

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Aplicação do óleo de buriti (*Mauritia Flexuosa*) no desenvolvimento
de emulsões e estudo da citotoxicidade e potencial foto-protetor
em cultivo celular**

Cinthia Fernanda Zanatta

Ribeirão Preto

2008

RESUMO

ZANATTA, C.F. **Aplicação do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) no desenvolvimento de emulsões e estudo da citotoxicidade e potencial fotoprotetor em cultivo celular**. 2008. 182f. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, 2008.

Nos últimos anos intensificou-se o estudo sobre sistemas criados para veicular princípios ativos, como nanoemulsões, dispersões contendo cristais líquidos e emulsões múltiplas, bem como o emprego de matérias-primas da biodiversidade brasileira na produção destes sistemas, a exemplo dos óleos de andiroba, copaíba, urucum e buriti, cuja fruta amazônica é rica em micro-nutrientes com propriedades anti-oxidante, hidratante e fotoprotetora. Durante o desenvolvimento de novas formulações cosméticas, o potencial de irritação dérmica deve ser investigado antes que o produto seja disponibilizado ao consumidor, a fim de identificar compostos que possam causar reações adversas na pele. O objetivo deste trabalho foi avaliar cientificamente o emprego do óleo de buriti na obtenção de emulsões contendo cristais líquidos, nanoemulsões e emulsões múltiplas estáveis e estudar o possível potencial citotóxico e fotoprotetor destas formulações em culturas de células epidérmicas (fibroblastos e queratinócitos), bem como o potencial irritante em modelo organotípico (HET-CAM). Foi estabelecido como valor de EHL crítico igual a 7,25 e selecionados dois pares de tensoativos (*Steareth-2* associado aos *Ceteareth-5* e *Ceteareth-20*) para produção das macroemulsões contendo cristal líquido pela técnica do diagrama ternário. Os testes preliminares em centrifuga, estresse térmico, microscopia, potencial zeta e o estudo do comportamento reológico permitiram a seleção de uma emulsão de cada diagrama para continuar o estudo, as quais foram submetidas aos testes de estabilidade acelerada. As formulações F29D1 e F51D2 com e sem vitamina E não apresentaram modificações no comportamento reológico, pH e estabilidade física, após serem submetidas às condições de estresse. O método de emulsificação em etapa única se mostrou eficiente na produção de emulsões múltiplas estáveis à centrifugação e estresse térmico, com óleo de buriti e monooleato de sorbitano e *PEG-40 castor oil* como sistema tensoativo. O estudo de EHL crítico da emulsão múltipla mostrou maior estabilidade do sistema no valor de EHL=9,0. Uma modificação no processo de emulsificação da emulsão múltipla permitiu a obtenção de nanoemulsões estáveis por PIT, cujas temperaturas de inversão de fases foram de 89, 91 e 93°C, para os valores de EHL 9,0; 9,5 e 10,0 respectivamente. Os resultados dos ensaios de citotoxicidade mostraram que as emulsões formuladas com óleo de buriti e tensoativos comerciais se mostraram não irritantes à pele devido aos escassos efeitos citotóxicos que provocaram às monocamadas de fibroblastos 3T3 e queratinócitos HaCat, sendo que a adição de vitamina E chegou a aumentar a viabilidade celular em alguns casos. As emulsões contendo álcoois graxos etoxilados como sistema tensoativo, se mostraram mais fototóxicas às células quando comparadas as que continham outra classe de tensoativos não iônicos, sendo que todas se mostraram mais fototóxicas quando foram aplicadas em condições de pré-tratamento. Os ensaios também demonstraram que os fibroblastos 3T3 foram mais sensíveis que os queratinócitos HaCat ao efeito da radiação quando tratados com os produtos. O ensaio em membrana corioalantóide auxiliou na identificação dos compostos irritantes e

confirmou os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade e associados podem ser considerados uma ferramenta importante na substituição de animais para avaliação do potencial irritante de produtos cosméticos e farmacêuticos.

Palavras chave: Óleo de Buriti, emulsão múltipla, cristal líquido, tensoativo não iônico, nanoemulsão, citotoxicidade, cultivo celular, HET-CAM.

INTRODUÇÃO

Com o desenvolvimento das tecnologias cosmética e farmacêutica, muitos sistemas para veicular ativos surgiram ou foram aperfeiçoados nos últimos anos. Entre os quais podemos citar as nanoemulsões, as emulsões contendo cristais líquidos e as emulsões múltiplas, que devido a propriedades específicas, como por exemplo, a capacidade de otimizar a liberação sustentada e o transporte de ativos, a diminuição da perda de água transepidérmica e o encapsulamento de ativos foto e/ou termossensíveis, vêm sendo empregados com sucesso em diversas áreas.

São inúmeras as matérias-primas empregadas pelas indústrias cosmética e farmacêutica na produção de fito cosméticos e fito medicamentos. Atualmente cresce o número de matérias-primas extraídas ou produzidas a partir da biodiversidade brasileira utilizada na confecção destes produtos, a exemplo dos óleos de andiroba, copaíba, urucum e buriti, cuja fruta amazônica é rica em micronutrientes com propriedades anti-oxidantes, e possivelmente fotoprotetora. Porém, como estes, muitos outros recursos provenientes da região Amazônica não foram explorados cientificamente.

Durante o desenvolvimento de novas formulações cosméticas, o potencial de irritação dérmica deve ser investigado antes que o produto seja disponibilizado ao consumidor, a fim de identificar compostos que possam causar reações adversas na pele. Apesar da maioria dos testes para avaliação de novos produtos cosméticos e farmacêuticos, ou de seus componentes ser tradicionalmente realizado em animais, é crescente a preocupação que surge em relação a estes ensaios e a possível proibição dos mesmos, bem como, as implicações éticas relacionadas aos testes em

humanos, resultando na necessidade de desenvolver novas alternativas para avaliação da citotoxicidade *in vitro* (Sanchez *et al.*, 2006).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar cientificamente o emprego do óleo de buriti na produção de emulsões contendo cristais líquidos, nanoemulsões e emulsões múltiplas e estudar o possível potencial citotóxico e fotoprotetor destas formulações em culturas de células epidérmicas (fibroblastos e queratinócitos), bem como o potencial de irritação ocular em modelo organotípico (HET-CAM).

CONCLUSÕES

Através da técnica do diagrama ternário foi possível produzir macroemulsões estáveis, com e sem cristais líquidos, utilizando o óleo de buriti como fase oleosa. Os testes de estabilidade preliminar e acelerada mostraram que as emulsões não sofreram alterações após serem submetidas às condições de estresse determinadas, ressaltando o potencial promissor dos sistemas.

O EHL crítico do buriti foi de 7,25 para as macroemulsões e de 9,0 para a emulsão múltipla e nanoemulsão.

Todas as macroemulsões apresentaram comportamento pseudoplástico e valores de potencial zeta negativo variando de -14,0 a -53,3 confirmando alta estabilidade do sistema em função das forças de repulsão.

O método de emulsificação de baixa energia (PIT) se mostrou eficiente para obtenção de nanoemulsões estáveis com óleo de buriti, bem como o método de emulsificação em etapa única na produção de emulsões múltiplas estáveis.

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade, concluímos que as emulsões formuladas com óleo de buriti e tensoativos comerciais se mostraram não irritantes à pele devido aos escassos efeitos citotóxicos que provocaram às monocamadas de fibroblastos 3T3 e queratinócitos HaCat. A adição de vitamina E às formulações não promoveu aumento da citotoxicidade das mesmas, ao contrário disso, em alguns casos chegou a aumentar a viabilidade celular. Enquanto que os efeitos de pantenol deveriam ser estudados mais a fundo, com o intuito de investigar uma possível ação antioxidante nas células, o que poderia diminuir os danos celulares causados pelos tensoativos.

A emulsão produzida com o óleo de buriti permitiu uma redução significativa no efeito citotóxico do Cetearith-20 para as células HaCat e 3T3.

As emulsões contendo álcoois graxos etoxilados como sistema tensoativo se mostraram mais fototóxicas quando comparadas as que continham outra classe de tensoativos não iônicos, sendo que todas se mostraram más fototóxicas quando foram aplicadas em condições de pré-tratamento. Os ensaios também demonstraram que os fibroblastos 3T3 foram mais sensíveis que os queratinócitos HaCat ao efeito da radiação quando tratados com os produtos.

O ensaio em membrana corioalantóide auxiliou na identificação dos compostos irritantes e confirmou os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade e associados podem ser considerados uma ferramenta importante na substituição de animais para avaliação do potencial irritante de produtos cosméticos e farmacêuticos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALANY, R.G.; RADES, T.; NICOLL, J.; TUCKER, I.G.; DAVIES, N.M. W/O microemulsions for ocular delivery: Evaluation of ocular irritation and precorneal retention. **J. Control. Release**, v. 111, p. 145–152, 2006.

ALCANTARA, M.R.; DE MOURA, A.F. The edge fracture occurrence on lyotropic liquid crystals. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 175, p. 303–309, 2000.

ALCANTARA, M.R.; FONSECA DIAS, L. C. The cholesterization process on lyotropic liquid crystals studied by rheology. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 136, p. 155-158, 1998.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: Espécies Vegetais Úteis**. Planaltina: EMBRAPA – CPAC, 1998. 464 p.

ANVISA. Guia para avaliação de segurança de produtos cosméticos. 2003. 47 p.

ANVISA. Guia de estabilidade de produtos cosméticos. Vol 1. 2004. 52 p.

API, A. M. In vitro assessment of phototoxicity. **Toxicol. In Vitro.**, v. 10, p. 339-350, 1997.

BENAVIDES, T.; MITJANS, M.; MARTÍNEZ, V.; CLAPÉS, P.; INFANTE, M. R.; CLOTHIER, R.; VINARDELL, M. P. Assessment of primary eye and skin irritants by in vitro cytotoxicity and phototoxicity models: an in vitro approach of new arginine-based surfactant-induced irritation. **Toxicology**, v. 197, p. 229-237, 2004a.

BENAVIDES, T.; MARTÍNEZ, V.; MITJANS, M.; INFANTE, M. R.; MORAN, C.; CLAPÉS, P.; CLOTHIER, R.; VINARDELL, M. P. Assessment of the potential phototirritation of

novel amino acid-based surfactants by in vitro methods as alternative to the animal tests.

Toxicology, v. 201, p. 87-93, 2004b.

BENTON, W. Spontaneous emulsification in oil-water-surfactant systems. **J. Dicers. Sci. Technol.** v. 3, p. 1-44, 1982.

BERNI, M. G.; LAWRENCE; C. J.; MACHIN, D. A review of the rheology of the lamellar phase in surfactant systems. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v. 98, p. 217-243, 2002.

BIESALSKI, H. K., OBERMUELLER-JEVIC, U. C. UV light, beta-carotene and human skin —beneficial and potentially harmful effects. **Arch. Biochem. Biophys.** v.389, p. 1–6, 2001.

BLACK, H. S.; GERGUIS, J. Modulation of dietary vitamins E and C fails to ameliorate beta-carotene exacerbation of UV carcinogenesis in mice. **Nutr. Cancer.** v. 45 (1), p. 36-45, 2003.

BODDÉ, H. E.; DE VRINGER, T.; JUNGINGER, H. E. Colloidal systems for controlled drug delivery structure activity relationships. **Prog. Colloid Polym. Sci.** v. 72, p.37-42, 1986.

BÖHM, F.; EDGE, R.; LANGE, L.; TRUSCOTT, T. G. Enhanced protection of human cells against ultraviolet light by anti-oxidant combinations involving dietary carotenoids. **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 44, p. 211-215, 1997.

BONE, R. A.; LANDRUM, J. T.; GUERRA, L. H. & RUIZ. C. A. Lutein and zeaxanthin dietary supplements raise macular pigment density and serum concentrations of these carotenoids in human. **J. Nutr.** v.133, p. 992-998, 2003.

BORENFREUND, E.; PUERNER, J.A. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. **Toxicol. Lett.** v. 24, p. 119-124, 1985.

BOUCHAMA, F.; VAN AKEN, G. A.; AUTIN, A. J. E.; KOPER, G. J. M. On the mechanism of catastrophic phase inversion in emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.** v. 231, p.11-17, 2003.

BOUKAMP, P.; PETRUSSEVSKA, R. T.; BREITKREUTZ, D.; HORNUNG, J.; MARKHAM A.; FUSENIG, N.E. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. **J. Cell Biol.**, v.106, p. 761-771, 1988.

BOZKIR, A.; HAYTA, G.; SAKA, O. M. Comparison of biodegradable nanoparticles and multiple emulsions (water-in-oil-in-water) containing influenza virus antigen on the in vivo immune response in rats. **Pharmazie**, v. 59, p. 723-725, 2004.

BRACONI, F. L.; OLIVEIRA, I.S.; BARONI, M. N. F.; ROCHA-FILHO, P.A. CONGRESSO LATINO AMERICANO E IBÉRICO DE QUÍMICOS COSMÉTICOS, 12, São Paulo, 1995. **Aplicação cosmética do óleo de canola.** (Anais) São Paulo: Associação Brasileira de Cosmetologia, 1995, (6-19).

BRINON, L.; GEIGER, S.; ALARD, V.; TRANCHANT, J. F.; POUGET, T.; COUARRAZE, G. Influence of lamellar liquid crystal structure on percutaneous diffusion of hydrophilic tracer from emulsions. **J. Cosmet. Sci.** v. 49, p. 1-11, 1998.

BRINON, L.; GEIGER, S.; ALARD, V.; DOUCET, J. TRANCHANT, J. F.; COUARRAZE, G. Percutaneous absorption of sunscreens from liquid crystalline phases. **J. Control. Release**, v. 60, p. 67-76, 1999.

BRITTON, G. UV/Visible Spectroscopy. In: Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.) **Carotenoids**. Basel: Birkhauser, 1995. Vol 1B, p. 13-62.

BURKE, K. E. Photodamage of the skin: protection and reversal with topical antioxidants. **J. Cosmet. Dermatol.**, v. 3., p.149-155, 2004.

CHANAMAI, R.; HORN, G.; MCCLEMENTS, D. J. Influence of Oil Polarity on Droplet Growth in Oil-in-Water Emulsions Stabilized by a Weakly Adsorbing Biopolymer or a Nonionic Surfactant. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 247, p. 167–176, 2002.

CHIU, A.; KIMBALL, A. B. Topical vitamins, minerals and botanical ingredients as modulators of environmental and chronological skin damage. **Br. J. Dermatol.** v.149, p. 681–691, 2003.

CIOCA, G.; CALVO, L. Liquid crystals and cosmetics applications. **Cosmet. Toil.**, v. 105, p. 57-62, 1990.

COIMBRA-FILHO, A. F. Brazilian biodiversity. **Acad. Bras. Ciên.**, v. 70, p.889-897, 1998.

COOPER, E.; BERBER, B. Penetrations enhancers. In: KYDONIEUS, A. F.; BERNER, B. **Transdermal delivery of drugs**, vol 3. Boca Raton: CRC Press, 1987. p. 57-61.

CZÓKA, I. & ERŐS, I. Stability of multiple emulsions I. Determination of factor influencing drop breakdown. **Int. J. Pharm.** v. 156, p. 119-123, 1997.

DAHMS, G. Properties os O/W emulsions with anisotropic lamellar phases. **Cosmet. Toil.**, v. 101, p. 113-115, 1986.

DAHMS, G. H. Einflub der thixotropie auf die lichtschutzwirkung von sonnenschutzemulsien. **Parfumerie und Kosmetik, Karlsruhe**, v. 75, n. 10, p. 675-679, 1994.

DEBBASCH, C.; EBENHAHN, C.; DAMI, N.; PERICOI, M.; VAN DEN BERGHE, C.; COTTIN, M.; NOHYNEK, G. J. Eye irritation of low-irritant cosmetic formulations: correlation of in vitro results with clinical data and product composition. **Food Chem. Toxicol.**, v. 43, p. 155–165, 2005.

DICKINSON, D. A.; MOELLERING, D. R.; ILES, K.E.; PATEL, [R. P.](#); LEVONEN, A. L.; WIGLEY, A.; DARLEY-USMAR, V. M.; FORMAN, [H. J.](#) Cytoprotection against oxidative stress and the regulation of glutathione synthesis. **Biol. Chem.**, v.384(4), p. 527-537, 2003.

DIJOUX, N.; GUINGAND, Y.; BOURGEOIS, C.; DURAND, S.; FROMAGEOT, C.; COMBE, C.; FERRET, P. J. Assessment of the phototoxic hazard of some essential oils using modified 3T3 neutral red uptake assay. **Toxicol. In Vitro**, v. 20, p. 480–489, 2006.

DOUCET, O.; LANVIN, M.; ZASTROW, L. Comparison of three in vitro methods for the assessment of the eye irritation potential of formulated products. **Vitro Mol. Toxicol.**, v. 12, p. 63–76, 1999.

DRAIZE, J.H.; WOOWARD, G.; CALVERY, H.O. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 82, p. 377–390., 1944.

DUCLAIROIR, C.; ORECCHIONI, A.-M.; DEPRAETERE, P.; OSTERSTOCK, F.; NAKACHE, E. Evaluation of gliadins nanoparticles as drug delivery systems: a study of three different drugs. **Inter. J. Pharm.** v.253, p.133–144, 2003.

DUTHIE, M.S; KIMBER, I.; NORVAL, M. The effects of ultraviolet radiation on the human immune system. **Br. J. Dermatol.** v.140, p. 995–1009, 1999.

EBERLEIN-KÖNIG, B.; RING, J. Relevance of vitamins C and E in cutaneous photoprotection. **J. Cosmet. Dermatol.**, v. 4., p. 4-9, 2005.

EBNER, F.; HELLER, A.; RIPPKE, F.; TAUSCH, I. Topical use of dexpanthenol in skin disorders. **Am. J. Clin. Dermatol.**, v. 3, p. 427-433, 2002.

ECCLESTON, G.M. Functions of mixed emulsifiers and emulsifying waxes in dermatological lotions and creams. **Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.** v. 123-124, p. 169-182, 1997.

EICHLER, O.; SIES, H.; STAHL, W. Divergent optimum levels of lycopene, β -carotene and lutein protecting against UVB irradiation in human fibroblasts. **Photochem. Photobiol.**, v. 75 (5), p. 503-506, 2002.

ENGSTRÖM, S. Cubic phases for studies of drug partition into a lipid bilayers. **Eur. J. Pharm. Sci.** v. 8, p. 243-254, 1999.

FALLER, C.; BRACHERA, M.; DAMIB, N.; ROGUET, R. Predictive ability of reconstructed human epidermis equivalents for the assessment of skin irritation of cosmetics. **Toxicol. In Vitro.** v.16, p. 557–572, 2002.

FARKAS, E.; ZELKÓ, R.; NÉMETH, Z. S.; PÁLINKÁS, J.; MARTON, S.; RACZ, I. The effect of liquid crystalline structure on chlorhexidine diacetate release. **Inter. J. Pharm.** v. 193, p. 239-245, 2000.

FERNANDEZ, P., ANDRÉ, V., RIEGER, J., KÜHNLE, A. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.** , v. 251, p. 53–58, 2004.

FERRARI, M. **Desenvolvimento e avaliação da eficácia fotoprotetora de emulsões múltiplas contendo metoxicinamato de etilexila e óleo de andiroba (Crapa guyanensis).** 142 p. Tese de Doutorado - Faculdade Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002.

FERRARI, M. **Obtenção e aplicação de emulsões múltiplas contendo óleos de andiroba e copaíba.** 147 p. Dissertação (Mestrado) - Faculdade Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 1998.

FILIFE, P.; SILVA, J. N.; HAIGLE, J.; FREITAS, J. P.; FERNADES, A.; SANTUS, R.; MORLIÈRE, P. Contrasting action of flavonoids on phototoxic effects induced in human skin fibroblasts by UVA alone or UVA plus cyamemazine, a phototoxic neuroleptic. **Photochem. Photobiol. Sci.** v.4, p. 420-428, 2005.

FLAMAND, N.; MARROT, L.; BELAIDI, J. P.; BOUROUF, L.; DOURILLE, E.; FELTES, M.; MEUNIER, J. R. Development of genotoxicity test procedures with Episkin®, a reconstructed human skin model: towards new tools for in vitro risk assessment of dermally applied compounds. **Mutat. Res.**, v. 606 (1-2), p. 39-51, 2006.

FLORENCE, A. T.; WHITEHILL, D. The formulation and stability of multiple emulsions. **Inter. J. Pharm.** v. 11; p. 277-309, 1982.

FLOURY, J., DESRUMAUX, A., AXELOS, M. A. V., LEGRAND, J., Effect of the high pressure homogenization on methylcellulose as food emulsifier. **J. Food Eng.** v. 58, p. 227-238, 2003.

FORGIARINI, A., ESQUENA, J., GONZÁLEZ, C., SOLANS, C. Formation of Nano-emulsions by Low-Energy Emulsification Methods at Constant Temperature. **Langmuir**, v. 17, p. 2076-2083, 2001.

FUKUDA, M.; KOIDE, M.; OHBU, K. Effects of hydrophilic-lipophilic-balance of alkyl poly(oxyethylene) ethers on hemolysis. **Yukagaku.** v.36, p. 576-589, 1987.

GABBOUN, N. H.; NAJIB, N. M.; IBRAHIM, H. G.; ASSAF, S. Release of salicylic acid, diclofenac acid and diclofenac acid salts from isotropic and anisotropic nonionic surfactants systems across rat skin. **Inter. J. Pharm.** v. 212, p. 73-80, 2001.

GARCIA-QUIROZ, A.; MOREIRA, S. G. C.; DE MORAIS, A. V.; SILVA, A. S.; DA ROCHA, G. N.; ALCANTARA, P. Physical and chemical analysis of dielectric properties and differential scanning calorimetry techniques on buriti oil. **Instrum. Sci. Technol.** v. 31, p. 93-101, 2003.

GARTI, N. Progress in stabilization and transport phenomena of double emulsions in food applications. **Lebensm.-Wiss. Technol.**, v. 30, p. 222-235, 1997a.

GARTI, N. Double emulsions – scope, limitations and new achievements. **Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.** v. 123-124, p. 233-246, 1997b.

GETTING, S. D.; DISPASQUALE, L.C.; BAGLEY, D. M.;CASTERTON, P. L.; CHUDKOWSKI, M.; CURREN, R. D.; DEMETRULIAS, J. L.; FEDER, P. I.; GALLI, C. L.; GAY, R.; GLAZA, S. M.; HINTZE, K. L.; JANUS, J.; KURTZ, P. J.; LORDO, R. A.; MARENUS, K. D.; MORAL, J.; MUSCATIELLO, M.; PAPE, W. J. W.; RENSKERS, K. J.; RODDY, M. T.; ROZEN, M. G. The CTFA evaluation of alternatives program: An evaluation of *in vitro* alternatives to the draize primary eye irritation test. (Phase II) oil/water emulsions. **Food Chem. Toxicol.**, v. 32 (10), p. 943-976, 1994.█

GETTING, S. D.; LORDO, R. A.; HINTZE, K. L.; BAGLEY, D. M.; CASTERTON, P. L.; CHUDKOWSKI, M.; CURREN, R. D.; DEMETRULIAS, J. L.; DISPASQUALE, L.C.; EARL, L. K.; FEDER, P. I.; GALLI, C. L.; GLAZA, S. M.; GORDON, V. C.; JANUS, J.; KURTZ, P. J.; MARENUS, K. D.; MORAL, J.; PAPE, W. J. W.; RENSKERS, K. J.; RHEINS, L. A.; RODDY, M. T.; ROZEN, M. G.; TEDESCHI, J. P.; ZYRACKI, J. The CTFA evaluation of alternatives program: An evaluation of *in vitro* alternatives to the draize primary eye irritation test: (Phase III) surfactant-based formulations. **Food Chem. Toxicol.**, v. 34 (1), p. 79-117, 1996.

GOLOUB, T.P.; PUGH, R.J. The role of the surfactant head group in the emulsification process: Binary (nonionic–ionic) surfactant mixtures. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 291, p. 256–262, 2005.

GONZÁLEZ, S.; ASTNER, S.; AN, W.; GOUKASSIAN, D. & PATHAK, M. A. Dietary lutein/zeaxanthin decreases ultraviolet B-induced epidermal hyper proliferation and acute inflammation in hairless mice. **J. Invest. Dermatol.** v.121, p. 399-405, 2003.

GRANADO, F.; OLMEDILLA, B. & Blanco, I. Nutritional and clinical relevance of lutein in human health. **Br. J. Nutr.** v.90, p. 487-502, 2003.

GULLAPALLI, R. P.; SHETH, B. B. influence of optimized non-ionic emulsifier blend on properties of oil in water emulsions. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.48, p. 233-238, 1999.

HIRAMA, S.; TATSUISHI, T.; IWASE, K.; NAKAO, H.; UMEBAYASHI, C.; NISHIZAKI, Y.; KOBAYASHI, M.; ISHIDA, S.; OKANO, Y.; OYAMA, Y. Flow-cytometric analysis on adverse effects of polysorbate 80 in rat thymocytes. **Toxicology** v.199, p. 137–143, 2004.

HORAN, I.; CLOTWORTHY, M., FOKUNANG, C. N.; TOMKINS, P. T. The development of an in vitro screening strategy for topically applied products. **J. Ethnopharmacology**, v. 89, p. 81–90, 2003.

ICHIHASHI, M.; UEDA, M.; BUDIYANTO, A.; BITO, T.; OKA, M.; FUKUNAGA, M.; TSURU, K.; HORIKAWA, T. UV-induced skin damage. **Toxicology**, v.189, p. 21-39, 2003.

Invitox Protocol. The frame neutral red release assay. Invitox no. 54. ECVAM DB-ALM: INVITTOX Protocol, 1992.

IWASE, K.; OYAMA, Y.; TATSUISHI, T.; YAMAGUCHI, J.; NISHIMURA, Y.; KANADA, A.;

IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; TADROS, T. F.; DEDEREN, J. C.; GARCIA, M. J.; AZEMAR, N.; SOLANS. C. Formation and stability of nano-emulsions prepared using the phase inversion temperature method. **Langmuir**, v.18, p. 26-30, 2002.

IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; TADROS, T. F.; DEDEREN, J. C.; FENG, J.; GARCIA, M. J.; AZEMAR, N.; SOLANS. C. Phase behavior and nano-emulsion formation by the phase inversion temperature method. **Langmuir**, v. 20, p. 6594-6598, 2004.

JEONG, M-W.; OH, S-G; KIM, Y. C. Effects of amine and amine oxide compounds on the zeta-potential of emulsion droplets stabilized by phosphatidylcholine. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 181, p. 247–253, 2001.

JÍROVÁ D.; KEJLOVÁ, K.; BRABEC, M.; BENDO VÁ, H.; KOLÁROVÁ H. The benefits of the 3T3 NRU test in the safety assessment of cosmetics: long-term experience from pre-marketing testing in the Czech Republic. **Toxicol. In Vitro**, v.17, p. 791–796, 2003.

KLEIN, K. Liquid Crystals and Emulsions: A Wonderful Marriage. **Cosmet. Toil.**, v. 115 (5), p. 30-34, 2002.

KORTING, H. C.; HERZINGER, T.; HARTINGER, A.; KERSCHER, M.; ANGERPOINTNER, T.; MAIBACH, H. I. Discrimination of the irritancy potential of surfactants in vitro by two cytotoxicity assays using normal human keratinocytes, HaCaT cells and 3T3 mouse fibroblasts: correlation with in vivo data from a soap chamber assay. **J. Dermatol. Sci.** v. 7(2), p. 119-29, 1994.

KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure & Appl. Chem.** v.66, p. 1003-1010, 1994.

KRIWET, K.; MÜLLER-GOYMANN, C.C. Binary diclofenac diethylamine-water systems: micelles, vesicles and lyotropic liquid crystals. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v. 39, p. 234-238, 1993.

KULIKOV, A.U.; ZINCHENKO, A.A. Development and validation of reversed phase high performance liquid chromatography method for determination of dexpanthenol in pharmaceutical formulations. **J. Pharm. Biomed. Anal.** v.43, p. 983–988, 2007.

KUNIEDA, H.; FRIBERG, S. E. Characterization of surfactants for enhanced oil recovery. **Bull. Chem. Soc. Jpn.** v. 54, p. 1010, 1981.

KUNIEDA, H.; FUKUI, H.; UCHIYAMA, H.; SOLANS C. Spontaneous formation of highly concentrated w/o emulsion (gel emulsions). **Langmuir**, v.12, p. 2136, 1996.

LANDFESTER, K., EISENBLÄTTER, J., ROTHE, R. Preparation of polymerizable miniemulsions by ultrasonication. **JCT Res.** v.1, p. 65-68, 2004.

LAUGEL, C.; CHAMINADE, P.; BAILLET, A. SEILLER, M.; FERRIER, D. Moisturizing substances entrapped in W/O/W emulsions: analytical methodology for formulation, stability and release studies. **J. Control. Release.** v. 38, p. 59-67, 1996.

LEAL-CALDERON, F.; POULIN, P. Progress in understanding emulsion metastability and surface forces. **Curr. Opin. Colloid Interface Sci.**, v. 4, p. 223-230, 1999.

LEE, H. M.; LEE, J. W.; PARK, O. O. Rheology and Dynamics of Water-in-Oil Emulsions under Steady and Dynamic Shear Flow. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 185, p. 297–305, 1997.

LEE, H. M.; LEE, J. W.; PARK, O. O. Rheology and dynamics of water-in-oil emulsions under steady and dynamic shear flow. **J. Colloid Interface Sci.**, v.185, p. 297–305, 1997.

LIEBLER, D. C.; BURR, J. A. Effects of UV light and tumor promoters on endogenous vitamin E status in mouse skin. **Carcinogenesis**, v. 21 (2), p. 221-225, 2000.

LIOCHEV, S. I.; FRIDOVICH, I. The role of O^{2-} in the production of HO^{\cdot} : in vitro and in vivo. **Free Radic. Biol. Med.** v.16, p. 29–33, 1994.

LIU, K.; BROWN, E.A. Enhancing vegetable oil quality through plant breeding and genetic engineering. **Food Technol.**, v. 50, p. 67, 1996.

LIU, Y.; PETERSON, D.A.; KIMURA, H.; SCHUBERT D. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. **J. Neurochem.**, v. 69 (2), p. 581, 1997.

LO, P.; FLORENCE, A. T.; TREGUIER, J. P.; SEILLER, M.; PUISIEUX, F. The influence of surfactant HLB and the nature of the oil phase on the phase diagrams of nonionic surfactant – oil – water systems. **J. Colloid Interface Sci.** v. 59, p. 319-327, 1977.

LOWE, G. M., BOOTH, L. A., YOUNG, A. J., BILTON, R. F. Lycopene and beta-carotene protect against oxidative damage in HT29 cells at low concentrations but rapidly lose this capacity at higher doses. **Free Radic. Res.** v. 30, p. 141–151, 1999.

LU, S. C. Regulation of hepatic glutathione synthesis: current concepts and controversies. **FASEB J.** v.13 (10), p. 1169-1183, 1999.

LUEPKE N.P. Hen's egg choriallantoic membrane test for irritation potential, **Food Chem. Toxicol.**, v. 23, p. 287-291, 1985.

LUEPKE, N.P.; KEMPER, F.H. The Het-Cam test: An alternative to the Draize eye test. **Food Chem Toxicol.**, v. 24, p. 495-496, 1985.

MAIER, K.; SCHMITT-LANDGRAF, R.; SIEGMUND, B. Development of an in vitro test system with human skin cells for evaluation of phototoxicity. **Toxicol. In Vitro.** v.5, p.457–461, 1991.

MAKAI, M.; CSÁNYI, E.; NÉMETH, ZS.; PÁLINKÁS, J.; ERÓS, I. Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. **Inter. J. Pharm.** v. 256, p. 95–107, 2003.

MARSZAL, L. HLB of Nonionic Surfactants: PIT and EPI methods. In: SCHICK, M. J. **Surfactant Science Series, Nonionic Surfactants – Physical Chemistry**. New York: Marcel Dekker Inc.1987. Vol. 23, pp. 439-547.

MARTINEZ, V.; CORSINI, E.; MITJANS, M.; PINAZO, A.; VINARDELL, M.P. Evaluation of eye and skin irritation of arginine-derivative surfactants using different in vitro endpoints as alternatives to the in vivo assays. **Toxicol. Lett.**, v.164, p. 259–267, 2006.

MARTINEZ, V. **Marcadores de irritación en modelos celulares y organotípicos como alternativa a los ensayos in vivo, aplicado al estudio de tensaoactivos de tipo lipoaminoácido**. 161 p. Tese de Doutorado – Facultat de Farmacia, Universita de Barcelona, Barcelona, 2007.

MASSON, D. S; MORAIS, G. G.; MORAIS, J. M.; ANDRADE, F. F.; SANTOS, O. D. H.; OLIVEIRA, W. P.; ROCHA-FILHO, P. A. Polyhydroxy alcohols and peach oil addition influence on liquid crystal formation and rheological behavior of O/W emulsions. **J. Dispers. Sci. Technol.**, v. 26 (4), p. 463-468, 2005.

MELE, S.; MURGIA, S.; MONDUZZI, M. Monoolein based liquid crystals to form long-term stable emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 228, p. 57–63, 2003.

MERWALD, H.; KLOSNER, G.; KOKESCH, C.; DER-PETROSSIAN, M.; HÖNIGSMANN, H.; TRAUTINGER, F. UVA-induced oxidative damage and cytotoxicity depend on the mode of exposure. **J. Photochem. Photobiol. B: Biol.** v.79, p. 197–207, 2005.

MILLER, D.; WIENER, E. M.; TUROWSKI, A.; THUNIG, C.; HOFFMANN, H. O/W emulsions for cosmetics products stabilized by alkyl phosphates – rheology and storage tests. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 152, p. 155-160, 1999.

MOLDENHAUER, F. Using in vitro prediction models instead of the rabbit eye irritation test to classify and label new chemicals: a post hoc data analysis of the international EC/HO validation study. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 31, p. 31–46, 2003.

MORAIS, G. G.; SANTOS, O. D. H.; MASSON, D. S.; OLIVEIRA, W. P.; ROCHA-FILHO, P. A. Development of O/W emulsion with annatto oil (*Bixa orellana*) containing liquid crystal. **J. Dispers. Sci. Technol.**, v. 26, p. 591-596, 2005.

MORAIS, J. M.; SANTOS, O. D. H.; NUNES, J. R. L.; ZANATTA, C. F.; ROCHA-FILHO, P. A. W/O/W Multiple emulsions obtained by one step emulsification method and evaluation of the involved variables. **J. Dispers. Sci. Technol.**, v. 29, DOI: 10.1080/01932690701688391, 2008.

MORITA, A.; KRUTMANN, J. Ultraviolet A radiation-induced apoptosis. *Methods Enzymol.* v.319, p. 302–309, 2000.

MORTENSEN A. Scavenging of benzylperoxyl radicals by carotenoids. **Free Radic. Res.** V. 36, p. 211-216, 2002.

MURILLO, G.; PEREZ U.; TUR, E.; VINARDELL, M.P.; GARCÍA, G.; PASCUAL, J.R. Estudio comparativo de tres variantes del ensayo de la membrana corioalantoidea del

huevo de la gallina para la evaluación de la irritación ocular. **Revista de Toxicología**, v. 20, p. 187-192, 2003.

MURPHY, G. M. The acute effects of ultraviolet radiation on the skin. In: HAWK, J. L. M. **Photodermatology**. London: Oxford University Press. 1999. pp. 43–52.

NESSEEM, D. Formulation and evaluation of itraconazole via liquid crystal for topical delivery system. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 26, p. 387-399, 2001.

OFFORD, E. A.; GAUTIER, J. C.; AVANTI, O.; SCALETTA, C.; RUNGE, F.; KRÄMER, K.; APPLGATE, L. A. Photoprotective potential of lycopene, b-carotene, vitamin E, vitamin C and carnosic acid in UVA irradiated human skin fibroblasts. **Free Radic. Biol Med.**, v. 32 (12), p.1293-1303, 2002.

ONUKE, Y.; MORISHITA, M.; TAKAYAMA, K. Formulation optimization of water-in-oil-water multiple emulsion for intestinal insulin delivery. **J. Control. Release**, v. 97, p. 91-99, 2004.

OPAWALE, F. O.; BURGESS, D. J. Influence of interfacial rheological properties of mixed emulsifier films on the stability of water-in-oil-in-water emulsions. **J. Pharm. Pharmacol.** v. 50, p. 965-973, 1998.

OSBORNE, R.; PERKINS, M. A. An approach for development of alternative test methods based on mechanisms of skin irritation. **Food Chem Toxicol.** v.32(2), p. 133-142, 1994.

ÖZER, Ö.; BALOGLU, E.; ERTAN G. The effect of the type and concentration of the lipophilic surfactant on the stability and release kinetics of the W/O/W multiple emulsions. **Inter. J. Cosmet. Sci.** v. 22, p. 459-470, 2000.

PARKS, D. R.; BRYAN, V. M.; OI, V. T.; HEIZENBERG, L.A. Antigen specific identification and cloning of hybridomas with fluorescence activated cell sorter. **P. Natl. Acad. Sci. USA** v.76, p. 1162-1166, 1979.

POURZAND, C.; TYRRELL, R. M. Apoptosis, the role of oxidative stress and the example of solar UV radiation. **Photochem. Photobiol.** v.70, p.380–390,1999.

PRETE, P.S.C.; GOMES, K.; MALHEIROS, S.V.P.; MEIRELLES, N.C.; DE PAULA, E. Solubilization of human erythrocyte membranes by non-ionic surfactants of the polyoxyethylene alkyl ethers series. **Biophys. Chem.** v.97, p. 45-54, 2002.

QUIJANO, J. A. T. Óleo de Palma . **Óleos Gorduras**, v. 49, p. 30, 1999.

RANG, M. J.; MILLER, C. A. Spontaneous emulsifications of oils containing hydrocarbon, non ionic surfactant and oleyl alcohol. **J. Colloid Interface Sci.** v. 209, p. 179-192, 1999.

RIBEIRO, H. M.; MORAIS, J. A.; ECCLESTON, G. M. structure and rheology of semi-solid o/w creams containing cetyl alcohol/non ionic surfactant mixed emulsifier and different polymers. **Int. J. Cosmet. Sci.**, v. 26, p. 47-59, 2004.

RIEDEL, H.; RASCHKE, T.; NIELSEN, J. **O/W emulsions useful e.g. cleansing, skin-care or anti-acne agents comprise a combination of steroids or fatty acids with optionally ethoxylated esters.** WO2003013460-A, Fev. 2003a.

RIEDEL, H.; HEINECKE, S.; LINDEMANN, W. & SCHLICHTING, A. **W/O/W emulsions useful e.g. cleansing, skin-care or anti-acne agents comprises a combination of steroids, fatty acids and optionally ethoxylated esters.** DE10139582-A1, Fev. 2003b.

RIEGER, M. M. Teste de estabilidade de macroemulsões. **Cosmet. Toil. (ed. Port.)**, v. 8, p. 47-53, 1996.

ROCHA-FILHO, P. A.; VAUTION, C.; SEILLER, M. Les émulsions multiples l/h/l. **Sci. Tech. Pharm. – Pharm Sci.** v. 10, p. 652-660, 1989.

ROUGIER, A.; COTTIN, M.; SILVA, O.; ROUGET, R.; CATROUX, P.; TOUFIC, A.; DOSSOU, K. G. *In vitro* methods: their relevance and complementary in ocular safety assessment. **Lens Eye Toxic. Res.**, v. 9, p. 229-245, 1992.

SAJJADI, S., JAHANZAD, F., YIANNESKIS, M., BROOKS, B. W. Phase inversion in abnormal O/W/O emulsions: effect of surfactant hydrophilic-lipophilic balance, **Ind. Eng. Chem. Res.** v. 42, p. 3571-3577, 2003a.

SAJJADI, S.; ZERFA, M.; BROOKS, B. W. Phase inversion in p-xylene-water emulsions with the non-ionic surfactant pair sorbitan monolaurate/polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Span20/Tween20). **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.** v. 218, p. 241-254, 2003b.

SAJJADI, S. Nanoemulsion formation by phase inversion emulsification: on the nature of inversion. **Langmuir**, v. 22, p. 5597-5603, 2006.

SALAGER J. L., FORGIARINI A., MARQUÉZ L., PEÑA A., PIZZINO A., RODRIGUEZ M. P., GONZÁLEZ M. R. Using emulsion inversion in industrial process. **Adv. Colloid Interface Sci.** v. 259 (108-109), p. 259-272, 2004.

SANCHEZ, L.; MITJANS, M.; INFANTE, M. R.; VINARDELL, M. P. Assessment of the potential skin irritation of lysisne-derivative anionic surfactants using mouse fibroblasts and

human keratinocytes as an alternative to animal testing. **Pharm. Res.**, v. 21, p. 1637-1641, 2004.

SANCHEZ, L.; MITJANS, M.; INFANTE, M. R.; VINARDELL, M. P. Potential irritation of lysine derivate surfactants by hemolysis and HaCat cell viability. **Toxicol. Lett.**, v. 161, p. 53-60, 2006.

SANTOS, O. D. H., MIOTTO J. V., MORAES J. M., OLIVEIRA W. P.; ROCHA-FILHO, P. A. Attainment of emulsions of liquid crystal from Marigold oil using required HBL method. **J. Dispers. Sci. Technol.** v. 26(2), 243-249, 2005.

SHIMA, M.; KOBAYASHI, Y.; KIMURA, Y.; ADASHI, S.; MATSUNO, R. effect of the hydrophilic surfactants on the preparation and encapsulation efficiency in course and fine W/O/W type emulsions. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 238, p. 83-90, 2004.

SHINODA, K.; SAITO H. The effect of temperature on the phase equilibria and the types of dispersion of the ternary system composed of water, cyclohexane, and non-ionic surfactant. **J. Colloid Interface Sci.** v. 26, p. 70-74, 1968.

SIES, H.; STAHL, W. Nutritional protection against skin damage from sunlight. **Annu. Rev. Nutr.** v.24, p. 173–200, 2004.

SILBER, P. M.; RUEGG, C. E. Product safety: In-Vitro Assays. **Cosmet. Toil.** v. 107, p. 71-78, 1992.

SILVA, M. R.; CONTENTE, D. M. L.; OLIVEIRA, A.; ROCHA FILHO, P. A. Ascorbic acid liberation from o/w/o multiple emulsions. **Cosmet. Toil.**, v. 112, p. 85-87, 1997.

SIMPSON, K. L. Relative value of carotenoids as precursors of vitamin A. **Proc. Nutr. Soc.** v.42, p. 7, 1983.

SINA, J.F.; GALER, D.M.; SUSSMAN, R.G.; GAUTHERON, P.; SARGENT, E.V.; LEONG, B.; SHAH, P.V.; CURREN, R.D.; MILLER, K. A collaborative evaluation of seven alternatives to the Draize eye irritation test using pharmaceutical intermediates. **Fund. Appl. Toxicol.**, v. 26, p. 20–31., 1995.

SINGH, S. Phase transitions in liquid crystals. **Physics Reports**, Amsterdam, v.324, p.107-269, 2000.

SLYSHENKOV, V. S.; DYMKOWSKA, D.; WOJTCZAK, L. Pantothenic acid and pantothenol increase biosynthesis of glutathione by boosting cell energetics. **FEBS Letters** v.569, p.169–172, 2004.

SMITH, C.N.; ALEXANDER, B. R. The relative cytotoxicity of personal care preservative systems in Balb/C 3T3 clone A31 embryonic mouse cells and the effect of selected preservative systems upon the toxicity of a standard rinse-off formulation. **Toxicol. In Vitro**, v.19, p. 963–969, 2005.

SÖDERLIND, E.; KARLSSON, L. Haemolytic activity of maltopyranoside surfactants. **Eur. J Pharm. Biopharm.** v.62(3), p. 254-259, 2006.

SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M J. Nano-emulsions. **Curr. Opin. Colloid Interface Sci.** v. 10, p. 102-110, 2005.

SPIELMANN, H., BALLS, M., DUPUIS, J., PAPE, W.J.W., DE SILVA, O., HOLZHUTTER, H.-G., GERBERICK, F., LIEBSCH, M., LOVELL, W.W., MAURER, T., PFANNENNBECKER, U. A study on UV filter chemicals from Annex VII of European

Union Directive 76/768/EEC, in the 3T3 NRU phototoxicity test. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 26, 1998a.

SPIELMANN, H., BALLS, M., DUPUIS, J., PAPE, W.J.W., OECHOVITCH, G., DE SILVA, O., HOLZHUTTER, H.-G., CLOTHIER, R., DESOLLE, P., GERBERICK, F., LIEBSCH, M., LOVELL, W.W., MAURER, T., PFANNENNBECKER, U., POTTHAST, J.M., CSATO, M., SLADOWSKI, D., STELLING, W., BRANTOM, P. The international EU/COLIPA in vitro phototoxicity validation study: results of phase II (blind trial). Part 1: The 3T3 NRU phototoxicity test. **Toxicol. In Vitro**, v. 12, p. 305–327, 1998b.

STAHL, W.; SIES, H. Carotenoids and protection against solar UV radiation. **Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.** v. 15, p. 291-296, 2002.

STAHL, W.; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochim. Biophysica Acta.** v. 1740, p. 101-107, 2005.

STEILING, W.; BRACHER, M.; COURTELLEMONT, P.; DE SILVA, O. The HET-CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and ingredients. **Toxicol. In vitro**, v. 13, p. 375–384, 1999.

STRATTON, S. P.; DORR, R. T.; ALBERTS, D. S. The state-of-the-art in chemoprevention of skin cancer. **Eur. J. Cancer**, v. 36, p. 1292–1297, 2000.

SUZUKI, T.; TAKEI, H.; YAMAZAKI, S. Formation of the three-phase emulsions by the liquid crystal emulsification method with arginine-branched monoalkyl phosphate. **J. Colloid Interface Sci.** v. 129, p. 491-500, 1989.

TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, P. Formation and stability of nano-emulsions. **Adv. Colloid Interface Sci.** v. 108 –109, p. 303–318, 2004.

TAROZZI, A.; MARCHESI, A.; HRELIA, A.; ANGELONI, C.; ANDRISANO, V.; FIORI, J.; CANTELLI-FORTI, G.; HRELIA, P. Protective Effects of Cyanidin-3-O-b-glucopyranoside Against UVA-induced Oxidative Stress in Human Keratinocytes. **Photochem. Photobiol.** v.81, p. 623–629, 2005.

TATSUISHI, T.; OYAMA, Y.; IWASE, K.; YAMAGUCHI, J.; KOBAYASHI, M.; NISHIMURA, Y.; KANADA, A.; HIRAMA, H. Polysorbate 80 increases the susceptibility to oxidative stress in rat thymocytes. **Toxicology**, v.199, p. 137–143, 2004.

TEDAJO, G. M.; BOUTTIER, S.; FOURNIAT, J.; GROSSIORD, J. L.; MARTY, J. P.; SEILLER, M. Release of antiseptics from aqueous compartments of a w/o/w multiple emulsion. **Int. J. Pharm.**, v. 208, p. 63-72, 2005.

The Merck Index: An encyclopedea of chemicals, drugs and biologicals. BUDAVARÍ, S.; O'NEIL, M. J.; SMITH, A. 11th Ed. Rathaway, N.J., U.S.A., 1989, p. 2924; 9932.

TODARO, G. J.; GREEN, H. Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. **J. Cell Biol.** v.17, p. 299-313, 1963.

TODARO, G. J.; GREEN, H.; GOLDBERG, B. D. Transformation of properties of an established cell line by SV 40 and Polyoma Virus. **P. Natl. Acad. Sci.** v.51, p. 66-73, 1964.

TREGUIER, J. P.; LO, P.; SÉLLER, M. ; PUISIEUX, F. Emulsions et diagramme eau – surfactif – huile. Étude d'un system eau – Brij 92 et 96 – huile Vaseline. Influence de l'hydrophilie du surfactif. **Pharm. Acta Helv.** v. 50, p. 421-431, 1975.

TRENAM, C. W.; BLAKE, D. R.; MORRIS, C. J. Skin inflammation: reactive oxygen species and the role of iron. **J. Invest. Dermatol.** v.99, p. 675–682, 1992.

TYLE, P. Liquid crystal and their applications in drug delivery. In: ROSOFF, M. (Ed.) **Controlled release of drugs: polymers and aggregate systems**. New York: VCH, 1989. Chapter 4 (125-162).

TYRRELL, R. M. The molecular and cellular pathology of solar ultraviolet radiation. **Mol. Aspects Med.** v.15, p. 1–77, 1994.

URSICA, L.; TITA, D.; PALICI, I., TITA, B.; VLAIA, V. Particle size analysis of some water/oil/water multiple emulsion. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 37, p. 931-936, 2005.

VAESSEN, G. E. J.; STEIN, H. N. The applicability of catastrophe theory to emulsion phase inversion. **J. Colloid Interface Sci.** v.176, p. 378-387, 1995.

VASUDEVAN, T. V.; NASER, M. S. Some aspects of stability of multiple emulsions in personal cleansing systems. **J. Colloid Interface Sci.** v. 256, p. 208-215, 2002.

VINARDELL, M.P.; GARCIA, L. The quantitative chorioallantoic membrane test using trypan blue stain to predict the eye irritancy of liquid scintillation cocktails. **Toxicol. In Vitro**, v. 14, p.551-556, 2000.

VINARDELL, M. P.; INFANTE, M.R. Review. The relationship between the chain length of non-ionic surfactants and their hemolytic action on human erythrocytes. **Comp. Biochem. Physiol. C.** v.124(2), p.117-20, 1999.

VINARDELL, M.P.; MITJANS, M The chorioallantoic membrane test as a model to predict the potential human eye irritation by commonly used laboratory solvents. **Toxicol. In Vitro**, v. 20, p. 1066-1070, 2006.

VIVES, M. A.; MACIÁN, M.; SEGUER, J.; INFANTE, M. R.; VINARDELL, M. P. Irritancy potential induced by surfactants derived from lysine. **Toxicol. in Vitro**, v. 11, p. 779-783, 1997.

WILHEM, K-P.; BOÈTTJER, B.; SIEGERS; C.P. Quantitative assessment of primary skin irritants in vitro in a cytotoxicity model: comparison with in vivo human irritation tests. **Br. J. Dermatol.** v.145, p. 709-715, 2001.

WLASCHEK, M., I. TANTCHEVA-POOR, L. NADERI, W. MA, L. A. SCHNEIDER, Z. RAZI-WOLF, J. SCHULLER AND K. SCHARFFETTER-KOCHANNEK Solar UV irradiation and dermal photoaging. **J. Photochem. Photobiol. B.** v.63, p. 41–51, 2001.

XIE, F.; BROOKS, B. W. Phase behaviour of a non-ionic surfactant-polymeric solution-water system during the phase inversion process. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.** v. 252, p. 27-32, 2004.

YAZAN, Y.; SEILLER, M. ; PUISIEUX, F. Multiple emulsions. **Boll. Chim. Farm.** v. 6, p. 187-196, 1993.

ZERFA, M., SAJJADI, S., BROOKS, B. W. Phase behaviour of polymer emulsions during the phase inversion process in the presence of non-ionic surfactants. **Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.** v.178, p. 41-48, 2001.