UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação tópica
a base de cristais líquidos para veiculação de
siRNA na terapia gênica**

Lívia Vieira Depieri

Ribeirão Preto
2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação tópica
a base de cristais líquidos para veiculação de
siRNA na terapia gênica**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e
Cosméticos

Orientada: Lívia Vieira Depieri

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Vitória
Lopes Badra Bentley

*Versão corrigida da **Dissertação de Mestrado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em 10/05/2012. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP*.

Ribeirão Preto
2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Depieri, Livia Vieira

Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação tópica a base de cristais líquidos para veiculação de siRNA na terapia gênica. Ribeirão Preto, 2012.

91f.; 30cm.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Bentley, Maria Vitória Lopes Badra.

1. siRNA 2. Cristal Líquido 3. Nanodispersões
4. Terapia Gênica

FOLHA DE APROVAÇÃO

Lívia Vieira Depieri

Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação tópica a base de cristais líquidos para veiculação de siRNA na terapia gênica

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Vitória Lopes Badra Bentley

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

*Dedico este trabalho aos meus avós Darcy
e Olindo, aos meus pais Libânia e Luiz, a
minha irmã Vanessa e ao meu namorado
Thiago por toda compreensão, amor e
dedicação.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, por todas as experiências vividas, permitindo meu crescimento e amadurecimento emocional e espiritual.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Vitória Lopes Badra Bentley pela oportunidade de desenvolver essa pesquisa, pelo aprendizado diário, pelo exemplo profissional e pessoal e pela confiança. Foi e é fundamental na transmissão de experiências, na criação e solidificação de saberes e nos meus pequenos sucessos. Obrigada pela dedicação, pelo carinho e pela amizade.

Aos meus avós Darcy e Olindo por serem tão especiais na minha vida. Sem a educação que me proporcionaram não teria chegado até aqui. Obrigada pelo amor incondicional, apoio, orações, por tudo. Amo muito vocês.

À minha mãe Libânia pela parceria na vida, por lutar e vencer junto comigo tantas coisas. Obrigada por me ajudar em todos os momentos vividos e por me incentivar sempre a prosseguir. Pelo imenso amor, generosidade e apoio incondicional. “Mãe não tem limite, é tempo sem hora”.

Ao meu pai Luiz Henrique por me apoiar e me ajudar a trilhar minhas escolhas. Pelo nosso jeito único de amar e conduzir nossa história.

À minha irmã Vanessa pela compreensão da minha ausência, pelo companheirismo, carinho e apoio.

Ao meu namorado, companheiro e amigo Thiago por ser tão amoroso e presente, por sempre me apoiar e ajudar a me tornar uma pessoa melhor. “Nosso amor é estado de graça... não se apaga... não se troca... não se conjuga... É forte por si só.”

Aos meus tios Teresa e Mauro, José Geraldo e Luciene, Denise e Luiz e aos meus padrinhos José Augusto e Maria Rosa por torcerem sempre por mim, por estarem sempre presentes na minha vida. Obrigada pelo carinho e incentivo.

Aos meus avós Neuza e Alcides (*in memoriam*) pelo imenso amor, incentivo e apoio. Vocês estão no meu coração.

Aos meus primos Carolina, Laís, Letícia, Ana Beatriz, Bruno, Thaís e Livia pela amizade, cumplicidade e pelos bons momentos compartilhados.

À Conceição, Raider, Matheus, Jusi, Ebinho, Amanda, Camila, Teh e Rita por somarem-se a minha família, por estarem presentes nessa etapa e por terem me acolhido com tanto afeto e carinho.

À amiga e companheira de laboratório Dr^a. Fabiana Testa Moura de Carvalho Vicentini pela dedicação, pelas trocas de experiência, ensinamentos, pelo convívio diário e, sobretudo, pela amizade. Muito obrigada por tudo Fabi.

À amiga e companheira de laboratório Livia Borgheti por toda ajuda, parceria, apoio nos momentos difíceis e amizade que me tanto colaboraram nesta etapa.

Aos amigos do laboratório de Tecnologia Farmacêutica: Danielle, Fabíola, Josimar, Marina, Raquel, Samantha, Thaís e Wanessa pelo apoio, incentivo, ensinamentos e amizade.

Aos amigos e técnicos do laboratório de Tecnologia farmacêutica, Henrique e José Orestes, pela ajuda, apoio e companheirismo.

À Prof^a. Dr^a. Márcia Carvalho de Abreu Fantini, ao Antônio Carlos e ao Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física – USP pela execução das análises de difração de raios X e pelo auxílio na interpretação dos dados.

À Prof^a. Dr^a. Maria José Vieira Fonseca, por permitir-me utilizar os equipamentos de seu laboratório.

Ao Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura, por permitir-me utilizar os equipamentos de seu laboratório.

À Prof^a. Dr^a. Maria Cristina Nonato, por permitir-me utilizar os equipamentos de seu laboratório.

À Prof^a. Dr^a. Mamie Mizusaki Iomasa, por permitir-me utilizar os equipamentos de seu laboratório.

Aos amigos Fabíola, Ana Paula, Anna Carolina, Renata, Talitha, Paula G., Paula Dias, Raquel, Willian, Cláudia, Paula I., Kátia, Marília, Letícia, Romulo e Luciana pelos bons momentos compartilhados, ao apoio e incentivo na minha trajetória. Saudades!

Aos funcionários da seção de pós-graduação pelo excelente serviço prestado.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de mestrado (processo n°. 2010/02398-3).

À todos aqueles que, de alguma forma, participaram da execução deste trabalho, tornando possível sua realização.

Aprender é transformador.

RESUMO

DEPIERI, L. V. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação tópica a base de cristais líquidos para veiculação de siRNA na terapia gênica.** 2012. 91f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A terapia gênica por interferência de RNA (RNAi) trata-se de um processo de silenciamento pós-transcricional capaz de suprimir a expressão de um determinado gene. A RNAi é uma proposta terapêutica promissora para o tratamento de muitas doenças severas que ainda não possuem cura ou terapias bem definidas. Porém, é necessário o desenvolvimento de sistemas de liberação clinicamente adequados, seguros e eficazes para se viabilizar essa nova terapêutica, uma vez que obstáculos na administração e distribuição *in vivo* comprometem o uso clínico dos siRNAs (*small interfering RNA*). Paralelamente, a liberação tópica de siRNAs surge como uma alternativa promissora para o tratamento de patologias cutâneas. Neste contexto, a presente pesquisa teve como objetivo o desenvolvimento de um sistema de liberação baseado em Nanotecnologia para a liberação tópica de siRNAs, visando introduzir a terapia gênica como nova abordagem para o tratamento de patologias cutâneas. Como sistema de liberação, foram desenvolvidas nanodispersões líquido-cristalinas aquosas, compostas por monoleína (MO), um lipídeo polar biocompatível, associadas ou não com ácido oléico (AO). Foram incorporados a esses sistemas os adjuvantes catiônicos polietilenoimina (PEI) e oleilamina (OAM) para obtenção das nanodispersões. Dentre as nanodispersões aquosas desenvolvidas, foram escolhidas as preparações com as menores concentrações de adjuvantes catiônicos, a saber: MO e OAM a 0,4%, MO e PEI a 0,4%, MO, AO e OAM a 2,5% e MO, AO e PEI a 1,0%. Estas formulações apresentaram: reduzido tamanho médio das partículas, baixa polidispersividade, valores de potencial zeta positivos (característica interessante para interação com as moléculas de siRNA que apresentam carga negativa), baixa citotoxicidade *in vitro* e foram capazes de complexar o siRNA na concentração final de 2,5 μ M. A análise de difração de raios X caracterizou a fase líquido-cristalina desses sistemas como hexagonal, exceto a nanodispersão MO e PEI a 0,4% que foi caracterizada como uma mistura de fase hexagonal e cúbica. As nanodispersões obtidas foram capazes de aumentar a penetração cutânea de siRNA *in vitro*. Face aos resultados obtidos, podemos concluir que as formulações desenvolvidas são sistemas de liberação de base nanotecnológica promissores para administração tópica de siRNA para o tratamento de patologias cutâneas na terapia gênica.

Palavras-chave: siRNA, cristal líquido, nanodispersões, terapia gênica.

ABSTRACT

DEPIERI, L. V. **Development and characterization of topical delivery systems based on liquid crystals for siRNA in gene therapy.** 2012. 91f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Gene therapy by RNA interference (RNAi) is a post-transcriptional silencing process that can suppress the expression of a particular gene. The RNAi is a promising therapeutic approach for the treatment of many severe diseases that have no cure or well-defined treatments. However, the development of clinically appropriate, safe and effective delivery systems is necessary to enable this new therapy, since obstacles in the *in vivo* administration and distribution committed the clinical use of siRNAs (*small interfering* RNA). In addition, the topical delivery of siRNAs appears as a promising alternative for the treatment of cutaneous pathologies. In this context, this research aimed to develop a delivery system based on Nanotechnology for the topical delivery of siRNAs, aiming to introduce gene therapy as a new approach for the treatment of skin disorders. As a delivery system, liquid-crystalline nanodispersions, composed by monoolein (MO), a polar biocompatible lipid, associated or not with oleic acid (OA) were developed. The cationic adjuvants polyethylenimine (PEI) and oleylamine (OAM) were incorporated into these systems to obtain the nanodispersions. Among the aqueous nanodispersions developed, preparations with lower concentration of cationic adjuvant were chosen, these consisting of: MO and OAM at 0.4%, MO and PEI at 0.4%, MO, OA and OAM at 2.5% and MO, OA and PEI at 1.0%. These formulations presented: reduced average particle size, low polydispersity, positive values of zeta potential (an interesting feature for interacting with the siRNA molecules that have a negative charge), low cytotoxicity *in vitro* and they were able to complex the siRNA at a final concentration of 2.5 μM . The X-ray diffraction analysis characterized the liquid crystalline phase of these systems as hexagonal, except the nanodispersion MO and PEI at 0.4% which was characterized as a mixture of cubic and hexagonal phases. The nanodispersions obtained were able to increase the skin penetration of siRNA *in vitro*. With the results obtained, we can conclude that the formulations developed are delivery systems based on nanotechnology, promising for topical administration of siRNA for the treatment of cutaneous diseases in gene therapy.

Keywords: siRNA, liquid crystal, nanodispersions, gene therapy.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1: Mecanismo de interferência de RNA.....	3
Figura 2: Estrutura molecular do polímero catiônico PEI.....	6
Figura 3: Esquematização do mecanismo de escape endossomal de <i>poliplexos</i> , conhecido como “efeito esponja de prótons”.....	7
Figura 4: Estrutura molecular do lipídeo catiônico OAM.....	8
Figura 5: Esquematização do mecanismo de escape endossomal de <i>lipoplexos</i>	8
Figura 6: Representação esquemática das diversas fases líquido-cristalinas formadas pela monoleína em presença de água.....	10
Figura 7: Estrutura molecular da MO.....	11
Figura 8: Diagrama esquemático dos diferentes tipos de fase líquido-cristalina que podem ser obtidas em termos do fator de empacotamento.....	12
Figura 9: Diagrama de fases binário monoleína/água com conteúdo de água variando entre 5 e 40% (p/p) e observado entre 20 e 90°C com aquecimento de 1°C/min.....	24
Figura 10: Diagramas ternário de fases parcial dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA contendo diferentes proporções de OAM e PEI, respectivamente. Observação das fases ao microscópio de luz polarizada, objetiva de 20X, temperatura de 25°C.....	26
Figura 11: Fotomicrografias obtidas utilizando microscopia de luz polarizada. (A) MO:OAM:FA (10:0,4:89,6, p/p/p), (B) MO:OAM:FA (10:1:89, p/p/p), (C) MO:OAM:FA (10:2,5:87,5, p/p/p), (D) MO:PEI:FA (10:0,4:89,6, p/p/p), (E) MO:PEI:FA (10:1:89, p/p/p), (F) MO:PEI:FA (10:2,5:87,5, p/p/p), (G) MO:AO:OAM:FA (8:2:0,4:89,6, p/p/p/p), (H) MO:AO:OAM:FA (8:2:1:89, p/p/p/p), (I) MO:AO:OAM:FA (8:2:2,5:87,5, p/p/p/p), (J) MO:AO:PEI:FA (8:2:0,4:89,6, p/p/p/p), (K) MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p), (L) MO:AO:PEI:FA (8:2:2,5:87,5, p/p/p/p), (M) MO:FA (10:90, p/p), (N) MO:AO:FA (8:2:90, p/p/p) (O) Fase hexagonal dispersa referente ao sistema composto por MO:AO:OAM:FA (8:2:2,5:87,5, p/p/p/p). Temperatura 25°C, objetiva 20X.....	29
Figura 12: Tamanho de partícula e polidispersividade das nanodispersões do sistema MO:FA após incorporação de diferentes porcentagens de OAM ou PEI e siRNA na concentração final de	

2,5 μ M. As amostras foram diluídas 100x em água Milli-Q e as medidas foram realizadas a 25°C. Os resultados são expressos pela média $\pm$ E.P.M. (n=3). Análise estatística realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, * $p < 0,05$ em relação ao controle (nanodispersão sem adição do adjuvante catiônico e sem siRNA); ** $p < 0,05$ em relação ao controle (nanodispersão sem a adição do adjuvante catiônico e com siRNA); Não houve diferença estatística em relação ao controle (nanodispersão sem siRNA em cada concentração testada do adjuvante catiônico).....

31

Figura 13: Tamanho de partícula e polidispersividade das nanodispersões do sistema MO:AO:FA após incorporação de diferentes porcentagens de OAM ou PEI e siRNA na concentração final de 2,5 μ M. As amostras foram diluídas 100x em água Milli-Q e as medidas foram realizadas a 25°C. Os resultados são expressos pela média $\pm$ E.P.M. (n=3). Análise estatística realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, * $p < 0,05$ em relação ao controle (nanodispersão sem adição do adjuvante catiônico e sem siRNA); ** $p < 0,05$ em relação ao controle (nanodispersão sem a adição do adjuvante catiônico e com siRNA); Não houve diferença estatística em relação ao controle (nanodispersão sem siRNA em cada concentração testada do adjuvante catiônico).....

33

Figura 14: Potencial zeta das nanodispersões dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA após incorporação de diferentes porcentagens de OAM ou PEI e siRNA na concentração final de 2,5 μ M. Os resultados são expressos pela média $\pm$ E.P.M. (n=3). Análise estatística realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, * $p < 0,05$ em relação ao controle (nanodispersão sem adição do adjuvante catiônico e sem siRNA); ** $p < 0,05$ em relação ao controle (nanodispersão sem a adição do adjuvante catiônico e com siRNA); Não houve diferença estatística em relação ao controle (nanodispersão sem siRNA em cada concentração testada do adjuvante catiônico).....

35

Figura 15: Perfil eletroforético do siRNA em água DEPC em diferentes concentrações (A) e das formulações dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA sem siRNA com as concentrações maiores de OAM ou PEI utilizadas (B).....

37

Figura 16: Eficiência de complexação do siRNA pelo sistema MO:FA preparado com diferentes concentrações de OAM ou PEI após a incorporação de siRNA na concentração final de 2,5 μ M.....

38

Figura 17: Eficiência de complexação do siRNA pelo sistema MO:AO:FA preparado com diferentes concentrações de OAM ou PEI após a incorporação de siRNA na concentração final de 2,5 μ M.....

39

Figura 18: Efeito dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA incorporados com diferentes porcentagens de OAM ou PEI na viabilidade celular de

fibroblastos da linhagem L929. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ E.P.M. Análise estatística realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, * $p < 0,05$ em relação ao controle + (células sem tratamento).....	41
Figura 19: Eficiência de complexação do siRNA pelas nanodispersões dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA preparados com PEI ou OAM após a incorporação de siRNA na concentração final de 10 μ M....	44
Figura 20: Efeito dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA preparados com PEI e OAM sem e com a adição de siRNA na concentração final de 10 μ M, na viabilidade celular de fibroblastos da linhagem L929. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ E.P.M. Análise estatística realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, * $p < 0,05$ em relação ao controle + (células sem tratamento); não houve diferença estatística das formulações adicionadas de siRNA em relação aquelas sem a adição de siRNA.....	46
Figura 21: Análise turbidimétrica a 25°C das nanodispersões líquido-cristalinas dos sistemas MO:FA (A) e MO:AO:FA (B) preparadas com diferentes concentrações de PEI e com siRNA 10 μ M. As leituras foram realizadas após o preparo das nanodispersões e durante 120 horas. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ E.P.M. Análise estatística realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, não houve diferença estatística em relação ao grupo controle (tamanho médio de partícula no tempo 0 h).....	48
Figura 22: Análise turbidimétrica a 25°C das nanodispersões líquido-cristalinas dos sistemas MO:FA (A) e MO:AO:FA (B) preparadas com diferentes concentrações de OAM e com siRNA 10 μ M. As leituras foram realizadas após o preparo das nanodispersões e durante 120 horas. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ E.P.M. Análise estatística realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, não houve diferença estatística em relação ao grupo controle (tamanho médio de partícula no tempo 0 h).....	49
Figura 23: Difrátogramas de raios X das nanodispersões dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA sem e com a adição de 10 μ M siRNA.....	51
Figura 24: Difrátogramas das nanodispersões compostas por MO:PEI (0,4%):FA sem e com 10 μ M siRNA modelados por uma função Lorentziana.....	52
Figura 25: Parâmetro de rede de uma estrutura líquido cristalina de fase hexagonal antes e após a adição de água.....	54
Figura 26: Esquema representativo da diminuição do parâmetro de rede (a)	

após a incorporação de siRNA 10 μ M às nanodispersões líquido-cristalinas.....	55
Figura 27: Fotomicrografias de cortes histológicos de pele suína após o tratamento com diferentes preparações por 4, 8 e 12 horas obtidas utilizando microscopia de fluorescência. (A) Controles; (B) Preparações como siRNA-FAM 10 μ M. Filtro: excitação 500 ± 20 nm; emissão 535 ± 30 , objetiva 20X, barra 50 μ m.....	57
Figura 28: Fotomicrografias de cortes histológicos de pele suína após o tratamento com diferentes preparações por 4, 8 e 12 horas obtidas utilizando microscopia de fluorescência. (A) Controles; (B) Preparações como siRNA-FAM 10 μ M. Filtro: excitação 500 ± 20 nm; emissão 535 ± 30 , objetiva 20X, barra 50 μ m.....	58

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1: Indexação das estruturas de fase cúbica e hexagonal de acordo com os índices de Miller.....	20
Tabela 2: Fases líquido-cristalinas obtidas com os sistemas MO:FA e MO:AO:FA preparados com diferentes porcentagens dos adjuvantes catiônicos OAM e PEI.....	25
Tabela 3: Características das formulações escolhidas dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA sem siRNA.....	43
Tabela 4: Resultados da caracterização das formulações de trabalho dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA com a adição de siRNA na concentração final de 10 μ M.....	44
Tabela 5: Dados obtidos através da difração de raios X a baixo ângulo das nanodispersões dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA incorporadas com diferentes concentrações de OAM ou PEI e com siRNA na concentração de 10 μ M.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

MO	Monoleína, monoleato de glicerina
AO	Ácido oléico
PEI	Polietilenoimina
OAM	Oleilamina
FA	Fase aquosa
LLC	Cristal líquido liotrópico
RNAi	Interferência de RNA
siRNA	<i>Small interfering</i> RNA
PTGS	Silenciamento gênico pós transcricional
RNA _m	RNA mensageiro
dsRNA	RNA dupla fita
miRNA	Micro-RNA
shRNA	<i>Short hairpin</i> RNA
Pri-miRNA	Micro-RNA primário
Pré-miRNA	Micro-RNA precursor
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region 8 protein
RISC	RNA Induced silencing complex
Ago-2	Argonauta-2
FAM	Carboxifluoresceína
TAE	Tris-acetato-EDTA
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
MTT	[brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
FE	Fator de empacotamento
EC	Estrato córneo
PC	Pachyonychia congênita
DMRI	Degeneração macular relacionada à idade
pK _a	Constante de dissociação
EPM	Erro padrão médio
DOTAP	1,2 Dioleoil-3-propionato de trimetilamônio

SUMÁRIO

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tabelas.....	vii
Lista de abreviaturas e siglas.....	viii
 1. INTRODUÇÃO.....	 1
1.1. Terapia Gênica – Interferência de RNA (RNAi).....	1
1.2. A importância dos sistemas de liberação para veiculação de siRNAs.....	5
1.3. Cristais-líquidos.....	9
1.4. Via de administração tópica para siRNAs.....	13
 2. OBJETIVOS.....	 15
2.1 Objetivos específicos.....	15
 3. MATERIAL E MÉTODOS.....	 16
3.1 Material.....	16
3.1.1. Solventes, reagentes e matérias-primas.....	16
3.1.2. Equipamentos e acessórios.....	16
3.2. Métodos.....	17
3.2.1. Obtenção das nanodispersões líquido-cristalinas.....	17
3.2.2. Caracterização dos sistemas obtidos.....	18
3.2.2.1. Análise por microscopia de luz polarizada.....	18
3.2.2.2. Análise do tamanho e polidispersividade das partículas nas nanodispersões.....	18
3.2.2.3. Medida da carga superficial e mobilidade eletroforética das partículas na nanodispersão.....	18
3.2.2.4. Análise turbidimétrica.....	19
3.2.2.5. Análise por difração de raios X a baixo ângulo.....	19
3.2.3. Eficiência de complexação.....	20
3.2.3.1. Preparo do gel de agarose 2%.....	20
3.2.3.2. Preparo das amostras.....	21
3.2.4. Estudos de citotoxicidade.....	21
3.2.4.1. Linhagem celular e cultivo.....	21
3.2.4.2. Avaliação da citotoxicidade.....	21
3.2.5. Avaliação de penetração cutânea <i>in vitro</i> das nanodispersões por microscopia de fluorescência.....	22
 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	 24
4.1. Obtenção e caracterização das nanodispersões líquido-cristalinas.....	24

4.1.1. Análise do tamanho e distribuição de tamanho de partículas pela técnica do espalhamento dinâmico da luz.....	30
4.1.2. Medida da carga superficial das partículas das nanodispersões.....	34
4.2. Eficiência de complexação.....	36
4.3. Estudos de citotoxicidade.....	40
4.4. Seleção das formulações de trabalho.....	42
4.5. Caracterização das formulações de trabalho com 10 μ M siRNA.....	43
4.6. Análise turbidimétrica.....	47
4.7. Difração de raios X.....	51
4.8. Avaliação da penetração cutânea <i>in vitro</i> das nanodispersões líquido-cristalinas contendo siRNA-FAM.....	55
5. CONCLUSÕES.....	60
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

1. Introdução

1.1. Terapia Gênica – Interferência de RNA (RNAi)

Terapia gênica trata-se de um procedimento que envolve a introdução de material genético dentro da célula de um organismo com o objetivo de manipular, substituir, suprimir ou introduzir genes para o tratamento de doenças. Os genes são responsáveis por grande parte das doenças humanas, seja pela ausência da codificação de determinadas proteínas, codificação de proteínas anormais ou em excesso, seja por deixar o organismo suscetível a agentes ambientais, o que os tornam alvos extremamente importantes para o tratamento das doenças. Desse modo, a terapia gênica surge como uma ferramenta promissora no desenvolvimento de novas terapias (MARTIMPREY *et al.*, 2009).

O processo de interferência de RNA, mecanismo celular responsável pelo silenciamento gênico pós transcricional (*post transcription gene silencing* – PTGS) foi descrito pela primeira vez em plantas (petúnias) no início da década de 90 por Richard Jorgenséns e Joseph Mols, os quais tentavam aumentar os níveis de expressão dos genes responsáveis pela pigmentação púrpura das petúnias através da introdução de transgenes envolvidos na produção desse pigmento. Porém, os autores observaram que as plantas apresentavam flores brancas devido à inibição da síntese do pigmento por silenciamento do transgene e do gene endógeno. Esse fenômeno, então denominado de “co-supressão”, foi também observado em outras espécies de plantas e fungos (SIFUENTES-ROMERO; MILTON; GARCÍA-GASCA, 2011; FRANÇA *et al.*, 2010).

No mesmo período, Guo e Kemphues estudavam a função do gene *par-1* em *Caenorhabditis elegans* utilizando uma fita de RNA *antisense* para bloquear a produção da proteína *par-1*. Observaram que a injeção do RNA *antisense* produzia o resultado esperado, contudo, encontraram o mesmo resultado com a injeção de uma fita de RNA *sense* que foi utilizada como controle negativo. Enquanto isso, Andrew Fire e Craig Mello's obtiveram resultados similares aos de Guo e Kemphues com a injeção das fitas de RNA *sense* e *antisense* separadamente nos nemátodos. Em adição, ao injetarem as fitas juntas, observaram que moléculas de RNA fita dupla (*double strand* RNA - dsRNA) eram mais efetivas que cada fita individualmente na supressão da expressão de um determinado gene com sequência similar àquele dsRNA. Esta descoberta ficou conhecida como Interferência de RNA (FIRE *et al.*, 1998; SIFUENTES-ROMERO; MILTON; GARCÍA-GASCA, 2011), que juntamente com a descrição de duplas fitas de 21 nucleotídeos

de RNA sintéticas capazes de promover o silenciamento gênico em células de mamíferos (EUBASHIR *et al.*, 2001), desencadearam uma revolução biotecnológica.

A interferência mediada por RNA é um fenômeno que ocorre naturalmente nos organismos eucariotos e parece exercer um papel primordial na eliminação de RNAs mensageiros (RNAm) anômalos e na defesa do organismo contra parasitas moleculares como transposons e vírus (SUN; TSAO, 2008).

Avaliando-se suas funções naturais, RNAi ganhou grande atenção e tornou-se um procedimento comum para estudar a função dos genes e identificar potenciais genes alvos causadores de doenças. Além de ser uma importante ferramenta de pesquisa, a RNAi é uma grande promessa na terapia gênica para o silenciamento de genes causadores de doenças aplicando-se, particularmente, para as doenças em que a redução ou supressão do produto de um gene alvo específico possa trazer benefícios terapêuticos (LENZ, 2005; GUO *et al.*, 2010). A redução na expressão de proteínas através da RNAi é aplicável a todas as classes de alvos moleculares, incluindo aqueles que são difíceis de modular seletivamente com as abordagens farmacêuticas tradicionais envolvendo pequenas moléculas e proteínas (JACKSON; LINSLEY, 2010).

O mecanismo de interferência de RNA pode ser dividido em duas fases distintas: a fase de iniciação, onde ocorre a geração das moléculas efetoras, as quais podem ser classificadas em relação a sua origem e função em ao menos três categorias: siRNA (*small interfering RNA*), miRNA (microRNA) e shRNA (*short hairpin RNA*); e a fase de execução, onde ocorre a incorporação das moléculas efetoras em complexos proteicos e a promoção do silenciamento gênico (GELEY; MÜLLER, 2004).

A geração dos siRNAs ocorre com a introdução celular de um fragmento correspondente a um determinado gene na forma de dsRNA que será clivado no interior celular pela enzima Dicer (membro da família RNase III), num processo dependente de ATP, em siRNAs de aproximadamente 21-23 bases. siRNAs sintéticos também podem ser introduzidos nas células. A produção de miRNAs ocorre através da transcrição de genes pela RNA polimerase II em um microRNA primário (pri-miRNA) que então é clivado por um complexo proteico formado pela Drosha (enzima membro da família RNase III) e pela proteína DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region 8 protein) resultando no micro-RNA precursor (pré-miRNA), de aproximadamente 70 pares de bases, contendo uma região dupla fita e

uma alça fita simples, formando uma estrutura denominada *hairpin*. O pré-miRNA é exportado para o citoplasma celular pela exportin-5. No citoplasma, é clivado pela enzima Dicer gerando um miRNA com cerca de 22 nucleotídeos. Os shRNA são moléculas de RNA dupla fita com estrutura semelhante à do miRNA. Podem ser sintéticos ou transcritos dentro da célula a partir de vetores que codificam o shRNA junto a um promotor da RNA polimerase III. Neste caso, o transcrito é processado pela Dicer igual os miRNAs (FRANÇA *et al.*, 2010; GELEY; MÜLLER, 2004).

Após a geração das moléculas efetoras, estas são incorporadas a proteínas celulares formando um complexo multimérico chamado RISC (*RNA Induced Silencing Complex*), do qual a proteína Argonata 2 (Ago 2) participa. Essa proteína é responsável pela seleção da fita do siRNA ou miRNA que será incorporada ao complexo RISC e apresenta atividade de endonuclease dirigida contra a fita de RNAm alvo. A fita *sense* é eliminada e a fita *antisense* guia o complexo até o RNAm alvo. Como a sequência de bases nas moléculas de siRNA é perfeitamente complementar à sequência de bases do RNAm alvo, o complexo RISC cliva o referido RNAm, degradando-o. Por outro lado, dependendo da complementaridade das bases entre o miRNA e o RNAm, este pode ser degradado ou ter sua tradução bloqueada (**Figura 1**) (HUANG; LIU, 2011; FRANÇA *et al.*, 2010; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON; 2009; GELEY; MÜLLER, 2004).

Figura 1: Mecanismo de interferência de RNA. Adaptado de: HUANG; LIU, 2011.

Entre as vantagens dos siRNAs frente a outros fármacos, destaca-se o fato das sequências destas pequenas moléculas poderem ser rapidamente projetadas para uma inibição altamente específica. Além disso, a síntese de siRNA não requer um sistema de expressão celular, purificação de proteínas complexas, ou esquemas *re-folding*, o que resulta em um processo relativamente simples (REISCHL; ZIMMER, 2009). Outra vantagem dos siRNAs é sua alta eficiência devido à natureza catalítica do processo de RNAi, onde uma molécula de siRNA pode ser usada repetidas vezes para guiar a clivagem de muitas moléculas de RNAm alvo (ELBASHIR *et al.*, 2001; MEISTER; TUSCHL, 2004, TSENG; MOZUMDAR; HUANG, 2009).

O silenciamento gênico com a utilização de siRNAs criou um novo paradigma no desenvolvimento e descoberta de novos fármacos em relação a terapêutica tradicional com o uso de pequenas moléculas e anticorpos monoclonais. Para projetar uma terapêutica com o uso de siRNA requerer-se apenas o conhecimento da sequência do gene alvo de interesse. Além disso, pelo fato do mecanismo de RNAi mediado por siRNA ocorrer no citoplasma, temos uma potencial vantagem em relação a outros mecanismos de regulação gênica que necessitam da entrada da molécula efetora no núcleo celular (GUO *et al.*, 2010).

Estudos clínicos de fase II para medicamentos à base de siRNAs estão sendo conduzidos por empresas como a *Allergan* e a *Alnylam Pharmaceuticals* para o tratamento de degeneração macular relacionada à idade (DMRI) e para infecções respiratórias por vírus sincial, respectivamente. Outras empresas também estão pesquisando essa terapêutica para a DMRI como a *Acuity Pharmaceuticals*, *siRNA Therapeutics* e a *OPKO Health*, esta última, com estudos clínicos de fase III. Os resultados mostram-se promissores e reforçam a grande viabilidade dessa nova modalidade terapêutica (KARAGIANNIS; EL-OSTA, 2005; JONES, 2009). Dentre os 23 estudos clínicos em andamento com o uso de siRNA, temos um relacionado a uma patologia cutânea, a *Pachyonychia congênita* (PC), doença genética dominante negativa causada por mutação em genes que codificam a queratina (CLINICAL TRIALS.GOV, 2012). Este é o primeiro estudo do uso de siRNA em pele humana e tem como objetivo avaliar a segurança e tolerabilidade de injeções intra-lesionais nos calos de pacientes portadores de PC e também avaliar qualquer sinal de eficácia no tratamento com siRNA através de exames clínicos, relatos de pacientes

e experimentos para quantificar e distinguir os RNAm de queratina mutante (LEACHMAN et al., 2010).

1.2. A importância dos sistemas de liberação para veiculação de siRNAs

Estudos recentes ilustram diferentes abordagens para enfrentar os desafios no desenvolvimento de terapêuticas com base na interferência de RNA. O desenvolvimento de sistemas de liberação clinicamente adequados, seguros e efetivos é um dos maiores desafios em proporcionar o uso clínico dos siRNAs para o tratamento de doenças severas e crônicas, uma vez que obstáculos na administração e distribuição *in vivo* comprometem seu uso. A terapia gênica de RNAi possui algumas limitações como: i) baixa taxa de transfecção celular, ii) rápida degradação por enzimas endógenas resultando em um curto tempo meia-vida, iii) carga negativa que impede atravessar as membranas celulares, iv) biodisponibilidade insuficiente (TOKATLIAN; SEGURA, 2010; NIMESH; CHANDRA, 2009; REISCHL; ZIMMER, 2009; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009).

Os siRNAs apresentam uma elevada densidade de carga negativa, o que possibilita sua associação através de interações eletrostáticas à polímeros, lipídeos, proteínas ou peptídeos catiônicos, os quais constituem as principais classes de vetores do tipo não virais para a veiculação de siRNA. Estes tipos de vetores mostram-se bastante promissores devido sua segurança, possibilidade de direcionamento para diferentes alvos celulares através de modificações estruturais pela incorporação de ligantes, fácil síntese e baixa resposta imunitária do organismo quando comparados aos vetores virais (ZHANG *et al.*, 2007; REISCHL; ZIMMER, 2009)

O adjuvante catiônico ideal para veiculação de siRNA deve ser capaz de: i) ultrapassar as barreiras inerentes de cada via de administração como, por exemplo, o estrato córneo da pele (EC), principal barreira para penetração de fármacos aplicados topicamente (CEVC; VIERL, 2010); ii) ligar-se às moléculas de siRNA promovendo proteção contra degradação enzimática; iii) liberar o siRNA nas células alvo; iv) facilitar o *uptake* celular e superar a incapacidade das moléculas de siRNA difundirem passivamente pelas membranas celulares devido a repulsão eletrostática ocasionada pelo residual de carga negativa do siRNA e das membranas; v) promover o escape endossomal liberando o conteúdo do endossomo no citoplasma celular antes que ocorra a metabolização do siRNA pela ação dos lisossomos; vi)

não provocar uma resposta imune no organismo; vii) desligar-se das moléculas de siRNA e permitir que ocorra um eficiente silenciamento gênico (ZHANG; MCINTOSH; GRINSTAFF, 2012; REISCHL; ZIMMER, 2009).

Poliplexos é a denominação utilizada para se referir a complexos formados entre polímeros catiônicos e ácidos nucleicos e apresentam uma alta eficiência de transfecção (REISCHL; ZIMMER, 2009). Um polímero que tem sido amplamente utilizado é a polietilenoimina (PEI) (**Figura 2**). PEIs são polímeros solúveis em água com uma alta densidade de carga catiônica em pH fisiológico devido aos grupamentos amino protonáveis em cada terceira posição. Neste pH, aproximadamente 20% dos nitrogênios presentes na estrutura molecular do PEI estão protonados, o que permite ao PEI formar complexos com ácidos nucleicos por ligações do tipo não covalentes (GÜNTHER *et al.*, 2011).

Figura 2: Estrutura molecular do polímero catiônico PEI. Adaptado de MARTIMPREY *et al.*, 2009.

Este polímero sintético de alta densidade de carga catiônica está disponível em uma gama de pesos moleculares e nas formas lineares e ramificadas, sendo que as formas ramificadas e de baixo peso (25 kDa) são as mais indicadas para uma efetiva liberação intracelular. Estudos comparativos entre nanopartículas preparadas com PEI de baixo peso molecular (25 kDa) ramificado e linear mostraram que o uso do PEI na forma ramificada é mais adequada pois permitiu a obtenção de nanopartículas estáveis e carregadas positivamente após complexação com siRNA, eficiente captação celular e maior atividade no silenciamento de genes (KWOK; HART, 2011). Além disso, PEI de baixo peso molecular apresenta sua toxicidade reduzida e também, ao complexar com o siRNA, confere proteção contra a degradação enzimática (GRAYSON; DOODY; PUTNAM, 2006).

Os complexos formados entre os siRNAs e este polímero apresentam uma carga residual positiva, o que permite sua interação com as membranas celulares de carga negativa, seguido por internalização por endocitose. A endocitose é um dos principais mecanismos de captação de substâncias pelas células e a liberação das substâncias internalizadas através de endossomos para o citosol é uma etapa

limitante para a realização de um tratamento eficaz quando essas substâncias captadas são fármacos (VARKOUHI *et al.*, 2011).

A liberação dos complexos siRNA/PEI ocorre no citoplasma após sofrerem o escape endossomal pelo mecanismo conhecido como “efeito esponja de prótons” (**Figura 3**). Esse mecanismo é mediado por agentes com alta capacidade de tamponamento e flexibilidade para inchar quando protonado. A protonação induz um intenso influxo de íons e água para o interior do endossomo ocasionando a ruptura da membrana endossomal e liberação do conteúdo internalizado. Polímeros como o PEI, possuem uma alta capacidade tamponante em uma ampla faixa de pHs devido a presença de grupamentos amina protonáveis com diferentes valores de constante de dissociação (pK_a) em sua estrutura, que resulta em um influxo que prótons, íons cloreto e água dentro do endossomo, o qual incha e se rompe devido a um aumento da pressão osmótica (BARRATT; FATTAL, 2009; TSENG; MOZUMDAR; HUANG, 2009; VARKOUHI *et al.*, 2011).

Figura 3: Esquemática do mecanismo de escape endossomal de *políplexos*, conhecido como “efeito esponja de prótons”. Adaptado de: HUANG; LIU, 2011.

Também encontramos complexos entre siRNAs e lipídeos catiônicos que são denominados *Lipoplexos*. Um exemplo de lipídeo catiônico bastante utilizado para liberação de ácidos nucleicos é o 1,2 Dioleoil-3-propionato de trimetilamônio (DOTAP), um lipídeo moncatiônico que apresenta uma cadeia dioleil, que forma *lipoplexos* espontaneamente como resultado de interações eletrostáticas entre os grupos fosfato de carga negativa dos siRNAs com as cargas positivas destes lipídeos (KIM *et al.*, 2004). Outro exemplo é a oleilamina (OAM) (**Figura 4**), um lipídeo moncatiônico contendo uma cadeia monoleil, que em pH fisiológico

encontra-se totalmente ionizada conferindo um residual positivo ao sistema, que é de grande interesse para sistemas de liberação de siRNAs (MARTINI *et al.*, 2008).

Figura 4: Estrutura molecular do lipídeo catiônico OAM. Fonte: MARTINI *et al.*, 2008.

Estudos recentes sugerem que o *uptake* celular de complexos de siRNA com lipídeos catiônicos ocorre principalmente via endocitose. Uma pequena fração desses lipoplexos pode entrar na célula por outra via ou por fusão com as membranas celulares num processo dependente de colesterol e pode ser responsável pela maioria da degradação do RNAi (BRUNO, 2011).

A liberação dos complexos siRNA/adjuvante catiônico ocorre após o escape endossomal através da interação das moléculas catiônicas com a membrana aniônica do endossomo, promovendo sua desestabilização e excluindo água da superfície da membrana, que resulta em seu rompimento. O *lipoplexo* escapa do endossomo rompido e libera o siRNA no citoplasma celular (**Figura 5**) (HUANG; LIU, 2011).

Figura 5: Esquemática do mecanismo de escape endossomal de *lipoplexos*. Adaptado de: HUANG; LIU, 2011.

O tamanho médio das nanopartículas formadas pela interação entre o siRNA com os substratos catiônicos é de grande importância para sua absorção celular. O tamanho de partícula adequado depende do seu campo de aplicação, por exemplo, para alcançar tumores, o menor diâmetro possível é desejado. Em geral, as

partículas com diâmetro médio entre 200 e 500 nm podem ser captadas pelas células alvo por endocitose. Por isso, partículas nessa faixa de tamanho são requeridas no desenvolvimento dos sistemas de liberação para veiculação de siRNA (REISCHL; ZIMMER, 2009).

Além do adequado tamanho de partícula, estratégias que garantam proteção, eficiência de transporte através das membranas celulares, eficiente captação celular, fácil manipulação, estabilidade, segurança, baixos custos, eficiente escape endossomal e biodegradabilidade são requeridas para a viabilização dessa promissora classe terapêutica (JONES, 2009).

1.3. Cristais-líquidos

Atualmente, a obtenção de sistemas de liberação de estrutura controlável e em escala nanométrica é de grande importância para uma ampla gama de aplicações. Estas nanoestruturas são importantes ferramentas na construção de novos compostos e como matrizes semelhantes aos sistemas biológicos promovendo uma liberação funcional e eficaz de alimentos e biomoléculas ativas (YAGHMUR; GLATTER, 2009).

Nas últimas duas décadas, sistemas líquido-cristalinos têm atraído grande atenção devido às suas aplicações em diversas áreas. O grande interesse nesses sistemas está na possibilidade de criar partículas estruturadas mediante o uso de métodos instantâneos e modular as forças formadas através de estímulos fisiológicos como pH, temperatura e força iônica (KRAINEVA *et al.*, 2005).

Estes sistemas apresentam características interessantes para um sistema de liberação tópico, tais como estrutura de camada lipídica e forma de gel, capacidade de controlar a liberação de fármacos incorporados e a possibilidade de incorporar promotores de absorção cutânea na formulação (SHAH; SADHALA; CHILUKURI, 2001; LEE; KELLAWAY, 2000b; LOPES *et al.*, 2006).

Lipídeos polares e certos tensoativos são capazes de formar cristais líquidos liotrópicos (LLC) que podem ser definidos como o estado da matéria intermediário entre o estado sólido cristalino e líquido isotrópico. A diferença entre líquidos e cristais sólidos é o estado de ordem: os cristais apresentam ordem posicional e orientacional, enquanto que nos líquidos as moléculas difundem-se livremente. Os cristais líquidos combinam a organização do estado sólido com a fluidez e

mobilidade molecular do estado líquido. Podem ser obtidos por diversos tipos de moléculas que se auto-agregam em um ambiente hidrofílico (SINGH, 2000).

Sistemas líquido-cristalinos são caracterizados por alta ordenação interna e simetria com ampla área interfacial e também apresentam a capacidade de incorporar moléculas hidrofílicas, lipofílicas e anfifílicas e modular a liberação destas substâncias. As fases mais comumente encontradas são: lamelar, hexagonal e cúbica (**Figura 6**) (MISHRAKI *et al.*, 2010). A maioria das mesofases liotrópicas existe como pares simétricos, um “normal” (tipo I) que trata-se de um sistema onde encontramos lipídeos agregados em uma matriz contínua de água, e um “invertido” (tipo II) que trata-se de um sistema onde os grupos hidrofílicos hidratados encontram-se dispostos dentro de uma matriz apolar contínua composta pelas cadeias de hidrocarbonetos (LIBSTER; ASERIN; GARTI, 2011).

Figura 6: Representação esquemática das diversas fases líquido-cristalinas formadas pela monoleína em presença de água. Adaptado de: SEDDON, 2010.

A fase lamelar caracteriza-se por intercalar bicamadas lipídicas com a fase aquosa, nas quais os grupamentos polares das moléculas localizam-se adjacentes e projetados para a fase aquosa, enquanto as caudas hidrocarbonadas encontram-se dispostas paralelamente formando uma rede unidimensional. Essa fase é caracterizada por sua fluidez e anisotropia na forma de mosaico planar e/ou cruzeiros malteses (TYLE, 1989).

A fase hexagonal é formada por longas estruturas cilíndricas, ocorrendo em duas formas: (i) a fase reversa, formada por canais aquosos circundados pelas cabeças polares do tensoativo, com a porção apolar localizada ao redor dos cilindros; e (ii) a fase normal, onde as cabeças polares do tensoativo localizam-se na

região externa dos cilindros. Sua obtenção torna-se possível pela adição de compostos apolares ao sistema, como por exemplo, o AO. O gel de fase hexagonal apresenta-se anisotrópico ao campo de luz polarizada, com textura estriada não geométrica ou em formato de placas; sua menor viscosidade em relação à fase cúbica é uma importante propriedade que facilita suas aplicações práticas (LIBSTER *et al.*, 2009; BORNÉ; NYLAMDER; KHAN, 2001; NORLING *et al.*, 1992).

A estrutura da mesofase cúbica é formada por uma bicamada lipídica curva e contínua (com uma espessura de aproximadamente 3,5 nm) que se estende em três dimensões, separando dois canais congruentes de água de aproximadamente 5 nm quando hidratado. O gel de fase cúbica apresenta-se transparente, bastante viscoso, isotrópico e termodinamicamente estável na presença de excesso de água (GUO *et al.*, 2010).

O monoleato de glicerina, também conhecido como monoleína (MO) (**Figura 7**), é um lipídeo polar biodegradável com capacidade de formar vários tipos de fases líquido-cristalinas em presença de água, sendo considerado um sistema bastante promissor para diversas aplicações, incluindo veículos farmacêuticos, sistemas de alimentação e meios de reação química (LIBSTER *et al.*, 2007).

Figura 7: Estrutura molecular da MO. Fonte: FONG; HANLEY; BOYD, 2009.

A formação das diferentes fases líquido-cristalinas ocorre com a hidratação das porções hidrofílicas da MO por um solvente hidrofílico, como a água, através de ligações de hidrogênio, enquanto as cadeias alifáticas se agregam com base em interações de van der Waals. Além da dependência dos constituintes na determinação da estrutura líquido-cristalina, LLC também são sensíveis a parâmetros externos como temperatura, pressão (LIBSTER; ASERIN; GARTI, 2011) e aditivos (ROSSETTI *et al.*, 2011).

A geometria molecular da anfifila possui um importante papel na determinação do tipo da mesofase líquido-cristalina que será formada. Dessa maneira, a teoria do fator de empacotamento (FE) pode ser utilizada para prever a geometria molecular do sistema anfifila/água, sendo que:

$$FE = \frac{v}{a_v \cdot l}$$

Onde v é o volume da cadeia hidrofóbica, a_v é a área do domínio polar da anfifila e l é o comprimento da anfifila. Dependendo do valor do fator de empacotamento, diferentes mesofases líquido-cristalinas podem ser obtidas decorrentes da auto-organização das moléculas da anfifila no ambiente hidrofílico, como mostra a **Figura 8** (FONG; LE; DRUMMOND, 2012; GUO *et al.*, 2010).

Figura 8: Diagrama esquemático dos diferentes tipos de fase líquido-cristalina que podem ser obtidas em termos do fator de empacotamento. Adaptado de: FONG; LE; DRUMMOND, 2012; GUO *et al.*, 2010.

Quando o valor do fator de empacotamento é menor que 1, a anfifila se auto-organiza de modo a formar estruturas como micelas normais e fase hexagonal normal. Quando FE é igual a 1, ocorre a formação de fase lamelar, e quando é maior que 1, há o rearranjo da anfifila, formado fase cúbica reversa, fase hexagonal reversa e micelas reversas (FONG; LE; DRUMMOND, 2012; GUO *et al.*, 2010).

A literatura relata diversos fatores que podem influenciar o comportamento das mesofases cúbica e hexagonal. A adição de um terceiro componente ao sistema anfifila/água como o AO, trioleína, monoleato de diglicerol, vitamina E, dentre outros, pode modular a textura das mesofases líquido-cristalinas e resultar em transição de fase. Variações de temperatura e pressão, concentração de sais e pH também podem induzir a transição de fase nos sistemas líquido-cristalinos (PHAN *et al.*, 2011; GUO *et al.*, 2010; FONG; HANLEY; BOYD, 2009; FERREIRA *et al.*, 2006).

Devido à capacidade de absorverem água, as mesofases líquido-cristalinas podem ser dispersas em equilíbrio com excesso de água e formar uma dispersão coloidal. A dispersão dos géis de fase cúbica e de fase hexagonal em água formam pequenas partículas denominadas de “cubossomos” e de “hexossomos”, respectivamente. As dispersões formadas incluem vantagens como grande área superficial, estabilidade termodinâmica, possibilidade de serem incorporadas por outras formulações, não causam irritação na pele após sua aplicação e os lipídeos formadores destas estruturas são de baixo custo (SIEKMANN *et al.*, 2002; LOPES *et al.*, 2006; LOPES *et al.*, 2007; GUO *et al.*, 2010). Além de serem capazes de promover uma liberação sustentada de fármacos, os sistemas líquido-cristalinos dispersos também apresentam a vantagem de ser pouco viscosos (AMAR-YULI *et al.*, 2007). São atóxicos, biodegradáveis e apresentam propriedades bioadesivas que contribuem para sua aplicação como sistema de liberação de bioativos, desde fármacos de baixo peso molecular a proteínas, peptídeos e ácidos nucleicos (LOPES *et al.*, 2007; GUO *et al.*, 2010).

Cristais líquidos formados por monoleína mostraram-se eficientes na incorporação e liberação cutânea de fármacos macromoleculares (LOPES *et al.*, 2006a; LOPES *et al.*, 2006b), podendo ser também promissores para o carreamento de siRNA na pele.

1.4. Via de administração tópica para siRNAs

A pele é uma atrativa e importante via para a liberação de fármacos, uma vez que permite uma aplicação terapêutica não invasiva e em uma ampla região corpórea. Além da possibilidade do seu direcionamento para as doenças cutâneas (administração tópica), também se pode obter o efeito sistêmico (administração transdérmica), combinando a comodidade do paciente, a ausência do metabolismo

hepático e a redução dos possíveis efeitos colaterais da administração sistêmica (PRAUZNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004).

Desordens relacionadas à pele, tais como a psoríase e a dermatite atópica, são de grande interesse de estudo para a terapia com siRNA. A administração tópica de siRNA para o tratamento dessas doenças seria bastante interessante devido ao fácil acesso a esse órgão e a possibilidade de direcionar o siRNA para o local de ação, reduzindo possíveis problemas relacionados com a sua biodisponibilidade (GEUSENS *et al.*, 2009; KIGASAWA *et al.*, 2010).

Para o estabelecimento de uma terapia eficaz utilizando siRNAs via administração tópica, primeiramente, dependemos da liberação eficiente do siRNA nas células alvo. No entanto, atingir esses alvos constitui um grande obstáculo para viabilização dessa terapêutica, pois a pele apresenta uma forte barreira exercida pelo EC, que dificulta a penetração de substâncias administradas topicamente, e, os siRNAs, por serem macromoléculas hidrofílicas, não conseguem atravessar a pele por difusão passiva. Para superar essa propriedade, sistemas de liberação devem modular essa função e facilitar o transporte de fármacos e macromoléculas na pele (DE FOUGEROLLES, 2008; GEUSENS *et al.*, 2011).

Assim, as características principais desses sistemas seriam: i) sistemas nanoestruturados que viabilizem a liberação de siRNA nas camadas viáveis da pele; ii) componentes que atuem como promotores de absorção cutânea; iii) componentes que complexem o siRNA por atração eletrostática na dose terapêutica.

Dessa forma, a presente pesquisa propôs o desenvolvimento de sistemas de liberação tópica a base de nanodispersões de cristais líquidos para a liberação na pele de siRNAs, como uma nova proposta para a terapia gênica de doenças cutâneas.

2. Objetivos

A presente pesquisa visou o desenvolvimento farmacotécnico de nanodispersões de cristais-líquidos como sistemas de liberação tópica para siRNA na terapia gênica.

2.1 Objetivos específicos:

2.1.1. Obtenção das nanodispersões líquido-cristalinas

2.1.2. Caracterização dos sistemas obtidos:

2.1.2.1. Microscopia de luz polarizada;

2.1.2.2. Tamanho e distribuição de tamanho das partículas por espalhamento dinâmico da luz;

2.1.2.3. Medida da carga superficial e mobilidade eletroforética das partículas na nanodispersão;

2.1.2.4. Análise turbidimétrica;

2.1.2.5. Difração de raios X

2.1.3. Determinação da eficiência de complexação do siRNA pelas nanodispersões líquido-cristalinas

2.1.4. Estudos de citotoxicidade

2.1.5. Avaliação da penetração cutânea *in vitro* das nanodispersões por microscopia de fluorescência

3. Material e Métodos

3.1. Material

3.1.1. Solventes, reagentes e matérias-primas:

- Monoleína (*Myverol 18-99[®]*) - *Quest International, Inc.*
- Ácido oléico - *Sigma Aldrich Co.*
- Polietilenoimina - *Sigma Aldrich Co.*
- Oleilamina - *Sigma Aldrich Co.*
- Poloxamer 407 - *Sigma Aldrich Co.*
- siRNA controle - *Silencer Negative Control #1 siRNA (#AM4635) Ambion (Austin, TX, USA) - Applied Biosystems*
- siRNA-FAM - *Silencer 6-carboxyfluorescein (FAM) GAPDH siRNA (#AM4650) Ambion (Austin, TX, USA) - Applied Biosystems*
- Dietilpirocarbonato - *Sigma Aldrich Co.*
- Tris (hidroximetil) aminometano – *Merck KGaA*
- Meio de cultura DMEM - Dulbecco's Modified Eagle Medium - *Gibco[®]*
- UltraPure[™] Agarose – *Invitrogen*
- Soro bovino fetal - *Gibco[®]*
- Tripsina-EDTA - *Sigma Aldrich Co.*
- [brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] - *Sigma Aldrich Co.*
- Solução de antibiótico e antimicótico composto por 10.000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B por mL - *Sigma Aldrich Co.*
- Tissue-Tec[®] OCT[™] Compound - *Sakura*
- Brometo de etídio - *Sigma Aldrich Co.*
- Cloreto de sódio - *Sigma Aldrich Co.*
- Fosfato de sódio monobásico - *Vetec*
- Fosfato de sódio dibásico hidratado - *Vetec*
- Água obtida por osmose reversa
- Água ultra pura obtida pelo sistema Milli-Q

3.1.2. Equipamentos e acessórios:

- Espectrofotômetros UV-Visível Hitachi (modelo U-300) e FEMTO 800 XI
- Célula de difusão Franz modificada *in vitro* vertical de marca LGA (modelo LG-1084)

- Equipamento de espalhamento dinâmico da luz marca Malvern Instruments (modelo Zetasizer Nano system ZS)
- Microscópio ótico (modelo AxioPlan 2 Image, Carl Zeiss) equipado com filtro polarizador e acoplado à câmara digital Axiocan HRc (Carl Zeiss AG, Alemanha)
- Microscópio de fluorescência (modelo Axio Imager.A1, Carl Zeiss) com software analisador de imagem (modelo AxioVision, Carl Zeiss)
- Ultrassom de haste (modelo MICROSON-XL-2000 ultrasonic cell disruptor Misonix, USA)
- Criostato (Leica CM1850)
- Nanostar (Bruker)
- Balança Analítica – Acculab – 110g
- Agitador mecânico tipo mixer – Ika
- Medidor de pH (Digimed)
- Dermatômetro Nuvag AG

3.2. Métodos

3.2.1. Obtenção das nanodispersões líquido-cristalinas:

Para a preparação das nanodispersões compostas por MO:AO:FA, foram empregados os métodos propostos por [Gustafsson *et al.* (1996, 1997) e Lopes *et al.* 2006a]. Resumidamente, a MO foi aquecida em banho termostatizado até a temperatura de fusão (42°C) e em seguida misturada ao AO. Após a homogeneização da mistura, foi adicionada a fase aquosa (FA) (tampão Tris-HCl 0,1M, pH 6,5 contendo 1,5% (m/m) de poloxamer). A fase aquosa dos sistemas foi preparada com água livre de RNase (água com dietilpirocarbonato – água DEPC).

Foram preparados sistemas compostos apenas por MO:FA (10:90, p/p) e sistemas compostos por MO:AO:FA (8:2:90, p/p). A esses sistemas foram adicionados o lipídeo catiônico OAM ou o polímero catiônico PEI nas concentrações de 0,2, 0,4, 0,6, 0,8, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 e 5,0%. Estes adjuvantes catiônicos foram adicionados às fases lipídicas dos sistemas, homogeneizados por 2 minutos e, em seguida, foi adicionada a FA. Os sistemas foram deixados em repouso por 24 horas após o preparo e acondicionados ao abrigo da luz. Após esse período, foram agitados em agitador do tipo “vórtex” por 2 minutos e então

sonicados sob-banho de gelo em sonificador de haste, potência 9 Watts, por 2 minutos.

O siRNA foi adicionado cuidadosamente sobre as nanodispersões na concentração final de 2,5 μM e foram avaliadas 30 minutos após a mistura.

3.2.2. Caracterização dos sistemas obtidos:

3.2.2.1. Análise por microscopia de luz polarizada

A identificação das diferentes fases líquido-cristalinas, antes de sua dispersão em excesso de água, foi realizada em microscópio óptico modelo Axioplan 2 (Carl Zeiss AG, Alemanha) equipado com filtro polarizador e acoplado à câmara digital Axiocan HRc (Carl Zeiss AG, Alemanha) com sistema de vídeo e aquisição automática de imagem. As análises foram realizadas após percorrido o tempo necessário para equilíbrio dos sistemas (24 horas).

3.2.2.2. Análise do tamanho e polidispersividade das partículas nas nanodispersões

Foi utilizada a técnica de espalhamento dinâmico da luz (*Light Scattering*) para a análise de tamanho e distribuição de tamanho das partículas. As nanodispersões foram diluídas em água Milli Q (100x) e submetidas às análises no equipamento Zetasizer Nano system ZS (Malvern Instruments). As amostras foram colocadas em celas de quartzo de 1 cm de caminho óptico e as medições foram feitas em temperatura ambiente (25°C). O equipamento possui um laser de HeNe de 4 mW operando num comprimento de onda de 633 nm e realiza as medições não invasivas por “*backscatter optics*”. As medições foram feitas num ângulo de detecção de 173° e a posição da medição da cubeta é automaticamente determinada pelo software do equipamento. O equipamento realiza em média 12 determinações para cada análise.

3.2.2.3. Medida da carga superficial e mobilidade eletroforética das partículas na nanodispersão

A carga superficial das nanodispersões foi medida como potencial zeta, o qual é determinado pela mobilidade eletroforética das partículas/gotículas dispersas submetidas a um campo elétrico. As análises de potencial zeta auxiliam na determinação das cargas envolvidas na interação de siRNAs com os lipídeos e

polímeros utilizados no preparo das nanodispersões e foram realizadas pelo equipamento Zetasizer Nano system ZS (Malvern Instruments).

3.2.2.4. Análise turbidimétrica

A turbidez das amostras foi determinada a 25°C como medida de absorbância aparente a 410 nm em espectrofotômetro (FentoScan, Brasil). Todas as amostras dispersas foram diluídas em solução tampão (Tris-HCl 0,1M, pH=6,5 contendo 1,5% poloxamer), sendo feita uma diluição de 20 vezes para as nanodispersões do sistema MO:FA e de 100 vezes para as nanodispersões do sistema MO:AO:FA, e analisadas por 120 horas. As amostras diluídas foram acondicionadas e armazenadas na própria cubeta para prevenir perturbações dos sistemas durante a leitura.

Mudanças na turbidez em função do tempo foram utilizadas como medida relativa de estabilidade, a qual foi calculada com a **Equação 1**:

$$\Delta \text{Turbidez} = \frac{(\text{Turb}_{120h} - \text{Turb}_{0h})}{\text{Turb}_{0h}} \times 100$$

Para interpretação dos resultados, é importante compreender que um aumento na turbidez indica ocorrência de agregação seguida de formação de partículas maiores. Por outro lado, uma redução na turbidez representa precipitação das partículas dispersas com consequente separação de fases (BERGSTRAND *et al.*, 2003).

3.2.2.5. Análise por difração de raios X a baixo ângulo

A difração de raios X é uma técnica na qual raios X são usados para determinar distâncias repetitivas dentro de materiais. Tanto materiais cristalinos sólidos quanto cristais líquidos, podem ser caracterizados através da difração de raios X (DONG; BOYD, 2011).

A estrutura líquido-cristalina das nanodispersões obtidas foi analisada por medidas de espalhamento de raios X a baixos ângulos (SAXS), realizadas no Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física-USP com a colaboração da Prof.^a Dr.^a Márcia Carvalho de Abreu Fantini, utilizando o equipamento Nanostar (Bruker). As nanodispersões foram colocadas em capilares de vidro cilíndrico com diâmetro interno de 1,5 mm. A curva de espalhamento de um capilar vazio foi usada como

branco e foi removido da intensidade das amostras, após a correção da transmissão. O tubo de raios X foi operado a 40 kV e 30 mA, gerando radiação Cu K α , $\lambda = 0,1540$ nm, monocromatizados por espelhos Göbel. O tempo de aquisição de cada curva de espalhamento foi de 3 horas e um detector de filamentos bidimensional foi utilizado. Com o software do equipamento a curva foi integrada, a fim de gerar um arquivo de intensidade em função de 2θ , o ângulo de espalhamento, ou q , o vetor de espalhamento ($q = (4\pi \sin \theta)/\lambda$). A distância amostra-detector foi de 650 mm, o que proporcionou um q na faixa de $0,13 \text{ nm}^{-1}$ a $3,13 \text{ nm}^{-1}$. As estruturas líquido-cristalinas foram determinadas através do cálculo dos valores das distâncias interplanares, d , a partir lei de Bragg ($\lambda = 2d \sin \theta$), e essas distâncias foram associadas aos índices de Miller da simetria da estrutura (**Tabela 1**) (DONG; BOYD, 2011).

Tabela 1: Indexação das estruturas de fase cúbica e hexagonal de acordo com os índices de Miller (LINDBLOM; RILFORS, 1989).

Estrutura	Grupo espacial	Índices de Miller (hkl)
Fase hexagonal (H_{II})	—	$\sqrt{3}$: $\sqrt{4}$: $\sqrt{7}$
Fase cúbica		
- Giróide (G)	$Ia3d$	$\sqrt{3}$: $\sqrt{4}$: $\sqrt{7}$: $\sqrt{8}$: $\sqrt{10}$: $\sqrt{11}$: $\sqrt{12}$: $\sqrt{13}$
- Diamante (D)	$Pn3m$	$\sqrt{2}$: $\sqrt{3}$: $\sqrt{4}$: $\sqrt{6}$: $\sqrt{8}$: $\sqrt{9}$: $\sqrt{10}$: $\sqrt{11}$
	$Pm3n$	$\sqrt{2}$: $\sqrt{4}$: $\sqrt{5}$: $\sqrt{6}$: $\sqrt{8}$: $\sqrt{9}$: $\sqrt{10}$: $\sqrt{11}$
- Primitiva (P)	$Im3m$	$\sqrt{2}$: $\sqrt{4}$: $\sqrt{6}$: $\sqrt{8}$: $\sqrt{10}$: $\sqrt{12}$: $\sqrt{14}$

3.2.3. Eficiência de complexação

3.2.3.1. Preparo do gel de agarose 2%

Para o estudo da eficiência de complexação do siRNA pelas nanodispersões desenvolvidas, foi realizada a eletroforese em gel de agarose 2% (TRAN *et al.*, 2008). O gel foi preparado usando 2,4 g de agarose, 120 mL de tampão Tris-Acetato-EDTA pH=8,0 (TAE) e brometo de etídeo (10 mg/mL). A agarose foi adicionada ao tampão TAE e aquecida em micro-ondas por aproximadamente 2 minutos para promover sua solubilização. Após o resfriamento da solução de agarose, foi adicionado o brometo de etídeo (10 μ L). O gel foi vertido na placa de corrida e esperou-se total resfriamento do gel para sua polimerização. O tampão TAE também foi utilizado na corrida das amostras.

3.2.3.2. Preparo das amostras

As amostras foram preparadas pela mistura de 40 µL das nanodispersões contendo siRNA ou 40 µL dos controles utilizados (siRNA em água DEPC e as nanodispersões sem siRNA) com 10 µL de *loading buffer* [utilizado para conferir densidade a amostra aplicada, composto por: azul de bromofenol (0,25 %, p/v), xileno cianol FF (0,25 %, p/v), orange G (0,25 %, p/v), Tris-HCl pH 7,5 (10 mmol/L), EDTA (10 mmol/L) e sacarose (0,65 %, p/v)]. Dessa mistura, aplicaram-se cuidadosamente 40 µL em cada poço do gel.

As corridas eletroforéticas foram processadas em cuba horizontal contendo tampão TAE, sob uma voltagem de 100 V, durante 20 minutos. Os géis foram corados com brometo de etídeo e as bandas visualizadas sob luz ultravioleta. Para obtenção das imagens utilizou-se o software Quantity One.

3.2.4. Estudos de citotoxicidade

3.2.4.1. Linhagem celular e cultivo

As células de fibroblastos de camundongos da linhagem L929 foram cultivadas em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), suplementado com 1% (v/v) de solução de antibiótico e antimicótico composto por 10.000 unidades de penicilina, 10 mg de estreptomicina e 25 µg de anfotericina B por mL e 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado (meio de cultura completo). Foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂. As células foram subcultivadas a cada 5-7 dias usando solução salina 0,9% com 1% (v/v) de solução de antibiótico e antimicótico para lavá-las e tripsina 5% (g/v) para desagregá-las do frasco. Após a desagregação, as células foram centrifugadas a 129 g por 10 minutos a 4°C, ressuspendidas em meio de cultura completo e contadas usando a câmara de Neubauer.

3.2.4.2. Avaliação da citotoxicidade

As células obtidas, como descrito anteriormente, foram inoculadas em placas de 96 poços a uma densidade de $0,5 \times 10^5$ células/poço usando-se o meio de cultura completo para o ensaio de toxicidade celular.

Todas as nanodispersões obtidas foram diluídas 50 vezes em PBS. 20 µL de cada diluição foram usados no ensaio do MTT ([brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]).

Após 24 horas que as células foram plaqueadas, o meio de cultura foi retirado e adicionou-se meio de cultura incompleto (meio de cultura DMEM sem o soro bovino fetal inativado) e as nanodispersões diluídas em PBS. As células expostas às nanodispersões foram re-incubadas por 24 horas a 37°C com 5% CO₂. Após as 24 horas, o meio de cultura incompleto foi retirado e as células foram lavadas duas vezes com solução salina 0,9% com 1% (v/v) de solução de antibiótico e antimicótico. Após esse procedimento, foram adicionados meio de cultura incompleto e 10 µL do reagente MTT (5 mg/mL em tampão fosfato) em cada poço da placa que foi incubada por 4 horas a 37°C. O sal amarelo tetrazólico foi metabolizado pelas células viáveis e transformado em cristais púrpuras de formazan. Esses cristais foram solubilizados por dimetilsulfóxido e tampão glicina 0,2 M, pH=10,2 e quantificados por espectrofotometria em leitor de placa de Elisa (µQuant, Biotek Instruments Inc.), a 570 nm. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem de células viáveis em relação ao grupo controle, cujas células não tiveram nenhum tratamento com formulação.

3.2.5. Avaliação de penetração cutânea *in vitro* das nanodispersões por microscopia de fluorescência

Este experimento foi conduzido utilizando as nanodispersões desenvolvidas mais adequadas para o carregamento de siRNA na concentração final de 10 µM.

Como a liberação de siRNAs na pele ainda não foi demonstrada, foi investigada a penetração nas camadas da pele mediante o uso de siRNA marcado com carboxifluoresceína (FAM) (siRNA-FAM) com excitação e emissão a 492/517 nm, respectivamente. Este marcador é comumente usado para monitorar a eficiência de liberação durante a otimização das condições experimentais, permitindo observar a internalização celular, distribuição e localização de siRNAs no tecido alvo.

A penetração de siRNA na pele foi avaliada *in vitro* usando como modelo de membrana biológica a pele de orelha de suínos. As orelhas foram dissecadas com auxílio de bisturi, dermatomizadas (~ 500 µm) para padronizar a espessura das mesmas, reduzindo assim as variações entre as peles utilizadas e montadas em células de difusão de Franz (Hanson Instruments, EUA) com área de difusão de 1,77 cm² (LOPES et al., 2006a). O compartimento receptor foi preenchido com tampão fosfato (100 mM, pH 7,4) e mantido a 37°C sob constante agitação (300 rpm). As

nanodispersões contendo siRNA-FAM a 10 μ M, assim como os controles (nanodispersões sem siRNA-FAM, solução salina, solução salina contendo siRNA-FAM, PEI a 1,0% em FA, PEI a 1,0% em FA contendo siRNA-FAM, OAM a 2,5% em FA, OAM a 2,5% em FA contendo siRNA-FAM) foram aplicados no compartimento doador. Após intervalos de tempo de 4, 8 e 12 horas, as peles foram retiradas das células de difusão, lavadas cuidadosamente, congeladas em matriz O.C.T. (Tissue Tek®) e seccionadas transversalmente em criostato. Foram obtidos cortes histológicos de 10 μ m de espessura, montados em lâminas extra-brancas gelatinizadas e sem nenhuma coloração adicional.

As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência (modelo Axio Imager.A1, Carl Zeiss AG, Alemanha) acoplado a uma câmara fotográfica com software analisador de imagem (modelo AxioVision, Carl Zeiss), utilizando a objetiva de 20 vezes e o filtro FS46 com excitação em 500 ± 20 nm e emissão em 535 ± 30 nm, adequado para o FAM.

4. Resultados e Discussões

4.1. Obtenção e caracterização das nanodispersões líquido-cristalinas

Misturas de água com MO, um lipídeo polar biocompatível, podem formar micelas reversas e três diferentes tipos de fases líquido-cristalinas (lamelar, hexagonal reversa e cúbica) dependendo da temperatura e da quantidade de água utilizadas no preparo dos sistemas (SHAH; SADHALA; CHILUKURI, 2001).

A fase cúbica formada por MO e água, atinge sua hidratação máxima a 40% de água (LARA; BENTLEY; COLLETT, 2005). Acima desta concentração, ocorre formação de fase cúbica estável na presença de excesso de água como mostra a **Figura 9**.

Figura 9: Diagrama de fases binário monoleína/água com conteúdo de água variando entre 5 e 40% (p/p) e observado entre 20 e 90°C com aquecimento de 1°C/min. Adaptado de: LARA; BENTLEY; COLLETT, 2005.

Para obtenção de sistemas formados por MO:FA, o sistema de interesse é aquele formado por um gel isotrópico ao campo de luz polarizada e em equilíbrio com excesso de FA. O sistema de fase cúbica escolhido foi com a maior proporção de fase aquosa, a qual facilita o processo de dispersão por sonicação utilizado para a obtenção das nanodispersões. A composição desse sistema foi de 10:90 em proporção de MO e FA.

Aditivos podem ser incorporados aos cristais líquidos com o objetivo de alterar a autoagregação dos lipídeos e, conseqüentemente, controlar a estrutura das fases líquido-cristalinas. Essas mudanças podem se manifestar como variações no parâmetro de rede da estrutura ou mudança de fase. Com a adição de substâncias lipofílicas como a vitamina E e o AO, a transição de fase cúbica para hexagonal, tem sido observada em temperatura ambiente (FERREIRA *et al.*, 2006; PHAN *et al.*,

2011). Dessa forma, o AO foi adicionado ao sistema composto por MO:FA para a obtenção de fase hexagonal em temperatura ambiente e fisiológica (37 °C).

Para obtenção de sistemas de fase hexagonal compostos por MO:AO:FA, o sistema de interesse é aquele formado por um gel anisotrópico ao campo de luz polarizada em equilíbrio com excesso de água. A composição desse sistema foi de 8:2:90 em proporção de MO, AO e FA.

A fase aquosa utilizada em ambos os sistemas é composta por tampão Tris-HCl 0,1M, pH=6,5 com 1,5% de poloxamer. A adição desse copolímero anfifílico é necessária para promover a estabilização estérica das nanopartículas após a dispersão dos sistemas (GUSTAFSSON *et al.*, 1997; LARSSON, 2000).

Os siRNAs interagem eletrostaticamente com lipídeos e polímeros catiônicos para formar partículas capazes de transferi-los para dentro das células. Dessa forma, foram adicionados aos sistemas MO:FA e MO:AO:FA diferentes concentrações do lipídeo catiônico OAM e do polímero catiônico PEI e verificada a influência destes na manutenção das fases líquido-cristalinas ao campo de luz polarizada. A quantidade desses adjuvantes adicionada foi subtraída da fase aquosa, ou seja, a proporção de MO e MO:AO dos sistemas foi mantida constante. O diagrama ternário de fases das formulações está representado na **Figura 10** e a **Tabela 2** especifica as quantidades dos adjuvantes catiônicos e as fases formadas.

Tabela 2: Fases líquido-cristalinas obtidas com os sistemas MO:FA e MO:AO:FA preparados com diferentes porcentagens dos adjuvantes catiônicos OAM e PEI

% adjuvante catiônico	MO:FA		MO:AO:FA	
	OAM	PEI	OAM	PEI
0,0	FC	FC	FH	FH
0,2	FC/FH	FC	FH	FH
0,4	FH	FC/FH	FH	FH
0,6	FH	FC/FH	FH	FH
0,8	FH	FC/FH	FH	FH
1,0	FH	FC/FH	FH	FH
1,5	FH	FH	FH	FH
2,0	FH	FH	FH	FH
2,5	FH	FH	FH	FH
3,0	----	FH	FH	FH
3,5	----	FH	----	FH
4,0	----	----	----	----
4,5	----	----	----	----
5,0	----	----	----	----

FC = Fase cúbica; FH = Fase hexagonal; ---- = perda da estrutura líquido-cristalina.

Figura 10: Diagramas ternário de fases parcial dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA contendo diferentes proporções de OAM e PEI, respectivamente. Observação das fases ao microscópio de luz polarizada, objetiva de 20X, temperatura de 25 °C.

Na ausência de OAM e PEI, o sistema composto por MO:FA foi caracterizado como fase cúbica. Esta fase encontra-se juntamente com a fase hexagonal na concentração de 0,2% de OAM e, na faixa de concentração de 0,4 a 2,5% de OAM, este sistema apresentou-se como fase hexagonal. Nas concentrações de 3,0 a 5,0% observou-se a formação de um material viscoso e isotrópico ao campo de luz polarizada. A transição de fase cúbica para hexagonal na presença de OAM pode ser explicada pelo caráter hidrofóbico desse lipídeo que aumenta o volume do domínio hidrofóbico do sistema, ou seja, aumenta os valores do fator de empacotamento favorecendo o rearranjo dos lipídeos para uma organização do tipo hexagonal reversa (vide **Figura 8**).

Com a incorporação de 0,2% de PEI, o sistema MO:FA manteve-se como fase cúbica. Entretanto, na faixa de concentração de 0,4 a 1,0% observou-se uma mistura de fase cúbica e fase hexagonal e, nas concentrações de 1,5 a 3,5%, este sistema apresentou-se como fase hexagonal. Para as concentrações de 4,0, 4,5 e 5,0% de PEI, observou-se a perda da fase líquido-cristalina. A formação de fase hexagonal ocorre com concentrações maiores de PEI (1,5%) que OAM (0,4%). Neste caso, a contribuição dos domínios apolares para um consequente aumento dos valores do fator de empacotamento, condição importante para a formação de fase hexagonal, é maior para OAM, devido sua estrutura lipídica. No caso do PEI, seus grupamentos amina protonáveis, podem estar contribuindo para um aumento do domínio polar reduzindo os valores do fator de empacotamento. Por isso, necessita-se de maiores concentrações desse polímero para promover a transição de fases, como foi observado.

O sistema MO:AO:FA apresentou-se como fase hexagonal na ausência de OAM e PEI. A incorporação de OAM na faixa de concentração de 0,2 a 3,0% manteve a fase hexagonal do sistema e, em concentrações maiores (3,5 a 5,0%), a estrutura líquido-cristalina foi perdida. A incorporação de PEI na faixa de concentração de 0,2 a 3,5% não alterou a fase hexagonal do sistema e nas concentrações de 4,0 a 5,0%, observou-se a perda da estrutura líquido-cristalina.

Esta perda da estrutura líquido-cristalina dos sistemas após a incorporação de altas concentrações dos adjuvantes catiônicos OAM e PEI pode ser explicada pela elevada quantidade de grupamentos carregados positivamente que se repelem eletrostaticamente, desestabilizando a organização dos constituintes dos sistemas.

Dessa forma, o sistema MO:FA foi estudado com a incorporação das concentrações de 0,2 a 2,5% (p/p) de OAM e de 0,2 a 3,5% (p/p) de PEI e o sistema MO:AO:FA foi estudado com a incorporação das concentrações de 0,2 a 3,0% (p/p) de OAM e de 0,2 a 3,5% (p/p) PEI.

A **Figura 11** apresenta as imagens de microscopia de luz polarizada de algumas estruturas líquido-cristalinas obtidas dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA incorporados com diferentes concentrações de OAM e PEI.

As **Figuras 11 A, B e C** mostraram que a incorporação de crescentes concentrações de OAM ao sistema MO:FA manteve a fase hexagonal obtida. O sistema formado por MO e PEI a 0,4% (**Figura 11 D**) foi caracterizado como uma mistura de fase cúbica e hexagonal. Com o aumento da concentração de PEI (**Figuras 11 E e F**), observou-se apenas a presença de fase hexagonal.

Os sistemas que apresentam AO em sua composição incorporados com OAM (**Figuras 11 G, H e I**), PEI (**Figuras 11 J, K e L**) e isento dos adjuvantes catiônicos (**Figura 11 N**) apresentaram-se como fase hexagonal.

A **Figura 11 M** apresenta a imagem obtida do sistema formado apenas por MO:FA e, a **Figura 11 O**, trata-se de uma representação do sistema composto por MO:AO:FA após sua dispersão.

Figura 11: Fotomicrografias obtidas utilizando microscopia de luz polarizada. (A) MO:OAM:FA (10:0,4:89,6, p/p/p), (B) MO:OAM:FA (10:1:89, p/p/p), (C) MO:OAM:FA (10:2,5:87,5, p/p/p), (D) MO:PEI:FA (10:0,4:89,6, p/p/p), (E) MO:PEI:FA (10:1:89, p/p/p), (F) MO:PEI:FA (10:2,5:87,5, p/p/p), (G) MO:AO:OAM:FA (8:2:0,4:89,6, p/p/p/p), (H) MO:AO:OAM:FA (8:2:1:89, p/p/p/p), (I) MO:AO:OAM:FA (8:2:2,5:87,5, p/p/p/p), (J) MO:AO:PEI:FA (8:2:0,4:89,6, p/p/p/p), (K) MO:AO:PEI:FA (8:2:1:89, p/p/p/p), (L) MO:AO:PEI:FA (8:2:2,5:87,5, p/p/p/p), (M) MO:FA (10:90, p/p), (N) MO:AO:FA (8:2:90, p/p/p), (O) Fase hexagonal dispersa referente ao sistema composto por MO:AO:OAM:FA (8:2:2,5:87,5, p/p/p/p). Temperatura 25 °C, objetiva 20X.

Definidas as formulações, estas foram dispersadas para a obtenção das nanopartículas de cristais líquidos.

A literatura descreve vários métodos de dispersão utilizados para a formação de nanopartículas de cristais líquidos, tais como: i) aplicação de alta energia, por exemplo: sonicação, microfluidização e homogeneização por alta pressão; ii) método de pré-mistura com a formação de um filme seco de lipídeos e estabilizante, e posterior agitação mecânica durante a hidratação do filme; iii) processo de diluição de lipídeos na presença de etanol (emulsificação espontânea) e, iv) liofilização (YAGHMUR; GLATTER, 2009).

Os métodos utilizados para dispersão podem afetar de forma relevante as propriedades das dispersões como, por exemplo, parcial ou total perda da estrutura líquido-cristalina, instabilidade e presença de grandes partículas. Como os sistemas líquido-cristalinos são bastante sensíveis aos processos de preparo (composição, modo de preparo e dispersão), essas etapas devem ser escolhidas cuidadosamente de forma que o produto final mantenha a característica líquido-cristalina como também apresente um adequado tamanho e distribuição de tamanho de partículas (WÖRLE *et al.*, 2007).

Dentre os métodos citados, foi escolhido o método de dispersão de alta energia utilizando-se sonicação para obtenção das nanodispersões. A sonicação (9 Watts) dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA foi realizada em banho de gelo durante 2 minutos, sendo que as nanodispersões obtidas apresentaram um aspecto leitoso e homogêneo após o processo de dispersão.

- 4.1.1. *Análise do tamanho e distribuição de tamanho de partículas pela técnica do espalhamento dinâmico da luz*

A **Figura 12** mostra o tamanho de partícula e polidispersividade obtidos com a incorporação de diferentes concentrações de OAM e PEI ao sistema MO:FA, bem como após a adição de siRNA na concentração final de 2,5 μ M.

Figura 12: Tamanho de partícula e polidispersividade das nanodispersões do sistema MO:FA após incorporação de diferentes porcentagens de OAM ou PEI e siRNA na concentração final de 2,5 µM. As amostras foram diluídas 100x em água Milli-Q e as medidas foram realizadas a 25°C. Os resultados são expressos pela média ± E.P.M. (n=3). Análise estatística realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, * $p < 0,05$ em relação ao controle (nanodispersão sem adição do adjuvante catiônico e sem siRNA); ** $p < 0,05$ em relação ao controle (nanodispersão sem a adição do adjuvante catiônico e com siRNA); Não houve diferença estatística em relação ao controle (nanodispersão sem siRNA em cada concentração testada do adjuvante catiônico).

Pode-se observar que a incorporação dos adjuvantes OAM e PEI alteraram significativamente os valores de tamanho de partícula obtidos pela dispersão do sistema MO:FA a partir da concentração de 0,4% de OAM e de 1,5% de PEI. O sistema MO:FA apresentou uma média de 190 ± 28 nm e 173 ± 17 nm para as nanodispersões incorporadas com OAM e PEI, respectivamente e, uma média de 181 ± 26 nm e 171 ± 14 nm quando complexadas com siRNA na concentração de 2,5 µM. Mesmo com o aumento significativo do tamanho médio das partículas devido ao aumento da concentração dos adjuvantes catiônicos, esses valores

continuam adequados para a aplicação tópica desses sistemas (REISCHL; ZIMMER, 2009). Contudo, podemos observar que a adição de siRNA na concentração final de 2,5 μ M às nanodispersões não alterou significativamente os valores de tamanho médio de partícula em cada concentração de adjuvante catiônico utilizada.

Em relação à polidispersividade do sistema MO:FA, também podemos observar que a incorporação dos adjuvantes catiônicos provocaram um aumento significativo desse parâmetro com o aumento das concentrações de OAM e PEI e que não houve diferenças significativas nos valores obtidos entre as nanodispersões sem e com siRNA.

No sistema MO:AO:FA (**Figura 13**), observou-se que a incorporação do adjuvante OAM não alterou significativamente os valores de tamanho de partícula obtidos após a dispersão do sistema. Alteração significativa nesse parâmetro foi observada com o uso do PEI a partir da concentração de 0,4% (p/p). A incorporação de siRNA aos sistemas nanodispersos não alterou de forma significativa os valores de tamanho de partícula, assim como no sistema MO:FA e apresentaram uma média de 207 ± 16 nm e 242 ± 27 nm para as nanodispersões com OAM e PEI respectivamente e, uma média de 222 ± 28 nm e 236 ± 23 nm para as nanodispersões com OAM e PEI complexadas com siRNA na concentração de 2,5 μ M. No sistema MO:AO:FA também podemos observar um aumento da polidispersividade com o aumento das concentrações de OAM e PEI assim como no sistema MO:FA.

Figura 13: Tamanho de partícula e polidispersividade das nanodispersões do sistema MO:AO:FA após incorporação de diferentes porcentagens de OAM ou PEI e siRNA na concentração final de 2,5 µM. As amostras foram diluídas 100x em água Milli-Q e as medidas foram realizadas a 25°C. Os resultados são expressos pela média ± E.P.M. (n=3). Análise estatística realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, * $p < 0,05$ em relação ao controle (nanodispersão sem adição do adjuvante catiônico e sem siRNA); ** $p < 0,05$ em relação ao controle (nanodispersão sem a adição do adjuvante catiônico e com siRNA); Não houve diferença estatística em relação ao controle (nanodispersão sem siRNA em cada concentração testada do adjuvante catiônico).

O aumento da polidispersividade em ambos os sistemas é decorrente de uma distribuição de tamanho de partículas heterogênea, ou seja, a existência de duas ou mais populações de partículas com tamanho médio diferente (distribuição bimodal). O mesmo comportamento foi observado por Rossetti e colaboradores (2011), onde aproximadamente 5% de partículas com diâmetro maior que 1,0 µm foram encontradas nas análises de espalhamento dinâmico da luz de nanodispersões de fase hexagonal contendo fotossensibilizador (ROSSETTI *et al.*, 2011).

Assim, pode-se aferir que adjuvantes ou fármacos, a partir de determinada concentração, podem interferir no tamanho e polidispersividade de dispersões de nanopartículas de cristais líquidos, mesmo que mantenham a estrutura de cristal líquido da nanopartícula.

- *4.1.2. Medida da carga superficial das partículas das nanodispersões*

A medida da carga superficial das partículas, potencial zeta, foi determinada para as formulações dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA antes e após sua complexação com o siRNA na concentração de 2,5 μM . Podemos observar na **Figura 14** que os valores do potencial zeta aumentam com o aumento da concentração dos adjuvantes catiônicos OAM e PEI em ambos os sistemas e que a adição de siRNA não altera significativamente esse parâmetro. No sistema MO:FA com a incorporação de OAM, o aumento do potencial zeta foi dependente da concentração de OAM até 0,8%. Em concentrações maiores, observamos uma redução do potencial zeta, contudo, essa redução não foi significativa comparada ao valor obtido com a incorporação de 0,8% de OAM ao sistema.

Figura 14: Potencial zeta das nanodispersões dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA após incorporação de diferentes porcentagens de OAM ou PEI e siRNA na concentração final de 2,5 μ M. Os resultados são expressos pela média $\pm$ E.P.M. ($n=3$). Análise estatística realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, * $p < 0,05$ em relação ao controle (nanodispersão sem adição do adjuvante catiônico e sem siRNA); ** $p < 0,05$ em relação ao controle (nanodispersão sem a adição do adjuvante catiônico e com siRNA); Não houve diferença estatística em relação ao controle (nanodispersão sem siRNA em cada concentração testada do adjuvante catiônico).

Os valores do potencial zeta para o sistema MO:FA sofreram variação de $9,3 \pm 3,4$ mV a $35,9 \pm 7,6$ mV e de $-0,2 \pm 3,3$ mV a $33,7 \pm 4,5$ mV para os sistemas incorporados por OAM ou PEI, respectivamente e, de $2,2 \pm 4,5$ mV a $34,8 \pm 8,2$ mV e de $-5,0 \pm 2,0$ mV a $34,8 \pm 5,5$ mV para os sistemas incorporados com OAM ou PEI e com siRNA na concentração de 2,5 μ M.

Os valores do potencial zeta para o sistema MO:AO:FA sofreram variação de $-17,6 \pm 4,2$ mV a $5,9 \pm 0,7$ mV e de $-13,7 \pm 2,7$ mV a $36,4 \pm 2,1$ mV para os sistemas incorporados por OAM ou PEI, respectivamente e, de $-17,9 \pm 3,5$ mV a $8,1 \pm 3,0$ mV e $-13,7 \pm 3,4$ mV a $40,0 \pm 6,3$ mV para os mesmos sistemas complexados com

siRNA na concentração de 2,5 μ M. Podemos observar que os valores do potencial zeta do sistema MO:AO:FA são mais negativos que os valores do sistema MO:FA, isso é decorrente da presença do AO que é capaz de ionizar-se, conferindo um potencial negativo ao sistema. Em contrapartida, com a adição de adjuvantes catiônicos, o potencial vai aumentando proporcionalmente às concentrações de OAM e PEI.

4.2. Eficiência de complexação:

A eletroforese vem sendo comumente utilizada na avaliação do grau de complexação de siRNA em diferentes tipos de sistemas de liberação como, por exemplo, os trabalhos realizados por Tran e colaboradores (2008) que fizeram o uso da eletroforese em gel de agarose 2% (100 V e 20 minutos de corrida) para testar a eficiência de complexação de siRNA por nanolipossomas catiônicos de ~ 50 nm de diâmetro médio. Obtiveram uma complexação máxima do siRNA com o tempo de incubação de 30 min e na proporção de 1:10 (TRAN *et al.*, 2008). Outro exemplo da utilização dessa técnica é o trabalho realizado por Takahashi e colaboradores (2010) que avaliaram a complexação de siRNA por complexos com PEI utilizando a eletroforese em gel de agarose 2%, 80 V e 20 minutos de corrida. A eletroforese demonstrou que o siRNA formava complexos estáveis com o PEI quando a proporção ânion/cátion era maior ou igual a 5 (TAKAHASHI; WANG; GRAINGER, 2010).

Para os estudos de eficiência de complexação, primeiramente realizamos uma corrida de soluções de siRNA em água DEPC em diferentes concentrações (**Figura 15 A**) com a finalidade de observar seu perfil de corrida nas condições experimentais aplicadas, ou seja, corrida de 20 minutos em gel de agarose 2% a 100 V.

Figura 15: Perfil eletroforético do siRNA em água DEPC em diferentes concentrações (A) e das formulações dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA sem siRNA com as concentrações maiores de OAM ou PEI utilizadas (B).

A figura acima mostra que as concentrações de siRNA em água DEPC apresentaram uma intensa banda que aumenta de intensidade com o aumento da concentração de siRNA. A concentração de 2,5 µM foi a escolhida para avaliar a complexação do siRNA nas formulações devido a boa intensidade da banda obtida, bem como por ser a mesma concentração utilizada nos estudos de caracterização dos sistemas.

Também realizou-se um teste aplicando as formulações dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA preparadas com as maiores concentrações de OAM ou PEI empregadas, para verificar se estas poderiam ter algum interferente na leitura do gel sob as condições experimentais utilizadas como mostra a **Figura 15 B**.

As formulações sem siRNA não apresentaram bandas, portanto, não interferem na leitura do gel.

A **Figura 16** mostra os resultados da eficiência de complexação das formulações do sistema MO:FA preparadas com diferentes concentrações de OAM ou PEI após a incorporação de siRNA na concentração final de 2,5 µM.

Figura 16: Eficiência de complexação do siRNA pelo sistema MO:FA preparado com diferentes concentrações de OAM ou PEI após a incorporação de siRNA na concentração final de 2,5 μ M.

O sistema MO:FA preparado com diferentes concentrações de OAM foi capaz de complexar o siRNA a partir da concentração de 0,4% (p/p) e o sistema MO:FA preparado com PEI, a partir de 0,2% (p/p). O resultado encontrado é compatível com os valores do potencial zeta obtidos para as nanodispersões, pois nas concentrações que houve a complexação do siRNA, estes valores foram positivos, característica desejada para possibilitar a complexação do siRNA com a nanodispersão, uma vez que o siRNA possui carga residual negativa. No entanto, embora o sistema MO e OAM a 0,2% tenha um potencial zeta positivo ($13,2 \pm 4,2$ mV), verifica-se que esta característica não é a única necessária para promoção da complexação do siRNA, que foi parcial nessa concentração, como pode ser observado na **Figura 16**. Observou-se que a banda do siRNA aparece com uma

intensidade menor que a do sistema sem a adição de OAM onde o siRNA encontra-se livre.

A **Figura 17** mostra os resultados da eficiência de complexação do siRNA na concentração final de 2,5 μM nas formulações do sistema MO:AO:FA preparadas com diferentes concentrações de OAM ou PEI.

Figura 17: Eficiência de complexação do siRNA pelo sistema MO:AO:FA preparado com diferentes concentrações de OAM ou PEI após a incorporação de siRNA na concentração final de 2,5 μM .

A figura acima mostra que o sistema MO:AO:FA preparado com diferentes concentrações de OAM foi capaz de incorporar o siRNA a partir da concentração de 2,0% (p/p) e o sistema MO:AO:FA preparado com PEI, a partir de 0,2% (p/p). Semelhantemente ao sistema MO:FA, os valores de potencial zeta das formulações que complexaram o siRNA foram positivos.

Diferentemente do sistema MO:FA preparado com OAM, o sistema MO:AO:FA, por conter o AO em sua composição, apresenta valores de potencial zeta mais negativos se comparado aos valores encontrados no sistema MO:FA nas mesmas concentrações de OAM, uma vez que o AO apresenta uma carga residual negativa e, com isso, o sistema necessita de maiores concentrações de OAM para alterar a carga residual do sistema para positiva e, conseqüentemente, ser capaz de complexar o siRNA.

Formulações do sistema MO:AO:FA preparadas com PEI que apresentaram potencial zeta levemente negativo (0,2; 0,4; 0,6 e 0,8% PEI) foram capazes de complexar o siRNA. Isso pode ser explicado pela estrutura molecular do PEI que apresenta um maior número de regiões protonáveis se comparado com a OAM e, com isso, possui uma região maior de interação com o siRNA, favorecendo sua complexação.

4.3. Estudos de Citotoxicidade:

Ensaio em culturas celulares são utilizados como modelo *in vitro* para avaliação de toxicidade. Células são comumente utilizadas nestes ensaios devido sua facilidade de cultivo, rápido crescimento e sensibilidade, como é o caso da linhagem de fibroblastos que foi utilizada no ensaio de MTT (SCHERLIE, 2011).

O MTT trata-se de um ensaio colorimétrico quantitativo de sobrevivência e proliferação celular que detecta a porcentagem de células vivas capazes de metabolizar o sal tetrazólico solúvel em água pela enzima succinil-desidrogenase mitocondrial em sais insolúveis de formazan. As principais vantagens desse ensaio colorimétrico são sua rapidez, precisão e ausência do uso de radioisótopos (MOSMANN, 1983).

Os resultados obtidos com os ensaios de MTT das formulações dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA foram analisados de acordo com a viabilidade celular em função das concentrações dos adjuvantes catiônicos OAM ou PEI utilizados no preparo dos sistemas. A **Figura 18** mostra os resultados de citotoxicidade obtidos com o sistema MO:FA e MO:AO:FA após a incorporação de diferentes porcentagens de OAM ou PEI.

Figura 18: Efeito dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA incorporados com diferentes porcentagens de OAM ou PEI na viabilidade celular de fibroblastos da linhagem L929. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ E.P.M. Análise estatística realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, * $p < 0,05$ em relação ao controle + (células sem tratamento).

Pode-se observar que a viabilidade celular é dependente da concentração do lipídeo ou polímero catiônico, as nanodispersões reduzem a viabilidade com o aumento da concentração de OAM ou PEI. As formulações compostas por MO:PEI:FA apresentaram uma maior redução da viabilidade celular comparada com aquelas compostas por MO:OAM:FA, resultado do caráter mais citotóxico do polímero PEI. Nas formulações com OAM, temos uma redução estatisticamente significativa da viabilidade celular a partir da incorporação de 0,8% desse lipídeo ao sistema e de 0,2% para a incorporação de PEI. Para os resultados de citotoxicidade das formulações do sistema MO:AO:FA, observou-se resultados semelhantes ao encontrado para o sistema MO:FA.

As formulações do sistema MO:AO:FA também reduziram a viabilidade celular com o aumento da porcentagem de OAM ou PEI. Diferentemente do sistema MO:FA, a redução significativa da viabilidade celular iniciou-se com o uso de concentrações mais altas desses adjuvantes catiônicos, sendo a partir de 2,5% para a incorporação de OAM e de 1,5% para incorporação de PEI. Uma explicação para esse fato pode ser a presença do AO na composição destas formulações, que por diminuir a carga residual do sistema, possui relação direta na redução da toxicidade celular.

A toxicidade celular é associada à razão de cargas do sistema e a dose administrada. Razões de carga mais elevadas são geralmente mais tóxicas a uma variedade de tipos celulares, sendo que a toxicidade é um parâmetro célula-específico (LV *et al.*, 2006). Em relação à dose administrada, sabe-se que altas concentrações de PEI induzem apoptose celular por interações com as membranas mitocondriais as quais levam a perda de potencial de membrana, diminuição de ATP e decréscimo da viabilidade celular (MERKEL *et al.*, 2011). Esses efeitos de razão de cargas e dose administradas foram observados nos ensaios de MTT realizados para as nanodispersões líquido-cristalinas desenvolvidas no presente trabalho.

4.4. Seleção das formulações de trabalho:

Após os experimentos acima realizados, escolheram-se duas formulações de cada sistema, sendo uma com OAM e uma com PEI, para conduzir os experimentos *in vitro* de penetração cutânea. A estas formulações foi complexado siRNA a 10 μ M, concentração esta mais adequada para futuros estudos de atividade (JENSEN *et al.*,

2011), bem como para visualização da penetração cutânea por microscopia de fluorescência.

As formulações escolhidas foram as preparadas com as menores concentrações dos adjuvantes catiônicos capazes de complexar o siRNA na concentração final de 2,5 μ M, também possuíam um reduzido tamanho de partícula e baixa polidispersividade, bem como um residual de carga superficial positiva que é interessante para interação com as membranas celulares que são carregadas negativamente (GEUSENS *et al.*, 2009; GÜNTHER *et al.*, 2011). Somado a essas características, as formulações escolhidas também apresentaram baixa citotoxicidade *in vitro*. Estes dados estão sumarizados na **Tabela 3**. Do sistema MO:FA, as formulações escolhidas foram as com a incorporação de 0,4% de OAM ou PEI e, do sistema MO:AO:FA, com a incorporação de 2,5% de OAM ou 1,0% de PEI.

Tabela 3: Características das formulações escolhidas dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA sem siRNA

Formulação	MO:OAM (0,4%):FA	MO:PEI (0,4%):FA	MO:AO:OAM (2,5%):FA	MO:AO:PEI (1,0%):FA
Tamanho médio de partícula (nm)	196 $\pm$ 32	150 $\pm$ 6	231 $\pm$ 58	254 $\pm$ 24
Polidispersividade	0,31 $\pm$ 0,07	0,14 $\pm$ 0,02	0,37 $\pm$ 0,09	0,43 $\pm$ 0,06
Potencial zeta (mV)	29,3 $\pm$ 3,7	4,2 $\pm$ 0,4	2,1 $\pm$ 3,2	2,1 $\pm$ 2,7
Viabilidade celular (%)	106 $\pm$ 8	82 $\pm$ 3	64 $\pm$ 11	92 $\pm$ 5

Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ E.P.M.

4.5. Caracterização das formulações de trabalho com 10 μ M siRNA

O aumento da concentração final de siRNA incorporado às nanodispersões de 2,5 para 10 μ M não alterou de forma significativa os parâmetros de tamanho de partícula, polidispersividade e potencial zeta estudados. Os valores obtidos após a incorporação do siRNA na concentração de 10 μ M encontram-se na **Tabela 4** e continuam adequados para sua aplicação, uma vez que obtiveram-se tamanhos de partícula e índices de polidispersividade reduzidos, bem como um residual de carga positiva para todos os sistemas após a incorporação do siRNA.

Tabela 4: Resultados da caracterização das formulações de trabalho dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA com a adição de siRNA na concentração final de 10 μ M

Formulação	MO:OAM (0,4%):FA + 10 μ M siRNA	MO:PEI (0,4%):FA + 10 μ M siRNA	MO:AO:OAM (2,5%):FA + 10 μ M siRNA	MO:AO:PEI (1,0%):FA + 10 μ M siRNA
Tamanho médio de partícula (nm)	145 $\pm$ 11	161 $\pm$ 21	240 $\pm$ 54	229 $\pm$ 32
Polidispersividade	0,19 $\pm$ 0,01	0,19 $\pm$ 0,08	0,42 $\pm$ 0,04	0,41 $\pm$ 0,04
Potencial zeta (mV)	24,8 $\pm$ 6,0	1,5 $\pm$ 1,9	11,7 $\pm$ 2,0	3,6 $\pm$ 4,8

Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ E.P.M.

Estudos utilizando a eletroforese em gel de agarose foram realizados para confirmar a complexação do siRNA na concentração final de 10 μ M pelas nanodispersões líquido-cristalinas de trabalho. A **Figura 19** mostra os resultados da eficiência de complexação obtidos com as nanodispersões dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA adicionadas de PEI e OAM, respectivamente.

Figura 19: Eficiência de complexação do siRNA pelas nanodispersões dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA preparados com PEI ou OAM após a incorporação de siRNA na concentração final de 10 μ M.

Observou-se que as nanodispersões preparadas com PEI e com OAM sem a incorporação de siRNA não interferiram na leitura no gel, como já foi mostrado anteriormente na **Figura 15 B**. Além disto, observou-se que as formulações de trabalho foram capazes de complexar o siRNA na concentração de 10 μ M. Estes resultados são condizentes com o potencial zeta das nanodispersões com siRNA a 10 μ M, os quais foram positivos (**Tabela 3**).

Avaliou-se a citotoxicidade das nanodispersões líquido-cristalinas dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA preparados com PEI ou com OAM e com siRNA na concentração final de 10 μ M e observamos que a adição do siRNA às nanodispersões não alterou significativamente a viabilidade celular quando comparado à viabilidade obtida com as nanodispersões isentas de siRNA, como mostra a **Figura 20**.

Figura 20: Efeito dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA preparados com PEI e OAM sem e com a adição de siRNA na concentração final de 10 µM, na viabilidade celular de fibroblastos da linhagem L929. Os resultados representam a média de três determinações ± E.P.M. Análise estatística realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. * p < 0,05 em relação ao controle + (células sem tratamento); não houve diferença estatística das formulações adicionadas de siRNA em relação aquelas sem a adição de siRNA.

A viabilidade celular obtida com as nanodispersões líquido-cristalinas escolhidas, preparadas com PEI e OAM, indicam grande potencial de sua utilização como sistemas de liberação para siRNA.

4.6. Análise turbidimétrica

A análise turbidimétrica é uma ferramenta bastante utilizada na avaliação da estabilidade de sistemas dispersos, fornecendo informações relevantes sobre o seu comportamento. As **Figuras 21** e **22** apresentam os resultados de turbidez, como medida de absorbância aparente a 410 nm, em função do tempo, obtidos para os sistemas MO:FA e MO:AO:FA preparados com diferentes concentrações de PEI ou OAM e também após a adição de siRNA 10 μ M aos sistemas.

Figura 21: Análise turbidimétrica a 25°C das nanodispersões líquido-cristalinas dos sistemas MO:FA (A) e MO:AO:FA (B) preparadas com diferentes concentrações de PEI e com siRNA 10 μ M. As leituras foram realizadas após o preparo das nanodispersões e durante 120 horas. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ E.P.M. Análise estatística realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, não houve diferença estatística em relação ao grupo controle (tamanho médio de partícula no tempo 0 h).

Figura 22: Análise turbidimétrica a 25°C das nanodispersões líquido-cristalinas dos sistemas MO:FA (A) e MO:AO:FA (B) preparadas com diferentes concentrações de OAM e com siRNA 10 μ M. As leituras foram realizadas após o preparo das nanodispersões e durante 120 horas. Os resultados representam a média de três determinações $\pm$ E.P.M. Análise estatística realizada pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney, não houve diferença estatística em relação ao grupo controle (tamanho médio de partícula no tempo 0 h).

Observou-se que o perfil turbidimétrico para os sistemas MO:FA e MO:AO:FA preparados com OAM (**Figura 22**) apresentaram um comportamento semelhante. Nesses sistemas, podemos notar uma redução acentuada na turbidez nas primeiras 12 horas após o preparo, ou seja, houve uma precipitação das partículas dispersas na solução tamponada na qual foram preparadas para as análises e, após esse período, tendem a permanecer no mesmo estado. Este fenômeno reflete a estabilização do sistema nanodisperso. A adição de siRNA 10 μ M aos sistemas não alterou o perfil obtido.

As nanodispersões do sistema MO:FA preparadas com PEI mantiveram os valores de turbidez constantes durante todo o período de análise (**Figura 21 A**) porém, as nanodispersões do sistema MO:AO:FA preparadas com PEI (**Figura 21 B**) apresentaram um perfil semelhante aos dos sistemas preparados com OAM, ou seja, houve uma redução acentuada na turbidez nas primeiras 12 horas após o preparo e, após esse período, tendem a permanecer no mesmo estado. A adição de siRNA 10 μ M aos sistemas não alterou o perfil obtido porém, reduziu os valores de turbidez encontrados. Sugere-se que essa redução na turbidez seja decorrente da interação polímero/siRNA que reduz o tamanho do complexo entre eles formado, porém, esses resultados foram obtidos com o uso de uma técnica que não avalia interações de nível molecular entre seus constituintes, que explique com precisão o comportamento observado. Análises utilizando a difração de raios X são mais adequadas para o entendimento de como os constituintes da formulação afetam sua estrutura.

Concomitantemente com o estudo da estabilidade física das nanodispersões líquido-cristalinas através da análise turbidimétrica, as mesmas foram submetidas a um acompanhamento do tamanho médio das partículas por espalhamento dinâmico da luz pelo mesmo período (120 horas) e os resultados mostraram que esse parâmetro manteve-se estável.

Esses resultados nos forneceram uma importante constatação a respeito da estabilidade física dos sistemas dispersos que, mesmo sofrendo precipitação no meio tamponado onde foram preparadas para as análises turbidimétricas, mantiveram o tamanho médio das partículas. Sendo assim, o sistema pode ser utilizado após sua dispersão, uma vez que não apresentaram alterações significativas de tamanho médio das partículas no período estudado.

4.7. Difração de raios X

As nanodispersões de trabalho foram analisadas por difração de raios X a baixo ângulo para a caracterização da estrutura líquido-cristalina dos sistemas formados. Além disso, avaliou-se a influência da incorporação de 10 μM de siRNA na estrutura líquido-cristalina dos sistemas obtidos.

A difração de raios X é um dos métodos mais utilizados para se investigar a estrutura interna de nanodispersões aquosas de cristais líquidos (YAGHMUR; GLATTER, 2009). Trata-se de um fenômeno de interferência causado por um objeto no caminho de ondas eletromagnéticas. A difração ocorre quando as dimensões deste objeto são comparáveis ao comprimento de onda da radiação. Os raios X possuem comprimento de onda comparável ao espaçamento entre grupamentos formadores dos cristais, por isso a técnica pode ser utilizada para identificação de fases líquido-cristalinas (ATKINS, 1998).

A **Figura 23** mostra os difratogramas de raios X das nanodispersões de trabalho dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA sem e com a adição de 10 μM de siRNA.

Figura 23: Difratogramas de raios X das nanodispersões dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA sem e com a adição de 10 μM siRNA.

Para o sistema MO:PEI (0,4%):FA traçou-se uma função Lorentziana para melhor visualização dos picos de difração (**Figura 24**) e, assim, identificação da estrutura líquido-cristalina presente neste sistema. Esse tipo de modelagem é feito quando se tem alargamentos nos picos de difração devido aos efeitos de tamanho e desordem no sistema, que dificultam a visualização dos picos, os quais podem estar sobrepostos.

Figura 24: Difrátogramas das nanodispersões compostas por MO:PEI (0,4%):FA sem e com 10 μM siRNA modelados por uma função Lorentziana.

A análise dos picos de reflexão forneceu as razões entre as distâncias interplanares e permitiu determinar o parâmetro de rede (a), bem como identificar o tipo de fase líquido-cristalina de cada nanodispersão, conforme apresentado na **Tabela 5**.

Tabela 5: Dados obtidos através da difração de raios X a baixo ângulo das nanodispersões dos sistemas MO:FA e MO:AO:FA incorporadas com diferentes concentrações de OAM ou PEI e com siRNA na concentração de 10 μ M

Amostra	q (nm^{-1})	d (nm)	Razão	Média do parâmetro de rede (nm)	Estrutura
MO:OAM (0,4%):FA	1,21	5,19	1:1	$a_H = 5,97 \pm 0,01$	Hexagonal
	2,11	2,98	$1:\sqrt{3}$		Hexagonal
	2,43	2,59	$1:\sqrt{4}$		Hexagonal
MO:OAM (0,4%):FA + 10 μ M siRNA	1,22	5,15	1:1	$a_H = 5,92 \pm 0,03$	Hexagonal
	2,12	2,96	$1:\sqrt{3}$		Hexagonal
	2,46	2,55	$1:\sqrt{4}$		Hexagonal
MO:PEI (0,4%):FA	0,78	8,06	1:1	$a_H = 7,04 \pm 0,01$ $a_C = 8,10 \pm 0,07$	Cúbica D
	1,03	6,10	1:1		Hexagonal
	1,10	5,71	$1:\sqrt{2}$		Cúbica D
	1,33	4,72	$1:\sqrt{3}$		Cúbica D
MO:PEI (0,4%):FA + 10 μ M siRNA	0,78	8,06	1:1	$a_H = 7,18 \pm 0,04$ $a_C = 8,11 \pm 0,04$	Cúbica D
	1,01	6,22	1:1		Hexagonal
	1,09	5,76	$1:\sqrt{2}$		Cúbica D
	1,34	4,69	$1:\sqrt{3}$		Cúbica D
MO:AO:OAM (2,5%):FA	1,35	4,65	1:1	$a_H = 5,36 \pm 0,02$	Hexagonal
	2,35	2,67	$1:\sqrt{3}$		Hexagonal
	2,70	2,33	$1:\sqrt{4}$		Hexagonal
MO:AO:OAM (2,5%):FA + 10 μ M siRNA	1,37	4,59	1:1	$a_H = 5,31 \pm 0,01$	Hexagonal
	2,36	2,66	$1:\sqrt{3}$		Hexagonal
	2,73	2,30	$1:\sqrt{4}$		Hexagonal
MO:AO:PEI (1,0%):FA	1,31	4,80	1:1	$a_H = 5,57 \pm 0,03$	Hexagonal
	2,60	2,42	$1:\sqrt{4}$		Hexagonal
MO:AO:PEI (1,0%):FA + 10 μ M siRNA	1,32	4,76	1:1	$a_H = 5,50 \pm 0,02$	Hexagonal

a_H : média do parâmetro de rede da estrutura hexagonal

a_C : média do parâmetro de rede da estrutura cúbica

Cúbica D: Fase cúbica D (Pn3m e Pm3n)

q : vetor de espalhamento

d : distâncias interplanares

Resultados são representados como média $\pm$ E.P.M.

A indexação dos picos de reflexão obtidos caracterizou as nanodispersões compostas por MO:OAM (0,4%):FA, MO:AO:OAM (2,5%):FA e MO:AO:PEI (1,0%):FA como fase hexagonal e a nanodispersão composta por MO:PEI (0,4%):FA

como uma mistura de fase hexagonal e cúbica. Os resultados obtidos com a difração de raios X confirmaram os resultados obtidos anteriormente através das análises por microscopia de luz polarizada. A adição de 10 μM não alterou as estruturas líquido-cristalinas obtidas.

O parâmetro de rede de uma fase líquido-cristalina (**Figura 25**) fornece informações úteis em relação a sua estrutura interna, sendo este a distância entre os centros das micelas ordenadas do cristal-líquido formado (AMAR-YULI *et al.*, 2007).

Figura 25: Parâmetro de rede de uma estrutura líquido cristalina de fase hexagonal antes e após a adição de água. Adaptado de: AMAR-YULI *et al.*, 2007.

O aumento do parâmetro de rede pode refletir mudanças na estrutura líquido-cristalina devido a modificações no sistema, tais como: i) hidratação da estrutura ou presença de moléculas hidrofílicas nos domínios aquosos e ii) presença de moléculas anfifílicas localizadas entre a cabeça polar e a cauda apolar das micelas reversas de MO e AO (AMAR-YULI *et al.*, 2007; AMAR-YULI; ASERIN; GARTI, 2008; LIBSTER *et al.*, 2007). Ou seja, seu aumento sugere que moléculas adicionadas ao sistema estejam localizadas internamente na estrutura líquido-cristalina e sua redução sugere uma perda do conteúdo de água presente nos domínios aquosos do sistema (AMAR-YULI *et al.*, 2007). Sendo que, a sua manutenção sugere ser decorrente da adsorção das moléculas na superfície das partículas reversas (LIBSTER *et al.*, 2007).

Analisando-se os valores do parâmetro de rede obtidos após a incorporação de 10 μM de siRNA (**Tabela 4**), pode-se observar uma pequena redução desse valor nos sistemas líquido-cristalinos caracterizados como fase hexagonal. Por se tratar de uma molécula hidrofílica, esperava-se que esta estaria localizada nos domínios

aquosos da estrutura líquido-cristalina e, portanto, observaríamos um aumento do parâmetro de rede. Porém, o siRNA possui uma forte atração pelos adjuvantes catiônicos OAM e PEI adicionados ao sistema e que estão presentes na região hidrofóbica do sistema líquido-cristalino. Dessa forma, sugerimos que o siRNA esteja entre as regiões hidrofóbicas, deslocando-a, fazendo com que a parte hidrofílica se aproxime e, com isso, reduzindo o parâmetro de rede (**Figura 26**).

Figura 26: Esquema representativo da diminuição do parâmetro de rede (a) após a incorporação de siRNA 10 μ M às nanodispersões líquido-cristalinas.

Os parâmetros de rede obtidos para as nanodispersões estudadas foram maiores que os valores obtidos para este tipo de fase por Lopes *et al.* (2006) e Boyd *et al.* (2007), que obtiveram nanodispersões de fase hexagonal com parâmetros de rede de 4,5 e 4,9, respectivamente. Uma explicação para esse fato é a diferença nas proporções e nos componentes utilizados para a obtenção das fases líquido-cristalinas, bem como, no caso do presente trabalho, a presença dos adjuvantes catiônicos OAM e PEI que exercem grande influência nas estruturas líquido-cristalinas das nanodispersões.

4.8. Avaliação da penetração cutânea *in vitro* das nanodispersões líquido-cristalinas contendo siRNA-FAM:

Os siRNAs são moléculas hidrofílicas, grandes, de alto peso molecular (~ 13 KDa) e com carga residual negativa devido aos grupamentos fosfatos de sua

estrutura (~ 40 grupos fosfato negativos) que, devido a suas características físico-químicas, não são capazes de difundir passivamente através do EC e atingir as demais camadas da pele (MANOHARAN, 2004; BRUNO, 2011). Dessa forma, a sua veiculação em sistemas de liberação que possuem a capacidade de ultrapassar a barreira do EC é de extrema necessidade, além de facilitar o *uptake* celular e fornecer proteção ao siRNA contra a degradação enzimática.

Os sistemas líquido-cristalinos desenvolvidos foram avaliados quanto a sua capacidade de penetrar *in vitro* nas camadas da pele através da visualização de cortes histológicos de pele de orelha suína após 4, 8 e 12 horas de aplicação das nanodispersões contendo siRNA-FAM e seus respectivos controles.

As **Figuras 27 e 28** mostram as imagens obtidas por microscopia de fluorescência dos cortes histológicos da pele de orelha suína tratadas com as formulações preparadas com OAM ou PEI, complexadas ou não com siRNA-FAM na concentração final de 10 μ M, respectivamente, após 4, 8 e 12 horas.

Figura 27: Fotomicrografias de cortes histológicos de pele suína após o tratamento com diferentes preparações por 4, 8 e 12 horas obtidas utilizando microscopia de fluorescência. (A) Controles; (B) Preparações com siRNA-FAM 10 μ M. Filtro: excitação 500 $\pm$ 20 nm; emissão 535 $\pm$ 30 nm, objetiva 20X, barra: 50 μ m.

Figura 28: Fotomicrografias de cortes histológicos de pele suína após o tratamento com diferentes preparações por 4, 8 e 12 horas obtidas utilizando microscopia de fluorescência. (A) Controles; (B) Preparações com siRNA-FAM 10 μ M. Filtro: excitação 500 $\pm$ 20 nm; emissão 535 $\pm$ 30 nm, objetiva 20X, barra: 50 μ m.

O filtro utilizado (FS46) excita moléculas em comprimentos de onda compreendidos entre 480 e 520 nm e permite a visualização da emissão de fluorescência em comprimentos de onda de 535 ± 30 nm. O FAM ligado ao siRNA, quando excitado em 492 nm, emite uma intensidade de fluorescência de intensidade máxima em 517 nm. Além do FAM, outros componentes presentes na pele quando excitados nestes comprimentos de onda são capazes de emitir fluorescência.

As fotomicrografias obtidas após o tratamento com os controles isentos de siRNA-FAM (**Figuras 27 A e 28 A**) apresentaram uma baixa intensidade de fluorescência, correspondente a fluorescência basal da pele. Os componentes das preparações e o tempo de aplicação não interferiram na intensidade de fluorescência basal da pele como pode ser observado.

Em ambas as figuras, podemos observar que as formulações compostas por salina + siRNA-FAM 10 μ M (**Figuras 27 B e 28 B**), os complexos formados pelos adjuvantes catiônicos e siRNA [OAM:siRNA-FAM 10 μ M (**Figura 27 B**) e PEI:siRNA-FAM 10 μ M (**Figura 28 B**)] ficaram retidas apenas no EC após todos os tempos analisados. Entretanto, as nanodispersões líquido-cristalinas estudadas foram capazes de penetrar o EC e atingiram a epiderme e a derme após 12 horas de tratamento. Também podemos observar que as nanodispersões do sistema MO:AO:FA preparadas com OAM ou PEI, promoveram uma maior penetração do siRNA-FAM na pele, inclusive nas camadas mais profundas da pele, comparada às nanodispersões do sistema MO:FA. Isso pode ser explicado pela presença do promotor de absorção AO, na composição desses sistemas (LOPES *et al.*, 2006).

Lopes e colaboradores (2006) obtiveram resultados de penetração *in vitro* semelhantes aos obtidos com sistemas líquido-cristalinos compostos por MO:AO para veiculação do peptídeo ciclosporina na pele. Além do fator promotor de absorção, o tamanho de partícula na faixa nanométrica também pode ter facilitado a penetração do siRNA-FAM.

Os resultados obtidos com os estudos *in vitro* de penetração cutânea indicam os sistemas líquido-cristalinos desenvolvidos como potenciais nanocarreadores de siRNA na pele. Esta proposta poderá viabilizar a terapia gênica tópica para várias patologias cutâneas.

5. Conclusões

O desenvolvimento e caracterização dos sistemas líquido-cristalinos permitiram concluir que:

- As análises por microscopia de luz polarizada e por difração de raios X possibilitaram a identificação das fases líquido-cristalinas das nanodispersões que foram caracterizadas como fase hexagonal, exceto para o sistema composto por MO:PEI (0,4%):FA, caracterizado como uma mistura de fase hexagonal e fase cúbica. A adição de siRNA às nanodispersões não alterou as fases líquido-cristalinas obtidas.
- As nanodispersões desenvolvidas apresentaram tamanho médio das partículas em torno de 190 ± 28 nm e 173 ± 17 nm para as nanodispersões do sistema MO:FA com OAM e PEI, respectivamente e de 207 ± 16 nm e 242 ± 27 para o sistema MO:AO:FA com OAM e PEI, respectivamente, baixa polidispersividade, residual de carga positivo e baixa citotoxicidade. A adição de siRNA (2,5 ou 10 μ M) às nanodispersões não alterou significativamente os parâmetros avaliados.
- As nanodispersões do sistema MO:FA incorporadas com OAM e PEI foram capazes de complexar o siRNA (2,5 ou 10 μ M) a partir da concentração de 0,4% e 0,2%, respectivamente. Já as nanodispersões do sistema MO:AO:FA incorporadas com OAM e PEI foram capazes de complexar o siRNA (2,5 ou 10 μ M) a partir da concentração de 2,0% e 0,2%, respectivamente.
- A utilização das nanodispersões de fase líquido cristalina permitiu a penetração cutânea *in vitro* do siRNA-FAM (10 μ M) nas camadas mais profundas da pele. Entre as nanodispersões em estudo, aquelas com AO em sua composição foram mais efetivas, demonstrando a importância da presença deste promotor de absorção nos sistemas, além da característica nanométrica e residual de carga positiva.

Face aos resultados obtidos, pode-se concluir que as formulações de cristais-líquidos desenvolvidas são sistemas de liberação de base nanotecnológica promissores para administração tópica de siRNA para o tratamento de patologias cutâneas na terapia gênica.

6. Referências Bibliográficas

1. AMAR-YULI, I.; ASERIN, A.; GARTI, N. Solubilization of Nutraceuticals into Reverse Hexagonal Mesophases. **J Phys Chem B**, v. 112, p. 10171–10180, 2008.
2. AMAR-YULI, I.; WACHTEL, E.; SHOSHAN, E.B.; DANINO, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. Hexosome and Hexagonal Phases Mediated by Hydration and Polymeric Stabilizer. **Langmuir**, v. 23, p. 3637-3645, 2007.
3. ATKINS, P.W. Diffraction techniques. In: ATKINS, P.W. **Physical chemistry**. Oxford University Press, 1998. p. 619-646.
4. BARRATT, G.; FATTAL, E. Nanotechnologies and controlled realese systems for the delivery of antisense oligonucleotides and small interfering RNA. **Br J Pharmacol**, v. 157, p. 179-194, 2009.
5. BERGSTRAND, N.; ARFVIDSSON, M.C.; KIM, J.M.; THOMPON, D.H.; EDWARDS, K. Interactions between Ph-sensitive liposomes and model membranes. **Biophys Chem**, v. 104, p. 361-79, 2003.
6. BORNÉ, J.; NYLAMDER, T.; KHAN, A. Phase behaviour and aggregate formation for the aqueous monoolein system mixed with sodium oleate and oleic acid. **Langmuir**, v. 17, p. 7742-7751, 2001.
7. BOYD, B.J.; RIZWAN, S.B.; DONG, Y.; HOOK, S.; RADES, T. Self-assembled geometric liquid-crystalline nanoparticles imaged in three dimensions: hexosomes are not necessarily flat hexagonal prisms. **Langmuir**, v. 23, p. 12461-12464, 2007.
8. BRUNO, K. Using drug-excipient interactions for siRNA delivery. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 63, p. 1210-1226, 2011.
9. CECV, G.; VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route A state of the art review and critical appraisal. **J Control Release**, v. 141, p. 277-299, 2010.
10. CLINICAL TRIALS.GOV. Clinical trials with siRNA. Disponível em <<http://www.clinicaltrials.gov>>. Acesso em fevereiro, 2012.
11. DE FOUGEROLLES, A.R. Delivery vehicles for small interfering RNA *in vivo*. **Hum Gene Ther**, v. 19, p. 125-132, 2008.
12. DONG, Y.; BOYD, B.J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. **Int J Pharm**, v. 417, p. 101-111, 2011.
13. ELBASHIR, S.M.; HARBORTH, J.; LENDECKEL, W.; YALCIN, A.; WEBER, K.; TUSCHL, T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs interference in cultured mammalian cells, **Natute**, v. 411, p. 494-498, 2001.
14. FERREIRA, D.A.; BENTLEY, M.V.L.B.; KARLSSON, G.; EDWARDS, K. Cryo-TEM investigation of phase behavior and agreegate structure in dilute dispersions of monoolein and oleic acid. **Int J Pharm**, v. 310, p. 203-212, 2006.
15. FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M.K.; KOSTAS, S.A.; DRIVER, S.E.; MELLO, C.C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 391, p. 806-811, 1998.

16. FONG, C.; LE, T.; DRUMMOND, C.J. Lyotropic liquid crystal engineering-ordered nanostructured small molecule amphiphile self-assembly materials by desingn. **Chem Soc Rev**, v. 41, p. 1297-1322, 2012.
17. FONG, W.; HANLEY, T.; BOYD, B.J. Stimuli responsive liquid crystals provide 'on demand' drug delivery *in vitro* and *in vivo*. **J Control Release**, v. 135, p. 218-226, 2009.
18. FRANÇA, N.R.; JÚNIOR, D.M.; LIMA, A.B.; PUCCI, F.V.C.; ANDRADE, L.E.C.; SILVA, N.P. Interferência de RNA: Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Ver Bras Reumatol**, v. 50, p. 695-709, 2010.
19. GELEY, S.; MÜLLER, C. RNAi: ancient mechanism with a promising future. **Exp Gerontol**, v. 39, p. 985-998, 2004.
20. GEUSENS, B.; LAMBERT, J.; DE SMEDT, S.C.; BUYENS, K.; SANDERS, N.N.; VAN GELE, M. Ultradeformable cationic liposomes for delivery of small interfering RNA (siRNA) into human primary melanocytes. **J Control Release**, v. 133, p. 214-220, 2009.
21. GEUSENS, B.; STROBBLE, T.; BRACKE, S.; DYNODT, P.; SANDERS, N.; GELE, M.G.; LAMBERT, J. Lipid-mediated gene delivery to the skin. **Eur J Pharm Sci**, Article in Press, 2011.
22. GRAYSON, A.C.; DOODY, A.M.; PUTNAM, D. Biophysical and structural characterization of polyethylenimine-mediated siRNA delivery *in vitro*. **Pharm Res**, v. 23, p. 1868-1876, 2006.
23. GÜNTHER, M.; LIPKA, J.; MALEK, A.; GUTSCH, D.; KREYLING, W.; AIGNER, A. Polyethylenimines for RNAi-mediate gene targeting *in vivo* and siRNA delivery to the lung. **Eur J Pharm Sci**, v.77, p. 438-449, 2011.
24. GUO, P.; COBAN, O.; SNEAD, N.M.; TREBLEY, J.; HOEPRICH, S.; GUO, S.; SHU, Y. Engineering RNA for Targeted siRNA Delivery and Medical Application. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 62, p. 650-666, 2010.
25. GUO, C.; WANG, J.; CAO, F.; LEE, R.J.; ZHAI, G. Lyotropic liquid crystal systems in drug delivery. **Drug Discov Today**, v. 15, p. 1032-1040, 2010.
26. GUSTAFSSON, J.; LJUSBERG-WAHREN, H.; ALMGREN, M.; LARSSON, K. Cubic-lipid-water phase dispersed into submicron particles. **Langmuir**, v. 12, p. 4611-4613, 1996.
27. GUSTAFSSON, J.; LJUSBERG-WAHREN, H.; ALMGREN, M.; LARSSON, K. Submicron particles of reversed lipid phases in water stabilized by nonionic amphiphilic polymer. **Langmuir**, v. 13, p. 6964-6971, 1997.
28. HUANG, L.; LIU, Y. In vivo delivery of RNAi with lipid-based nanoparticles. **Annu Res Biomed Eng**, v. 13, p. 507-530, 2011.

29. JACKSON, A.L.; LINSLEY, P.S. Recognizing and avoiding siRNA off-target effects for target identification and therapeutic application. **Nat Rev Drug Discov**, v. 9, p. 57-67, 2010.
30. JENSEN, D.K.; JENSEN, L.B.; KOOCHKEI, S.; BENGTSON, L.; CUN, D.; NIELSEN, H.M.; FOGED, C. Design of an inhalable dry powder formulation of DOTAP-modified PLGA nanoparticles loaded with siRNA. **J Control Release**, v. 157, p. 141-148, 2011.
31. JONES, D. Teaming up to tackle RNAi delivery challenge. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, p. 525-526, 2009.
32. KARAGIANNIS, T.C.; EL-OSTA, A. RNA interference and potential therapeutic applications of short interfering RNAs. **Cancer Gene Ther.**, v.12, p.787-795, 2005.
33. KIGASAWA, K.; KAJIMOTO, K.; HAMA, S.; SAITO, A.; KANAMURA, K.; KOGURE, K. Noninvasive delivery of siRNA into the epidermis by iontophoresis using an atopic dermatitis-like model rat. **Int J Pharm**, v. 383, p. 157-160, 2010.
34. KIM, A.; LEE, E.H.; CHOI, S.; KIM, C. In vitro and in vivo transfection efficiency of a novel ultradeformable cationic liposome. **Biomaterials**, v. 25, p. 305-313, 2004.
35. KRAINEVA, J.; NARAYANAN, R.A.; KONDRASHKINA, E.; THIYAGARAJAN, P.; WINTER, R. Kinetics of lamellar-to-cubic and inter-cubic phases transitions of pure and cytochrome C containing monoolein dispersions monitored by time-resolved small-angle x-ray diffraction. **Langmuir**, v. 21, p. 3559-71, 2005.
36. KWOK, A.; HART, S.L. Comparative structural and functional studies of nanoparticle formulations for DNA and siRNA delivery. **Nanomedicine**, v. 7, p. 210-219, 2011.
37. LARA, M.G.; BENTLEY, M.V.L.B.; COLLETT, J.H. *In vitro* drug release mechanism and drug loading studies of cubic phase gels. **Int J Pharm**, v. 293, p. 241-250, 2005.
38. LARSSON, K. Aqueous dispersion of cubic lipid-water phases. **Curr Opinion Colloid Interf Sci**, v. 5, p. 64-69, 2000.
39. LEACHMAN, S.A.; HICKERSON, R.P.; SCHWARTZ, M.E.; BULLOUGH, E.E.; HUTCHERSON, S.L.; BOUCHER, K.M.; HANSEN, C.D.; ELIASON, M.J.; SRIVATSA, G.S.; KORNBRUST, D.J.; SMITH, F.J.; MCLEAN, W.I.; MILSTONE, L.M.; KASPAR, R.L. First-in-human mutation-targeted siRNA phase Ib trial of an inherited skin disorder. **Mol Ther**, v. 18, p. 442-446, 2010.
40. LEE, J.; KELLAWAY, I.W. Bucal permeation of [D-Ala, D-Leu] enkephalin from liquid crystalline phases of glycerol monooleate. **Int J Pharm**, v. 195, p. 35-38, 2000b.
41. LENZ, G. The RNA interference revolution. **Braz J Med Biol Res**, v. 38, p. 1749-1757, 2005.

42. LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. Interactions of biomacromolecules with reverse hexagonal liquid crystals: Drug delivery and crystallization applications. **J Colloid Interface Sci**, v. 356, p. 375-386, 2011.
43. LIBSTER, D.; ASERIN, A.; WACHTEL, E.; SHOHAM, G.; GARTI, N. An HII liquid crystal-based delivery system for cyclosporine A: Physical characterization. **J Colloid Interface Sci**, v. 308, p. 514-524, 2007.
44. LIBSTER, D.; ASERIN, A.; YARIV, D.; SHOHAM, G.; GARTI, N. Concentration- and Temperature- Induced Effects of Incorporated Desmopressin on the Properties of Reverse Hexagonal Mesophase. **J Phys Chem B**, v. 113, p. 6336-6346, 2009.
45. LINDBLOM, G.; RILFORS, L. Cubic phase and isotropic structures formed by membrane lipids-possible biological relevance. **Biochim Biophys Acta**, v. 988, p. 221-256, 1989.
46. LOPES, L.B.; FERREIRA, D.A.; PAULA, D.; GARCIA, M.T.J.; THOMAZINI, J.A.; FANTINI, M.C.; BENTLEY, M.V.L.B. Reverse hexagonal phase nanodispersion of monoolein and oleic acid for topical delivery of peptides: *in vitro* and *in vivo* skin permeation of cyclosporin A. **Pharm Res**, v.23, p.1332-42, 2006a.
47. LOPES, L.B.; LOPES, J.L.C.; OLIVEIRA, D.C.R.; THOMAZINI, J.A.; FANTINI, M.C.; COLLETT, J.H.; BENTLEY, M.V.L.B. Liquid crystalline phases of monoolein and water for topical delivery of cyclosporin A: characterization and study of *in vitro* and *in vivo* delivery. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 63, p. 146-155, 2006b.
48. LOPES, L.B.; SPERETTA, F.F.F.; BENTLEY, M.V.L.B. Enhancement of skin penetration of vitamin K using monoolein-based liquid crystalline systems. **Eur J Pharm Sci**, v. 32, p. 209-215, 2007.
49. LV, H.; SHUBIOA, Z.; WANG, B.; CUI, S.; YAN, J. Toxicity of cationic lipids and cationic polymers in gene delivery. **J Control Release**, v. 114, p. 100-109, 2006.
50. MANOHARAN, M. RNA interference and chemically modified small interfering RNAs. **Curr Opin Chem Biol**, v. 8, p. 570-579, 2004.
51. MARTIMPREY, H.; VAUTHIER, C.; MALVY, C.; COUVREUR, P. Polymer nanocarriers for the delivery of small fragments of nucleic acids: Oligonucleotides and siRNA. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 71, p. 490-504, 2009.
52. MARTINI, E.; FATTAL, E.; OLIVEIRA, M.C.; TEIXEIRA, H. Effect of cationic lipid composition on properties of oligonucleotide/emulsion complexes: Physico-chemical and release studies. **Int J Pharm**, v. 352, p. 280-286, 2008.
53. MEISTER, G.; TUSCHL, T. mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, v. 431, p. 343-349, 2004.
54. MERKEL, O.M.; BEYERLE, A.; BECKMANN, B.M. ZENG, M.; HARTMANN, R.K.; STÖGER, T.; KISSEL, T.H. Polymer-related off-target effects in non-viral siRNA delivery. **Biomaterials**, v. 32, p. 2388-2398, 2011.

55. MISHRAKI, T.; LIBSTER, D.; ASERIN, A.; GARTI, N. Lysozyme entrapped within reverse hexagonal mesophases: Physical properties and structural behavior. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 75, p. 47-56, 2010.
56. MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.
57. NIMESH, S.; CHANDRA, R. Polyethylenimine nanoparticles as an efficient *in vitro* delivery system. **Eur J Pharm Biopharm**, v. 73, p. 43-49, 2009.
58. NORLING, T.; ENGSTROM, L.P.; LARSSON, K.; KROG, N.; NISSEN, S.S. Formulation of a drug delivery system based on a mixture of monoglycerides and tryglicerides for use in the treatment of periodontal disease. **J Clin Periodontol**, v. 19, p. 687-692, 1992.
59. PHAN, S.; FONG, W.; KIRBY, N.; HABLEY, T.; BOYD, B.J. Evaluating the link between self-assembled mesophase structure and drug release. **Int J Pharm**, v. 421, p. 176-182, 2011.
60. PRAUSNITZ, M.R.; MITRAGOTRI, S.; LANGER, R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. **Nature Rev**, v. 3, p. 115-124, 2004.
61. REISCHL, D.; ZIMMER, M.S.A. Drug delivery os siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems. **Nanomedicine**, v. 5, p. 8-20, 2009.
62. ROSSETTI, F.C.; FANTINI, M.C.A.; CAROLLO, A.R.H.; TEDESCO, A.C.; BENTLEY, M.V.L.B. Analysis of liquid crystalline nanoparticles by small angle X-ray diffraction: Evaluation of drug and pharmaceutical additives influences on the internal structure. **J Pharm Sci**, v. 100, p. 2849-2857, 2011.
63. SCHERLIE, R. The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity *in vitro* on respiratory epithelial cells. **Int J Pharm**, p. 1-8, 2011.
64. SEDDON, A. Bridging the gap between in vitro and in vivo models. **Bristol Centre for Functional Nanomaterials**. Disponível em <<http://www.portal.bcf.n.bris.ac.uk>>. 2010.
65. SHAH, J.C.; SADHALA, Y.; CHILUKURI, D.M. Cubic phase as drug delivery systems. **Adv Drug Deliv Rev**, v. 47, p. 229-250, 2001.
66. SIEKMANN, B.; BUNJES, H.; KOCH, M.H.J.; WETSEN, K. Preparation and structural investigation of colloidal dispersions prepared from cubic monoglycerides-water phases. **Int J Pharm**, v. 54, p. 56-68, 2002.
67. SIFUENTES-ROMERO, I.; MILTON, S.L.; GARCÍA-GASCA, A. Post-transcriptional gene silencing by RNA interference in non-mammalian vertebrate systems: Where do we stand? **Mutat Res**, v. 728, p. 158-171, 2011.
68. SINGH, S. Phase transitions in liquid crystals. **Physics Reporpts**, v. 324, p. 107-269, 2000.

69. SUN, B.K.; TSAO, H. Small RNAs development and disease. **J Am Acad Dermatol**, v.59, p. 725-737, 2008.
70. TAKAHASHI, H.; WANG, Y.; GRAINGER, D.W. Device-based local delivery of siRNA against mammalian target of rapamycin (mTOR) in a murine subcutaneous implant model to inhibit fibrous encapsulation. **J Control Release**, v. 147, p. 400-407, 2010.
71. TOKATLIAN, T.; SEGURA, T. siRNA applications in nanomedicine. **Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol**, v. 2, p. 1-11, 2010.
72. TRAN, M.A.; GOWDA, R.; SHARMA, A.; PARK, E.; ADAIR, J.; KESTER, M.; SMITH, N.B.; ROBERTSON, G.P. Targeting V600EB-Raf and Akt3 using nanoliposomal-small interfering RNA inhibits cutaneous melanocytic lesion development. **Cancer Res**, v.68, p. 7638-7649, 2008.
73. TSENG, Y.; MOZUMDAR, S.; HUANG, L. Lipid-based systemic delivery of siRNA. **Adv Drug Deliv Rev**, v.61, p. 721-731, 2009.
74. TYLE, P. Liquid Crystals and their applications in drug delivery. In: ROSOFF, M. **Controlled release of drugs: Polymer and aggregate systems**. New York: VCH Publishers, 1989. chapter 4, p. 125-162, 1989.
75. VARKOUHI, A.K.; SCHOLTE, M.; STORM, G.; HAISMA, H.J. Endosomal escape pathways for delivery of biological. **J Control Release**, v. 151, p. 220-228, 2011.
76. WHITEHEAD, K.A.; LANGER, R.; ANDERSON, D.G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. **Nat Rev Drug Discov**, v. 8, p. 129-139, 2009.
77. WÖRLE, G.; DRECHSLER, M.; KOCH, M.H.J.; SIEKEMANN, B.; WESTESEN, K.; BUNJES, H. Influence of composition and preparation parameters on the properties of aqueous monoolein dispersions. **Int J Pharm**, v. 329, p. 150-157, 2007.
78. YAGHMUR, A.; GLATTER, O. Characterization and potential applications of nanostructured aqueous dispersions. **Adv Colloid Interface Sci**, v. 147-148, p. 333-342, 2009.
79. ZHANG, X.; MCINTOSH, T.J.; GRINSTAFF, M.W. Functional lipids and lipoplexes for improve gene delivery. **Biochi**, v, 94, p. 42-58, 2012.
80. ZHANG, S.; ZHAO, B.; JIANG, H.; WANG, B.; MA, B. Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA. **J Control Release**, v. 123, p. 1-10, 2007.