

## SISTEMA MICROEMULSIONADO CONTENDO RNA INTERFERENTE CONTRA O FOTOENVELHECIMENTO

Geilza Carla de Lima Silva<sup>1\*</sup>, Rosalina Coelho Jácome<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos Farmacêuticos, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande – PB.*

\* *geilza\_55@yahoo.com.br*

### RESUMO

A interferência por RNA é um processo de silenciamento pós-transcricional que requer um sistema de liberação clinicamente adequado para entrega segura do siRNA. Assim, o objetivo do estudo é formular e caracterizar sistemas microemulsionados para veiculação de siRNA na pele. As microemulsões foram avaliadas quanto à microscopia eletrônica de transmissão (MET), Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e calorimetria exploratória diferencial (DSC), evidenciando ser uma microemulsão do tipo A/O, uma vez que os termogramas obtidos aproximaram-se das características da fase oleosa. Além disso, o potencial de encapsulação do siRNA foi determinado por eletroforese e as formulações selecionadas também foram avaliadas através do ensaio de citotoxicidade, o qual comprovou o efeito citoprotetor das formulações aplicadas. Dessa forma, este trabalho propõe o desenvolvimento de uma nova abordagem da nanotecnologia associada à biologia molecular.

**Palavras-Chaves:** Nanotecnologia, Silenciamento gênico, siRNA, Terapia Gênica.

### INTRODUÇÃO

A interferência mediada por RNA é um fenômeno que ocorre praticamente em todas as células eucarióticas, podendo exercer um papel importante na eliminação de RNAs mensageiros (mRNA) anômalos através de pequenos RNAs interferentes (siRNA), que promovem o silenciamento gênico pós-transcricional (SUN; TSAO, 2008).

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).

Diante disso, as microemulsões (MEs) são sistemas promissores para a transfecção de siRNA (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.

## **METODOLOGIA**

Um diagrama de fases pseudoternário 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). A microemulsão foi obtida adicionando os seguintes componentes para as percentagens finais indicadas (w / w): 7,4% de uma mistura de propilenoglicol e água (3:1), 55,6% de uma mistura de Tween 80 e Span 80 (3:1) e 37% de óleo de canola. Outro sistema de microemulsão foi formulado através da adição do polímero catiônico,

polietilenoimina (PEI) 5%, que é comumente utilizado em aplicações de transporte de genes, na fase aquosa (3:3:1 de PEI, PPG e A, respectivamente). As microemulsões formuladas foram caracterizadas por seu aspecto morfológico, através da microscopia eletrônica de transmissão, onde 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)

A presença de siRNA nas microemulsões foi determinada por eletroforese em gel de agarose 0,6% contendo brometo de etídio (0,5mg/mL). Os complexos de ME/siRNA foram preparados para uma diluição final de 65µL com tempo de incubação de 10 minutos. A eletroforese foi realizada a 45V, com amperagem aberta, por 120 min (HUNG et al., 2005).

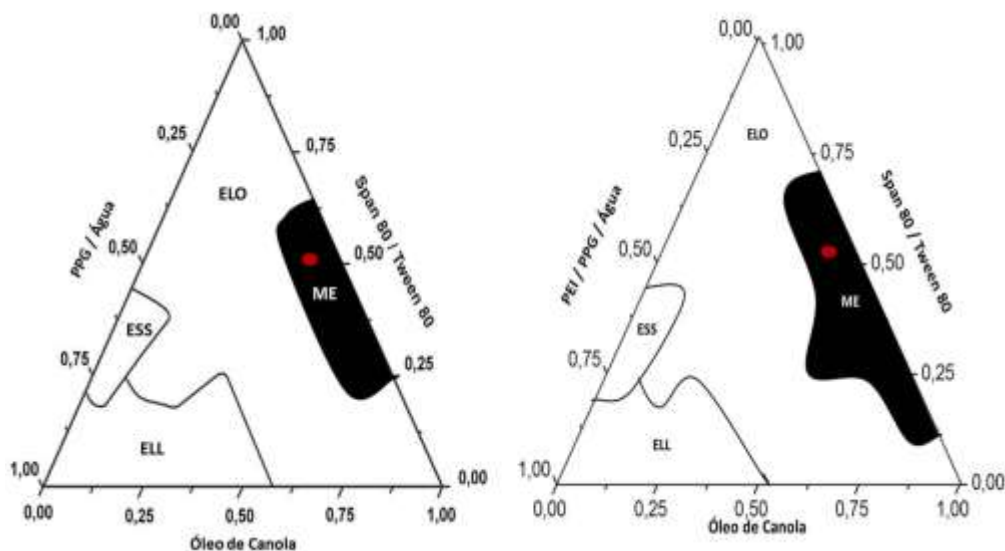
As curvas de DSC das MEs e componentes isolados foram obtidas em um módulo calorimétrico exploratório diferencial baseado no método de BOONME et al., (2006), onde as amostras de  $7,5 \pm 0,05$  mg foram acondicionadas em cadinhos de alumínio hermeticamente fechados. Inicialmente elas foram submetidas a resfriamento de 25 a  $-50$  °C, com taxa de  $5$  °C . min<sup>-1</sup>, 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<sup>-1</sup>, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de  $50$  mL . min<sup>-1</sup>.

Além disso, 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). O estudo de citotoxicidade foi determinado pelo teste do MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide].

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

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 1, sendo possível observar as variações de estado, como emulsão líquida opaca (ELO), emulsão líquida 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 1.** 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).

Macroscopicamente, a formulação sem PEI apresentou-se como um líquido amarelado, translúcido e ligeiramente 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, como pode ser visualizado na figura 2. 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 2.** Características macroscópicas das Microemulsões.



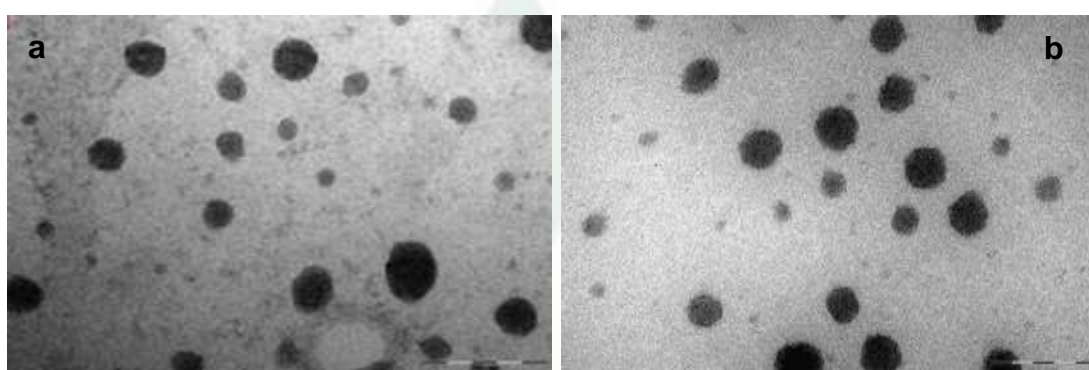
LEGENDA: À esquerda encontra-se a ME sem PEI; À direita representa à formulação com PEI.  
(FONTE: Dados da pesquisa).

Com relação às características ultraestruturais dos sistemas microemulsionados, pode-se observar na figura 3, que 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).

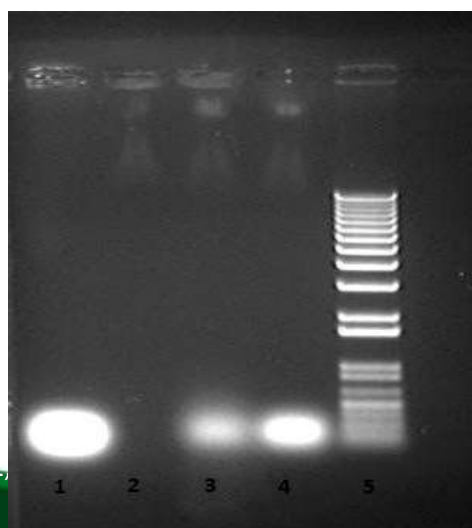
**Figura 3.** Ultraestrutura das Microemulsões.



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).

Na eletroforese (figura 4), foi avaliada a interação entre a microemulsão e o siRNA. Pode-se observar a presença das moléculas regulatórias nas bandas marcadas pelo brometo de etídio. Sugere-se que o PEI exerce fortes ligações com o siRNA e compactação, demonstrado pela banda menos intensa (banda 3), quando comparado àquele complexo sem o polímero catiônico (banda 4).

**Figura 4:** Eletroforese do complexo de microemulsão-siRNA.



LEGENDA: Banda 1: siRNA livre; Banda 2: Microemulsão; Banda 3: Microemulsão catiônica com siRNA; Banda 4: Microemulsão sem PEI e com siRNA; Banda 5: Padrão de peso molecular. (FONTE: Dados da pesquisa).

Foi utilizado o Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) a fim de caracterizar as formulações quanto ao tamanho e distribuição das gotículas. Dessa forma, é possível observar na tabela 1, que a adição do polímero às formulações resultou em gotículas menores, sugerindo um transporte mais eficiente e aumento da biodisponibilidade de siRNA. No entanto, pode-se observar 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).

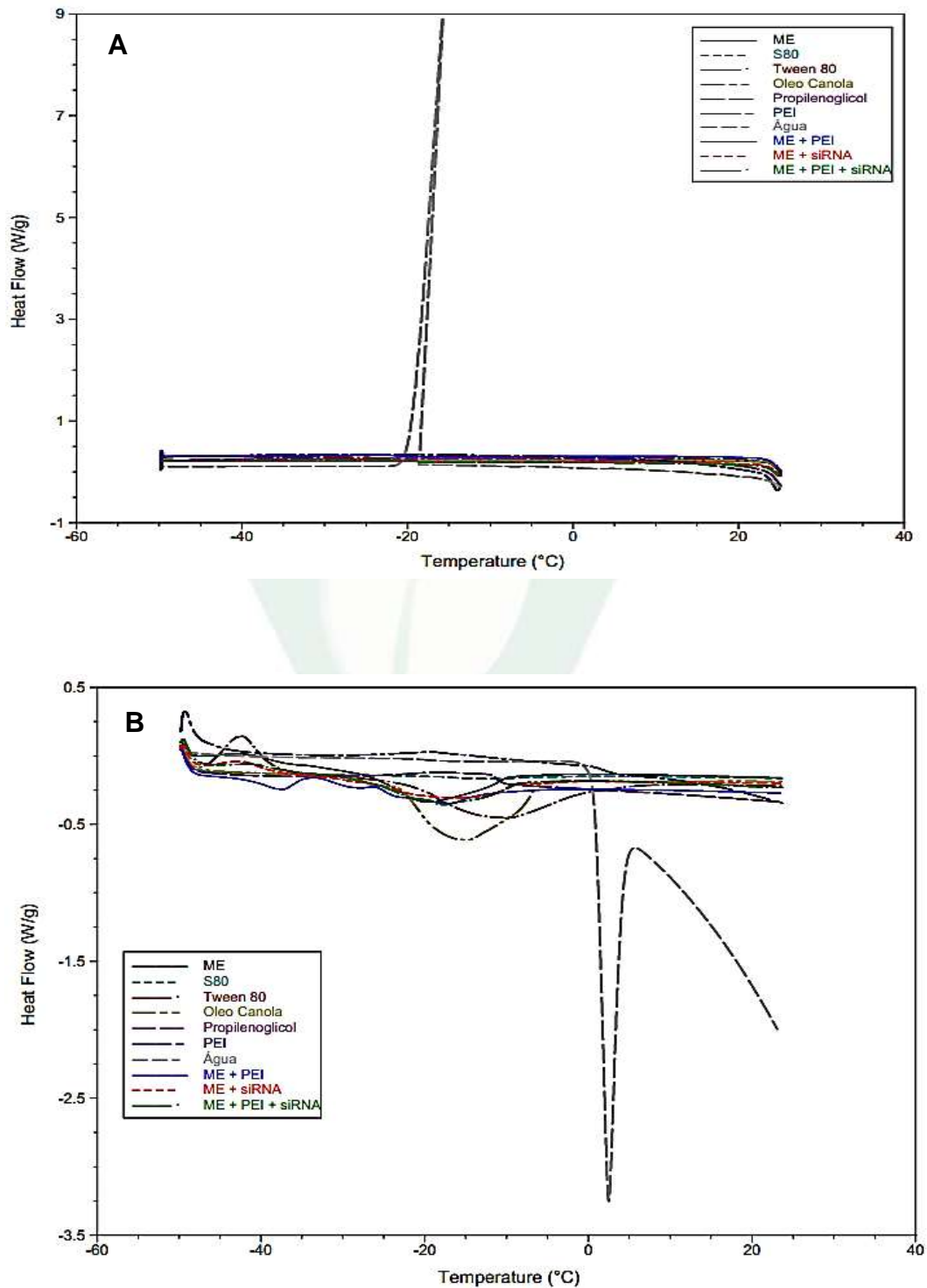
**Tabela 1.** Tamanho de gotículas e índice de polidispersão nas formulações.

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).

Com vista à determinação da microestrutura das MEs, a calorimetria exploratória diferencial (DSC) foi aplicada. Sendo assim, através da análise dos termogramas, 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 (Figura 5). As características da água não foram aparentes durante a análise dos termogramas, supondo que a mesma permaneceu confinada no interior das gotículas.

**Figura 5.** Termogramas dos componentes e MEs no ciclo de congelamento e aquecimento, respectivamente.

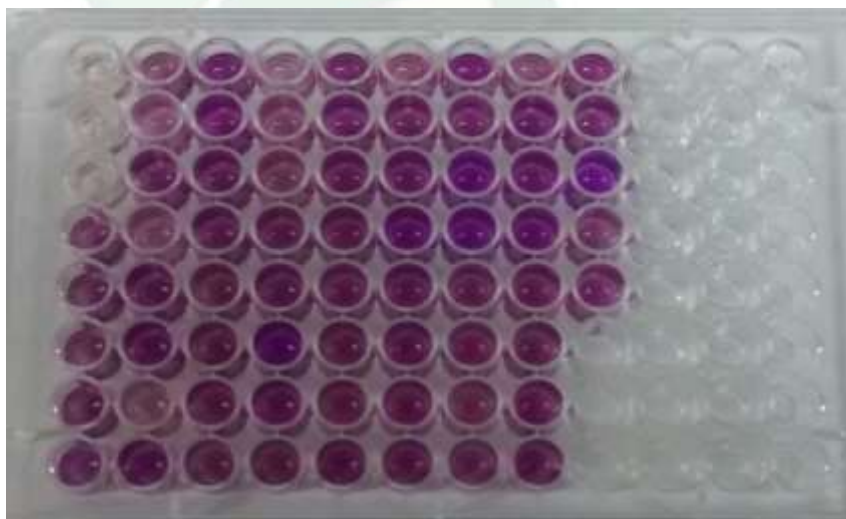


LEGENDA: A. Termogramas dos componentes e MEs no ciclo de congelamento. B. Termogramas dos componentes e MEs no ciclo de aquecimento.  
(FONTE: Dados da pesquisa).



Como método para o estudo de citotoxicidade *in vitro*, baseou-se 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 6). Assim, é possível estabelecer parâmetros de citotoxicidade e taxas de proliferação celular (MIZUNO, 2000).

**Figura 6.** Metabolização do MTT por fibroblastos após tratamento com as formulações microemulsionadas.

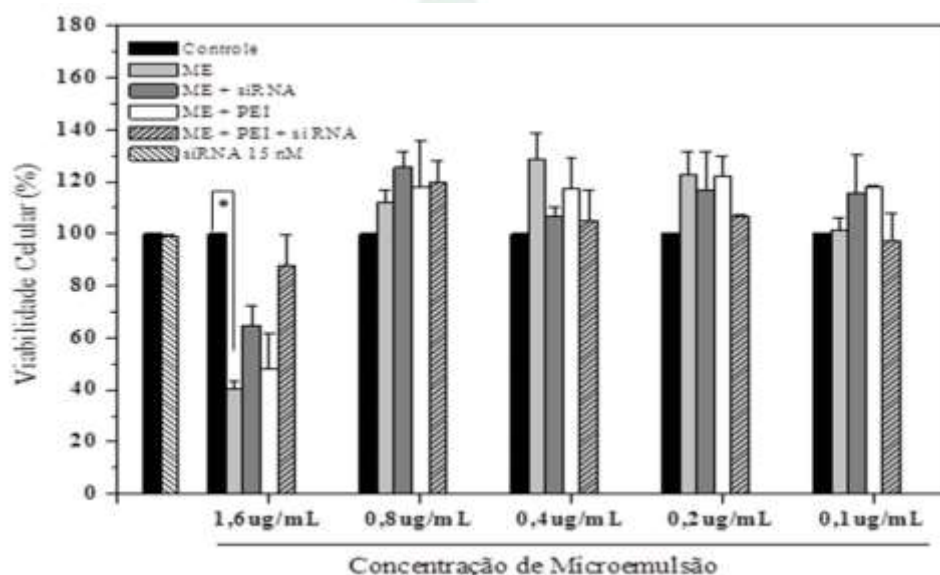


(FONTE: Dados da pesquisa).

Como demonstrado na Figura 7, o siRNA 15nM não exerceu toxicidade celular, bem como as formulações microemulsionadas com concentrações menores ou igual a 0,8 µg/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 µg/mL apresentou diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle (\*  $p < 0,05$ ). Segundo Albuquerque (2008), absorbância 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 7.** 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).

## CONCLUSÕES

Microemulsões A/O foram desenvolvidas para veiculação de RNA interferente para aplicação na terapia do fotoenvelhecimento. A adição do polímero catiônico PEI, 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 e MET foram determinantes para a confirmação da microestrutura das MEs em A/O e isotrópica, com gotículas arredondadas. Além disso, as formulações apresentaram propriedades citoprotetoras para concentrações  $\leq 0,8 \mu\text{g/mL}$ , o que permite sua aplicação clínica de forma segura. Dessa forma, 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.

## REFERÊNCIAS

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. *AAPS PharmSciTech*. 2006 Jun; 7(2): 99–104.

Damasceno B PGL. et al. Microemulsão: um promissor carregador para moléculas insolúveis. *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 2011; 32(1): 9-18.

Depieri LV. Desenvolvimento e Caracterização de Sistemas de Liberação Tópica a Base de Cristais Líquidos para Veiculação de siRNA na Terapia Gênica. Ribeirão Preto. Dissertação [Mestrado em Ciências Farmacêuticas] - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto; 2012.

Grampurohit N, Ravikumar P, Mallya R. Microemulsions For Topical Use – A Review. *Ind J Pharm Edu Res* 2011 Jan-Mar; 45(1): 100-107.

Huang L, Liu Y. In vivo delivery of RNAi with lipid-based nanoparticles. *Annu Rev Biomed Eng*. 2011 Aug; 15(13): 507-530.

Hung CF, Hwang TL, Chang CC, Fang JY. Physicochemical characterization and gene transfection efficiency of lipid emulsions with various co-emulsifiers. *INT J PHARM* 2005 Jan; 289(1-2): 197-208.

Klang V, Hatsko NB, Valenta C, Hofer F. Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. *Micron*. 2012 Feb; 43(2-3): 85-103.

Kreilgaard M. Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2002 Nov; 54(1): 77-98.

Kunieda H, Umizu G, Yamaguchi Y. Mixing effect of polyoxyethylene-type nonionic surfactants on the lipid crystalline structures. *J. Colloid Interface Sci*. 1999; 218(1): 88-96.

Neves K. Nanotecnologia em cosméticos. *Cosmetics & Toiletries* 2008 Jan-Fev; 20(1): 22.

Nimesh S, Chandra R. Polyethylenimine nanoparticles as an efficient in vitro siRNA delivery system. *Eur J Pharm Biopharm*. 2009 Sep; 73(1): 43-49.

Oliveira AG, Scarpa MV, Correa MA, Cera LFR, Formariz TP. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos. *Quim*. Nov. 2004; 27(1): 131-138.

Reischl D, Zimmer MSA. Drug delivery os siRNA therapeutics: potentials and limits of nanosystems. *Nanomedicine*. 2009 Mar; 5(1): 8-20.

Rodríguez-González R, Baluja A, Del Río SV, Rodríguez A, Rodríguez J, Taboada et al. Effects of sevoflurane postconditioning on cell death, inflammation and TLR expression in human endothelial cells exposed to LPS. *J Transl Med*. 2013 Apr; 11(87): 1-8.

Rossi CGFT, Dantas TNC, Dantas-Neto AA, Maciel MAM. MICROEMULSÕES: Uma Abordagem Básica e Perspectivas para Aplicabilidade Industrial. *Rev. Univ. Rural. Sér. Ci. Exatas e da Terra* 2007; 26(1): 45-66.

Sun BK, Tsao H. Small RNAs development an disease. *J Am Acad Dermatol*. 2008 Nov; 59(5): 725-737.

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*. 2010 Nov; 31(31): 8072-8080.