



UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
CURSO DE FARMÁCIA

GISELE LINS MONTEIRO ALVARES

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MICROEMULSIONADO PARA
TRANSFEÇÃO DE RNA INTERFERENTE**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Campina Grande

2014

GISELE LINS MONTEIRO ALVARES

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MICROEMULSIONADO PARA
TRANSFEÇÃO DE RNA INTERFERENTE**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação de
Farmácia da Universidade Estadual da
Paraíba, em cumprimento à exigência
para obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia.

Orientadora: Prof^a Dr^a Karina Lidianne
Alcântara Saraiva
Departamento de Biologia - UEPB

Campina Grande, 2014

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.

A473d Alvares, Gisele Lins Monteiro

Desenvolvimento de sistema microemulsionado para transfeção de RNA interferente [manuscrito] / Gisele Lins Monteiro Alvares. - 2014.

49 p. : il. color.

Digitado.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2014.

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

1. Microemulsão. 2. Interferência por RNA. 3. Metaloproteinase. 4. Fotoenvelhecimento. I. Título.

21. ed. CDD 615.82

GISELE LINS MONTEIRO ALVARES

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMA MICROEMULSIONADO PARA
TRANSFEÇÃO DE RNA INTERFERENTE**

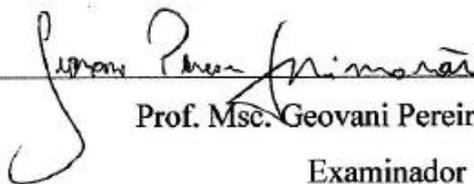
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação de
Farmácia da Universidade Estadual da
Paraíba, em cumprimento à exigência
para obtenção do grau de Bacharel em
Farmácia.

Aprovada em: 21/02/2014



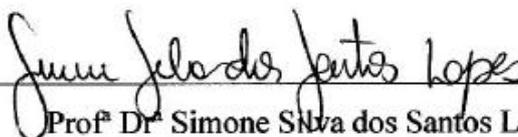
Profª Drª Karina Lidiane Alcântara Saraiva/UEPB

Orientador



Prof. Msc. Geovani Pereira Guimarães

Examinador



Profª Drª Simone Silva dos Santos Lopes

Examinador

Eternamente aos meus pais e minha irmã,
fonte inesgotável de amor em minha vida.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por TUDO que é me proporcionado, pela esperança e fé, pelas pessoas incríveis presentes em minha vida, por sua luz sempre abrindo meus caminhos, pelas oportunidades ofertadas para prosseguir no trabalho e na missão de minha vida.

A minha querida orientadora, Karina Saraiva, agradeço pela paciência, compreensão, confiança, amizade, exemplo como professora, pesquisadora e ser humano, fonte de inspiração e incentivo, responsável por grandes contribuições, observações e ensinamentos ao longo deste trabalho, de valor imensurável para o desenvolvimento de minha formação e evolução pessoal na pesquisa acadêmica.

Aos parceiros e amigos do Laboratório de Desenvolvimento de Produtos Farmacêuticos (LDCPF), especialmente Jamilly, Geovani, Airlla, Danielle Rocha, Danielle Mendes, Alessandra, Yargo, Geilza e Rosalina, agradeço pela cooperação, importantes contribuições, palavras de incentivo, apoio, trabalho em equipe, solidariedade, conselhos, pela experiência e por terem tornado meu trabalho possível e mais prazeroso.

Ao Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE), por disponibilizar sua infraestrutura, tornando viável a realização de algumas técnicas ausentes na nossa instituição.

Aos meus professores de graduação e todos os amigos de curso, pelas experiências, convivências, sonhos e expectativas compartilhadas, palavras de apoio, amizades que levarei por toda a vida. Em especial Joanda, Tâmires, Cleildo, Lianne, Karla Monik, Monique, Saniele e Diogo, amigos que se mantiveram firmes em momentos de apreensão e dificuldades, que foram capazes de me proporcionar momentos incríveis e que guardarei eternamente em meu coração.

A minha mãe, Leda, por sua força, exemplo, fé, amor incondicional, fonte de luz e paz em minha vida, responsável por quem sou e por todas as minhas vitórias, por ter me erguido com suas palavras de amor todas as vezes que me senti cansada, abalada e incapaz, por ser dona do abraço mais reconfortante e carinhoso, por me ter presenteado com Leila, irmã caçula carinhosa e querida. É impossível pensar em vocês duas sem me emocionar, sem querer ser uma pessoa melhor, sem sonhar com um futuro bom para nós.

Ao meu pai, Gilberto, responsável por meus maiores aprendizados, por me incentivar sempre em minha busca, por sempre compartilhar comigo suas palavras de sabedoria, reflexões e exemplos, por seu amor, amizade e carinho, pelo conforto e paz transmitidos por sua presença em minha vida.

A minha tia Bia (*in memoriam*) e demais familiares, tios, avós e primos, que influenciaram fortemente em meu crescimento e formação, além de depositarem esperanças, amor, confiança e amizade.

Ao meu namorado, Rafael, por sua paciência e palavras de apoio diante dos desafios enfrentados neste último ano, por seu carinho e companheirismo, imprescindíveis para o desenvolvimento final desse trabalho.

Aos demais amigos e companheiros de jornada, não podendo esquecer Andréia, Joelma, Ana Cláudia, Juliana e Vania, cuja amizade e confiança depositadas ultrapassam anos e distâncias, favorecendo-me sempre com a cumplicidade e compreensão ante aos desafios.

Finalmente, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização e obtenção deste trabalho.

RESUMO

Interferência por RNA (RNAi) é um mecanismo natural de silenciamento de genes conservados em células de plantas e animais. É uma ferramenta versátil com aplicações desde a genética reversa até o mapeamento de alvos para drogas e, além disso, tem se tornado um assunto de grande interesse devido ao seu potencial terapêutico para uma variedade de doenças, incluindo as malignas, as infecciosas e as autoimunes, pela supressão de sequências gênicas específicas. Aplicações cutâneas de pequenos RNAs regulatórios (siRNA) estão emergindo devido à grande demanda de tratamentos efetivos para várias desordens na pele. Este órgão é uma importante rota para transporte de drogas por ser facilmente acessível e permitir tratamento local e confinado, com acesso direto às células-alvo e menor absorção sistêmica das moléculas de siRNA. A terapia com RNAi requer um veículo para o transporte *in vivo*, devido à fragilidade das moléculas de siRNA quando em contato com as variações do meio e as enzimas de degradação. Por isso a importância de sistemas nanocarreadores, que além de fornecer um mecanismo de liberação controlada, facilita a passagem do siRNA intacto através da pele. As microemulsões são capazes de aumentar a permeação cutânea, pela habilidade de interagir com os lipídeos da pele, e a eficácia terapêutica de diversos fármacos, com redução da dose administrada e dos potenciais efeitos adversos. Até o momento, não existem estudos sobre o encapsulamento de siRNA em sistemas microemulsionados para terapia cutânea do fotoenvelhecimento. Dessa forma, o presente trabalho formulou e caracterizou microemulsões como veículo de siRNA específico para uma metaloproteinase de matriz (MMP) para futura aplicação tópica como um nanocosmético. Um diagrama de fases pseudoternário (DFPT) foi obtido utilizando uma fase aquosa de propilenoglicol (PPG) e água (A), Span 80 e Tween 80 como o sistema tensoativo/cotensoativo e o óleo de canola como fase oleosa (O). Após obtenção da região de microemulsão (ME), o polímero catiônico polietilenoimina (PEI) 5% foi incorporado ao sistema selecionado, em sua fase aquosa, sendo este comumente utilizado em aplicações de transporte de genes. As ME foram avaliadas quanto ao pH, condutividade, índice de Refração (IR), microscopia eletrônica de transmissão (MET), calorimetria exploratória diferencial (DSC) e estabilidade, evidenciando ser um sistema do tipo A/O. Ademais, o potencial de encapsulação do siRNA foi determinado por eletroforese em gel de agarose. As microemulsões catiônicas podem ser úteis para encapsulação de moléculas carregadas negativamente, aumentando a permeação e liberação cutânea. Esta proposta fornecerá uma nova estratégia de prevenção do fotoenvelhecimento, com o desenvolvimento de um produto com alto valor biotecnológico.

PALAVRAS-CHAVE: Microemulsão, Interferência por RNA, Metaloproteinase, Fotoenvelhecimento.

ABSTRACT

RNA interference (RNAi) is a natural silencing mechanism of genes conserved in plant and animal cells. It is a versatile tool with applications ranging from reverse genetics to mapping of targets for drugs, moreover, it has become a matter of great interest because of its therapeutic potential for a variety of diseases, including malignant, infectious or autoimmune, by suppression of specific gene sequences. Cutaneous applications of small regulatory RNAs (siRNA) are emerging due to the great demand for effective treatments for various skin disorders. This organ is an important route for transporting drugs, once it is easily accessible and allow confined and local treatment, with direct access to the target cells and lower systemic uptake of siRNA molecules. RNAi therapy requires a vehicle to transport *in vivo*, due to the fragility of siRNA molecules when in contact with the variations of the environment and degrading enzymes. Hence the importance of nanocarriers systems, which in addition to provide a controlled-release mechanism facilitates the passage of intact siRNA through the skin. Microemulsions are able to increase skin permeation, by the ability to interact with lipids of the skin, and therapeutic efficacy of various drugs, with reduced dose and potential adverse effects. So far, there are no studies on the encapsulation of siRNA in microemulsion systems for topical treatment of photoaging. Therefore, this study formulated and characterized microemulsions as a vehicle for specific siRNA for a matrix metalloproteinase (MMP) for future topical application as a nanocosmetic. A pseudoternary phase diagram was obtained using an aqueous phase of propyleneglycol (PPG) and water (A), Span 80 and Tween 80 as the surfactant/cosurfactant system and canola oil as the oil phase (O). After getting the region of microemulsion (ME), the cationic polymer polyethyleneimine (PEI) 5% was incorporated into the selected system, in its aqueous phase, which is commonly used in gene transport applications. The MEs were evaluated for pH, conductivity, refractive index (IR), electron microscopy and stability, demonstrating to be a system of type W/O. Furthermore, the siRNA-encapsulating potential was determined by agarose gel electrophoresis. The cationic microemulsions can be useful for encapsulation of negatively charged molecules, enhancing skin permeation and release. This proposal will provide a new strategy for the prevention of photoaging, with the development of a product with high biotechnological value.

KEYWORDS: Microemulsion, RNA interference, Metalloproteinase, Photoaging.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Caracterização físico-química das MEs	38
TABELA 2 – Avaliação físico-química das MEs em teste de estresse térmico	42

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Representação esquemática da estrutura da pele	18
FIGURA 2 – Representação dos danos provocados pela irradiação UV na pele.....	20
FIGURA 3 – Nanocarreadores para incorporação de siRNA.....	23
FIGURA 4 – Mecanismo de nanocarreadores estudados para siRNA.....	25
FIGURA 5 – Estrutura molecular do polímero catiônico PEI.....	26
FIGURA 6 – Estruturas de MEs.....	27
FIGURA 7 – Classificação de Winsor.....	29
FIGURA 8 – Representação esquemática da obtenção do DFPT	30
FIGURA 9 – Determinação da concentração ideal de PEI nas MEs.....	31
FIGURA 10 – Diagrama de fases pseudoternário	35
FIGURA 11 – Aspecto macroscópico das microemulsões.....	36
FIGURA 12 – Ultraestrutura da ME sem PEI	37
FIGURA 13 – Ultraestrutura da ME com PEI 5%	37
FIGURA 14 – Curvas do termograma.....	40
FIGURA 15 – Eficiência da encapsulação de siRNA em MEs.....	41

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μm	Micrômetro
API	<i>Activator Protein 1</i>
ATP	Adenosina Trifosfato
CPP	Empacotamento Crítico
DFPT	Diagrama de Fases Pseudoternario
DGCR8	<i>DiGeorge Syndrome Critical Region 8 Protein</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DSC	Calorimetria Exploratória Diferencial
dsRNA	<i>Double-Stranded RNA</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine Tetraacetil Acid</i>
EHL	Equilíbrio Hidrófilo-Lipofílico
ELL	Emulsão Líquida Leitosa
ELO	Emulsão Líquida Opaca
ERK	<i>Extracelular Signal-Regulated Kinase</i>
ESS	Emulsão Semissólida
IR	Índice de refração
kDa	Kilodalton
Kv	Kilovolt
ME	Microemulsão
MEC	Matriz Extracelular
MEM	Meio Mínimo Essencial
MEK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway</i>
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
miRNA	<i>MicroRNA</i>
mM	Milimol
MMP	Metaloproteinase de matriz
RNA _m	RNA Mensageiro
PEI	Polietilenoimina
pH	Potencial Hidrogeniônico
pKa	Constante de Dissociação Ácida
PPG	Propilenoglicol
Pre-miRNA	Micro RNA Precursor
PTGS	<i>Post Transcription Gene Silencing</i>
RISC	<i>RNA Induced Silencing Complex</i>
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAi	RNA Interferente
RNAses	Ribonuclease
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
RPM	Rotação por Minuto
rRNA	RNA Ribossomal
shRNA	<i>Short Hairpin RNA</i>
siRNA	<i>Small Interfering RNA</i>
tRNA	RNA transportador
UVA	Ultra Violeta Age
UVB	Ultra Violeta <i>Burn</i>
UV	Ultra Violeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3 REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1 FOTOENVELHECIMENTO CUTÂNEO	18
3.2 INTERFERÊNCIA POR RNA	21
3.3 SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE GENES	24
3.4 MICROEMULSÕES	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 RNA INTERFERENTE.....	30
4.2 CONSTRUÇÃO DO DIAGRAMA DE FASES PSEUDOTERNÁRIO	30
4.3 AVALIAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO IDEAL DE PEI NA FORMULAÇÃO	31
4.4 INCORPORAÇÃO DE RNA INTERFERENTE.....	31
4.5 CARACTERIZAÇÃO DE SISTEMAS MICROEMULSIONADOS	31
4.5.1 Condutividade Elétrica.....	31
4.5.2 Determinação do pH.....	32
4.5.3 Índice de Refração	32
4.5.4 Calorimetria Exploratória Diferencial	32
4.5.5 Microscopia Eletrônica de Transmissão	32
4.5.6 Eficiência da Encapsulação.....	33
4.6 TESTES DE ESTABILIDADE	33
4.6.1 Testes de Centrifugação	33
4.6.2 Ciclo Congelamento/Descongelamento	33
4.6.3 Estresse Térmico	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 CONSTRUÇÃO DO DFPT	35
5.2 INCORPORAÇÃO DE PEI E siRNA	36
5.3 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS MICROEMULSIONADOS	36
5.3.1 Análise Ultraestrutural.....	36
5.3.2 Aspectos Físico-químicos.....	37
5.3.3 Análise Térmica	39
5.3.4 Eficiência da Encapsulação.....	41
5.4 ESTUDOS DE ESTABILIDADE	42
6 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44

1 INTRODUÇÃO

O presente estudo teve como finalidade o desenvolvimento de uma nova abordagem farmacêutica para liberação de pequenos RNAs regulatórios na pele com intenção de silenciar genes associados ao fotoenvelhecimento, inibindo a degradação de fibras dérmicas e formação de rugas. A escolha do tema ocorreu em virtude das potenciais propriedades da tecnologia de interferência por RNA em inibir de forma eficiente e seletiva qualquer transcrito de RNA, bem como pela fragilidade das sequências gênicas quando transportadas livres através da pele, sendo facilmente degradadas por RNAses do meio intra/extracelular. Por isso, estratégias de proteção devem ser aplicadas, tais como modificações químicas ou encapsulação em polímeros ou lipídeos. Além disso, o tema nunca foi explorado no âmbito dos cosméticos, com foco na nanomedicina do fotoenvelhecimento.

O envelhecimento é um processo multifatorial complexo que resulta em declínio funcional e mortalidade das células. Há principalmente dois tipos de envelhecimento: o intrínseco e o extrínseco. O primeiro é um processo incontrollável e está associado ao aumento da idade. O segundo ocorre devido a fatores ambientais como gravidade, temperatura, umidade, tabagismo e, principalmente, por exposição repetitiva ao sol (SCHARFFETTER–KOCHANNEK, 2000; SHAHA; MAHAJANB, 2013).

O fenótipo do fotoenvelhecimento é causado por alterações na função celular, incluindo alterações importantes na derme, através da degradação da matriz extracelular do tecido conjuntivo, que propicia suporte estrutural para a pele. Dessa forma, a exposição solar crônica induz a fragmentação e a desorganização da elastina e colágeno. A pele fotoenvelhecida apresenta perda de resistência e do tônus, aumento da rugosidade, secura e pigmentação irregular (SANTOS, 2011; SCHARFFETTER–KOCHANNEK, 2000; XU; FISHER, 2005). Além disso, a exposição à radiação ultravioleta (UV) causa deficiência no sistema antioxidante de proteção natural, fazendo com que os efeitos deletérios não sejam totalmente prevenidos, resultando em danos ao DNA e afetando as várias estruturas celulares. As espécies reativas de oxigênio (ROS) também podem desencadear uma série de cascatas de citocinas, que induzem a síntese das metaloproteinases de matriz responsáveis pela degradação do colágeno, levando à formação de rugas e disfunções dos melanócitos, entre outras alterações (HANSON; CLEGG, 2002; HALLIDAY, 2005; TOUITOU; GODIN, 2008).

As MMPs são uma família de endopeptidases dependentes de zinco capazes de degradar diversos componentes da matriz extracelular (MEC) da derme. O colágeno é o componente extracelular mais abundante, responsável pelas propriedades de extensibilidade. As collagenases são as únicas MMPs que hidrolisam as fibras de colágeno intactas. Entretanto, a MMP-1 merece destaque no processo de degradação das fibras de colágeno tipo I e III. O principal componente do tecido conectivo é o colágeno tipo I, que oferece elasticidade e consistência à matriz celular, enquanto o colágeno tipo III é menos abundante, formando uma rede conjunta com as fibras de colágeno tipo I (HO et al., 2005; VILELA, 2010; XU; FISHER, 2005).

Atualmente, o tratamento do fotoenvelhecimento está associado a procedimentos cirúrgicos, que apresentam riscos e não são preventivos, e tratamentos com drogas que incluem retinóides, protetores solares e antioxidantes (GRIFFITHS, 1999).

O processo de interferência por RNA é um mecanismo celular responsável pelo silenciamento gênico pós transcricional. Trata-se de um fenômeno que ocorre naturalmente nos organismos eucariotos e exerce importante papel na eliminação de RNAs mensageiros (mRNAs) indesejáveis, anômalos e na defesa do organismo contra parasitas moleculares. Além de ser um instrumento poderoso para análises genômicas, a inibição da expressão de proteínas através da tecnologia de interferência por RNA pode ser aplicável a todas as classes de alvos moleculares, inclusive aquelas difíceis de modular com as abordagens farmacêuticas tradicionais. Ensaios experimentais com camundongos expostos à radiação UVB mostraram que a injeção intradérmica *Small Interfering RNA* (siRNA) específico para P53 suprimiu a expressão do mRNA e proteínas codificadoras de citocinas, bem como fatores melanogênicos. Este bloqueio resultou na inibição da hiperpigmentação, comum no fotoenvelhecimento (ALMEIDA; REIS; CALIN, 2011; DEPIERI, 2012; LI et al., 2006; GEUSENS et al., 2009).

Contudo, a transfecção de siRNAs é dificultada em virtude do estrato córneo representar uma barreira para a permeação do ácido nucléico. Além disso, a terapia com siRNA é prejudicada devido a sua instabilidade, a entrada ineficiente na célula, e perfil farmacocinético pobre. Por apresentar uma alta carga negativa, os siRNAs podem ser associados à polímeros, lipídeos, proteínas ou peptídeos catiônicos, através de interações eletrostáticas. Um polímero catiônico que tem sido amplamente utilizado é a Polietilenoimina (PEI), que pode ser complexado aos siRNAs e facilitar a interação com as membranas celulares carregadas negativamente, aumentando a transfecção (GÜNTHER et al., 2011; VINCENTINI et al., 2013).

Como carreadores promissores, as microemulsões (MEs) são sistemas termodinamicamente estáveis e opticamente transparentes formados a partir da mistura de dois líquidos imiscíveis estabilizados por meio de um filme interfacial de tensoativos. Por sua composição, as ME interagem com o extrato córneo desestruturando sua bicamada lipídica. Assim, os lipídios passam de uma estrutura ordenada para uma forma desordenada, aumentando a permeabilidade cutânea e a penetração de substâncias que, normalmente, não passariam através dessa barreira (DAMASCENO et al., 2011; FANUN, 2010; HO; HSIAO; SHEU, 1996; OLIVEIRA et al., 2004; SILVA et al., 2009).

O presente estudo, inovador, apoia a hipótese de tratamento e rejuvenescimento da pele através das tecnologias de sistemas microemulsionados e interferência por RNA, buscando a inibição eficiente e seletiva de uma proteína envolvida na degradação de fibras dérmicas. O sucesso desta metodologia será de grande interesse para as indústrias farmacêuticas e/ou de cosméticos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Formular sistema microemulsionado contendo siRNA para transfecção em células da pele.

2.2 Objetivos específicos.

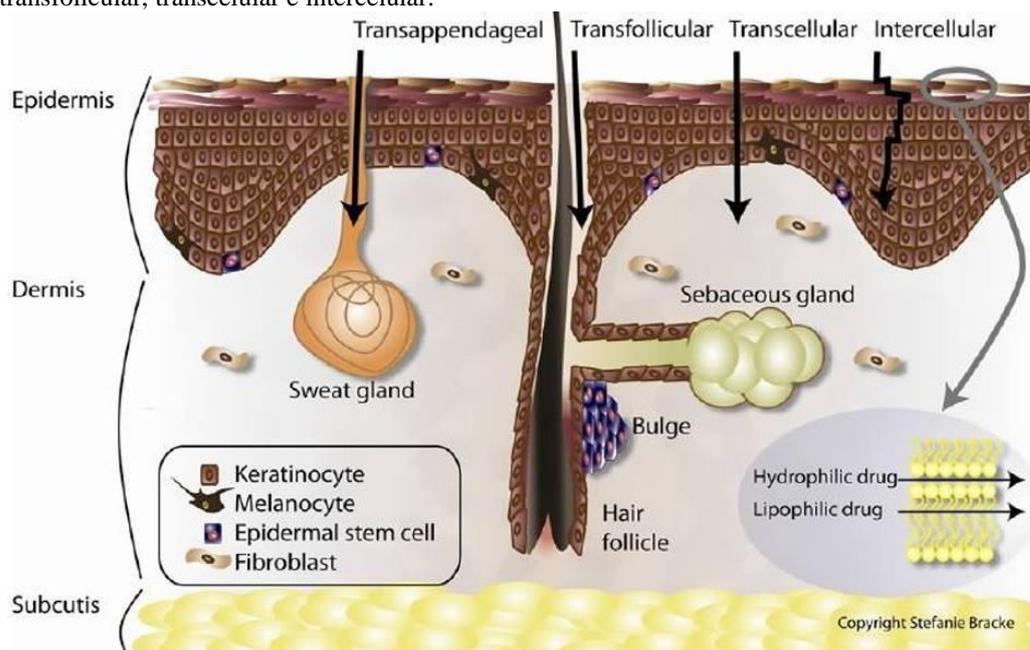
- Desenvolver um diagrama de fases pseudoternário para obtenção de sistema microemulsionado água/óleo;
- Avaliar a concentração ideal de polietilenoimina (PEI) na formulação;
- Selecionar o ponto de ME para incorporação de PEI e RNA interferente;
- Caracterizar as microemulsões em aspectos físico-químicos;
- Realizar ensaios de estabilidade física;
- Detectar o potencial de encapsulação de siRNA pela técnica de eletroforese.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Fotoenvelhecimento cutâneo

A pele é um órgão complexo formado por diferentes estruturas e células (Figura 1). Seu padrão histológico inclui as camadas da epiderme, derme e hipoderme. A primeira é um epitélio de revestimento firmemente aderido ao tecido conjuntivo subjacente, a derme, que lhe proporciona suporte. Abaixo da derme encontra-se a hipoderme, um tecido conjuntivo frouxo rico em gordura. A epiderme possui camadas de células diferenciadas, sendo a camada córnea (*stratum corneum*) a mais superficial, plana e repleta de queratina, principal barreira contra substâncias químicas e microrganismos. A camada granulosa (*stratum granulosum*) possui morfologia intermediária com grânulos de queratohialina e lamelares. A camada espinhosa (*stratum spinosum*) é composta por células de Malpighi unidas por processos citoplasmáticos. Ela repousa sobre a camada basal (*stratum basale*) composta por queratinócitos e células-tronco epidermais. A derme é formada pelas camadas papilar e reticular. A primeira, mais superficial, é delgada e formada por tecido conjuntivo frouxo, enquanto a segunda é constituída por tecido conjuntivo denso. Ambas possuem fibras de colágeno e elastina, que concedem força e elasticidade à pele (BARBOSA, 2011; GUARATINI; MEDEIROS; COLEPICOLO, 2007).

Figura 1 Representação esquemática da estrutura da pele. Corte transversal, ilustrando as principais células e anexos. As setas indicam as possíveis vias de penetração de drogas através de glândulas sudoríparas, transfollicular, transcelular e intercelular.



Fonte: Geusens et al (2011).

A exposição crônica da pele à radiação UV tem como consequências o fotoenvelhecimento e a fotocarcinogênese. As principais alterações clínicas-morfológicas da pele fotoagredida são: degradação do colágeno extracelular, diminuição da elasticidade, irregularidade de superfície, aspereza, despigmentação mosqueada provocada por melanócitos super estimulados, telangiectasias que surgem pelo alargamento de pequenos vasos e rugas finas ou ríides actínicas (DE SICA, 2009; MCCULLOUGH; KELLY, 2006).

Comprimentos de onda curtos de UVB (290-320 nm) penetram apenas na epiderme, enquanto comprimentos de onda mais longos de UVA, principalmente UVA1 (340-400 nm), penetram profundamente na pele e são os maiores responsáveis pelas mudanças clínicas do fotoenvelhecimento. Um dos efeitos primários dos danos oxidativos provocados pela radiação UVA é a síntese, induzida pelas ROS, de MMPs que causam a degradação do colágeno (SANTOS, 2011; SCHARFFETTER-KOCHANNEK, 2000).

As MMPs são secretadas como proenzimas e liberadas por neutrófilos, monócitos, macrófagos, fibroblastos e por células tumorais em resposta a diversos estímulos. Elas controlam a migração, proliferação e apoptose celular, regulam a expansão tumoral, a angiogênese, e são responsáveis por degradar componentes proteicos da MEC e das membranas basais. As MMPs degradam as macromoléculas da matriz, tais como o colágeno intersticial, laminina, proteoglicano e fibronectina. A família das MMPs inclui cerca de 25 proteínas, as quais podem ser divididas em: colagenases (MMP-1, 8 e 13), gelatinases (MMP-2 e 9), estromelinas (MMP-3, 7 e 10), matrilisinas (MMP-7 e 26), MMPs tipo membrana (MMP-14, 15, 16, 17 e 24) e outras que são classificadas pela sua estrutura e especificidade ao substrato (ARAÚJO et al., 2011; SOUNNI; NOEL, 2005; VILELA, 2010).

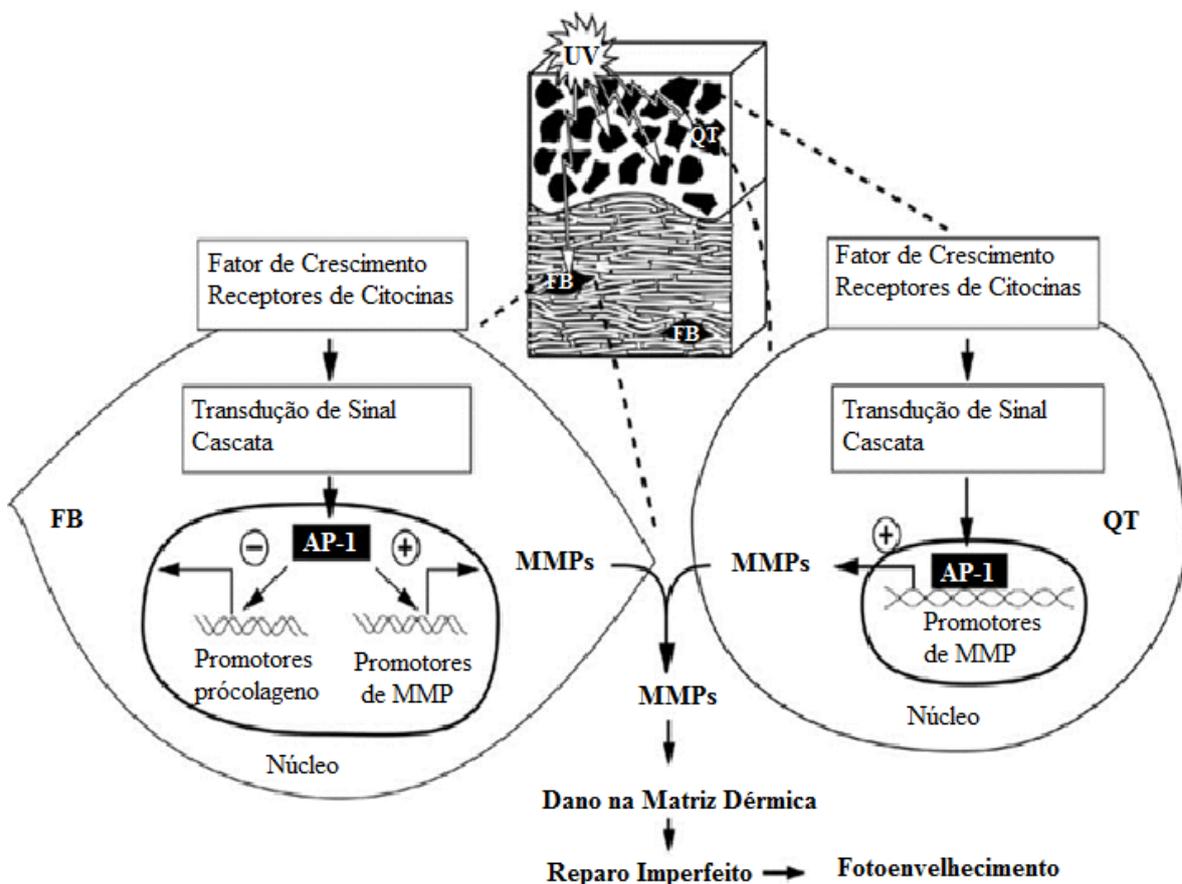
As MMPs podem influenciar o comportamento celular através de diferentes mecanismos, tais como clivagem de proteínas que promovem a adesão célula-célula, clivagem de moléculas presentes na superfície celular, ou mesmo a liberação de moléculas bioativas na superfície celular que transmitem sinais no ambiente extracelular. As MMPs são cruciais nos estágios da cicatrização, degradando os componentes da MEC, além de apresentarem habilidade para sintetizar colágeno e outros membros da matriz extracelular (ARAÚJO et al., 2011; NAVARRO et al., 2006; SOUNNI; NOEL, 2005; VILELA, 2010).

O colágeno contribui com 80% do peso seco da pele sendo, portanto, o componente extracelular mais abundante, responsável pelas propriedades de extensibilidade. Quatro MMPs merecem destaque na degradação extracelular da pele: a colagenase MMP-1, as gelatinases MMP-2 (92 kDa) e MMP-9 (72 kDa) e a estromelina-1 (MMP-3). Em conjunto, essas MMPs podem degradar o colágeno da pele completamente e as principais proteínas

estruturais, que compõem a derme. Entretanto, as únicas as únicas MMPs capazes de hidrolisar as fibras de colágeno intactas são as colagenases. (HO et al., 2005; XU; FISHER, 2005).

A radiação UV estimula o fator de crescimento e receptores de citocinas presentes na superfície de fibroblastos e queratinócitos. Os receptores ativados, por sua vez, estimulam as cascatas de transdução do sinal, induzindo a transcrição do fator AP-1, que estimula a transcrição do grupo de genes de MMP que se localizam no cromossomo 11q22.3. O reparo imperfeito dos danos causados na derme danifica a integridade funcional e estrutural da MEC. A exposição repetida ao sol causa um acúmulo dos danos que resulta em uma pele fotoenvelhecida (FISHER et al., 2002) (Figura 2).

Figura 2 Representação dos danos provocados pela irradiação UV na pele. A exposição aos raios UV ativa receptores de fator de crescimento e citocinas na superfície de queratinócitos (QT) e fibroblastos (FB). Estes receptores estimulam cascatas de transdução de sinais que induzem o fator de transcrição AP-1, o qual estimula a transcrição de genes de MMPs. Em fibroblastos, o AP-1 inibe a expressão do gene do procolágeno. As MMPs secretadas por QT e FB degradam o colágeno e outras proteínas que constituem a matriz dérmica. O reparo imperfeito do dano compromete a integridade funcional e estrutural da matriz, resultando no fotoenvelhecimento da pele.



Fonte: adaptado de Fisher et al. (2002).

O tratamento do fotoenvelhecimento está associado a procedimentos cirúrgicos e farmacêuticos. Os primeiros incluem *facelifts*, dermoabrasão, *laser resurfacing*, toxina botulínica, injeção de colágeno e *peeling* químico. Estes produzem melhorias, mas apresentam riscos e não são preventivos. O tratamento a base de medicamentos é um campo em crescimento, entretanto, a eficácia de muitas abordagens farmacêuticas é restrita. O tratamento com drogas incluem retinóides, protetores solares e antioxidantes (GRIFFITHS, 1999). Atualmente, existe uma busca por novas alternativas aos tratamentos usuais, através da utilização de novos compostos e/ou procedimentos para amenizar os efeitos da radiação UV na pele.

3.2 Interferência por RNA

A terapia gênica consiste em um procedimento que envolve a introdução de material genético dentro da célula, com objetivo de suprimir, introduzir, manipular e substituir genes para o tratamento de diversas doenças humanas. Atualmente, um mecanismo inovador de intervenção terapêutica foi estabelecido com a descoberta das tecnologias *antisense*, através da aplicação de pequenas sequências denominadas oligonucleotídeos, que são complementares a uma sequência gênica específica e capaz de alterar sua expressão. Em teoria, este tipo de abordagem pode seletivamente silenciar qualquer produto do gene antes de ser traduzido (DEPIERI, 2012; SHUEY et al., 2002).

O processo de interferência por RNA é um mecanismo celular responsável pelo silenciamento gênico pós transcricional. Existem três tipos “clássicos” de RNA: mRNA, RNA transportador (tRNA) e RNA ribossomal (rRNA). Os mRNAs são traduzidos em proteínas, enquanto os tRNAs e rRNAs exercem funções de processamento do mRNA durante a tradução. Diferentemente, siRNAs não são traduzidos em proteínas. Em vez disso, essas sequências regulam vários processos biológicos por interferir na tradução do mRNA-alvo. Os primeiros microRNAs (miRNAs) descobertos, *Lin-4* e *Let-7*, foram identificados em *Caenorhabditis elegans*. Em seguida, siRNAs foram identificados em animais, plantas e fungos como moléculas efetoras que atuam como silenciadores gênicos sequência-específicos (ALMEIDA; REIS; CALIN, 2011; GROSSHANS; FILIPOWICZ, 2008).

Além de ser um instrumento poderoso para análises genômicas, a redução na expressão de proteínas através da RNAi pode trazer benefícios terapêuticos por ser aplicável a todas as classes de alvos moleculares, inclusive aqueles difíceis de modular seletivamente com as abordagens farmacêuticas tradicionais envolvendo pequenas moléculas e proteínas.

Neste âmbito, os siRNAs possuem propriedades marcantes por serem rapidamente projetados para uma inibição altamente específica, não necessitarem de um sistema de expressão celular, purificação de proteínas, além de possuírem alta eficiência catalítica, onde uma molécula de siRNA pode ser usada repetidas vezes para guiar a clivagem de muitas moléculas de mRNA-alvo (DEPIERI, 2012).

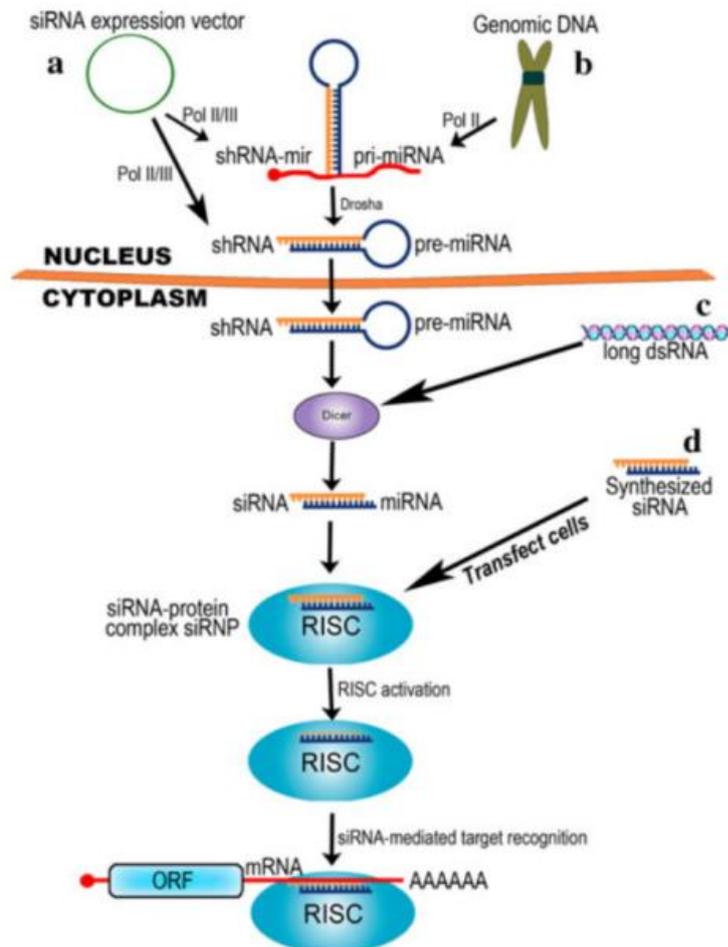
A interferência mediada por RNA é um fenômeno que ocorre praticamente em todas as células eucariotas, capaz de exercer um papel importante na eliminação de mRNAs anômalos e na defesa do organismo contra parasitas moleculares como transposons e vírus (SUN; TSAO, 2008). Além de ser uma importante ferramenta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

O mecanismo de RNAi pode ser dividido em fase de iniciação e fase de execução. Na primeira, ocorre a geração das moléculas efetoras que podem ser classificadas em relação a sua origem e função, em pelo menos três categorias: siRNA (*small interfering RNA*), miRNA (*microRNA*) e shRNA (*short hairpin RNA*). Quando ligado ao mRNA-alvo, o miRNA gera um pareamento incompleto, levando a uma interrupção da tradução. Em contrapartida, o siRNA ou shRNA, provoca a degradação do mRNA, através de um pareamento complementar perfeito. Esse silenciamento ocorre devido à fase subsequente de execução, onde as moléculas efetoras são incorporadas a complexos proteicos específicos (DE PAULA; BENTLEY; MAHATO, 2007; GELEY; MÜLLER, 2004).

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. Por outro lado, a produção de miRNA ocorre através da transcrição de genes endógenos em um microRNA primário (pri-miRNA) pela RNA polimerase II, onde posteriormente sofre a clivagem por um complexo proteico formado pela *Drosha* (também pertencente à família RNase III) e pela proteína DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region 8 Protein*), resultando no micro-RNA precursor (pre-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 estrutura semelhante ao miRNA, 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). Na etapa de execução, as moléculas efetoras são incorporadas a proteínas celulares formando um complexo multimérico denominado RISC (*RNA Induced Silencing Complex*). Neste, a proteína Argonauta 2 (Argo 2) apresenta atividade de endonuclease direcionada à fita de mRNA 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 mRNA-alvo, degradando-o ou bloqueando a sua ação (FRANÇA et al., 2010; HUANG; LIU, 2011; WHITEHEAD; LANGER; ANDERSON, 2009) (Figura 3).

Figura 3 Mecanismo de silenciamento induzido por RNA. a) shRNA-mirs são expressos por vetores de expressão de siRNA e clivados pela enzima *Drosha*, resultando em shRNAs (pequenos *hairpin* RNA), direcionados ao citoplasma e clivados pela *Dicer* em siRNAs que, posteriormente, são associados ao RISC e desenrolados em uma única fita de RNA (ssRNA). O RISC está envolvido no recrutamento de ssRNA para o mRNA de sequência complementar e clivagem do mRNA, evitando sua tradução; b) Precusores de microRNAs, chamados de pré-miRNAs, são codificados pelo genoma do hospedeiro; c) Longos dsRNAs tem sido sintetizados e introduzidos em células-alvo. Lá são digeridos pela *Dicer* em siRNAs ou d) siRNAs podem ser sintetizados e transfectados para dentro de células-alvo diretamente.



Fonte: Cheng e He (2010).

Recentemente, foi apontada a relação entre RNAi e corpos GW (GWB) ou *P bodies*, os quais parecem ser os sítios de repressão da tradução de mRNA por miRNAs. Os GWB são estruturas citoplasmáticas envolvidas no controle da expressão gênica pós-transcricional (JAKYMIW et al., 2007; LIU; PAROO, 2010; SEN; BLAU, 2005), através da regulação do *turnover* de mRNA bem como a remoção de RNAs aberrantes e com mutações *nonsense*. A formação dos GWB parece depender de proteínas específicas e RNA, em particular, os miRNAs (JAKYMIW et al., 2007).

Aplicações cutâneas de RNAs interferentes para fins terapêuticos estão emergindo devido à grande demanda de tratamentos efetivos para as várias patologias da pele. Melanomas invasivos possuem ativação constitutiva da via de sinalização MEK/ERK. Essa via regula a produção da MMP-1, que é superexpressa pelo melanoma e células estromais adjacentes. Esta regulação positiva da metaloproteinase está relacionada à progressão do câncer, incluindo crescimento do tumor, invasão e metástase, através da proteólise da membrana basal entre a epiderme e derme, e degradação da MEC. A inibição da MMP-1 por pequenos RNA regulatórios (shRNA) reduziram a atividade da collagenase, inibindo a metástase (BLACKBURN et al., 2007).

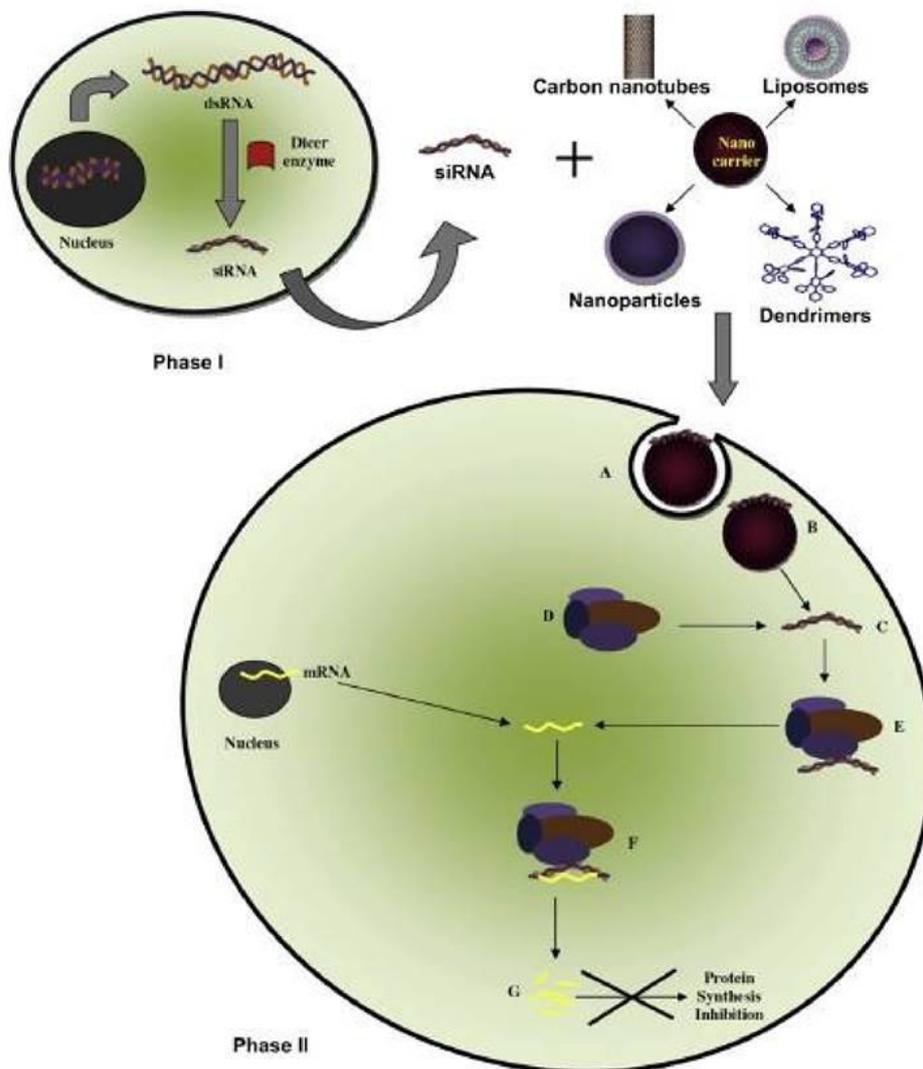
Entretanto, a aplicação clínica de siRNA tem sido dificultada por sua instabilidade, perfil farmacocinético pobre, baixa taxa de transfecção celular, rápida degradação por enzimas endógenas e carga negativa, que repele o transporte através das membranas celulares. Assim, sistemas de liberação de genes são necessários para superar esses obstáculos e possibilitar a entrega eficiente às células-alvo. O sistema ideal deve ser capaz de ultrapassar a função de barreira do estrato córneo, proporcionar uma proteção contra a degradação enzimática, facilitar a absorção intracelular e evitar o metabolismo para, finalmente, promover o silenciamento gênico (VINCENTINI et al., 2013).

3.3 Sistemas de liberação de genes

Os obstáculos na transfecção de material genético estimulam o desenvolvimento de sistemas transportadores *in vivo*. Diferentes tipos de vetores sintéticos têm sido aplicados para o silenciamento de genes, incluindo lipídios, lipossomas, polímeros, peptídeos, dendrímeros e nanotubos de carbono (Figura 4) (KESHARWANI; GAJBHIYE; JAIN, 2012). Estas tecnologias são desenvolvidas observando a elevada densidade de carga negativa do material genético, que possibilita a associação aos vetores catiônicos através de interações eletrostáticas. Esses vetores não virais mostram-se promissores devido à segurança, fácil

síntese, possibilidade de direcionamento para diferentes alvos celulares através da modificação estrutural, incorporação de ligantes e baixa resposta imunológica, quando comparados aos vetores virais (ZHANG, S. et al., 2007; REISCHL; ZIMMER, 2009).

Figura 4 Nanocarreadores para incorporação de siRNA. Fase I: iniciação; Fase II: execução, sendo (A) a internalização do complexo nanocarreador de siRNA por endocitose, (B) complexo dentro da célula, (C) siRNA liberado no citoplasma, (D) complexo RISC, (E) complexo multiproteínas RISC, (F) reconhecimento do mRNA (G) degradação do mRNA e inibição da síntese de proteínas.

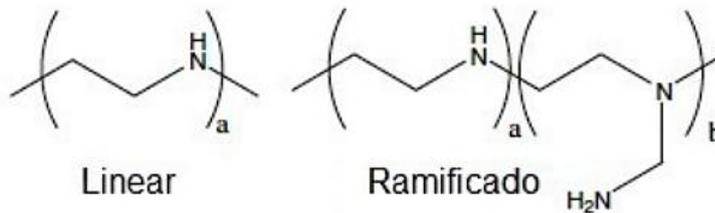


Fonte: Kesharwani, Gajbhiye e Jain (2012).

Um polímero que tem sido amplamente utilizado é a PEI (Figura 5) por apresentar solubilidade em água e alta densidade de carga positiva em pH fisiológico, devido aos grupamentos protonáveis existentes em sua estrutura. Dessa forma, este polímero pode

interagir com as membranas celulares, carregadas negativamente, e aumentar a transfecção celular de siRNAs (GÜNTHER et al., 2011).

Figura 5 Estrutura molecular do polímero catiônico PEI.



Fonte: Martimprey et al. (2009).

A liberação do siRNA de complexos formados com a PEI ocorre no citoplasma, após sofrerem o escape endossomal pelo mecanismo “efeito esponja de prótons”. Este é mediado por agentes com alta capacidade tamponante e flexibilidade para intumescer quando protonado. Devido à presença de grupamentos amina protonáveis com diferentes valores de constante de dissociação (pKa) em sua estrutura, os polímeros apresentam alta capacidade tamponante, o que favorece o aumento da pressão osmótica através do influxo de íons e água para o interior do endossomo, ocasionando a ruptura da membrana endossomal e a consequente liberação do conteúdo internalizado (BARRATT; FATTAL, 2009; TSENG; MOZUMDAR; HUANG, 2009; VARKOUHI et al, 2011).

A procura por novos sistemas de liberação de fármacos tem sido relevante no sentido de se estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes, que possibilitem administrar fármacos via tópica com mais segurança e efeitos colaterais minimizados (CERA, 2001). Desse modo, uma atenção especial tem sido dada aos sistemas microemulsionados, por sua capacidade em aumentar a permeação cutânea e a eficácia terapêutica de diversos fármacos, além de reduzir a dose administrada e os potenciais efeitos adversos (FORMARIZ et al., 2005). Além disso, esses sistemas mostram-se capazes de proporcionar melhorias quanto à liberação, biodisponibilidade e dissolução dos produtos (ASTIER, 2006).

3.4 Microemulsões

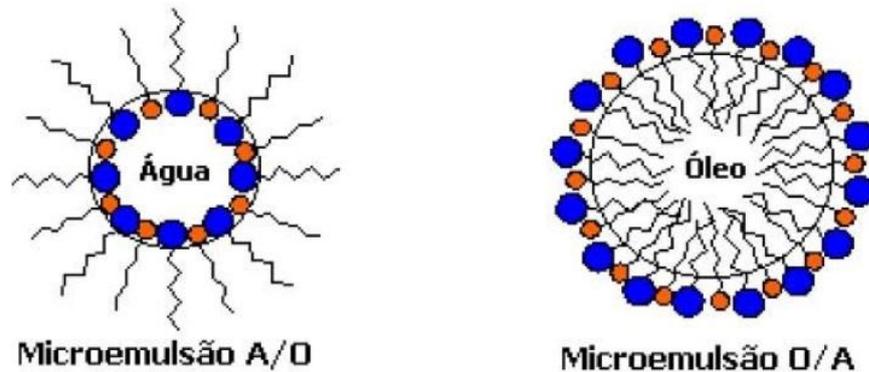
As ME são, geralmente, formadas pela combinação de três a cinco componentes: óleo, água, tensoativo, cotensoativo e eletrólito. Estes sistemas diferem das emulsões simples por apresentarem baixa tensão interfacial, já que as moléculas do tensoativo se intercalam entre as moléculas do cotensoativo na interface óleo-água, afetando a curvatura da gotícula. Esta

menor tensão interfacial, promove a formação espontânea desses sistemas monofásicos e a formação de gotículas de tamanho reduzido, apresentando estabilidade termodinâmica. Por outro lado, as emulsões simples são dispersões bifásicas, turvas ou leitosas, termodinamicamente instáveis e requerem energia externa para sua formação (DEPIERI, 2012; SCHWARZ et al., 2012; SILVA CUNHA et al., 2003).

Os sistemas microemulsionados podem ser representados através de diagramas de fases classificados em ternários, quaternários e pseudoternários, que variam de acordo com a natureza química e com a quantidade de constituintes em cada sistema. O diagrama pseudoternário possui aspecto de diagrama ternário apesar de ser constituído por quatro componentes, onde dois deles são agrupados de modo que a relação água/tensoativo ou cotensoativo/tensoativo seja constante. Assim, este sistema é caracteristicamente bidimensional pela ocorrência de agrupamentos (ROSSI et al., 2007).

As MEs apresentam uma grande diversidade estrutural devido a sua composição química, sendo constituídas de microgotículas dispersas e dinâmicas com diâmetro entre 5 - 100 nm. Possuem uma camada de moléculas anfifílicas que envolvem as microgotículas como uma membrana. Igualmente às emulsões, as microemulsões podem ser do tipo óleo em água (O/A), onde o meio dispersante é a água, ou do tipo água em óleo (A/O), onde o sistema é rico em óleo e as microgotículas são ditas inversas (Figura 6). As moléculas dos tensoativos se comportam de acordo com cada caso, de forma que as cabeças polares estejam voltadas para a fase aquosa, e suas caudas apolares para a fase oleosa. Quando se deseja uma microemulsão do tipo A/O, deve-se utilizar um tensoativo mais hidrofóbico, conseqüentemente, um tensoativo de caráter hidrofílico deve ser usado para obtenção de microemulsões do tipo O/A. É importante ressaltar que em sistemas com elevado teor de tensoativos, o equilíbrio termodinâmico entre os constituintes pode ser representado pela formação de estruturas diferentes das MEs, como os cristais líquidos lamelares, de fases hexagonais ou cúbicas (LAWRENCE; RESS, 2000; FORMARIZ et al., 2005; ROSSI et al., 2007).

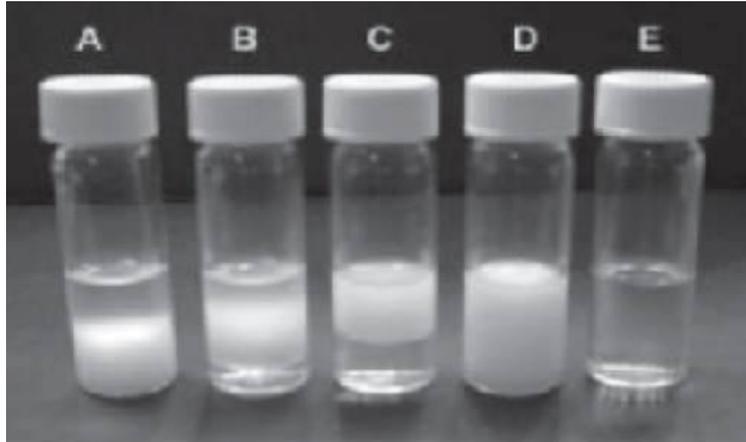
Figura 6 Estruturas das MEs.



Fonte: Franzini (2006).

Para racionalizar a utilização dos tensoativos na produção de uma ME, é necessário conhecer o seu comportamento quanto ao Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL) e ao Parâmetro de Empacotamento Crítico (PEC). O primeiro leva em consideração a contribuição relativa da fração hidrofílica e hidrofóbica da molécula do tensoativo. O segundo retrata a habilidade dos tensoativos em formar agregados particulares, referindo-se à geometria da molécula e sua tendência à formação de micelas ou micelas reversas. Ambas as abordagens são empíricas, mas servem de guia para a seleção dos tensoativos. Winsor (1948) criou um método semiquantitativo de mensurar o equilíbrio entre as características hidrofílicas e lipofílicas do tensoativo em um sistema particular que é um tanto similar ao expresso pelo valor do EHL. Ele classificou os sistemas em quatro tipos: Winsor I, II, III e IV. O primeiro representa o equilíbrio entre a fase emulsionada com a fase oleosa em excesso na porção superior do sistema; no segundo ocorre o equilíbrio entre a fase emulsionada e a fase aquosa em excesso na porção inferior do sistema; no terceiro o sistema homogêneo está em equilíbrio com excesso tanto de óleo quanto de água, formando um sistema trifásico; no IV não há excesso de fase aquosa ou oleosa, formando um sistema homogêneo e monofásico (Figura 7). Este último é o foco principal durante a preparação de um sistema microemulsionado (DAMASCENO et al., 2011; FRANCINI, 2006; FORMARIZ et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2004; ROSSI et al., 2007).

Figura 7 Classificação de Winsor. (A) *Winsor* I, (B) *Winsor* III, (C) *Winsor* II, (D) Emulsão homogênea e (E) *Winsor* IV.



Fonte: Formariz et al. (2005).

O interesse na aplicação de MEs como veículos de preparações farmacêuticas deve-se à capacidade de solubilização de substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas, além de proporcionar a estabilidade dos fármacos. Ademais, devido à formação espontânea desses sistemas, fatores como duração e intensidade da agitação, temperatura, tempo de emulsificação, entre outros, muitas vezes não são necessários, tornando as microemulsões bastante atrativas do ponto de vista da produção farmacêutica (SILVA CUNHA et al., 2003).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 RNA interferente

As sequências de aminoácidos correspondentes à proteína foram identificadas e processadas através de ferramentas de bioinformática disponíveis em banco de dados públicos como NCBI e Expasy. Sequências relacionadas foram alinhadas por grau de homologia, através do programa Clustal W, visando obtenção de sequências consenso mais conservadas. O siRNA da proteína-alvo foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich (catálogo EHU005681), a qual possui expertise na manufatura de oligos DNA e RNA, disponibilizando um vasto portfólio de estratégias para silenciamento gênico por interferência de RNA.

4.2 Construção do diagrama de fases pseudoternário

O DFPT foi obtido através das misturas de óleo de canola, tensoativos e fase aquosa. Os tensoativos empregados foram Span® 80 e Tween® 80 na proporção de 3:1, respectivamente. A fase aquosa consistiu em água deionizada e PPG, na proporção de 1:3. Utilizou-se o método de titulação, com diferentes volumes de fase aquosa. Inicialmente a fase oleosa e os tensoativos foram misturados em proporções que variavam de 9:1 à 1:9. Em seguida a fase aquosa foi titulada em diferentes volumes sob agitação magnética (IKA, RH Basic 1, Brasil) a temperatura ambiente, por três minutos (Figura 8). Após cada titulação de fase aquosa, o sistema obtido foi classificado por inspeção visual e caracterizados em: ME, Emulsão Líquida Opaca (ELO), Emulsão líquida Leitosa (ELL) e Emulsão Semisólida (ESS). O diagrama obtido teve os pontos plotados com o auxílio do software Origin Pro® 8.0 (VINCENTINI et al., 2013).

Figura 8 Representação esquemática da obtenção do DFPT.

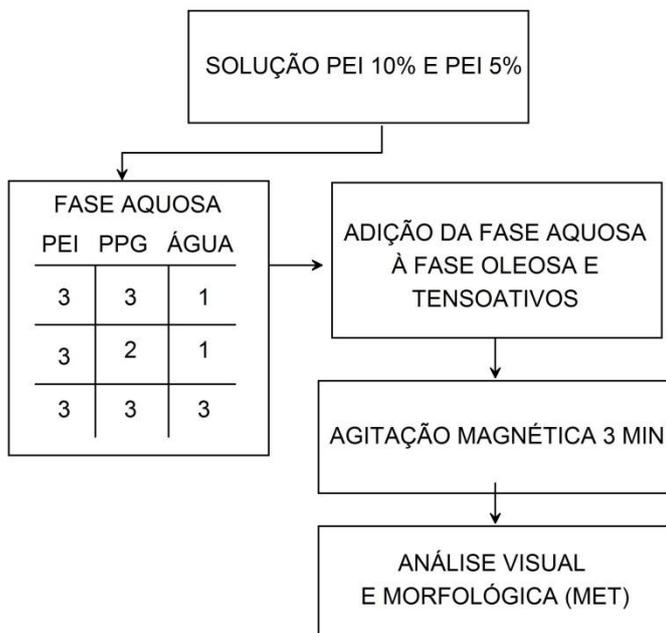


Fonte: dados da pesquisa.

4.3 Avaliação da concentração ideal de PEI e seleção da formulação

A concentração ideal de PEI foi determinada através da visualização da formação e distribuição das gotículas da microemulsão por MET (Figura 9). Avaliou-se as concentrações de 5% e 10% de PEI, em adição ao propilenoglicol e a água deionizada, nas proporções respectivas de 3:3:1, 3:2:1 e 3:3:3 (NOTE; KOETZ; KOSMELLA, 2006).

Figura 9 Determinação da concentração ideal de PEI nas MEs.



Fonte: dados da pesquisa.

4.4 Incorporação de RNA interferente

Partindo do diagrama obtido, selecionou-se o ponto de microemulsão contendo 7,4% de solução aquosa, 55,6% da mistura de tensoativos e 37% de óleo de canola. O siRNA foi adicionado à fase aquosa na concentração 200 ng/ μ L. Um novo sistema foi formulado através da adição de PEI à solução aquosa (3:3:1) utilizando o mesmo ponto de ME, com as proporções de componentes citadas acima. Os sistemas foram incubados por 12h, à temperatura ambiente, antes dos ensaios de caracterização.

4.5 Caracterização dos sistemas microemulsionados

4.5.1 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 $\mu\text{S}/\text{cm}$, à temperatura de 25 °C.

4.5.2 Determinação do pH

O pH das formulações foi avaliado por meio de pHmetro digital com eletrodo de vidro e sensor de temperatura (Instrutemp, ITmPA 210, Brasil) calibrado previamente com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 a uma temperatura de $25 \pm 0,5$ °C. As determinações dos valores de pH em triplicata foram obtidas com introdução do eletrodo diretamente no interior das formulações acondicionadas em frascos de cintilação.

4.5.3 Índice de refração

O Índice de refração das MEs foi determinado em triplicata utilizando refratômetro de Abbé (Biobrix, São Paulo, Brasil) aferido com água deionizada Milli-Q® (IR=1,3325) à temperatura de $25 \pm 0,5$ °C.

4.5.4 Calorimetria exploratória diferencial

As curvas DSC da microemulsões e componentes isolados foram obtidas em um módulo Calorimétrico Exploratório Diferencial DSC (Modelo Q20, TA – *Instruments*, Estados Unidos). Amostras de $7,5 \pm 0,05$ mg foram acondicionadas em cadinhos de alumínio hermeticamente fechados. Inicialmente as amostras 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, analisadas na razão de aquecimento de 5 °C.min⁻¹, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 50 mL min⁻¹(BOONME et al., 2006).

4.5.5 Microscopia eletrônica de transmissão

As microemulsões brancas com e sem o PEI 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 (CETENE) com aceleração de voltagem de 80KV (ZHANG, W. et al., 2010).

4.5.6 Eficiência de encapsulação

A eficiência de encapsulação do siRNA em microemulsões foi investigada por eletroforese em gel de agarose (CETENE). Um microlitro de microemulsão foi adicionado à 10 μ L de siRNA e o volume foi completado para 65 μ L de meio mínimo essencial (MEM). O tempo de incubação para a formação de complexos foi de 10 min. Os complexos formados foram submetidos a gel de agarose 0,6% contendo brometo de etídio (0,5 mg / ml) com aplicação de tampão de corrida Tris acetato 40 mM e EDTA 1 mM. O procedimento foi executado a 45 V por 120 min. A intensidade das bandas do siRNA livre, microemulsão branca, complexo de ME-siRNA e padrão de peso molecular (1Kb plus DNA ladder, Invitrogen) foram visualmente observadas (HUNG et al., 2005).

4.6 Testes de estabilidade

As formulações foram submetidas a testes de estabilidade termodinâmica e de resistência à força centrípeta. Os parâmetros de índice de refração, pH e condutividade foram avaliados antes e após os testes, seguindo a metodologia anteriormente mencionada (GHOSH et al., 2013).

4.6.1 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 89g, 559g, 1095g, 2236g e 4382g, durante quinze minutos em cada rotação, à temperatura ambiente. Ao fim de cada ciclo, os resultados foram avaliados por inspeção visual.

4.6.2 Ciclo congelamento/descongelamento

As formulações (5 mL) foram submetidas a quatro ciclos alternados de temperatura de -21°C e 25°C , com tempo de permanência de 48 h em cada. Ao final de cada ciclo os resultados foram avaliados por inspeção visual.

4.6.3 Estresse térmico

As microemulsões (4 mL) foram submetidas a um aumento gradual de temperatura, de 40 a 80°C , elevando a temperatura em 10°C a cada 30 minutos utilizando banho termostático. As amostras foram analisadas visualmente após 30 minutos em cada temperatura.

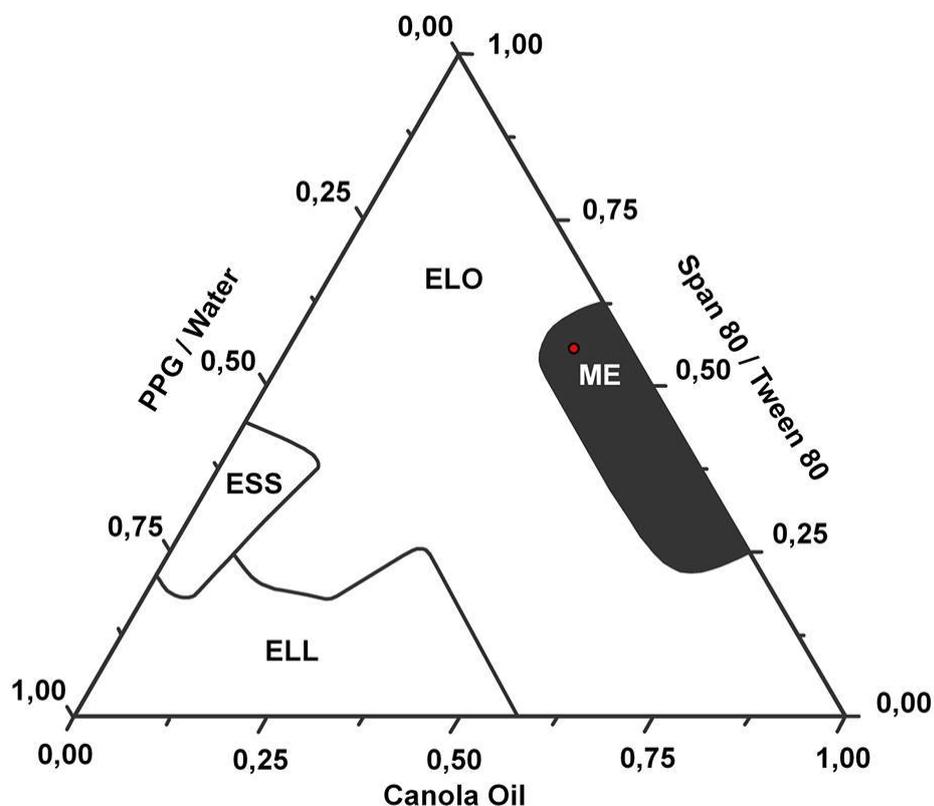
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Construção do DFPT

Os sistemas microemulsionados foram obtidos pelo princípio do Equilíbrio Hidrófilo-Lipófilo (EHL), que leva em consideração a contribuição relativa da fração hidrofílica e hidrofóbica da molécula do tensoativo (ROSSETI et al., 2011). Partindo do valor requerido do EHL para o óleo de canola ($EHL=7$), os tensoativos (Span 80 e Tween 80) foram selecionados e misturados em uma proporção próxima a esse valor para obter uma microemulsão do tipo A/O. Deve-se ressaltar que os tensoativos não iônicos selecionados são aceitáveis para aplicações farmacêuticas por serem pouco afetados com as mudanças de pH e força iônica, além da baixa toxicidade (CRUZ; UCKUN, 2001; DAMASCENO et al., 2011; FORMARIZ et al., 2005; OLIVEIRA, 2004).

No DFPT estão representadas as quantidades de tensoativo/cotensoativo (3:1), fase aquosa e fase oleosa (Figura 10). Macroscopicamente, as MEs apresentaram-se como um líquido de coloração amarelada, translúcido e com aspecto levemente viscoso (Figura 11).

Figura 10 Diagrama de fases pseudoternário. As áreas delimitadas são representadas por: ELO, ESS, ELL e ME (em destaque). O ponto em vermelho refere-se à formulação de microemulsão escolhida para estudo.



F

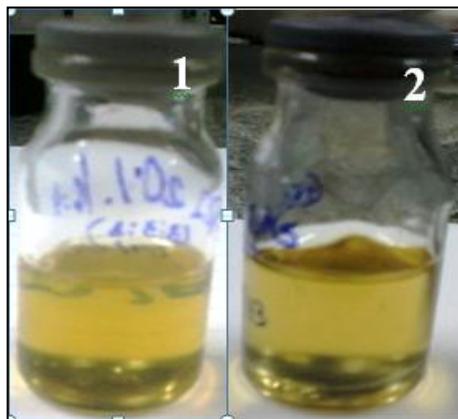
Fonte: dados da pesquisa.

5.2 Incorporação de PEI e siRNA

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 uma proteção e evitar a rápida degradação por enzimas endógenas (VINCENTINI et al., 2013). A PEI caracteriza-se como um polímero solúvel em água, que possui alta densidade de carga positiva em pH fisiológico, graças aos grupamentos amino protonáveis em cada terceira posição. Os complexos formados com os siRNAs apresentam uma carga residual positiva, o que permite a sua interação com as membranas celulares de carga negativa, seguido por internalização por endocitose (DEPIERI, 2012).

Após a determinação da região de microemulsão, um ponto foi selecionado através de análise visual e MET (Figura 10) com as percentagens de componentes (v/v) correspondentes a 7,4% da mistura de propilenoglicol e água (3:1), 55,6% da mistura de Tween 80 e Span 80 (3:1) e 37% de óleo de canola. A PEI e o siRNA foram incorporados na fase aquosa, posteriormente titulada sob agitação na fase oleosa contendo tensoativos. A concentração ideal da PEI na formulação foi avaliada por MET quanto ao formato e distribuição das gotículas. A solução de PEI 5%, PPG e água deionizada na proporção de 3:3:1, respectivamente, obteve melhores resultados em comparação à fase aquosa com PEI 10%, onde não houve formação de gotículas. A ME com a PEI apresentou aspecto visual próximo ao da ME sem o polímero, com coloração ligeiramente mais amarelada (Figura 11). Além disso, a MET revelou gotículas como demonstrado no tópico 5.3.1. O siRNA na concentração de 200 ng/ μ L foi adicionado à fase aquosa da ME com/sem o polímero.

Figura 11 Aspecto macroscópico das microemulsões. ME sem PEI (1) e ME com o polímero (2).



Fonte: dados da pesquisa.

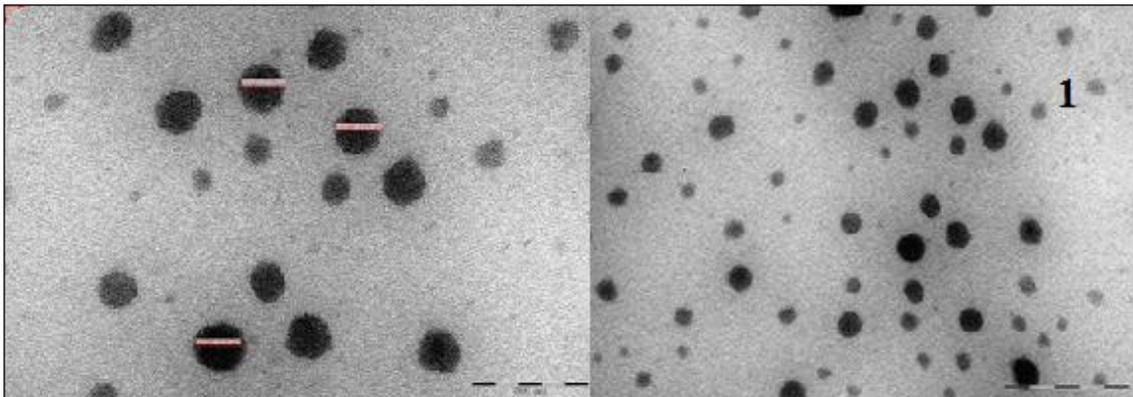
5.3 Caracterização dos sistemas microemulsionados

5.3.1 Análise ultraestrutural

As microemulsões são, geralmente, caracterizadas como agregados esféricos e com diâmetros menores que 1400 Å, tipicamente da ordem de 100 Å. Apesar da denominação "micro", o sistema envolve gotículas de tamanhos suficientemente pequenos para ser opticamente transparente (FRANZINI, 2006). A MET é uma das técnicas mais adequadas em estudos morfológicos para obter imagens de compostos nanométricos, tais como as nanopartículas e/ou nanogotículas (BEDÊ, 2010).

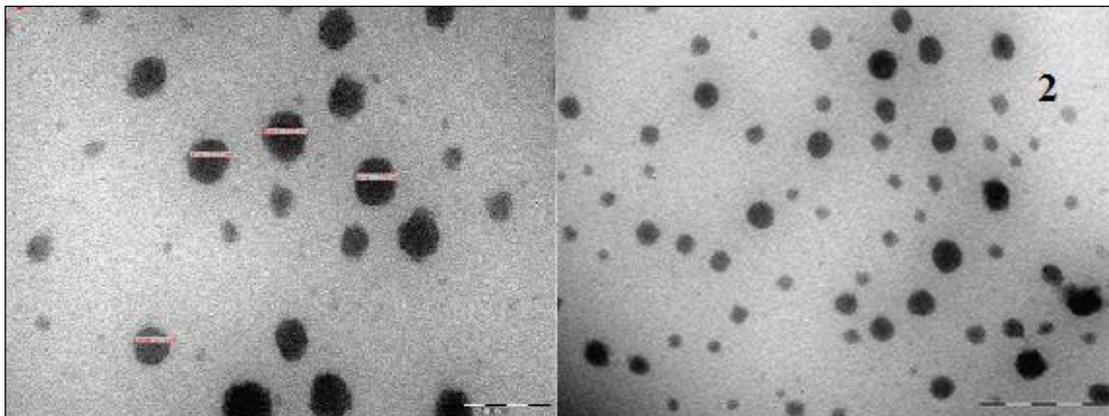
As gotículas do sistema microemulsionado sem PEI apresentaram-se esféricas, distribuídas de maneira homogênea, com diâmetro médio de $41,452 \pm 14,201\text{nm}$ (n=200) (Figura 12). As gotículas de ME com PEI 5% apresentaram diâmetro médio de $125,42 \pm 28,383\text{nm}$ (n=200) (Figura 13).

Figura 12 Ultraestrutura de ME sem PEI.



Fonte: dados da pesquisa.

Figura 13 Ultraestrutura de ME com PEI 5%.



Fonte: dados da pesquisa.

5.3.2 Aspectos físico-químicos

A caracterização físico-química permite a análise da microemulsão em aspectos de formação, comportamento estrutural e determinação das transições de fase e estabilidade. Dentre as propriedades mais utilizadas estão a reologia, viscosidade, condutividade elétrica, DSC, índice de refração, entre outras (EVANDRO, 2009; MICHNIAK-KOHN; ZHANG, 2011). Com intuito de obter as informações elencadas e verificar a interferência do polímero e do ácido nucleico na estrutura da formulação, ensaios de condutividade, pH e índice de refração foram realizados nos sistemas obtidos. A condutividade das MEs apresentou-se baixa, entre 1,3467 e 2,5867 μScm^{-1} , em todas as formulações testadas (Tabela 1), sendo sugestiva de um sistema A/O. Entretanto, a condutividade das MEs contendo o polímero catiônico e siRNA foi levemente mais elevada, devido aos grupos ionizados do siRNA e da PEI.

Tabela 1 Caracterização físico-química das MEs.

Microemulsões	pH	Condutividade (μScm^{-1})	Índice de refração
ME	7,2167 \pm 0,0810	1,3467 \pm 0,1701	1,4668 \pm 0,0006
ME + siRNA	6,6167 \pm 0,4725	2,5867 \pm 0,2510	1,4673 \pm 0,0040
ME + PEI	7,5201 \pm 0,0531	1,5402 \pm 0,1253	1,4670 \pm 0,0005
ME + PEI + siRNA	6,8167 \pm 0,0251	2,0167 \pm 0,0890	1,4657 \pm 0,0066

Fonte: dados da pesquisa

Nas MEs com fase externa aquosa a condutividade é elevada, enquanto naquelas com fase externa oleosa a condutividade é baixa devido às gotículas de água estarem isoladas pelo filme de tensoativos. À medida que a concentração de água no sistema é aumentada, ocorre sua agregação e formação de canais interconectados, levando ao aumento da condutividade e originando microemulsões do tipo bicontínuas. Mudanças no comportamento estrutural estão intimamente relacionadas com drásticas mudanças nos mecanismos de transporte elétrico (MICHNIAK-KOHN; ZHANG, 2011)

Microemulsões são agregados esféricos incapazes de desviar o plano de luz incidente. No entanto, durante um processo de inversão de fases tornam-se anisotrópicos, sem apresentar qualquer descontinuidade aparente nas suas propriedades físicas, mas que pode ser evidenciado pela variação do índice de refração. Os valores do IR encontrados para as MEs testadas mantiveram-se aproximados, entre 1,4657 e 1,4673 (Tabela 1). Além disso, estes

valores estão próximos ao descrito nas especificações técnicas para o óleo de Canola (1,465 - 1,467), sugerindo uma fase externa oleosa (EVANDRO, 2009; PRZYBYLSKI, 2011).

O pH adequado de uma formulação é padronizado conforme a tolerância biológica para produtos de uso cutâneo (pH 5,5 a 8,0) e estabilidade do componente ativo (SILVA et al., 2009). As formulações testadas neste estudo obtiveram pH aproximados e compatíveis com o da pele (Tabela 1). A diminuição no valor do pH após a incorporação do siRNA, mesmo na presença do polímero catiônico, possivelmente se deve ao grande conteúdo de cargas negativas do material genético.

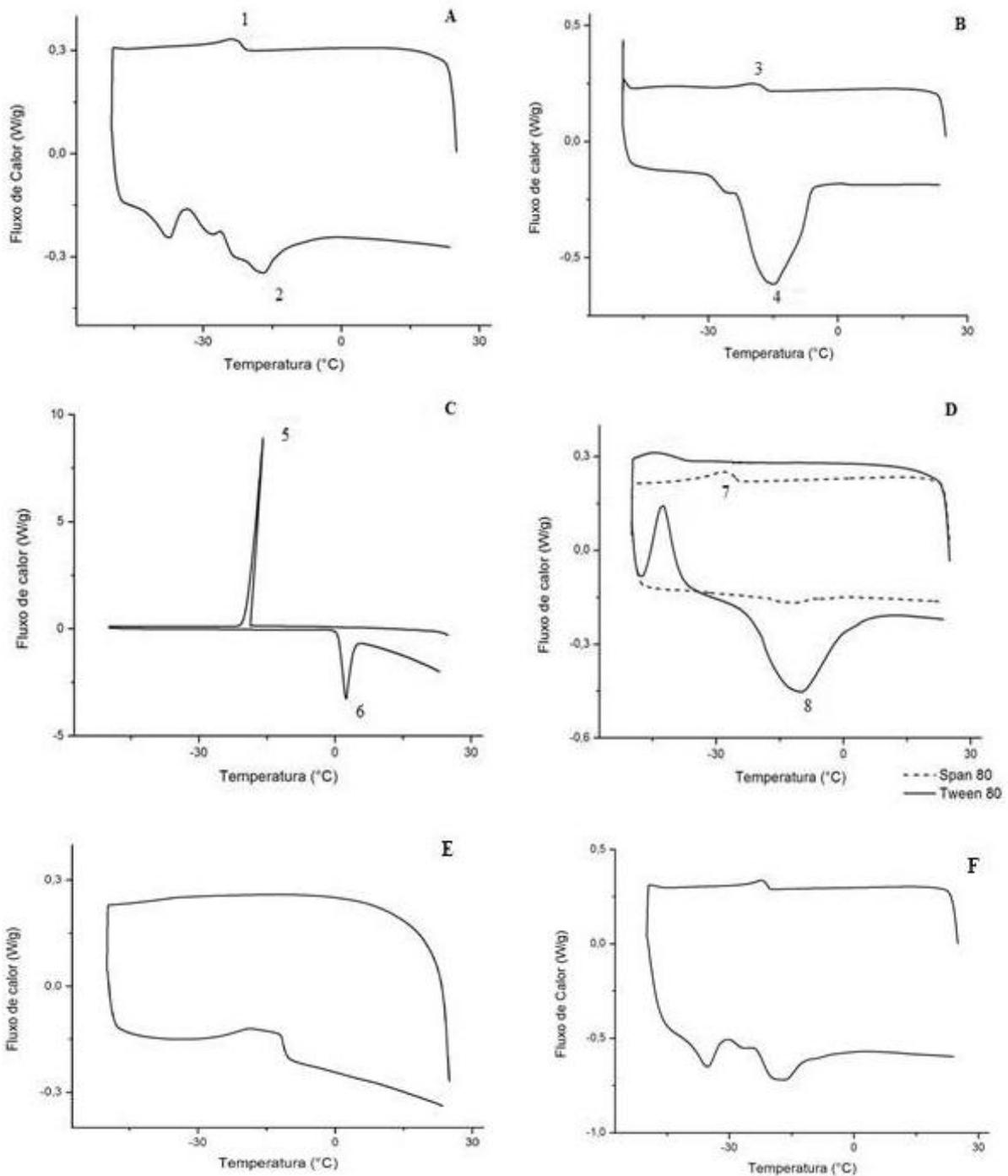
5.3.3 Análise térmica

A água da microemulsão pode estar livre, como no sistema O/A, ou estar confinada no interior das gotículas revestidas pelo filme de tensoativos, como no sistema A/O. É possível avaliar a estrutura de microemulsões através das propriedades da água, avaliando diferenças no comportamento de fusão e de congelamento detectadas por medições de DSC. Através do ponto de fusão é possível diferenciar a água livre (ponto de fusão em torno de 0°C), a água interfacial (ponto de fusão em torno de -10°C) e a água ligada (com pontos de fusão abaixo de -10°C). Microemulsões O/A apresentam apenas o pico de congelamento da água no termograma, enquanto que aquelas do tipo A/O não apresentam pico de congelamento da água em seu termograma. Já as microemulsões 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).

As microemulsões foram submetidas à análise térmica por DSC (Figura 14). O termograma B representa

C, representando a temperatura de congelamento do óleo. O termograma da ME sem PEI (A) se assemelha àquele da ME com PEI (F), além de ter características do termograma do óleo de canola e tensoativos, sendo possível observar a presença de um pico exotérmico (1) semelhante ao pico de congelamento do óleo (3). O termograma C representa a corrida analítica para a água utilizada na formulação, com os picos exotérmico (5) e endotérmico (6) não visíveis nas MEs, indicando que a água encontra-se confinada no interior da microestrutura. Assim, os termogramas obtidos deduzem 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 para as microemulsões.

Figura 14 Curvas do termograma. A: termograma da ME sem PEI; B: termograma do óleo de canola; C: termograma da água; D: termograma dos tensoativos; E: termograma do propilenoglicol; F: termograma da ME com PEI.



Fonte: dados da pesquisa.

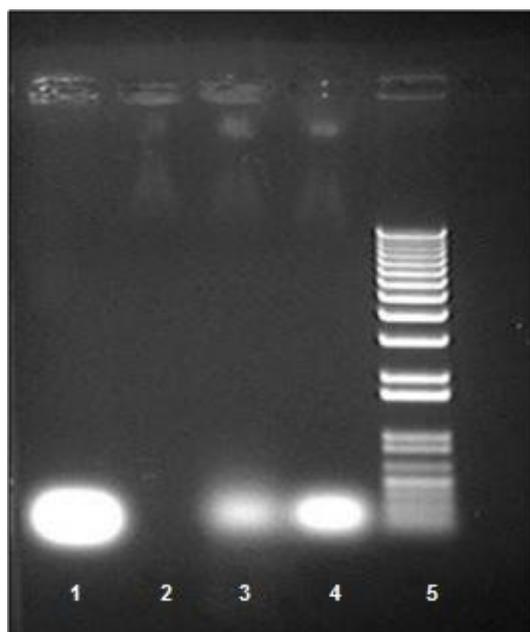
5.3.4 Eficiência de encapsulação

A eletroforese em gel de Agarose consiste em um método padrão usado para separar, identificar, analisar, caracterizar e purificar fragmentos de ácidos nucleicos. 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).

Os poliplexos consistem em complexos formados entre os ácidos nucleicos e os polímeros catiônicos de alta eficiência de transfecção. A PEI possui alta densidade de carga positiva em pH fisiológico, sendo capaz de formar complexos por ligações não covalentes (GÜNTHER et al., 2011).

Para determinar o grau de incorporação de siRNA nos sistemas, o ensaio de eletroforese foi realizado com amostras de siRNA livre (1), MEs brancas (2), MEs catiônicas com siRNA incorporado (3) MEs sem PEI com siRNA incorporado (4) e padrão de peso molecular (5) 1Kb plus DNA ladder, Invitrogen (Figura 15). As bandas reveladas pelo marcador indicaram uma maior encapsulação das sequências gênicas na microemulsão contendo PEI/catiônica, demonstrado pela menor quantidade de siRNA não ligado, em comparação àquele conteúdo de siRNA livre e siRNA não ligado às MEs sem PEI.

Figura 15 Eficiência de encapsulação de siRNA em MEs. 1: siRNA livre; 2: ME branca; 3: ME catiônica com siRNA; 4: ME sem PEI e com siRNA; 5: Padrão de peso molecular.



Fonte: dados da pesquisa.

5.4 Estudos de estabilidade

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 microemulsões 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 para avaliar a ocorrência de separação de fases, cremosidade e fissuras (MORAIS et al., 2006; ROSSI et al., 2007; GHOSH et al., 2013).

Todos esses desafios não afetaram a estrutura macroscópica dos sistemas. Quanto às propriedades físico-químicas, os resultados de IR não foram modificados após os testes. Os valores de pH e condutividade também não apresentaram mudanças após os teste de centrifugação e congelamento/descongelamento. Entretanto, houve sutil diferença entre os valores encontrados para o pH e a condutividade nas amostras após o teste de estresse térmico, indicando fragilidade da formulação frente a temperaturas elevadas (Tabela 2).

Tabela 2 Avaliação físico-química das MEs em teste de estresse térmico.

Sistemas	Valores anteriores aos testes de estabilidade		Valores após os testes de estabilidade	
	pH	Condutividade (μScm^{-1})	pH	Condutividade (μScm^{-1})
ME	7,2167 \pm 0,0810	1,3467 \pm 0,1701	7,1259 \pm 0,0757	1,0758 \pm 0,1910
ME + siRNA	6,6167 \pm 0,4725	2,5867 \pm 0,2510	7,1156 \pm 0,0510	1,9678 \pm 0,1799
ME + PEI	7,5201 \pm 0,0531	1,5402 \pm 0,1253	7,3031 \pm 0,0492	1,2021 \pm 0,2015
ME + PEI + siRNA	6,8167 \pm 0,0251	2,0167 \pm 0,0890	7,0201 \pm 0,0163	1,6359 \pm 0,0987

Fonte: dados da pesquisa

6 CONCLUSÃO

A tecnologia de interferência por RNA tem se tornado uma ferramenta eficaz em investigações biológicas e no desenvolvimento de sistema nanocarreadores eficazes. A proposta deste estudo foi o desenvolvimento de microemulsões para encapsulação de RNA interferente, uma nova abordagem da nanotecnologia ainda não investigada. O sucesso desta aplicação depende da otimização das propriedades morfológicas e físico-químicas, tais como eficiência de encapsulação, propriedades térmicas, pH, condutividade, IR, estabilidade, aspecto estrutural, entre outras.

O diagrama de fases pseudoternário obtido mostrou-se simples e reprodutível, oferecendo um sistema microemulsionado do tipo A/O apropriado para incorporação de siRNA. Isto foi confirmado através dos estudos físico-químicos e morfológicos citados acima, sendo a microemulsão com PEI 5% mais eficiente na encapsulação do material genético. Além disso, a formulação apresentou-se macroscopicamente estável frente aos desafios aplicados. Assim, a formulação desenvolvida pode ser um veículo não viral promissor para uso tópico de siRNA terapêutico. Estudos subsequentes devem abordar novas caracterizações do sistema e a transfecção do siRNA para silenciamento da proteína-alvo *in vitro*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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.

ALMEIDA, M. I.; REIS, R. M.; CALIN, G. A. MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 717, p. 1-8, 2011.

ARAÚJO, R. V. S. et al. Metaloproteinases: aspectos fisiopatológicos sistêmicos e sua importância na cicatrização. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.10, n.1, p. 82-88, 2011.

ASTIER, A. Formes galéniques nouvelles en cancérologie. **Annales Pharmaceutiques Françaises**. v. 64, n. 1, p. 23-35, 2006.

BARBOSA, F. S. **Modelo de impedância de ordem fracional para a resposta inflamatória cutânea**. Rio de Janeiro, 2011. [Dissertação de Mestrado em Engenharia Biomédica, Universidade Federal do Rio de Janeiro].

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

BEDÊ, P. M. **Produção e caracterização de nanopartículas polimérico-magnéticas para utilização biomédica**. Rio de Janeiro, 2010. [Dissertação de Mestrado em Ciência dos Materiais, Instituto Militar de Engenharia].

BLACKBURN, J. S. et al. RNA interference inhibition of matrix metalloproteinase-1 prevents melanoma metastasis by reducing tumor collagenase activity and angiogenesis. **Cancer Research**, v. 15, n. 67, p. 49-58, 2007.

BOONME, P. et al. Characterization of Microemulsion Structures in the Pseudoternary Phase Diagram of Isopropyl Palmitate/Water/Brij 97:1-Butanol. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, n. 7, v. 2, 2006.

CERA, R. F. L. **Estudo da incorporação do diclofenaco sódico com microemulsão lipídicas: formulação e liberação in vitro**. Araraquara, 2001. [Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista].

CHENG, F.; HE, S. RNA interference: a potent technology in studying and modulating of dendritic cells, and potential in clinical therapy. **Molecular Biology Reports**., v. 37, n. 6, p. 2635-2644, 2010.

CRUZ, D’J. O.; UCKUN, M. F. Gel-microemulsions as vaginal spermicidal and intravaginal drug delivery vehicles. **Contraception**, v. 64, p.113-123, 2001.

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.

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.

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

DE SICA, R. C. P. **Estudo comparativo pré e pós luz intensa pulsada no tratamento do fotoenvelhecimento cutâneo: avaliação clínica, histopatológica e imunoistoquímica**. São Paulo, 2009. [Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo].

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

FANUN, M. Formulation and characterization of microemulsions based on mixed nonionic surfactants and peppermint oil. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 343, p. 496–503, 2010.

FISHER, G. J. et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. **Archives of Dermatology**, v. 138, p. 1462-1470, 2002.

FORMARIZ, T. P. et al. Microemulsões e fases líquidas cristalinas como sistemas de liberação de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 3, 2005.

FRANÇA, N. R. J. et al. Interferência de RNA: Uma nova alternativa para terapia na doenças reumáticas. **Revista Brasileira de Reumatologia**, V. 50, p. 695-709, 2010.

FRANZINI, C. M. **Estudo de microemulsões e subemulsões contendo Anfotericina B para administração oral**. São Paulo, 2006. [Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista].

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

GEUSENS, B. et al. Ultradeformable cationic liposomes for delivery of small interfering RNA (siRNA) into human primary melanocytes. **Journal of Controlled Release**, v. 133, p. 214-220, 2009.

GEUSENS, B. et al. Lipid-mediated gene delivery to the skin. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, p. 199–211, 2011.

GRIFFITHS, C. E. Drug treatment of photoaged skin. **Drugs Aging**, v. 14, n. 4, p. 289-301, 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.

GROSSHANS, H.; FILIPOWICZ, W. Molecular biology: the expanding world of small RNAs. **Nature**, v. 24, n. 7177, p. 414-416, 2008.

GUARATINI, T.; MEDEIROS, M. H. G.; COLEPICOLO, P. Antioxidantes na manutenção do equilíbrio redox cutâneo: uso e avaliação de sua eficácia. **Quimica Nova**, v. 30, n. 1, p. 206-213, 2007.

GÜNTHER, M. et al. Polyethylenimines for RNAi-mediated gene targeting in vivo and siRNA delivery to the lung. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 3, p. 438 – 449, 2011.

GUO, P. C. et al. Engineering RNA for targeted siRNA delivery and medical application. **Advanced Drug Delivery**, v. 62, p. 650-666, 2010.

HALLIDAY, G. M. Inflammation, gene mutation and photoimmunosuppression in response to UVR-induced oxidative damage contributes to photocarcinogenesis. **Mutation Research**, v. 571, p.107–120, 2005.

HANSON, K. M.; CLEGG, R. M. Observation and quantification of ultraviolet-induced reactive oxygen species in ex vivo human skin. **Photochemistry and Photobiology**, v. 76, p. 57-63, 2002.

HO, H.; HSIAO, C. C.; SHEU, M.T. Preparation of microemulsions using polyglycerol fatty acid esters as surfactant for the delivery of protein drugs. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, p. 138-143, 1996.

HO, J. N. et al. Protective effects of Aucubin isolated from *Eucommia ulmoides* against UVB-induced oxidative stress in human skin fibroblasts. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 28, n. 7, p. 1244-1248, 2005.

HUANG, L.; LIU, Y. In vivo delivery of RNAi with lipid-based nanoparticles. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v.13, p. 507-530, 2011.

HUNG, C. F. et al. Physicochemical characterization and gene transfection efficiency of lipid emulsions with various co-emulsifiers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 289, p. 197–208, 2005.

JAKYMIW, A. et al. Disruption of GW bodies impairs mammalian RNA interference. **Nature Cell Biology**. v. 7, p. 1267-1274, 2007.

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.

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.

- LENZ, G. The RNA interference revolution. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 1749-1757, 2005.
- LI, C. X. et al. Delivery of RNA interference. **Cell Cycle**, v. 5, n. 8, p. 2103-2109, 2006.
- LIU, Q.; PAROO, Z. Biochemical principles of small RNA pathways. **Annual Review of Biochemistry**, v. 79, p. 295-319, 2010.
- MARTIMPREY, H. et al. Polymer Nanocarriers for the Delivery of Small Fragments of Nucleic Acids: Oligonucleotides and Sirna. **European Journal of Pharmaceutics And Biopharmaceutics**, v. 71, p. 490-504, 2009.
- MCCULLOUGH, J. L.; KELLY, K. M. Prevention and treatment of skin aging. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1067, p. 323–331, 2006.
- 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**, n. 421, p. 34– 44, 2011.
- 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.
- NOTE C.; KOETZ J.; KOSMELLA S. Structural changes in poly(ethyleneimine) modified microemulsion. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 2, n. 15, p. 662-668, 2006.
- NAVARRO, V. P. et al. A participação das metaloproteínas da matriz nos processos fisiopatológicos da cavidade bucal. **Revista de Odontologia da UNESP**, n. 35, v. 4, p. 233-238, 2006.
- OLIVEIRA, A. G. et al. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. **Química Nova**, v. 27, n. 1, p. 131-138, 2004.
- PRZYBYLSKI, R. **Canola/Rapeseed Oil, in Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and Uses** ed., F. D. Gunstone, Wiley-Blackwell, Oxford, UK, 2011.
- REISCHL, D.; ZIMMER, M. S. A. Drug delivery os siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems. **Nanomedicine**, v.5, p. 8-20, 2009.
- ROSSETI, F. C. et al. A delivery system to avoid self-aggregation and to improve in vitro and in vivo skin delivery of a phthalocyanine derivative used in the photodynamic therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 155, p. 400-408, 2011.
- ROSSI, C. G. F. T. et al. Microemulsões: uma abordagem básica e perspectivas para aplicabilidade industrial. **Revista Universiade Rural: Série Ciências Exatas e da Terra**, v. 26, p. 45-66, 2007.

SANTOS, J. L. M. **Novas abordagens no combate ao envelhecimento cutâneo**. Porto, Portugal, 2011. [Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa].

SCHARFFETTER–KOCHANNEK, K. et al. Photoaging of the skin from phenotype to mechanisms. **Experimental Gerontology**, v. 35, p. 307–316, 2000.

SHAHA, H.; MAHAJANB, S. R. Photoaging: New insights into its stimulators, complications, biochemical changes and therapeutic interventions. **Biomedicine & Aging Pathology**. v. 3, p.161–169, 2013.

SHUEY, D. J. et al. RNAi: gene-silencing in therapeutic intervention. **Drug Discovery Today**, v. 7, n. 20, p. 1040-1046, 2002.

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 CUNHA, A. et al. Microemulsões como veículo de drogas para administração ocular tópica. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p. 385-389, 2003.

SOUNNI, N. E.; NOEL, A. Membrane type-matrix metalloproteinases and tumor progression. **Biochimie**, v. 87, p. 329-342, 2005.

SUN, B. K.; TSAO, H. Small RNAs development an disease. **Arquivos Brasileiros de Oftamologia**, v. 59, p. 725-737, 2008.

SEN, G. L.; BLAU, H. M. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. **Nature Cell Biology**, v. 7, n. 6, 2005.

SCHWARZ, J. C. et al. Natural microemulsions: Formulation design and skin interaction. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, p. 557–562, 2012.

TOUITOU, E.; GODIN, B. Skin nonpenetrating sunscreens for cosmetic and pharmaceutical formulations. **Clinics in Dermatology**, v. 26, p. 375-379, 2008.

TSENG, Y.; MOZUMDAR, S.; HUANG, L. Lipid-based systemic delivery of siRNA. **Advanced Drug Delivery**, v. 61, p. 721-731, 2009.

VARKOUHI, A. K. et al. Endosomal escape pathways for delivery of biological. **Journal of Controlled Release**, v. 151, p. 220-228, 2011.

VICENTINE, F. T. M. C. et al. Liquid crystalline phase nanodispersions enable skin delivery of siRNA. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, p.16-24, 2013.

VILELA, F. M. P. **Avaliação da segurança in vivo de filtros solares em formulação fotoprotetora**. Ribeirão Preto, 2010. [Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2010].

WHITEHEAD, K. A.; LANGER, R.; ANDERSON, D. G. Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, p. 129-139, 2009.

WINSOR, P. A. Hydrotrophy, solubilization, and related emulsification processes. VIII Effect of constitution on amphiphilic properties. **Transactions of the Faraday Society**, v. 44, p. 463-471, 1948.

XU, Y.; FISHER, G. J. Ultraviolet (UV) light irradiation induced signal transduction in skin photoaging. **Journal of Dermatological Science Supplement**. v. 1, p. 1- 8, 2005.

ZHANG, H. et al. Microstructure characterization of a food-grade U-type microemulsion system by differential scanning calorimetry and electrical conductivity techniques. **Food Chemistry**, n. 141, p. 3050–3055, 2013.

ZHANG, S. et al. Cationic lipids and polymers mediated vectors for delivery of siRNA. **Journal of Controlled Release**, v. 123, p. 1-10, 2007.

ZHANG, W. et al. Nanostructured lipid carriers constituted from high-density lipoprotein components for delivery of a lipophilic cardiovascular drug. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 391, p. 313–321, 2010.