

**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:** Livia Vieira Depieri

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> 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\*.

## 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  $\mu$ 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.

# *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 Kempthues 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 Kempthues 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).

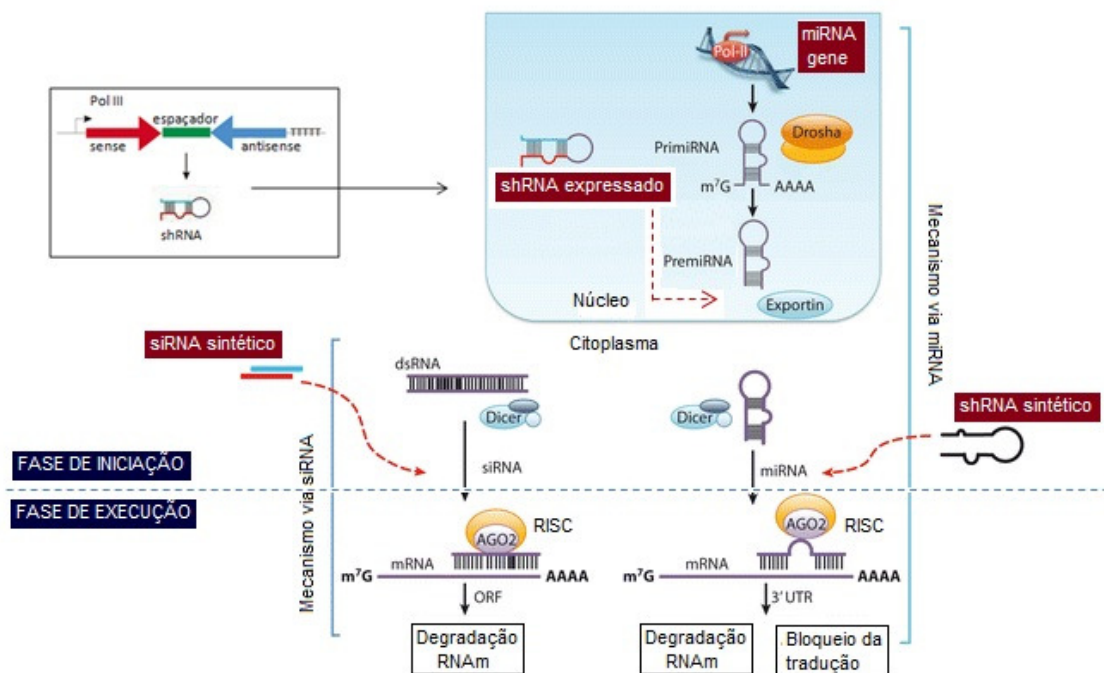
Avaliando-se suas funções naturais, RNAi ganhou grande atenção e tornou-se um procedimento comum para estudar a função dos genes e identificar potenciais genes alvos causadores de doenças. Além de ser uma importante ferramenta de pesquisa, a RNAi é uma grande promessa na terapia gênica para o silenciamento 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 *Anylam 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

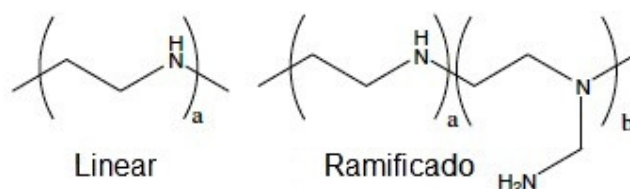
Estudos recentes ilustram diferentes abordagens para enfrentar os desafios no desenvolvimento de terapêuticas com base na interferência de RNA. O desenvolvimento de sistemas de liberação clinicamente adequados, seguros e efetivos é um dos maiores desafios em proporcionar o uso clínico dos siRNAs para 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).



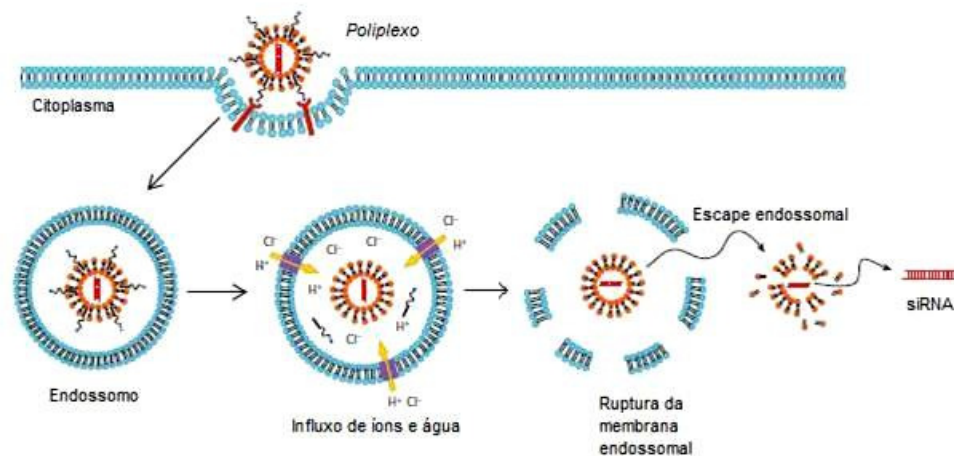
**Figura 2:** Estrutura molecular do polímero catiônico PEI. Adaptado de MARTIMPREY *et al.*, 2009.

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

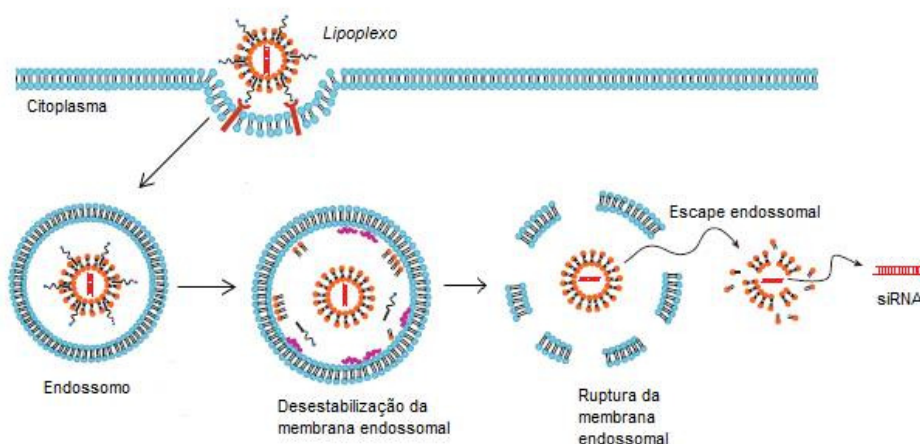
encontra-se totalmente ionizada conferindo um residual positivo ao sistema, que é de grande interesse para sistemas de liberação de siRNAs (MARTINI *et al.*, 2008).



**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 RNAm (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).

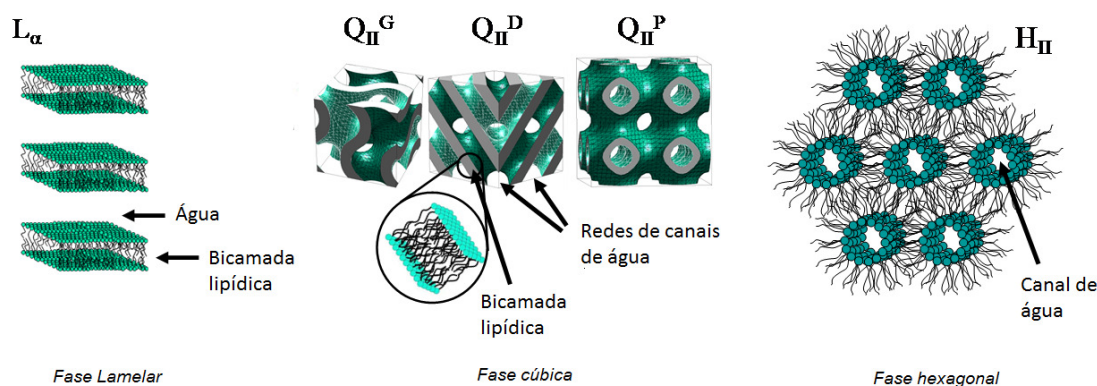
Nas últimas duas décadas, sistemas líquido-cristalinos têm atraído grande atenção devido às suas aplicações em diversas áreas. O grande interesse nesses sistemas está na possibilidade de criar partículas estruturadas mediante o uso de métodos instantâneos e modular as forças formadas através de estímulos 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

movilidade 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.

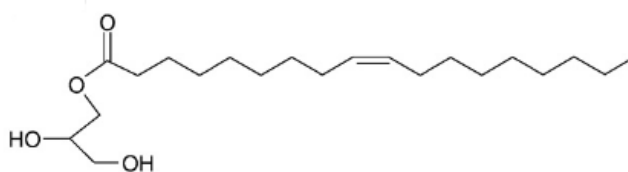
A fase lamelar caracteriza-se por intercalar bicamadas lipídicas com a fase aquosa, nas quais os grupamentos polares das moléculas localizam-se adjacentes e projetados para a fase aquosa, enquanto as caudas hidrocarbonadas encontram-se dispostas paralelamente formando uma rede unidimensional. Essa fase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



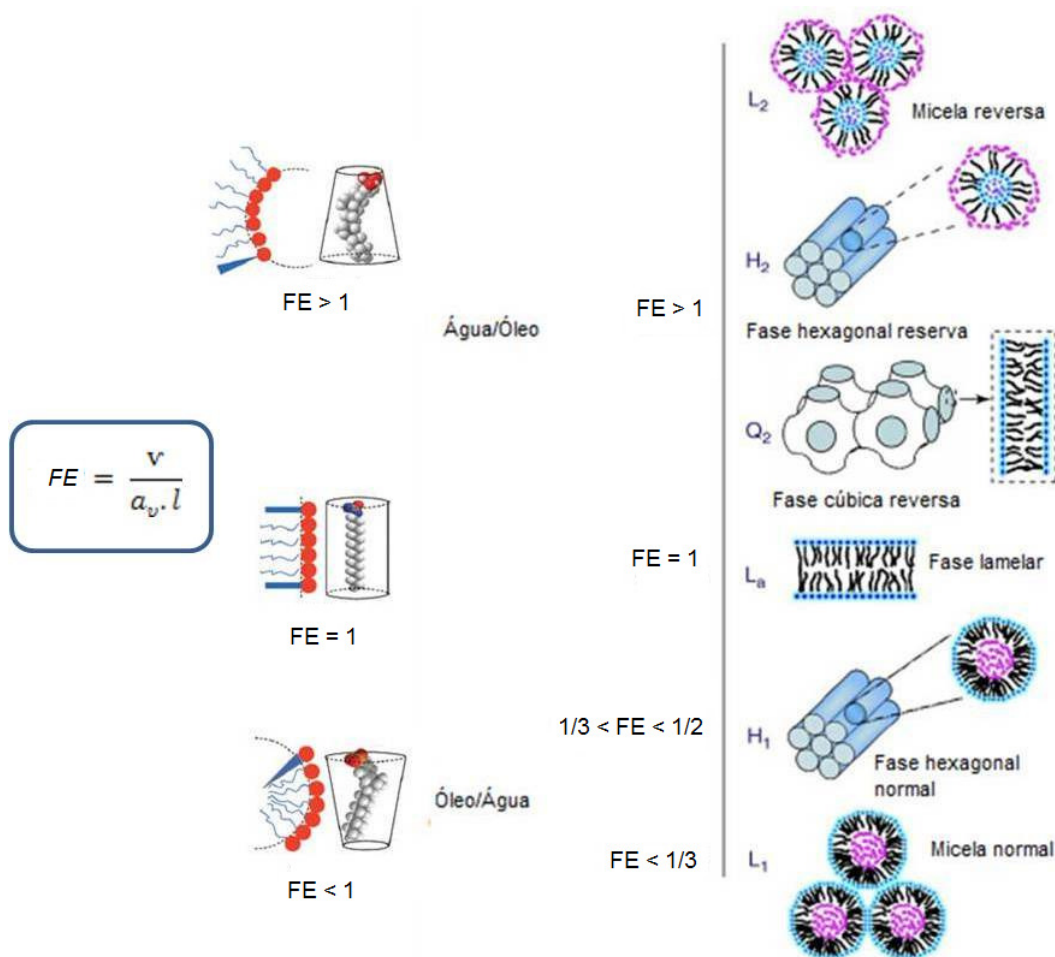
**Figura 7:** Estrutura molecular da MO. Fonte: FONG; HANLEY; BOYD, 2009.

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, monooleato 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. 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  $190 \pm 28$  nm e  $173 \pm 17$  nm para as nanodispersões do sistema MO:FA com OAM e PEI, respectivamente e de  $207 \pm 16$  nm e  $242 \pm 27$  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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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.

### *3. 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 release 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.; THOMPSON, 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 aggregate 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.; KOOCHKEKI, 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 Repoprts**, 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 V600E-Braf 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.