



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ROSALINA COELHO JÁCOME

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROEMULSÕES PARA
VEICULAÇÃO DE RNA INTERFERENTE NA PELE**

Campina Grande – PB

2015

ROSALINA COELHO JÁCOME

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROEMULSÕES PARA
VEICULAÇÃO DE RNA INTERFERENTE NA PELE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Dr^a Karina Lidianne Alcântara Saraiva

Campina Grande – PB

2015

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

J42d Jácome, Rosalina Coelho.

Desenvolvimento e caracterização de microemulsões para veiculação de RNA interferente na pele [manuscrito] / Rosalina Coelho Jácome. - 2015.

111 p. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2015.

"Orientação: Profa. Dra. Karina Lidianne Alcântara Saraiva, Departamento de Ciências Biológicas".

1. Microemulsão. 2. Interferência por RNA. 3. Nanotecnologia. 4. Polietilenoimina. I. Título.

21. ed. CDD 615.82

ROSALINA COELHO JÁCOME


**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROEMULSÕES PARA
VEICULAÇÃO DE RNA INTERFERENTE NA PELE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento à exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em: 19 / 03 / 2015.

BANCA EXAMINADORA

Presidente da Banca: Dr^a Karina Lidianne Alcântara Saraiva (FIOCRUZ)



Membros Titulares:

Membro Interno: Prof. Dr. Rodrigo José de Oliveira (UEPB)



Membro Externo: Dr^a Janáina Viana de Melo (CETENE)



Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.

(Madre Teresa de Calcuta)

AGRADECIMENTOS

Ao responsável por tudo, Deus, meu Pai, protetor da minha vida, agradeço por nunca me deixares cair, que com tua imensa misericórdia e amor me permitiu chegar até aqui.

Aos meus pais, Pedro Jácome e Sueli Coelho, por me apoiar e sempre me incentivar a lutar por tudo que eu almejo para a minha vida. “Amo vocês acima de tudo!”.

Aos meus irmãos Jácome e Niácome, que sempre estão ao meu lado quando preciso, dando carinho, apoio, atenção e acima de tudo me erguendo quando necessário. “Vocês são a maior riqueza que eu posso ter, e obrigada por tudo!”.

À minha vovó, Maria Inácia Coelho, que com sua frase: “Ah meu Deus, será que vou ver meus netinhos formados?!”, fez com que eu tivesse mais forças para lhe mostrar que ainda pode ver seus netinhos com uma pós-graduação.

Ao amor e inspiração da minha vida, Paulo André, que durante todo este tempo, fez mais do que suportar os meus estresses, dando-me tranquilidade, paz, alegria e muito amor. “Meu anjo, amor meu, sei que juntos iremos alcançar nossos objetivos, um apoiando o outro, dando puxões de orelhas quando convier, muitos abraços e beijos, muitos sorrisos e lágrimas e muito amor no coração. Obrigada por tudo. Te amo infinitamente!!”.

Aos queridos e amados, Sônia Russo e Saulo Guerra, mais que sogros, meus segundos pais, a quem admiro muito e tenho maior respeito e paixão. Agradeço por todo o apoio fornecido e as vibrações positivas enviadas em todos os momentos. “Obrigada Senhor, por ter colocado anjos tão especiais em minha vida, que além de um noivo maravilhoso, deste-me pais de coração”.

Aos primos e primas, em especial, Mariana Coelho, que durante todo este tempo me ofereceu ajuda, fidelidade, amizade e contribuiu de forma grandiosa para o meu sucesso.

Ao meu sobrinho, Natan Jácome, por me fazer tão feliz enquanto tia e tão lisonjeada enquanto madrinha. E, apesar da distância, ao lembrar do seu sorriso encantador, isso me renova. “Titio, eu te amo!”.

À minha cunhada, Débora Truta, pela sua amizade, companheirismo e convivência.

À minha amiga - irmã, Magna Tavares, a quem agradeço pela sua paciência, fidelidade, companheirismo, amizade e por estar sempre disponível para ouvir as minhas reclamações, loucuras e confidências.

À minha amiga e companheira de mestrado, Glória Batista, por ter me dado forças e inspiração para nunca desistir de chegar ao final deste caminho longo. “Obrigada Glória, sei que iremos chegar ainda mais longe, e quem sabe, se não nos aventuramos no doutorado juntas?! (rsrsrs)”.

À amiga que adquiri nesta caminhada, Airlla Laana, que assim como seu nome, é um pouco complicada, mas uma grande pessoa. “Louca, agradeço-te pelas conversas, pelas palavras de carinho, pelo apoio dado, pelas brigas e xingamentos, pelos gestos de amor que sentes por mim (rsrsrs), enfim, pela tua amizade, a qual quero tê-la comigo sempre”.

Aos meus queridos companheiros de laboratório, Yargo, Patrícia, Geilza e Gisele, pela dedicação, apoio e confiança. Geilza e Gisele, nominadas carinhosamente por Ge e Gi, respectivamente, agradeço de coração pela colaboração no trabalho, como também, pela amizade conquistada durante este tempo. “Quero vocês comigo sempre!!”.

A todos os professores, desde a alfabetização, que contribuíram para a minha formação, através das informações repassadas, dos puxões de orelhas na hora certa, dos elogios, críticas e sugestões convenientes e pela amizade fornecida durante o ensino.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Karina Lidianne Alcântara Saraiva, a quem vai o meu sincero agradecimento por sua paciência, dedicação, apoio e amizade durante este tempo de mestrado, fornecendo-me conhecimentos imprescindíveis. “Parabéns por esta pessoa maravilhosa que és!!”.

A todo o corpo docente do curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UEPB, que repassaram conhecimentos específicos indispensáveis para a ascensão profissional.

A todos os funcionários presentes na minha pós-graduação, que estiveram à disposição quando precisei.

Enfim, tenho enorme gratidão por todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para que eu alcançasse mais esta vitória.

SUMÁRIO

RESUMO	i
ABSTRACT	ii
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	vi
1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1. PELE E AFECÇÕES CUTÂNEAS.....	21
2.2. TERAPIA GÊNICA E RNA INTERFERENTE.....	23
2.3. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO TÓPICA DE RNA INTERFERENTE....	26
2.4. MICROEMULSÕES.....	28
2.4.1. Diagrama de Fases.....	31
2.4.2. Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL).....	32
2.5. POLIETILENOIMINA (PEI).....	34
2.6. POLIMERIZAÇÃO EM MICROEMULSÕES.....	36
3. OBJETIVOS.....	41
3.1. OBJETIVO GERAL.....	41
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
4.1. MATERIAIS.....	43
4.2. MÉTODOS.....	43
4.2.1. Construção dos diagramas de fases pseudoternário.....	43
4.2.2. Incorporação de RNA interferente.....	44
4.2.3. Caracterização dos sistemas microemulsionados.....	45
4.2.3.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	45
4.2.3.2. Avaliação do tamanho e distribuição de gotículas.....	45
4.2.3.3. Eletroforese em Gel de Agarose.....	46
4.2.3.4. Curva de calibração do siRNA.....	46
4.2.3.5. Eficiência de Encapsulação (EE).....	47
4.2.3.6. Ensaio de Liberação de siRNA.....	47
4.2.3.7. Condutividade Elétrica.....	48

4.2.3.8. Índice de Refração.....	49
4.2.3.9. Isotropia.....	49
4.2.3.10. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC).....	49
4.3. ENSAIOS DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES.....	49
4.3.1. Teste de Centrifugação.....	50
4.3.2. Teste de congelamento-descongelamento.....	50
4.3.3. Estresse Térmico.....	50
4.4. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DO MTT....	50
4.5. ENSAIOS DE REOLOGIA.....	51
4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	51
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
5.1. DETERMINAÇÃO DO EHL DO SISTEMA.....	53
5.2. DIAGRAMA DE FASES.....	53
5.3. SELEÇÃO DAS FORMULAÇÕES.....	54
5.4. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DOS SISTEMAS.....	56
5.5. AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DO siRNA NA FORMULAÇÃO.....	57
5.5.1. Eletroforese em Gel de Agarose.....	58
5.5.2. Ultraestrutura dos sistemas microemulsionados contendo siRNA.....	60
5.5.3. Detecção do tamanho de gotículas e índice de polidispersão.....	61
5.5.4. Curva de Calibração do siRNA.....	63
5.5.5. Eficiência de Encapsulação.....	64
5.5.6. Liberação de siRNA.....	65
5.6. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROEMULSÕES.	68
5.7. ENSAIOS DE ESTABILIDADE.....	74
5.8. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PELO MTT.....	75
5.9. DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO.....	77
6. CONCLUSÕES.....	82
REFERÊNCIAS.....	84

RESUMO

A terapia gênica surgiu como uma ferramenta promissora a fim de manipular, substituir, suprimir ou introduzir genes em um organismo para o tratamento de doenças. Dentre os ácidos nucleicos com potencial terapêutico estão as pequenas moléculas interferentes (siRNA), capazes de ocasionar a eliminação de RNAs mensageiros (RNAm) anômalos ou silenciar genes. O principal desafio é a veiculação dessas moléculas para eficiente transfecção em células-alvo. As microemulsões têm sido amplamente utilizadas como carreadores de fármacos de uso tópico. Elas são sistemas coloidais com alta capacidade de solubilização e controle de liberação de moléculas ativas. Dessa forma, o presente trabalho desenvolveu microemulsões contendo siRNA para futura aplicação tópica como um nanocosmético. Dois diagramas de fases pseudoternário foram obtidos utilizando uma fase aquosa de propilenoglicol e água, Span 80 e Tween 80 como a mistura de tensoativos e o óleo de canola como a fase oleosa. Um deles recebeu polietilenoimina (PEI) 5% à fase aquosa para síntese de um sistema polimérico. As formulações selecionadas foram avaliadas quanto à condutividade, índice de refração (IR), microscopia eletrônica de transmissão (MET), calorimetria exploratória diferencial (DSC), tamanho de gotículas, difração de raios-X (DRX), microscopia de luz polarizada (MLP) e estabilidade, evidenciando ser microemulsões do tipo A/O. Além disso, foram realizados estudos de eficiência de encapsulação e liberação de siRNA, que demonstraram um ótimo desempenho das microemulsões como carreadores das moléculas interferentes. A presença do PEI proporcionou forte interação eletrostática com os polinucleotídeos de forma a não favorecer sua liberação, além de reduzir o tamanho das gotículas. O ensaio de citotoxicidade comprovou o efeito citoprotetor das formulações aplicadas. Os sistemas se comportaram como fluidos Newtonianos e de baixa viscosidade, o que favorece a aplicação tópica. Sendo assim, as microemulsões são veículos promissores de siRNA para fins de terapia cutânea, com possível impacto tecnológico e sócio-econômico, uma vez que esta metodologia ainda não foi aplicada na área dos cosméticos.

Palavras-Chave: Sistemas microemulsionados; Nanotecnologia; Polietilenoimina; RNA de interferência.

ABSTRACT

The gene therapy has emerged as a promising tool to handle, replace, remove or introduce genes into an organism for treatment of disease. Among the nucleic acids with therapeutic potential are the small interference molecules (siRNA) capable of causing the removal of messenger RNAs (mRNA) or to silence genes. The main challenge is the placement of these molecules for efficient transfection into target cells. The microemulsions have been widely used as carriers for topical drugs. They are colloidal systems with high solubilizing capacity and ability to control the rate of release of active molecules. Therefore, this study developed microemulsions containing siRNA for future topical application as a nanocosmetic. Two pseudoternary phase diagram were obtained using an aqueous phase of propylene glycol and water, Span 80 and Tween 80 as the mixture of surfactants and the canola oil as the oil phase. One received 5% polyethyleneimine (PEI) to aqueous phase to the synthesis of a polymeric system. The selected formulations were evaluated for conductivity, refractive index (RI), transmission electron microscopy (TEM), differential scanning calorimetry (DSC), droplet size, X-ray diffraction (XRD), polarized light microscopy (PLM) and stability, showing microemulsions of the type W/O. Furthermore, were performed studies of encapsulation efficiency and release of siRNA, which showed a great performance of the microemulsions as carriers of the interfering molecules. The presence of PEI provided strong electrostatic interaction with polynucleotides in order to not favor his release and reduced droplet size. The cytotoxicity assay demonstrated the cytoprotective effect of the formulations applied. The systems behaved as Newtonian fluids and low viscosity which facilitates topical application. Therefore, microemulsions are promising vehicles of siRNA for the purpose of skin therapy, with possible technological and socio-economic impact, given that this methodology has not been applied in the field of cosmetics.

Keywords: Microemulsion systems; Nanotechnology; Polyethyleneimine; RNA interference

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	Composição centesimal das formulações selecionadas.....	55
TABELA 2 -	Tamanho de gotículas e índice de polidispersão nas formulações.....	63
TABELA 3 -	Condutividade e IR das microemulsões.....	68
TABELA 4 -	Avaliação físico-química das MEs antes e após o teste de estresse térmico.....	75

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	Representação esquemática de corte transversal da pele.....	23
FIGURA 2 -	Fluxograma das vias que levam à interferência por miRNAs e siRNAs.....	25
FIGURA 3 -	Representação esquemática dos tipos de microemulsões.....	29
FIGURA 4 -	Representação esquemática da estrutura básica de um tensoativo.....	30
FIGURA 5 -	Estruturas de microemulsões em um diagrama ternário.....	32
FIGURA 6 -	Escala de Griffin.....	33
FIGURA 7 -	Estrutura molecular do polímero catiônico PEI.....	35
FIGURA 8 -	Representação esquemática do mecanismo “efeito esponja de prótons”.....	36
FIGURA 9 -	Polimerização em microemulsão.....	37
FIGURA 10 -	Representação esquemática da micela esférica (à esquerda) e com polímero hidrofóbico (à direita).....	37
FIGURA 11 -	Representação esquemática de micela inversa (à esquerda) e com polímero hidrofílico (à direita).....	38
FIGURA 12 -	Desenvolvimento dos diagramas de fases pseudoternário...	44
FIGURA 13 -	Diluições sucessivas para construção da curva de calibração.....	47
FIGURA 14 -	Representação esquemática do ensaio de liberação de siRNA.....	48
FIGURA 15 -	Diagramas de fase pseudoternário para os sistemas microemulsionados.....	54
FIGURA 16 -	Características macroscópicas das microemulsões.....	56
FIGURA 17 -	Ultraestrutura das Microemulsões.....	57
FIGURA 18 -	Encapsulação de siRNA e estabilidade da formulação frente à RNase por eletroforese em gel de agarose.....	59
FIGURA 19 -	Ultraestrutura das microemulsões formuladas sem siRNA (à esquerda) e com siRNA (à direita).....	61
FIGURA 20 -	Curva de calibração de soluções de siRNA obtida por espectrofotometria UV-VIS a 260nm.....	64

FIGURA 21 -	Liberção de siRNA das microemulsões com PEI e sem PEI.....	67
FIGURA 22 -	Termogramas representativos do óleo de canola e da água, respectivamente.....	70
FIGURA 23 -	Termogramas representativos dos tensoativos Span 80 e Tween, respectivamente.....	70
FIGURA 24 -	Termogramas representativos das microemulsões sem PEI e com PEI, respectivamente.....	71
FIGURA 25 -	Termogramas representativos das microemulsões com siRNA.....	72
FIGURA 26 -	Termogramas dos componentes e MEs no ciclo de congelamento.....	73
FIGURA 27 -	Termogramas dos componentes e MEs no ciclo de aquecimento.....	73
FIGURA 28 -	Aparência macroscópica das MEs após os ciclos de congelamento, descongelamento e centrifugação.....	75
FIGURA 29 -	Metabolização do MTT por fibroblastos após tratamento com as formulações microemulsionadas.....	76
FIGURA 30 -	Viabilidade celular após 24 h de incubação com as formulações.....	77
FIGURA 31 -	Comportamento reológico das formulações em estudo. Reograma Tensão de cisalhamento versus Taxa de cisalhamento.....	79
FIGURA 32 -	Comportamento reológico das formulações em estudo. Reograma Viscosidade versus Taxa de cisalhamento.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido acrílico
AM	Acrilamida
AOT	1,4-bis(2-etilhexil) sulfossuccinato de sódio
ATP	Adenosina tri-fosfato
Ago 2	Arganouta 2
CA	Ácido cólico
CTAB	Brometo de dodeciltrimetilamônio
DGCR8	DiGeorge Syndrome Critical Region 8 Protein
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsufóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
DRX	Difração de raios X
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
dsRNA	Double Strande RNAs
EC	Estrato Córneo
EDTA	Ethylenediamine tetra acetic acid
EE	Eficiência de encapsulação
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
ELL	Emulsão Líquida Leitosa
ELO	Emulsão Líquida Opaca
ESS	Emulsão Semisólida
FC	Fator de correção
FD	Fator de diluição
h	Hora
IPD	Índice de Polidispersão
IR	Índice de refração
J/g	Joule por grama
kDa	Quilodalton
Kv	Quilovolt

mA	Miliampere
ME	Microemulsão
ME A/O	Microemulsão água em óleo
ME O/A	Microemulsão óleo em água
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
mg/ml	Miligrama por mililitro
min	Minutos
miRNA	Micro RNA
MLP	Microscopia de Luz Polarizada
mM	Milimolar
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
mV	Milivolt
NaAMPS	2-acrilamido-2-metilpropanosulfonato de sódio
ng/ µl	Nanograma por microlitro
nm	Nanômetro
nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
PEI	Polietilenoimina
pH	Potencial Hidrogeniônico
PPG	Propilenoglicol
Pré-miRNA	Micro RNA precursor
Pri-miRNA	Micro RNA primário
R²	Coefficiente de correlação
RISC	Complexo de Silenciamento Induzido por RNA
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAi	RNA interferente
RNA_m	RNA mensageiro
rpm	Rotação por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sódio
shRNA	<i>Small hairpin RNA</i>
siRNA	Pequenos RNA interferentes
St	Estireno
TRIS-EDTA	Tris-Acetato-EDTA
UV-VIS	Ultravioleta visível

V	Volts
v/v	Volume por volume
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
µS/cm	Micro Siemens por centímetro

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A biologia molecular contribui de forma significativa na área da genética proporcionando o conhecimento das funções celulares normais, bem como os mecanismos que ocasionam uma doença. O projeto genoma tem fornecido informações abrangentes e acessíveis sobre os genes humanos, trazendo esperança em tornar a terapia gênica uma realidade (NABEL, 2004).

Alterações nas sequências gênicas podem ser causadas pela ausência de codificação de determinadas proteínas, codificação de proteínas anormais ou em excesso, ou pela susceptibilidade do organismo a agentes ambientais (MARTIMPREY et al., 2009). Desse modo, a terapia gênica surge como uma ferramenta para substituir, complementar ou inibir genes causadores de doenças (VERMA, WEITZMAN, 2005).

Após a descoberta de que os genes poderiam ter sua expressão modulada, o silenciamento gênico desencadeado por interferência de RNA (RNAi) tornou-se uma classe terapêutica atrativa por possuir elevada potência e especificidade (GRIMM, KAY, 2007), instigando pesquisadores e indústrias farmacêuticas a investirem no desenvolvimento de terapias baseadas em pequenas moléculas de RNA (siRNA). Estas consistem em RNAs dupla fita (dsRNA), contendo 20 a 30 pares de bases, que inibem a tradução de um RNAm específico devido à alta complementaridade dos nucleotídeos, impedindo a síntese de proteínas (WOLTERS, MacKEIGAN, 2008; PEER, LIBERMAN, 2011; ZHOU et al., 2012).

Entretanto, apesar das conhecidas potencialidades terapêuticas do siRNA, a transfecção da sequência gênica é dificultada pelas diversas limitações que essa molécula apresenta, tais como elevada carga negativa que dificulta a passagem através das membranas celulares, curto tempo de meia-vida por ser facilmente degradada por enzimas endógenas, além de biodisponibilidade insuficiente (TOKATLIAN; SEGURA, 2010; NIMESH; CHANDRA, 2009; REISCHL; ZIMMER, 2009). Dessa forma, um sistema de liberação deve ser capaz de complexar o siRNA de forma reversível, protegê-lo contra a degradação enzimática, além de apresentar-se atóxico e não-imunogênico (ROSSI et al., 2007).

Por suas cargas negativas, os siRNAs possibilitam interações eletrostáticas a lipídeos, proteínas, peptídeos ou polímeros catiônicos, como a Polietilenoimina (PEI), os quais constituem as principais classes de vetores não-virais para a veiculação de siRNA. Estes apresentam boa segurança, fácil síntese, possibilidade de direcionamento para diferentes alvos celulares através da modificação estrutural pela incorporação de ligantes, e baixa resposta

imunológica quando comparados aos vetores virais (ZHANG et al., 2007; REISCHL; ZIMMER, 2009).

O tamanho das nanoestruturas formadas pela interação entre o siRNA e substratos catiônicos é de grande importância para sua absorção celular, visto que, aquelas com diâmetro médio entre 200 e 500 nm podem ser captadas pelas células-alvo por endocitose. Diante disso, as microemulsões (MEs) são sistemas promissores para a transfecção de siRNA, visto seu tamanho médio ser de 10 a 300nm (REISCHL; ZIMMER, 2009; DAMASCENO et al., 2011). Elas foram descritas primeiramente por Hoar e Schulman em 1943, e anos mais tarde foram definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos e transparentes, no qual dois líquidos imiscíveis, usualmente água e óleo, são misturados para formar uma única fase na presença de tensoativos apropriados, frequentemente em associação a um cotensoativo (GRAMPUROHIT; RAVIKUMAR; MALLYA, 2011).

As MEs são capazes de aumentar a absorção cutânea de substâncias ativas tanto hidrofílicas quanto lipofílicas, quando comparado aos sistemas convencionais, agindo como um reservatório para substâncias pouco solúveis (GRAMPUROHIT; RAVIKUMAR; MALLYA, 2011). Além disso, suas propriedades físico-químicas influenciam a liberação de fármacos na pele devido à baixa tensão interfacial e, conseqüentemente, melhor contato da formulação com o local de aplicação (KREILGAARD, 2002). Por isso, o presente estudo abordou a hipótese de encapsulação de siRNAs em ME, visando a aplicação tópica e silenciamento de genes associados ao fotoenvelhecimento.

REFERENCIAL TEÓRICO

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. PELE E AFECÇÕES CUTÂNEAS

A pele é o maior órgão do corpo humano e um candidato interessante para terapia gênica devido à fácil acessibilidade, conhecimento pontual da estrutura e tipo de células presentes (GEUSENS et al., 2011), e pelo fato de haver um grande número de doenças passíveis de mediação de genes cutâneos defeituosos (TAKANASHI et al., 2009). Vários estudos, *in vitro* e *in vivo*, têm usado a pele como uma via de distribuição de siRNA para o tratamento de melanoma, artrite reumatóide, ferimentos, doenças alérgicas, tal como hipersensibilidade de contato e dermatite atópica, e condições genéticas dominantes, incluindo paquioníquia congênita, alopecia areata e psoríase. Portanto, a veiculação tópica de siRNA pode modular a expressão do gene estrategicamente em uma variedade de distúrbios cutâneos, evitando efeitos secundários sistêmicos (TRAN et al., 2008; RITPRAJAK et al., 2008; LEACHMAN et al., 2008; NAKAMURA et al., 2008; JAKOBSEN et al., 2009).

Este órgão é a principal interface biológica do organismo humano com o meio ambiente e, devido a esta função de barreira, representa um órgão-alvo para estímulos externos de reações oxidativas, tais como incidência de radiações ultravioleta e ionizante, ação do ozônio e de diferentes agentes químicos tóxicos (SAIJA *et al.*, 1998, HADGRAFT, 2001; CEVEC e VIERL, 2006, MARQUELE-OLIVEIRA, 2007). Ao longo do tempo, estas agressões externas comprometem as funções e a aparência da pele, estimulando o indivíduo a buscar meios de retardar ou atenuar certas características adquiridas, tais como rugas, diminuição de tônus, perda de elasticidade e hidratação (SCOTTI, 2003).

A pele humana é composta principalmente por três camadas: epiderme, derme e hipoderme ou tecido adiposo subcutâneo, que se apresenta como um tecido extremamente viscoso e macio (Figura 1). A primeira divide-se em subcamadas, que em ordem de profundidade são: o estrato córneo (EC), a camada lúcida, a camada granulosa, a camada espinhosa e o estrato germinativo ou basal. O EC é a mais fina e superficial, sendo composta de células mortas e queratinócitos, os quais são transformados em queratina de superfície. Este processo de renovação celular ocorre por toda a vida, porém seu decaimento é um dos principais fatores de manifestação do envelhecimento cutâneo, que pode ser percebido através do afinamento da pele. A camada córnea é hidratada por um filme líquido chamado de manto

hidrolipídico, formado por água, sais minerais, enzimas, vitaminas e gorduras (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1990; FREEDBERG *et al.*, 2003).

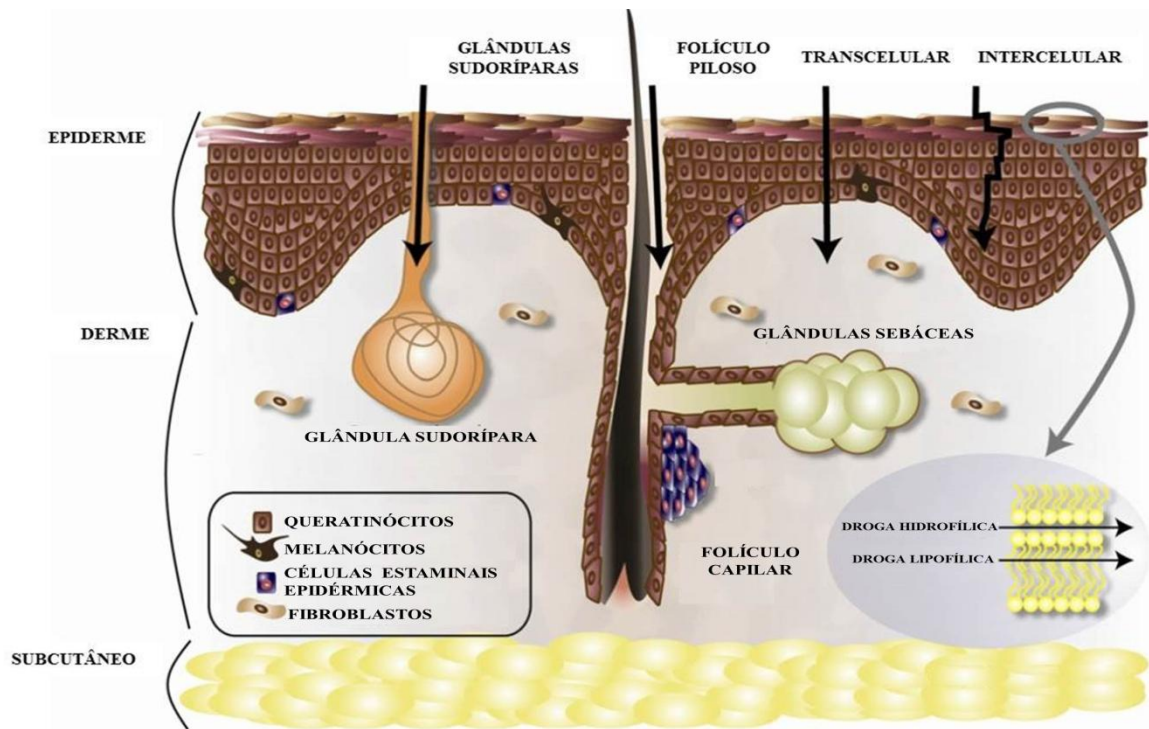
Abaixo da epiderme, encontra-se a derme, consistindo em uma rede de colágeno intercalada por fibras elásticas e elementos linfáticos. A espessura das camadas da pele sofre muitas variações em função da idade, sítio anatômico e do estado de hidratação. Geralmente, a espessura da epiderme apresenta-se entre 40 a 48 μm . A espessura da derme é maior que 800 μm e menor que 1.500 μm , e por fim, a espessura da hipoderme é dependente do sítio anatômico e do estado nutricional do indivíduo (AGACHE, 2000).

A ligação entre a derme reticular e a hipoderme é uma transição abrupta entre um tecido dérmico conectivo e fibroso para um tecido predominantemente adiposo. De origem mesenquimal, os adipócitos são as células primárias da hipoderme. Organizam-se em glóbulos definidos por septos de tecido conectivo fibroso. A hipoderme exerce função de isolamento, reserva energética e proteção. Permite ainda a mobilidade das estruturas adjacentes (FREEDBERG *et al.*, 2003).

Segundo Beny (2000), o EC representa uma região importante no controle da absorção de substâncias ativas, por sua propriedade de permeabilidade seletiva. No entanto, existem outras vias potenciais para penetração de substâncias na pele, tais como os folículos pilosos associados às glândulas sebáceas, glândulas sudoríparas e vias intercelular e transcelular na epiderme (Figura 1) (BARRY, 2001). Elas representam apenas 0,1% da área superficial da pele e admite-se que a penetração de substâncias por essas vias seja menor quando comparado ao EC (HADGRAFT, 2001; HADGRAFT, 2005; KRETSUS *et al.*, 2008).

Entre os fatores que influenciam a penetração cutânea de substâncias estão a hidratação do EC, a temperatura, o pH, a concentração e as características moleculares tanto da substância quanto dos componentes da formulação (SANTIS, 2008). O grau de absorção pode ser determinado pela hidratação do EC, uma vez que seu aumento pode minimizar a resistência, provavelmente por provocar um intumescimento das estruturas compactas da camada cornificada, criando canais aquosos que permitem a difusão de substâncias. Sabe-se que o pH afeta o grau de ionização das moléculas e, embora apenas moléculas não ionizadas passem prontamente por membranas lipídicas, sabe-se que aquelas ionizadas penetram efetivamente no EC até um determinado nível, e uma vez que estas apresentam concentração maior do que as neutras quando em solução saturada ou próxima da saturação, elas acabam exercendo uma contribuição significativa para o fluxo total (AULTON, 2005).

Figura 1. Representação esquemática de corte transversal da pele.



LEGENDA: As setas indicam as possíveis vias de penetração de partículas: por glândulas sudoríparas, transfolicular associado às glândulas sebáceas, transcelular e percursos intercelulares.
(FONTE: Adaptado de GEUSENS et al., 2011).

2.2. TERAPIA GÊNICA E RNA INTERFERENTE

A terapia gênica é capaz de substituir ou complementar genes causadores de doenças por intermédio da inserção de genes funcionais em células defeituosas (GRIFFITHS et al., 2004). Para tal, é necessário que o material genético chegue ao alvo de forma satisfatória, surgindo assim o conceito de transfecção celular pela introdução intencional de ácidos nucleicos nas células (VERMA, WEITZMAN, 2005), incluindo DNA plasmidial, oligonucleotídeos antisense e RNA interferente, que modulam a expressão gênica com finalidade terapêutica (MOUNTAIN, 2000; WASUNGU, HOEKSTRA, 2006; BHATTACHARYA, BAJAJ, 2009; LIU, YU, 2010; VERÍSSIMO et al, 2010).

Segundo as várias pesquisas e protocolos clínicos de terapia gênica em humanos, a molécula de RNA foi identificada como uma ferramenta capaz de revolucionar as terapias de um elevado número de doenças. As atividades biológicas dessas moléculas, empregadas normalmente na forma de dupla fita, foram descobertas na década de 1990, quando os pesquisadores americanos Napoli, Lemieux e Jorgensen tentavam aumentar a expressão de genes responsáveis pela pigmentação púrpura das petúnias através da introdução de um transgene envolvido na produção desse pigmento. Entretanto, o gene introduzido

proporcionou efeito oposto ao esperado e bloqueou a síntese do pigmento por silenciamento do transgene e do gene endógeno, originando flores de coloração branca. Esse fenômeno nomeado de co-supressão foi também observado em outras espécies de plantas e fungos (SIFUENTES-ROMERO; MILTON; GARCIA-GASCA, 2011; FRANÇA et al., 2010).

Apesar disso, o mecanismo molecular que levava ao silenciamento gênico permaneceu desconhecido por alguns anos, até que, trabalhando com o verme nematódeo *Caenorhabditis elegans*, um grupo de pesquisadores americanos descobriu que moléculas de RNA dupla fita (dsRNA – *Double Stranded RNAs*) poderiam silenciar a expressão de genes (FIRE et al., 1998). Ao analisarem o efeito do silenciamento gênico por moléculas fitas simples de RNA, os pesquisadores descobriram que o uso da molécula dupla fita era mais efetivo em cerca de cem vezes. Esta descoberta ficou conhecida como Interferência por RNA ou apenas RNAi (FIRE et al., 1998; SIFUENTES-ROMERO; MILTON; GARCIA-GASCA, 2011).

A interferência mediada por RNA é um fenômeno que ocorre praticamente em todas as células eucariotas, podendo exercer um papel importante na eliminação de RNAs anômalos e na defesa do organismo contra agentes infecciosos (SUN; TSAO, 2008). Além de ser uma importante ferramenta de pesquisa, a RNAi é uma grande promessa para o silenciamento de genes causadores de doenças, principalmente quando a redução ou supressão do produto de um gene-alvo específico possa proporcionar benefícios terapêuticos (LENZ, 2005; GUO et al., 2010).

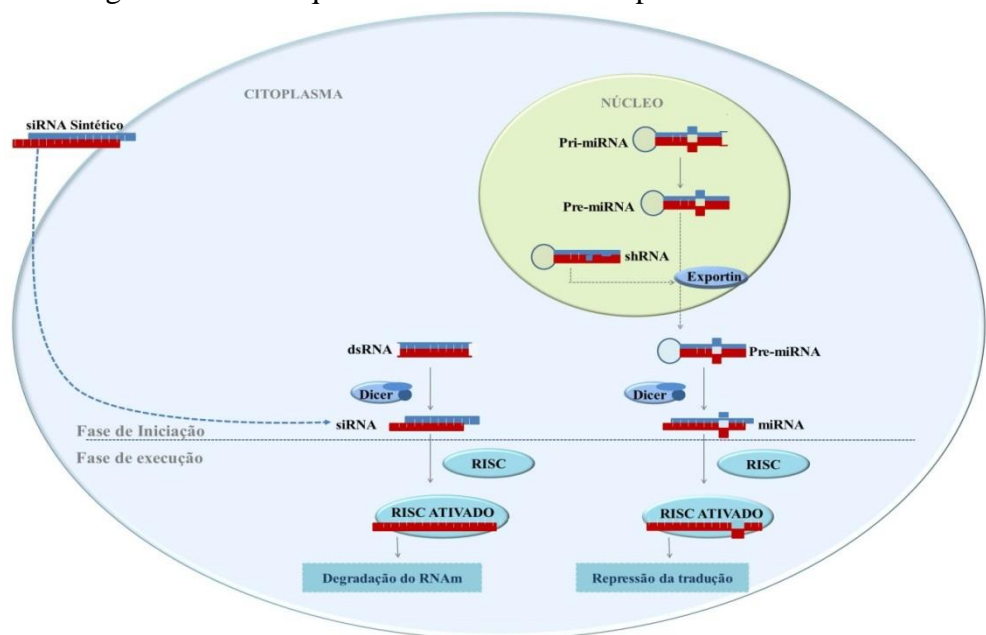
O silenciamento gênico pode ser regulado por duas fases distintas: uma fase de iniciação e uma fase de execução. Na fase de iniciação acontece a formação das moléculas efetoras, as quais podem ser classificadas quanto a sua origem e função. Uma delas é a microRNA (miRNA), quando ligada ao RNA-alvo gera um pareamento incompleto, levando à interrupção da tradução. A produção de miRNA ocorre através da transcrição de genes endógenos em um microRNA primário (pri-miRNA) pela RNA polimerase II, e posteriormente sofre a clivagem por um complexo proteico formado pela Drosha (também pertencente a família RNase III) e pela proteína DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region 8 Protein*), resultando no microRNA precursor (Pré-miRNA), com aproximadamente 70 pares de bases, possuindo uma região dupla fita e uma alça fita simples, formando uma região denominada de *hairpin*. Essa molécula precursora é exportada ao citoplasma pela enzima exportin-5, sendo clivada pela enzima Dicer em um miRNA com cerca de 22 nucleotídeos. Os shRNAs são moléculas com estruturas semelhantes às do miRNAs, podendo ser sintéticas ou produzidas endogenamente a partir da transcrição de vetores que codificam o

shRNA junto a um promotor da RNA polimerase III (FRANÇA et al., 2010; GELEY; MÜLLER, 2004).

Em contrapartida, as pequenas moléculas de RNA (siRNA), provocam a degradação do RNAm, através do pareamento complementar perfeito ao mesmo. Os siRNAs podem ser introduzidos diretamente no citoplasma celular, ou produzidos intracelularmente, a partir da clivagem do dsRNA pela enzima Dicer (pertencente à família RNase III), em um processo dependente de ATP, gerando siRNAs com aproximadamente 21 a 23 pares de bases.

Na etapa de execução, as moléculas efetoras são incorporadas a proteínas celulares formando um complexo multimérico denominado RISC (Complexo de Silenciamento Induzido por RNA), do qual a proteína Argonata 2 (Ago 2) faz parte. Esta proteína apresenta atividade endonuclease direcionada contra a fita de RNAm complementar ao siRNA ou miRNA, além de auxiliar na seleção da fita do siRNA ou miRNA que será incorporada ao complexo RISC, sendo a fita sense descartada e a fita antisense selecionada para guiar o complexo até o RNAm-alvo, degradando-o ou bloqueando a sua ação (Figura 2) (HUANG; LIU, 2011; FRANÇA et al., 2010; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009; GELEY; MÜLLER, 2004).

Figura 2: Fluxograma das vias que levam à interferência por miRNAs e siRNAs.



(FONTE: Dados da pesquisa).

silenciamento de genes *in vivo*, os torna adequados como uma nova classe terapêutica para a supressão de genes promotores de doenças (DE FOUGEROLLES, 2008). Desta forma, o

mecanismo de interferência por RNA tem o potencial de transformar a medicina moderna (BUMCROT et al, 2006; JACKSON, LINSLEY, 2010). Desde 2003, após a primeira evidência da eficácia terapêutica baseada em RNAi em um modelo animal, o ritmo de desenvolvimento desta terapia tem sido rápido (DE FOUGEROLLES, 2007). Atualmente, 65 estudos clínicos estão sendo realizados, sendo mais de 25 para o tratamento de câncer (www.clinicaltrials.gov).

2.3. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO TÓPICA DE RNA INTERFERENTE

Pesquisadores e indústrias farmacêuticas têm investido fortemente no desenvolvimento de terapias baseadas em siRNA. No entanto, os ácidos nucleicos são moléculas volumosas, com elevada densidade de cargas negativas e facilmente degradadas, dificultando o desenvolvimento de sistemas de liberação eficazes (BHATIA; CHAKRABORTY; KRISNAN, 2012). Além disso, as barreiras de transporte celular e do nível tecidual devem ser superadas a fim de proporcionar uma entrega eficiente do material genético (VICENTINI et al., 2013).

Muitos dos sistemas de transferência de genes *in vivo* têm sido desenvolvidos para entrega cutânea, utilizando vetores virais e não virais. Estes sistemas incluem a aplicação tópica direta do gene, injeção intradérmica, eletroporação, iontoforese, sonoforese e pistolas de genes (CARRETERO et al., 2006; KHAVARI et al., 2002; KIKUCHI et al., 2008). Alguns vetores virais permitem a expressão gênica prolongada *in vivo*, por serem capazes de se integrar ao genoma de várias células da pele e estaminais epidérmicas (BAEK et al., 2001; GHAZIZADEH et al., 1999). No entanto, apesar dos vírus recombinantes serem veículos eficazes para a entrega de ácidos nucleicos terapêuticos, o transporte é limitado e pode induzir potenciais respostas imunogênicas e graves oncogêneses. Por isso, carreadores não virais têm sido desenvolvidos para introdução segura de sequências gênicas em células-alvo (GEUSENS, 2011).

Para veiculação tópica de siRNA, o material ideal deve apresentar ligação e condensar o siRNA, ultrapassar a barreira do EC, proporcionar uma proteção contra a degradação por enzimas, promover a transfecção celular, facilitar sua absorção intracelular e a fuga do endossoma para atingir o citoplasma e evitar o metabolismo, e promover eficientemente o silenciamento do gene (CEVC et al., 2009; FERNANDEZ et al., 2009; XIONG et al., 2009).

Os sistemas de liberação de siRNA geralmente consistem em polímeros, lipídios ou peptídeos catiônicos que formam complexos com o ácido nucleico, protegendo-o do ataque de

nucleases e facilitando sua absorção celular, através de interações eletrostáticas com as bicamadas fosfolipídicas carregadas negativamente ou através de grupos de segmentação específicos, como os carboxilatos, a fim de desestabilizar a membrana endossomal por mudança conformacional através da variação de pH, desencadeada pela protonação gradual dos resíduos de ácidos carboxílicos inseridos ao longo da cadeia polimérica (CONVERTINE et al., 2009).

Para superar essas propriedades de barreira, Geusens et al., (2009) projetou lipossomas deformáveis, chamados de transfersomas. Estes foram os primeiros carreadores de drogas relatados por atravessar a pele intacta espontaneamente sob a influência de uma hidratação transcutânea. Eles são caracterizados pela presença de um ativador de extremidade, que desestabiliza bicamadas lipídicas e, assim, aumenta a capacidade de deformação (GEUSENS et al., 2009). De fato, diversos estudos *in vivo* têm relatado que lipossomas ultradeformáveis são capazes de transferir quantidades terapêuticas de drogas, incluindo macromoléculas, através do EC (CEVC 2003; SONG, KIM, 2006).

Estudos de RNAi em células cancerosas têm sido realizados, particularmente envolvendo genes comuns a diferentes formas de câncer, como a glicoproteína-P, em células da mama, cólon, próstata, rins, fígado e pele, sendo os genes responsáveis pela resistência das células a múltiplas drogas (DUXBURY et al., 2004). Com isso, diferentes sistemas carreadores de moléculas interferentes vêm sendo aplicados *in vitro*, a fim de otimizar o silenciamento de genes envolvidos no crescimento desfavorável de células anômalas (PAI et al., 2006; TAN, JIANG, ZHANG, 2007; YU, PENG, DHARAP, 2005; TAKESHITA, MINAKUCHI, NAGAHARA, 2005; MAGALHÃES, 2013).

Pelo crescente desenvolvimento de carreadores e métodos de transfecção gênica, parece claro que, no futuro, haverá um vasto portfólio desses sistemas para as diferentes complicações clínicas. Isto certamente ampliará as oportunidades para a aplicação da terapia gênica no contexto clínico (VERMA, WEITZMAN, 2005).

2.4. MICROEMULSÕES

As microemulsões (MEs) são sistemas capazes de veicular diversas substâncias, devido à alta capacidade de solubilização e a possibilidade de controlar as taxas de liberação de moléculas ativas. Em particular, elas têm recebido atenção considerável para uso tópico (HEUSCHKEL et al., 2008; KREILGAARD, 2002), visto que as taxas de permeação cutânea

são significativamente maiores quando comparadas a emulsões ou outros veículos convencionais (BOLZINGER et al., 2008; SINTOV, SHAPIRO, 2004).

Os sistemas microemulsionados foram originalmente descritos por Hoar e Schulman, em 1943. No entanto, o termo microemulsão só foi utilizado por Schulman et al. (1959) no final da década de 1950, definindo-a como sendo um sistema fluido e translúcido obtido por titulação até o ponto de clarificação, onde a mistura entre uma emulsão simples com álcool de cadeia média, como hexanol ou pentanol, se mostrava homogênea (HOAR e SCHULMAN, 1943). Neste ponto de clarificação, não era necessário agitação, sendo a dispersão formada espontaneamente. O tamanho das gotas variava de 100 a 600 nm, significativamente menores que os da emulsão simples inicial (1 e 10 μ m), justificando seu aspecto transparente (ESTEPHAN, 2012).

No entanto, essa definição de Hoar e Schulman torna-se restrita a partir do momento que desconsidera a potencial formação de uma variedade de sistemas e fases facilmente reconhecidas microscopicamente através da mistura de óleo, água e tensoativo. Independente da estrutura formada, estas dispersões são estruturas altamente dinâmicas, submetidas a oscilações contínuas e espontâneas, tipicamente na gama de 1-100 nm (NAOUI et al., 2011).

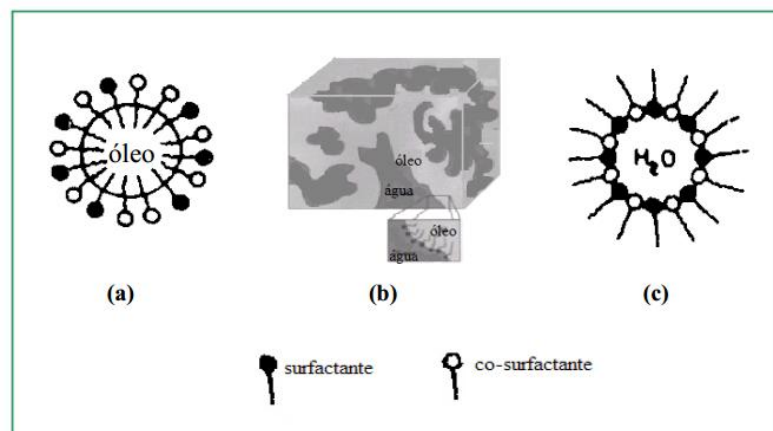
Neste contexto, o aperfeiçoamento dos estudos com MEs conduziu a algumas modificações, e dentre os conceitos mais recentes nota-se que as microemulsões se formam a partir de uma aparente solubilização espontânea entre dois líquidos imiscíveis, água e óleo, na presença de um tensoativo e, se necessário, um cotensoativo. Sendo caracteristicamente sistemas dispersos, monofásicos, termodinamicamente estáveis, transparentes ou translúcidos, com baixíssima tensão interfacial e com capacidade de combinar grandes quantidades de líquidos imiscíveis em uma única fase homogênea (ROSSI et al., 2007; FORMARIZ et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2004; KOGAN, GARTI, 2006; KREILGAARD, 2002).

Do ponto de vista microestrutural (Figura 3), as MEs podem ser classificadas em três tipos: água/óleo (A/O), óleo/água (O/A) ou estruturas bicontínuas. Nas MEs do tipo A/O, o componente hidrofílico é disperso na forma de gotículas coloidais na fase lipídica. Enquanto que nas MEs O/A, a fase hidrofílica é contínua com gotículas de óleo dispersas, as quais estão recobertas pelo tensoativo. Ao variar as condições de emulsificação, ambas são passíveis de inversão de fases. Nas MEs com estrutura bicontínua os componentes hidrofílicos e lipofílicos formam canais adjacentes alongados, sendo uma rede dinâmica de canais de água e de óleo, com volumes relativamente iguais, e monocamadas dos tensoativos nas interfaces (D'CRUZ, UCKUN, 2001; GODDERRIS et al., 2006; KREILGAARD, 2002; LAWRENCE, REES, 2000; MO, ZONG, 2000).

A escolha adequada e a concentração dos componentes tornam-se extremamente importantes para a orientação desses sistemas (SIROTTI et al., 2002). Os sistemas microemulsionados podem facilitar a permeação cutânea de fármacos (PADULA; NICOLI; SANTI, 2009), provavelmente devido ao fato de possuírem quantidade significativa de tensoativos, que podem interagir com o estrato córneo e desestruturar a camada lipídica da pele, fazendo com que os lipídios passem de uma forma cristalina para uma forma líquida desordenada, aumentando a permeabilidade cutânea e facilitando a penetração de substâncias que normalmente não atravessariam essa barreira (KREILGAARD, 2002).

Estes sistemas podem ainda modular a liberação local ou sistêmica de fármacos através de diferentes mecanismos (HOELLER; KLANG; VALENTA, 2008; FORMARIZ et al., 2005; BAROLI et al., 2000). Por esta razão, as MEs têm se tornado foco de grande interesse para administração cutânea, com o objetivo de se obter um efeito local do fármaco, o que poderá ser acompanhado de uma diminuição da sua absorção sistêmica, muitas vezes não necessária, como nas aplicações estéticas de cosméticos.

Figura 3. Representação esquemática dos tipos de microemulsões.

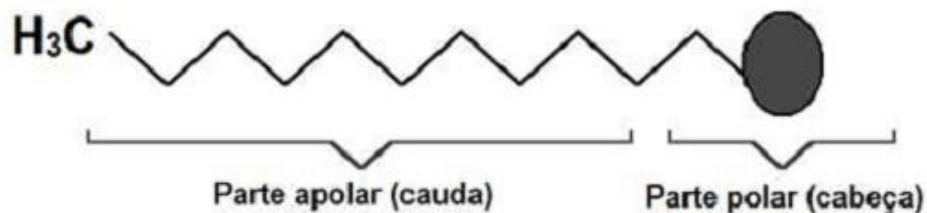


LEGENDA: (a) Microemulsão O/A; (b) Microemulsão bicontínua; (c) Microemulsão A/O ou reversa. (FONTE: MENDONÇA, 2005).

Os agentes tensoativos têm um papel fundamental na preparação de ME, por possuírem estrutura anfifílica (figura 4) (MANIASSO, 2001). Os ésteres de sorbitano também conhecidos como a série comercial Span[®], são de caráter lipofílico, e por este motivo formam sistemas do tipo A/O. Eles são frequentemente utilizados em combinação com os polissorbatos para obter ME A/O e O/A. Os polissorbatos são derivados dos ésteres de sorbitano e do polietilenoglicol, correspondendo comercialmente à série dos Tween[®]. Esses compostos proporcionam maior estabilidade ao sistema, assegurando melhor encapsulamento

e liberação controlada da substância encapsulada quando comparados aos tensoativos de menor peso molecular (BONNET et al., 2010). Além disso, apresentam baixa toxicidade, sendo praticamente compatíveis com todos os outros tipos de tensoativos. Em adição, possuem um pH neutro e são estáveis ao calor, às variações de pH e as elevadas concentrações de eletrólitos.

Figura 4. Representação esquemática da estrutura básica de um tensoativo.



(FONTE: LOUZEIRO, 2012.)

Os cotensoativos, em contrapartida, são responsáveis pela redução adicional da tensão interfacial necessária para a formação e estabilidade termodinâmica das microemulsões, além de promoverem a fluidificação do filme interfacial formado pelo tensoativo, impedindo a elevação significativa da viscosidade do sistema (VANDAMME, 2002). Adicionalmente, a presença de um álcool, como o propilenoglicol (PPG), pode influenciar a solubilidade das fases aquosa e oleosa, devido à sua partição entre ambas as partes (LAWRENCE, 2000). A presença simultânea de domínios hidrofílicos e lipofílicos em sistemas compartimentalizados permite que as MEs tornem-se capazes de solubilizar uma vasta gama de substâncias, podendo conter até mesmo fármacos e moléculas bioativas de diferentes polaridades em uma mesma formulação (FANUN et al., 2011).

Os óleos vegetais têm se destacado como constituinte da fase oleosa de MEs cosméticas, devido às propriedades como baixa viscosidade e massa molecular, o que os tornam menos oclusivos que os óleos minerais. Além disso, apresentam boa penetração na pele e capacidade de transporte de agentes terapêuticos, são seguros e biocompatíveis, podem fornecer nutrientes como ácidos graxos essenciais à pele, além do custo reduzido. Estes fatores reforçam a atual tendência de utilização de produtos naturais (BLOISE, 2003).

Sendo assim, o óleo de canola é caracterizado pelo conteúdo de baixos níveis de ácidos graxos saturados (7%), quantidades substanciais de ácidos graxos monoinsaturados e poli-insaturados, incluindo 61% de ácido oléico, 21% de ácido linoléico, e 11% de ácido α -

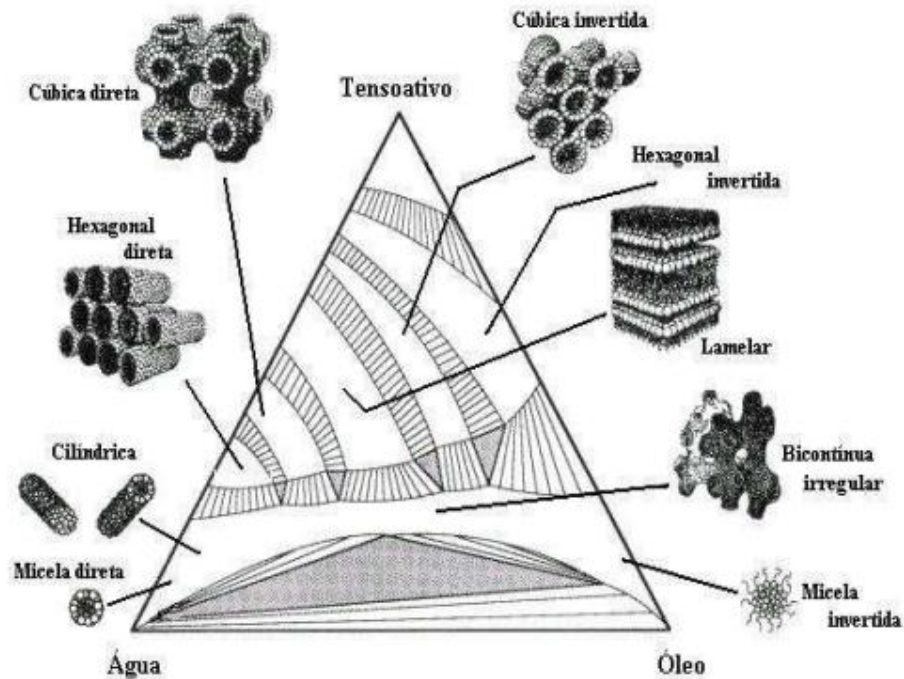
linolênico (JOHNSON et al., 2007), além de esteróis vegetais (0,53-0,97%) e tocoferóis (700-1200 ppm) (GUNSTONE, 2011; ORLOVIUS, 2012). Todos estes componentes são cardioprotetores e anti-inflamatórios. Várias pesquisas estão sendo realizadas para avaliar os efeitos do consumo de óleo de canola sobre a doença cardíaca coronária, a sensibilidade à insulina, a peroxidação lipídica, processos inflamatórios, metabolismo energético e crescimento de células cancerígenas (SÖDERGREN et al., 2001; HUNTER, ZHANG, KRIS-ETHERTON, 2010; ION et al., 2011; GILLINGHAM, HARRIS-JANZ, JONES, 2011; GILLINGHAM, ROBINSON, JONES, 2012). Pelas atividades anti-inflamatória e antioxidante, o referido óleo pode atuar de forma sinérgica ao siRNA para prevenir o fotoenvelhecimento.

2.4.1. Diagrama de Fases

Na preparação dos sistemas microemulsionados é essencial levar em consideração a proporção dos componentes, a estrutura do tensoativo e do cotensoativo e o tipo de óleo. Deste modo, a construção de um diagrama de fases (Figura 5) é uma ferramenta fundamental para caracterizar em que condições experimentais os sistemas emulsionados existem, para, posteriormente, selecionar o tipo de sistema através da região do diagrama com as proporções dos componentes que se deseja trabalhar (FORMARIZ et al., 2004; POLIZELLI, 2007).

Os diagramas ternários representam diretamente sistemas microemulsionados formados por três componentes, ou seja, água, óleo e tensoativo. Sua representação pode ser feita em um diagrama triangular onde cada constituinte puro ocupa um vértice do triângulo, sendo que cada vértice do diagrama indica 100% de um dos componentes. Em contrapartida, nos diagramas pseudoternários dois constituintes são agrupados e supõe que se formam pseudoconstituintes puros (OLIVEIRA et al., 2004). Normalmente, utilizam-se dois tipos de relações, água - tensoativo e tensoativo - cotensoativo. Segundo Silva (2006), a primeira relação é usada em estudos de difusão da luz e a segunda no estudo do comportamento de fases da ME.

Figura 5. Estruturas de microemulsões em um diagrama ternário.



(FONTE: GOMES, 2009).

2.4.2. Equilíbrio Hidrófilo – Lipófilo (EHL)

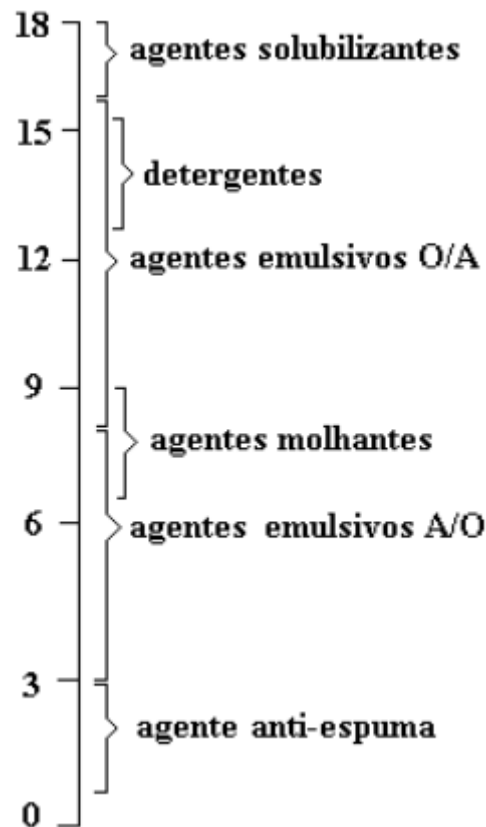
O EHL é uma propriedade particular de cada tensoativo. Ele foi introduzido por Griffin em 1949 para facilitar a seleção de tensoativos ideais para um determinado sistema emulsionado (ROSSI et al., 2007). Esse conceito baseia-se no fato de que estas moléculas são constituídas por uma região hidrossolúvel e outra lipossolúvel, sendo a associação entre elas determinante para suas características e aplicabilidade (SANTOS et al., 2011).

A regra de Bancroft ofereceu um primeiro guia empírico para formular emulsões. Em 1913, ele reconheceu que o tipo de emulsão depende da natureza do agente tensoativo, onde a fase na qual o tensoativo é mais solúvel seria a fase contínua. Posteriormente, Bancroft (1926) desenvolveu uma forma mais elaborada de sua teoria, a qual relacionou o tipo de emulsão em termos de tensões interfaciais. Ele propôs que o filme interfacial apresentava uma natureza duplex, consistindo de tensões interfaciais interna e externa, e que o filme curvava-se em direção à fase com tensão interfacial mais elevada.

A partir da regra de Bancroft, estudos avançaram sobre a relação entre a composição das fases e a estabilidade das emulsões. Diante disso, o EHL é numericamente representado em uma escala com valores que vão de 0 a 18, em função das regiões polar e apolar presentes

na molécula do tensoativo. Como demonstrado na Figura 6, as substâncias de EHL muito baixo, acentuadamente lipofílicas, são agentes antiespumantes. Aquelas cujo valor de EHL é entre 3 e 9 indicam predominância do componente apolar, tornando-as adequadas para o preparo de ME A/O. Por outro lado, valores superiores a 9 apontam a prevalência da região polar, útil na obtenção de ME O/A (ZANIN et al., 2002). O valor igual a 8 aponta o processo de inversão de fases e, portanto, formação de MEs bicontínuas, as quais contêm volumes relativos aproximadamente iguais entre a fase aquosa e a fase oleosa (LAWRENCE e REES, 2000; FORMARIZ et al., 2005).

Figura 6. Escala de Griffin.



(FONTE: Adaptado de FERNANDES, 2005).

Emulsões estáveis, especialmente as que utilizam tensoativos sintéticos, são melhores formuladas quando utilizam um ou mais tensoativos com valores próximos ao requerido pela fase oleosa (ORAFIDIYA; OLADIMEJI, 2002). Assim, a quantidade percentual necessária de cada tensoativo para obter um EHL próximo ao requerido pelo óleo pode ser obtida pela seguinte equação (FLORENCE et al, 2003):

$$EHL_{(req)} = x \cdot EHL_{(A)} + (1-x) \cdot EHL_{(B)} \quad \text{(Equação 1)}$$

Onde: x = Proporção de tensoativo A e (1-x) = Proporção de tensoativo B

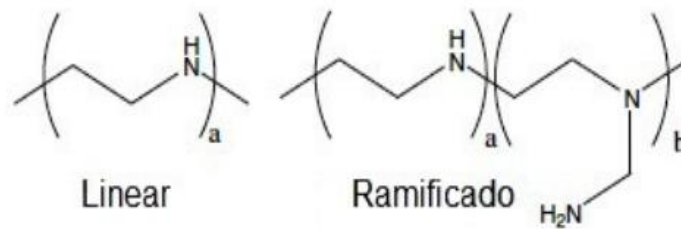
2.5. POLIETILENOIMINA (PEI)

Pelo grande interesse em sistemas carreadores poliméricos, vários polímeros naturais e sintéticos têm sido obtidos e caracterizados. O PEI, que foi utilizada pela primeira vez no transporte de genes em 1995 (BOUSSIF et al., 1995), emergiu como um dos candidatos mais promissores para o desenvolvimento de vetores para transfecção eficiente de ácidos nucleicos (NIMESH, CHANDRA, 2009).

O PEI é um polímero solúvel em água, e em outros solventes orgânicos, como o metanol, etanol e clorofórmio (ALVAREZ et al., 2005), apresentando alta densidade de carga catiônica em pH fisiológico devido aos grupamentos amino protonáveis em cada terceira posição (GODBEY, MIKOS, 1999; TANG, SZOKA, 1997). Em pH ácido, cerca de 20% dos nitrogênios presentes em sua estrutura molecular estão protonados, o que permite o PEI formar complexos com ácidos nucleicos por ligações do tipo não-covalente (GUNTHER et al., 2011). Entretanto, em pH básico, esse polímero é essencialmente neutro (TIAN et al., 2006). Além disso, ele tem habilidade de formar um grande número de complexos com íons metálicos, polieletrólitos aniônicos e tensoativos (KUO, CHEN, JAO, 2005). Apresenta, ainda, temperatura de transição vítrea (-23 °C) e ponto de fusão (~ 60 °C) relativamente baixos (YANG, COUTINHO, YANG. J, 2008).

Este polímero sintético de alta densidade de carga catiônica está disponível comercialmente em uma gama de pesos moleculares e nas formas ramificadas e lineares (Figura 7). O PEI com elevado peso molecular (25 kDa) é considerada como um dos veículos não-virais mais eficientes para o silenciamento de genes (GARY, PURI, WON, 2007), entretanto, a forte carga de superfície positiva provoca citotoxicidade grave e ligação não específica com proteínas do soro (ZHANG et al., 2006). Por outro lado, o PEI de baixo peso molecular (0,6 e 1,8 kDa) tem baixa citotoxicidade, porém mostra-se com baixa atividade de transfecção (GODBEY, MIKOS, 1999; FISCHER et al., 2003; LI et al., 2013).

Figura 7. Estrutura molecular do polímero catiônico PEI.



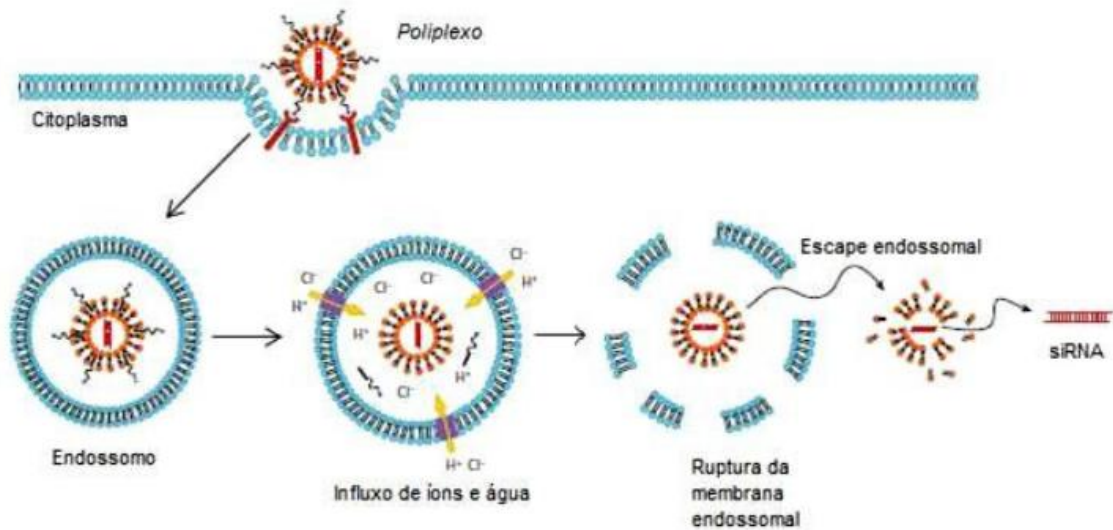
(FONTE: MARTIMPREY et al., 2009).

A toxicidade do PEI de alto peso molecular pode ser reduzida mascarando as suas cargas, no entanto, isto pode diminuir a eficiência de transfecção (NIMESH, 2006; NIMESH, 2007). Em função disto, vários autores têm proposto a modificação do polímero, tal como sua acetilação (SHIM, KWON, 2008). No entanto, o PEI modificado torna-se instável a um pH em torno de 5,0 e se degrada quando atinge o endossoma das células, liberando o ácido nucleico. Swami et al. (2007) sugeriram usar um PEI-bisepóxido em que as aminas primárias são alteradas para aminas secundárias e terciárias. A redução do número de grupos amina primários conduz a uma diminuição da toxicidade do PEI, fornecendo derivados de polímeros que são mais adequados para transfecção *in vitro* (MARTIMPREY, 2009).

Estudos comparativos entre nanopartículas preparadas com PEI de alto peso molecular (25 kDa) ramificada e linear mostraram que o uso da primeira forma é mais satisfatório, pois permitiu a obtenção de carreadores estáveis e positivamente carregados após a complexação com siRNA, eficiente captação celular e maior silenciamento de genes (KWOK, HART, 2011). Além disso, o PEI de alto peso molecular é capaz de conferir proteção ao siRNA contra a degradação enzimática, bem como a redução de sua toxicidade quando associada a ligantes, como o polietilenoglicol (ZHANG, 2004; GRAYSON, DOODY, PUTNAM, 2006). Dessa forma, os complexos formados entre siRNAs e PEI apresentam uma carga residual positiva, o que permite sua interação com as membranas celulares de carga negativa, seguido da internalização por endocitose (DEPIERI, 2012).

A liberação dos complexos siRNA/PEI ocorre no citoplasma após sofrerem o escape endossomal pelo mecanismo “efeito esponja de prótons” (Figura 8). Este mecanismo é mediado por agentes como o PEI, com alta capacidade tamponante e flexibilidade para intumescer a micela quando protonados. A protonação provoca um intenso influxo de prótons, íons cloreto e água para o interior do endossomo, levando ao aumento da pressão osmótica, o que eventualmente ocasiona a dilatação e ruptura da membrana endossomal e liberação do conteúdo internalizado (BARRATT, FATTAL, 2009; TSENG, MOZUMDAR, HUANG, 2009; VARKOUHI et al., 2011; BRUNO, 2011)

Figura 8. Representação esquemática do mecanismo “efeito esponja de prótons”.



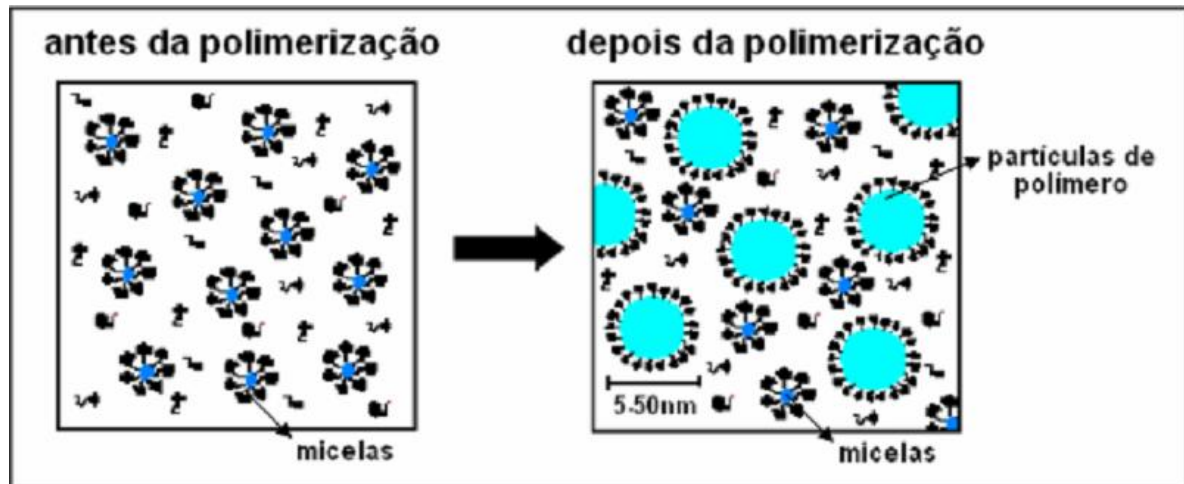
(FONTE: Adaptado de HUANG, LIU, 2011).

2.6. POLIMERIZAÇÃO EM MICROEMULSÕES

A polimerização em ME consiste em uma técnica que envolve a preparação de partículas poliméricas à escala nanométrica (VALENTE, 2008). Este sistema é composto por micelas poliméricas intumescidas e gotículas de monômeros (Figura 9) (VOGEL, 2007).

A descrição mais pormenorizada de polimerização em ME só surgiu em 1980 por Stoffer e Bone, quase 30 anos após o artigo introdutório de Schulman. Estes autores realizaram polimerizações do tipo A/O, utilizando o metacrilato de metila (MMA) como monômero, o dodecilsulfato de sódio (SDS) como tensoativo e o pentanol como cotensoativo. No ano seguinte, em 1981, Thomas et al. desenvolveram a primeira ME utilizando o monômero estireno. Esta polimerização foi realizada em fase aquosa usando o estireno, o brometo de dodeciltrimetilamônio como tensoativo e o hexanol como cotensoativo. O resultado foi uma dispersão termodinamicamente estável em que as partículas de polímero apresentavam diâmetros na ordem dos 20-50 nm (GAN et al, 1994; TAUER et al, 2003; VOGEL, 2007).

Figura 9. Polimerização em microemulsão.

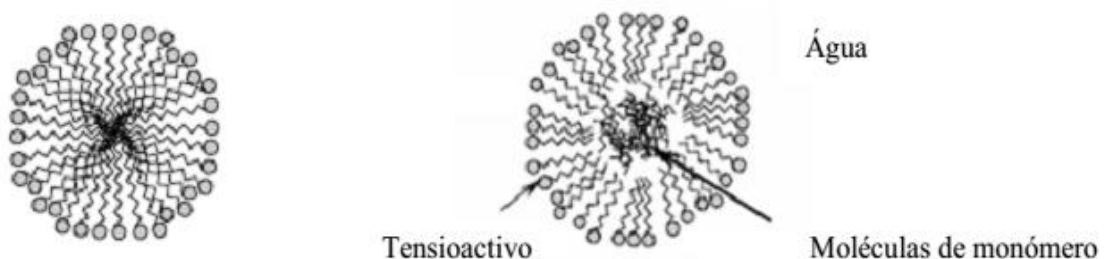


(FONTE: VOGEL, 2007).

As partículas poliméricas obtidas por polimerização em ME apresentam, tipicamente, pesos moleculares na ordem de 10^6 - 10^7 Daltons (MEYER, KEUREBTJES, 2002; HERMANSON, 2003) e diâmetros de 1-100 nm (QIU, TEXTER, 2007). Estas características são influenciadas pela concentração de tensoativos na interface água-óleo, pela quantidade de cotensoativo, pelo tempo e temperatura de reação (YAN, TEXTER, 2006).

Como descrito no item 2.4, as MEs podem ser classificadas em vários tipos, sendo as mais comuns O/A, A/O e o sistema bicontínuo. Desta forma, os polímeros podem se rearranjar na estrutura microemulsionada de acordo com a sua solubilidade, podendo apresentar-se internamente ou externamente à micela. Por exemplo, nas MEs do tipo O/A, os monômeros hidrofóbicos ficam aprisionados na fase descontínua representada pelo óleo (Figura 10), sendo este tipo de polimerização mais comum (BOSSEV et al., 2003).

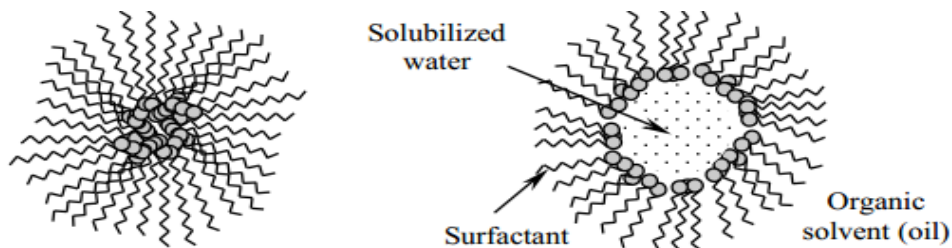
Figura 10. Representação esquemática da micela esférica (à esquerda) e com o polímero hidrofóbico (à direita).



(FONTE: BOSSEV et al, 2003).

A técnica de polimerização em ME A/O (Figura 11), também designada por ME inversa, foi alvo de estudo intensivo por Candau et al. (1999), usando monômeros hidrófilos, como a acrilamida e o ácido acrílico, estabilizados por 1,4-bis(2-etilhexil) sulfossuccinato de sódio. As micelas inversas obtidas inicialmente apresentaram diâmetros na ordem dos 6 nm, em contrapartida, as partículas de poli(acrilamida) apresentaram diâmetros de 16-19 nm.

Figura 11. Representação esquemática de micela inversa (à esquerda) e com o polímero hidrofílico (à direita).



(FONTE: BOSSEV et al, 2003).

A polimerização em sistemas bicontínuos surgiu na tentativa de reduzir a elevada razão entre tensoativos e cotensoativos (YAN, TEXTER, 2006). Candau et al. (1999) utilizaram esta técnica na copolimerização de 2-acrilamido-2-metilpropanosulfonato de sódio com acrilamida, produzindo um hidrogel estável em que as partículas apresentavam diâmetros aproximadamente de 100 nm (LOVELL, 1997; YAN, TEXTER, 2006).

Com o passar do tempo, a polimerização em ME teve um desenvolvimento significativo, sendo assim alvo de muitos estudos (PAVEL, 2004). As polimerizações em meio disperso vêm sendo utilizadas na indústria para obtenção de produtos nas áreas têxtil, alimentícia, agrária, farmacêutica e biomédica, como sistemas de liberação controlada de ativos e ácidos nucleicos (MEDEIROS, 2010; GUNTHER et al, 2011; LI et al, 2013). Essa metodologia permite a incorporação de vários monômeros com reatividades e polaridades distintas, o controle das características e morfologias das partículas de polímero e um estado inicial termodinamicamente estável e bem definido. Além disso, o polímero obtido apresenta elevado peso molecular e os tempos de reações são reduzidos (TAUER et al, 2003; SAHOO et al., 2004; O'DONNELL, KALER, 2007). Contudo, esta técnica apresenta algumas limitações, principalmente, pelo alto índice de toxicidade presente nesses compostos quando associados aos tensoativos (CANDAU et al., 1999; POKHRIYAL et al., 2000; YAN, TEXTER, 2006). Esta desvantagem vem sendo contornada através da modificação estrutural

do polímero, por adição de ligantes aos tensoativos ou ainda pela utilização de tensoativos reativos ou polimerizáveis (POKHRIYAL et al., 2000; HE, PAN, REMPEL, 2007).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar sistemas microemulsionados contendo siRNA.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um diagrama de fases pseudoternário para obtenção de região de ME;
- Avaliar a concentração ideal de PEI na formulação;
- Incorporar o siRNA nas formulações obtidas;
- Caracterizar as MEs em aspectos de condutividade, índice de refração, microscopia eletrônica de transmissão, tamanho de gotículas e potencial zeta, microscopia de luz polarizada, difração de raio X e calorimetria exploratória diferencial;
- Avaliar a eficiência de encapsulação qualitativa e quantitativa;
- Determinar o grau de liberação de siRNA pelos sistemas;
- Realizar ensaios de estabilidade física dos sistemas microemulsionados através de testes de centrifugação, estresse térmico e ciclo congelamento-descongelamento, além da estabilidade do siRNA frente à enzima RNase;
- Avaliar o grau de citotoxicidade dos sistemas microemulsionados;
- Realizar estudos de reologia para determinação do tipo de fluxo e viscosidade.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

Os sistemas microemulsionados foram constituídos por:

- a) **Fase oleosa:** Óleo de Canola
- b) **Fase aquosa:** Água Milli-Q, PEI, propilenoglicol, siRNA
- c) **Tensoativos ou surfactantes:** Span[®] 80 (Mono-oleato de sorbitano 80) e Tween[®] 80 (Polissorbato 80)

Todos os reagentes foram adquiridos junto à empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). O siRNA é específico contra uma proteína envolvida no fotoenvelhecimento; o PEI usado foi da forma ramificada e de alto peso molecular (Fluka, Mw 750,000); os demais reagentes foram: O óleo de canola (Supelco), o propilenoglicol (Mw 76,09), o Span[®] 80 (surfactante não iônico) e o Tween[®] 80 (mol wt 1310).

4.2. MÉTODOS

4.2.1. Construção dos diagramas de fases pseudoternário

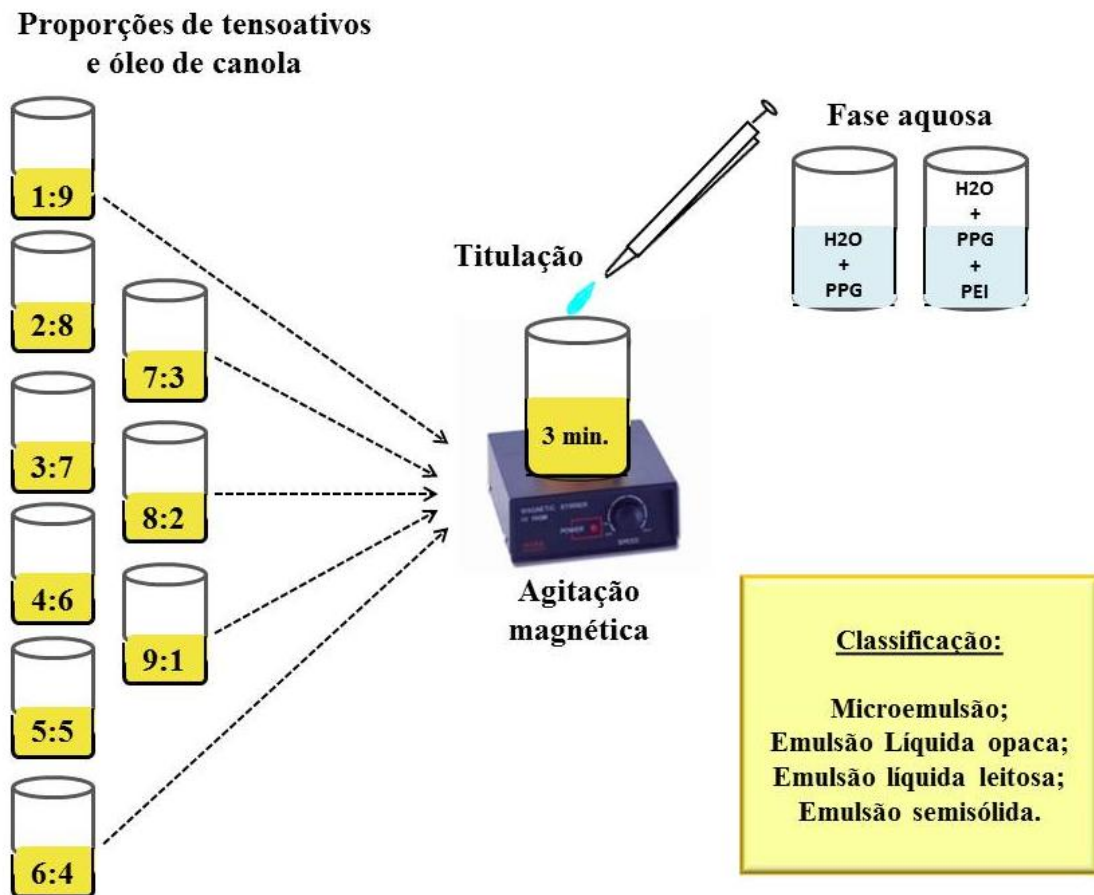
Os tensoativos utilizados foram o Span[®] 80 e o Tween[®] 80 numa razão de 3:1, respectivamente, calculada pela equação 1 (página 34). A fase aquosa consistiu de água Milli-Q e propilenoglicol (PPG), na proporção de 1:3. Inicialmente, o óleo de canola e os agentes tensoativos foram misturados em proporções que variaram de 9:1 a 1:9. Em seguida, diferentes volumes da fase aquosa foram titulados sob agitação magnética (IKA, RH básica 1, Brasil), à temperatura ambiente, durante três minutos (Figura 12). Após cada titulação de fase aquosa, os sistemas obtidos foram classificados por inspeção visual e caracterizados em: ME, Emulsão Líquida Opaca (ELO), Emulsão líquida Leitosa (ELL) e Emulsão Semi-sólida (ESS).

Para avaliação da concentração ideal de PEI, um ponto de microemulsão foi selecionado e sua solução aquosa foi substituída por PEI 5% ou 10%, PPG e água Milli-Q, nas proporções 3:3:1, 3:2:1 e 3:1:1, respectivamente. Aquele sistema que apresentou

formação de gotículas, visualizado por microscopia eletrônica (ver subitem 4.2.3.1), foi selecionado (NOTE; KOETZ; KOSMELLA, 2006). Diante deste resultado, um novo diagrama de fases foi construído na presença do polímero 5%, titulando a fase aquosa (3:3:1) na oleosa.

Os diagramas de fases obtidos tiveram os pontos traçados com o auxílio do software Origin[®] Pro 8.5.1 (VICENTINI, et al, 2013). Todo o preparo das formulações foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos (LDCPF) da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

Figura 12. Desenvolvimento dos diagramas de fases pseudoternário.



(FONTE: Dados da pesquisa).

4.2.2. Incorporação de RNA interferente

Partindo-se dos diagramas obtidos, foram selecionados os pontos de ME. O siRNA foi adicionado à fase aquosa em diferentes concentrações, de acordo com as técnicas de caracterização. Após o preparo da fase oleosa (SPAN[®] 80 + Tween[®] 80 + óleo de canola), a

fase aquosa (PPG + água + siRNA ou PEI + PPG + água + siRNA) foi gotejada sob constante agitação por 3 minutos.

4.2.3. Caracterização dos sistemas microemulsionados

Os estudos de microscopia eletrônica de transmissão (MET) e ensaios de reologia foram realizados no Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE); a microscopia de luz polarizada (MLP), o espalhamento de luz dinâmica (DLS) e o índice de polidispersão (IPD) foram executados na Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), sendo o primeiro no departamento de física e os dois últimos no de farmácia; a eletroforese em gel de agarose foi realizada no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães (CPqAM/FIOCRUZ); o laboratório de Genética e Biologia Molecular da UEPB forneceu condições para que os estudos de eficiência de encapsulação, ensaios de liberação e curva de calibração do siRNA fossem desenvolvidos; ainda nesta universidade, o estudo de calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento e Avaliação de Biomateriais do Nordeste (CERTBIO).

4.2.3.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão

As MEs brancas e com siRNA foram gotejadas em grades de níquel de 300 mesh e preparadas pelo método de contrastação negativa em ácido fosfotúngstico 2 %. Em seguida, as amostras foram analisadas em microscópio FEI Morgagni com intensidade de 80 kV (ZHANG, W. et al., 2010).

4.2.3.2. Avaliação do tamanho e distribuição de gotículas

O diâmetro médio e a distribuição das gotículas foram mensuradas através da técnica de espalhamento de luz dinâmica (DLS), com leitura em equipamento Zetatrac SL-OS-07 (Betatec, Inc., Toronto, Canadá). Os valores médios foram calculados em triplicata \pm SD (PEREIRA, 2012).

4.2.3.3. Eletroforese em Gel de Agarose

A eletroforese em gel de agarose foi utilizada para determinação qualitativa da eficiência de encapsulação e liberação, além da estabilidade do siRNA na formulação na presença da enzima RNase, que degrada o RNA livre. Os sistemas microemulsionados contendo siRNA (1 μM) foram submetidos a gel de agarose 1 % contendo brometo de etídio (0,5 mg / ml) com aplicação de tampão de corrida Tris acetato 40 mM e EDTA 1 mM. Para avaliação da estabilidade, a enzima RNase foi adicionada à formulação na concentração final de 30 ng / μL por 15 minutos, à temperatura ambiente, antes da aplicação no gel. A eletroforese realizou-se a 100 V, com amperagem aberta, por 45 min. As imagens foram analisadas através do software Kodak molecular imaging v.4.0.0, para quantificar a intensidade das bandas, medida em pixels (HUNG et al., 2005).

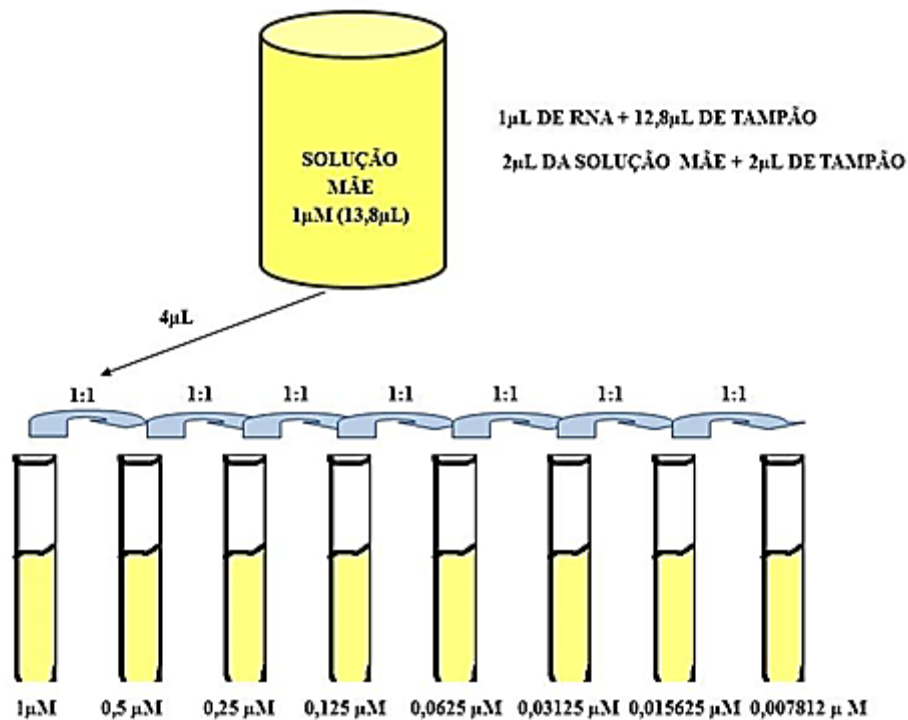
4.2.3.4. Curva de Calibração do siRNA

Para a determinação da eficiência de encapsulação e estudos de liberação de siRNA, foi necessário construir uma curva de calibração a fim de avaliar se o método de escolha era capaz de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração de siRNA dentro de uma variação estabelecida. Sendo assim, partindo-se de uma solução estoque de siRNA na concentração de 1 μM , foram realizadas oito diluições subsequentes no volume de 2 μL com tampão TRIS-EDTA, pH 8,0 (Figura 13). Após tratamento estatístico dos valores de absorbância observados, foi determinado o coeficiente de correlação (R^2), além da equação da reta. Segundo Brasil (2012), o coeficiente de correlação deve ser maior que 0,98. A absorbância foi determinada em um comprimento de onda de 260 nm, específico para este tipo de ácido nucleico (AMJAD et al., 2014). Em adição, a concentração de siRNA foi calculada através da seguinte equação:

$$[\text{siRNA}] (\mu\text{g/mL}) = \frac{A_{260} \times \text{FC} \times \text{FD}}{1000}, \quad \text{(Equação 2)}$$

Onde: FC corresponde ao fator de correção e FD fator de diluição.

Figura 13. Diluições sucessivas para construção da curva de calibração.



(FONTE: Dados da pesquisa).

4.2.3.5. Eficiência de Encapsulação (EE)

A EE de siRNA (100 nM) pela ME foi determinada pelo método de ultracentrifugação (Optima L-100 XP Ultracentrífuga com um rotor NV 70.1, Beckman-Coulter, EUA) à 14000 rpm durante 30 min. O teor de siRNA no sobrenadante foi analisado por um espectrofotômetro (Agilent Technologies Cary 60, UV-Vis) a 260 nm. As amostras foram preparadas e avaliadas em triplicata. A EE foi calculada usando a seguinte equação (KATAS et al, 2013):

$$E.E (\%) = \frac{\text{siRNA Total} - \text{siRNA livre}}{\text{siRNA total}} \times 100 \quad \text{(Equação 3)}$$

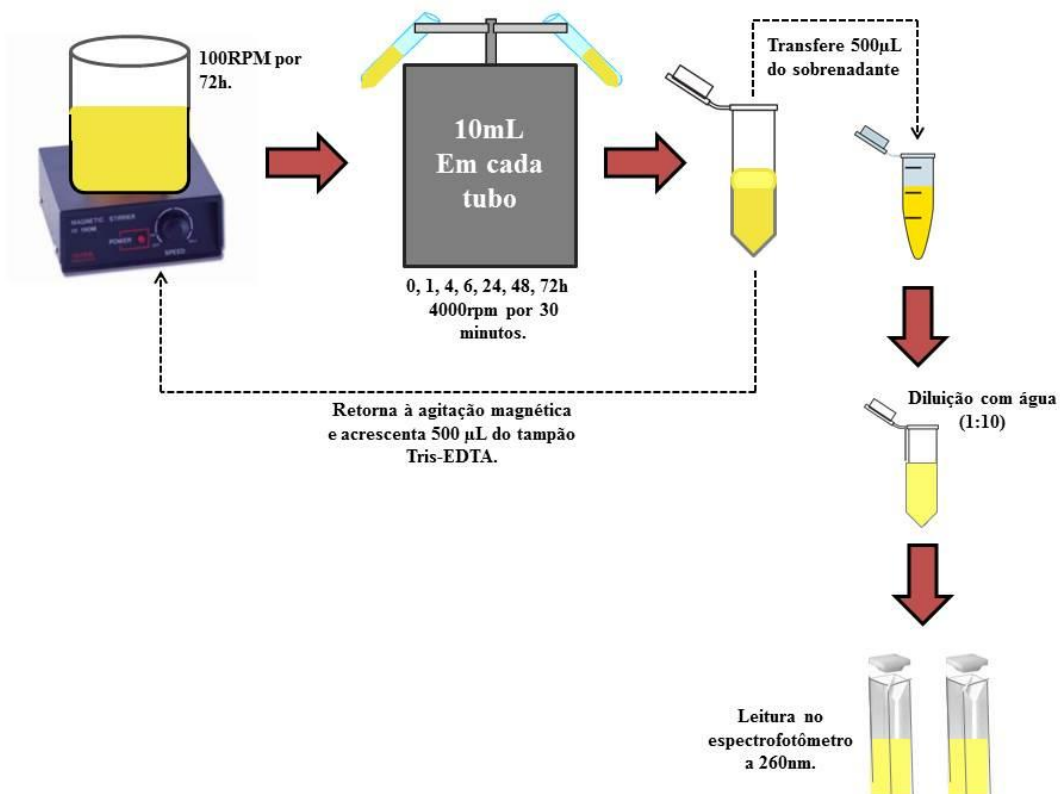
4.2.3.6. Ensaio de Liberação de siRNA

As MEs com siRNA (100 nM) sofreram agitação magnética (IKA, RH básica 1, Brasil) a uma velocidade de 100 rpm a 25 °C durante 72 h. Em intervalos de tempo pré-determinados (0, 1, 4, 6, 24, 48 e 72 h) as amostras foram centrifugadas a 4000 rpm durante

30 min a 10 °C. Em seguida, alíquotas de 500 µL foram diluídas em água Milli-Q na proporção de 1 : 10. O volume removido foi substituído por um volume equivalente de solução tampão de Tris-EDTA (pH 8,0). A quantidade de siRNA liberado no sobrenadante foi analisado por um espectrofotômetro de UV-Vis a um comprimento de onda de 260 nm (Figura 14). A quantidade de siRNA liberado foi determinada de acordo com a equação 4, onde considera-se que 100 % do siRNA inserido está na formulação (KATAS et al, 2013):

$$\text{Liberação siRNA (\%)} = 100 - \text{EE (\%)} \quad \text{(Equação 4)}$$

Figura 14. Representação esquemática do ensaio de liberação de siRNA.



(FONTE: Dados da pesquisa).

4.2.3.7. Condutividade Elétrica

A condutividade elétrica das MEs foi determinada em triplicata através de condutivímetro digital TECNOPON (MCA 150, Piracicaba, São Paulo, Brasil). O equipamento foi calibrado com uma solução de calibração apresentando condutância específica de 1413 µS/cm, à temperatura de 25 °C.

4.2.3.8. Índice de Refração

A determinação do índice de refração foi realizada no Refratômetro de bancada Abbé (Biobrix, São Paulo, Brasil), aferido com água Milli-Q (IR=1,3325) à temperatura de $20 \pm 0,5$ °C, conforme metodologia descrita na Farmacopéia Brasileira (2010).

4.2.3.9. Isotropia

A MLP foi realizada com auxílio do microscópio Olympus, modelo BX51-P, Tokyo, Japão, no CETENE. Alíquotas das amostras foram colocadas entre lâminas e lamínulas e analisadas quanto à isotropia, caracterizada por um campo escuro e indicativo de sistemas micelares, ou anisotropia pela existência de diferentes índices de refração, característico de cristais líquidos (CHORILLI, 2007).

4.2.3.10. Calorimetria Exploratória Diferencial (DSC)

As curvas de DSC das MEs e componentes isolados foram obtidas em um módulo calorimétrico exploratório diferencial (Modelo Q20, TA – Instruments, Estados Unidos). Amostras de $7,5 \pm 0,05$ mg foram acondicionadas em cadinhos de alumínio hermeticamente fechados. Inicialmente elas foram submetidas a resfriamento de 25 a -50 °C, com taxa de 5 °C . min^{-1} , mantendo-se por 3 minutos nesta temperatura. Posteriormente, as amostras foram aquecidas até a temperatura de 25 °C, utilizando a mesma razão de aquecimento de 5 °C . min^{-1} , sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL . min^{-1} (BOONME et al., 2006).

4.3. ENSAIOS DE ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES

Os sistemas microemulsionados foram submetidos a testes de estabilidade termodinâmica e de resistência à força centrífuga. Estes estudos foram realizados no Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos da UEPB.

4.3.1. Teste de Centrifugação

A estabilidade das formulações foi analisada através da microcentrífuga Macro IV EVLAB. As MEs (1g) foram submetidas a ciclos de centrifugação de 970 rpm, 2427 rpm, 3396 rpm, 4852 rpm e 6792 rpm, durante quinze minutos em cada rotação, à temperatura ambiente. Ao final de cada ciclo, os resultados foram avaliados quanto às alterações macroscópicas.

4.3.2. Teste de congelamento-descongelamento

As formulações (5 mL) foram submetidas a quatro ciclos alternados de temperatura de -21 °C e 25 °C com tempo permanência de 48 h em cada temperatura. Ao fim de cada ciclo, os resultados foram avaliados quanto às alterações macroscópicas.

4.3.3. Estresse Térmico

As MEs (4 mL) foram submetidas a um aumento gradual de temperatura, de 40 a 80 °C, a uma taxa de 10 °C a cada 30 minutos em banho termostático. Os parâmetros de índice de refração e condutividade foram avaliados antes e após o teste de estresse térmico, seguindo a metodologia anteriormente mencionada (GHOSH et al., 2013).

4.4. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PELO MÉTODO DO MTT

Os estudos de citotoxicidade das formulações foram realizados no CETENE em Recife. Inicialmente, fibroblastos de pele humana CCD1072SK foram cultivados em placas de 96 poços, a uma densidade de 10^4 células/poço, em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*) de baixa glicose suplementado com 1 % de solução antibiótica, contendo penicilina e estreptomicina, e 2 % de soro fetal bovino inativado. As células foram mantidas a 37 °C sob 5 % de CO₂. O grau de citotoxicidade da formulação foi determinado pelo teste do MTT [*3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide*]. Após o tratamento com as formulações por 24h as células foram incubadas em solução de MTT (5 mg / mL) durante 3 h. O sal de tetrazólio amarelo foi metabolizado por células viáveis em cristais de formazan de coloração púrpura. Estes foram solubilizados em dimetilsufóxido (DMSO) por 15 minutos sob agitação. O produto foi detectado espectrofotometricamente pela medição da

absorbância a 595 nm em leitor de microplacas. A viabilidade celular foi expressa como porcentagem de células viáveis comparadas ao grupo controle.

4.5. ENSAIOS DE REOLOGIA

As propriedades reológicas das formulações microemulsionadas foram analisadas usando os ensaios de fluxo e oscilação. As análises foram realizadas utilizando o reômetro Physica MCR301 (Anton Paar, Áustria) com a geometria de cilindros concêntricos, presente no CETENE. As leituras foram feitas no intervalo de 0 a 300 s⁻¹ para a curva ascendente e de 300 a 0 s⁻¹ para a curva descendente. Durante o ensaio, a temperatura foi mantida constante a 25 ° C. Com o auxílio do software Rheoplus / 32 versão 3.40, as curvas de fluxo, a tensão de cisalhamento e a viscosidade com velocidade de corte, para descrever as características de fluxo das formulações, foram representados graficamente (MEZGER, 2006).

4.6. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram expressos como a média ± desvio padrão e foram submetidos à análise de variância com o auxílio do programa estatístico Sisvar 5.0 seguido do pós-teste de Tukey. Os valores foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. DETERMINAÇÃO DO EHL DO SISTEMA

Partindo-se do valor requerido do EHL para o óleo de canola ($EHL = 7$), os tensoativos Span 80 ($EHL = 4,3$) e Tween 80 ($EHL = 15,0$) foram selecionados e misturados a uma proporção 3:1, de acordo com a equação 1 (página 34). O Span 80 por apresentar um EHL lipofílico foi utilizado em maior quantidade a fim de formar uma ME do tipo A/O, com objetivo de transportar RNAs interferentes hidrofílicos. De acordo com Gonçalves (2014), substâncias de caráter hidrossolúvel não têm grande capacidade de penetrar no EC, em adição, as moléculas de elevada lipofilia também têm dificuldade em serem absorvidas, ficando retidas à superfície. Desta forma, é necessário encontrar um intervalo de EHL ideal para melhorar a absorção pela pele, sendo preferíveis mistura de moléculas que apresentem um caráter apolar (PRISTA et al., 2012).

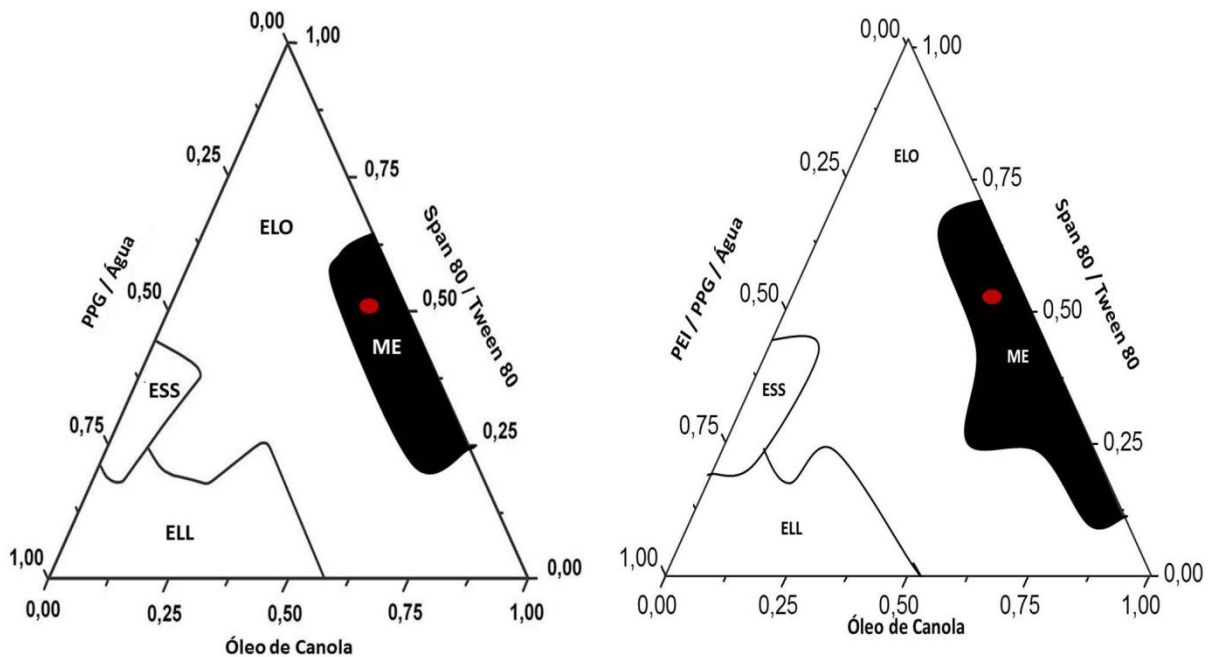
5.2. DIAGRAMA DE FASES

Os comportamentos de fases de um sistema microemulsionado ou de um cristal líquido, constituído por óleo, água e tensoativos, podem ser representados por um diagrama de fases ternário, que descreve as condições em que os componentes devem ser combinados para formar um sistema específico. No entanto, as MEs podem conter componentes adicionais, como os cotensoativos. No caso em que quatro ou mais componentes estão sendo estudados, diagramas de fases pseudoternário são utilizados e um de seus vértices representa uma mistura binária de componentes como tensoativo/cotensoativo (SAULNIER et al., 2008; PAUL; MOULIK, 2001; LAWRENCE; REES, 2000).

Representados como triângulos equiláteros, a grande vantagem dos diagramas de fases pseudoternário é que eles apresentam a proporção de cada componente utilizado, bem como as regiões de domínio dos diferentes sistemas encontrados. Sendo assim, optou-se por esta metodologia para obtenção de amostras não-poliméricas e poliméricas, como demonstrado na Figura 15, sendo possível observar as variações de estado, como emulsão líqüida opaca (ELO), emulsão líqüida leitosa (ELL), emulsão semi-sólida (ESS) e microemulsão (ME). Nota-se que ambas as regiões de ME foram deslocadas para a direita, onde existe um

predomínio da fase oleosa e pequeno volume aquoso, com formação de ME do tipo A/O (OLIVEIRA et al, 2004).

Figura 15. Diagramas de fases pseudoternário para os sistemas microemulsionados.



LEGENDA: (À esquerda) Diagrama de fases pseudoternário da microemulsão sem PEI. (À direita) Diagrama de fases pseudoternário da microemulsão com PEI. ME - microemulsão; ELL - emulsão líquida leitosa; ELO - emulsão líquida opaca; ESS - emulsão semisólida.

(FONTE: Dados da pesquisa).

Quando a solução de PEI 5% foi adicionada à fase hidrofílica houve um pequeno aumento da região de ME, estatisticamente não significativo ($p > 0,05$), em comparação àquela sem PEI, como pode ser observado na Figura 15. O interesse por MEs modificadas por polímeros tem aumentado, uma vez que estes podem influenciar no tamanho das gotículas, diminuir as interações entre elas e proporcionar flexibilidade da interface, devido à forte interação com os tensoativos (KOETZ et al., 2006). Desta forma, a ampliação da região do sistema microemulsionado polimérico pode estar relacionada com a formação de gotículas menores por maior curvatura da camada interfacial (KUNIEDA et al., 1999).

5.3. SELEÇÃO DAS FORMULAÇÕES

A partir dos diagramas obtidos, as formulações foram selecionadas através de análise visual e microscópica. Como demonstrado na Figura 15, as formulações escolhidas para o

estudo possuem a mesma proporção de tensoativos (55,6%), fase lipofílica (37%) e fase hidrofílica (7,4%). Nota-se que as formulações apresentam altas concentrações de tensoativos e fase lipofílica, além de baixa concentração de fase hidrofílica, o que contribui para a formação de sistemas microemulsionados do tipo A/O. As proporções dos constituintes individuais (m/m) correspondentes estão representadas na tabela 1.

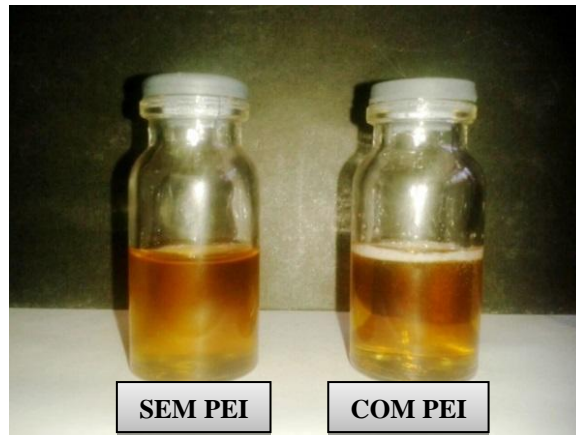
Tabela 1. Composição centesimal das formulações selecionadas.

COMPONENTES	PROPORÇÃO (%)	
	FORMULAÇÃO SEM	FORMULAÇÃO COM
	PEI	PEI
Span® 80	41,7	41,7
Tween® 80	13,9	13,9
Óleo de canola	37,0	37,0
Propilenoglicol	5,55	3,17
Água	1,85	1,06
Polietilenoimina	--	3,17

(FONTE: Dados da pesquisa).

Com relação às características macroscópicas das formulações (Figura 16), observa-se que a formulação sem PEI apresentou-se como um líquido de coloração amarelada, translúcido, porém levemente turvo e com aspecto viscoso. Em contrapartida, ao adicionar o polímero na composição, sua coloração tornou-se mais intensa e límpida, devido, provavelmente, ao menor tamanho de gotículas obtido. De acordo com Damasceno et al. (2011), a transparência das MEs pode ser decorrente do pequeno diâmetro das gotículas, apresentando em média $\frac{1}{4}$ do comprimento de onda da luz incidente. Com isso, as mesmas não espalham luz e o sistema apresenta-se transparente.

Figura 16. Características macroscópicas das Microemulsões.



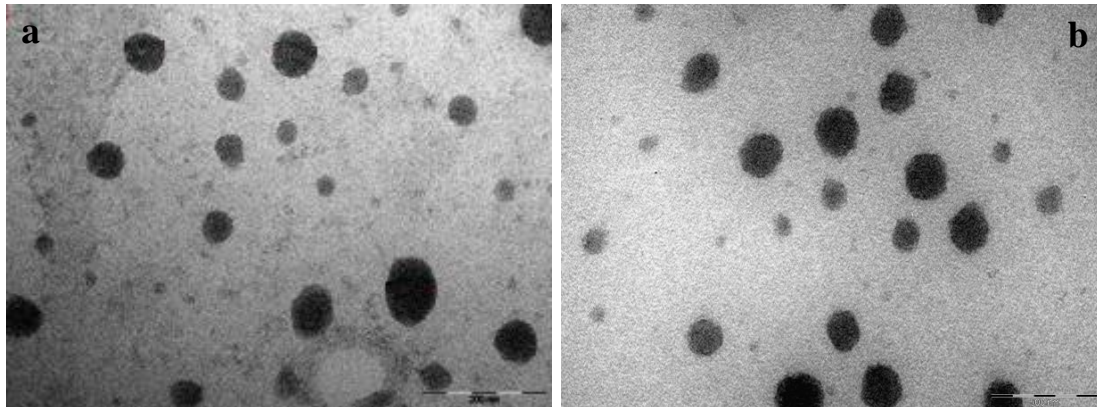
LEGENDA: À esquerda encontra-se a ME sem PEI; À direita representa à formulação com PEI.
(FONTE: Dados da pesquisa).

5.4. ANÁLISE ULTRAESTRUTURAL DOS SISTEMAS

A proporção ideal de PEI na formulação foi determinada por MET quanto ao formato e distribuição das gotículas (Figura 17), sendo aquela com PEI 5%, PPG e água Milli-Q na proporção de 3:3:1, respectivamente, com formação de ME. As imagens apresentaram gotículas com formato esférico.

A vantagem em se obter gotículas esféricas e bem formadas flui em torno da estabilidade do sistema. Em adição, pequenas gotículas podem ser facilmente transportadas através da pele, com consequente penetração de compostos ativos, além de melhorar o aspecto estético da formulação e sensorial da pele, através da transparência e fluidez do sistema (NEVES, 2008).

Figura 17. Ultraestrutura das Microemulsões.



LEGENDA: a) Observam-se gotículas esféricas na ausência do polímero. Escala de 200 nm. b) Ultraestrutura da microemulsão com PEI 5% mostrando as gotículas. Escala de 200 nm.

(FONTE: Dados da pesquisa).

A técnica de MET é vantajosa, frente aos demais métodos microscópicos, devido ao seu alto poder de resolução, conseguindo detectar e distinguir detalhes ultraestruturais (FREITAS, 2011). É uma das técnicas mais adequada para se obter imagens diretas de sistemas coloidais, como as MEs (BEDÊ, 2010), pela captura de qualquer estrutura coexistente e transições microestruturais (JHA et al., 2011).

5.5. AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DO siRNA NA FORMULAÇÃO

O siRNA apresenta caráter hidrofílico, sendo desejável que o mesmo permaneça na fase interna do sistema, revestida pelo filme de tensoativos, a fim de proporcionar proteção e evitar a rápida degradação por enzimas endógenas (VINCENTINI et al., 2013). Sendo assim, a associação de siRNA com sistemas coloidais tem sido investigada através de diferentes metodologias. Neste estudo, a incorporação foi detectada de forma indireta, através de modificações no diâmetro e carga das gotículas, além da avaliação da estabilidade do complexo através da eletroforese em gel de agarose (YI et al., 2000; BARUT et al., 2005; KIM et al., 2005). De forma quantitativa, a associação do siRNA à ME foi estimada por meio da eficiência de encapsulação e liberação das sequências gênicas, após centrifugação (OTT et al., 2002).

5.5.1. Eletroforese em Gel de Agarose

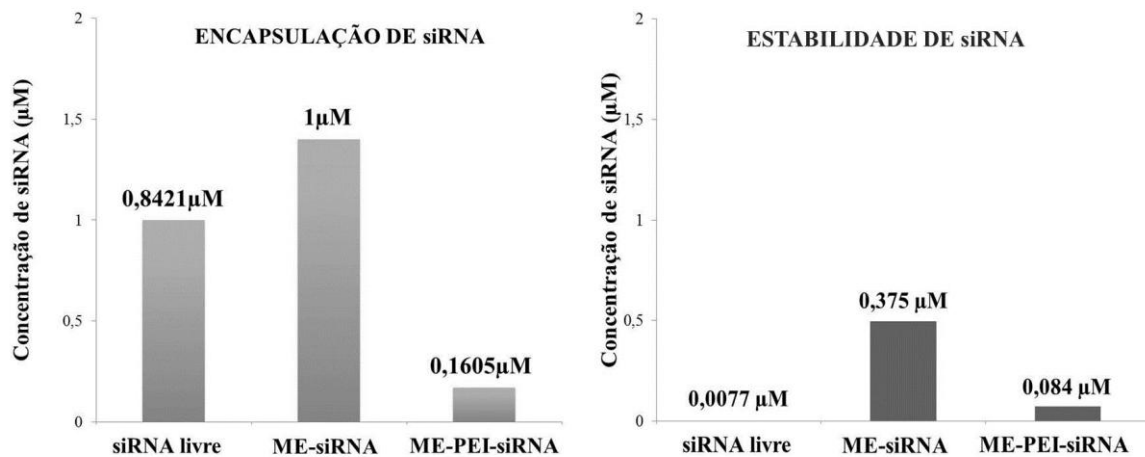
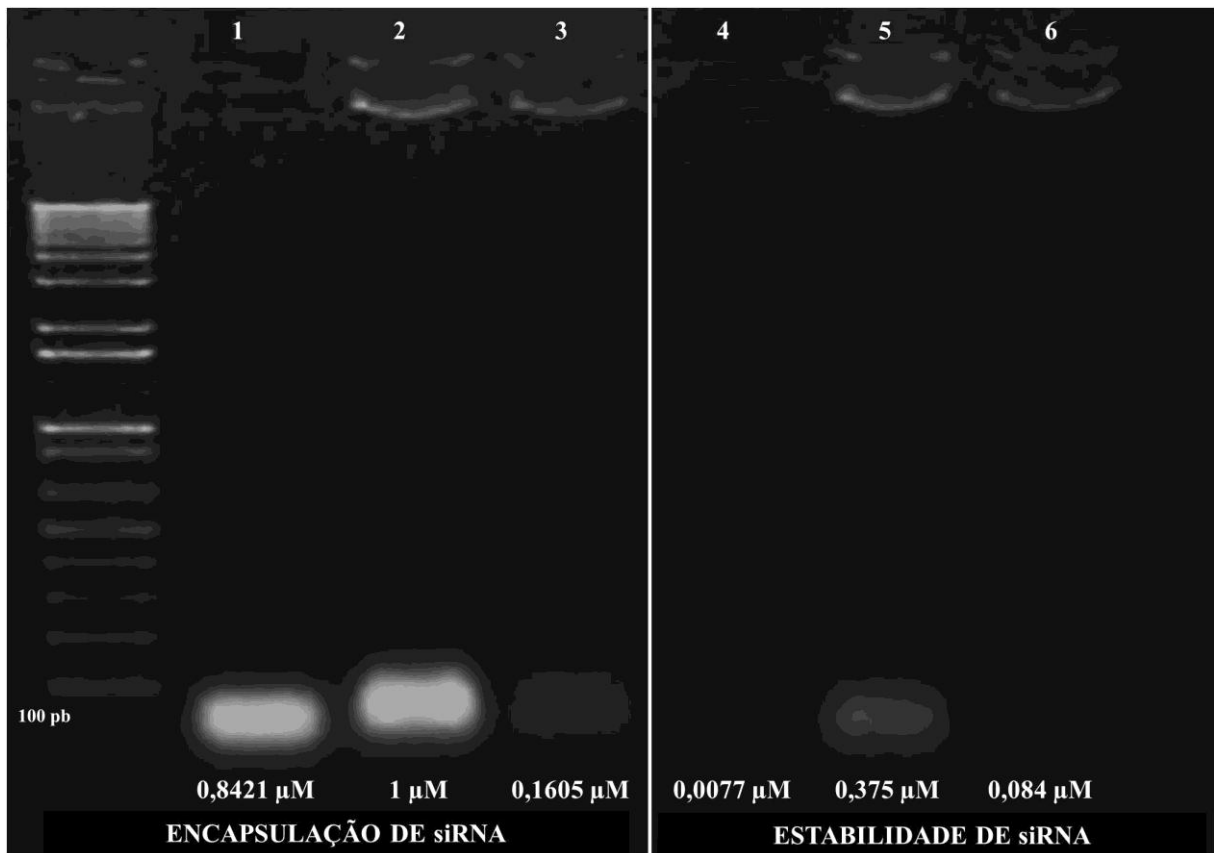
A eletroforese em gel de Agarose consiste em um método padrão usado para separar, identificar, analisar, caracterizar e purificar fragmentos de ácidos nucleicos e proteínas. As bandas no gel podem ser marcadas por um agente intercalante, como o brometo de etídio, e visualizadas por exame direto do gel em luz ultravioleta. Os grupos fosfatos dos ácidos nucleicos ionizados promovem a migração dos polinucleotídeos/poliânions para o eletrodo positivo quando submetidos a um campo elétrico. O ajuste da viscosidade do meio permite a identificação do formato das moléculas e separação por tamanho (ADKINS; HALL; GEORGEL, 2007).

Neste estudo, foram preparados complexos de siRNAs com MEs polimerizadas e não polimerizadas, submetendo-os a eletroforese em gel de agarose. Esta foi, então, analisada para visualizar qualquer migração dos polinucleotídeos. A densidade das bandas foi mensurada pela quantidade em pixels (Figura 18). Para isto, o ensaio foi realizado utilizando uma concentração constante de siRNA (1 μM), livre ou incorporado às MEs. A técnica foi usada para comprovar a complexação de siRNA aos sistemas de estudo.

No poço 1, o siRNA livre aniônico migrou no gel de agarose para o eletrodo carregado positivamente e, uma banda tornou-se visível após a marcação com brometo de etídio. Nota-se que a concentração de siRNA na banda diminuiu em relação à concentração inicial de 1 μM , o que pode estar associado à exposição a meios diferenciados (gel e tampão) e consequente degradação enzimática. Em contrapartida, quando o siRNA é incorporado à ME sem PEI, observa-se a conservação do mesmo, havendo uma maior proteção do ácido nucleico em relação ao meio externo.

A redução da banda no poço 3 (0,1605 μM) pode estar relacionada à compactação do siRNA pelo PEI da formulação, por atração eletrostática, impedindo a liberação e incorporação do brometo de etídio às sequências nucleotídicas, ou por repulsão de cargas entre o polímero catiônico e o eletrodo positivo, limitando a migração do políplexo pelo gel (DANIELS, 2011). Em estudo realizado por Amjad et al. (2014), os resultados de retardo de migração de siRNA associado à ácido cílico (CA) - PEI em eletroforese em gel de agarose demonstraram ausência de bandas devido à forte interação entre CA-PEI e siRNA. Os autores sugerem que, após a complexação, os grupos fosfato do siRNA carregados negativamente interagiram com grupos amina protonados do PEI, formando complexos apertados.

Figura 18. Encapsulação de siRNA e estabilidade da formulação frente à RNase por eletroforese em gel de agarose.



LEGENDA: Visualização de siRNA livre no gel de agarose por luz UV. Marcador (1Kb plus DNA ladder, Invitrogen). Poço 1: siRNA livre. Poço 2: Complexo entre siRNA e microemulsão não polimerizada. Poço 3: Complexo entre siRNA e microemulsão polimerizada. Poço 4: Interação entre siRNA livre e RNase. Poço 5: Microemulsão sem PEI e com siRNA na presença de RNase. Poço 6: Microemulsão com PEI e siRNA na presença de RNase. Quantificação do siRNA incorporado e estabilidade do siRNA na presença de RNase (FONTE: Dados da pesquisa).

Um dos obstáculos na introdução de siRNA em meios biológicos é sua susceptibilidade à nucleases, tal como a RNase, da circulação e do espaço intersticial (LU et al., 2009). Desta forma, uma característica desejável de qualquer vetor de distribuição é a sua capacidade em proteger o siRNA da degradação. Assim, a proteção conferida pelas MEs ao siRNA foi analisada pelo ensaio de estabilidade com a enzima RNase.

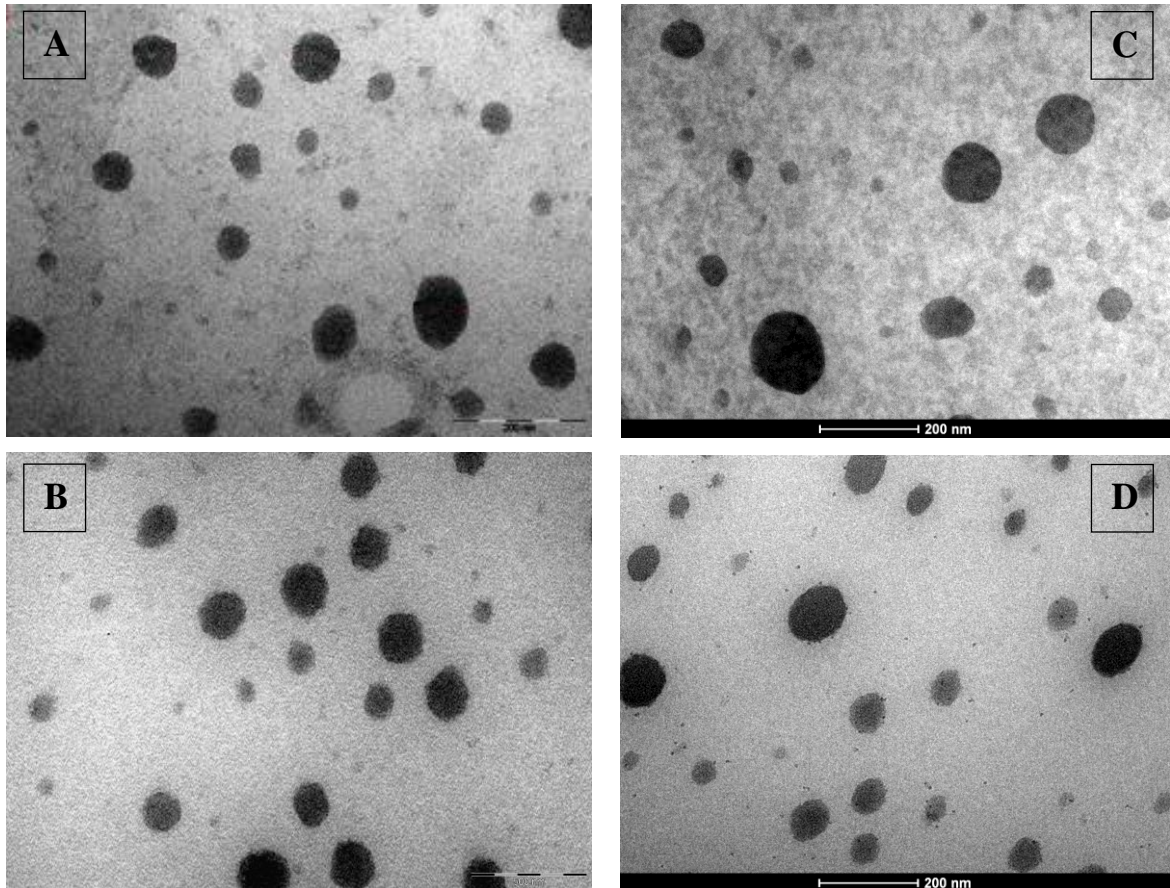
A Figura 18 demonstra que as MEs exercem certo grau de proteção do siRNA frente à RNase. O siRNA livre, submetido ao poço 4, foi quase que completamente degradado na presença da enzima (99%), ao passo que parte do siRNA complexado às MEs sem PEI (poço 5) (62,5 %) e com PEI (poço 6) (47,6 %) migrou pelo gel de forma intacta, após o mesmo tratamento. Uma vez que a interação entre políplexo-siRNA é mais intensa que aquela na ME não polimérica, a banda 6 apresentou-se menos corada, possivelmente pela forte ligação das sequências gênicas ao polímero e a não migração no gel. Assim, é possível prever que o políplexo foi capaz de preservar, de forma mais significativa, o siRNA incorporado, no entanto, esta alta complexação pode interferir na liberação do ácido nucleico, reduzindo-a. Estudos com DNA têm sugerido que a interação eletrostática entre as cargas negativas do material genético e as positivas dos polímeros resulta na formação de estruturas altamente organizadas, onde as moléculas de DNA são condensadas e protegidas contra a degradação enzimática (SINGH, 2005). Este resultado também se aplica às interações estabelecidas entre lipossomas catiônicos e moléculas polianiónicas de siRNA (DANIELS, 2011).

5.5.2. Ultraestrutura dos sistemas microemulsionados contendo siRNA

A técnica de MET foi utilizada a fim de determinar as características morfológicas e a distribuição das gotículas na presença do siRNA. As imagens da Figura 19 revelaram gotículas esféricas com heterogeneidade entre o tamanho das gotículas. Em comparação à morfologia das MEs brancas/sem siRNA (A), nota-se que a adição do ácido nucleico à formulação (C) não alterou visivelmente a ultraestrutura das gotículas, talvez pelo fato dessa molécula ter sido adicionada em baixa concentração nas formulações. De uma forma geral, estudos preliminares preveem uma zona de concentração, na qual o ácido nucleico veiculado não interfere na estabilidade da estrutura coloidal (OTT et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2003; SILVA et al., 2014). No estudo realizado por Teixeira et al. (2003), foi verificado o aumento do diâmetro das gotículas somente após a associação de elevadas concentrações do ácido nucleico na interface A/O (~ 200µM). Nas formulações poliméricas (B e D), a adição do siRNA não influenciou a ultraestrutura das gotículas, provavelmente pela forte complexação

entre os grupos fosfato do siRNA, carregados negativamente, e os grupos amina protonados do PEI, formando complexos apertados e condensados (DANIELS, 2011).

Figura 19. Ultraestrutura das microemulsões formuladas sem siRNA (à esquerda) e com siRNA (à direita).



LEGENDA: (A) Microemulsão sem siRNA. (B) Microemulsão polimérica sem siRNA. (C) Microemulsão com siRNA. (D) Microemulsão polimérica com siRNA. Todas as imagens foram adquiridas em escalas de 200nm. (FONTE: Dados da pesquisa).

5.5.3. Detecção do tamanho de gotículas e índice de polidispersão

O DLS foi utilizado a fim de caracterizar as formulações quanto ao tamanho e distribuição das gotículas. Esta é uma excelente ferramenta para explorar as nanoestruturas, uma vez que não perturba o equilíbrio do sistema nem produz artefatos (MOURA, 2008). Quando as gotículas são iluminadas por um laser, ocorre o espalhamento da radiação, detectado em ângulo específico. A intensidade da radiação varia numa taxa dependente da velocidade de difusão das gotículas (ROSSETI, 2006), fornecendo informações diretas sobre o movimento translacional e permitindo o cálculo do tamanho através de relações empíricas adequadas (DAMASCENO et al., 2011).

A tabela 2 apresenta os resultados do tamanho de gotículas e o índice de polidispersão (IPD) obtidos para as diferentes MEs. É possível observar que a adição do polímero às formulações resultou em gotículas menores, sugerindo um transporte mais eficiente e aumento da biodisponibilidade de siRNA. Estes resultados são consistentes com o trabalho de Convertine et al. (2009), onde complexos de DNA-PEI apresentaram-se mais compactos, favorecendo uma maior internalização celular, no entanto com baixa eficiência de transfecção (ZHANG et al., 2004).

Sabe-se que os polímeros catiônicos formam complexos com RNA interferentes através de interações eletrostáticas, entre suas cargas positivas e as cargas negativas do ácido nucleico. Isto pode favorecer a transfecção celular, quando o sistema catiônico é atraído pela membrana plasmática aniônica, bem como pela condensação e proteção do ácido nucleico contra a degradação enzimática (GUNTHER et al., 2011; BEYERLE et al., 2011). No entanto, as ligações eletrostáticas devem ser suficientemente estáveis para sustentar a complexação do material genético durante o transporte até a célula-alvo, como também devem permitir sua dissociação para eficiente atividade terapêutica (SCHROEDER, et al., 2010).

O IPD reflete o perfil de homogeneidade do tamanho das gotículas. Segundo a literatura, um valor até 0,3 é considerado adequado para aplicação cutânea (KÜLKAMP et al., 2009). Entretanto, valores altos estão associados à ampla variação no tamanho das gotículas, a qual pode ser afetada por diversos fatores: natureza e concentração do polímero, do óleo e da substância ativa, concentração de tensoativos, proporção entre água e solvente orgânico, além da velocidade de difusão da fase aquosa na orgânica (SANTOS E BARBOZA, 2013).

Deste modo, pode-se observar na tabela 2 que o IPD foi alto ($> 0,3$) para todas as formulações obtidas, com resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$), indicando a formação de sistemas polidispersos (LEMOS E SENNA, 2011) com menor estabilidade frente a fenômenos como a maturação de Ostwald (crescimento das partículas maiores à custa da difusão do conteúdo das partículas menores) (KLANG et al., 2012).

Tabela 2. Tamanho de gotículas e índice de polidispersão nas formulações.

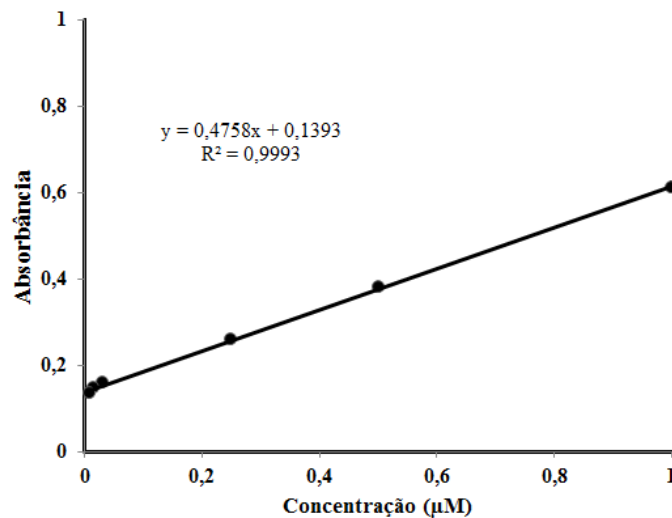
FORMULAÇÕES	Tamanho de gotículas (nm)	IPD
ME	599,7 ± 100,69	1,00 ± 0,01
ME + siRNA	547,4 ± 51,61	0,95 ± 0,06
ME + PEI	258,6 ± 8,48	0,65 ± 0,02
ME + PEI + siRNA	277,25 ± 15,2	0,46 ± 0,02

(FONTE: Dados da pesquisa).

5.5.4. Curva de Calibração do siRNA

Espectrofotômetros são instrumentos capazes de registrar dados de absorvância ou transmitância em função do comprimento de onda específico de cada substância. Assim, torna-se extremamente necessário efetuar uma rigorosa calibração visando obter resultados confiáveis (SARAIVA et al., 2011). A fim de quantificar o siRNA presente nas formulações para posterior análise da eficiência de encapsulação e liberação de siRNA, construiu-se uma curva de calibração. Sendo assim, é possível visualizar na Figura 20 a curva padrão da solução de siRNA. A equação da reta para a mesma apresentou-se como: $y = 0,4758x + 0,1393$ e o coeficiente de correlação (R^2) obtido foi de 0,9993, demonstrando uma linearidade aceitável na faixa estudada, uma vez que o critério mínimo aceitável do R^2 deve ser 0,98 (BRASIL, 2012). A quantificação do siRNA poderia ser feita pela equação da reta ofertada, no entanto, há uma equação específica para quantificação de ácidos nucleicos por espectrofotômetro, sendo a concentração calculada em $\mu\text{g/mL}$ através da equação 2, citada no subitem 4.2.3.4.

Figura 20. Curva de calibração de soluções de siRNA obtida por espectrofotometria UV-VIS a 260nm.



(FONTE: Dados da pesquisa).

5.5.5. Eficiência de Encapsulação

A avaliação da EE baseia-se na diferença entre a quantidade de ácido nucleico adicionado à ME e a quantidade não associada, detectada em sua fase externa após separação por ultracentrifugação à velocidade de 14000 rpm (OTT et al., 2002). A EE para as MEs sem PEI e com PEI foi de $88,7 \pm 0,87\%$ e $90,3 \pm 1,72\%$, respectivamente, o que não demonstra diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$).

No estudo realizado por Ragelle et al. (2014), a EE foi avaliada para diversos complexos, dentre eles o de quitosana-siRNA e PEI-quitosana-siRNA. Os resultados foram semelhantes, em torno de 99% de eficiência. Em outro estudo concretizado por Pereira et al. (2012), a encapsulação de siRNA foi obtida com 97% de eficiência utilizando o polímero PEI de baixo peso molecular. Ele comparou os resultados com o PEI de alto peso molecular e observou que, em geral, este último parece ser mais eficiente na condensação do siRNA. Sabe-se que polycations com densidades de cargas elevadas promovem forte ligação com o ácido nucleico (DOT et al, 1959; NIMESH, CHANDRA, 2009; RANJBAR, 2009; BONNET et al, 2010). No entanto, deve-se ressaltar o grau de toxicidade destes compostos quando presentes em carreadores de substâncias para os meios biológicos (CUN et al, 2011), uma vez que moléculas de alto peso molecular apresentam toxicidade elevada (KIRCHEIS et al., 2001). Ogris et al. (2007), utilizando PEI de 800kDa, observou maior toxicidade sistêmica

após a aplicação *in vivo*, com elevada agregação de eritrócitos, quando comparado ao PEI de baixo peso molecular.

Estudos estão sendo realizados a fim de buscar modificações de superfície, visando melhorar a biocompatibilidade e reduzir a toxicidade de complexos baseados em PEI através de ligações covalentes com polímeros hidrofílicos não-iônicos, como o polietilenoglicol (BHADRA et al., 2002) ou por modificações da espinha dorsal polimérica com produtos químicos, como o butanoato e o acetato (ZINTCHENKO et al., 2008). Esta modificação pode ser traduzida no aumento da transfecção de genes *in vitro*, com base no escape endossomal e liberação intracelular (GÜNTHER et., 2011). Em trabalho realizado por Thomas et al. (2005), a desacetilação completa de PEI resultou em toxicidade reduzida e uma melhoria acentuada na entrega de siRNA para células pulmonares após a distribuição sistêmica.

5.5.6. Liberação de siRNA

A aplicação de nanocarreadores como sistemas de liberação de fármacos e ácidos nucleicos tem sido alvo de crescente interesse dado às inúmeras vantagens que oferecem, como o aumento da solubilidade e da estabilidade de fármacos, possibilidade de incorporação de substâncias hidrofílicas ou lipofílicas, capacidade de ação como sistemas reservatórios, diminuição da toxicidade, aumento da eficácia, bem como alteração da disponibilidade de substâncias, dependendo da forma de interação com o sistema (CHORILLI, 2007).

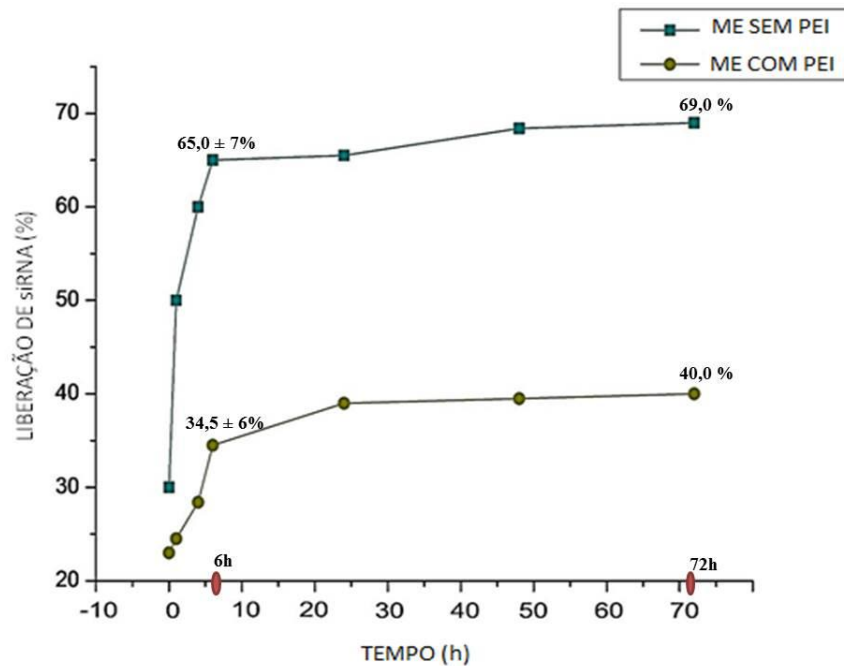
MEs são consideradas como sistemas reservatórios, onde o fármaco encontra-se separado do meio de dissolução através de um revestimento, uma membrana ou simplesmente uma interface, a qual deve ser transposta para liberação do agente no meio. Elas proporcionam um ambiente dimensionalmente restrito, com propriedades particulares, capazes de ligar ou associar moléculas de diferentes grupos de fármacos, com o objetivo de solubilizar, modular estabilidade ou melhorar o perfil de biodisponibilidade (OLIVEIRA, SCARPA, 2001).

Pesquisas crescentes têm sido realizadas em busca do aparato mais adequado para avaliar a velocidade de liberação *in vitro* de produtos tópicos dermatológicos, uma vez que, oficialmente, não existe uma padronização que possa ser aplicada para todas as formulações semissólidas (SANTIS, 2008). Sendo assim, neste estudo foi utilizada a metodologia de centrifugação, levando-se em consideração a condição sink do sistema, a qual se refere a um excesso de volume do meio que irá permitir a dissolução continuada da substância ativa. Para

isso, foi realizada uma reposição constante do tampão, de modo que a concentração do ácido nucleico não atingisse mais que 20 a 30% da solubilidade máxima (ABDOU, 1995; SHARGEL, YU, 1999; AULTON, 2005).

A Figura 21 apresenta a liberação de siRNA em duas fases. Na primeira etapa, o sistema mostrou uma liberação brusca do material genético nas primeiras 6 horas. Isto resultou em uma liberação cumulativa de siRNA de $65 \pm 7\%$ e $34,5 \pm 6\%$ para as MEs sem PEI e com PEI, respectivamente. Na segunda etapa, o siRNA foi liberado lentamente de 6 até 72 h, resultando numa liberação cumulativa total de siRNA de mais de 65% para a ME não polimérica e de 40% para a ME com PEI. O motivo da rápida liberação do siRNA das MEs pode estar associado à difusão das moléculas ligadas à superfície ou interface das gotículas. No entanto, a liberação lenta do siRNA da ME polimérica, na segunda etapa, pode estar relacionada com o intumescimento das gotículas e/ou degradação do polímero. Sendo assim, é provável que o siRNA ficou retido nas gotículas até que o PEI fosse completamente corroído ou dissolvido no meio de liberação (KATAS et al, 2013). Esses resultados corroboram com o estudo realizado por Zhang et al. (2008) ao utilizarem nanopartículas de quitosana-siRNA, a fim de determinar as propriedades físico-químicas do sistema. Ao avaliarem o grau de liberação do ácido nucleico das nanopartículas poliméricas, foi constatada a presença de dois estágios de liberação. Nas primeiras 6 horas houve liberação contínua de siRNA em torno de $58 \pm 5\%$. O segundo estágio ocorreu no período de 6 a 48h, onde o siRNA alcançou uma liberação de mais de 80%. Este fato foi associado à interação do siRNA ao grupamento amino livre restante nos segmentos de quitosana (ZHANG et al., 2008; ZHANG, TENG, WU, 2008).

Figura 21. Liberação de siRNA das microemulsões com PEI e sem PEI.



(FONTE: Dados da pesquisa).

Outros estudos utilizaram complexos catiônicos como o PEI e a poli-L-lisina para aumentar a eficiência de encapsulação do siRNA e DNA em nanopartículas, obtendo resultados eficientes, bem como um aumento na carga de superfície. No entanto, é evidente que estes compostos catiônicos afetam o perfil de liberação dos ácidos nucleicos (BLUM, SALTZMAN, 2008; PATIL, PANYAM, 2009). Já em 1998, Miller et al. afirmaram que a presença de substâncias catiônicas no meio formulado poderia dificultar a liberação dos ácidos nucleicos devido a atração intensa entre as cargas opostas, diminuindo a transfecção celular destes compostos.

Desse modo, levando em consideração que um bom sistema carreador deve proporcionar à substância ativa proteção e transporte eficiente a alvos específicos através da liberação progressiva e controlada da mesma (VERMA, GARG, 2001; DUNNE et al., 2003; TAO, DESAI, 2003), nota-se que a formulação polimérica apesar de ter apresentado uma ótima EE de 90%, a liberação do siRNA foi menor em comparação àquela da formulação sem PEI. Entretanto, seu tamanho de gotícula foi bem menor, o que facilitaria a permeação cutânea. Sendo assim, ambas MEs sintetizadas mostraram-se como eficientes carreadores de siRNA com características peculiares de liberação, além de certa proteção contra agentes agressivos do meio, sendo capazes de oferecer conteúdo significativo da substância ao organismo (PIMENTEL et al, 2007).

5.6. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS MICROEMULSÕES

O conhecimento da estrutura interna de um sistema microemulsionado, além de ser muito importante, é também muito complexo. Assim, o sinergismo de várias técnicas é necessário para atingir este objetivo (BRUXEL et al., 2012). Métodos como difração de raios-X, microscopia de luz polarizada, calorimetria exploratória diferencial (ARAMAKI et al., 2001; FANUN et al., 2001; SIDDIG et al., 2006), estão sendo cada vez mais utilizados nos últimos anos. Outros métodos, como por exemplo, índice de refração, pH e condutividade, também são frequentemente realizados para complementar o estudo físico-químico desses sistemas.

Medidas de condutividade são capazes de determinar se a formulação possui domínio contínuo aquoso ou oleoso, bem como monitorar fenômenos como inversão de fases (LAWRENCE & REES, 2000). Para as MEs formuladas a condutividade apresentou-se baixa, entre 1,3467 e 2,5867 μScm^{-1} , sendo sugestiva de um sistema A/O, por predominância da fase oleosa. A adição de PEI 5% e siRNA às formulações, não alterou de forma significativa ($p > 0,05$) a condutividade do meio. De acordo com Bumajdad e Eastoe (2004), MEs com fase aquosa contínua têm condutividade relativamente elevada, em comparação aos sistemas microemulsionados onde a fase oleosa é o meio dispersante.

Em substâncias isotrópicas, como as MEs, o índice de refração é uma característica constante em determinado comprimento de onda, temperatura e pressão. Assim, este índice é útil não só para identificar a substância, mas também para detectar a presença de impurezas (KLEIN, 2007). Sendo assim, considerando as especificações técnicas para o IR do óleo de canola (1,465 – 1,467), os resultados obtidos para as MEs testadas mantiveram-se aproximados, sugerindo uma fase externa oleosa (EVANDRO, 2009; PRZYBYLSKI, 2011).

Tabela 3. Condutividade e IR das microemulsões.

Microemulsões	Condutividade (μScm^{-1})	Índice de Refração
ME	1,3467 \pm 0,1701	1,466 \pm 0,0006
ME + siRNA	2,5867 \pm 0,2510	1,467 \pm 0,0040
ME + PEI	1,5402 \pm 0,1253	1,467 \pm 0,0005
ME + PEI + siRNA	2,0167 \pm 0,0890	1,465 \pm 0,0066

(FONTE: Dados da pesquisa).

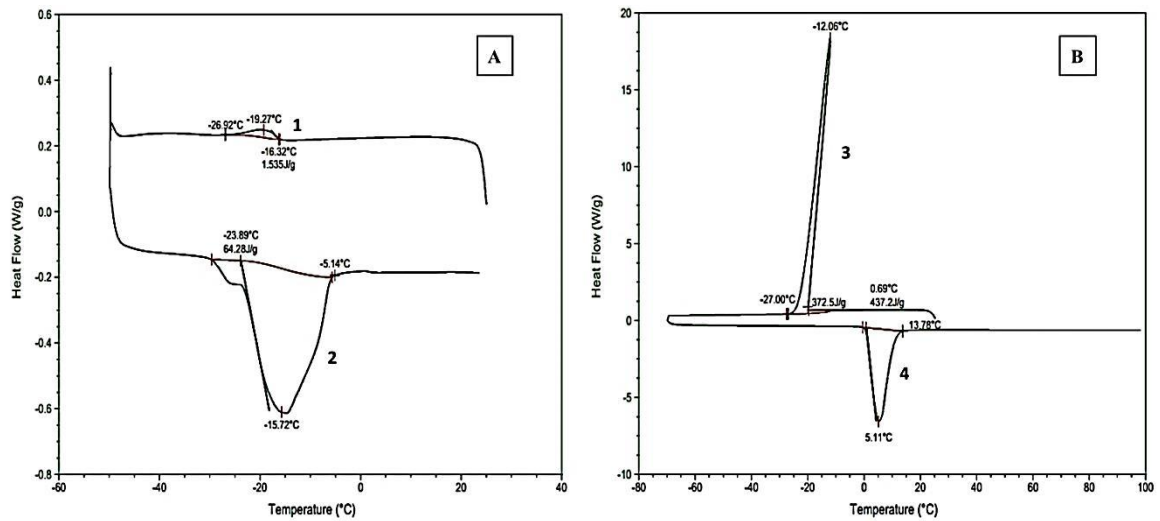
A microscopia de luz polarizada foi utilizada a fim de determinar a isotropia óptica dos sistemas. Esse fenômeno é capaz de fornecer informações sobre a estrutura de sistemas

coloidais, como as MEs e os cristais líquidos (DAMASCENO et al., 2011). Por exemplo, sistemas micelares e fases cúbicas são isotrópicos e apresentam-se como um campo escuro sob luz polarizada, enquanto que fases cristalinas lamelares e hexagonais são anisotrópicas, apresentando estruturas características, como a presença de Cruz de Malta, quando observados sob a luz polarizada (CHORILLI et al., 2011). No presente estudo, a técnica demonstrou aspectos isotrópicos (campo escuro), característicos de microemulsões (dado não mostrado).

Com vista à determinação da microestrutura das MEs, a calorimetria exploratória diferencial foi aplicada. Esta é uma técnica analítica utilizada para determinar a quantidade de calor absorvida ou emitida por um material durante o seu aquecimento ou resfriamento em função do tempo. Ou seja, pode-se determinar se estão ocorrendo processos exotérmicos ou endotérmicos (DE PAOLI, 2008). Dessa forma, é possível avaliar a estrutura de MEs através das propriedades da água, avaliando diferenças no comportamento de fusão e de congelamento. Esta, por sua vez, pode apresentar-se livre como no sistema O/A, ou estar confinada no interior das gotículas revestidas pelo filme de tensoativos, como no sistema A/O. Sendo assim, o primeiro tipo de ME apresenta apenas o pico de congelamento da água, enquanto que o segundo não apresenta o pico de congelamento da água no termograma. Já as MEs bicontínuas apresentam os picos de congelamento do óleo e da água bem distintos e separados (BOONME et al., 2006; MICHNIAK-KOHN; ZHANG, 2011; ZHANG, H. et al., 2013).

Como observado na Figura 22, o termograma A representa a estrutura do óleo de canola com picos característicos de congelamento (1) na temperatura de $-16,32\text{ }^{\circ}\text{C}$ e valor de entalpia (ΔH) de $1,535\text{ J/g}$ e aquecimento (2) na temperatura de $-23,89\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = 64,28\text{ J/g}$). O termograma B, no entanto, representa a corrida analítica para a água utilizada na formulação, com os picos exotérmico (3) e endotérmico (4), compreendendo as fases de solidificação e fusão da água nas temperaturas de $-12,06\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = 372,5\text{ J/g}$) e $5,11\text{ }^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Estes picos não se apresentaram visíveis nas MEs (Figura 24), possivelmente indicando que a água encontra-se contida no interior da microestrutura.

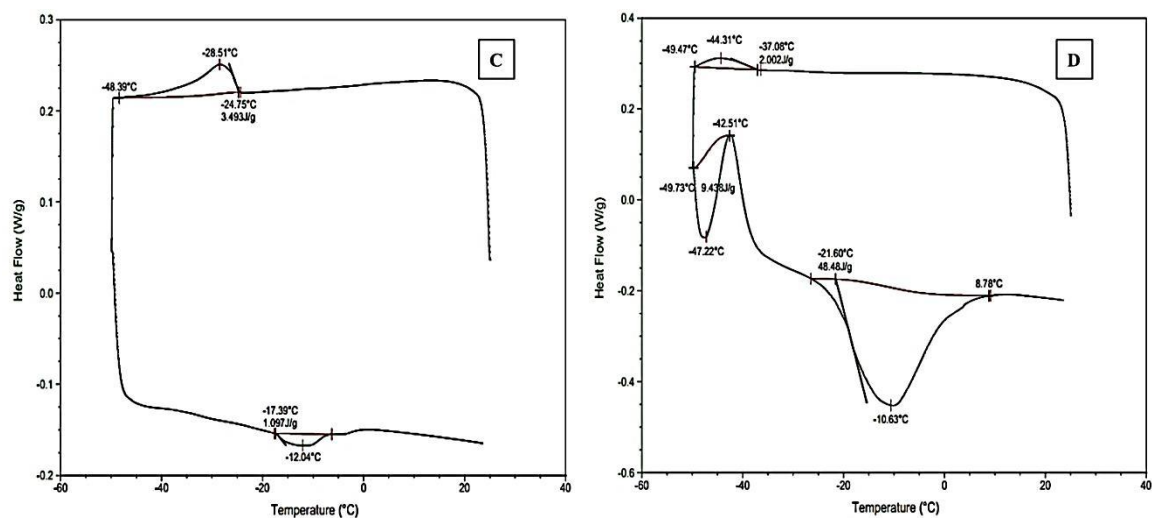
Figura 22. Termogramas representativos do óleo de canola e da água, respectivamente.



(FONTE: Dados da pesquisa).

A Figura 23 demonstra os termogramas dos tensoativos Span 80 e Tween 80. O termograma C apresentou picos sutis de congelamento na temperatura de $-24,75\text{ °C}$ com entalpia de $3,493\text{ J/g}$ e aquecimento em $-17,39\text{ °C}$ com valor de entalpia de $1,097\text{ J/g}$, enquanto que o termograma representativo do Tween 80 apresentou dois picos endotérmicos nas temperaturas de $-47,22\text{ °C}$ ($\Delta H = 9,438\text{ J/g}$) e $-21,60\text{ °C}$ ($48,48\text{ J/g}$), respectivamente.

Figura 23. Termogramas representativos dos tensoativos Span 80 e Tween 80, respectivamente.

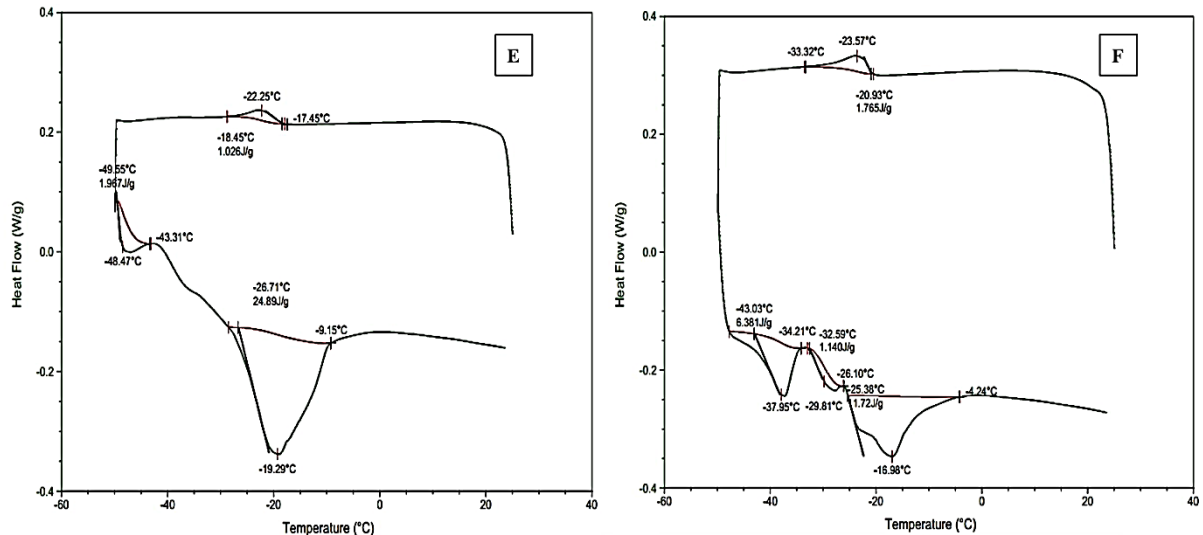


(FONTE: Dados da pesquisa).

É possível visualizar na Figura 24 os termogramas da ME sem PEI (E) e com PEI (F), com características térmicas do óleo de canola e dos agentes tensoativos. No termograma E, pode-se observar um pico exotérmico na temperatura de $-18,45\text{ °C}$ com desprendimento de

energia de 1,026 J/g e um outro pico endotérmico alcançado na temperatura de $-26,71\text{ }^{\circ}\text{C}$ com entalpia de 24,89 J/g. Em contrapartida, o termograma F apresenta um pico de congelamento em $-20,93\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = 1,765\text{ J/g}$) e três picos de aquecimento nas temperaturas de $-43,03\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = 6,381\text{ J/g}$), $-32,59\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = 1,140\text{ J/g}$) e $-25,38\text{ }^{\circ}\text{C}$ ($\Delta H = 1,72\text{ J/g}$).

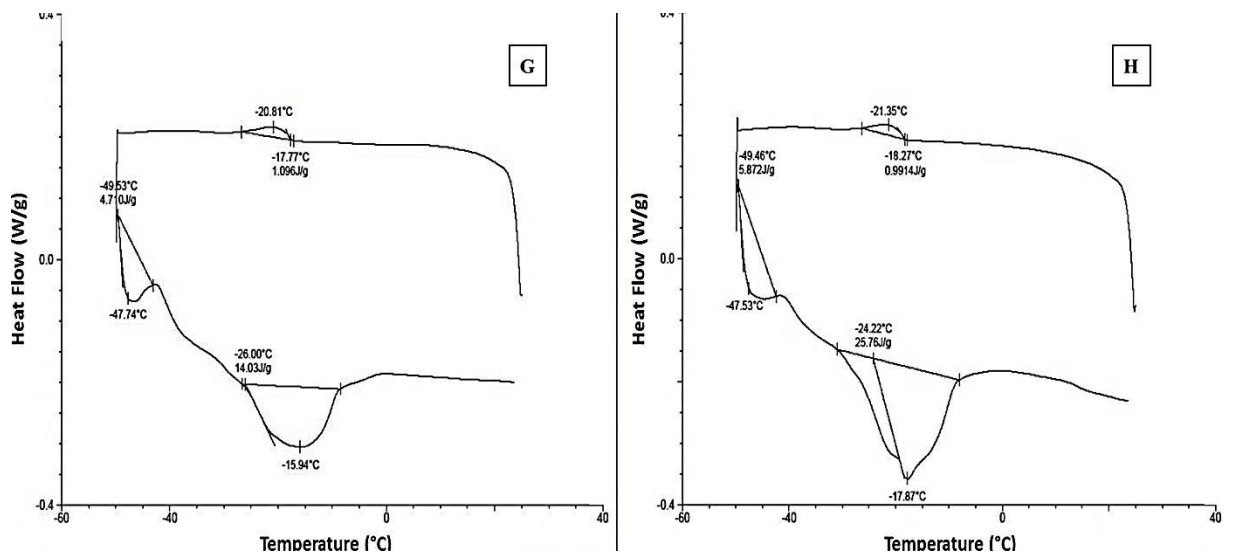
Figura 24. Termogramas representativos da ME sem PEI e com PEI, respectivamente.



(FONTE: Dados da pesquisa).

Nos termogramas G e H estão representadas as formulações microemulsionadas sem PEI e com PEI na presença do siRNA, respectivamente. No primeiro observa-se um pico exotérmico na temperatura de $-17,77\text{ }^{\circ}\text{C}$, com entalpia de 1.096 J/g e dois picos endotérmicos nas temperaturas de $-49,53\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $-26\text{ }^{\circ}\text{C}$ com entalpias respectivas de 4.710 J/g e 14.03J/g. No segundo termograma encontra-se um pico exotérmico na temperatura de $-18,27\text{ }^{\circ}\text{C}$ com valor de entalpia de 0.9914 J/g, além de dois picos endotérmicos, sendo um na temperatura de $-49,46\text{ }^{\circ}\text{C}$ com entalpia de 5.872 J/g, e outro na temperatura de $-24,22\text{ }^{\circ}\text{C}$ com valor de entalpia de 25.76 J/g. É provável que os pontos exotérmicos estejam relacionados ao ponto de solidificação do óleo, enquanto que os pontos endotérmicos relacionam-se ao ponto de fusão do óleo. É possível observar que o siRNA na presença do polímero promoveu um alargamento do ponto de fusão, sendo este deslocado para temperaturas mais altas (Figura 25). Isto se deve à forte atração eletrostática gerada entre os íons catiônicos e aniônicos dispostos de maneira regular, formando um retículo. Neste caso a fusão só é possível em temperaturas mais elevadas e em quantidades de energia maiores para romper a estrutura formada (KOTZ, 2005).

Figura 25. Termogramas representativos das microemulsões com siRNA.

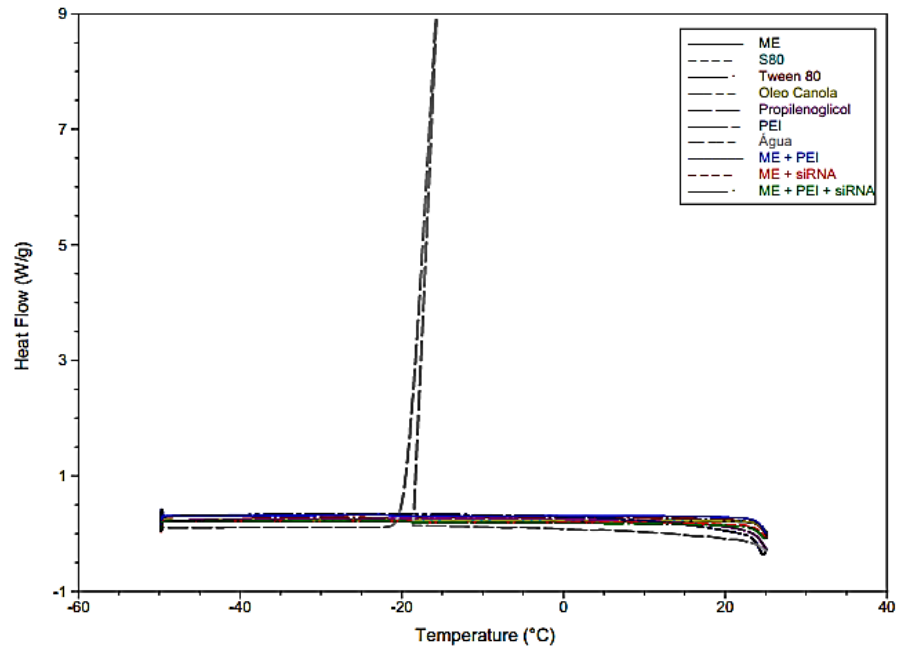


(FONTE: Dados da pesquisa).

Após análise dos termogramas obtidos, pode-se deduzir que a microestrutura da formulação desenvolvida é do tipo A/O, uma vez que as propriedades térmicas do óleo e dos tensoativos são mais próximas daquelas demonstradas pelas MEs, como pode ser observado nas Figuras 26 e 27. As características da água não foram aparentes durante a análise dos termogramas, supondo que a mesma permaneceu confinada no interior das gotículas.

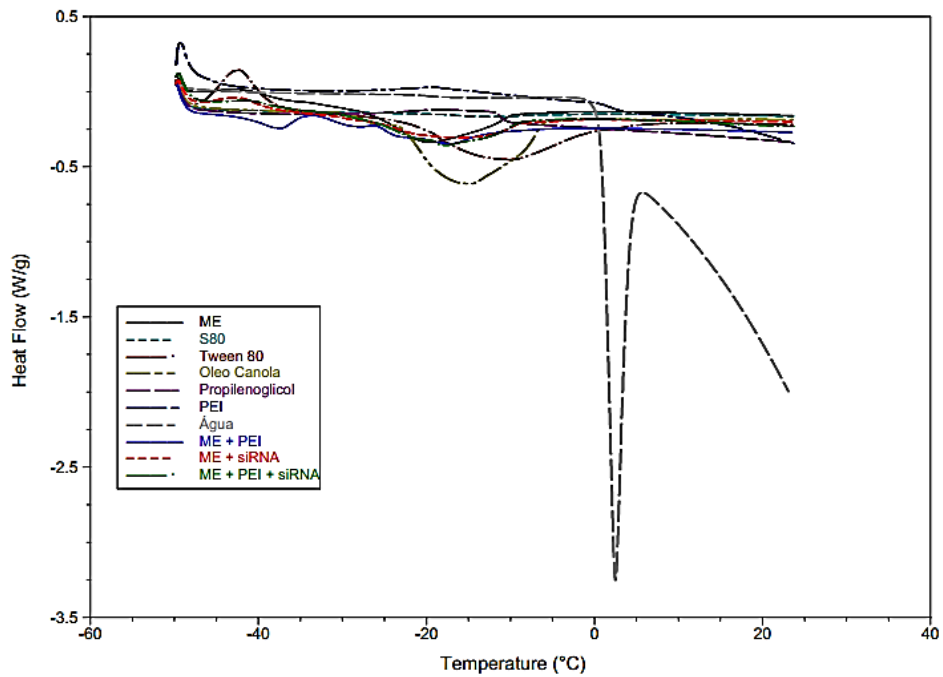
Zhang et al. (2011), investigou as estruturas de MEs contendo cetoprofeno, lidocaína e cafeína. No estudo, foram desenvolvidas três formulações com diferentes conteúdos de água, representando as microestruturas de A/O, O/A e bicontínua. Na primeira não foi observado o pico de congelamento da água, em contrapartida, a segunda amostra mostrou apenas o pico de congelamento da água como um único pico grande no termograma. A microestrutura da ME bicontínua teve o pico de congelamento do óleo e da água distintos e separados.

Figura 26. Termogramas dos componentes e MEs no ciclo de congelamento.



(FONTE: Dados da pesquisa).

Figura 27. Termogramas dos componentes e MEs no ciclo de aquecimento.



(FONTE: Dados da pesquisa).

5.7. ENSAIOS DE ESTABILIDADE

Devido à importância econômica e necessidade de agilidade no desenvolvimento de novos produtos, o estudo de estabilidade tornou-se uma ferramenta fundamental para garantir a segurança e eficácia dos mesmos dentro do prazo necessário para o lançamento comercial. O estudo de estabilidade de formulações cosméticas como as MEs, fornece indicações sobre o comportamento do produto, em determinado intervalo de tempo, frente a condições ambientais a que possa ser submetido, desde a fabricação até o término da validade. No entanto, os parâmetros do produto a serem avaliados durante o estudo de estabilidade devem ser capazes de garantir a qualidade do produto e, são divididos em organolépticos, como aspecto, cor e odor, e físico-químicos como pH, viscosidade, densidade e monitoramento de ingredientes da formulação (BRASIL, 2004).

A baixa tensão interfacial dos sistemas microemulsionados garante sua estabilidade termodinâmica quanto à sedimentação em temperatura constante. No entanto, com o aumento da agitação térmica algumas formulações perdem a estabilidade e formam grandes agregados advindos da coalescência entre as gotículas. Dessa forma, a temperatura modifica as propriedades do filme de tensoativos, resultando em mudanças estruturais. A estabilidade termodinâmica das MEs formuladas frente a mudanças de temperatura foi verificada a partir de ciclos de congelamento/descongelamento e de estresse térmico. Além disso, as formulações foram submetidas à centrifugação em diferentes rotações (MORAIS et al., 2006; ROSSI et al., 2007; GHOSH et al., 2013). O aumento da força gravitacional sobre o produto promove o movimento de suas partículas e estresse na preparação, antecipando possíveis alterações de estabilidade (OLIVEIRA, 2009).

Após as amostras serem submetidas aos ciclos de congelamento/descongelamento e centrifugação, a estrutura macroscópica dos sistemas permaneceu inalterada (Figura 28). Quanto às propriedades físico-químicas de IR e condutividade, pode-se observar na tabela 4 que não houve alterações significativas ($p > 0,05$) após estresse térmico.

Tabela 4. Avaliação físico-química das MEs antes e após o teste de estresse térmico.

Sistemas	Antes do estresse térmico		Após o estresse térmico	
	Índice de Refração	Condutividade (μScm^{-1})	Índice de Refração	Condutividade (μScm^{-1})
ME	$1,466 \pm 0,0006$	$1,3467 \pm 0,1701$	$1,468 \pm 0,0008$	$1,0758 \pm 0,1910$
ME-PEI	$1,467 \pm 0,0040$	$1,5402 \pm 0,1253$	$1,470 \pm 0,0010$	$1,2021 \pm 0,2015$
ME-siRNA	$1,467 \pm 0,0005$	$2,5867 \pm 0,2510$	$1,471 \pm 0,0004$	$1,9678 \pm 0,1799$
ME-PEI-siRNA	$1,465 \pm 0,0066$	$2,0167 \pm 0,0890$	$1,467 \pm 0,0023$	$1,6359 \pm 0,0987$

(FONTE: Dados da pesquisa).

Figura 28. Aparência macroscópica das MEs após os ciclos de congelamento, descongelamento e centrifugação.

LEGENDA: (A) Amostras de Microemulsão + PEI + RNA e Microemulsão + RNA após o ciclo de congelamento. (B) Amostras de Microemulsão + PEI + RNA e Microemulsão + RNA após o ciclo de descongelamento. (C) Amostras de Microemulsão + PEI + RNA e Microemulsão + RNA após os ciclos de centrifugação.

(FONTE: Dados da pesquisa).

5.8. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE PELO MTT

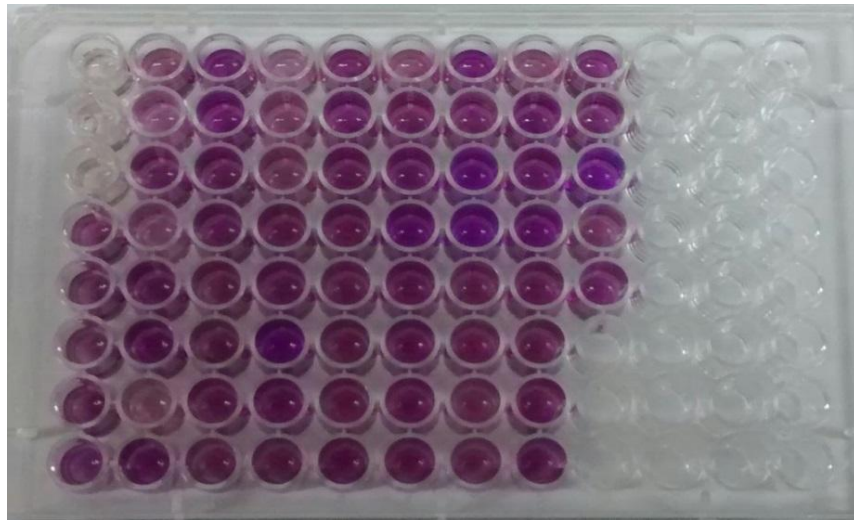
Os estímulos tóxicos ameaçam as funções metabólicas celulares, levando a adaptação das células ao meio que estão submetidas (YANG, CARDONA e BARILE, 2002). Os testes de toxicidade são realizados para determinar os riscos potenciais que novos produtos podem gerar na saúde e meio ambiente (CASTAÑO e GÓMENEZ-LECHÓN, 2005).

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material para uso na biomedicina. Os métodos são padronizados utilizando-se culturas celulares, onde o material entra em contato direta ou indiretamente com as células de mamíferos para verificar as alterações celulares por diferentes mecanismos (ROGERO et al., 2003). Entre eles estão o método do 3-(4,5)-

dimetiltiazolil-2,5-difeniltetrazólio (MTT), enzima lactato desidrogenase, Azul de Tripán, entre outros, com objetivo de detectar efeitos tóxicos agudos (SOENEN e DE CUYPER, 2009).

O método aplicado neste estudo foi baseado na metabolização do reagente MTT (cor amarela) em cristais de formazan (cor violácea). A reação ocorre através da atividade da enzima mitocondrial succinato-desidrogenase, a qual permanece ativa somente em células viáveis (Figura 29). Assim, é possível estabelecer parâmetros de citotoxicidade e taxas de proliferação celular (MIZUNO, 2000).

Figura 29. Metabolização do MTT por fibroblastos após tratamento com as formulações microemulsionadas.



(FONTE: Dados da pesquisa).

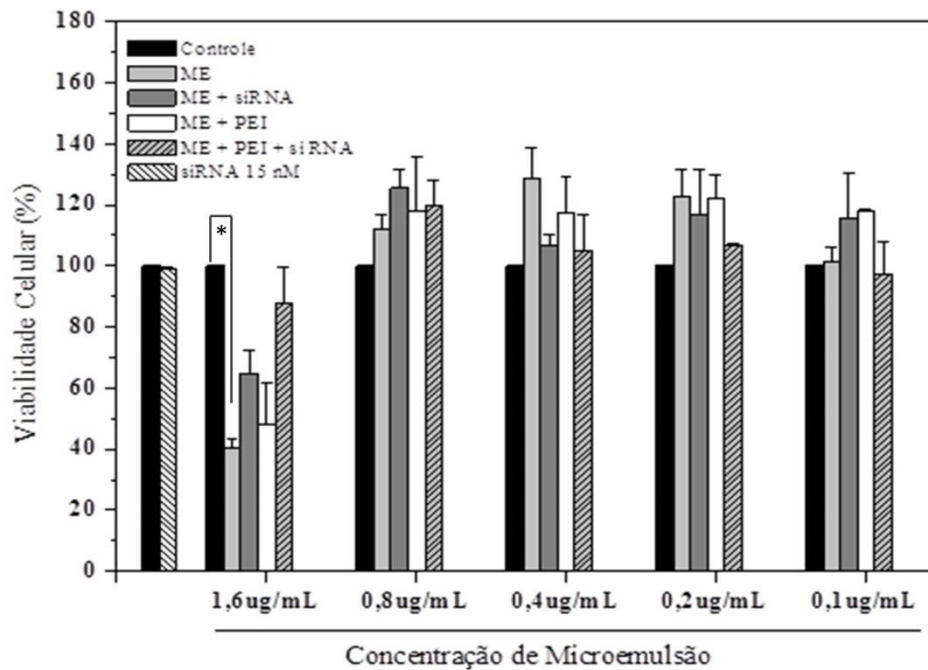
O controle corresponde às células não tratadas, com leituras de absorvância representadas como 100% de sobrevivência celular. Cada ponto representa a média \pm D.P. (n = 3) (* p <0,05). Para detecção da viabilidade das células frente às formulações, a seguinte equação foi aplicada:

$$\text{Viabilidade (\%)} = \frac{\text{Abs (tratamento)}}{\text{Abs (controle)}} \times 100 \quad \text{(Equação 5)}$$

Como demonstrado na Figura 30, o siRNA 15nM não exerceu toxicidade celular, bem como as formulações microemulsionadas com concentrações menores ou igual a 0,8 $\mu\text{g/mL}$, indicando um efeito citoprotetor e proliferação celular, representados pela viabilidade maior que 100% (p>0,05). No entanto, pode-se observar que a ME na concentração de 1,6 $\mu\text{g/mL}$ apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle (* p<0,05).

Segundo Albuquerque (2008), absorvância menor que a do controle é indicativa de morte celular ou proliferação reduzida, enquanto que o inverso é válido para a indução do crescimento e renovação celular. Rodríguez-González et al. (2013), associou o efeito citoprotetor para viabilidades maiores que 100%.

Figura 30. Viabilidade celular após 24 h de incubação com as formulações.



Cada ponto representa a média \pm D.P. (n = 3) (* p < 0,05).

(FONTE: Dados da Pesquisa).

5.9. DETERMINAÇÃO DO COMPORTAMENTO REOLÓGICO

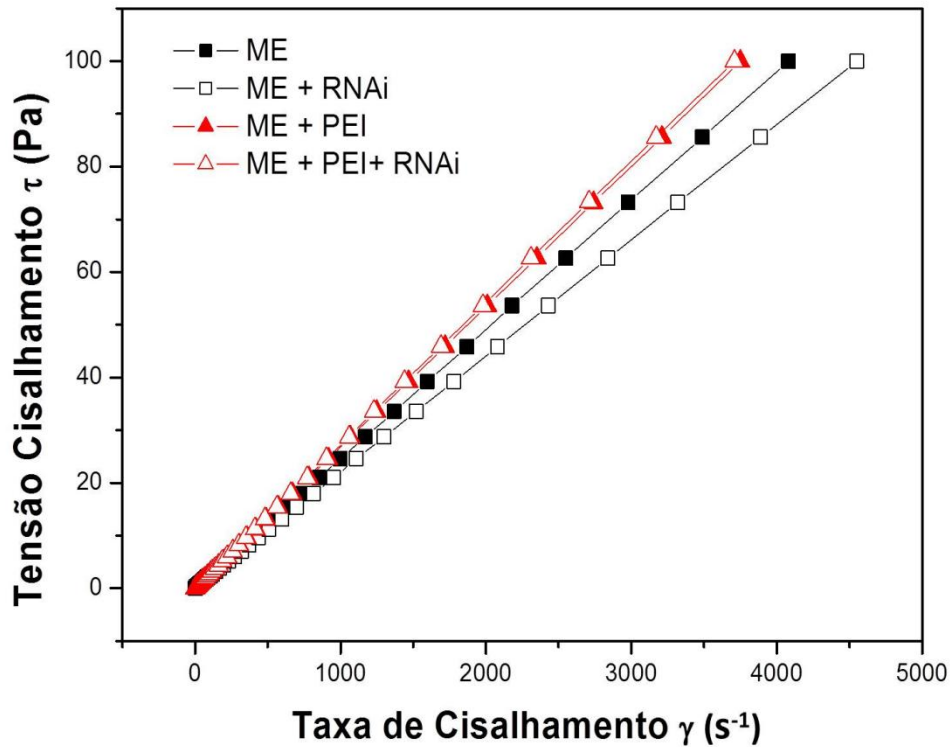
A caracterização reológica de formulações fornece informações valiosas sobre estrutura e viscosidade, isto é, resistência ao fluxo. Assim, é possível avaliar a estabilidade física do sistema, bem como seu comportamento no local de aplicação (WELIN-BERGER, 2001). Este método aplica-se na caracterização de diversos sistemas nanoestruturados, pois o comportamento reológico do fluido está relacionado com o tipo de arranjo e seu nível organizacional (HARDING et al., 2000). Sendo assim, análises reológicas são imprescindíveis no desenvolvimento de formulações (BRICENO, 2000) e na caracterização físico-química de produtos farmacêuticos, tais como, pastas, cremes, emulsões e microemulsões, géis, suspensões, revestimento de comprimidos e vários outros produtos (MARTIN et al., 1993; LIEBERMAN et al., 1996; LIMA, 2000; NETZ E GEORGE, 2002).

As curvas de fluxo são resultados gráficos do comportamento de fluxo de um líquido, onde é correlacionada a tensão de cisalhamento (*Shear stress*, τ) e a taxa de cisalhamento (*Shear rate*, γ). As curvas são do tipo ascendente e descendente. A primeira indica o aumento da taxa de cisalhamento e o comportamento de fluxo e a segunda indica a redução gradual desta taxa (SCHRAMM, 2006).

O comportamento de fluxo pode ser classificado em Newtoniano ou não-Newtoniano. Os fluidos Newtonianos apresentam como principal característica a proporcionalidade entre a tensão e a taxa de cisalhamento em regime laminar, de modo que a viscosidade do sistema independe destes parâmetros de deformação e o escoamento se inicia assim que a tensão é aplicada, apresentando viscosidade constante. Desta forma, sua representação gráfica é uma reta com início na origem dos eixos. Os outros tipos que não se adequam a esse comportamento ideal de fluxo são classificados como não-newtonianos (SCHRAMM, 2006).

Deste modo, pode-se observar na Figura 31 um comportamento Newtoniano das formulações desenvolvidas neste estudo, ocorrendo uma sobreposição das curvas ascendente e descendente, gerando uma reta que passa pela origem. As MEs usualmente comportam-se como fluidos Newtonianos, uma vez que apresentam baixa influência a mudanças de pressão e temperatura, favorecendo a uma adequada aplicação tópica com boa espalhabilidade e formação de filme uniforme na pele (DAMASCENO et al., 2011; SINTOV, LEY, BOTNER, 2010; GAO et al., 2003).

Figura 31. Comportamento reológico das formulações em estudo. Reograma Tensão de cisalhamento *versus* Taxa de cisalhamento.

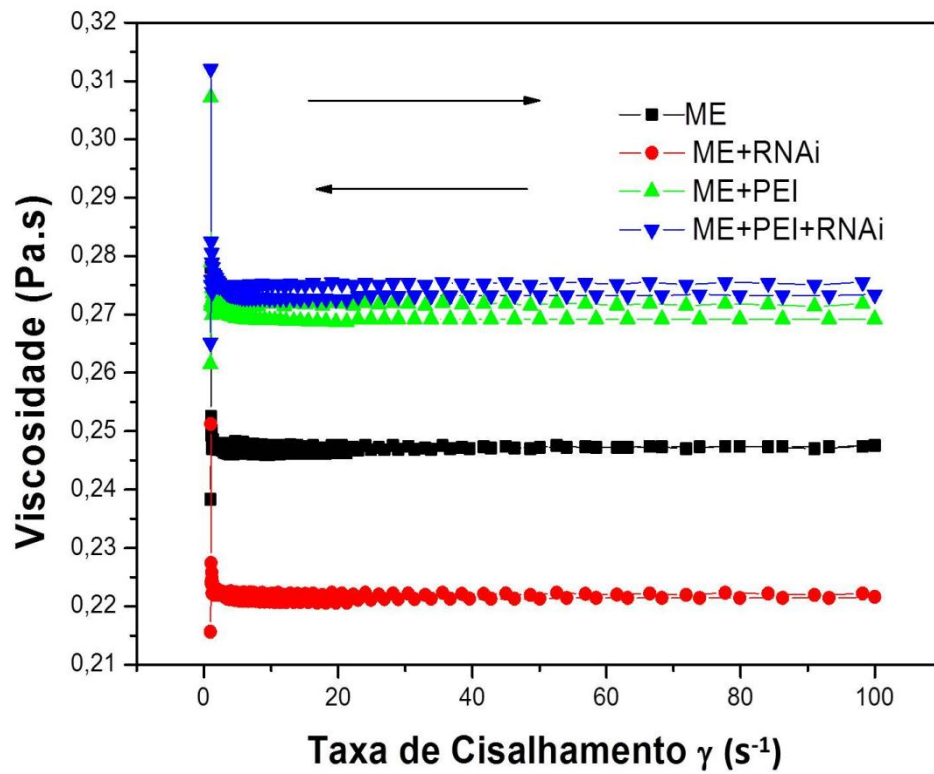


(FONTE: Dados da Pesquisa).

A viscosidade pode ser entendida como a resistência interna de um fluido ao fluxo ou movimento, resultante da aplicação de uma força que causa deformação temporária ou permanente da matéria. Portanto, quanto maior a viscosidade, maior a resistência ao fluxo, levando-se em consideração a maior dificuldade do movimento browniano, ou seja, movimento aleatório de partículas microscópicas imersas no fluido (LEONARDI & MAIA CAMPOS, 2001; AULTON, 2005; TONZAR, 2006).

Na Figura 32, pode-se observar que a viscosidade não se alterou em função da taxa de cisalhamento, apresentando um comportamento constante e uma viscosidade relativamente baixa. Isto pode estar associado ao tamanho reduzido das gotículas, as quais podem ter se orientado na direção do fluxo, permitindo o alinhamento e o deslizamento das mesmas, reduzindo a resistência interna do sistema e contribuindo para diminuição da viscosidade (DALVIN, 2011; SCHRAMM, 2006).

Figura 32. Comportamento reológico das formulações em estudo. Reograma Viscosidade *versus* Taxa de cisalhamento.



(FONTE: Dados da Pesquisa).

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Após a análise dos dados obtidos, pode-se concluir que:

- A metodologia empregada para a determinação do diagrama de fases demonstrou relativa facilidade de aplicação, bem como reprodutibilidade dos pontos de ME, obtendo sistemas A/O apropriados para a incorporação de siRNA;
- O polímero induziu à compactação das gotículas, atingindo menores tamanhos em comparação àquelas sem o PEI, maior encapsulação e provável liberação prolongada de siRNA. Isto seria vantajoso para aplicações cutâneas e transfecção de RNA interferente em células-alvo;
- Os dados de DSC, Microscopia de Luz polarizada, MET, estudos de condutividade e IR, foram determinantes para a confirmação da microestrutura das MEs: A/O, isotrópica e arredondada;
- As formulações mostraram-se estáveis frente a mudanças de temperatura e força centrífuga;
- As formulações apresentaram propriedades citoprotetoras para concentrações $\leq 0,8$ $\mu\text{g/mL}$, o que permite sua aplicação clínica segura;
- Os sistemas se comportaram como fluidos Newtonianos de baixa viscosidade, favorecendo a uma adequada aplicação tópica.

Assim, a presente proposta pode exercer importante impacto na área de tecnologia farmacêutica e biotecnologia pelo ineditismo de uma formulação microemulsionada como veículo de siRNA para aplicação tópica. Sendo necessários estudos posteriores para analisar a atividade farmacológica e mecanismo de ação das moléculas interferentes.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABELHA, T. F. **Desenvolvimento e caracterização de sistemas de liberação tópica para veiculação de siRNA na terapia gênica da córnea: gel termorreversível e nanodispersões de cristal líquido**. 2012, 46f. Dissertação (Mestrado em ciências farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. São Paulo.
- ABDOU, H.M. Dissolution. In: MISCHER, A. Remington: The Science and practice of pharmacy. **Mack Publishing Company**. V.1, p. 593-604. 1995.
- ADKINS, N. L.; HALL, J. A.; GEORGEL, P. T. The use of Quantitative Agarose Gel Electrophoresis for rapid analysis of the integrity of protein–DNA complexes. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, n. 70, p. 721–726, 2007.
- AGACHE, Physiologie de la peau et exploitations fonctionnelles cutanes. **Editions Medicales Internationales**, 2000.
- ALBUQUERQUE, I. O. **Citotoxicidade *in vitro* da terapia fotodinâmica com alumínio-cloro-ftalocianina lipossomal em melanoma murinho (B16FA)**. Faculdade de ciências da saúde da Universidade de Brasília. Dissertação de mestrado. Brasília. 2008.
- AMJAD, M.W. AMIN, M.C.M. MAHALI, S.M.et al., **Nanoscale Diblock Copolymer Micelles: Characterizations and Estimation of the Effective Diffusion Coefficients of Biomolecules Release through Cylindrical Diffusion Model**. V.9, p. 1-14, 2014.
- ANSEL, H.C. POPOVICH, N.G. ALLEN, L.V. **Formas farmacêuticas: Considerações biofarmacêuticas**. Editora Premier, p. 65-112. 2000.
- ARAMAKI, K. HAYASHI, T. KATSURAGI, M. ISHITOBI, H. KUNIEDA, T. Effect of adding an amphiphilic solubilization improver, sucrose distearate, on the solubilization capacity of nonionic microemulsions. **J. Colloid Interface Sci.** v. 236, p. 14-19, 2001.
- AUTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. 677p. São Paulo: Artmed, 2005.

BAEK, S.C., LIN, Q., ROBBINS, P.B., FAN, H., KHAVARI, P.A. Sustainable systemic delivery via a single injection of lentivirus into human skin tissue. **Hum Gene Ther** 12:1551–1558, 2001.

BANCROFT, W. D. The theory of emulsification. **Journal Physical Chemistry**, v. 17, p. 501-519, 1913.

BARRY, B.W. Novel mechanism and devices to enable successful transdermal drug delivery. **Eur.J.Pharm. Sci.**, Amsterdam, v.14,p.101-114,2001.

BENY, M.G. Fisiologia da pele. **Cosmetic Toiletries**, São Paulo, v. 12, p. 44-50, 2000.

BHATIA, D., CHAKRABORTY, S. AND KRISHNAN, Y. Designer DNA give RNAi more spine. **Nature Nanotechnology**, 7, 344-346, 2012.

BHATTACHARYA, S., BAJAJ, A. Advances in gene delivery through molecular design of cationic lipids. **Chemical Communications**, n.31, p.4632-56. 2009.

BAROLI, B.; LÓPEZ-QUINTELA, M. A.; DELGADO-CHARRO, M. B.; FADDA, A. M.; BLANCO-MÉNDEZ, J. Microemulsions for topical delivery of 8-methoxsalen **J. Control. Release**, v.69, p. 209-218, 2000.

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.

BARUT, K.D. COSKUN, F.F. et al., Development and characterization of a cationic emulsion formulation as a potential pDNA carrier system. **Turkish Journal of Chemistry**, v.29, p. 27-40. 2005.

BEDÊ, P. M. **Produção e caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para utilização biomedical**. Dissertação (Mestrado) - Ciência dos Materiais Instituto Militar de Engenharia. Rio de Janeiro, 2010.

BEYERLE, A., BRAUN, A., MERKEL, O., KOCH, F., KISSEL, T., STOEGER, T. Comparative *in vivo* study of poly(ethylene imine)/siRNA complexes for pulmonary delivery in mice. **J. Control Release**. V. 151, p. 51-56, 2011.

BHADRA, S. BHADRA, P. JAIN, N.K. JAIN, Pegnology: a review of PEGylated systems, **Die Pharmazie**. V.57 (1),p. 5–29. 2002.

BLOISE, M.I. Óleos vegetais e especialidades da floresta Amazônica. **Cosmetics & Toiletries**, v.15, p.46-49, 2003.

BLUM, J.S. SALTZMAN, W.M. High loading efficiency and tunable release of plasmid DNA encapsulated in submicron particles fabricated from PLGA conjugated with poly-L-lysine, **J. Controlled Release**. V.129, p. 66–72, 2008.

BOLZINGER, M.-A.; BRIANÇON, S.; PELLETIER, J.; FESSI, H.; CHEVALIER, Y. Percutaneous release of caffeine from microemulsion, emulsion and gel dosage forms **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.68, p. 446–451, 2008.

BONNET, S. VERNAL, A. MARCEL, C.H. RADY, T. HUSUM, K. Variability of sea-surface temperature and sea-ice cover in the Fram Strait over the last two millennia. **Marine Micropaleontology**. v.74, p. 59–74, 2010.

BOONME, P. KRAUEL, K. GRAF, A. RADES, T. Characterization of Microemulsion Structures in the Pseudoternary Phase Diagram of Isopropyl Palmitate/Water/Brij 97:1-Butanol. **APS Pharm Sci. Tech**, V. 7 (2), p. 1-6, 2006.

BOSE, S., DU, Y.; TAKHISTOV, P., MICHNIAK-KOHN, B. Formulation optimization and topical delivery of quercetin from solid lipid based nanosystems. **International Journal of Pharmaceutics**, v.441, n.1-2, p.56-66, 2013.

BOSSEV D. P., KLINE S., ROSOV N. Diffusion of surfactant micelles and shape fluctuations of microemulsion studied by neutron spin echo. **NIST Center for Neutron Research**, p. 9-13, 2003.

BOUCHEMAL, K; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano -emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, iol and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v.280, n.1-2, 241-251, 2004.

BOUSSIF, O. LEZOULACH, F. ZANTA, M.A. MERGNY, M.D. SCHERMAN, B. DEMENEIX, J.P. BEHR, D. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into

cells in culture and *in vivo* — polyethylenimine, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 92,p. 7297–7301, 1995.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC N.º 27, de 17 de maio de 2012 – **Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos**. Disponível em: < <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/564310004b60537> >. Acesso em: 28 de julho 2014.

BRICENO, M. I. **Rheology of suspensions and emulsions**. In: Nielloud, F., Martimestres, G (ed) *Pharmaceutical emulsion and suspensions*, New York, p. 557- 608. 2000.

BRUNO, K. Using drug-excipient interactions for siRNA delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews** 63. P.1210–1226, 2011.

BRUXEL, F.R; OLIVEIRA, E. C.; STULP, S.; MULLER, C. S.; ETCHEPARE, H. D. Estudo da adição de resíduo (lodo) de gemas na massa cerâmica vermelha. **Cerâmica**. São Paulo, vol.58, nº346, 2012.

BUMAJDAD, A. EASTOE, J. Conductivity of water-oil microemulsions stabilized by mixed surfactants. **J colloid interface sci.** v. 274, 2004.

BUMCROT D, MANOHARAN M, KOTELIANSKY V, SAH DW. RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. **Nat Chem Biol.** V.2, p.711–9, 2006.

CANDAU F., PABON M., ANQUETIL J.-Y. Polymerizable microemulsions: some criteria to achieve an optimal formulation. **Colloids Surfaces A: Physiochem. Eng. Aspects.** V.153, p. 47-59. 1999.

CARRETERO, R., ROMERO, J.M., RUIZ-CABELLO, F., MALENO, I., RODRIGUEZ, F., et al., Analysis of HLA class I expression. In progressing and regressing metastatic melanoma lesions after immunotherapy, **Immunogenetics**, v. 60, p. 439-447, 2006.

CASTAÑO, A.; GÓMEZ-LECHÓN, M.J. Comparison of basal cytotoxicity data between mammalian and fish cell lines: A literature survey. **Toxicology in Vitro**, v.19, p.695–705, 2005.

CEVC, G. BLUME, G. Biological activity and characteristics of triamcinolone-acetonide formulated with the self-regulating drug carriers, transfersomes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes**, v.1614, p. 156-164, 2003.

CEVC, G.; VIERL, U. Spatial distribution of cutaneous microvasculature and local drug clearance after drug application on the skin. **Journal of Controlled Release**, v.118, p. 18-26, 2006.

CEVC, G. VIERL, U. Nanotechnology and the transdermal route: a state of the art review and critical appraisal, **J. Control Release**, v. 141 (3), p.277–299, 2009.

CHORILLI, M. **Desenvolvimento e Caracterização Físico-Química de Sistemas Nanoestruturados Contendo Palmitato de Retinol**: Controle Microbiológico, Avaliação da Segurança e Eficácia no Tratamento do Envelhecimento Cutâneo. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Tese de mestrado. 2007.

CHUDNOVSKY Y, KHAVARI PA, ADAMS AE. Melanoma genetics and the development of rational therapeutics. **The J Clin Invest**. v.115(4),p. 813-24, 2002.

CONVERTINE, A.J. BENOIT, D.S. DUVALL, C.L. HOFFMAN, A.S. STAYTON, P.S. Development of a novel endosomolytic diblock copolymer for siRNA delivery, **J. Control Release**, v. 133 (3), p. 221–229, 2009.

CUN, D. JENSEN, D.K. MALTESEN, M.J. BUNKER, M. et al., High loading efficiency and sustained release of siRNA encapsulated in PLGA nanoparticles: Quality by design optimization and characterization. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. V. 77, p. 26–35. 2011.

CUNHA-JÚNIOR, A.; FIALHO, S.L.; CARNEIRO, L.B.; ORÉFICE F. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arq. Bras. Oftal.**, v.63, p.285-391, 2003.

DALTIN, D. **Tensoativos – Química, Propriedades e Aplicações**. Editora Blucher, São Paulo, 2011.

DAMASCENO, B. P. G. L. et al. Microemulsão: um promissor carregador para moléculas insolúveis. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 32, p. 9-18, 2011.

DANIELS, A.N. **Elucidation of Gene Function Using RNA Interference in a Cancer Cell Culture Model**. University of KwaZulu-Natal. Durban. 2011.

DANIELSSON, I.; LINDMAN, B. The definition of microemulsion. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v.3, n.4, p.391-392, 1981.

D'CRUZ OJ, UCKUN FM. Gel-microemulsions as vaginal spermicides and intravaginal drug delivery vehicles. **Contraception**. 64(2):113-23. 2001.

DE FOUGEROLLES, A. R. Delivery vehicles for small interfering RNA *in vivo*, Hum. **Gene Ther**. V.19 (2), p.25–132, 2008.

De 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.

DE PAOLI, AURÉLIO, M. **Degradação e Estabilização de Polímeros**, Editora Artliber, p. 286, 2008.

DELGADO, J.M.F. **Preparação e caracterização de nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa**. Instituto Politécnico de Bragança. São Paulo, 2013.

DEPIERI, L. V. **Desenvolvimento e Caracterização de Sistemas de Liberação Tópica a Base de Cristais líquidos para Veiculação de siRNA na Terapia Gênica (Reduzida)**. 2012. 27 f. Tese (Mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2012.

DJEKIC, L.; PRIMORAC, M. The influence of cosurfactants and oils on the formation of pharmaceutical microemulsions based on PEG-8 caprylic/capric glycerides. **International Journal of Pharmaceutics**, v.352, p.231-39, 2008.

DOTY, P. BOEDTKER, J.R. FRESCO, R. HASELKORN, M. LITT, H. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 45. 1959.

DUNNE, M.; BIBBY, D.C.; JONES, J.C.; CUDMORE, S. Encapsulation of protamine sulphate compacted DNA in polylactide and polylactide-co-glycolide microparticles. **J. Control. Release**, Amsterdam, v.92, p.209-219, 2003.

DUXBURY, M.S., MATROS, E., ITO, H., ZINNER, M.J., ASHLEY, S.W., WHANG, E.E. **Systemic siRNA-mediated gene silencing: a new approach to targeted therapy of cancer**. Ann. Surg. 240, 667–674, discussion 675–676, 2004.

ELAKNESWARAN, Y.; NAWA, T.; KURUMISAWA, K. Zeta potential study of paste blends with slag, **Cement Concrete Comp**, v. 31, n. 1, p.72-76, 2009.

ESTEPHAN, E.C. **Microemulsão do Sistema Água – Etanol –Isoctano**. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2012.

EVANDRO, S. A. **Caracterização elétrica e óptica da transições de fase em colóides e microemulsões**. Bahia, Dissertação de Mestrado em Ciências dos Materiais, Universidade Federal do Vale do São Franscisco. 2009.

FANKHAUSER, F. 2nd. Application of static and dynamic light scattering-a review. **Klin Monbl Augenheilkd.**, v. 227, p. 194-198, 2010.

FANUN, M., WACHTEL, E., ANTALEK, B., ASERIN, A., AND GARTI, N. A study of the microstructure of four-component sucrose ester microemulsions by SAXS and NMR, *Colloids Surf. A: Physicochem. and Eng. Asp.*, Vol 180, Iss 1-2, pp. 173-186. 2001.

FANUN, M. **Microemulsions as delivery systems**. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 17 pp. 306-313, 2011.

FERNANDES, M.R. **Desenvolvimento de um novo combustível microemulsionado base-diesel**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Centro de Tecnologia. Natal, 2005.

FERNANDEZ, C.A. RICE, K.G. **Engineered nanoscaled polyplex gene delivery systems**, *Mol. Pharm.* V. 6 (5), p.1277–1289, 2009.

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.806-11,1998.

FISCHER D, LI Y, AHLEMEYER B, KRIEGLSTEIN J, KISSEL T. *In vitro* cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis. **Biomaterials**. 24: 1121–1131. 2003.

FLORENCE, TAYLOR, A., ATTWOOD, D. **Princípios físico-químicos em farmácia**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo. 2003.

FRANÇA, N.R., MESQUITA JÚNIOR, D., LIMA, A.B., PUCCI, F.V.C., ANDRADE, L.E.C., SILVA, N.P. Interferência por RNA: Uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. **Rev Bras Reumatol.** V. 50(6), p. 695-709, 2010.

FREEDBERG I. M. et al. (eds). FITZPATRICK`S. **Dermatology In General Medicine**, New York: MacGraw Hill Professional, p.107, 2003.

FREITAS, V. F.; CÓTICA, L. F.; DIAS, G. S.; SANTOS, I. A.; VENDRAME, S. C.; KHALIL, N. M.; MAINARDES, R.M.; STARUCH, M.; JAIN, M. Simple and facile approach to synthesize magnetite nanoparticles and assessment of their effects on blood cells. **J. of Magnetism and Magnetic Materials.** 2011.

FORMAÇÃO DE EMULSÕES ÁGUA- ÓLEO EM CONDIÇÕES DE MISTURA TURBULENTA. Capítulo 3. PUC – RIO. Certificação digital nº 0321172/CA. Disponível em: http://www2.dbd.puc-rio.br/pergamum/tesesabertas/0511146_08_cap_02.pdf. Acesso em: 29 de abril de 2015.

FORMARIZ, T.P.; WANCZINSKI, B.J.; JÚNIOR-SILVA, A.A.; SCARPA, M.V.; OLIVEIRA, A.G. Biotecnologia de sistemas coloidais aplicável na otimização do efeito terapêutico de fármacos usados no tratamento do câncer. **Infar.**,v.16, p.44-57, 2004.

FORMARIZ, T.P.; URBAN, M.C.C.; A.A. SILVA-JÚNIOR; GREMIÃO, M.D.; OLIVEIRA, A.G. Microemulsões e fases líquidas cristalinas com sistemas de liberação de fármacos. **Rev. Bras. Ciên. Farmac.**, v.41, p.301-313, 2005.

GAN L. M., LEE K. C., CHEW C. H., NG S. C. Effects of surfactant concentration on polymerizations of methyl methacrylate and styrene in emulsions and microemulsions. **Langmuir**;11:449-454. 1994.

GAO, T.; TIEN, J.M.; CHOI, Y.H. Sunscreen formulas with multilayer lamellar structure **Cosmet. Toiletries**, v.118, n.10, p.41-52, 2003.

GARY, D.J. PURI, N. WON, Y.Y. Polymer-based siRNA delivery: perspectives on the fundamental and phenomenological distinctions from polymer-based DNA delivery. **J. Control Release** 121, 2007.

GEUSENS, B. LAMBERT, J. DE SMEDT, S.C. BUYENS, K. SANDERS, N.N. VAN GELE, M. in Cevc (1996). 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; STROBBE, T., BRACKE, S., DYNOODT, P., SANDERS, N., VAN GELE, M., LAMBERT, J. Lipid-mediated gene delivery to the skin. **Eur J Pharm Sci.** v. 17; 43(4), p. 199-211, 2011.

GELEY, S. MULLER, C. RNAi: ancient mechanism with a promising future. **Exp. Gerontol**, v. 39, p. 985-998, 2004.

GILLINGHAM, L.G., HARRIS-JANZ, S., JONES, P. J. H. Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. **Lipids.** V.46, p. 209–228. 2011

GILLINGHAM, L.G., ROBINSON, K.S., JONES, P.J.H. Effect of high-oleic canola and flaxseed oils on energy expenditure and body composition in hypercholesterolemic subjects. **Metabolism.** V.61, p.1598–1605. 2012.

GHAZIZADEH S, HARRINGTON R, TAICHMAN L: *In vivo* transduction of mouse epidermis with recombinant retroviral vectors: Implications for cutaneous gene therapy. **Gene Ther** 6:1267–1275, 1999.

GHOSH, S. V. et al. Antibacterial microemulsion prevents sepsis and triggers healing of wound in wistar rats. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 105, p. 152– 157, 2013.

GRAMPUROHIT, N., RAVIKUMAR, P., MALLYA, R. Microemulsions for topical use - a review. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research.** V. 45, p. 100–107, 2011.

GRAYSON ACR, DOODY AM, PUTNAM D. Biophysical and Structural Characterization of Polyethylenimine-Mediated siRNA Delivery *in vitro*. **Pharm Res.**; 23(8):1868–1876. 2006.

GRIFFIN W.C. Calculation of HLB values of Nonionic Surfactants, **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, 5:249-256. 1954.

GRIFFIN, W.C.J. Classification of surface-active agents by HLB. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v.1, p.311, 1949.

GRIFFITHS, D.V., TAYLOR, H.V., SALT, M . The reaction of heteroaroylphosphonates with trialkyl phosphites. Conference: ICPC2004, **Birmingham International Conference Centre**, 2004.

GRIMM, D., M.A. KAY. Therapeutic RNAi applications: Is mRNA targeting finally ready for prime-time. **J. Clin. Invest.** v. 117, p. 3633-3641, 2007.

GODBEY, W. T., K. K. WU, G. J. HIRASAKI, AND A. G. MIKOS. Improved packing of poly(ethylenimine)/DNA complexes increases transfection efficiency. **Gene Ther.** 6:1380–1388. 1999.

GODBEY WT, BARRY MA, SAGGAU P, WU KK, MIKOS AG. Poly(ethylenimine)-mediated transfection: a new paradigm for gene delivery. **J Biomed Mater Res** 51: 321–328. 1999.

GOMES, D.A.A. **Aplicação de microemulsões na solubilização de frações pesadas de petróleo**. 124p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

GONÇALVES, J.C. **Nanotecnologia Aplicada à Pele**. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. Lisboa. 2014.

GUNSTONE F. **Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.; 2011.

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

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.

HADGRAFT, J. Skin, the final frontier. **Int.J.Pharm.**, Amsterdam, v.224,p.1-18, 2001.

HADCGRAFT, J., LANE, E.M. Skin permeation: The years of enlightenment. **International Journal of Pharmaceutics**, v.305, p.2-12, 2005.

HASSAN, M.L. ALI, A.F. Synthesis of nanostructured cadmium and zinc sulfides in aqueous solutions of hyperbranched polyethyleneimine. **Journal of Crystal Growth**. V. 310, p. 5252–5258. 2008.

HARDING, C.R., WATKINSON, A., RAWLINGS, A.V., SCOTT, I.R. Dry skin, moisturization and corneodesmolysis. **Int J Cosmet Sci**. v. 22, p. 21-52. 2000.

HE G., PAN Q., REMPEL G. L. Modeling of differential microemulsion polymerization for synthesizing nanozid poly(methyl methacrylate) particles. **Ind. Eng. Chem. Res**. V.46, p.1682-1689. 2007.

HEUSCHKEL, S.; GOEBEL, A.; NEUBERT, R. H. H. Microemulsions—Modern Colloidal Carrier for Dermal and Transdermal Drug Delivery. **J. Pharm. Sci.**, v. 97, n. 2, p. 603 –631, 2008.

HERMANSON, K. D., KALER, E. W. Kinetics and mechanism of the multiple addition microemulsion polymerization of hexyl methacrylate. **Macromolecules** ;36:1836-1842. 2003.

HOELLER, S.; KLANG, V.; VALENTA C. **Skin-compatible lecithin drug delivery systems for fluconazole**: effect of phosphatidylethanolamine and oleic acid on skin permeation. **JPP**, v. 60, p. 587–591, 2008.

HOAR, T. P.; SCHULMAN, J. H. Transparent water-on-oil dispersions, the oleopathic hydromicelle. **Nature**, 152:102-3, 1943.

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

HUNG, C.F. HWANG, T.L. CHANG, C.C. FANG, J.Y. Physicochemical characterization and gene transfection efficiency of lipid emulsions with various co-emulsifiers. **International Journal of Pharmaceutics**. v.289, p. 197–208, 2005.

HUNTER JE, ZHANG J, KRIS-ETHERTON PM. Cardiovascular disease risk of dietary stearic acid compared with trans, other saturated, and unsaturated fatty acids: a systematic review. **Am J Clin Nutr.** V. 91, p. 46–63. 2010.

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.

JAKOBSEN, M. STENDERUP, K. ROSADA, C. MOLDT, S. KAMP, T.N. DAM, T.G. JENSEN, J.G. MIKKELSEN, B. Amelioration of psoriasis by anti-TNF-alpha RNAi in the xenograft transplantation model. **Mol. Ther.** V. 17 (10), p. 1743–1753, 2009.

JHA P, GUINDON E, JOSEPH RA, NANDI A, JOHN RM, RAO K, CHALOUPKA FJ, KAUR J, GUPTA PC, RAO MG. A rational taxation system of bidis and cigarettes to reduce smoking deaths in India. **EPW Economic & Political Weekly.** P. 44-51. 2011.

JOHNSON GH, KEAST DR, KRIS-ETHERTON PM. Dietary modeling shows that the substitution of canola oil for fats commonly used in the United States would increase compliance with dietary recommendations for fatty acids. **J Am Diet Assoc.** v.107, p.1726–1734. 2007.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica.** 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 272-280, 1990.

KAHN, H. **Difração de raios X.** São Paulo, 2012.

KATAS, H. RAJA, M.A.G. LAM, K.L. Development of Chitosan Nanoparticles as a Stable Drug Delivery System for Protein/siRNA. **International Journal of Biomaterials.** 2013.

KESHARWANI, P.; GAJBHIYE, V.; JAIN, N. K. A review of nanocarriers for the delivery of small interfering RNA. **Biomaterials,** v. 33, p. 7138-7150, 2012.

KIKUCHI E, YAMAZAKI K, TORIGOE T, CHO Y, MIYAMOTO M, OIZUMI S, HOMMURA F, DOSAKA-AKITA H, NISHIMURA M. HLA class I antigen expression is associated with a favorable prognosis in early stage non-small cell lung cancer. **Cancer Sci.** v.98(9), p.1424–1430, 2008.

KIM, T.W. CHUNG, H. KWON, I.C. SUNG, H.W. SHIN, B.C. JEONG, S.Y. Airway gene transfer using cationic emulsion as a mucosal gene carrier. **J gene med.** V.7, p. 749-747. 2005.

KIRCHEIS, R. WIGHTMAN, L. WAGNER, E. Design and gene delivery activity of modified polyethylenimines. **Advanced Drug Delivery Reviews.** V.53, p. 341–358. 2001.

KLANG, V., HATSKO, N.B., VALENTA, C., HOFER, F. Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. **Micron**, v.43, p.85–103, 2012.

KLEIN, T. **Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados estabilizados com álcool cetílico etoxilado e propoxilado contendo fluconazol potencialmente ativo contra esporotricose.** Universidade Estadual Paulista. Faculdade de ciências farmacêuticas. Araraquara, 2007.

KREILGAARD, M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.54, p. 77-98, 2002.

KRETSOS, K. et.al.Partitioning, diffusivity and clearance of skin permeants in mammalian dermis.**Int.J.Pharm.**, v.346, p. 64-79, 2008.

KOGAN, A., GARTI, N. Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. **Adv. Colloid Interface Sci.** 123–126, 369. 2006.

KOTZ, J. C. **Química Geral e Reações Químicas.** 5ª edição, São Paulo: Thomson. p.479, 501. 2005.

KUO, P.L. CHEN, C.C. JAO, M.W. Effects of Polymer Micelles of Alkylated Polyethylenimines on Generation of Gold Nanoparticles. **J. Phys. Chem. B**, 109 (19), p 9445–9450. 2005

KÜLKAMP, I.; PAESE, K; GUTERRES, S.S.; POHLMANN, A.R. Estabilização do ácido lipoico via encapsulação em nanocápsulas poliméricas planejadas para aplicação cutânea. **Quím. Nova**, v. 32, n. 8, 2009 .

KUNIEDA, H.; UMIZU, G.; YAMAGUGHI, Y. Mixing effect of polyoxyethylene-type nonionic surfactants on the lipid crystalline structures. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.218, p.88-96, 1999.

KWOK, A., HART, S.L.. Comparative structural and functional studies of nanoparticle formulations for DNA and siRNA delivery. **Nanomedicine**. v.7. 2011.

LAWRENCE, M. J.; RESS, G. D. Microemulsion-based media as novel drug delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.45, n.1, p.89-121, 2000.

LEACHMAN, S.A., HICKERSON, R.P., HULL, P.R. SMITH, F.J., MILSTONE, L.M., LANE, E.B., BALE, D.R. ROOP, W.H., MCLEAN, R.L., KASPAR, B.D. Therapeutic siRNAs for dominant genetic skin disorders including pachyonychia congenita, **J. Dermatol. Sci.** v.51 (3), p.151–157, 2008.

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

LEONARDI, G.R.; MAIA CAMPOS, P.M.B.G. Estabilidades de formulações cosméticas. **Int. J. Pharm. Compound.**, v.3, n.4, p.154-156. 2001.

LI, J.M., WUANG, Y.Y., ZHANG, W., SU, W., JI, L.N., MAO, Z.W. Low-weight polyethylenimine cross-linked 2-hydroxypopyl- β -cyclodextrin and folic acid as an efficient and nontoxic siRNA carrier for gene silencing and tumor inhibition by VEGF siRNA. **International Journal of Nanomedicine**. v.8, p. 2101–2117, 2013.

LIEBERMAN, J.A., RIEGER, M.M., BANKER, G.S. Rheological and mechanical properties os dispersed systems in pharmaceutical dosage forms: Disperse systems. Ed. **Radebaugh, G. W.** New York, 2^oed. 1996.

LIMA, E.M., **Fármacos & medicamentos**. V.4. p. 20. 2000.

LIU, C. H., YU, S.Y. Cationic nanoemulsions as non-viral vectors for plasmid DNA delivery. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v.79, n.2, Sep 1, p.509-15. 2010.

LOUZEIRO, HC. **Microemulsões Combustíveis a Partir do Óleo de Babaçu para Substituir o Diesel em Motores Estacionários**. Universidade Federal da Paraíba. Departamento de química. João Pessoa, 2012.

LOVELL P. A., EL-AASSER M. S. Emulsion polymerization and emulsion polymers. UK: **John Wiley e Sons**. 1997.

LU, W.H, HWANG, S.M, CHUANG, C.K, CHEN, C.Y, HU, Y.C. Development of a hybrid baculo viral vector for sustained transgene expression. **Mol Ther**. V.17, p.658–66. 2009.

MAGALHÃES, M.P. **Desenvolvimento de sistemas de base lipídica para a entrega de material genético em hepatocarcinoma**. Faculdade de ciências e tecnologia. Universidade de Coimbra. 2013.

MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, 24, p.87-93. 2001.

MARQUELE-OLIVEIRA, F.; et.al.. Development of topical functionalized formulations added with própolis extract: stability, cutaneous absorption and *in vivo* studies. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 342, p. 40 – 48, 2007.

MARTIN, A., WARBRICK, J., CAMMARATTA, A. Rheology in physical pharmacy; 4th. Ed. **Philadelphia**: Lea & Febiger, p. 622. 1993.

MARTIMPREY, H. VAUTHIER, C. MALVY, C. COUVREUR, P. Polymer Nanocarriers for the Delivery of Small Fragments of Nucleic Acids: Oligonucleotides and Sirna. France: **European Journal Of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, v. 71, p. 490-504, 2009.

MCLOUGHLIN, D.M. O'BRIEN, J. MCMANUS, J.J. GORELOV, A.V. DAWSON, K.A. **Bioseparation**. V. 9, p. 307. 2005.

MEDEIROS, S.F. **Obtenção de nanopartículas magnéticas sensíveis a estímulos para aplicações biomédicas**. Universidade de São Paulo. Tese de mestrado. São Paulo. 2010.

MEIER, W. Poly(oxyethylene) Adsorption in Water/Oil Microemulsions: A Conductivity Study. **Langmuir**, V.12, p. 1188-1192. 1995.

MEHROTRA, S. LEE, I. CHAN, C. Multilayer mediated forward and patterned siRNA transfection using linear-PEI at extended N/P ratios. **Acta Biomater**. V. 5(5), p. 1474–1488. 2009.

MENDONÇA, C.R.B. **Desenvolvimento de metodologias para análise direta de óleos vegetais empregando microemulsões de água em óleo e meios não aquosos**. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2005.

MEYER T., KEUREBTJES J., editors. Handbook of polymer reaction engineering **Editora Wiley**. VCH;Vol. 1. 2002.

MICHNIAK-KOHN, B. ZHANG, J. Investigation of microemulsion microstructures and their relationship to transdermal permeation of model drugs: Ketoprofen, lidocaine, and caffeine. **International Journal of Pharmaceutics**. V. 421, p. 34– 44. 2011.

MILLER B.L., CUMMINGS J., MISHKIN F., BOONE K., PRINCE F., PONTON M., COTMAN C. Emergence of artistic talent in fronto-temporal dementia. **Neurology**. **51**, 978–982. 1998.

MIZUNO, M.; SHIOMI, Y.; MINATO, K.; KAWAKAMI, S.; ASHIDA, H.; TSUCHIDA, H. Fucogalactan isolated from *Sarcodon aspratus* elicits release of tumor necrosis factor- α and nitric oxide from murine macrophages. **Immunopharmacology**, v.46, p.113-121, 2000.

MORAIS, J. M. et al. Physicochemical characterization of Canola oil/ Water Nano emulsions obtained by determination of required HLB number and emulsion phase inversion methods. **Journal of Dispersion Science and Technology**. v. 27, p. 109-115, 2006.

MOUNTAIN, A. Gene therapy: the first decade. **Trends in Biotechnology**, v.18, n.3, Mar, p.119-128. 2000.

MOURA, E. S. **Aplicação de técnicas eletroquímicas para análise de amostras lipofílicas**. Relatório final de estágio apresentado à Universidade Federal de Pelotas. Departamento de Ciências dos alimentos. 2008.

NABEL G. J. Genetic, cellular and immune approaches to disease therapy: past and future. **Nat. Med.** V. 1, n.2, p. 135-141, 2004.

NAKAMURA, M. J. TABATA, Y. ISHIKAWA, O. Controlled delivery of T-box21 small interfering RNA ameliorates autoimmune alopecia in a C3H/HeJ mouse model. **Am. J. Pathol.** V.172 (3),p. 650–658, 2008.

NAOUI, W. BOLZINGER, M.A. FENET, B. PELLETIER, J. VALOUR, J.P.KALFAT, R. CHEVALIER, Y. Microemulsion microstructure influences the skin delivery of an hydrophilic drug. **Pharmaceutical research**, v.28, n.7, p.1683-95, 2011.

NEMEN, D., SENNA, E.L. Preparação e caracterização de suspensões coloidais de nanocarreadores lipídicos contendo resveratrol destinados à administração cutânea. **Quim. Nova**, Vol. 34, No. 3, 408-413, 2011.

NETZ, P.A. GEORGE, G.O. **Reologia em fundamentos de físico-química**: uma abordagem conceitual para as ciências farmacêuticas. Artmed. 2002.

NEVES, K. Nanotecnologia em cosméticos. **Cosmetics & Toiletries**, v. 20, jan-fev, p. 22, 2008.

NIMESH, S., CHANDRA, R. Polyethylenimine nanoparticles as an efficient *in vitro* siRNA delivery system. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. V. 73 (1), p. 43-49, 2009.

NOTE, C. KOETZ, J. KOSMELLA, S. Structural changes in poly(ethyleneimine) modified microemulsion. **Journal of Colloid and Interface Science** v.302, p.662–668, 2006.

O'DONNELL J., KALER E. W. Microstructure, kinetics, and transport in oil-in-water microemulsion polymerizations. **Macromolecular Rapid Communications**. V.28, p. 1445-1454. 2007.

OGRIS, M. WAGNER, E. Tumor-targeted gene transfer with DNA polyplexes, Somat. **Cell Mol. Genet**. V. 27, p. 1–6. 2007.

OLIVEIRA, A.G.; SCARPA, M.V.; CORREA, M.A.; CERA, L.F.R.; FORMARIZ, T.P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Quim. Nov.**, v.27, p.131-138, 2004.

OLIVEIRA, A.Z.M. **Desenvolvimento de formulações cosméticas com Ácido hialurônico**. Faculdade de Farmácia. Tese de mestrado. 2009.

ORAFIDIYA, L. O., OLADIMEJI, F. A. Determination of the required HLB values of some essential oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 237, p. 241-249, 2002.

ORLOVIUS K. IPI **Bulletin 16**: Oilseed Rape. 2003. Available at: <http://www.ipipotash.org/en/publications/detail.php?i=58>. Accessed 15 September 2012. 13. Kris-Eth.

OTTY, G. SINGH, M. KAZZAZ, J. et al., A cationic sub-micron emulsion (MF59 /DOTAP) is an effective delivery system for DNA vaccines. **Journal of Controlled Release**, v.79, p. 1–5. 2002.

PADULA, C.; NICOLI, S.; SANTI P. Innovative formulations for the delivery of levothyroxine to the skin. **Int. J. Pharm.**, v.372, p.12-16 2009.

PAI SI, LIN YY, MACAES B, MENESHIAN A, HUNG CF, WU TC. Prospects of RNA interference therapy for cancer. **Gene Ther**;13:464–77, 2006.

PATIL, Y. PANYAM, J. Polymeric nanoparticles for siRNA delivery and gene silencing, **Int. J. Pharm.** V.367, p. 195–203. 2009.

PAUL, B.; MOULIK, S. P. Uses and applications of microemulsions. **Curr. Sci.**, .v. 80, n. 8, 2001.

PAVEL, F. M. Microemulsion polymerization. **Journal of dispersion science and technology**. V.25, p.1-16. 2004.

PAYS, K. GIEMANSKA-KAHNA, J., POULIGNYA, B., BIBETTEB, J. Understanding the stability and lifetime of emulsions. **Journal of Controlled Release**, v. 79, p. 193-205, 2002.

PEER, D., LIEBERMAN, J. Special delivery: targeted therapy with small RNAs. **Gene Therapy**. p. 1–7, 2011.

PEREIRA et al., Characterization of polyplexes involving small RNA. **Journal of Colloid and Interface Science**.v.387. p. 84-94, 2012.

PIMENTEL, L.F. JÁCOME JÚNIOR, A.T. MOSQUEIRA, V.C.F. MAGALHÃES, N.S.S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. vol. 43, n. 4, 2007.

POLIZELLI, M. A. **Estudo da Formação de Microemulsões em Misturas de Surfactante/Água/Óleos Vegetais e Interação Com Vitaminas e Sais**. São José do Rio Preto, UNESP, 2007, Doutorado.

POKHRIYAL N. K., SANGHVI P. G., SHAH D. O., DEVI S. Kinetics and behavior of copolymerization in emulsion and microemulsion systems. **Langmuir**. V.16, p.5864-5870. 2000.

PRISTA, L. NOGUEIRA; ALVES, A. CORREIA; MORGADO, RUI; LOBO, J. S. **Tecnologia Farmacêutica**. vol.II, 1402. 2012.

PRZYBYLSKI, R. Canola/Rapeseed Oil, in *Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses*. ed., **F. D. Gunstone**, Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 2011.

QIU Z., TEXTER J. Ionic liquids in microemulsions. **Colloid and Interface Science** 2007.

RADOMSKA ZB. Morphological relationships among 15 species of *Trifolium* occurring in Poland. **Genetic Resource and Crop Evolution**, 47:267-272, 2000.

RAGELLE, H. RIVA, R. VANDERMEULEN, G. NAEYE, B. POURCELLE, V. et al., Chitosan nanoparticles for siRNA delivery: Optimizing formulation to increase stability and efficiency. **Journal of Controlled Release**. V. 176, p. 54–63. 2014.

RAMON AL, BERTRAND JR, MALVY C. Delivery of small interfering RNA. A review and an example of application to a junction oncogene. **Tumorigenesis**. V.94(2), p.254–263. 2008.

RANJBAR, B. GILL, P. **Chem. Biol. Drug Des**. V.74. 2009.

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

RITPRAJAK, P., HASHIGUCHI, M., AZUMA, M. Topical application of cream-emulsified CD86 siRNA ameliorates allergic skin disease by targeting cutaneous dendritic cells, **Mol. Ther**. V.16, p. 1323–1330, 2008.

RODRIGUES, L.A. SILVA, M.L.C.P. **Estudo da adsorção de íons fosfato em matriz inorgânica**. **Cerâmica**, v.54, p.92-96, 2008.

RODRÍGUEZ-GONZÁLEZ, R. BALUJA, A. DEL RÍO, S. V. RODRÍGUEZ, A. RODRÍGUEZ, J. TABOADA, M. BREA, D. ÁLVAREZ, J. Effects of sevoflurane

postconditioning on cell death, inflammation and TLR expression in human endothelial cells exposed to LPS. **Journal of Translational Medicine**. V. 11, p. 87. 2013.

ROGERO, S.O.; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Teste *in vitro* de Citotoxicidade: Estudo Comparativo entre Duas Metodologias. **Materials Research**, v.6, p.3 – 31, 2003.

ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 263, p. 85-94, 2003.

ROSSETI, F.C. **Microemulsões como sistema de liberação cutânea para zinco ftalocianina tetrassulfonada na terapia fotodinâmica do câncer de pele**. 104p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

ROSSI, J.J. Receptor-targeted siRNA. **Nature Biotechnology**, v. 23, n, 6, p. 682-684, 2005.

ROSSI, C.G.F.T., DANTAS, T.N.C., DANTAS NETO, A.A., MACIEL, M.A.M. **MICROEMULSÕES: Uma Abordagem Básica e Perspectivas para Aplicabilidade Industrial**. Rev. Univ. Rural. Sér. Ci. Exatas e da Terra, Seropédica, RJ, EDUR, v. 26, p. 45-66, 2007.

SAHOO P. K., SAMAL B., SWAIN S. K. Cobalt(III)-mediated microemulsion polymerization of acrylonitrile: kinetics and particle morphology. **Applied Polymer Science**. V.91, p. 3120-3126. 2004.

SAIJA, A. et.al. Influence of different penetration on *in vitro* skin permeation and *in vivo* photoprotective effect of flavonoids. **Int. J. Pharm.** v.175, p. 85–94., 1998.

SANTIS, A.K. **Formas farmacêuticas semi-sólidas de uso tópico contendo nifedipina: desenvolvimento galênico e avaliação biofarmacotécnica**. Rio de Janeiro: UFRJ, Faculdade de Farmácia, 2008.

SANTOS, R.F.A. **Emulsões múltiplas: formação, caracterização, estabilidade e aplicações**. Universidade Fernando Pessoa. Faculdade de Ciências da Saúde. Porto, 2011.

SANTOS, E.P., BARBOZA, J.C.S. Avaliação do uso de amidos aniônicos hidrolisados como estabilizantes em nanocápsulas poliméricas para formulações tópicas. **Polímeros**, vol. 23, n. 5, p. 624-629, 2013.

SARAIVA L, ANDRADE FILHO JD, FALCÃO AL, CARVALHO DAA, MARGONARI CS, FREITAS CR, LOPES CRG, MORENO EC, MELO MN. Phlebotominae fauna (Diptera: Psychodidae) in an urban district of Belo Horizonte, Brazil, endemic for visceral leishmaniasis: characterization of favored locations as determined by spatial analysis. **Acta Trop** 117: 137-145. 2011

SAULNIER, P.; ANTON, N.; HEURTAULT, B., BENOIT, J. Liquid crystals and emulsions in the formulation of drug carriers. **C. R. Chimie.**, v. 11, p. 221-228, 2008.

SCHRAMM, G. **Reologia e Reometria: Fundamentos Teóricos e Práticos**. Editora Artliber, 2ª Edição, 2006.

SCHROEDER, A., LEVINS, C.G., CORTEZ, C., LANGER, R., ANDERSON, D.G. Lipid-based nanotherapeutics for siRNA delivery. **J. Intern. Med.** V.267, n.1, p. 9-21, 2010.

SCHULMAN, J.H.; STOECKENIUS, W.; PRINCE, L.M. Mechanism of formation and structure of micro emulsions by electron microscopy. **The Journal of Physical Chemistry**, v.63, n.10, p.1677-1680, 1959.

SCOTTI, L.; VELASCO M. V. R. Envelhecimento cutâneo à luz da cosmetologia. São Paulo: **Tecnopress**, p. 12-108. 2003.

SHIM MS., KWON YJ. Acid-responsive linear polyethylenimine for efficient, specific, and biocompatible siRNA delivery. **Bioconjug Chem** v.20, 488–499. 2008.

SIDDIG, M. A.; RADIMAN, S.; JAN, L. S.; MUNIANDY, S. V. Rheological behaviours of the hexagonal and lamellar phases of glucohone (APG) surfactant. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical Eng. Aspects**, v. 276, p. 15-21, 2006.

SIFUENTES-ROMERO, I., MILTON, S.L., GARCÍA-CASCA, 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.

SINGH, M. 'Targeted gene transfer to mammalian systems using liposome constructs containing cholesterol components with or without biotinylated molecular accessories'. Tese de mestrado. University of KwaZulu Natal, Westville Campus. 2005.

SILVA, ACM. **Microemulsões aplicadas ao tratamento de óleos isolantes**. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2006.

SILVA, J. A. et al. Estudo de liberação e permeação *in vitro* do diclofenaco de dietilamônio em microemulsão gel-like. **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1389-1393, 2009.

SILVA, S. S. **Análise dos processos de flotação e oxidação avançada para o tratamento de efluente modelo da indústria do petróleo**. Natal, 2010.

SILVA, G.B.R.F.; SCARPA, M.V.; ROSSANEZI, G.; EGITO, E.S.T.; OLIVEIRA, A. Development and characterization of biocompatible isotropic and anisotropic oil-in-water colloidal dispersions as a new delivery system for methyl dihydrojasmonate antitumor drug. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 867–876, 2014.

SINTOV, A.C.; SHAPIRO, L. New microemulsion vehicle facilitates percutaneous penetration *in vitro* and cutaneous drug bioavailability *in vivo*. **J. Control. Release**, .95, n.2, p.173-183, 2004.

SINTOV, A.C., LEY, H.V., BOTNER, S. Systemic delivery of insulin via the nasal route using a new microemulsion system: *In vitro* and *in vivo* studies. **Journal of Controlled Release**, v.148, p.168–176, 2010.

SHARGEL, L. YU, A.B.C. Biopharmaceutic consideration in drug product design. In: Applied Biopharmaceutics & Pharmacokinetics. Stamford: **Appleton and Lange**, 1999, p. 99-128.

SHARMA, G.; WILSON, K.; VAN DERWALLE, C.F.; SATTAR, N.; PETRIE, J.R.; KUMAR, R.M.N. Ravi Kumar. Microemulsions for oral delivery of insulin: design, development and evaluation in streptozotocin induced diabetic rats, **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.76, p.159-69, 2010.

SIROTTI, C.; COCEANI, N.; COLOMBO, I.; LAPASIN, R.; GRAS, M. Modeling of drug release from microemulsions: a peculiar case. **J. Membrana Sci.**, v. 204, p. 401-412, 2002.

SÖDERGREN E, GUSTAFSSON IB, BASU S, et al. A diet containing rapeseed oil-based fats does not increase lipid peroxidation in humans when compared to a diet rich in saturated fatty acids. **Eur J Clin Nutr**. V.55, p.922–931. 2001.

SOENEN, S.J.; DE CUYPER, M. Assessing cytotoxicity of (iron oxide-based) nanoparticles: an overview of different methods exemplified with cationic magnetoliposomes. **Contrast Media & Molecular Imaging**, v.4, p.207 - 219, 2009.

SOLÈ, I.; SOLANS, C.; MAESTRO, A.; GONZÁLEZ, C.; GUTIÉRREZ, J.M. Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v.376, p.133–39, 2012.

SONG YK, KIM CK. Topical delivery of low-molecular-weight heparin with surface-charged flexible liposomes. **Biomaterials**. V.27, p. 271, 2006.

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

SWAMI, Y. A. PATHAK, A. AGGARWAL, R.K. KURUPATI, S. PATNAIK, A. SINGH, P. KUMAR, S.P. VYAS, K.C. **Gupta, Pharm. Res.** 24. 2007.

TADROS T.F. In: Applied Surfactants Principles and Applications, **WileyVCH**, Berkshire, United Kingdom. 2005.

TAKANASHI, M., OIKAWA, K., SUDO, K. Therapeutic silencing of an endogenous gene by siRNA cream in an arthritis model mouse. **Gene Therapy** v. 16, p. 982–989, 2009.

TAKESHITA, F., MINAKUCHI, Y., NAGAHARA, S. et al. Efficient delivery of small interfering RNA to bone-metastatic tumors by using atelocollagen *in vivo*. **Proc Natl Acad Sci USA**; 102: 12177–82, 2005.

TAN WB, JIANG S, ZHANG Y. Quantum-dot based nanoparticles for targeted silencing of HER2/neu gene via RNA interference. **Biomaterials**;28:1565–71, 2007.

TANG, M. X., AND F. C. SZOKA. The influence of polymer structure on the interactions of cationic polymers with DNA and morphology of the resulting complexes. **Gene Ther.** 4:823–832. 1997.

TAO, S.L.; DESAI, T.A. Microfabricated drug delivery systems: from particles to pores. **Adv. Drug Del. Rev.**, Arlington, v.55, p.315-328, 2003.

TAUER K., RAMÍREZ A. G., LÓPEZ R. G. Effect of the surfactant concentration on the kinetics of oil in water microemulsion polymerization: a case study with butyl acrylate. **C. R. Chimie**;6:1245-1266. 2003.

TEIXEIRA, H.; DUBERNET, C.; CHACUN, H.; RABINOVICK, L.; BOUTET, T.; DEVERRE, J.R.; BENITA, S.; COUVREUR, P. Cationic emulsions improves the delivery of oligonucleotides to leukemic P388/ADR cells in ascite. *Journal of controlled release*, vol. 89, p. 473-482, 2003.

THOMAS, M. LU, J.J. GE, Q. ZHANG, C. CHEN, A.M. KLIBANOV, J. Full deacylation of polyethylenimine dramatically boosts its gene delivery efficiency and specificity to mouse lung, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. V. 102 (16),p. 5679– 5684. 2005.

TRAN, M.A., GOWDA, R., SHARMA, A., PARK, E.J., ADAIR, J., KESTER, M., SMITH, N.B., ROBERTSON, G.P. Targeting V600EB-Raf and Akt3 using nanoliposomal-small interfering RNA inhibits cutaneous melanocytic lesion development. **Cancer Res**. V. 68(18), p. 7638-49, 2008.

TROTTA, M.; PATTARINO, F.; IGNONO, T. Stability of Drug carrier emulsions containing phosphatidyl choline mixtures. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v.53, p. 203-208, 2002.

TSENG, Y. MOZUMDAR, S. HUANG, L. Lipid-based systemic delivery of siRNA. **Adv Drug Deliv Rev**, v.61, p. 721-731, 2009.

TOKATLIAN, T, SHRUM CT ,KADOYA WM, SEGURA, T, “Protease Degradable Tethers for Controlled and Cell-Mediated Release of Nanoparticles in 2- and 3-Dimensions”. **Biomaterials**. V. 31, p. 8072-8080, 2010.

TONZAR, A.C. Medições de viscosidade e reologia em cosméticos. **Cosmet. Toiletries**, v.18, n.3, p.56-58, 2006.

VALENTE, M.V. **Polimerização de PMMA em microemulsão com Lis tensioactivos**. Universidade de Aveiro. Departamento de Química. Tese de mestrado. 2008.

VANDAMME, TH. F. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. **Progress in Retinal and Eye Research**, 21: 15, 2002.

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

VERISSIMO, L. M., LIMA, L. F. et al. Pharmaceutical emulsions: a new approach for gene therapy. **J Drug Target**, v.18, n.5, Jun, p.333-42. 2010.

VERMA, R.K.; GARG, S. Current status of drug delivery technologies and future directions. **Pharmac. Technol.**, v.25, n.2, p.1-4, 2001.

VERMA, I. M., WEIRZMAN, M. D. GENE THERAPY: Twenty-First Century Medicine. **Annu. Rev. Biochem.** V. 74, p. 711–38, 2005.

VICENTINI, F. T. M. C. **Efeito fotoquimioprotetor de quercetina incorporada em microemulsão contra os danos na pele causados pela radiação ultravioleta.** 2009. 56 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2009.

VICENTINI, F. T. M. C., DEPIERI, L.V., POLIZELLO, A.C.M., CIAMPO, J.O.D., SPADARO, A.C.C., FANTINI, M.C.A., BENTLEY, M.V.L.B. Liquid crystalline phase nanodispersions enable skin delivery of siRNA. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, V.83, p. 16–24, 2013.

VOGEL, F. C., **Modelagem Matemática da Polimerização em Miniemulsão utilizando Iniciador Hidrossolúvel e Organo-Solúvel.** Santa Catarina: Universidade Federal de Santa Catarina. 101p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia Química). 2007.

WASUNGU, L. E D. HOEKSTRA. Cationic lipids, lipoplexes and intracellular delivery of genes. **J Control Release**, v.116, n.2, Nov 28, p.255-64. 2006.

WELIN-BERGER, K. **Formulations, Release and Skin Penetration of Topical Anesthetics.** Acta Universitatis Upsaliensis. Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Pharmacy 258. 53 pp. Uppsala. 2001.

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.

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

WU, S. MICKLEY, L.J. JACOB, D.J. RIND, D. STREETS, D.G. Effects of 2000–2050 changes in climate and emissions on global tropospheric ozone and the policy-relevant background surface ozone in the United States. **Journal Of Geophysical Research**, v. 113. 2008.

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 (2),p. 242–253, 2009.

YAN, F., TEXTER, J. Capturing nanoscopic length scales and structures by polymerization in microemulsions. **Soft Matter**;2:109-118. 2006.

YANG, A.; CARDONA, D.L.; BARILE, F.A. Subacute cytotoxicity testing with cultured human lung cells. **Toxicology in vitro**, v.16, p.33–39, 2002.

YANG, Z. COUTINHO, D. YANG, D.J BALKUS, K.J. FERRARIS A.J. Proton Conducting a Membranes based on HTFSI doped PEI/SiO₂ Nanocomposites. **Membr. Sci**, 313(1-2), 91-96. 2008.

YI, S. W. YUNE, T.Y. et al., A cationic lipid emulsion/DNA complex as a physically stable and serum-resistant gene delivery system. **Pharmaceutical Research**, v.17, n.3, p. 314-320. 2000.

YU D, PENG P, DHARAP Set al. Antitumor activity of poly(ethylene glycol)-camptothecin conjugate: the inhibition of tumor growth *in vivo*. **J Control Release**;110:90–102, 2005.

ZANIN, S.M.W.; MIGUEL, M.D.; CHIMELLI, M.C.; OLIVEIRA, A.B. Determinação do equilíbrio hidrófilo-lipófilo (EHL) de óleos de origem vegetal. **Vis. Acad.**, v.3; p.13-18, 2002.

ZHOU, Z., QIU, J., LIU, W., ZHOU, Y., PLOCINIK, R.M., LI, H., HU, Q., GHOSH, G., ADAMS, J.A., ROSENFELD, M.G., FU, X-D. The Akt-SRPK-SR axis constitutes a major

pathway in transducing EGF signaling to regulate alternative splicing in the nucleus. **Mol Cell**, v. 47, p. 422-433, 2012.

ZHANG, S., XU, Y., WUANG, B., QIAO, W., LIU, D., LI, Z. Cationic compounds used in lipoplexes and polyplexes for gene delivery. **Journal of Controlled Release** v.100, p. 165 – 180. 2004.

ZHANG, Y.-C., W.B. ROSSOW, AND P.W. Comparison of different global information sources used in surface radiative flux calculation: Radiative properties of the near-surface atmosphere. **J. Geophys. Res.**, 111. 2006.

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.

ZHANG W, TANG Y. J. A novel three-stage light irradiation strategy in the submerged fermentation of medicinal mushroom *Ganoderma lucidum* for the efficient production of ganoderic acid and *Ganoderma* polysaccharides. **Biotechnol Prog**; v.24, p.1249–61. 2008.

ZHANG, D.Y. TENG, Z.M. WU ET AL. E.D. “PEG-grafted chitosan nanoparticles as an injectable carrier for sustained protein release,” **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, vol. 19, no. 12, pp. 3525–3533, 2008.

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, 2010.

ZHANG, Q., LI, P., ROBERTS, M. S. Maximum transepidermal flux for similar size phenolic compounds is enhanced by solvent uptake into the skin. **J. Control. Release**, 154(1), 50– 57, 2011.

ZHANG H, et al. RNAi-Directed Downregulation of Vacuolar H(+)- ATPase Subunit a Results in Enhanced Stomatal Aperture and Density in Rice. **J. Control. Release**, 2013.

ZINTCHENKO, A. PHILIPP, A. DEHSHAHRI, E. WAGNER, Simple modifications of branched PEI lead to highly efficient siRNA carriers with low toxicity, **Bioconjug. Chem.** (2008).