UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

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

Danielle de Macedo Mano

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 com vitamina E TPGS 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

Orientadoa: Danielle de Macedo Mano

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

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.

Mano, Danielle de Macedo

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

101 p.; 30cm.

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

Orientador: Bentley, Maria Vitória Lopes Badra.

1. Terapia Gênica. 2. siRNA. 3. Cristal Líquido. 4. Nanodispersões. 5. Vitamina E TPGS

RESUMO

MANO, D. M. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação tópica a base de cristais líquidos com vitamina E TPGS para veiculação de siRNA na terapia gênica**. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Apesar da aparente acessibilidade, a pele é bem protegida contra a absorção de materiais estranhos. Esta função barreira é exercida principalmente pelo estrato córneo. Dessa forma, a administração cutânea de fármacos precisa transpor esta barreira para atingir uma concentração efetiva. Uma maneira de tornar o tratamento eficaz é o uso de injeções, forma de administração muito invasiva e desconfortável para o paciente. A administração tópica é uma forma simples e confortável para a administração cutânea de fármacos. As doenças cutâneas, em geral, são doenças estigmatizadas. Assim, o desenvolvimento de uma formulação capaz de transpor as barreiras impostas a esta via de administração e um novo tratamento para estas doenças complexas, com componentes genéticos, devem ser estudados. O siRNA veiculado com nanocarreadores foi aplicado a esta via de administração. O nanocarreador possibilita um maior tempo de permanência na superfície da pele devido às propriedades adesivas, além de proteger o siRNA contra a degradação. O siRNA visa o bloqueio específico da expressão de genes, por isso é capaz de agir em diferentes caminhos de uma doença. A maior limitação para o uso de siRNA é a incapacidade de difundir-se através das membranas celulares devido a carga negativa, o que gera uma repulsão eletrostática da membrana celular. Portanto, a complexação com um carreador torna a liberação do siRNA no interior celular mais efetiva. É amplamente aceito que o desenvolvimento de um sistema de liberação eficiente é um dos principais obstáculos para transformar siRNA em terapêutica. Consequentemente, o objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento farmacotécnico de um nanocarreador capaz de liberar o siRNA de maneira efetiva na aplicação tópica cutânea, respeitando as peculiaridades desta via. As formulações de monoleína (MO), polietilenoimina (PEI) e diferentes concentrações de vitamina E TPGS, contendo ou não ácido oléico (AO), foram caracterizadas como fases líquido cristalinas com tamanho de partícula e potencial zeta desejado, mostrando-se eficazes em complexar o siRNA. As nanodispersões desenvolvidas foram efetivas na complexação do siRNA, na estabilização deste ácido nucléico frente a degradação enzimática, e na efetiva internalização celular *in vitro* em células de fibroblastos de camundongos L929. As nanodispersões contendo maior quantidade de vitamina E TPGS, ou contendo o AO foram as formulações que promoveram um maior aumento da penetração cutânea de siRNA *in vitro* em peles de modelo animal. Logo, os resultados obtidos permitiram concluir que as formulações desenvolvidas são sistemas de liberação nanotecnológicos, contendo cristais líquidos, promissores para a administração tópica de siRNA, no tratamento de patologias cutâneas na terapia gênica.

Palavras-chave: Terapia gênica, siRNA, cristal líquido, nanodispersões, vitamina E TPGS

ABSTRACT

MANO, D. M. **Development and characterization of topical delivery systems based on liquid crystals with vitamin E TPGS for siRNA in gene.** 2012. 101 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Despite its apparent easy accessibility, the skin is, in fact, well protected against the absorption of foreign materials. The barrier function is imposed, mainly, by the stratum corneum. Thus, the cutaneous administration of drugs needs to overcome this barrier to reach an effective concentration. One way to make an effective treatment is the use of injections, mode of administration very invasive and uncomfortable for the patient. Topical administration is simple and comfortable for cutaneous administration of drugs. Skin diseases, in general, are stigmatized diseases. Therefore, the development of a formulation capable of overcoming the barriers of this route of administration and a new treatment for these complex diseases, with the genetic components, shall be studied. The siRNA in nanocarriers has been applied to this route of administration. The nanocarrier allows siRNA to stay longer on the skin surface because of its adhesive properties, while also protects siRNA against degradation. The siRNA is directed for producing gene-specific inhibition, so it is able to act in different ways to the same disease. The most critical factor limiting the use of siRNA as therapeutics is delivering siRNA to its intracellular target site due to their negative charge, which cause an electrostatic repulsion of the cell membrane. Therefore, complexation with a carrier makes the release of siRNA inside the cells more effective. It is widely accepted that the development of an efficient delivery system is a major obstacle to change siRNA into therapeutics. Consequently, the objective of this work was the pharmacotechnical development of a nanocarrier capable of releasing the siRNA effectively in topical skin, respecting the peculiarities of this pathway. The formulations of monoolein (MO), polyethylenimine (PEI) and different concentrations of vitamin E TPGS, with or without oleic acid (OA), were characterized as liquid crystalline phases with particles size and zeta potential desired, proving to be effective in complexing the siRNA. The nanodispersions developed were effective for the complexation of siRNA, for the stabilization of nucleic acid against enzymatic degradation, and for the effective *in vitro* cellular uptake into cells of mouse fibroblast L929. The nanodispersions containing higher amounts of vitamin E TPGS, or containing OA, have been the formulations which promoted a greater increase in skin penetration of siRNA *in vitro* in animal model skin. Therefore, the results obtained allowed one to conclude that the formulations developed are delivery systems based on nanotechnology, with liquid crystalline phase, promising for topical administration of siRNA, for the treatment of cutaneous diseases in gene therapy.

Keywords: Gene therapy, siRNA, liquid crystal, nanodispersions, vitamin E TPGS

1. INTRODUÇÃO¹

¹ De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR 10520

1.1 A Pele

Para uma administração tópica ser efetiva o fármaco deve vencer a barreira imposta pela pele. Dessa forma, o desenvolvimento de uma formulação tópica deve atentar-se para a estrutura cutânea.

A pele é o órgão mais acessível do corpo humano. Apesar disso, possui importante função como barreira entre o corpo e o ambiente. A pele é a responsável por evitar perda excessiva de água além de possuir um sistema imunológico ativo (HADGRAFT et al., 2008; MENON, 2002).

A pele humana é composta por três camadas de tecidos (**Figura 1**): a epiderme celular, estratificada e avascular; seguida pela derme subjacente, composta de tecido conectivo e, por último a hipoderme, caracterizada pelo depósito de gordura subcutânea (BARRY, 2005; FASOLO, 2007).

Figura 1: Estrutura da pele. Adaptado de Prauznitz et al., 2004.

A camada córnea (estrato córneo) é uma camada constituída por células mortas, quase impermeável, densa, que é crucialmente importante no controle da absorção percutânea de fármacos e outros produtos químicos. Esta camada é formada por células que à medida que envelhecem passam a fabricar e a acumular dentro de si uma proteína resistente e impermeável – a queratina (BARRY, 2005).

Na epiderme não existem vasos sanguíneos, os nutrientes e oxigênio chegam à epiderme por difusão a partir de vasos sanguíneos da derme. A epiderme não se

apresenta, na maioria das vezes, como uma barreira importante à penetração de substâncias (BARRY, 2005).

A derme consiste em uma matriz de tecido conectivo de 3 a 5 mm de espessura entremeada de proteínas fibrosas (colágeno, elastina e reticulina) que são embebidas em uma substância de fundo amorfo, composta por mucopolissacarídeos. Nervos, vasos sanguíneos e linfáticos estão presentes nessa camada. A derme necessita de um suprimento sanguíneo eficiente para transportar nutrientes, remover produtos de degradação, regular a pressão e a temperatura, mobilizar forças de defesa e contribuir para a coloração da pele. O volume generoso de sangue na pele, geralmente age como um sistema *sink*, difundindo as moléculas que alcançam os capilares, mantendo as concentrações penetrantes na derme bastante baixas e maximizando gradientes de concentração epidérmicos, promovendo, dessa forma, a absorção percutânea (MENON, 2002; BARRY, 2005).

1.2 Penetração cutânea de fármacos

O estrato córneo é o principal obstáculo para a liberação tópica de fármacos, uma vez que é uma matriz constituída tanto de regiões hidrofílicas quanto de regiões lipofílicas (FASOLO, 2007).

Em uma situação ideal, o agente tópico utilizado no tratamento deve penetrar o estrato córneo e ficar retido na epiderme e derme em concentração suficiente para produzir efeito terapêutico, sem absorção significativa pela corrente sanguínea, a fim de evitar efeitos sistêmicos, os quais são responsáveis pelos efeitos colaterais (GEUSENS et al., 2011).

O peso molecular e a lipofilicidade são fatores importantes da característica do fármaco que irão determinar a extensão da penetração e da absorção da preparação tópica. Em uma pele saudável, a penetração pela epiderme diminui com um peso molecular superior a 500 Da (RUZICKA; REITAMO, 2004).

Outras características que podem afetar a penetração e absorção da preparação tópica são a concentração, solubilidade, pH, pKa e coeficiente de partição no estrato córneo e no veículo. No caso de moléculas de elevada

permeabilidade, o controle da velocidade de permeação é frequentemente atribuído ao veículo empregado, pois a etapa limitante torna-se a difusão destas moléculas a partir das formulações (FASOLO, 2007).

Fármacos lipofílicos permeiam, preferencialmente, de forma transcelular, ou seja, através das células, enquanto os hidrofílicos usualmente permeiam de maneira paracelular (nos espaços intercelulares) (**Figura 2**). O estroma celular é altamente hidrofílico, portanto, oferece resistência a difusão de substâncias lipofílicas, considerando que as substâncias mais hidrofílicas encontram maior resistência no epitélio. O estroma não constitui uma barreira física a substâncias lipofílicas. Entretanto, isto causa uma partição lenta dos fármacos para partes de domínio hidrofílico e, conseqüente distribuição dos mesmos, constituindo a parte limitante do processo (GEUSENS et al., 2011).

Figura 2: Representação esquemática dos mecanismos de penetração de substâncias através do estrato córneo. Adaptado de: Bolzinger et al., 2012.

O conhecimento da polaridade do fármaco e da rota para a penetração cutânea torna o desenvolvimento farmacotécnico mais efetivo. Entretanto, o desafio é administrar fármacos hidrossolúveis de elevado peso molecular, em uma rota paracelular, uma vez que as pequenas junções intercelulares permitem somente a penetração de moléculas pequenas (CECV; VIERL, 2010; FUENTE et al., 2010).

Logo, compostos como ácidos polinucleicos não penetram livremente a barreira imposta pela pele, ficando retidos na camada superficial (FUENTE et al., 2010).

1.3 Terapia Gênica – RNA de interferência (RNAi)

A terapia gênica foi desenvolvida com a promessa de curar inúmeras doenças (AA et al., 2011), e pode ser definida como um produto medicinal contendo uma substância ativa, constituída parcial ou integralmente por ácido nucleico recombinante. Esta terapia é usada na administração humana, promovendo a regulação, substituição, adição ou deleção de uma sequência genética, podendo ser terapêutico, profilático ou empregada para diagnóstico (YLÄ-HERTTUALA; WIRTH, 2011). Assim, a terapia gênica promove a redução ou silenciamento específico da expressão de genes nas células alvos ou órgãos (MARTIMPREY et al., 2009; YUAN et al., 2010). Desta forma, a terapia gênica tornou-se uma nova estratégia para o tratamento de diversas doenças, tanto genéticas quanto adquiridas, especialmente utilizando o pequeno RNA de interferência (siRNA) (AA et al., 2011; GUO; HUANG, 2011; WANG; LU; CHIANG, 2010; YADAVA; ROURA; HUCHES, 2007).

O potencial terapêutico do siRNA é enorme, sobretudo em processos genéticos que requerem inibição de produtos de genes (GUO, P. et al., 2010). Os melhores candidatos à terapia gênica são aquelas doenças causadas pela mutação em apenas um gene, como a fibrose cística, hemofilia, distrofia muscular e anemia falciforme (REISCHL; ZIMMER, 2009; YADAVA; ROURA; HUCHES, 2007; ZHANG, S. et al., 2012).

Contudo, a utilização da terapia gênica é limitada por problemas relacionados à administração de genes, imunogenicidade, expressão transiente, resposta inflamatória, toxicidade e resposta não específica. A resposta imune dificulta o uso de múltiplas doses. Outro grande problema é garantir a estabilidade biológica, controle e regulação da expressão dos oligonucleotídeos somente na célula alvo (YADAVA; ROURA; HUCHES, 2007).

1.3.1 RNA interferência

A descoberta que genes podem ter sua expressão modulada através do mecanismo de interferência de RNA (RNAi), por Fire e colaboradores em 1998, foi o início de um novo paradigma de como lidar com uma ampla diversidade de doenças (WANG; LU; CHIANG, 2010; YADAVA; ROURA; HUCHES, 2007). Considerando que, teoricamente, qualquer gene pode ter a sua expressão bloqueada, o silenciamento genético desencadeado por RNAi torna-se uma alternativa terapêutica atrativa por possuir elevada potência e especificidade (GRIMM; KAY, 2007).

Atualmente considera-se o que o RNAi está envolvido em, pelo menos, três funções distintas, em praticamente todas as células eucarióticas: defesa na presença de genes virais (AIGNER, 2006; MEISTER; TUSCHL, 2004; MOURRAIN et al., 2000; WOLTERS; MACKEIGAN, 2008), controle e função da estrutura da cromatina e regulação gênica (JACOBSON et al., 2010; SUN; TSAO, 2008; YADAVA; ROURA; HUCHES, 2007).

Após a descoberta do RNAi, a interferência gênica tornou-se um procedimento comum para estudos de função de genes e identificação de genes causadores de doenças. Além de ser uma importante ferramenta de pesquisa, o RNAi é uma grande promessa na terapia gênica para o silenciamento de genes causadores de doenças (GUO, P. et al. 2010; JACKSON; LINSLEY, 2010; LENZ, 2005). Primeiramente atribuiu-se essa atividade às longas moléculas de dsRNA, mas atualmente sabe-se que estas são precursoras de espécies menores muito reativas.

O mecanismo de RNAi é ativado por moléculas endógenas como o micro RNA (miRNA), mas também por RNAs exógenos sintéticos como o *small interference* RNA (siRNA) ou de origem viral como *short hairpin* RNA (shRNA), o qual é degradado em pequenos fragmentos que imitam o silenciamento genético endógeno (PEER; LIEBERMAN, 2011; WOLTERS; MACKEIGAN, 2008).

A tecnologia de RNAi tem sido amplamente empregada na inibição de sequências específicas de genes alvos, em cultura celular e modelos animais (XIA et al., 2002). Mas a introdução de dsRNA, com mais de 30 pares de bases, em células

de mamíferos resulta em uma resposta não específica pelo *interferon*, levando a um silenciamento não específico. Este processo é evitado com o uso de siRNA sintéticos, semelhante ao naturalmente produzido pela Dicer (BRUNO, 2011; GAN et al., 2010; WOODLE; LU, 2005; YADAVA; ROURA; HUCHES, 2007).

1.3.2 Pequeno RNA de interferência (siRNA)

O siRNA é um fragmento de RNAi dupla fita, o qual possui, aproximadamente, 21 a 23 nucleotídeos, que podem ser gerados tanto a partir de uma molécula maior de RNA dupla fita (*double stranded* – dsRNA), quanto podem ser obtidos sinteticamente (CAO et al., 2010; PAULA; BENTLEY; MAHATO, 2007; WANG; LU; CHIANG, 2010).

O dsRNA primeiramente é clivado pela enzima RNase III (ribonuclease III citoplasmática - Dicer) em siRNAs (**Figura 3**). Este siRNA posteriormente é incorporado por proteínas celulares formando um complexo multimérico chamado RISC (*RNA-induced silencing complex*). Este complexo é composto pela proteína Argonata 2 (Ago 2), principal responsável pela seleção da fita de siRNA incorporada ao complexo RISC. Após o siRNA ser incorporado a RISC, uma fita do siRNA é expulsa do complexo (a fita sense), enquanto a outra continua ligada (antisense) formando a RISC ativa. A fita antisense remanescente atua como guia para o pareamento com um RNA mensageiro (mRNA) complementar – que será hidrolisado e degradado pelo complexo formado – consequentemente, a síntese de uma proteína específica será inibida (BRADÁC et al., 2007; BUYENS et al., 2012; HUANG; LIU, 2011; MEISTER; TUSCHL, 2004; YUAN et al., 2010; ZHANG; MCINTOSH; GRINSTAFF, 2012; ZHANG, S. et al., 2012).

Figura 3: Mecanismo celular do RNAi. O RNA dupla fita (dsRNA) é clivado, pela enzima Dicer, em pequenos fragmentos de RNAi (siRNA). Estes siRNAs são incorporados pela RISC, onde as duplas fitas são separadas. A RISC contendo uma fita antisense guia, se liga a uma sequência de mRNA. A sequência de mRNA é clivada pela Argonauta, enzima responsável pela degradação do mRNA, levando a regulação da expressão do mRNA. Adaptado de: Bumcrot et al., 2006.

Este mecanismo primeiramente foi demonstrado *in vitro* em 2001, em células de mamíferos, mostrando que o siRNA é efetivo em concentrações muito menores que o RNA antisense ou ribozimas. Este processo de RNAi é bastante eficiente, pois somente o mRNA é degradado, enquanto o siRNA pode ser utilizado repetidamente em diversas reações catalíticas (BRUNO, 2011; ELBASHIR et al., 2001; PEER; LIEBERMAN, 2011; WANG; LU; CHIANG, 2010).

Além da alta especificidade e da potência do siRNA, para projetar uma terapêutica com o uso desta substância, basta o conhecimento da sequência do gene de interesse, não necessitando de um sistema de expressão celular ou purificação de proteínas, o que resulta em um processo relativamente simples (REISCHL; ZIMMER, 2009). Outra vantagem da terapia gênica com este oligonucleotídeo é o seu mecanismo de ação ocorrer no citoplasma celular, portanto, a membrana nuclear não precisa ser transposta como na utilização de DNA (BUYENS et al., 2012; GUO, P. et al., 2010; HOWARD, 2009; YADAVA; ROURA; HUCHES, 2007).

O primeiro teste clínico ocorreu em 1990 em pacientes portadores de deficiência imune severa combinada (SCID). Recentemente a terapia gênica com

siRNA tem se mostrado eficaz no tratamento de câncer (YADAVA; ROURA; HUCHES, 2007). A terapêutica com o siRNA possui muitas vantagens sobre a terapêutica tradicional. Graças a estas vantagens muitos siRNA terapêuticos entraram em fase II e III de testes clínicos, indicando que a comercialização desta nova classe terapêutica não é uma realidade muito distante (KIM et al., 2004; WANG, J. et al., 2010; ZHANG, S. et al., 2012). Dentre os 25 estudos clínicos em andamento com o uso de siRNA, está o uso de siRNA na Pachyonychia congênita (PC), uma patologia cutânea genética dominante, causada por mutações em genes que codificam a queratina (CLINICAL TRIALS.GOV, 2012). Este é o primeiro estudo de terapia com base em siRNA em pele humana, objetivando avaliar a segurança e a viabilidade de injeções intra-lesionais nos calos de pacientes acometidos pela PC. A fase I desse estudo clínico foi concluída em 2008 (CLINICAL TRIALS.GOV, 2012; LEACHMAN et al., 2010).

O siRNA é capaz de silenciar sequências específicas dos genes, sem alterar o genoma como um todo; esta propriedade pode ser explorada para suprimir proteínas associadas a doenças. Dessa forma, existe um grande interesse em desenvolver uma terapia gênica baseada em siRNA de forma prática, segura e efetiva. Entretanto, as propriedades inerentes do siRNA, tais como o tamanho (~13kDa), a natureza aniônica (~40 cargas negativas do fosfato) e a suscetibilidade a degradação, impossibilitam o uso direto no tratamento de doenças, devido à repulsão eletrostática da superfície aniônica da membrana celular (AKHTAR; BENTER, 2007; BRUNO, 2011; BUMCROT et al., 2006; CHRISTIE et al., 2011; TOKALIAN; SEGURA, 2010; ZHANG et al., 2009). Assim, um sistema de liberação é necessário para aumentar sua estabilidade no meio biológico, bem como facilitar seu acesso ao meio intracelular e possibilitar a ação do ácido nucléico administrado.

1.4 A importância dos sistemas de liberação para veiculação de siRNAs

A ação do siRNA como mediador farmacológico é promissora, mas, infelizmente o siRNA dupla fita não é uma molécula ideal para a administração como fármaco. Os problemas referentes à sua administração vão desde a liberação, a

baixa estabilidade em meio fisiológico, o clearance renal e a ligação efetiva na molécula alvo (ALIABADI et al., 2012; CONLEY; NAASH, 2010; CONTRETAS-RUIZ et al., 2010; SHEN et al., 2011; WANG, J. et al., 2010; YUAN et al., 2010). Logo, a eficácia do siRNA está vinculada a um “carreador” que possa liberá-lo íntegro no sítio de ação.

O siRNA pode ser administrado por meio de dois tipos de vetores: os virais e os não-virais. Os sistemas virais possuem alta eficiência de transfecção e segurança do ponto de vista mutagênico. Contudo, existe a possibilidade de recombinação, efeito oncogênico e imunogênico, podendo ainda causar inflamação no tecido, além de possuir alto custo de produção; estes fatores limitam a aplicação desta terapêutica. Em contrapartida, aos vetores não-virais são atribuídos menores problemas de segurança - devido à relativa simplicidade, fácil obtenção, diversidade de materiais, possibilidade de direcionamento para diferentes alvos celulares – através de modificações estruturais pela incorporação de ligantes, baixa toxicidade e baixo custo. Dessa forma, os vetores não-virais são uma alternativa ao uso de vetores virais, embora com uma taxa de transfecção celular menor (ALSHAMSAN et al., 2010; BLOQUEL et al., 2006; WANG; LU; CHIANG, 2010; XIA et al., 2002; ZHANG, S. et al., 2012).

Vetores não-virais com potencial para a terapia gênica têm sido desenvolvidos para o adequado transporte e liberação de siRNA associado a macromoléculas (AFONIN et al., 2011; BLOQUEL et al., 2006; YADAVA; ROURA; HUCHES, 2007). Tanto polímeros sintéticos como naturais são utilizados como vetores não-virais para a liberação de genes. Os polímeros naturais são basicamente as proteínas como histonas e albumina plasmática cationizada, além dos aminopolissacarídeos - como a quitosana. Já os polímeros sintéticos são em maior quantidade, compreendendo os peptídeos (poli-L-lysina, poli-L-ornitina e poli4-hidroxi-L-prolina éster), poliaminas, polietilenoimina (PEI), polipropilenoamina, lipossomas, lipídios e dendrímeros de poliamidoamina (ARIMA; MOTOYAMA; HIGASHI, 2012; THOMAS; KLIVANOV, 2003; ZHENG; JI; HU, 2011).

A complexação do siRNA com o carreador catiônico ocorre devido a interação eletrostática não específica do grupamento fosfato do ácido nucléico e o grupamento amino do carreador, em adição à hidrofobicidade e ligações de hidrogênio entre o polímero e os nucleotídeos (FUENTE et.al., 2008; MARTIMPREY et al., 2009; WANG; LU; CHIANG, 2010). O uso de grupamentos catiônicos confere ao siRNA

uma maior compactação, e, sua carga global positiva ou neutra, aumenta a internalização celular do complexo (BLOQUEL et al., 2006).

Dentre os adjuvantes mais utilizados e efetivos na farmacotécnica da terapia gênica está o PEI. O PEI é uma poliamina catiônica – de alta densidade de carga, linear ou ramificada (**Figura 4**), utilizada em produção de papel, xampus e purificação de água. A estrutura ramificada favorece a interação com o siRNA, fornecendo partículas menores e uma melhor interação com o alvo (ALSHAMSAN et al., 2010; GAO; LIU; LI, 2011).

Figura 4: Estrutura molecular do PEI (a) forma linear, (b) forma ramificada. Fonte: AIGNER, 2006

No PEI, somente uma das seis aminas estão protonadas no pH fisiológico, resultando em uma alta capacidade de tamponamento e na liberação da carga no ambiente ácido do endossoma, este processo é o “efeito esponja dos prótons” (**Figura 5**). As aminas não protonadas possuem diferentes constantes de dissociação (pK_a), devido a aglomeração das aminas, resultando no efeito tamponante em uma larga faixa de pH. Este efeito tamponante irá proteger o siRNA da degradação no compartimento endosomal durante a maturação, e a posterior fusão com o lisossomo. A capacidade tamponante do PEI causa o influxo de prótons, íons clorido e água para o endossomo, o que eventualmente leva ao rompimento do endossomo devido ao aumento da pressão osmótica, liberando o ácido nucléico para o citoplasma (AKHTAR; BENTER, 2007; BRUNO, 2011; GUO; HUANG, 2011; VARKOUHI et al., 2011; YADAVA; ROURA; HUCHES, 2007).

Figura 5: Transferência de siRNA mediada pelo PEI (polication). Devido a interação eletrostática, o PEI é capaz de complexar o siRNA, levando a uma compactação e formação de pequenas partículas, que são endocitadas. Dependendo do pH, os grupamentos amina do PEI estão protonados, o que aumenta a densidade de carga do PEI. O efeito esponja do próton do PEI causa a ruptura da vesícula endossomal, levando a liberação do siRNA. Adaptado de: Thomas, Klibanov, 2003.

A complexação entre ácidos nucleicos e polycations, além de proteger os genes de enzimas e facilitar a transposição de barreiras celulares, normalmente, resulta em estruturas de tamanho nanométrico (CHRISTIE et al., 2011; NIMESH; CHANDRA, 2009; TRAN et al., 2008; YANG et al., 2012; ZARBIN et al., 2010). Esta modificação aumenta a estabilidade do siRNA sem alterar a sua eficácia (WANG, J. et al., 2010).

Os materiais de base nanotecnológica foram rapidamente desenvolvidos, constituindo o sistema de liberação mais estudado nas duas últimas décadas. Estes sistemas de liberação incluem lipídios e polímeros coloidais. A aplicação da nanotecnologia possui potencial de aplicação na área da saúde, particularmente no desenvolvimento de novos sistemas farmacêuticos. Nanopartículas já foram utilizadas com sucesso para a liberação de fármacos em um sítio específico, e possuem potencial para aumentar a penetração do fármaco através das membranas, aumentando, assim, a ação terapêutica. O uso de nanopartículas tem sido investigado para aumentar a liberação de sistemas baseados em siRNA. As

nanopartículas são geralmente delineadas para superar uma ou mais barreiras impostas ao siRNA (BOURLAIS et al., 1998; CHRISTIE et al., 2011; TOKATLIAN; SEGURA, 2010; WOODLE; LU, 2005; ZARBIN et al., 2010).

A distribuição das nanopartículas ocorre em um curto período de tempo. A expressão é muito superior do que quando comparada à liberação do material genético livre. Com o aumento da estabilidade e do tempo de meia-vida do fármaco, ocorre a diminuição da frequência de aplicação e dos picos plasmáticos, mantendo a liberação do fármaco relativamente estável (minimiza o *burst* devido ao volume reduzido da dose). Os resultados são dependentes das características da nanopartícula formada, como tamanho e carga eletrônica. Além do mais, as nanoformulações podem ser armazenadas em diferentes condições e concentrações, são toleradas em diferentes temperaturas, concentração de sais e pH, e protegem o material encapsulado da degradação de enzimas (AMO; URTTI, 2008; CAI; CONLEY; NAASH, 2008; CONLEY; NAASH, 2010).

Um sistema de liberação de sucesso, para o siRNA, deve possuir, no mínimo, três propriedades: complexar o ácido nucléico; proteger de interações não específicas e promover o *uptake* celular. O PEI complexa o siRNA e promove o *uptake* celular, mas não o protege e é um composto muito tóxico. Atualmente, nenhum material possui estas três características concomitantemente, por isso são usadas associações. Dessa forma, combinar o PEI com sistemas de liberação macromoleculares é uma alternativa (BORGER et al., 2011; JONES, 2009; WOODLE; LU, 2005).

1.5 Cristais-líquidos

O sucesso de qualquer terapia, inclusive a terapia gênica, depende da eficiência do sistema de liberação (WANG; LU; CHIANG, 2010). A tentativa de desenvolver novos sistemas de liberação de fármacos tem por objetivo estabelecer alternativas terapêuticas mais eficazes, porém mais seguras e com efeitos colaterais mínimos (BARRATT; FATTAL, 2009). Através de nanodispersões de cristais líquidos formadas por materiais biocompatíveis, o ativo pode ser transportado sem sofrer

degradação e ter uma liberação efetiva, por facilitar a penetração pela membrana plasmática.

A formação de estruturas bem definidas, com morfologia controlada e estrutura em escala nanométrica, é uma tecnologia muito importante em muitas aplicações farmacêuticas (KRAINEVA et al., 2005; YAGHMUR; GLATTER, 2009).

Os cristais líquidos são fases da matéria que podem ser desenvolvidas por compostos orgânicos anfifílicos, exibindo uma fase de transição entre o estado sólido e o líquido, denominada mesofase. Eles possuem simetria, ordem, mobilidade e propriedades mecânicas intermediárias entre sólidos e líquidos, ou seja, cristais líquidos apresentam ordem posicional e orientacional - como no estado sólido, e também fluidez e mobilidade - característicos do estado líquido (HO et al., 1996; LOCKWOOD; GUPTA; ABBOTT, 2008; MÜLLER-GOYMANN, 2004; SINGH, 2000). Estas moléculas anfifílicas se estruturam, na presença de água, em diversas formas topológicas, desenvolvendo uma, duas ou três dimensões (polimorfismo). Pequenas alterações moleculares ou em seu meio (pH, temperatura, presença de íons, etc.), determina a fase da partícula e a sua morfologia (GUO, C. et al., 2010; KULKARNI; MEZZENGA; GLATTER, 2010; YAGHMUR; GLATTER, 2009).

Lipídios de membrana são um exemplo de organização biológica com comportamento de mesofase. Nesse contexto, o uso de cristais líquidos como sistema de liberação pode mimetizar condições biológicas naturais (BARAUSKAS et al., 2010; HO et al., 1996). Estas fases biologicamente compatíveis mostram um grande potencial para a liberação de fármacos em diferentes vias de administração, inclusive com a incorporação de promotores de absorção (BILEWICZ; ROWINSKI; ROGASKA, 2005; LOPES et al., 2006; SHAH; SADHALA; CHILUKURI, 2001; YAGHMUR; GLATTER, 2009).

Materiais que formam cristais líquidos pela adição de solventes são chamados cristais líquidos liotrópicos (LLC), enquanto cristais líquidos termotrópicos (TLC) têm sua estabilidade dependente da temperatura (BARRATT; FATTAL, 2009).

LLC são compostos por pelo menos uma molécula anfifílica e um solvente, os quais se organizam de maneiras específicas, formando mesofases lamelares, cúbicas ou hexagonais (**Figura 6**). Geralmente, lipídios polares e uma fase aquosa são utilizados para formar mesofases hexagonais, em que o lipídio absorve certa quantidade de água e, espontaneamente, forma uma fase de gel com estruturas

internas únicas, nas quais os princípios ativos podem ser incorporados (GUO, C. et al., 2010; LIBSTER; ASERIN; GARTI, 2011; SINGH, 2000).

O fenômeno essencial comum aos estados mesomórficos é o arranjo molecular com alta ordenação interna e simetria com ampla área interfacial, caracterizado por regiões hidrofílicas e lipofílicas alternadas, alinhando-se ao longo de uma direção específica (MISHRAKI et al., 2010). Estas estruturas apresentam a capacidade de incorporar moléculas hidrofílicas, lipofílicas e anfifílicas, podendo conter fármaco nas duas camadas dependendo da solubilidade do fármaco, desde que o mesmo não rompa a estrutura (MISHRAKI et al., 2010; SHAH; SADHALA; CHILUKURI, 2001). Os cristais líquidos podem apresentar todas as formas agregadas (**Figura 6**), com exceção das fases micelares (HAFEZ; CULLIS, 2001; LINDBLOM; RILFORDS, 1989).

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

A fase lamelar constitui a forma de organização mais simples. Apresenta estrutura unidimensional paralela, na forma de bicamadas lipídicas intercaladas por fases aquosas. Os grupamentos polares das moléculas encontram-se adjacentes e projetados para a interface aquosa, enquanto as caudas hidrocarbonadas encontram-se dispostas paralelamente. Essa fase é caracterizada por sua fluidez e anisotropia, sendo visualizada no microscópio de luz polarizada como cruzes de Malta isoladas ou cordões finos que representam bicamadas (MÜLLER-GOYMANN, 2004; SHAH; SADHALA; CHILUKURI, 2001; TYLE, 1989).

A fase hexagonal consiste em estruturas bidimensionais cilíndricas de lipídios em um arranjo hexagonal, favorecido termodinamicamente. Na fase hexagonal normal as partes polares dos lipídios estão voltadas para a superfície do cilindro. Na fase hexagonal reversa são as cadeias apolares que estão voltadas para fora. Sua obtenção torna-se possível pela adição de compostos apolares ao sistema. Essa fase é anisotrópica, apresentando estruturas angulares na forma de estrias não-geométricas quando visualizada no microscópio de luz polarizada (MÜLLER-GOYMANN, 2004; SHAH; SADHALA; CHILUKURI, 2001). Sua viscosidade intermediária entre a fase lamelar e a fase cúbica é uma importante propriedade, a qual facilita suas aplicações práticas (LIBSTER et al., 2009).

A fase cúbica apresenta-se como uma estrutura única, sob o arranjo tridimensional. Formada por bicamadas lipídicas curvas separando dois canais congruentes de água. Macroscopicamente caracteriza-se por um gel rígido transparente, ressoante, isotrópico e termodinamicamente estável na presença de excesso de água (AI; CAFFREY, 2000; MÜLLER-GOYMANN, 2004; SHAH; SADHALA; CHILUKURI, 2001; TYLE, 1989). Neste tipo de fase a molécula encontra-se mais aprisionada, tendo que difundir por vários canais, portanto, a liberação é mais prolongada (MÜLLER-GOYMANN, 2004).

A monoleína (MO) (**Figura 7**) é um monoglicerídeo insaturado de cadeia longa, amplamente utilizada em veículos para liberação tópica e transdérmica de fármacos. Devido a sua característica anfifílica, possui capacidade de incorporar moléculas tanto lipofílicas quanto hidrofílicas e modular a liberação destas substâncias. Outra possibilidade é a sua utilização como lipídio estrutural na formação de cristais líquidos. Além disso, é biodegradável e biocompatível, o que torna seu uso irrestrito a qualquer via de administração (LEE; KELLAWAY, 2000; LIBSTER et al., 2007; TURCHIELLO et al., 2003).

Figura 7: Estrutura química da monoleína. Adaptado de: Clogston et al., 2000.

A formação das diferentes mesofases ocorre pela hidratação das porções hidrofílicas da MO, através de ligações de hidrogênio, enquanto as cadeias alifáticas

se agregam devido às interações de van der Waals. Em excesso de água, se ordena como fases cúbicas bicontínuas, em temperatura fisiológica. Entretanto, as nanopartículas podem ser feitas por uma combinação de lipídios com a MO. Quando adicionado de outros lipídios anfífilos, formam diferentes tipos de nanoestruturas ordenadas inversamente (BARAUSKAS et al., 2010; GAN et al., 2010; LOPES et al., 2007; YAGHMUR; GLATTER, 2009).

O tipo de mesofase formada depende da geometria molecular desenvolvida pela anfífila. Dessa maneira, a teoria do fator de empacotamento (FE) pode ser utilizada para prever a geometria molecular do sistema anfífila/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 anfífila e l é o comprimento da anfífila. Dependendo do valor de FE, diferentes mesofases líquido-cristalinas podem ser obtidas decorrentes da auto-organização das moléculas da anfífila no ambiente hidrofílico como mostra a **Figura 8** (FONG; LE; DRUMMOND, 2012; GUO, P. 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 e Drummond, 2012; Guo, P. et al., 2010.

Micelas e fases hexagonais normais são formadas quando o FE é menor que 1. Quando as anfífilas se auto organizam formando a fase lamelar, o FE é igual a 1. Valores de FE maiores que 1 indicam a formação de fase reversa, podendo ser fase cúbica, hexagonal ou micelares (FONG; LE; DRUMMOND, 2012; GUO et al.; 2010).

A alteração das condições físicas (como temperatura e pressão) podem induzir a transição de fase nos sistemas líquido-cristalinos. Mas, a transição de fase também pode ser induzida pela adição de um terceiro componente ao sistema anfífilo/água, como o ácido oléico (AO), ácido acetil salicílico, vitamina E, dentre outros (CABOI et al., 2001; FERREIRA et al., 2006; FONG; HANLEY; BOYD, 2009; GUO et al., 2010; PHAN et al., 2011).

A vitamina E TPGS (D- α -tocoferol polietileno glicol 1000 succinato) (**Figura 9**) é um derivado da vitamina E, solúvel em água, formado pela esterificação do succinato de vitamina E com polietilenoglicol 1000 (WU; HOPKINS, 1999).

Figura 9: Estrutura química da vitamina E TPGS. Adaptado de: Mu e Feng, 2002.

O acréscimo de vitamina E TPGS, além de atuar como promotor de absorção interage com a MO e modifica a estrutura formada. O uso conjunto de diferentes promotores de absorção pode resultar em um efeito sinérgico ou aditivo na penetração, sem aumentar os efeitos indesejáveis (FONG; HANLEY; BOYD, 2009; LOPES et al., 2006b).

A estrutura química da vitamina E TPGS apresenta propriedades anfífilas, que, em meio aquoso, leva a formação espontânea de bicamadas lipídicas, termodinamicamente estáveis, as quais podem assumir formas geométricas e estruturas organizadas (**Figura 10**) (SHAH; SADHALA; CHILUKURI, 2001). A absorção é imediata, mas demora cerca de 2 horas para a dissolução ser completa. Contudo, a estabilidade é atingida em 24 horas (WU; HOPKINS, 1999).

Figura 10: Fases líquido cristalinas estruturadas pela vitamina E TPGS em água à 37°C. Adaptado de: Wu; Hopkins, 1999.

Sua relação estrutura/atividade sugere que, a vitamina E TPGS, pode aumentar a solubilidade do fármaco veiculado, a permeabilidade e a biodisponibilidade. A vitamina E TPGS também confere proteção de fármacos e proporciona menor irritabilidade do tecido, sendo utilizada em inúmeras formas farmacêuticas (ESMAEILI; ATYABI; DINARVAND, 2007; SHIN; KIM, 2003; WU; HOPKINS, 1999).

Assim como a MO, a vitamina E TPGS pode ser um veículo interessante para liberação tópica de fármacos, pois pode ser usada como agente solubilizador ou como promotor de absorção (MU; FENG, 2002).

Composições específicas de anfífilas e adjuvantes permitem que os sistemas líquido-cristalinos sejam estáveis na presença de excesso de água e, dessa maneira, podem ser dispersos utilizando estabilizadores (tensoativos). Uma efetiva sonicação permite reduzir o tamanho de partícula de maneira homogênea, obtendo as estruturas nanométricas com a mesma organização da fase líquido-cristalina no seu interior. Dispersões aquosas nanoestruturadas de cristais líquidos possuem amplo potencial de utilização, pois são compostas de lipídios biodegradáveis, podem carrear grande quantidade de princípios ativos - com diferentes propriedades, possuem grande área superficial e são estáveis termodinamicamente. Portanto, trata-se de uma estratégia promissora para garantir sistemas de liberação eficazes com boa biodisponibilidade e segurança (BARAUSKAS et al., 2010; GUO et al., 2010; HO et al., 1996; LOPES et al., 2007; SIEKMANN et al., 2002; YAGHMUR; GLATTER, 2009). Além disso, nanoestrutura e as propriedades reológicas das dispersões de cristais líquidos conferem bioadesão à dispersão, contribuindo, assim, para a aplicação tópica (de fármacos de baixo peso molecular a ácidos nucleicos) (GAO et al., 2012; GUO et al., 2010; KULKARNI; MEZZENGA; GLATTER, 2010; LOPES et al., 2007; WÖRLE et al., 2007).

Devido às características positivas relatadas sobre os cristais líquidos (biocompatibilidade, nanodimensão, promotor de absorção) (INTRA; SALEM, 2008; GÜNTER et al., 2011), a associação da MO e da vitamina E TPGS com o PEI, pode permitir a viabilização da aplicação do siRNA num sistema líquido cristalino tópico.

1.6 Via de administração tópica para siRNAs

A administração de compostos na pele é extremamente atrativa; não apenas objetivando um efeito local (administração tópica), efetivo e seguro - como também para o efeito sistêmico (administração transdérmica), combinando a comodidade do paciente à ausência de metabolismo hepático e efeitos adversos sistêmicos. Entretanto, a penetração de macromoléculas através da pele é dificultada devido à função barreira deste tecido, exercida principalmente pelo estrato córneo. Dessa forma, torna-se necessário o desenvolvimento de sistemas de liberação adequados, seguros e eficazes para a veiculação de diversos fármacos (PRAUZNITZ; MITRAGOTRI; LANGER, 2004).

O preparo de uma formulação tópica deve ser realizado com base no conhecimento do tecido, não basta preparar uma formulação levando em consideração somente as características do fármaco, uma vez que, ao ser aplicada, a formulação irá interagir com o tecido podendo causar irritações e desconforto para o paciente.

A facilidade de acesso e a administração local do siRNA, são as características que tornam as desordens relacionadas à pele, como a psoríase e dermatite atópica, atrativas para a terapia com siRNA (GEUSENS et al., 2009; KIGASAWA et al., 2010; WANG et al., 2007).

As barreiras para a liberação do siRNA são muitas, não somente relacionadas as suas características físico-químicas, mas dependentes do órgão alvo e da rota de administração (**Figura 11**). Em geral, a liberação local do siRNA possui menos barreiras do que quando comparado a liberação sistêmica (REISCHL; ZIMMER, 2009; WANG, J. et al., 2010).

A primeira barreira a ser transposta, em uma administração sistêmica, é a remoção do sangue e posterior excreção pelo rim. O siRNA ainda é alvo da degradação enzimática, e da distribuição não-específica. Estes fatores podem ser contornados através do uso de um sistema de liberação adequado, que promova a proteção do siRNA contra a degradação, redução da excreção, e direcionamento ao tecido alvo (AFONIN et al., 2011; WANG, J. et al., 2010; WOODLE; LU, 2005).

Figura 11: Barreiras na liberação do siRNA sistêmico. Entre as barreiras biológicas à liberação de siRNA estão a degradação do siRNA e dos seus carreadores; absorção protéica (opsonização) e fagocitose pelo sistema fagocitário mononuclear; e entrada no sistema do retículo endotelial. As barreiras de biodistribuição e penetração estão relacionadas a estrutura fisiológica do alvo. Barreiras da internalização celular são dependentes das propriedades do siRNA e seus carreadores. A maior barreira para a liberação de siRNA, no sítio de ação, é o escape endossomal e a degradação por lisosimas. Adaptado de: Wang, J. et al., 2010.

A difusão no tecido alvo é o ponto de convergência, no qual as barreiras biológicas passam a ser comuns tanto à aplicação sistêmica, quanto à aplicação local. Ao atingir o tecido alvo, o siRNA deve ser capaz de difundir-se pelo tecido ou órgão-alvo. Após esta difusão, a membrana plasmática celular deve ser transposta. O sistema de liberação promove a superação das barreiras biológicas de maneira mais eficaz. Contudo, é na internalização celular que o uso de um sistema de

liberação passa a ser primordial. A carga residual positiva ou neutra do complexo sistema de liberação – siRNA irá permitir a internalização celular do siRNA, o qual, se estivesse na forma livre não conseguiria transpor a membrana celular devido a carga negativa. Uma vez internalizado, o sistema de liberação deve ser capaz de promover o escape endossomal, liberando o conteúdo do endossomo no citoplasma celular antes que ocorra a metabolização do siRNA pela ação dos lisossomos e, desligar-se do siRNA, permitindo que ocorra um eficiente silenciamento gênico (BUYENS et al., 2012; REISCHL; ZIMMER, 2009; TOKATLIAN; SEGURA, 2010; WANG, J. et al., 2010; ZHANG; MCINTOSH; GRINSTAFF, 2012).

Assim, o uso de nanocarreadores permite uma maior interação da formulação com estruturas específicas da pele, transpondo barreiras do estrato córneo e aumentando a residência no tecido alvo. Dessa maneira, os nanocarreadores aumentam o interesse para aplicações tópicas, isto devido à capacidade de proteger a molécula enquanto facilita o transporte a diferentes compartimentos. Além do mais, nanoestruturas são de fácil obtenção, oferecem bioadesão e a possibilidade de controlar a liberação de fármacos, o que é atrativo para o tratamento de doenças tópicas, tornando-se um sistema clinicamente aplicável (BLOQUEL et al., 2006; FUENTE et al., 2010; HAO et al., 2010; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2009).

Considerando as características necessárias a um sistema de liberação eficaz e as propriedades estruturais da pele, a presente pesquisa propôs a associação de MO, vitamina E TPGS e PEI num de sistemas de nanopartículas de estrutura líquido cristalina para a aplicação tópica de siRNAs, como uma nova proposta para a terapia gênica de doenças cutâneas.

2. CONCLUSÕES

Através das análises realizadas com os sistemas líquido-cristalinos, pode-se concluir que:

- A microscopia de luz polarizada fornece um indicativo da fase líquido-cristalina das formulações, podendo ser complementar à difração de raios X. Assim, a análise conjunta dos dados permite a melhor interpretação dos resultados. Além disso, a adição de siRNA às nanodispersões do sistema MO/PEI/FA, em diferentes concentrações de vitamina E TPGS, não alterou a ordenação das fases líquido-cristalinas bem estruturadas. O sistema MO/AO/PEI/vitamina E TPGS/FA possui um melhor empacotamento após a adição de siRNA.
- As nanodispersões desenvolvidas (MO/PEI/FA e MO/AO/PEI/FA) apresentaram características físico-químicas muito diversas, após a incorporação com diferentes concentrações de vitamina E TPGS. Enquanto o tamanho médio e a polidispersividade das partículas foram menores e mais homogêneos, após 7 dias de estabilização, para o sistema MO/PEI/FA, a estabilização por um período maior, interferiu negativamente nas características físico-químicas do sistema com AO, aumentando a polidispersividade.
- As dispersões testadas foram capazes de complexar o siRNA, uma vez que a quantidade de PEI em cada sistema não se altera.
- Somente as nanodispersões com fase líquido-cristalina estáveis foram capazes de conferir estabilidade ao siRNA contra degradação enzimática em FBS, o que atesta a importância deste sistema de liberação tanto para administração tópica como sistêmica, neste quesito.
- A estabilidade do gel de cristal líquido é mantida pelo tempo analisado, 21 dias, podendo ser utilizado para uma nova nanodispersão.
- A transfecção proporcionada pelas nanodispersões, com fase estável, foi efetiva, mas não apresentaram vantagem significativa da proporcionada pelo PEI.
- A utilização das nanodispersões de fase líquido-cristalina permitiu a penetração cutânea *in vitro* do siRNA-FAM (10 μ M) nas camadas do estrato córneo em diferentes proporções. Neste modelo de penetração *in vitro*

(multicamadas), a vantagem das nanodispersões, frente aos controles, foi evidente. Foi obtida uma relação direta entre a concentração de vitamina E TPGS e a profundidade da penetração. Entre as nanodispersões estudadas, o sistema contendo AO foi o mais efetivo, possibilitando a penetração nas camadas mais profundas da pele, demonstrando a importância da presença deste promotor de absorção nos sistemas.

Tendo como base os resultados apresentados, conclui-se que as formulações de cristais líquidos desenvolvidas são sistemas de liberação de base nanotecnológica com potencial para o uso em terapia gênica com siRNA, permitindo o tratamento tópico de doenças cutâneas.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS²

² De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas NBR6023.

AA, L.; VADER, P.; STORM, G.; SCHIFFELERS, R. M.; ENGBERSEN, J. F, J. Optimization of poly(amido amine)s as vectors for siRNA delivery. **J. Controll. Rel.**, v. 150, p. 177-186, 2011.

ABE, K.; MATSUKI, N. Measurement of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction activity and lactate dehydrogenase release using MTT. **Neurosci. Res.**, v. 38, p. 325-329, 2000.

AFONIN, K. A.; GRABOW, W. W.; WALKER, F. M.; BINDEWALD; E.; DOBROVOLSKAIA, M. A.; SHAPIRO, B. A.; JAEGER, L. Design and self-assembly of siRNA-functionalized RNA nanoparticles for use in automated nanomedicine. **Nat. Protoc.**, v. 6, n. 12, p. 2022-2034, 2011.

AI, X.; CAFFREY, M. Membrane protein crystallization in lipidic mesophases: detergent effects. **Biophys J**, v.78, p.394-405, 2000.

AIGNER, A. Delivery systems for the direct application of siRNA to induce RNA interference (RNAi) *in vivo*. **J. Biomed. Biotechnol.**, p. 1-15, 2006.

AKHTAR, S.; BENTER, I. F. Nonviral delivery of synthetic siRNAs *in vivo*. **J. Clin. Invest.**, v. 117, p. 3623-3632, 2007.

AL-ABD, A. M. LEE, S. H.; KIM, S. H.; CHA, J.; PARK, T. G.; LEE, S. J.; KUH, H. Penetration and efficacy of VEGF siRNA using polyelectrolyte complex micelles in a human solid tumor model *in-vitro*. **J. Controll. Rel.**, v. 137, p. 130-135, 2009.

ALIABADI, H. M.; LANDRY, B.; SUN, C.; TANG, T.; ULUDAQ, H. Supramolecular assemblies in functional siRNA delivery: Where do we stand? **Biomaterials**, v.33, n. 8, p. 2546-2569, 2012.

ALSHAMSAN, A.; HAMDY, S.; SAMUEL, J.; EL-KADI, A. O. LAVASANIFAR, A.; ULUDAG, H. The induction of tumor apoptosis in B16 melanoma following STAT3 siRNA delivery with a lipid-substituted polyethylenimine. **Biomaterials**, v. 31, n. 6, p. 1420-1428, 2010.

AMAR-YULI, I.; ASERIN, A.; GARTI, N. Solubilization of Nutraceuticals into Reverse Hexagonal Mesophases. **J Phys Chem B**, v. 112, p. 10171–10180, 2008.

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.

AMO, E. M.; URTTI, A. Current and future ophthalmic drug delivery systems. A shift to the posterior segment. **Drug Discov. Today**, v. 13, n. 3/4, p. 135-143, 2008.

ATKINS, P.W. Diffraction techniques. In: ATKINS, P.W. **Physical chemistry**. Oxford University Press, 1998. p. 619-646.

BARRATT, G.; FATTAL, E. Nanotechnologies and controlled release systems for the delivery of antisense oligonucleotides and small interfering RNA. **Br J Pharmacol**, v. 157, p. 179-194, 2009.

BARRY, B. Liberação transdérmica de fármacos. In: AULTON, M. E. *Delineamento de Formas Farmacêuticas*. Tradução George G. Ortega et al. Porto Alegre: Artmed, 2005.

BILEWICZ, R.; ROWINSKI, P.; ROGASKA, E. Modified electrodes based on lipidic cubic phases. **Bioelectrochemistry**, v. 66, p. 3-8, 2005.

BLOQUEL, C.; BOURGES, J. L.; TOUCHARD, E.; BERDUGO, M.; BENEZRA, D.; BEHAR-COHEN, F. Non-viral ocular gene therapy: Potential ocular therapeutic avenues. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 58, n. 11, p. 1224-1242, 2006.

BOLZINGER, M.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; CHEVALIER, Y. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.**, v.17, p. 156-165, 2012.

BORGER, J. G.; CARDENAS-MAESTRE, J. M.; ZAMOYSKA, R.; SANCHEZ-MARTIN, R. M. Novel strategy for microsphere-mediated DNA transfection. **Bioconjug. Chem.**, v. 22, n. 10, p. 1904-1908, 2011.

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.

BOURLAIS, C. L.; ACAR, L.; ZIA, H.; SADO, P. A.; NEEDHAM, T.; LEVERGE, R. Ophthalmic drug delivery systems – Recent advances. **Prog Retin Eye Res.**, v. 17, p. 33-58, 1998.

BRADÁČ, I.; SVOBODOVÁ, V. R.; WACENOVSKY, M.; SKRDLA, M.; PLCHÚT, M.; POLCÍK, M. siRNA selection criteria – Statistical analyses of applicability and significance. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 359, p. 83-87, 2007.

BRUNO, K. Using drug-exciipient interactions for siRNA delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 63, p. 1210-1226, 2011.

BUMCROT, D.; MANOHARAN, M.; KOTELIANSKY, V.; SAH, D. W. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. **Nat. Chem.I Biol.**, v. 2, n. 12, p. 711-719, 2006.

BUYENS, K.; SMEDT, S. C. de; BRAECKMANS, K.; DEMEESTER, J.; PEETERS, L.; GRUNSVEN, L. A. van; SAWANT, R.; TORRCHILIN, V.; FARKASOVA, K.; OGRIS, M.; SANDERS, N. N. Liposome based systems for systemic siRNA delivery: Stability in blood sets the requirements for optimal carrier design. **J. Control. Release**, v. 158, n. 3, p. 362-370, 2012.

CABOI, F.; AMICO, G. S.; PITZALIS, P.; MONDUZZI, M.; NYLANDER, T.; LARSSON, K. Addition of hydrophilic and lipophilic compounds of biological relevance to the monoolein/water system. I. Phase behavior. **Chem. Phys. Lipids.**, v. 109, p. 47-62, 2001.

CAI, X.; CONLEY, S.; NAASH, M. Nanoparticle applications in ocular gene therapy. **Vision Res.**, v. 48, n. 3, p. 319 – 324, 2008.

CAO, H.; JIANG, X.; CHAI, C.; CHEW, S. Y. RNA interference by nanofiber-based siRNA delivery system. **J. Control. Release**, v. 144, n. 2, p. 203-212, 2010.

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.

CHEN, W.; MIAO, Y.; FAN, D.; YANG, S.; LIN, X.; MENG, L.; TANG, X. Bioavailability study of berberine and the enhancing effects of TPGS on intestinal absorption in rats. **AAPS**, v. 12, n. 2, p. 705-711, 2011.

CHRISTIE, R. J.; MIYATA, K.; MATSUMOTO, Y.; NOMOTO, T.; MENASCO, D.; LAI, T. C.; PENNISI, M.; OSADA, K.; FUKUSHIMA, S.; NISHIYAMA, N.; YAMASAKI, Y.; KATAOKA, K. Effect of polymer structure on micelles formed between siRNA and cationic block copolymer comprising thiols and amidines. **Biomacromolecules**, v. 12, n. 9, p. 3174-3185, 2011.

CLINICAL TRIALS.GOV. Clinical trials with siRNA. Disponível em <<http://www.clinicaltrials.gov>>. Acesso em: 2 jul. 2012.

CLOGSTON, J.; RATHMAN, J.; TOMASKO, D.; WALKER, H.; CAFFREY, M. Phase behavior of monoacylglycerol (MYverol 18-99)/water. **Chem. Phys. Lipids**, v.107, n. 2, p.191-220, 2000.

CONLEY, S. M.; NAASH, M. I. Nanoparticles for retinal gene therapy. **Prog. Retin. Eye Res.**, v. 29, n. 5, p. 376-97, 2010.

DONG, Y.; BOYD, B.J. Applications of X-ray scattering in pharmaceutical science. **Int. J. Pharm.**, v. 417, p. 101-111, 2011.

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.

ESMAEILI, F.; ATYABI, F.; DINARVAND, R. Preparation of PLGA nanoparticles using TPGS in the spontaneous emulsification solvent diffusion method. **J. Exp. Nanosci.**, v. 2, n. 3, p. 183-192, 2007.

FASOLO, D. **Nanoemulsões contendo quercetina e 3-o-metilquercetina: estudos de formulação e permeação cutânea**. 2007. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

FERREIRA, D. A.; BENTLEY, M. V.; KARLSSON, G.; EDWARDS, K. Cryo-TEM investigation of phase behavior and aggregate structure in dilute dispersions of monoolein and oleic acid. **Int. J. of Pharm**, v. 310, p. 203-212, 2006.

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.

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.

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.

FUENTE, M. de la; SEIJO, B.; ALONSO, M. J. Novel hyaluronic acid-chitosan nanoparticles for ocular gene therapy. **Invent. Ophthalmol. Vis. Sci.**, v. 49, n. 5, p. 2016-2024, 2008.

FUENTE, M. de la; RAVIÑA, M.; PAOLICELLI, P.; SANCHES, A.; SEIJO, B.; ALONSO, M. J. Chitosan-based nanostructures: A delivery platform for ocular therapeutics. **Ad. Drug Del. Rev.**, v. 62, p. 100-117, 2010.

GAN, L.; HAN, S.; SHEN, J.; ZHU, J.; ZHU, C.; ZHANG, X.; GAN, Y. Self-assembled liquidcrystalline nanoparticles as a novel ophthalmic delivery system for dexamethasone: Improving preocular retention and ocular bioavailability. **Int. J. Pharm.**, v. 396, p. 179–187, 2010.

GAO, L.; LIU, G.; MA, J.; WANG, X.; ZHOU, L.; LI, X. Drug nanocrystals: *in vivo* performances. **J. Control. Release**, v. 160, n. 3, p. 418-430, 2012.

GAO, Y.; LIU, X. L.; LI, X. R. Research progress on siRNA delivery with nonviral carriers. **Int. J. Nanomedicine**, v. 6, p. 1017-1025, 2011.

GEUSENS, B.; LAMBERT, J.; SMEDT, S.C. de; BUYENS, K.; SANDERS, N.N.; GELE, M. van Ultradeformable cationic liposomes for delivery of small interfering RNA (siRNA) into human primary melanocytes. **J. Control. Release**, v. 133, p. 214-220, 2009.

GEUSENS, B.; STROBBLE, T.; BRACKE, S.; DYNOODT, P.; SANDERS, N.; GELE, M. van; LAMBERT, J. Lipid-mediated gene delivery to the skin. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 43, n. 4, p. 199-211, 2011.

GHOSH, I.; MICHNIAK-KOHN, B. Design and characterization of submicron formulation for a poorly soluble drug: The effect of vitamin E TPGS and other solubilizers on skin permeability enhancement. **Int. J. Pharm.**, v. 434, n.1/2, p. 90-98, 2012.

GRIMM, D.; KAY, M. A. Therapeutic application of RNAi: is mRNA targeting finally ready for prime time? **J. Clin. Invest.**, v. 117, n. 12, p. 3633-3641, 2007.

GÜNTHER, M.; LIPKA, J.; MALEK, A.; GUTSCH, D.; KREYLING, W.; AIGNER, A. Polyethylenimines for RNAi-mediated gene targeting *in vivo* and siRNA delivery to the lung. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v.77, p. 438-449, 2011.

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.

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.

GUO, S.; HUANG, L. Nanoparticles Escaping RES and Endosome: Challenges for siRNA Delivery for Cancer Therapy. **J. Nanomater.**, v. 2011, 2011.

GUSTAFSSON, J., LJUSBERG-WAHREN, H., ALMGREN, M., LARSSON, K. Cubic-lipid-water phase dispersed into submicron particles. **Langmuir**, v. 12, p. 4611-4613, 1996.

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.

HADGRAFT, J.; LANE, M. E.; WATKINSON, A. C. Dermal and transdermal drug delivery. In: ROBERTS, M. S. et. al. *Modified-release drug delivery technology*. 2^oed. Informa Health Care, v. 2, Cap 20, p. 263-267, 2008.

HAFEZ, I. M.; CULLIS, P.R. Roles of lipid polymorphism in intracellular delivery. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v.47, n.2-3, p.139-148, 2001.

HAO, J.; LI, S. K.; KAO, W. W. Y.; LIU, C. Gene delivery to cornea. **Brain Res. Bull.**, v. 81, p. 256-261, 2010.

HO, M.; HAFEGEE, J.; NEWTON, R.; ZHOU, Y.; BOLTON, J. S.; ROSS, S. Organisms as polyphasic liquid crystals. **Bioelectrochem. Bioenerg.**, v. 41, p. 81-91, 1996.

HOWARD, K. A. Delivery of RNA interference therapeutics using polycation-based nanoparticles. **Ad. Drug Del. Rev.**, v. 61, p. 710-720, 2009.

HUANG, L.; LIU, Y. *In vivo* delivery of RNAi with lipid-based nanoparticles. **Annu. Res. Biomed. Eng.**, v. 13, p. 507-530, 2011.

INTRA, J.; SALEM, A. K. Characterization of the transgene expression generated by branched and linear polyethylenimine-plasmid DNA nanoparticles *in vitro* and after intraperitoneal injection *in vivo*. **J. Control. Release**, v. 130, n. 2, p. 129–138, 2008.

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.

JACOBSON, G. B; MCCULLOUGH, R. L.; CHENG, N. J.; CREASMAN, A.; HICKERSON, R. P.; QUAN, C.; TURNER, C.; KASPAR, R. L.; CONTAG, C. H.; ZARE, R. N. Nanoparticles formation of organic compounds with retained biological activity. *J. Pharm. Sci.*, v. 99, n. 6, p. 2750-2755, jun 2010.

JONES, D. Teaming up to tackler RNAi delivery challenge. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 8, p. 525-526, 2009.

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.

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.

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.

KULKARNI, C. V.; MEZZENGA, R.; GLATTER, O. Water-in-oil nanostructured emulsions: towards the structural hierarchy of liquid crystalline materials. **Soft Matter**, v. 6, p. 5615-5624, 2010.

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.

LARSSON, K. Aqueous dispersion of cubic lipid-water phases. **Curr. Opinion Colloid Interf. Sci.**, v. 5, p. 64-69, 2000.

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.

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, 2000.

LENZ, G. The RNA interference revolution. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 38, p. 1749-1757, 2005.

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.

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.

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.

LIN, X.; WANG, R.; WILCOX, D.; ZHAO, X.; SONG, J.; HUANG, X.; HANSEN, T. M.; DANDE, P.; WADA, C.; HUBBARD, R. D.; KOHLBRENNER, W. M.; FESIK, S. W.; SHEN, Y. A robust *in vivo* positive-readout system for monitoring siRNA delivery to xenograft tumors. **RNA**, v. 17, n. 4, p. 603-612, 2011.

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.

LO, W.; GHAZARYAN, A.; TSO, C.; HU, P.; CHEN, W.; KUO, T.; LIN, S.; CHEN, S.; CHEN, C.; DONG, C. Oleic acid-enhanced transdermal delivery pathways of fluorescent nanoparticles. **Appl. Phys. Lett.**, v. 100, 2012.

LOCKWOOD, N. A.; GUPTA, J. K.; ABBOTT, N. L. Self-assembly of amphiphiles, polymers and proteins at interfaces between thermotropic liquid crystals and aqueous phases. **Surface Science Reports**, v. 63, n. 6, p. 255–293, 2008.

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.

LOPES, L.B.; LOPES, J.L.C.; OLIVEIRA, D.C.R.; THOMAZINE, 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.

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. **E.J. Pharm. Sci.**, v.32, p. 209-215, 2007.

LUZZATI, V.; HUSSON, F. The structure of the liquid-crystalline phases of lipid-water systems. **J. Cell Biol.**, v. 12, p. 207-219, 1962.

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.

MA, Y.; ZHENG, Y.; LIU, K.; TIAN, G.; TIAN, Y.; XU, L.; YAN, F.; HUANG, L.; MEI, L. Nanoparticles of Poly(Lactide-Co-Glycolide)-d- α -tocopheryl polyethylene glycol 1000 succinate random copolymer for cancer treatment. **Nanoscale Res. Lett.**, v. 5, n. 7, p. 1161-1169, 2010.

MAKAI, M.; CSÁNYI, E.; NÉMETH, Z.; PÁLINKÁS, J.; EROS, I. Structure and drug release of lamellar liquid crystals containing glycerol. **Int. J. Pharm.**, v. 256, n. 1/2, p. 95-107, 2003.

MANOHARAN, M. RNA interference and chemically modified small interfering RNAs. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 8, p. 570-579, 2004.

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.

MEISTER, G.; TUSCHL, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. **Nature**, v. 431, p. 343-349, 2004.

MENON, G. K. New insights into skin structure: scratching the surface. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 54, S3-17, 2002.

MOURRAIN, P.; BÉCLIN, C.; ELMAYAN, T.; FEUERBACH, F.; GODON, C.; MOREL, J. B.; JOUETTE, D.; LACOMBE, A. M; NIKIC, S.; PICAULT, N.; RÉMOUÉ, K.; SANIAL, M.; VO, T. A.; VAUCHERET, H. Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for post-transcriptional gene silencing and natural virus resistance. **Cell**, v. 101, n. 5, p. 533-542, 2000.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **Int. J. Pharm.** 2010.

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.

MU, L.; FENG, S.S. Vitamin E TPGS used as emulsifier in the solvent evaporation/extraction of technique for fabrication of polymeric nanospheres for controlled release of paclitaxel (Taxol®). **J. Control. Release**, v.80, p.129-144, 2002.

MU, L.; FENG, S. S. PLGA/TPGS nanoparticles for controlled release of paclitaxel: effects of the emulsifier and drug loading ratio. **Pharm, Res.**, v. 20, n. 11, p. 1864-1872, 2003.

MÜLLER-GOYMANN, C.C. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.58, n. 2, p.343-356, 2004.

NIMESH, S.; CHANDRA, R. Polyethylenimine nanoparticles as an efficient *in vitro* delivery system. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 73, p. 43-49, 2009.

PAULA, D.; BENTLEY, M. V. L. B.; MAHATO, R. I. Hydrophobization and bioconjugation for enhanced siRNA delivery and targeting. **RNA**, v. 13, p. 431-456, 2007.

PEER, D.; LIEBERMAN, J. Special delivery: targeted therapy with small RNAs. **Gene Ther.**, v. 18, n. 12, p. 1127-1133, 2011.

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.

PRAUSNITZ, M.R.; MITRAGOTRI, S.; LANGER, R. Current status and future potential of transdermal drug delivery. **Nat. Rev. Drug Discov.**, v. 3, n. 2, p. 115-124, 2004.

QUELUZ, T. H. A. T.; DEFAVERI, J.; EL-FAKHOURI, S. Alterações morfológicas induzidas pelo ácido oléico em pulmões de ratos. **J. Pneumol.**, v. 23, n. 5, p. 245-251, 1997.

REISCHL, D.; ZIMMER, A. Drug delivery of siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems. **Nanomedicine**, v. 5, p. 8-20, 2009.

RICHTER, T.; KEIPERT, S. *In vitro* permeation studies comparing bovine nasal mucosa, porcine cornea and artificial membrane: androstenedione in microemulsions and their components. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 58, p. 137-143, 2004.

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.

ROWAT, A. C.; KITSON, N.; THEWALT, J. L. Interactions of oleic acid and model stratum corneum membranes as seen by ^2H NMR. **Int. J. Pharm.**, v. 307, n. 2, p. 225-231, 2006.

SAGALOWICZ, L.; MEZZENGA, R.; LESER, M. E. Investigating reversed liquid crystalline mesophases. **Curr. Opin. Colloid Interface Sci**, v. 11, n. 4, p. 224-229, 2006.

SAVÍC, S.; SAVÍC, M.; TAMBURÍĆ, S.; VULETA, G.; VESÍĆ, S.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. na alkylpolyglucoside surfactant as a prospective pharmaceutical excipient for topical formulations: the influence of oil polarity on the colloidal structure and hydrocortisone in vitro/in vivo permeation. **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 30, n. 5, p. 441-450, 2007.

SCHERLIESS, R. The MTT assay as tool to evaluate and compare excipient toxicity *in vitro* on respiratory epithelial cells. **Int. J. Pharm.**, v. 411, p. 98-105, 2011.

SEDDON, A. Bridging the gap between *in vitro* and *in vivo* models. **Bristol Centre for Functional Nanomaterials**. Disponível em <<http://www.portal.bcfm.bris.ac.uk>>. 2010.

SHAH, J.C.; SADHALA, Y.; CHILUKURI, D.M. Cubic phase as drug delivery systems. **Adv. Drug Deliv. Rev.**, v. 47, p. 229-250, 2001.

SHAH, P. P.; DESAI, P. R.; PATEL, A. R.; SINGH, M. S. Skin permeating nanogel for the cutaneous co-delivery of two anti-inflammatory drugs. **Biomaterials**, v. 33, p. 1607-1617, 2012.

SHEN, Y.; WANG, B.; LU, Y.; QUAHAB, A.; LI, Q.; TU, J. A novel tumor-targeted delivery system with hydrophobized hyaluronic acid-spermine conjugates (HHSCs) for efficient receptor-mediated siRNA delivery. **Intern. J. Pharm.**, v. 414, p. 233-243, 2011.

SHIN, S. C.; KIM, J. Physicochemical characterization of solid dispersion of furosemide with TPGS. **Int. J. Pharm.**, v. 251, p. 79-84, 2003.

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.

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

SUN, B.K.; TSAO, H. Small RNAs development and disease. **J. Am. Acad. Dermatol.**, v.59, p. 725-737, 2008.

TAKAHASHI, H.; WANG, Y.; GRAINGER, D.W. Device-based local delivery os 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.

THANIK, V. D.; GREIVES, M. R.; LERMAN, O. Z.; SEISER, N.; DEC, W.; CHANG, C. C.; WARREN, S. M.; LEVINE, J. P.; SAADEH, P. B. Topical matrix-based siRNA silences local gene expression in a murine wound model. **Gene Ther.**, v. 14, p. 1305-1308, 2007.

THOMAS, M.; KLIBANOV, A. M. Non-viral gene therapy: polycation-mediated DNA delivery. **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, v. 62, p. 27-34, 2003.

TOKATLIAN, T.; SEGURA, T. siRNA applications in nanomedicine. **Wiley Interdiscip. Rev. Nanomed. Nanobiotechnol.**, v. 2, n. 3, p. 305-315, 2010.

TRAN, M.A.; GOWDA, R.; SHARMA, A.; PARK, E.; ADAIR, J.; KESTER, M.; SMITH, N.B.; ROBERTSON, G.P. Targeting ^{V600E}B-Raf and Akt3 using nanoliposomal-small interfering RNA inhibits cutaneous melanocytic lesion development. **Cancer. Res.**, v.68, n. 18, p. 7638-7649, 2008.

TURCHIELLO, R.F.; VENA, F. C.; MAILLARD, P.; SOUZA, C. S.; BENTLEY, M. V.; TEDESCO, A. C. Cubic phase gel as a drug delivery system for topical application of 5-ALA, its ester derivatives and m-THPC in photodynamic therapy (PDT). **J. Photochem. Photobiol. B**, v.70, p.1-6, 2003.

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.

VARKOUHI, A.K.; SCHOLTE, M.; STORM, G.; HAISMA, H.J. Endosomal escape pathways for delivery of biological. **J. Control. Release**, v. 151, n. 3, p. 220-228, 2011.

WANG, Q.; ILVES, H.; CHU, P.; CONTAG, C. H.; LEAKE, D.; JOHNSTON, B. H.; KASPAR, R. L. Delivery and inhibitions of reporter genes by small interfering RNAs in a mouse skin model. **J. Invest. Dermatol.**, v. 127, p. 2577-2584, 2007.

WANG, C.; LU, D.; CHIANG, C. Gene Therapy using SiRNA for Treatment of Ocular Neovascularization. **J. Med. Sci.**, v. 30, n. 3, p. 79-84, 2010.

WANG, J.; LU, Z.; WIENTJES, M. G.; AU, J. L. Delivery of siRNA Therapeutics: Barriers and Carriers. **AAPS J.**, v. 12, n. 4, p. 492-503, dez. 2010.

WOLTERS, N. M.; MACKEIGAN, J. P. From sequence to function: using RNAi to elucidate mechanisms of human disease. **Cell Death Differ.**, v.15, n. 5, p. 809-819, 2008.

WOODLE, M. C.; LU, P. Y. Nanoparticles deliver RNAi therapy. **Materials Today**, v. 8, n. 8, suppl. 1, p. 34-41, ago 2005.

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.

WU, S. H.; HOPKINS, W. K. Characteristics of D- α -tocopheryl PEG 1000 succinate for applications as an absorption enhancer in drug delivery systems. *Pharmaceutical Technology*, 1999.

XIA, H.; MAO, Q.; PAULSON, H. L.; DAVIDSON, B. L. siRNA-mediated gene silencing *in vitro* and *in vivo*. **Nat. Biotechnol.**, v.20, n. 10, p. 1006- 1010, out. 2002.

XIONG, X. B.; ULUDAG, H.; LAVASANIFAR, A. Biodegradable amphiphilic poly(ethylene oxide)-block-polyesters with grafted polyamines as supramolecular nanocarriers for efficient siRNA delivery. **Biomaterials**, v. 30, n. 2, p. 242-253, 2009.

YADAVA, P.; ROURA, D.; HUCHES, J. A. Evaluation of two cationic delivery systems for siRNA. *Oligonucleotides*, v. 17, n. 2, p. 213-222, 2007.

YAGHMUR, A.; GLATTER, O. Characterization and potential applications of nanostructured aqueous dispersions. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v. 147-148, p. 333-342, 2009.

YANG, X.; DU, J. Z.; DOU, S.; MAO, C. Q.; LONG, H. Y.; WANG, J. Sheddable ternary nanoparticles for tumor acidity-targeted siRNA delivery. **ACS nano**, v. 6, p. 771-781, 2012.

YLÄ-HERTTUALA, S; WIRTH, T. Therapeutic delivery using gene-delivery methods. **Ther. Deliv.**, v. 2, n. 4, p. 423-426, 2011.

YUAN, X.; SHAH, B. A.; KOTADIA, N. K.; LI, J.; GU, H.; WU, Z. The development and mechanism studies of cationic chitosan-modified biodegradable PLGA nanoparticles for efficient siRNA drug delivery. **Pharm Res.**, v. 27, n. 7, p. 1285-1295, 2010.

ZARBIN, M. A.; MONTEMAGNO, C.; LEARY, J. F.; RITCH, R. Nanotechnology in ophthalmology. **Can. J. Ophthalmol.**, v. 45, n. 5, p. 457-476, 2010.

ZHANG, M.; ISHII, A.; NISHIYAMA, N.; MATSUMOTO, S.; ISHII, T.; YAMASAKI, Y.; KATAOKA, K. PEGylated Calcium phosphate nanocomposites as smart

environment sensitive carriers for siRNA delivery. **Adv. Materials**, v. 21, n. 34, p. 3520-3525, 2009.

ZHANG, S.; ZHAO, Y.; ZHI, D.; ZHANG, S. Non-viral vectors for the mediation of RNAi. **Bioorg. Chem.**, v. 40, p. 10-18, 2012.

ZHANG, X.; MCINTOSH, T.J.; GRINSTAFF, M.W. Functional lipids and lipoplexes for improve gene delivery. **Biochi**, v, 94, p. 42-58, 2012.

ZHANG, Y.; ZHOU, C.; KWAK, K. J.; WANG, X.; YUNG, B.; LEE, L. J.; WANG, Y.; WANG, P. G.; LEE, R. J. Efficient siRNA delivery using a polyamidoamine dendrimer with a modified pentaerythritol core. **Pharm. Res.**, v. 29, n. 6, p. 1627-1636, 2012.

ZHENG, X.; JI, P.; HU, J. Sonoporation using microbubbles promotes lipofectamine-mediated siRNA transduction to rat retina. **Bosn. J. Basic Med. Sci.**, v. 11, n. 3, p. 147-152, 2011.