-by-design approach in cancer nanomedicine. *Nanomaterials* 2020; 10: 1–41.
191. Pepe D, Carvalho VFM, McCall M, et al. Transportan in nanocarriers improves skin localization and antitumor activity of paclitaxel. *Int J Nanomedicine* 2016; 11: 2009–2019.
192. Hajizadeh M, Maleki H, Barani M, et al. In vitro cytotoxicity assay of D-limonene niosomes: An efficient nano-carrier for enhancing solubility of plant-extracted agents. *Res Pharm Sci* 2019; 14: 448–458.
193. Rabi T, Bishayee A. d-Limonene sensitizes docetaxel-induced cytotoxicity in human prostate cancer cells: Generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis. *J Carcinog*; 8. Epub ahead of print 2009. DOI: 10.4103/1477-3163.51368.
194. Kramer N, Walzl A, Unger C, et al. In vitro cell migration and invasion assays.

Mutat Res - Rev Mutat Res 2013; 752: 10–24.

195. Shin JH, Shin DH, Kim JS. Let-7 miRNA and CDK4 siRNA co-encapsulated in Herceptin-conjugated liposome for breast cancer stem cells. *Asian J Pharm Sci* 2020; 15: 472–481.
196. Chidambara Murthy KN, Jayaprakasha GK, Patil BS. D-limonene rich volatile oil from blood oranges inhibits angiogenesis, metastasis and cell death in human colon cancer cells. *Life Sci* 2012; 91: 429–439.
197. Ye Z, Liang Z, Mi Q, et al. Limonene terpenoid obstructs human bladder cancer cell (T24 cell line) growth by inducing cellular apoptosis, caspase activation, G2/M phase cell cycle arrest and stops cancer metastasis. *J BUON* 2020; 25: 280–285.
198. Kang H, Lee M, Choi KC, et al. N-(4-hydroxyphenyl)retinamide inhibits breast cancer cell invasion through suppressing NF-KB activation and inhibiting matrix metalloproteinase-9 expression. *J Cell Biochem* 2012; 113: 2845–2855.
199. Chou YC, Sheu JR, Chung CL, et al. Nuclear-targeted inhibition of NF-κB on MMP-9 production by N-2-(4-bromophenyl) ethyl caffeamide in human monocytic cells. *Chem Biol Interact* 2010; 184: 403–412.
200. Kim Y, Kang H, Jang S, et al. Cellular Physiology Biochemistry and Biochemistry Celastrol Inhibits Breast Cancer Cell Invasion via Suppression of NF-κB-mediated Matrix Metalloproteinase-9 Expression. *Cell Physiol Biochem* 2011; 28: 175–184.
201. Sun J. D-Limonene: safety and clinical applications. *Altern Med Rev* 2007; 12: 259–64.