UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Lívia do Nascimento Grossi

Desenvolvimento de vesículas do tipo etossoma para o carreamento de siRNA para o silenciamento do gene MITF no tratamento do melasma

Juiz de Fora
2026

Lívia do Nascimento Grossi

Desenvolvimento de vesículas do tipo etossoma para o carreamento de siRNA para o silenciamento do gene MITF no tratamento do melasma

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito ao título de doutora em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Pittella Silva
Co-orientadora: Profa. Dra. Paula Rocha Chellini

Juiz de Fora
2026

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração
automática da Biblioteca Universitária da UFJF,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

do Nascimento Grossi, Lívia.
Desenvolvimento de vesículas do tipo etossoma para o carreamento de siRNA para o silenciamento do gene MITF no tratamento do melasma / Lívia do Nascimento Grossi. -- 2026.
144 f.

Orientador: Prof. Dr. Frederico Pittella Silva
Coorientadora: Prof. Dra. Paula Rocha Chellini
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2026.

1. melasma. 2. etossoma. 3. siRNA. 4. melanogênese. 5. silenciamento gênico. I. Pittella Silva, Prof. Dr. Frederico, orient. II. Rocha Chellini, Prof. Dra. Paula, coorient. III. Título.

Lívia do Nascimento Grossi

Desenvolvimento de vesículas do tipo etossoma para o carreamento de siRNA para o silenciamento do gene MITF no tratamento do melasma

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Ativos

Aprovada em 14 de setembro de 2026.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Paula Rocha Chellini - Coorientadora

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Gisele Assis Castro Goulart

Universidade Federal de Minas Gerais

Dr. Wilson Rodrigues Braz

Centro Universitário do Planalto de Araxá - UNIARAXÁ

Dra. Juliana de Carvalho da Costa

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Guilherme Diniz Tavares

Universidade Federal de Juiz de Fora

Juiz de Fora, 19/08/2026.

Documento assinado eletronicamente por **Paula Rocha Chellini**, **Professor(a)**, em 14/09/2026, às 18:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Juliana de Carvalho da Costa**, **Professor(a)**, em 14/09/2026, às 18:41, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Guilherme Diniz Tavares**, **Professor(a)**, em 15/09/2026, às 08:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Wilson Rodrigues Braz**, **Usuário Externo**, em 15/09/2026, às 18:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

Documento assinado eletronicamente por **Gisele Assis Castro Goulart**, **Usuário Externo**, em 17/09/2026, às 05:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020.

A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Uɳf (www2.uɳf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **3157919** e o código CRC **6ACBB3CB**.

Dedico este trabalho aos meus pais e marido que me inspiram e me auxiliam.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e pela sabedoria concedidas em cada etapa desta caminhada.

A minha família, em especial, aos meus pais, Mariza e Luiz, por todo incentivo, apoio e amor nesta jornada. Ao meu marido, Cássio, pela compreensão, carinho e estímulo e por estar ao meu lado em todos os momentos da minha vida.

Ao meu orientador Professor Dr. Frederico Pittella, por me acolher em seu laboratório; e ao grupo de pesquisa, pela confiança depositada, pelo exemplo profissional e pessoal, pelo conhecimento compartilhado e pelas oportunidades proporcionadas.

À Professora Dra. Paula Rocha Chellini, por me acolher como sua co-orientanda e compartilhar seu conhecimento.

Aos professores do programa, por todo incentivo, por todo conhecimento compartilhado até hoje, por serem exemplos de professores e pesquisadores.

Aos amigos do laboratório LDNano, em especial, à Natália, ao Wilson, à Kezia, ao Davi e Estael, por contribuírem grandiosamente em meus experimentos e por terem me apoiado durante esta jornada.

Ao Dr. Anderson Ferreira de Oliveira, Cientista da Fagron Solutions, por me inspirar e ser o ponto de partida para que esse projeto pudesse acontecer.

Aos Colegas do P&D da Fagron Solutions, em especial ao Adelino, por compartilhar sua experiência e contribuir significativamente para este trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo fomento dos estudos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo fomento dos estudos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo fomento dos estudos.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, contribuíram para que este trabalho fosse concluído. A cada um, minha eterna gratidão.

"*A imaginação é mais importante que o conhecimento. O conhecimento é limitado. A imaginação envolve o mundo*."

Albert Einstein

RESUMO

O melasma é uma condição dermatológica crônica e benigna caracterizada pela formação de máculas hiperpigmentadas, principalmente em regiões fotoexpostas, com elevada prevalência e impacto na autoestima. Apesar da existência de diferentes alternativas terapêuticas, o tratamento do melasma permanece desafiador, especialmente em razão das recorrências e necessidade de abordagens capazes de atuar nos mecanismos moleculares envolvidos na melanogênese. Nesse contexto, o fator de transcrição associado à microfitalmia (MITF) constitui um importante regulador da melanogênese, sendo considerado um alvo potencial para estratégias de silenciamento gênico. Assim, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e avaliar um sistema de liberação baseado em etossomas para o carreamento de siRNA direcionado ao gene MITF, visando à redução da produção de melanina. Inicialmente, foi realizado o desenvolvimento e a otimização da formulação por meio de planejamento fatorial 2^3 com ponto central, considerando diferentes concentrações de fosfatidilcolina, etanol e brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB). A formulação selecionada foi caracterizada quanto ao diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersividade por espalhamento dinâmico da luz, potencial Zeta por mobilidade eletroforética, morfologia por espectrofotometria de transmissão, estabilidade coloidal e eficiência de encapsulação do siRNA pelo método indireto por ultrafiltração/centrifugação. Posteriormente foram avaliadas a viabilidade celular, a internalização celular, liberação do siRNA, expressão gênica e avaliação da inibição da produção de melanina. O sistema obtido apresentou características físico-químicas compatíveis com a aplicação como nanocarreador, com diâmetro hidrodinâmico de aproximadamente de 47 ± 1,9 nm, índice de polidispersão de 0,23 ± 0,06, potencial Zeta de +43 ±1,8 mV e eficiência de encapsulação de 92 ± 0,5%. A morfologia mostrou vesículas esféricas com a presença da bicamada lipídica. A viabilidade celular foi superior a 70% para a formulação siRNA modificada com copolímero polietilenoglicol-bloco-poliglutamato. A análise por microscopia de fluorescência permitiu visualizar o núcleo celular e a vesícula contendo o fluoróforo Cy5 no interior da célula, apresentando evidências qualitativas compatíveis com a internalização celular. No ensaio de produção de melanina, observou-se redução da melanogênese em relação ao controle para o Etossoma-siRNA-PEG-pGLU, possivelmente pela redução da expressão do gene MITF, conforme observado por RT-qPCR. Os resultados obtidos

indicam que o sistema etossomal apresenta potencial como plataforma para o transporte de siRNA direcionado aos melanócitos para o silenciamento do gene MITF e como estratégia para modulação da produção de melanina, fornecendo subsídios para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas destinadas ao tratamento do melasma.

Palavras-chave: melasma; etossoma; siRNA; melanogênese; silenciamento gênico.

ABSTRACT

Melasma is a chronic and benign dermatological condition characterized by the formation of hyperpigmented macules, mainly in photoexposed areas, with high prevalence and a significant impact on self-esteem. Despite the availability of different therapeutic alternatives, the treatment of melasma remains challenging, particularly due to its recurrence and the need for approaches capable of acting on the molecular mechanisms involved in melanogenesis. In this context, the microphthalmia-associated transcription factor (MITF) is an important regulator of melanogenesis and is considered a potential target for gene silencing strategies. Therefore, the present study aimed to develop and evaluate an ethosome-based delivery system for the transport of siRNA targeting the MITF gene, with the purpose of reducing melanin production. Initially, the formulation was developed and optimized using a 2^3 factorial design with a central point, considering different concentrations of phosphatidylcholine, ethanol, and cetyltrimethylammonium bromide (CTAB). The selected formulation was characterized in terms of hydrodynamic diameter and polydispersity index by dynamic light scattering, zeta potential by electrophoretic mobility, morphology by transmission electron microscopy, colloidal stability, and siRNA encapsulation efficiency using an indirect ultrafiltration/centrifugation method. Subsequently, cell viability, cellular internalization, siRNA release, gene expression, and inhibition of melanin production were evaluated. The resulting system exhibited physicochemical characteristics compatible with its application as a nanocarrier, with a hydrodynamic diameter of approximately 47 ± 1.9 nm, a polydispersity index of 0.23 ± 0.06, a zeta potential of +43 ± 1.8 mV, and an encapsulation efficiency of 92 ± 0.5%. Morphological analysis revealed spherical vesicles with the presence of a lipid bilayer. Cell viability was above 70% for the siRNA formulation modified with the polyethylene glycol-block-polyglutamate copolymer. Fluorescence microscopy analysis enabled visualization of the cell nucleus and the vesicle containing the Cy5 fluorophore within the cell, providing qualitative evidence consistent with cellular internalization. In the melanin production assay, a reduction in melanogenesis compared with the control was observed for the siRNA-PEG-pGLU ethosome, possibly due to reduced MITF gene expression, as observed by RT-qPCR. The results indicate that the ethosomal system has potential as a platform for the delivery of siRNA to melanocytes for MITF gene silencing and as

a strategy for modulating melanin production, providing support for the development of new therapeutic approaches for the treatment of melasma.

Keywords: melasma; ethosome; siRNA; melanogenesis; gene silencing.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de variância

cDNA – DNA complementar (*complementary DNA*)

CTAB – Brometo de cetiltrimetilamônio (*cetyltrimethylammonium bromide*)

Cy5 – Cianina 5 (*Cyanine 5*)

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol (*4',6-diamidino-2-phenylindole*)

DHM – Diâmetro hidrodinâmico médio

DLS – Espalhamento dinâmico da luz (*dynamic light scattering*)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*)

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético (*ethylenediaminetetraacetic acid*)

EE – Eficiência de encapsulação

FBS – Soro fetal bovino (*fetal bovine serum*)

Glu – Glutamato

HA – Ácido hialurônico

MET/TEM – Microscopia eletrônica de transmissão (*transmission electron microscopy*)

MITF – Fator de transcrição associado à microftalmia (*microphthalmia-associated transcription factor*)

mRNA – RNA mensageiro (*messenger RNA*)

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio

NCBI – Centro Nacional de Informação Biotecnológica (*National Center for Biotechnology Information*)

PDI – Índice de polidispersidade (*polydispersity index*)

PEG – Polietilenoglicol (*polyethylene glycol*)

PEG-pGLU – Polietilenoglicol-bloco-poliglutamato

pH – Potencial hidrogeniônico

pZ – Potencial Zeta

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa (*quantitative polymerase chain reaction*)

RNA – Ácido ribonucleico (*ribonucleic acid*)

RNAi – RNA de interferência (*RNA interference*)

RT-qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa precedida de transcrição reversa (*reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*)

siMITF – siRNA direcionado ao gene MITF

siRNA – RNA de interferência pequeno (*small interfering RNA*)

UV – Ultravioleta

XTT – 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tons de pele segundo a classificação dos fototipos de Fitzpatrick.

Tabela 2 – Planejamento de experimento 2^3 com ponto central

Tabela 3 – Sequências de siRNA selecionadas para o gene MITF.

Tabela 4 – Sequências dos *primers* utilizados para análise da expressão do gene MITF.

Tabela 5 – Resultados do planejamento fatorial 2^3 com ponto central.

Tabela 6 – Resultados do ensaio de viabilidade celular por MTT para a linhagem celular SK-MEL-28.

Tabela 7 – Resultados do ensaio de viabilidade celular por MTT para a linhagem celular HaCaT.

Tabela 8 – Resumo do resultado do MTT para SK-MEL-28.

Tabela 9 – Caracterização do etossoma quanto ao DHM, PDI e pZ.

Tabela 10 – Curva de calibração do siRNA livre.

Tabela 11 – Resultados da eficiência de encapsulação (EE%).

Tabela 12 – Estabilidade do etossoma branca (sem ativo) armazenado sob refrigeração e em temperatura ambiente.

Tabela 13 – Estabilidade do etossoma-siRNA-PEG-pGLU armazenado sob refrigeração e em temperatura ambiente.

Tabela14 – Análise de variância para o etossoma branca e para o etossoma siRNA-PEG-pGLU.

Tabela 15 – Resultados do teste de Tukey.

Tabela 16 – Perfil de liberação de siRNA livre.

Tabela 17 – Perfil de liberação de siRNA-PEG-pGLU.

Tabela 18 – Expressão do gene MITF em SKMEL-28 após administração de Etossoma siRNA-PEG-pGLU

Tabela 19 – Avaliação do efeito inibitório da produção de melanina.

Tabela 20 – Estatística aplicada ao efeito inibitório da produção de melanina (Anova e Teste de Tukey)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO ---------- 15
2 REVISÃO DA LITERATURA ---------- 17
2.1 PELE E A PRODUÇÃO DE MELANINA ---------- 17
2.2 MELASMA - - -

4.2.10 Avaliação do efeito inibitório da produção de melanina 56
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA 57
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 58
5.1 SEQUÊNCIA DE siRNA E *PRIMERS* 58
5.2 DESENVOLVIMENTO E SELEÇÃO DA FORMULAÇÃO DO ETOSSOMA 60
5.3 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DE MTT 62
5.3.1 Viabilidade celular para a linhagem celular SK-MEL-28 63
5.2.2 Viabilidade celular para a linhagem celular HaCat 67
5.4 CARACTERIZAÇÃO DO ETOSSOMA 76
5.4.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade do etossoma e potencial Zeta 76
5.4.2 Determinação da morfologia do etossoma 82
5.4.3 Curva analítica e eficiência de encapsulação do siRNA 84
5.5 AVALIAÇÃO DA ESTABILIDADE COLOIDAL DO SISTEMA ETOSSOMAL 85
5.6 AVALIAÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO CELULAR POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA 95
5.7 PERFIL DE LIBERAÇÃO DO siRNA *IN VITRO* POR DIÁLISE 97
5.8 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE MITF POR RT-QPCR 104
5.9 AVALIAÇÃO DO EFEITO INIBITÓRIO DA PRODUÇÃO DE MELANINA 108
6 CONCLUSÃO 109
7 PERSPECTIVAS FUTURAS 113
8 PRODUÇÃO CIENTÍFICA 115
REFERÊNCIAS 117
APÊNDICES 138

1 INTRODUÇÃO

A pele, maior órgão do corpo humano, representando cerca de 15% do seu peso total, é estratificada em três camadas distintas: epiderme, derme e hipoderme. A epiderme é principalmente composta por células residentes, conhecidas como queratinócitos, e pelos melanócitos, que desempenham um papel fundamental na produção do pigmento melanina, responsável pela coloração da pele (Lorz *et al.*, 2019). A segunda camada, a derme, é rica e complexa, possuindo uma variedade de estruturas, como fibroblastos, vasos sanguíneos, glândulas sebáceas e sudoríparas, terminações nervosas, receptores sensoriais e folículos pilosos. Finalmente, a camada mais profunda da pele, a hipoderme, consiste principalmente em tecido adiposo subcutâneo (Kim *et al.*, 2019).

A melanina presente na epiderme desempenha um papel fundamental na proteção da pele contra os danos causados pelos radicais livres e radiação ultravioleta. Os melanócitos, células produtoras de melanina, são responsáveis por sua síntese, sendo a tirosinase a enzima chave, ao converter a L-tirosina em L-diidroxifenilalanina (L-DOPA) e dopaquinona, precursores da melanina (Wolff *et al.*, 2011). Na sequência, a L-DOPA pode ser convertida em feomelanina ou eumelanina, dependendo das interações com outras proteínas, como a tautomerase dopacromo e a proteína relacionada à tirosinase 1. Após a síntese, os melanócitos transportam melanossomas carregados dessas melaninas para os queratinócitos da epiderme, oferecendo proteção contra os raios UV (Regazzetti *et al.*, 2018; Yuan; Jin, 2018; KIM *et al.*, 2016).

O melasma é uma condição caracterizada por hiperpigmentação localizada em áreas expostas ao sol, sendo mais comum na face. Suas manchas hipercrômicas variam em tonalidades de marrom claro a marrom escuro, apresentando limites irregulares e simetria. Devido à natureza crônica e recorrente, o melasma afeta significativamente a qualidade de vida, por causa do impacto psicossocial e emocional (Colferai, 2018; Taraz, 2017).

O tratamento convencional do melasma geralmente envolve agentes despigmentantes, com foco na inibição da enzima tirosinase. No entanto, muitos desses agentes podem causar efeitos colaterais indesejados, como despigmentação inadequada, dermatite irritante e ocronose. Portanto, tecnologias inovadoras como a regulação de expressão de genes por ação do RNA de interferência e suas moléculas

efetoras, como o siRNA (*short interfering RNA)* podem possibilitar de modulação de genes específicos relacionados à pigmentação da pele, como o MITF (Fator de transcrição associado à microftalmia). O MITF desempenha um papel central na regulação da produção de melanina, influenciando genes associados à síntese de melanina, como a tirosinase (Goding; Arnheiter, 2019; Gelmi *et al.*, 2022).

A utilização de siRNA apresenta a vantagem de permitir o silenciamento específico e pós transcricional de genes de interesse, possibilitando a modulação de vias celulares sem a necessidade de interferir diretamente na estrutura do DNA. Apesar do potencial terapêutico do siRNA, sua aplicação tópica apresenta importantes limitações relacionadas às características físico-químicas da molécula (Dong; Siegwart; Anderson, 2019).

Por apresentar elevada massa molecular, carga negativa e baixa estabilidade em determinadas condições, o siRNA apresenta dificuldade para atravessar as barreiras biológicas e alcançar o compartimento intracelular em quantidade suficiente para promover o silenciamento gênico. Na administração tópica, essa limitação é ainda mais relevante em razão da função de barreira desempenhada pelo estrato córneo, que restringe a penetração de moléculas hidrofílicas e de maior tamanho. Além disso, após alcançar o meio extracelular, o siRNA pode sofrer degradação enzimática e apresentar baixa capacidade de internalização celular (Dong; Siegwart; Anderson, 2019).

Diante dessas considerações, o desenvolvimento de um sistema vesicular capaz de transportar siRNA contra o gene *MITF* representa uma abordagem inovadora como estratégia de modulação molecular da melanogênese. A associação entre a tecnologia de RNAi e um sistema nanovesicular pode contribuir para superar algumas das limitações relacionadas à utilização de siRNA livre, favorecendo sua proteção, incorporação, interação celular e disponibilidade intracelular a partir da administração tópica.

Portanto, este trabalho teve como objetivo desenvolver e caracterizar um nanocarreador do tipo etossoma para o transporte de siRNA contra o gene *MITF*, visando a modulação da melanogênese como estratégia para o tratamento tópico do melasma.

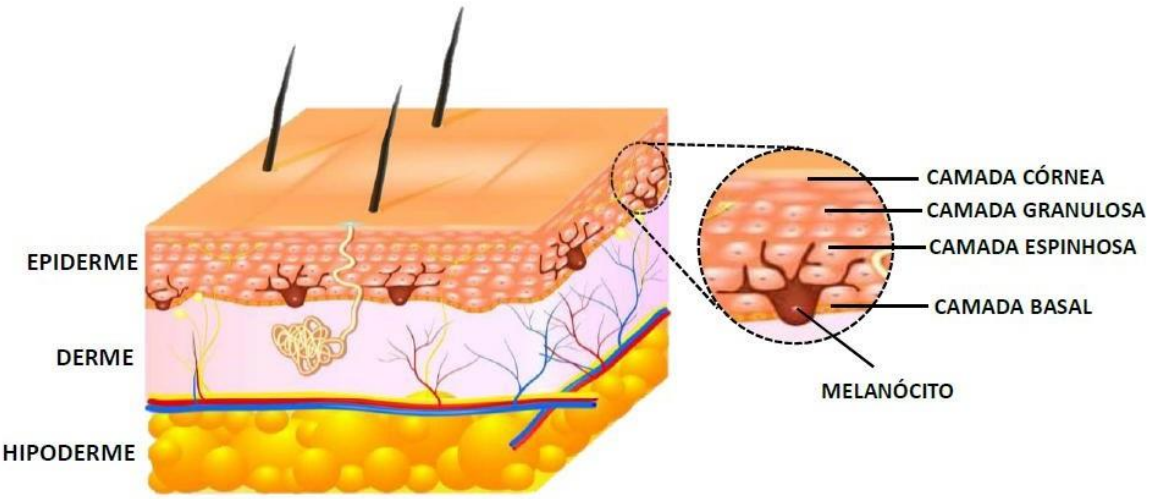
2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A PELE E A PRODUÇÃO DE MELANINA

A pele (**Figura 1**) é o maior órgão do corpo humano e desempenha várias funções vitais, incluindo proteção contra agressões externas de natureza infecciosa, química, danos físicos e perda hídrica. É capaz de oferecer proteção contra radiação ultravioleta e regulação da temperatura corporal, sendo composta por três camadas principais: a epiderme, a derme e a hipoderme (Lorz *et al.*, 2019).

A coloração da pele é determinada pela presença de melanina, um pigmento biológico produzido pelas células da pele como um mecanismo de autoproteção, servindo como um absorvente natural de espécies reativas de oxigênio, bem como uma barreira física aos raios ultravioleta. Embora a melanogênese seja um processo benéfico para evitar os estímulos danosos externos, a deposição excessiva ou irregular de melanina pode causar distúrbios hiperpigmentares desfavoráveis como o melasma (Kim *et al.*, 2019).

Figura 1- Estrutura da pele e suas camadas



Fonte: https://www.sienceabc.com/humanas

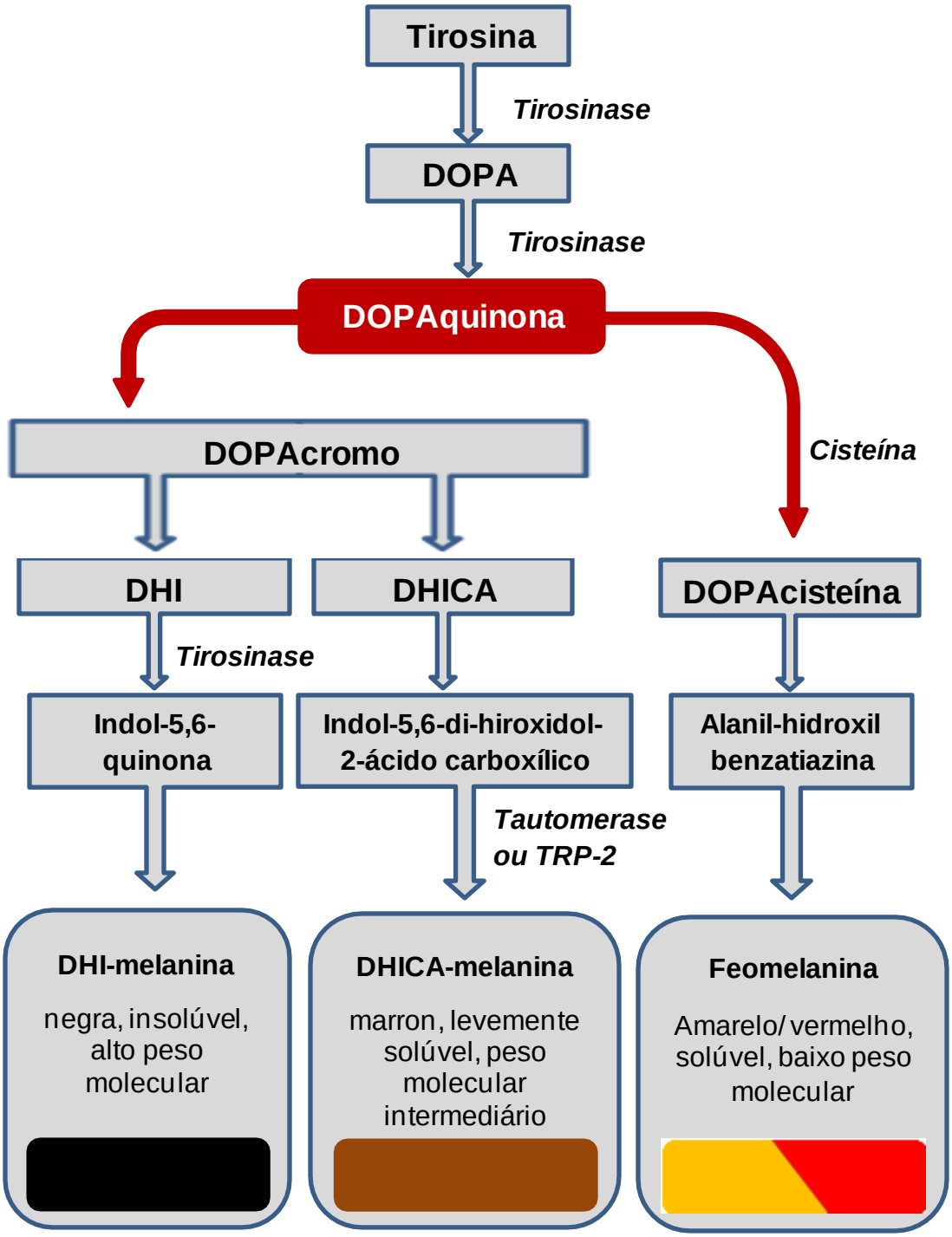
Na camada mais externa da pele, a epiderme, há várias camadas de células, incluindo queratinócitos, células de *Langerhans* (células do sistema imunológico) e melanócitos. A derme, camada intermediária, contém fibras de colágeno, vasos

sanguíneos, glândulas e terminações nervosas. A hipoderme, camada mais profunda, é composta por tecido adiposo e vasos sanguíneos (Ross; Pawlina, 2018).

Os melanócitos, células especializadas encontradas na camada basal da epiderme, são responsáveis pela produção de melanina, um pigmento que além da proteção especificada acima, confere cor à pele, cabelo e olhos. Os melanócitos possuem dendritos longos que se estendem entre os queratinócitos da epiderme, permitindo a transferência da melanina produzida para as células vizinhas (Gartner, 2017).

A melanina é produzida por uma série de reações bioquímicas que ocorrem dentro dos melanócitos. O pH do melanossoma afeta a atividade enzimática melanogênica e influência na polimerização da melanina. O aminoácido tirosina, encontrado na dieta, e sintetizado pelo organismo, é o precursor da melanina, sendo convertidado em DOPA (3,4-dihidroxifenilalanina) pela enzima tirosinase (Pillaiyar *et al*., 2018). Esta é uma etapa limitante crítica na melanogênese, uma vez que a inibição desta etapa bloqueia a síntese de melanina. Nestas reações, a DOPA age como cofator e como substrato para a tirosinase. A DOPA é então oxidada em *DOPAquinona*, e a partir deste momento é convertida em DOPAcromo ou *DOPAcisteína*. Seguindo a via da conversão em *DOPAcromo*, será convertida em 5,6-dihidroxiindol (DHI) ou 5,6-dihidroxiindol-2-carboxílico (DHICA) e, posteriormente, ocorrendo a catalisação pela enzima DOPA-cromo tautomerase ou TRP-2 (proteína relacionada a tirosinase), tem-se a formação da eumelanina, que pode apresentar tonalidade marrom ou preta (Ito; Wakamatsu, 2008). O nível de conversão parece ter relação com a proporção DHI/DHICA, onde uma taxa maior de conversão leva a formação da melanina preta e uma taxa menor de melanina marrom (Wakamatsu; Zippin; Ito, 2021). Para a síntese de feomelanina, a *DOPAquinona* também pode ser combinada com glutationa ou cis *DOPAquinona*; a DOPA é então convertida em dopaquinona (Wolff *et al.*, 2011). Esta cascata de melanogênese está representada na **Figura 2**.

Figura 2 – Biossíntese de melanina



Fonte: adaptado de Wolff *et al.*, 2011

As partículas de melanina formadas são transferidas para os queratinócitos adjacentes, onde formam um escudo protetor em torno do núcleo celular. Isso ajuda a proteger o DNA das células da pele dos danos causados pelos raios UV. A produção de melanina é regulada por diversos fatores, incluindo hormônios, exposição solar,

genética e citocinas inflamatórias. (Regazzetti *et al.*, 2018; Yuan; Jin, 2018; Kim *et al.*, 2016).

De maneira semelhante aos queratinócitos, os fibroblastos e as células do sistema imunológico presentes na derme, estão envolvidos na regulação do comportamento dos melanócitos através da produção de fatores parácrinos. Além disso, as proteínas da matriz extracelular, também regulam a morfologia e a função do melanócito, ao mesmo tempo, que fornecem suporte estrutural entre a epiderme e a derme, controlando da distribuição de citocinas envolvidas na melanogênese (Yuan, 2018).

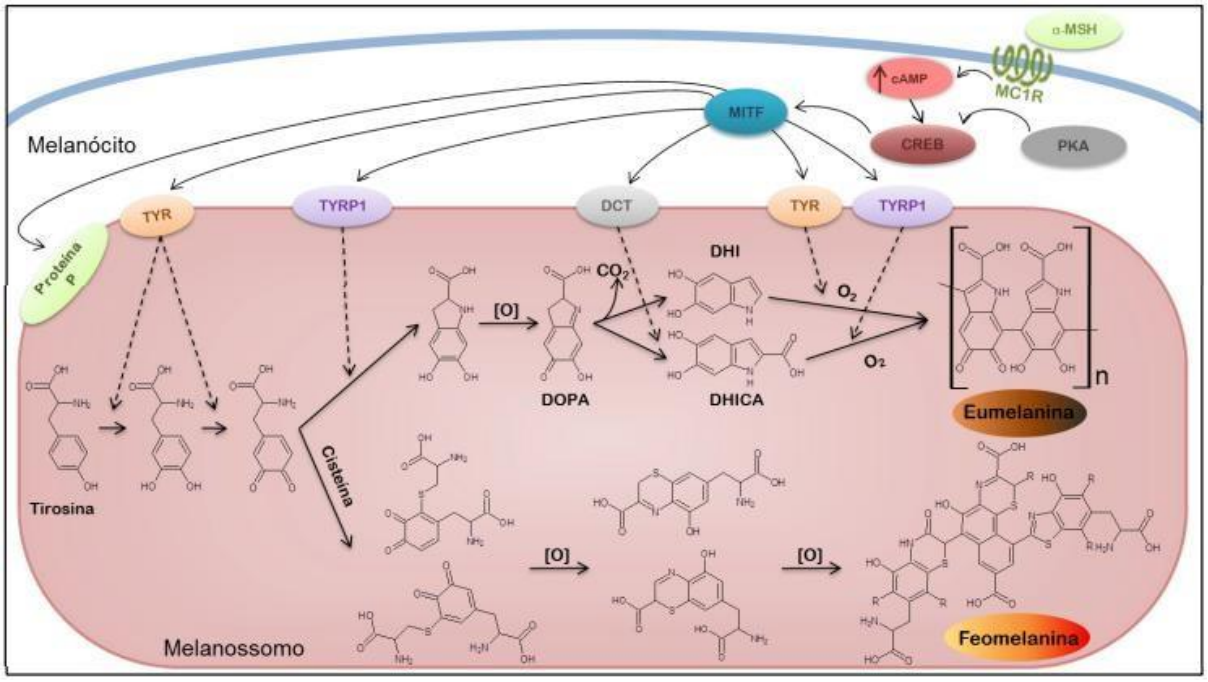
Outro regulador importante no desenvolvimento, função e sobrevivência dos melanócitos é o fator de transcrição associado à microftalmia - MITF. O MITF medeia os efeitos significativos do hormônio estimulador de α-melanócitos, hormônio estimulante de melanócitos na diferenciação por meio da regulação transcricional de enzimas que são essenciais para a produção de melanina, ou seja, tirosinase, proteína 1 relacionada à tirosinase P1 e proteína 2 relacionada à tirosinase P2/dopacrome-tautomerase (Miller; Mihm, 2006; Hemesath *et al.*, 1994). A inibição da atividade da tirosinase ainda é a abordagem mais relatada como meio de clareamento da pele (Solano *et al*., 2006; Zolghadri *et al*., 2023). Outros métodos usados incluem a inibição de MITF, a regulação negativa da atividade do receptor de melanocortina 1 (MC1R), interferência na transferência melanossômica e perda de melanócitos (Kamakchi, 2012).

O gene MITF está envolvido em diversos processos cruciais para a formação e atividade dos melanócitos. Ele codifica um fator de transcrição que regula a expressão de genes relacionados à produção de melanina, como a tirosinase, enzima-chave no processo de síntese da melanina. Além disso, o gene MITF desempenha um papel crucial na diferenciação dos melanócitos a partir de células progenitoras indiferenciadas durante o desenvolvimento embrionário (Thomas; Erickson, 2008). Ele regula a expressão de genes que direcionam a formação e a migração dos melanócitos para as áreas da pele onde a pigmentação é necessária (Goding; Arnheiter, 2019; Gelmi *et al.*, 2022). A proteína codificada pelo gene MITF regula a expressão das proteínas transmembranas TYR, TYRP1 e DCT que estão diretamente envolvidas na síntese dos pigmentos, além de regular também a expressão do gene OCA2 que transcreve a proteína transmembrana P, possivelmente responsável pelo controle do pH no melanossomo (Tully, 2007; Sturm, 2009; Ancans *et al*., 2001). A

estrutura que representa a eumelanina, na **Figura 3** é uma das várias estruturas de monômeros que podem compor esse polímero (Riesz, 2007).

A expressão do gene MITF pode ser regulada por estímulos externos, como a exposição aos raios ultravioleta (UV). A radiação UV é capaz de ativar os receptores de melanocortina nas células da pele, levando à expressão aumentada do gene MITF e, consequentemente, ao aumento da produção de melanina como uma resposta de defesa contra a radiação UV (Elkoshi *et al.*, 2023).

Figura 3 – Papel do gene MITF na regulação da síntese de eumelanina e feomelanina nos melanócitos.



α-MSH: hormônio estimulador de melanócitos alfa; MC1R: receptor 1 de melanocortina; cAMP: adenosina monofosfato cíclico; PKA: proteína quinase A; CREB: proteína de ligação ao elemento de resposta ao cAMP; MITF: fator de transcrição associado à microftalmia; TYR: tirosinase; TYRP1: proteína 1 relacionada à tirosinase; DCT: dopacromo tautomerase; DHI: 5,6-diidroxi-indol; DHICA: ácido 5,6-diidroxi-indol-2-carboxílico; O_2: oxigênio molecular; CO_2: dióxido de carbono; [O]: oxidação.
Fonte: Marcorin, 2017

Variações genéticas no gene MITF podem resultar em distúrbios pigmentares, como a síndrome de Waardenburg e a síndrome do olho de gato. Essas condições

são caracterizadas por desordens na pigmentação da pele, cabelo e olhos devido a mutações que afetam a função do MITF (Kumawat *et al.*, 2019).

Portanto, o nível de expressão do gene MITF desempenha um papel crucial na regulação da produção de melanina, afetando a expressão de genes envolvidos na síntese do pigmento, na proliferação e sobrevivência dos melanócitos, e no fenótipo dessas células. Sua ativação e regulação são altamente sensíveis a uma variedade de sinais e estímulos, o que permite uma adaptação dinâmica à exposição ao ambiente e à necessidade de proteção contra a radiação UV (Gelmi *et al.*, 2022).

2.2 MELASMA

O melasma é uma condição cutânea caracterizada por áreas de hiperpigmentação visíveis na pele, manifestando-se como manchas de coloração mais escura do que a pele circundante. Essas manchas podem variar em tamanho, forma e intensidade de pigmentação. Geralmente são simétricas, aparecendo em ambos os lados do rosto (Rahimi *et al.*, 2023). A cor das manchas varia do marrom claro ao marrom escuro, podendo também assumir tons acinzentados, que ocorrem principalmente em áreas do corpo expostas ao sol, como o rosto, a testa, as bochechas e o lábio superior (Colferai, 2018; Taraz, 2017). Esta condição é mais comum em mulheres, especialmente durante a idade fértil, embora também possa afetar homens (Colferai, 2018; Zhou; Baibergenova, 2017; Ayres *et al.*, 2016).

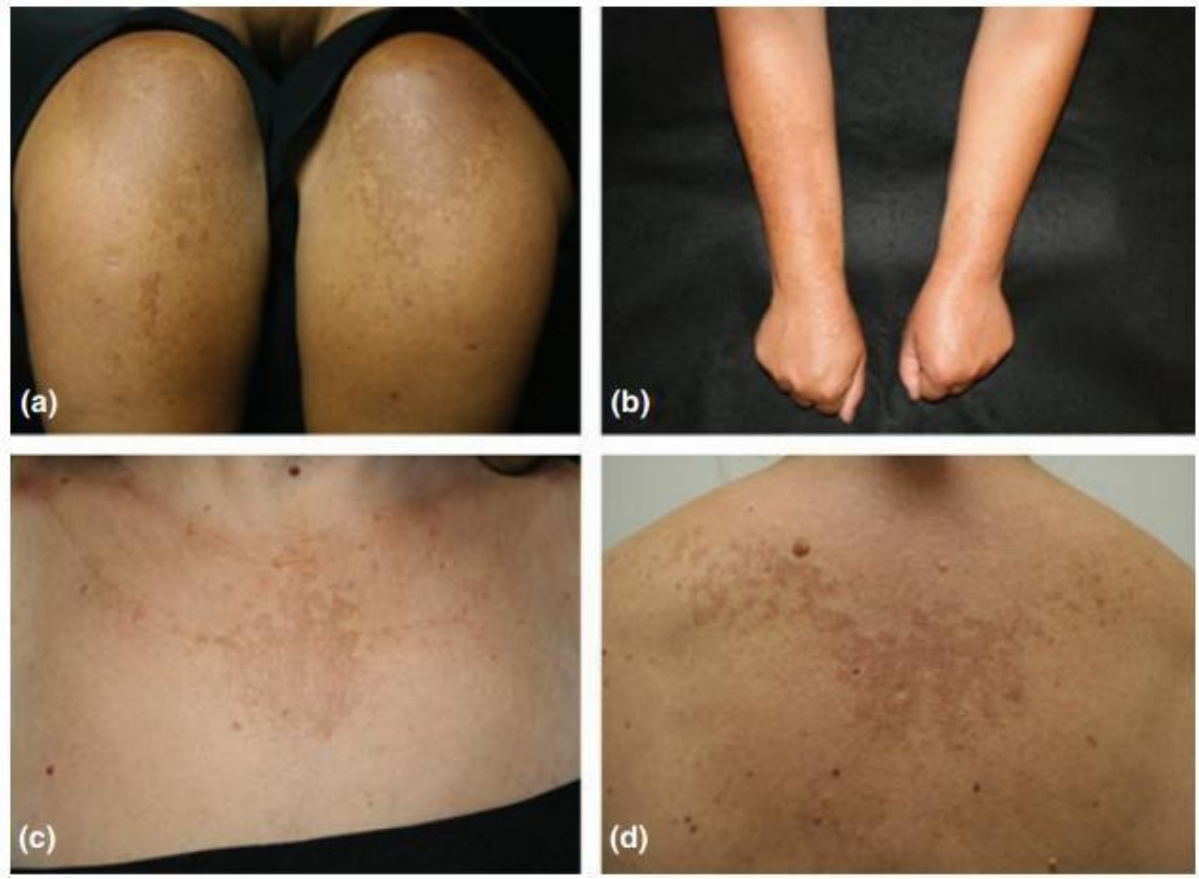
Conforme a região afetada, o melasma pode ser classificado em: *padrão centro-facial*, quando envolve fronte, dorso do nariz, região malar, lábio superior e queixo; *padrão malar*, quando afeta regiões malares e dorso do nariz e *padrão mandibular ou periférico*, quando distribuído ao longo da linha mandibular (Lozer; David, 2014; Perper, 2017). A localização do melasma pode ser vista na **Figura 4**. Em alguns casos, o pescoço, a face extensora dos braços e parte das costas também são acometidos, sendo classificado como *melasma extra-facial* (Grimer, 2018). O aspecto clínico do melasma extra-facial pode ser visto na **Figura 5**.

Figura 4 – Localização do melasma.



Fonte: Damevska, 2014 p.7

Figura 5 – Aspectos clínicos do melasma extra-facial.



Legenda: (a) braços; (b) ante-braços; (c) peito; (d) parte superior das costas

Fonte: Ritter *et al*., 2013.

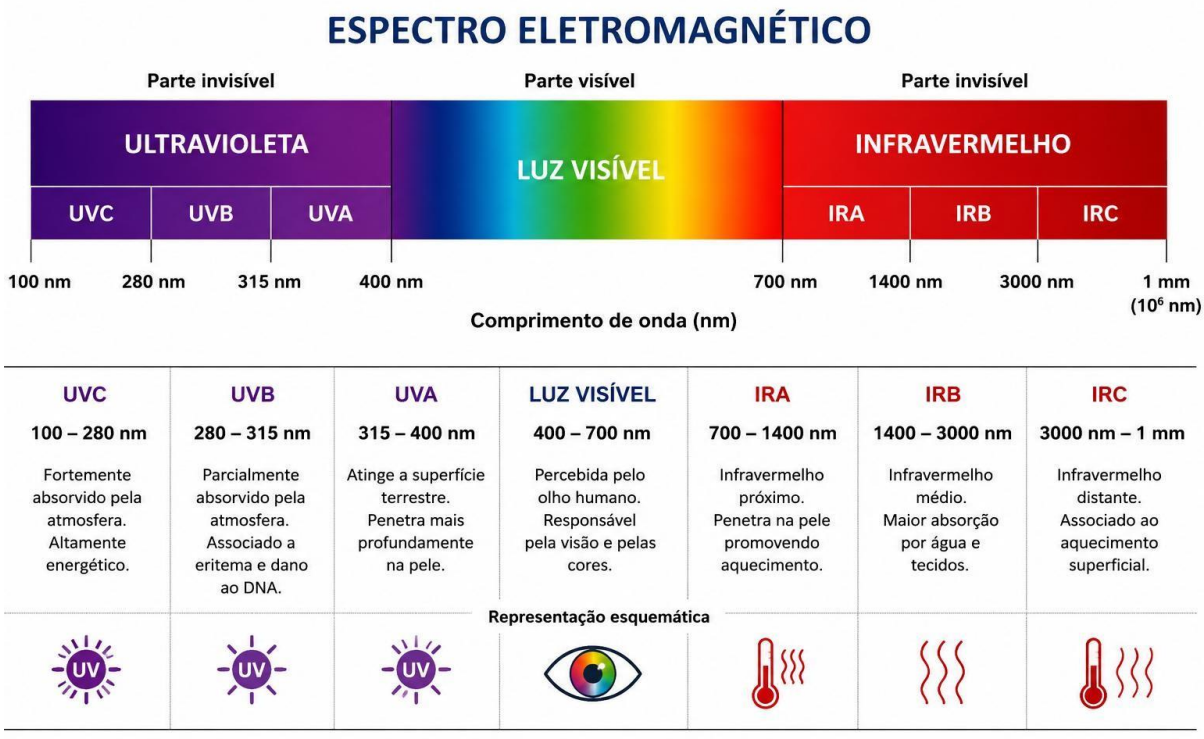
O padrão mais frequente é o centro-facial, que acomete aproximadamente 65% das pessoas que apresentam melasma, seguido pelo padrão malar, em torno de 20% dos casos e, por fim, o padrão periférico, com um acometimento de 15% (Cestari, 2014).

O melasma é resultado de uma combinação complexa de fatores genéticos, hormonais, ambientais e exposição à radiação ultravioleta (UV) (Epósito *et al.*, 2022). Algumas das principais causas e fatores contribuintes incluem*:*

1. Exposição Solar: A radiação UV do sol é um dos principais desencadeantes do melasma. A exposição ao sol aumenta a atividade dos melanócitos, as células produtoras de melanina, resultando em uma produção excessiva de pigmento (Passeron, 2018). A irradiação solar que atinge a superfície da terra é composta por três segmentos (**Figura 6**): infravermelho (780-5000nm), luz visível (400-780nm) e ultravioleta (290-400nm) (Castanedo-Cazares, 2013).

A radiação ultravioleta atua na melanogênese através de estímulos direto no melanócito e indireto nos queratinócitos, com liberação de fatores pró-melanogênicos, que propiciam aumento dos dentritos, maior transferência de melanossomos e proliferação de melanócitos (Regazzetti, 2018);

Figura 6- Espectro da radiação solar



Nota: 1 nm (nanômetro) = 10^{-9} m; 1 mm (milímetro) = 10^{-3} m.
Fonte: Adaptado de NIST – *National Institute of Standards and Tecnology*. NIST *Special Publication 250-81*: *Guide to te Selection of wavelengths for Optical Materials, Filters, and Coatings. Gaithersburg*, MD, USA, 2008.

2. Hormônios: Flutuações hormonais, como as que ocorrem durante a gravidez, o uso de contraceptivos orais e a terapia de reposição hormonal, podem estimular os melanócitos e desencadear o melasma. Esse tipo de melasma é muitas vezes chamado de "máscara da gravidez" (Cario, 2019; Grimer, 2018; Ogbechie-Godec, 2017);

3. Predisposição Genética: Histórico familiar de melasma pode aumentar a probabilidade de desenvolvimento da condição, sugerindo uma influência genética na predisposição (Epósito *et al.*, 2022). A base genética do melasma é sustentada por sua ocorrência em parentes de primeiro grau, conforme relatado por 41-61% dos pacientes no Brasil, incluindo irmãs gêmeas idênticas, enquanto a prevalência geral esperada em adultos na mesma região é de 16 a 28% (Epósito *et al.*, 2020);

4. Etnia e Fototipos de Pele: Indivíduos com pele morena e escura, especialmente aqueles de origem asiática, hispânica ou africana, têm maior predisposição ao melasma devido à maior produção de melanina (Mahajan *et al.*, 2022; Eposito *et al.*, 2022). Porém, o melasma é uma condição que pode afetar todos os fototipos de pele, sendo mais comum em indivíduos de fototipos intermediários a altos - fototipos III e IV de Fitzpatrick (Colferai, 2018; Zhou, 2017), **Tabela 1**.

Tabela 1 – Tons de pele segundo a classificação dos fototipos de Fitzpatrick.

Fototipos	Cor da pele	Características	Sensibilidade ao sol
I 	Branca	Queima com facilidade, nunca bronzeia	Muito sensível
II 	Branca	Queima com facilidade, bronzeia muito pouco	Sensível
III 	Morena clara	Queima moderadamente, bronzeia moderadamente	Moderadamente sensível
IV 	Morena	Queima pouco, bronzeia moderadamente	Minimamente sensível
V 	Morena escura	Queima raramente, bronzeia bastante	Pouco sensível
VI 	Negra	Nunca queima, totalmente pigmentada	Insensível

Fonte: adaptado de Schimidt, (2011).

Embora o melasma não seja uma condição médica grave, seu impacto psicossocial pode ser significativo. A aparência visível das manchas escuras pode afetar a autoestima, a confiança e a qualidade de vida dos indivíduos que as possui. Isso pode levar a sentimentos de constrangimento e isolamento social, especialmente em culturas onde a aparência da pele é altamente valorizada (Mckesey *et al.*, 2019; Perper, 2017; Lima, 2017; Yadav *et al*., 2018).

O melasma é uma condição dermatológica prontamente diagnosticada por meio de exame clínico. No entanto, apresenta uma característica crônica, com recorrências frequentes e grande resistência aos tratamentos existentes (Grimes, 2018; Kang, 2010). Assim, o tratamento é desafiador, devido à natureza multifatorial da condição e à resposta variável dos pacientes aos diferentes métodos terapêuticos (Neagu *et al.*, 2021; Suggs, 2018; Fabbrocini, 2011).

Os tratamentos convencionais visam controlar a produção de melanina e melhorar a aparência da pele afetada. No entanto, essas abordagens têm suas limitações.

O uso regular de protetor solar é fundamental para prevenir a piora do melasma devido à exposição solar. No entanto, essa abordagem é mais preventiva do que curativa e pode não ser suficiente para tratar manchas já existentes (Passeron *et al.*, 2021).

A Hidroquinona, ácido azelaico, ácido kójico, niacinamida, cisteamina, tiamidol, arbutina, clobetazol, ácido tranexâmico associado a microagulhamento são agentes frequentemente utilizados para reduzir a hiperpigmentação. Embora possam proporcionar algum clareamento, seu efeito pode ser gradual e requer uso contínuo. Além disso, alguns pacientes podem experimentar irritação, vermelhidão ou sensibilidade (Cassiano *et al.*, 2022).

Os retinóides têm como alvo várias vias de sinalização na melanogênese. Eles reduzem a transcrição da tirosinase e a síntese de melanina, causando rápida perda de pigmento por meio da epidermopoiese (Romero *et al.*, 1994). Assim, são usados em monoterapia ou em combinação para tratar melasma e hiperpigmentação pós-inflamatória, ajudando a acelerar a renovação celular e promovendo o clareamento gradual da pele (Wang; Schoenberg; Saedi, 2019; Sadick *et al.*, 2019). No entanto, também podem causar irritação, especialmente em peles sensíveis, e demorar várias semanas para mostrar resultados visíveis.

Terapias a laser, como o laser de picossegundos e a luz intensa pulsada, visam alvejar a melanina nas manchas escuras. Os recursos/terapias com laser e luz devem ser usados em casos resistentes e são necessários agentes despigmentantes antes e depois do tratamento (Küçük, 2018; Sadick, 2019; Shah; Auragabadkar, 2019). Embora possam ser eficazes para algumas pessoas, esses procedimentos podem ser dolorosos, requererem várias sessões e, em alguns casos, podem levar a efeitos colaterais como vermelhidão, irritação e hiperpigmentação paradoxal, especialmente em fototipos altos (Sadick, 2019).

Os *peelings* químicos utilizam ácidos para esfoliar a camada superficial da pele, ajudando a diminuir a aparência das manchas escuras. O ácido glicólico é o mais amplamente usado, sendo que o ácido salicílico representa uma opção mais segura para fenótipos sensíveis e escuros (Sarkar *et al.*, 2016). Entretanto, esses procedimentos também podem resultar em sensibilidade, descamação, hiperpigmentação pós-inflamatória e vermelhidão temporária.

Embora os tratamentos convencionais para o melasma possam oferecer benefícios em termos de clareamento da pele e redução da hiperpigmentação, suas

limitações podem dificultar a obtenção de resultados consistentes e duradouros. Diante dessas limitações, abordagens inovadoras, como o silenciamento do gene MITF, apresentam-se como alternativa para superar os desafios associados ao tratamento do melasma e proporcionar alternativas mais eficazes, duradouras e personalizadas.

2.3 INTERFERÊNCIA POR RNA (RNAi)

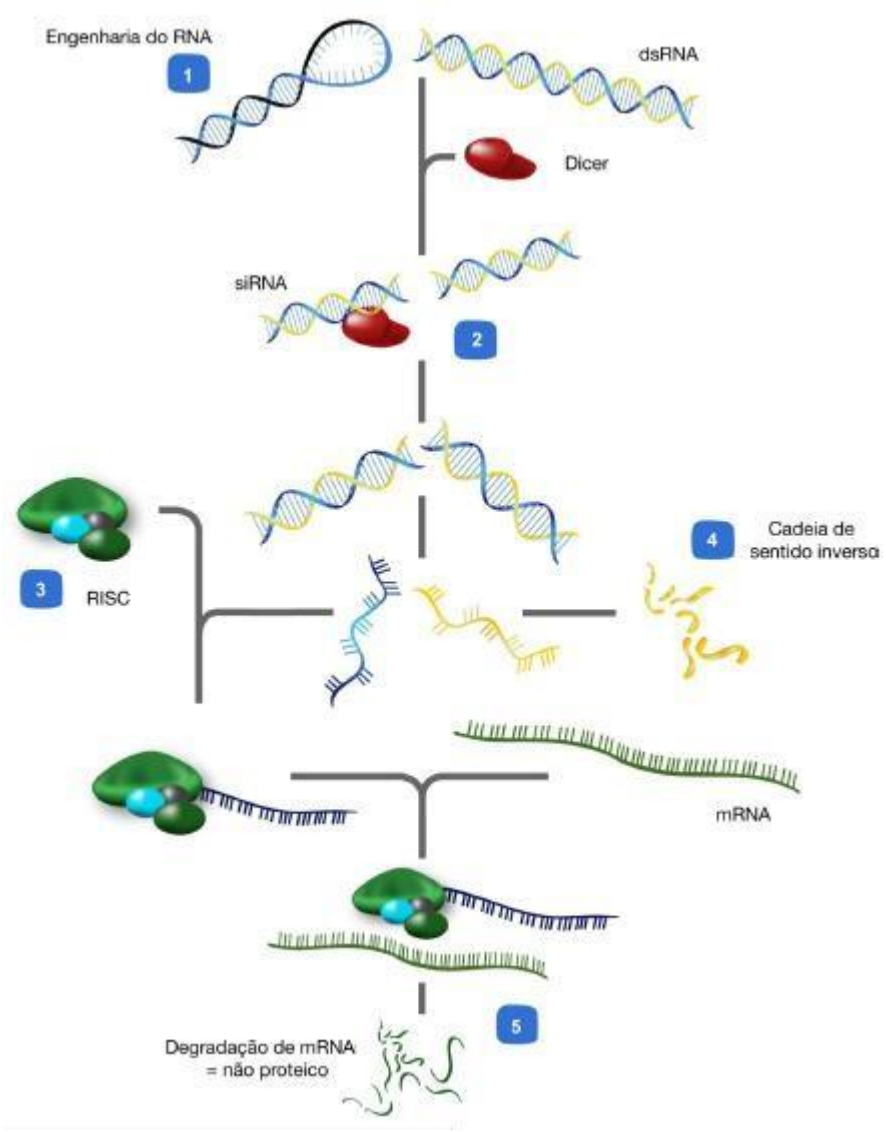
A interferência por RNA (RNAi) é um mecanismo celular responsável pelo silenciamento gênico pós-transcricional atuando sobre o RNA mensageiro (mRNA). No foco deste mecanismo está em uma molécula de fita dupla de RNA que, ao ser incorporada na forma ativa a um complexo intracitoplasmático, se liga a uma sequência de nucleotídeos complementar no mRNA-alvo, ocasionando a quebra do mRNA (Fire *et al*., 1998).

Esse fenômeno foi descrito pela primeira vez no nemátodo *Caenorhabditis elegans*, em 1998, quando se observou que a presença de apenas algumas poucas moléculas de RNA dupla-fita (dsRNA) eram capazes de abolir a expressão de um determinado gene com sequência similar àquele dsRNA (Fire *et al.*, 1998). No entanto, o mecanismo de silenciamento por RNA foi primeiramente observado em plantas, quando pesquisadores trabalhando com plantas transgênicas, ao inserirem como um transgene, uma cópia extra do gene que produzia a enzima responsável pelo pigmento roxo, obtiveram flores brancas. Ou seja, a cópia extra do gene para pigmentação não apenas não resultou em intensificação da cor como suprimiu a ação do gene endógeno, fenômeno conhecido como “cossupressão”. Mais tarde, os pesquisadores entenderam o mecanismo subjacente: o transgene provavelmente gerou na planta intermediários de RNA dupla-fita que reconheceram o mRNA homólogo (endógeno), gerando sua degradação (Baulcombe, 2002).

O RNA dupla-fita é importante no processo de silenciamento porque ele é clivado dentro da célula em fragmentos de 21-25 nucleotídeos por uma nucleasse conhecida como Dicer (Elbashir; LEndeckel; Tuschl, 2001). Essa enzima é homóloga à RNAse III de *E. coli* e apresenta um domínio de ligação a dsRNA e domínios helicase (Bernstein *et al.*, 2001). Os pequenos fragmentos de dsRNA, conhecidos como *small interfering RNA* (siRNA), correspondem às fitas *sense* e *antisense* do RNA alvo e se associam a proteínas celulares formando um complexo multimérico chamado RISC

(*RNA Interference Specificity Complex*). Uma helicase presente no complexo abre a dupla-fita dos siRNA, de forma que a fita *antisense* do duplex guia o complexo até o mRNA alvo (Nykanen; Haley; Zamore, 2001). Uma endorribonuclease, também presente no complexo, cliva o referido mRNA, degradando-o (Martinez *et al.*, 2002). O mecanismo de funcionamento do RNAi pode ser visto na **Figura 7.**

Figura 7 – Mecanismo de funcionamento do RNAi.



Fonte: adaptado de Pocket K No. 34: *RNAi for Crop Improvement*.

As terapias emergentes que utilizam interferência por RNA (RNAi) têm o potencial de tratar amplas classes de doenças devido à sua capacidade de silenciar reversivelmente os genes-alvo. Em agosto de 2018, o FDA aprovou o primeiro medicamento baseado em siRNA, chamado ONPATTRO™ (Patisiran), para o

tratamento de amiloidose mediada por transtirretina (Dong; Siegwart; Anderson, 2019).

A partir deste, outros medicamentos também foram aprovados (Valle; Gualberto; Pittella, 2020; Xião *et al*; 2024), conforme ilustrado no **Quadro 1**.

Quadro 1 – Medicamentos aprovados pela *U.S.* (*Food and Drug Administration*).

Nome do ativo	Nome comercial/ Industria Desenvolvedora	Tratamento	Ano de aprovação	Plataforma
Patsiran	Onpattro/ Alnylam Parmaceuticals.	amiloidose mediada por transtirretina	2018	Nanopartículas lipídicas ionizáveis
Givosiran	Givlaari/Alnylam Parmaceuticals.	porfíria hepática aguda em adultos	2019	siRNA–GalNAc conjugado (GalNAc–siRNA)
Lumasiran	Oxlumo/ Alnylam Parmaceuticals	hiperoxalúria primária tipo 1 em pacientes pediátricos e adultos	2020	GalNAc–siRNA conjugado (entrega hepatoespecífica)
Inclisiran	Leqvio/ Novartis Europharm Limited	hipercolesterolemia familiar heterozigótica ou doença cardiovascular aterosclerótica	2021	GalNAc–siRNA conjugado (entrega hepatoespecífica)
Vutrisiran	Amvuttra/ Alnylam Parmaceuticals	amiloidose hereditária mediada por transtirretina	2022	GalNAc–siRNA conjugado (entrega hepatoespecífica)
Nedosiran	Rivfloza/Novo Nordisk	hiperoxalúria primária tipo 1	2023	GalNAc–siRNA conjugado (entrega hepatoespecífica)
Fitusiran	Qfitilia/ Sanofi	profilaxia de rotina em pacientes com hemofilia A ou B	2025	GalNAc–siRNA conjugado (entrega hepatoespecífica)
Plozasiran	Redemplo/ Arrowhead Pharmaceuticals	Reduzir triglicerídeos em adultos com síndrome de	2025	GalNAc–siRNA conjugado (entrega hepatoespecífica)

		quilomicronemia familiar		

Fonte: Elaborado pela autora (2026)

O RNAi se tornou uma tecnologia poderosa para estudos da função gênica e muita atenção tem sido dada à possível aplicação do RNA de interferência (RNAi) no tratamento do câncer (Chalbatani *et al.*, 2019). Assim, nos últimos anos diversos estudos clínicos a base de siRNA foram conduzidos para uma variedade de doenças de ordem cutânea e sistêmica, e com resultados promissores, reforçando viabilidade dessa modalidade terapêutica (Aljuffali; LIN; Fang, 2016; Rosa *et al*., 2018; Weng *et al.*, 2019; Ain *et al.*, 2020). No entanto devido às suas características intrínsecas, como instabilidade e susceptibilidade à degradação, tamanho (~13 KDa), natureza aniônica, penetração ineficiente nas células e um perfil farmacocinético deficiente, o uso direto no tratamento de doenças tem sido dificultado (Liu *et al.*, 2018a). Devido a essas limitações e aos fatores relacionados à administração pela via tópica, o desenvolvimento de sistemas carreadores é apontado como fator chave para viabilizar a aplicação clínica da terapia *antisense* em doenças dermatológicas (Vicentini *et al.*., 2013b; Tai; Gao, 2017; Liu *et al.*.; 2018a).

Embora seja possível construir sequências específicas de siRNA para redução da expressão de qualquer gene, a terapia por RNAi enfrenta vários desafios e requer métodos para entregar essas moléculas dentro das células-alvo com segurança e eficácia (Dong; Siegwart; Anderson, 2019). Assim, um carreador molecular para a entrega e liberação do ácido nucleico precisa ser específico, apresentar eficiência na liberação de uma ou mais moléculas de tamanhos necessários para aplicações clínicas, não ser reconhecido pelo sistema imune e ser purificado em grandes quantidades e altas concentrações, viabilizando a disponibilização em grande escala. Uma vez que o carreador é inserido no paciente, este não pode induzir reações alérgicas ou processo inflamatório, deve aumentar as funções normais, corrigir deficiências ou inibir atividades deletérias. Ainda, deve ser seguro não somente para o paciente, mas também para o meio ambiente e para os profissionais que o manipulam (Gonçalves; Paiva, 2017).

Em um estudo clínico, 31 pacientes com lesões faciais pigmentadas foram tratados com um creme contendo siRNA-MITF em um carreador transdérmico baseado em peptídeo altamente eficiente (Yi *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2010). Foi demonstrado que o siRNA-MITF silenciava a expressão do gene MITF de forma eficaz

e induzia reduções significativas nos níveis de tirosinase, tirosinase P1 e receptor de melanocortina 1 - MC1R. O uso de siRNA para o silenciamento do gene MITF levou à inibição significativa da síntese de melanina e à apoptose de células de melanoma.

No tratamento de 12 semanas os pacientes tratados com o creme siRNA-MITF apresentaram lesões faciais significativamente mais claras; sendo a melhora geral observada após quatro semanas de tratamento. No final do tratamento, as avaliações clínicas e colorimétricas demonstraram 90,4% de clareamento das lesões tratadas. O conteúdo relativo de melanina nas lesões e na pele normal adjacente após o tratamento foi reduzida em 26% e 7,4%, respectivamente. Esse tratamento representou uma terapia segura e eficaz para o melasma, sugerindo que os agentes baseados em siRNA poderiam ser desenvolvidos para produtos cosmecêuticos antienvelhecimento (Yi *et al.*, 2011).

A concentração de siRNA empregada na preparação de sistemas de entrega nanoestruturados não é universalmente estabelecida, podendo variar de acordo com a composição do sistema, o método de preparação, a relação entre o material genético e os componentes da nanopartícula e a finalidade da formulação. Diferentes sistemas de entrega de siRNA descritos na literatura utilizam concentrações micromolares durante a etapa de preparação ou carregamento do material genético.

Nesse contexto, concentrações da ordem de 1,5 µM são descritas na literatura para a preparação de sistemas nanoparticulados contendo siRNA. Em um estudo destinado ao silenciamento do gene HOXB7, nanopartículas híbridas foram preparadas por automontagem dos componentes e, após a mistura das diferentes fases, a dispersão nanoparticulada apresentou concentração final de 1,5 µM de siRNA. Os autores utilizaram inicialmente uma solução de siRNA de 15 µM, obtendo, após a preparação das nanopartículas, concentração final de 1,5 µM na dispersão (Valle *et al*., 2024).

De maneira semelhante, em um sistema lipossomal desenvolvido para a entrega de siRNA, o filme lipídico foi hidratado utilizando uma solução contendo 1,5 µM de siRNA, demonstrando a utilização dessa concentração como condição da etapa de formação/carregamento do sistema de entrega. Nesse estudo, a concentração de 1,5 µM esteve associada à preparação dos lipossomas contendo o material genético, e não deve ser interpretada como uma concentração terapêutica universal para o tratamento celular (Xiang *et al*., 2017).

A utilização de 1,5 µM durante a etapa de associação do siRNA ao sistema de entrega também é descrita para micropartículas destinadas ao transporte de ácidos nucleicos. Nesse caso, as partículas foram incubadas com uma solução contendo 1,5 µM de siRNA para promover a associação do material genético às partículas antes das etapas subsequentes de lavagem e ressuspensão (Kruse *et al*., 2020).

Assim, a literatura demonstra que 1,5 µM pode ser utilizada como concentração de preparação ou carregamento de siRNA em diferentes sistemas de entrega nanoestruturados, embora não represente uma concentração universalmente estabelecida ou uma dose terapêutica padrão. No presente estudo, essa concentração foi empregada especificamente como concentração final de siRNA na preparação do etossoma, sendo posteriormente realizadas diluições da formulação para os ensaios celulares.

É importante distinguir, portanto, a concentração empregada na preparação da vesícula daquela efetivamente utilizada no tratamento celular. Após a preparação do etossoma contendo siRNA a 1,5 µM, foram avaliadas concentrações finais de 200, 100, 50, 25 e 12,5 nM nos ensaios celulares. A avaliação da viabilidade celular demonstrou que a concentração de 50 nM apresentou a menor toxicidade entre as condições avaliadas, sendo selecionada para os experimentos subsequentes. Dessa forma, a concentração de 1,5 µM corresponde à concentração do siRNA na formulação inicial do sistema etossomal, enquanto 50 nM corresponde à concentração final selecionada para a exposição das células.

Essa estratégia permitiu separar duas etapas experimentais distintas: inicialmente, a utilização de 1,5 µM possibilitou a preparação e caracterização do sistema de entrega contendo siRNA; posteriormente, a realização de uma avaliação de diferentes concentrações de exposição permitiu selecionar, com base na resposta de viabilidade celular, uma concentração adequada para a investigação dos efeitos biológicos do etossoma-siRNA. Essa abordagem também evita a associação direta entre a concentração utilizada durante a formulação e uma suposta dose terapêutica, uma vez que a concentração efetivamente administrada às células foi inferior e determinada experimentalmente.

2.4 NANOCARREADORES PARA A ENTREGA DE siRNA

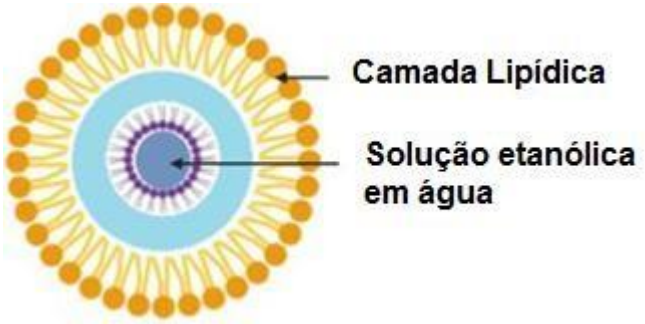
A nanotecnologia farmacêutica oferece soluções promissoras para o transporte de moléculas sensíveis como o siRNA. Os nanossistemas permitem proteger o material genético, controlar sua liberação e direcionar o fármaco a tecidos específicos (Whitehead; Langer; Anderson, 2009).

Para melhorar a estabilidade, incorporação e entrega, e evitar a degradação do siRNA, diferentes plataformas têm sido empregadas, tradicionalmente divididas em vetores virais e não virais. Os vetores virais, como lentivírus, adenovírus e vírus adeno-associados, foram pioneiramente utilizados devido à elevada eficiência de transfecção e capacidade de promover expressão prolongada de sequências capazes de gerar siRNA (Wang *et al*., 2010; Brummelkamp; Bernards; Agami, 2002; Aleixo *et al*., 2025). No entanto, limitações importantes, como imunogenicidade, risco de mutagênese insercional e baixa capacidade de carga para moléculas grandes, impulsionaram o avanço de estratégias não virais (Gao *et al*., 2023).

Os vetores não virais, que hoje constituem a principal base tecnológica das terapias aprovadas de siRNA, são subdivididos em orgânicos e inorgânicos (Ghasemiyeh; Mohammadi-Samani, 2025). Entre os sistemas orgânicos destacam-se nanopartículas lipídicas, lipossomas, micelas poliméricas, dendrímeros e polímeros biodegradáveis, além de vesículas biológicas, como exossomas. Esses sistemas apresentam elevada biocompatibilidade, maior segurança e possibilidade de modular características como tamanho, carga e liberação controlada. Já os vetores inorgânicos incluem nanopartículas de ouro, sílica mesoporosa, fosfato de cálcio e óxido de ferro, que oferecem vantagens como maior estabilidade estrutural, facilidade de funcionalização e potencial para aplicações teranósticas, embora questões relacionadas à biodegradabilidade e à segurança a longo prazo ainda estejam em avaliação (Aleixo *et al*, 2025; Dias *et al.*, 2025).

É nesse cenário que os etossomas (**Figura 8)**, vesículas compostas por fosfolipídios, etanol e água, emergem como uma alternativa promissora, ao encapsulamento do siRNA. Estes sistemas vesiculares foram desenvolvidos por Touitou *et al.*, 1997 e podem ser definidos como a segunda geração de lipossomas, sendo caracterizados por maior maleabilidade, maior estabilidade e melhor capacidade de aprisionar moléculas lipofílicas (Verma; Pathak, 2010; Abdulbagi *et al.*, 2016).

Figura 8 – Estrutura do Etossoma

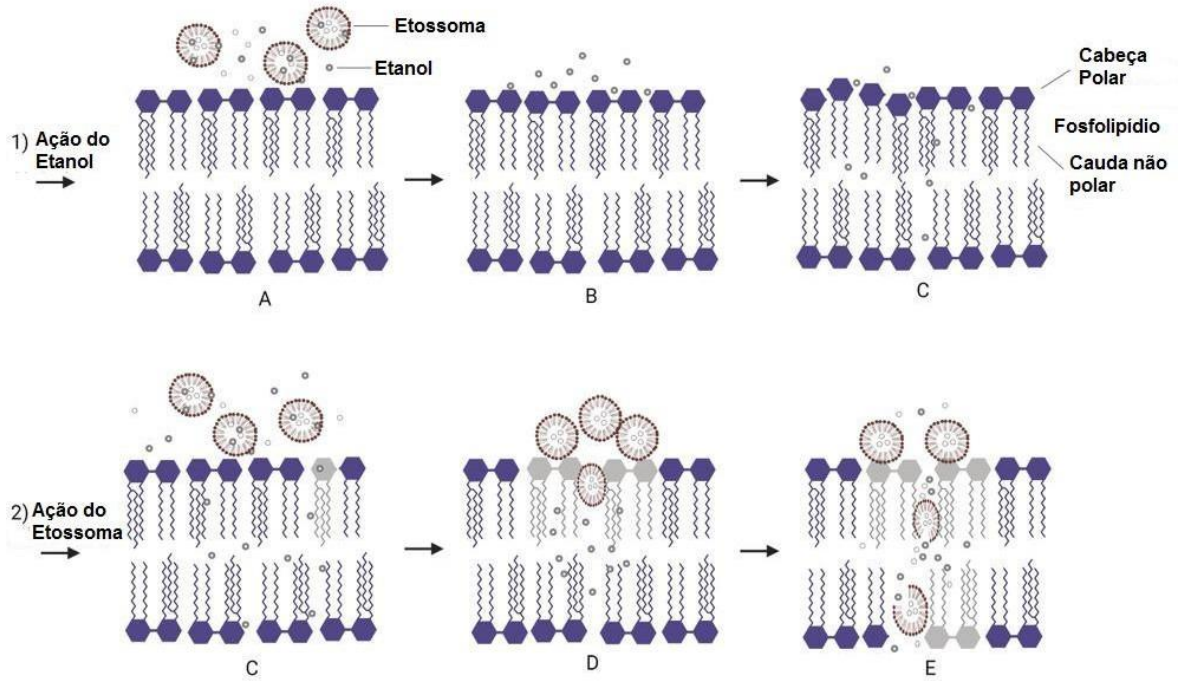


Fonte: Grossi *et al.*,2023

Os etossomas podem servir como sistema para liberação e transporte de fármacos hidrofílicos e lipofílicos através da pele devido às suas propriedades anfifílicas (Kadhim *et al.*, 2022).

O mecanismo do etanol se dá por meio da interação com a região polar das moléculas lipídicas que resulta na redução do ponto de fusão dos lípidos da camada córnea (**Figura 9**).

Figura 9 – Proposta do mecanismo de permeabilidade do Etossoma



Legenda: (A) Camada lipídica do estrato córneo; (B) O etanol interage com as moléculas de lipídios; (C) O etanol aumenta a densidade da camada lipídica; (D) Interação do etanol e dos etossomas no estrato córneo; (E) Penetração dos etossomas nas camadas profundas da pele; (F) Liberação do fármaco nas camadas profundas da pele.
Fonte: Grossi *et al*., 2023

Devido ao efeito fluidificante do etanol sobre os lipídios, os etossomas conseguem atravessar o estrato córneo até as camadas mais profundas da pele (KADHIM *et al.*, 2023). Os etossomas com um diâmetro de 200 a 300 nm podem ultrapassar facilmente a pele não danificada (Hoffman, 2008).

Aumentos na porcentagem de lipídios no sistema resultam em vesículas maiores, mas aumentos na porcentagem de etanol com aproximadamente a mesma concentração de lipídios resultam em etossomas menores, de acordo com uma análise completa da influência do conteúdo do sistema no tamanho da vesícula. Essa relação significa que mudanças na porcentagem de qualquer um dos constituintes do sistema resultarão em mudanças nas características gerais do sistema (Tsuchiya *et al.*, 2005).

A comercialização da tecnologia etossoma começou em 2000 e é um campo em crescente evolução. Vários produtos comerciais baseados na tecnologia etossomal: o *Nanominox*, produto contendo minoxidil, promotor do crescimento capilar (Sirene, Alemanha); Supravir, para o tratamento do vírus da herpes (*Trima*, Israel); *Cellutight EF*, creme tópico para celulite (*Hampden Health*, Estados Unidos); Decorin, creme *Anti-aging* (Genome *Cosmetics*, Pensilvania, U.S.); *Noicellex,* creme tópico anti-celulite (*Novel Therapeutic Technologies*, Israel) e *Skin genuity*, para o tratamento da celulite (*Physonics*, *Nottingham*, *UK*) (Verma; Pathak, 2010).

Para que um nanocarreador seja considerado ideal para a entrega de siRNA deve satisfazer alguns requisitos, como: a) ultrapassar as barreiras inerentes à via de administração; b) ligar-se às moléculas de siRNA promovendo proteção contra a degradação enzimática; c) facilitar a transfecção celular e superar a incapacidade das moléculas de siRNA de se difundirem passivamente pelas membranas celulares devido a repulsão eletrostática; d) promover o escape endossomal liberando o conteúdo do endossomo no citoplasma celular antes que ocorra a metabolização lisossomal; e) não provocar uma resposta imune ou tóxica no organismo (Durymanov; Reineke, 2018).

O etossoma tem sido estudado para a entrega de moléculas bioativas, como o siRNA (Abdulbaqi *et al*., 2016; Mahajan *et al*., 2024). Os estudos de Geusens *et al*.

(2009) demonstraram a utilização de formulações etossomais para o transporte de siRNA, incluindo investigações realizadas em melanócitos humanos, nas quais esses sistemas foram avaliados como potenciais nanocarreadores para a entrega intracelular de moléculas de RNA de interferência.

Além disso, diferentes modificações na composição dos etossomas podem ser empregadas para otimizar suas propriedades físico-químicas e sua capacidade de interação com as células, ampliando seu potencial como plataformas de entrega de moléculas terapêuticas (Bhat; Tharmatt; Bhargava *et al.,* 2025). Chen *et al*. (2014) desenvolveram um sistema etossomal catiônico baseado em DOTAP, denominado DOTAP-SPACE Ethosomal System (DOTAP-SES), no qual o peptídeo SPACE foi associado ao siRNA, à superfície das vesículas e à formulação. O sistema promoveu aumento da penetração celular do siRNA e resultou em expressivo silenciamento do gene GAPDH, demonstrando o potencial da associação entre etossomas e peptídeos de penetração celular para a liberação de ácidos nucleicos. A combinação com peptídeos SPACE resultou em um silenciamento gênico de 83,3 ± 3,0% em comparação com o controle, demonstrando uma entrega eficaz de siRNA (Chen *et al*., 2014).

Neste estudo foram feitas duas modificações na composição do etossoma: o acréscimo do brometo de cetitrimetil amônio – CTAB (818 µg/mL); e o revestimento com polietileno-bloco-poliglutamato – PEG-pGLU (25 µg/mL).

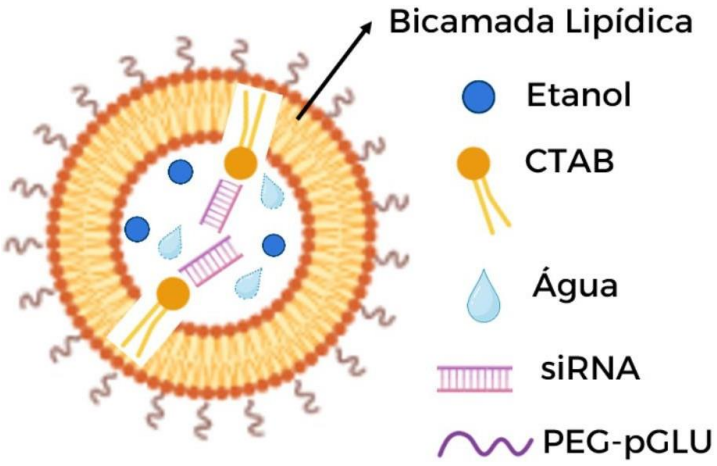
O brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foi utilizado na formulação dos etossomas como componente catiônico, com o objetivo de conferir carga superficial positiva às vesículas. Essa característica é particularmente relevante para sistemas de entrega de siRNA, uma vez que a carga superficial influencia a interação entre o nanocarreador e o ácido nucleico, bem como sua interação com as membranas celulares. Formulações lipídicas catiônicas são amplamente investigadas para a entrega de siRNA em razão da possibilidade de interação eletrostática com moléculas aniônicas e da maior interação com superfícies celulares. Entretanto, a densidade de carga positiva deve ser cuidadosamente controlada, considerando que o aumento da carga superficial pode também estar associado a maior citotoxicidade (Russo et al., 2013).

A escolha do PEG-pGLU para a modificação superficial dos etossomas foi baseada nas propriedades complementares de seus componentes. O PEG apresenta caráter hidrofílico e é amplamente empregado na modificação de nanocarreadores por

contribuir para a estabilidade do sistema e reduzir interações inespecíficas com componentes biológicos. A presença de segmentos derivados do ácido glutâmico, por sua vez, fornece grupos carboxílicos que conferem caráter polianiônico ao polímero e possibilitam interações eletrostáticas com espécies de carga oposta. Dessa forma, a utilização do PEG-pGLU como modificador de superfície pode contribuir para ajustar as propriedades superficiais do sistema e melhorar sua interação com o meio biológico, reduzir as interações inespecíficas associadas a superfícies altamente catiônicas, além de reduzir a citotoxicidade (Xia; Tian; Chen, 2016).

Dessa forma, a nova estrutura do Etossoma passou a ser conforme a **Figura 10**.

Figura 10 – Estrutura do etossoma com a inclusão do CTAB e do PEG-pGLU**.**

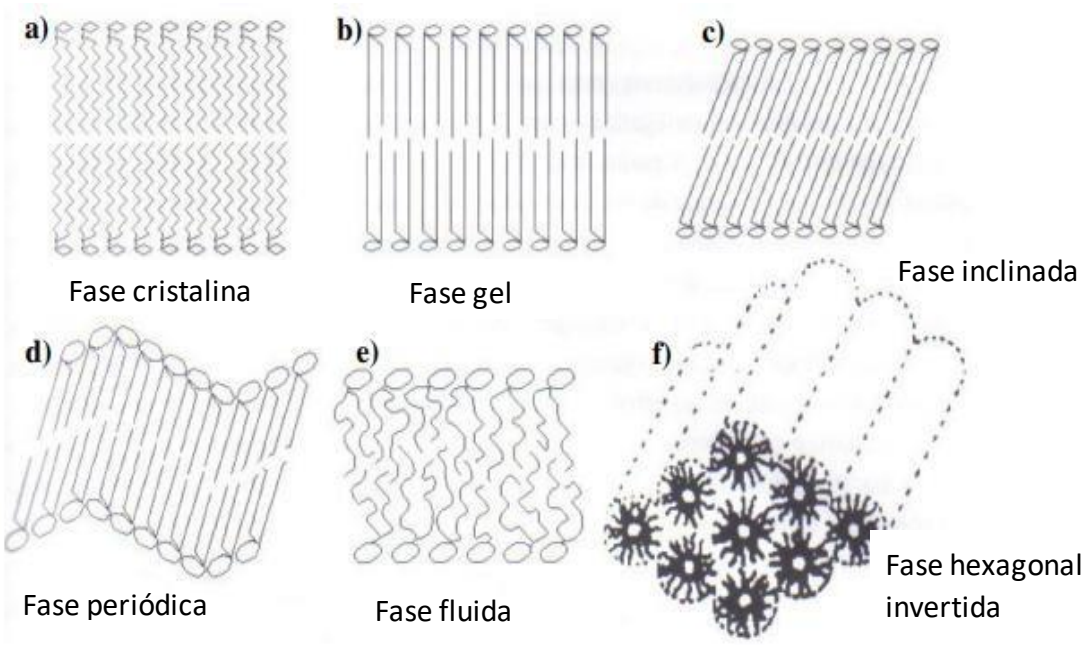


Fonte: adaptado de Grossi *et al*., 2023

2.4.1 Efeito do etanol nas bicamadas lipídicas.

As fases lipídicas lamelares definem-se pela organização dos lípides em bicamada, onde as cadeias acilo hidrófobas se encontram no interior da estrutura e os grupos polares estão direcionados para o exterior. Ao se organizarem, as fases mais comumente encontradas são: fase cristalina; fase gel; fase gel inclinada; fase periódica; fase fluida ou líquida cristalina e fase hexagonal invertida (**Figura 11, a-f**). Destas, apenas a fase hexagonal invertida não é lamelar (Almeida; Loura, 2004).

Figura 11 - Representação esquemática das estruturas das fases mais comuns em lípides.



Fonte: (Almeida; Loura, 2004)

A relevância das interações do etanol com as bicamadas lipídicas está relacionada à sua capacidade de modificar as propriedades físico-químicas das membranas, influenciando sua organização, fluidez e permeabilidade (Schroeder *et al*., 1994; Schroeder *et al*., 1995; Lovinger, 1997). Essas características são particularmente importantes no desenvolvimento de sistemas vesiculares, uma vez que a incorporação de etanol pode alterar a estrutura e o comportamento das bicamadas lipídicas. Nesse contexto, o etanol constitui um dos principais componentes dos etossomas, contribuindo para a formação de vesículas com maior flexibilidade e capacidade de interação com membranas biológicas. Estudos sobre a interação entre etanol e sistemas lipídicos, como o realizado por Almeida e Loura (2002), demonstram a importância desse componente na modulação das propriedades das membranas, fornecendo subsídios para a compreensão de seu papel em sistemas de liberação baseados em vesículas lipídicas. Entretanto, além de modificar as propriedades das membranas, o etanol também pode exercer efeitos sobre as células, especialmente quando presente em concentrações elevadas.

Entre os efeitos biológicos do etanol, destacam-se a alteração da ativação celular, a partição de proteínas específicas e a indução de estresse oxidativo, todos os quais podem comprometer diversas funções celulares e teciduais. Além disso, o

etanol apresenta importante efeito promotor de permeação cutânea, decorrente, em parte, de sua interação com as estruturas lipídicas das membranas. Essa interação pode alterar a organização e a fluidez dos lipídios, reduzindo o seu empacotamento e favorecendo a permeação através da barreira do estrato córneo. No contexto dos sistemas etossomais, essa propriedade é particularmente relevante, uma vez que o etanol também contribui para o aumento da fluidez e da deformabilidade das vesículas, favorecendo sua interação com as membranas biológicas e, consequentemente, a entrega do ativo. Entretanto, esses efeitos são dependentes da concentração de etanol, de modo que concentrações elevadas podem aumentar a perturbação das membranas e a citotoxicidade, tornando necessário o equilíbrio entre a capacidade de promover a permeação e a segurança biológica da formulação. (Nourissat *et al.*, 2005; Szabo, 2007; Dai; Zhang; Pruett, 2008).

A maioria dos estudos biofísicos das interações etanol-bicamada recorreram a técnicas que não permitem a observação direta da amostra, tais como difração de raios-X, calorimetria diferencial de varredura e várias espectroscopias. Porém, existem outros trabalhos onde o efeito do etanol e outros álcoois foram analisados por microscopia de força atómica (Marquês, 2009). Os principais resultados reportam a indução da redução de espessura da bicamada. Esta redução de espessura pode ocorrer como consequência de (a) um aumento dos ângulos de inclinação, por exemplo, passagem de fase gel para fase gel inclinada; (b) um aumento da desordem das cadeias acilo dos fosfolipídios, por exemplo, passagem de fase gel a fase fluida; ou ainda, (c) formação de fases interdigitadas, quando as cadeias acilo de um folheto da bicamada interpenetram no outro folheto, resultando no desaparecimento do plano médio da bicamada, ocorrendo a interdigitação (**Figura 12**) (Marquês, 2009). Como efeito subsequente da indução de interdigitação dá-se a expansão da bicamada, a qual pode igualmente ocorrer pela diminuição da tensão superficial entre a bicamada e a água.

Além disso, o alto teor de etanol confere ao sistema um efeito sinérgico de permeação, reduzindo a resistência da membrana e promovendo maior absorção intracelular (Almuqbil; Aldhubiab, 2025). Os estudos de Godin e Touitou, (2003), demonstraram que a coexistência de fosfolipídios e etanol em altas concentrações, desde que não ultrapasse 50%, propiciou a formação de um sistema carreador aprimorado devido ao efeito fluidificador do etanol nas vesículas lipídicas.

Dessa forma, os etossomas têm grande potencial como plataforma eficiente e de relativo baixo custo para o transporte de ácidos nucleicos, especialmente quando comparados a sistemas lipídicos mais complexos, como os lipídios ionizáveis utilizados em formulações comerciais de MRNA.

Figura 12 - Indução de interdigitação de uma bicamada lipídica pelo etanol.



Fonte: Adaptado de Vierl *et al*. 1994

2.4.2 Métodos de preparação do Etossoma

Entre as técnicas de preparação dos etossomas a literatura destaca métodos simples, de baixo-custo e passível de escalonamento industrial:

a) *Método à quente*: O fosfolipídio é disperso em água através de aquecimento e agitação em banho-maria a 40°C, até que uma solução coloidal seja obtida. Em um recipiente separado, o etanol e o propilenoglicol são misturados e aquecidos a 40°C. Assim que ambas as misturas atingem a mesma temperatura, a fase orgânica é adicionada à fase aquosa. O fármaco de interesse é dissolvido em água ou etanol, dependendo de suas propriedades hidrofílicas/hidrofóbicas. Por fim, a suspensão pode ser submetida a sonicação ou ao método de extrusão para reduzir o tamanho das vesículas (Verma; Pathak, 2010);

b) *Método à frio*: o fosfolipídio e a molécula a ser incorporada são dissolvidos por agitação vigorosa em etanol em um recipiente coberto à temperarura ambiente. O propilenoglicol, ou outro poliol, é adicionado durante a agitação. Esta mistura é aquecida a 30°C em banho-maria. Paralelamente, a água é aquecida também a 30°C e adicionada à mistura, seguida de agitação por 5 minutos no recipiente fechado. O processo de sonicação ou método de extrusão também pode ser utilizados. Por fim, deve-se armazenar a suspensão obtida sob refrigeração (Dongare *et al.*, 2012). Este é o método mais comum e amplamente utilizado para a preparação etossômica.

Algumas das razões pelas quais o método a frio é preferido incluem: i) preservação de ingredientes sensíveis, visto que o uso de temperaturas baixas ou ambiente ajuda a preservar a estabilidade de ingredientes ativos ou sensíveis ao calor que podem ser incluídos na formulação dos etossomas; ii) facilitação de escala, uma vez que o método a frio é escalonável para produções em larga escala, tornando-o mais prático para aplicações industriais; *iii)* redução de custos, visto que não requer aquecimento extenso, economiza energia e custos associados; iv) prevenção da *degradação térmica, posto que* muitas substâncias bioativas ou farmacêuticas podem se decompor quando expostas a altas temperaturas (Verma; Pathak, 2010).

c) *Método clássico de dispersão mecânica*: a fosfatidilcolina é dissolvida em solvente orgânico, como, clorofórmio, em frasco de fundo redondo, juntamente com a substância ativa de interesse. O solvente é removido com evaporador rotativo a vácuo acima da temperatura de transição de lipídeo até a formação de uma película lipídica fina na parede do frasco. A hidratação da película formada pode ser realizada com diferentes concentrações de solução etanólica, seguida de agitação mecânica e sonicação (Dongare *et al.*, 2012; Park *et al*., 2014).

d) *Método clássico*: o fosfolipídio e a substância são dissolvidos em etanol e aquecidos a 30°C em banho-maria. Água bidestilada é adicionada, sob agitação constante de 700 rpm, em recipiente fechado. A suspensão obtida é homogeneizada por passagem através de uma membrana de policarbonato utilizando extrusor por três ciclos (Dongare *et al*..; 2012).

Além destes, outros métodos também foram encontrados na literatura como: (I) a hidratação de filmes finos (Rakesh *et al.*., 2012; Park *et al.*, 2014; Zhang *et al*., 2017; Limsuwan *et al*., 2017; Soni *et al*., 2019); e (II) a injeção em etapa única (Ishar *et al*., 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo foi desenvolver e caracterizar vesículas do tipo etossomas para o carreamento de siRNA contra o gene MITF, avaliando sua capacidade de promover a entrega do material genético às células e de modular a melanogênese, como estratégia nanotecnológica para o controle da hiperpigmentação cutânea.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenhar sequências de siRNA e Primers para redução da expressão gênica da microftalmina (MITF);
- Preparar vesículas do tipo etossoma, subsidiada por planeamento fatorial 2^3 com ponto central, carregadas como agentes de transfecção contendo siRNA complementar ao gene MITF;
- Verificar a viabilidade celular de células de melanoma SKMEL 28 e células de queratinócitos - HaCat, após tratamento com as vesículas carreando siRNA-MITF;
- Caracterizar os nanocarreadores quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio, potencial Zeta, morfologia, eficiência de encapsulação;
- Avaliar a estabilidade coloidal do sistema vesicular;
- Avaliar a internalização celular em célula SKMEL 28 por microscopia de fluorescência;
- Avaliar a liberação *in vitro* do siRNA por diálise;
- Avaliar o silenciamento *in vitro* do gene MITF em células de melanoma SMEL 28 por PCR em tempo real;
- Avaliar a interferência, inibição da produção de melanina por meio das vesículas carregadas com siRNA-MITF.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Reagentes, solventes e matérias-primas

O fosfolipídio de soja (PHOSPHOLIPON® 90 G) utilizado neste projeto foi cordialmente cedido por LIPID *Ingredients* (Ribeirão Preto, SP). O etanol absoluto grau farmacêutico foi adquirido da farmácia de manipulação Santos (Juiz de Fora, MG). Tensoativo catiônico brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) foi adquirido de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Água ultrapurificada (*Milli-Q Millipore Simplocity* 185, *Bedford*, EUA) foi utilizada no preparo de todas as suspensões.

O copolímero polietilenoglicol-bloco-poliglutamato (*methoxy-poly(ethylene glycol)-block-poly(L-glutamic acid sodium salt*) (Peg-pGlu) foi adquirido da Alamanda copolymer).

As sequências de siRNA foram sintetizadas por SYNBIO Technologies (EUA) e os *primers* foram sintetizadas por FastBio LTDA (Ribeirão Preto, SP). As sequências sintetizadas foram:

siMITF: *Sense* 5':GUGGACUAUAUCCGAAAGU dUdG; *Antisense* 3': GdGd CACCUGAUAUAGGCUUUCA

Cy5-siMITF: Sense (5'-3'): Cy5-GUGGACUAUAUCCGAAAG UdUdG; Antisense (5'-3'): dGdG CACCUGAUAUAGGCUUUCA

MITF primer Foward: (5' para 3') GCC AAG ACC TCC TTC AGC AT
MITF primer Reverse: (5' para 3') AAA GGG TGT CGT CCA TCA GG

4.1.2 Linhagens celulares

Foram utilizadas células de melanoma SK-MEL-28 (ATCC HTB-72) e células de queratinócitos HaCat (Boukamp *et al*, 1988) para os testes biológicos *in vitro*.

A linhagem celular SK-MEL-28 é uma das linhas celulares de melanoma estabelecidas a partir de amostras de tumores derivadas de pacientes. Essa linhagem

celular expressa mutante B-Raf (V600E) e N-Ras selvagem (MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER, [s.d.]).

A linhagem celular de queratinócitos, HaCaT, é uma linhagem de queratinócitos humanos imortalizados que foi desenvolvida a partir de células da pele humana (BOUKAMP *et al*, 1988). É frequentemente usada em estudos de biologia da pele, cicatrização de feridas, toxicologia de cosméticos e pesquisa dermatológica, sendo uma alternativa útil para estudos de interações entre queratinócitos e outros tipos de células da pele, como melanócitos. As células HaCaT mantêm características semelhantes aos queratinócitos normais e são frequentemente usadas para estudar processos de diferenciação, resposta imunológica da pele e efeitos de produtos químicos ou agentes terapêuticos na pele. É uma linhagem celular de queratinócitos de fácil cultivo que proporciona uma visão mais próxima das interações entre as células da epiderme (Zedler, 2012; Seo *et al*., 2012).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Determinação da sequência do siRNA e *PRIMERS*.

As sequências de siRNA direcionadas ao gene MITF foram selecionadas utilizando a ferramenta *Whitehead siRNA Server*, desenvolvida pelo *Whitehead Institute* (2004). O desenho das sequências considerou parâmetros relacionados à eficiência e à especificidade do silenciamento gênico, incluindo o conteúdo de guanina e citosina (GC), parâmetros termodinâmicos e a temperatura de *melting* (Tm). Após análise de 180 siRNA, Reynolds e colaboradores (2004) sugeriram que a fita guia dessas moléculas devia seguir oito critérios que contribuem para aumentar a eficiência: a) porcentagem de GC entre 30% e 52%; b) baixa estabilidade na fita senso na extremidade 3’ (de três a cinco pares de AU); c) ausência de repetições invertidas; d) preferência de A na posição 19; e) preferência de A na posição 3; f) preferência de U na posição 10; g) ausência de G na posição 13; h) ausência de G ou C na posição 19.

Após a seleção inicial, as sequências candidatas foram submetidas à análise de similaridade utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) para nucleotídeos, disponibilizada pelo *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). Essa etapa teve como objetivo verificar a ocorrência de homologia significativa

entre as sequências selecionadas e outras regiões gênicas, minimizando o risco de efeitos inespecíficos decorrentes do pareamento com transcritos não relacionados ao gene-alvo. Para a seleção das sequências, foram avaliados os resultados de alinhamento obtidos no BLAST, considerando-se principalmente os parâmetros de identidade e cobertura da sequência, bem como os valores de score e *E-value*. A análise foi realizada de acordo com os critérios descritos por Valle (2019).

As sequências dos iniciadores (*primers*) utilizados para a análise do gene MITF humano foram desenhadas utilizando a ferramenta *Primer-BLAST*, disponibilizada pelo NCBI. A seleção dos iniciadores considerou os parâmetros recomendados pela ferramenta, visando à obtenção de sequências específicas para o gene de interesse e adequadas às condições experimentais empregadas.

4.2.2 Desenvolvimento e seleção da formulação de etossoma.

Para o desenvolvimento e a otimização da formulação de etossomas foi empregado um planejamento fatorial completo 2^3, com ponto central. Foram avaliados três fatores independentes: concentração de fosfatidilcolina (X_1), concentração de etanol (X_2) e concentração de brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) (X_3). Cada fator foi investigado em dois níveis, correspondentes aos valores inferior (−1) e superior (+1), sendo acrescentadas formulações no ponto central (0) para avaliação da curvatura da superfície de resposta e da variabilidade experimental (**Tabela 2**).

Como variáveis dependentes, foram consideradas as características físico-químicas das formulações, incluindo diâmetro hidrodinâmico (DHM), índice de polidispersividade (PDI) e potencial Zeta (pZ). Os experimentos foram realizados de acordo com a matriz experimental estabelecida pelo planejamento fatorial, permitindo avaliar os efeitos principais dos fatores e suas possíveis interações sobre as respostas.

Tabela 2 – Planejamento de Experimento 2^3 com ponto central

Fator	Parâmetro	Níveis		
		(-)	0	(+)
X1	% Fosfolipídio	1	2	3
X2	% Etanol	30	40	50
X3	% Tensoativo catiônico	0,1	0,15	0,2

Fonte: Elaborado pela autora, (2026).

4.2.3 Preparo do nanocarreador etossoma.

Após o estabelecimento da composição da formulação otimizada (Fosfolipídio 2%, Etanol 30%, CTAB 0,1%), os etossomas foram preparados pelo método a frio conforme descrito por Verma e Pathak (2010) (**Figura 13**), com adaptações e seguiu os seguintes passos:

1. Fase lipídica: 0,2 g do fosfolipídio foi dissolvido em 3 mL de etanol absoluto, sob agitação magnética de 600 rpm, à temperatura de 30 °C, até completa homogeneização.

2. Fase aquosa: 0,01g do tensoativo catiônico (CTAB) foi dissolvido em 6,79 mL de água ultrapura, sob agitação de 600 rpm, à temperatura de 30 °C.

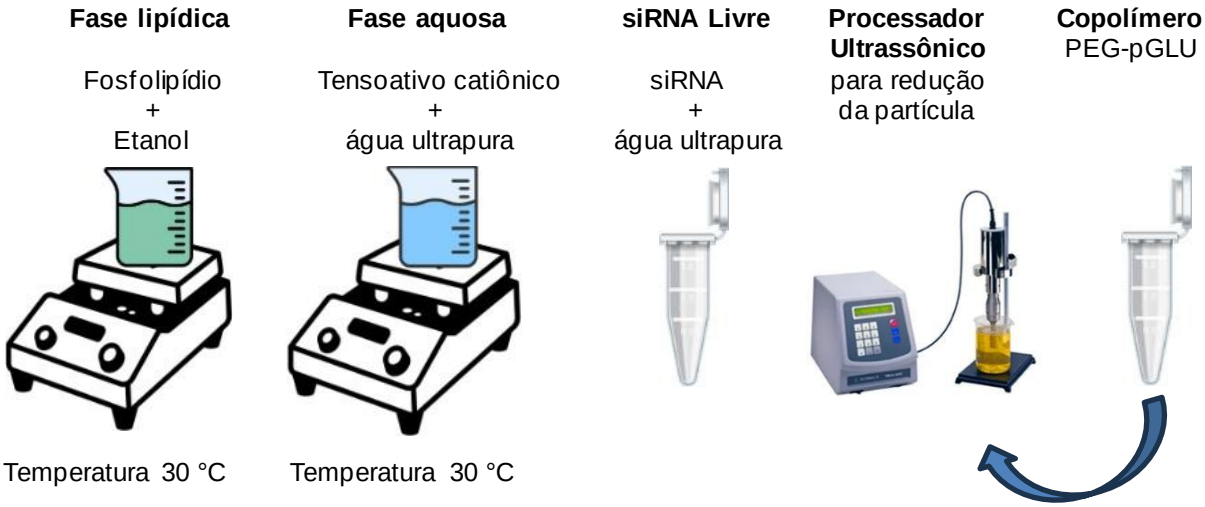
3. Formação das vesículas sem o ativo: para o preparo de 200 µL da formulação, foram pipetados, nesta ordem, 111 µL da fase aquosa, 20 µL de água ultrapura e 64 µL da fase lipídica, os quais foram transferidos para um tubo tipo Falcon. A mistura foi submetida à sonicação em processador ultrassônico, em 3 ciclos de 5 minutos (3'' *on* e 2'' *off*), mantendo-se o recipiente em banho de gelo. A formulação foi armazenada sob refrigeração, entre 2 e 8 °C, até o momento das análises.

4. Formação das vesículas contendo siRNA-MITF: para o preparo de 200 µL da formulação, foram pipetados, nesta ordem, 111 µL da fase aquosa, 20 µL de siRNA livre (15 µL/mL) e 64 µL da fase lipídica, os quais foram transferidos para um tubo tipo Falcon. A mistura foi submetida à sonicação em processador ultrassônico, em três ciclos de 5 minutos (3'' *on* e 2'' *off*), mantendo-se o recipiente em banho de gelo. A formulação foi armazenada sob refrigeração, entre 2 e 8 °C, até o momento das análises.

5. Formação das vesículas contendo siRNA-MITF, com superfície modificada com copolímero polietilenoglicol-bloco-poliglutamato (PEG-pGLU): para o preparo de 200 µL da formulação, foram pipetados, nesta ordem, 111 µL da fase aquosa, 20 µL de siRNA livre (15 µL/mL) e 64 µL da fase lipídica, os quais foram transferidos para um tubo tipo Falcon. A mistura foi submetida à sonicação em processador ultrassônico,

em dois ciclos de 5 minutos (3'' *on* e 2'' *off*), mantendo-se o recipiente em banho de gelo. Após o término dos dois ciclos, foram adicionados 5 µL de PEG-pGLU (1mg/mL estabilizado em TRIS 10nM), seguido de mais um ciclo de sonicação de 5 minutos (3'' *on* e 2'' *off*). A formulação foi armazenada sob refrigeração, entre 2 e 8 °C, até o momento das análises.

Figura 13 – Preparo dos Etossomas



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

4.2.4 Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT, utilizando um protocolo de exposição por pulso (*pulse exposure*) (Gadalla *et al*., 2022). As células HaCat e SK-MEL-28 foram cultivadas em placas de 96 poços na densidade de 1×10^4 e mantidas em condições adequadas de cultivo por 24h, até atingirem a densidade celular necessária para o experimento. Posteriormente, as células foram expostas às diferentes formulações (siRNA livre, etossoma branca [sem ativo], etossoma-siRNA e etossoma-siRNA-PEG-pGLU) e ao respectivo controle, nas concentrações de: 200, 100, 50, 25 e 12,5 nM.

Após 2 h de exposição, o meio contendo as formulações foi cuidadosamente removido e substituído por meio de cultura fresco, sem a presença das formulações. As células foram então mantidas em incubação pelo período previamente estabelecido para o ensaio de 48h.

Ao final do período de exposição, foi adicionada a solução de MTT aos poços, seguida de incubação por 4 h, sob condições apropriadas para permitir a formação dos cristais de formazan pelas células metabolicamente ativas. Após esse período, o meio contendo MTT foi removido e os cristais de formazan foram solubilizados com dimetilsulfóxido. A absorbância foi determinada em leitor de microplacas no comprimento de onda de 595 nm.

A viabilidade celular foi expressa como porcentagem em relação ao grupo controle, considerado como 100% de viabilidade. O percentual de viabilidade foi calculado pela relação entre a absorbância das células tratadas e a absorbância do grupo controle, após a correção dos valores pelo branca.

$$\textbf{Viabilidade celular}\ (\%) = \frac{\textbf{Absorbância da amostra}}{\textbf{Absorbância do controle}}\ \textbf{x 100}$$

Todos os experimentos foram realizados em triplicata independentes, e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

4.2.5 Caracterização dos etossomas

4.2.5.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio e do índice de polidispersividade

A determinação do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM) e do índice de polidispersividade (PDI) foram obtidos utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvem Instruments, UK) a partir da técnica de espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic light Scattering – DLS)*. As medidas foram realizadas com laser He-Ne (633 nm) em ângulo de detecção de 173° utilizando célula específica (DTS1060) à 25 °C após a preparação das vesículas (Stetefeld; Mckenna; Patel, 2016). O ensaio foi realizado em equipamento do Laboratório Multiusuário de Bioprodutos e Bioprocessos – CENTRALBIO, da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão de três determinações da formulação do Etossoma branca (sem ativo) (10 µL/400 µL de solução diluído em água ultrapura) e do etossoma-siRNA-PEG-pGLU (10 µL/400 µL de solução diluído em água ultrapura).

4.2.5.2 Determinação do Potencial Zeta

O potencial Zeta (pZ) dos etossomas foi determinado por meio da técnica de mobilidade eletroforética, utilizando o equipamento *Zetasizer Nano* ZS (*Malvern Instruments*, Reino Unido), equipado com cubeta específica para análise de potencial Zeta (DTS1060). As medidas foram realizadas mediante aplicação de campo elétrico com potencial de ±150 mV.

As análises foram realizadas em equipamento do Laboratório Multiusuário de Bioprodutos e Bioprocessos – CENTRALBIO, em três determinações da formulação do Etossoma branca (sem ativo) (10 µL/400 µL de solução diluído em água ultrapura) e do etossoma-siRNA-PEG-pGLU (10 µL/400 µL de solução diluído em água ultrapura).

4.2.5.3 Determinação da morfologia

A morfologia das vesículas foi caracterizada por microscopia eletrônica de transmissão (MET), realizada no Laboratório do *Center for cooperative research in biomaterials* (CICbiomaGUNE), na Espanha. As análises foram conduzidas utilizando um microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011 TEM (JEOL Ltd., Tóquio, Japão), operado com tensão de aceleração de 80 kV.

Para o preparo das amostras, uma alíquota da suspensão de vesículas foi depositada sobre grades de níquel de malha 200 (CF200-Ni, EMS), revestidas com filme de carbono. As grades foram mantidas em condições ambiente por 24 horas para secagem da amostra. A caracterização morfológica foi realizada em modo de campo claro (*bright-field*), utilizando ampliações de até 50.000×.

4.2.5.4 Curva analítica e eficiência de encapsulação do siRNA

A eficiência de encapsulação (EE%) do siRNA nos etossomas foi determinada pelo método indireto, em triplicata, a partir da quantificação do siRNA não encapsulado presente no ultrafiltrado. Para a separação das frações, as formulações foram submetidas à ultrafiltração por centrifugação, utilizando filtros do tipo Amicon® *Pro Purification System with Ultra*-0.5 *Device* de 30 kDa (Merck Millipore ACS501012), a 14.000 rpm durante 30 minutos, a 4 °C. Após a centrifugação, o siRNA livre, não

associado às vesículas, foi recuperado no ultrafiltrado, enquanto a fração retida no sistema de filtração correspondeu à fração associada aos nanocarreadores.

A concentração de siRNA presente no ultrafiltrado foi determinada por espectrofotometria de absorção no ultravioleta, utilizando o equipamento *NanoDrop Life Spectrophotometer* (*Thermo Scientific*), no comprimento de onda de 260 nm, conforme metodologia descrita por Furst *et al*. (2016) e Ahmed *et al*. (2021). A quantificação foi inicialmente realizada por meio de uma curva analítica construída com padrão de siRNA livre, nas concentrações de 0,0150; 0,0375; 0,0750; 0,375; 0,750 e 1,500 μM.

A relação entre a concentração de siRNA e a absorbância foi estabelecida por regressão linear, conforme a Equação a seguir:

$$y = ax + b$$

onde “y” corresponde à absorbância medida; “x”, à concentração de siRNA; “a”, ao coeficiente angular da reta; e “b”, ao coeficiente linear. A concentração de siRNA presente nas amostras de ultrafiltrado foi calculada a partir da equação da reta obtida pela curva analítica.

Adicionalmente, a eficiência de encapsulação foi determinada por uma segunda abordagem de cálculo, também baseada no método indireto, utilizando a comparação padrão-amostra entre a concentração inicial de siRNA livre (1,5 μM) e a concentração de siRNA determinada do etossoma siRNA-PEG-pGLU (1:1) diluído em água ultrapura, sem a utilização da curva analítica. Nesse procedimento, considerou-se que a diferença entre a quantidade total de siRNA inicialmente adicionada à formulação e a quantidade de siRNA detectada no ultrafiltrado correspondia à quantidade de siRNA efetivamente associada aos nanocarreadores.

A eficiência de encapsulação foi calculada conforme a equação a seguir:

$$EE\% = \frac{(Quantidade\ de\ siRNA\ adicionada - Quantidade\ de\ siRNA\ livre\ no\ ultrafiltrado)}{Quantidade\ \ total\ de\ siRNA\ adicionado}\ x\ 100$$

4.2.6 Avaliação da estabilidade coloidal do etossoma

A estabilidade dos sistemas etossomais foi avaliada por meio do monitoramento do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), do índice de polidispersividade (PdI) e do potencial Zeta, considerando as possíveis alterações desses parâmetros ao longo do período de armazenamento.

Foram analisadas, em triplicata, as formulações de etossoma sem ativo e etossoma contendo siRNA-MITF-PEG-pGLU, preparadas conforme a caraterização dos etossomas, armazenadas sob duas condições de temperatura: refrigeração (2–8 °C) e temperatura ambiente (15–30 °C). As avaliações foram realizadas imediatamente após o preparo das formulações (tempo zero) e após 7, 14, 30 e 60 dias de armazenamento.

Os resultados foram expressos como média ± desvio-padrão. Para avaliação dos efeitos do tempo de armazenamento, da temperatura e da interação entre esses fatores sobre o DHM, PdI e potencial Zeta, os dados foram submetidos à análise de variância de duas vias (*two-way ANOVA*). Quando identificadas diferenças estatisticamente significativas, foram realizados testes de comparações múltiplas, utilizando-se *Tukey*, conforme o delineamento das comparações. As análises estatísticas foram realizadas no software *GraphPad Prism*, versão 5.0, adotando-se nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

4.2.7 Avaliação da internalização celular por microscopia de fluorescência

A internalização celular dos etossomas contendo siRNA-MITF marcado com Cy5 (Cy5-siRNA-MITF) foi avaliada por microscopia de fluorescência utilizando células de melanoma humano SK-MEL-28. O siRNA-MITF previamente marcado com o fluoróforo Cy5 foi utilizado como marcador de fluorescência para permitir o acompanhamento da localização intracelular do siRNA. Para a avaliação da internalização, as células foram incubadas com a formulação Etossoma contendo Cy5-siRNA-MITF-PEG-pGLU (50 nM) e, após o período de exposição, foram lavadas para remoção do material não associado às células. A fluorescência do Cy5 foi posteriormente avaliada por microscopia de fluorescência, permitindo verificar a presença do sinal fluorescente associado às células. As células foram cultivadas em placas de 12 poços apropriadas para microscopia contendo lamínulas de vidro,

utilizando meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de solução de penicilina, sendo incubadas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 até atingirem aproximadamente 70–80% de confluência. Na sequência, o meio foi removido e substituído por meio fresco contendo os etossomas carregados com Cy5-siRNA-MITF na concentração previamente estabelecida. As células foram incubadas e avaliadas em 15 minutos, 1 h, 2h, 4h, 6h, 8h, 10h e 24h nas mesmas condições de cultivo para permitir a internalização das vesículas.

Ao término da incubação de cada tempo, as células foram lavadas três vezes com tampão fosfato salino (PBS, pH 7,4) para remoção das formulações não internalizadas e fixadas com metanol PA por 15 minutos em temperatura ambiente. Após nova lavagem com PBS, os núcleos celulares foram corados com 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) por 10 minutos e novamente lavados para remoção do excesso do corante.

As lamínulas foram montadas sobre lâminas e analisadas em microscópio de fluorescência (HBO 100.AX10; Carl Zeiss), equipado com filtros apropriados para DAPI (excitação/emissão: 358/461 nm) e Cy5 (excitação/emissão: 649/670 nm). As imagens foram adquiridas separadamente para cada canal de fluorescência e posteriormente sobrepostas (merge) para avaliação qualitativa da localização intracelular dos etossomas contendo Cy5-siRNA-MITF. A presença do sinal fluorescente vermelho distribuído no citoplasma das células foi utilizada como indicativo da internalização dos etossomas, enquanto a marcação nuclear por DAPI permitiu a identificação da morfologia e da localização dos núcleos celulares.

4.2.8 Perfil de liberação de siRNA *in vitro* por diálise

O perfil de liberação *in vitro* do siRNA a partir dos etossomas foi avaliado utilizando o método do saco de diálise (D6191-25EA, Peso molecular: 12000 Da, 18 mm de diâmetro; Sigma-Aldrich, USA). Membranas de diálise com limite de exclusão molecular adequado para retenção dos nanocarreadores e difusão do siRNA livre foram previamente hidratadas em água ultrapura, conforme recomendação do fabricante.

O sistema foi mantido sob agitação constante em incubadora orbital a 37 ± 0,5 °C, visando reproduzir condições próximas às fisiológicas e favorecer a difusão do

siRNA para o meio receptor. Foi utilizado volume de 2 mL de PBS no compartimento receptor, com o objetivo de manter condições favoráveis à transferência do siRNA durante o período experimental. A manutenção da condição sink não foi determinada experimentalmente por meio da avaliação da solubilidade ou da concentração de saturação do siRNA no meio receptor, constituindo, portanto, uma limitação metodológica do ensaio.

Uma alíquota das formulações (200 μL): Etossoma branca (sem ativo); Etossoma-siRNA-PEG-pGLU e siRNA Livre foram transferidas para o interior da membrana de diálise, que foi devidamente vedada e imersa em um recipiente contendo 2 mL de tampão fosfato salino (PBS, pH 5,5), utilizado como meio receptor. O sistema foi mantido sob agitação constante em incubadora orbital a 37 ± 0,5 °C, visando reproduzir condições próximas às fisiológicas e favorecer a difusão do siRNA para o meio receptor. Foi utilizado volume de 2 mL de PBS no compartimento receptor, com o objetivo de manter condições favoráveis à transferência do siRNA durante o período experimental. A manutenção da condição sink não foi determinada experimentalmente por meio da avaliação da solubilidade ou da concentração de saturação do siRNA no meio receptor, mas que foram adotadas condições experimentais destinadas a favorecer a manutenção do gradiente de concentração durante o ensaio.

Em intervalos predeterminados (0,25; 2; 4; 6; 8 e 24 horas), foram coletados 10 μL do meio receptor e transferido para tubo ependorf de 1 mL para quantificação do siRNA liberado e imediatamente substituído por igual volume de PBS fresco previamente aquecido à temperatura do ensaio, mantendo o volume constante durante todo o experimento.

A concentração de siRNA presente nas amostras foi determinada por espectrofotometria utilizando o *NanoDrop*® 2000 (*Thermo Fisher Scientific*, EUA), com leitura da absorbância em 260 nm. A quantidade acumulada de siRNA liberada foi calculada considerando a concentração determinada em cada coleta, o volume do meio receptor e a correção referente às substituições sucessivas do meio. Os resultados foram expressos como porcentagem de liberação acumulada em função do tempo.

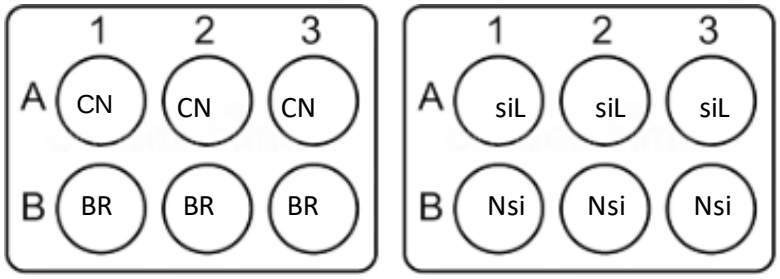
Os perfis de liberação foram posteriormente ajustados aos modelos cinéticos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer–Peppas, visando elucidar o mecanismo predominante de liberação do siRNA a partir dos etossomas.

4.2.9 Avaliação da expressão gênica por reação da cadeia de polimerase em tempo real por (RT-qPCR)

A expressão gênica foi avaliada por meio da técnica de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR), com o objetivo de determinar os níveis de expressão do gene MITF após o tratamento celular com a formulação desenvolvida.

As células de melanoma SK-MEL-28 foram transferidas para 2 placas de 6 poços na concentração de $1x10^5$ em cada poço e incubada à 37°C e 5% de CO_2 por 24 horas. Após o período de incubação foi realizado o tratamento conforme esquema ilustrado na **Figura 14**.

Figura 14. Placas preparadas para extração do RNA



Legenda:
CN – Controle negativo
BR – Etossoma Branca
siL – siRNA Livre (50 nM)
Nsi – Etossoma siRNA PEG-pGLU (50 nM).

Fonte: Elaborado pela autora, (2026),

Após 2h de tratamento, o meio foi substituído por meio fresco e as placas foram incubadas por 48h. Após o período de incubação, as células foram coletadas e submetidas à extração do RNA total utilizando o kit Pi-Clear RNA total (Pi Biotech Genética Avançada LTDA), conforme as instruções do fabricante. O RNA extraído foi utilizado para a síntese do DNA complementar (cDNA), realizada empregando-se o kit de transcrição reversa da Cellco, de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante.

Após a síntese do cDNA, foi preparada a placa de 96 poços usando um mix de SYBR pHt Biotecnologia (Phoneutria Biotecnologia e Serviços LTDA), *primers* de β-actina e de MITF, cDNA e água livre de RNAse. A amplificação e leitura foram realizadas em equipamento QuantoStudio 5 em ensaio de PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR), para posterior cálculo e determinação da expressão do gene MITF. Como controle endógeno, foi utilizado o gene β-actina, permitindo a normalização das diferenças na quantidade de material genético entre as amostras.

Cada amostra foi analisada em triplicata, juntamente com controles negativos.

A especificidade dos produtos de amplificação foi avaliada por meio da análise da curva de dissociação (*melting curve*). Os valores de ciclo de quantificação (Cq) obtidos para o gene MITF foram normalizados em relação ao gene de referência utilizado.

O grupo controle não tratado foi utilizado como referência, sendo sua expressão relativa considerada igual a 100%. Os resultados foram expressos como variação relativa da expressão do gene MITF em relação ao grupo controle

4.2.10 Avaliação da inibição da produção de melanina

A capacidade dos etossomas contendo siRNA-MITF em reduzir a produção de melanina foi avaliada utilizando células de melanoma humano SK-MEL-28. As células foram cultivadas em meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) e 1% de solução de penicilina, sendo mantidas a 37 °C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2.

As células foram semeadas em placas de 24 poços e incubadas por 24 horas para adesão. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por meio fresco contendo as formulações experimentais nas concentrações de 50 μM e 10 μM. As células permaneceram em contato com as formulações durante 2 horas. Em seguida, o meio foi removido, as células foram lavadas com tampão fosfato salino (PBS) e adicionou-se meio de cultura fresco. As culturas foram então mantidas em incubação por 6 dias, com renovação do meio de cultura no 3° dia, para permitir que o silenciamento do gene MITF promovesse alterações na síntese e no acúmulo de melanina intracelular.

Ao término do período de incubação, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS. As células foram então coletadas e centrifugadas para obtenção do pellet celular. O pellet foi ressuspendido em solução de hidróxido de sódio (NaOH 1 mol/L) contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e incubado a 80 °C por 1 hora para completa solubilização da melanina. A absorbância das amostras foi determinada em leitor de microplacas a 405 nm.

O conteúdo de melanina foi expresso como porcentagem em relação ao controle negativo (células não tratadas), considerado como 100% da produção de melanina, utilizando a seguinte equação:

$$\text{Produção de melanina (\%)} = \left(\frac{(Absorbância\ \ da\ \ amostra}{Absorbância\ \ do\ controle\ \ negativo}\right)\ x\ 100$$

Todos os experimentos foram realizados em triplicata independentes, e os resultados foram expressos como média ± desvio padrão.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise estatística foi utilizada análise de variância ANOVA com seus pressupostos de normalidade e homocedasticidade, pós-teste de Dunnet, Teste Tukey, Teste t de *student*, Teste t de Welch, com o auxílio do software *GraphPad Prism* 5,0 e Excel 365.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SEQUÊNCIAS DE siRNA E *PRIMERS*

A sequência de siRNA contra o gene MITF desenhada neste trabalho está de acordo com cinco dos oito critérios: porcentagem de GC entre 30% e 52%; baixa estabilidade na fita senso na extremidade 3' (de três a cinco pares de AU); ausência de repetições invertidas; ausência de G na posição 13 e ausência de G ou C na posição 19, propostos por Reynolds e colaboradores (2004). Além disso, tamanhos de 21 e 22 pares de base e *overhangs* na extremidade 3' da fita *antisense* são importantes para degradação específica do RNA mensageiro (Elbashir *et al.*, 2001b). A sequência de siRNA do MITF e *primers* estão apresentadas nas **Tabelas 3 e 4**.

Tabela 3 – Sequências de siRNA.

Posição	Sequência	Padrão	GC %	VT
880-902	S 5': GUGGACUAUAUCCGAAAGU dUdG mRNA: CC GTGGACTATATCCGAAAGT TG AS 3': GdGd CACCUGAUAUAGGCUUUCA	C	42	-5,4 (-11,7, -6,3)

S: *sense*; AS: *antisense*; GC %: porcentagem de guanina citosina; VT: Valores termodinâmicos.

Tabela 4 – Sequências de *Primers.*

	Sequência (5'→3')	Fita molde	Com	Início	Fim	TM	GC %	C	C 3'
Forward primer	GCCAAGACCTCCTTCAGCAT	Mais	20	1105	1124	60,0	55	3	2
Reverse primer	AAAGGGTGTCGTCCATCAGG	Menos	20	1281	1262	59,6	55	2	1
Com.do produto	177								

Com: Comprimento; PF: Temperatura de fusão; GC%: porcentagem de guanina citosina; C: Autocomplementaridade; C 3': Autocomplementaridade 3'

A **Figura 14** mostra a sequência de 1815 pares de base do MRNA maturado do gene MITF, permitindo uma ampla visualização do local exato em que o siRNA desenhado pareia com o MRNA desse gene. O siRNA de 22 pares de base emparelha nos nucleotídeos 880-902 que fazem parte do éxon 2 do MRNA.

A ferramenta de pesquisa de alinhamento BLAST mostra se a sequência desenhada possui homologia a outros genes. A sequência de MITF definida neste estudo se mostrou específica ao gene com valores que contemplam os critérios exigidos. A sequência de siRNA MITF apresentou 100% de homologia ao seu MRNA apenas com MITF, e possuiu menos de 70% de homologia com outros genes.

Figura 14 – Indicação do sítio de ligação do siRNA ao éxon 2 do RNA mensageiro do gene MITF

GGTGGTGTCTCGGGATACCTTGTTTATAGTACCTTCTCTTTGCCAGTCCATCTTCAAATTGGAATTATAG
AAAGTAGAGGGAGGGATAGTCTACCGTCTCTCACTGGATTGGTGCCACCTAAAACATTGTTATGCTGGAA
ATGCTAGAATATAATCACTATCAGGTGCAGACCCACCTCGAAAACCCCACCAAGTACCACATACAGCAAG
CCCAACGGCAGCAGGTAAAGCAGTACCTTTCTACCACTTTAGCAAATAAACATGCCAACCAAGTCCTGAG
CTTGCCATGTCCAAACCAGCCTGGCGATCATGTCATGCCACCGGTGCCGGGGAGCAGCGCACCCAACAGC
CCCATGGCTATGCTTACGCTTAACTCCAACTGTGAAAAAGAGGGATTTTATAAGTTTGAAGAGCAAAACA
GGGCAGAGAGCGAGTGCCCAGGCATGAACACACATTCACGAGCGTCCTGTATGCAGATGGATGATGTAAT
CGATGACATCATTAGCCTAGAATCAAGTTATAATGAGGAAATCTTGGGCTTGATGGATCCTGCTTTGCAA
ATGGCAAATACGTTGCCTGTCTCGGGAAACTTGATTGATCTTTATGGAAACCAAGGTCTGCCCCCACCAG
GCCTCACCATCAGCAACTCCTGTCCAGCCAACCTTCCCAACATAAAAAGGGAGCTCACAGCGTGTATTTT
TCCCACAGAGTCTGAAGCAAGAGCACTGGCCAAAGAGAGGCAGAAAAAGGACAATCACAACCTGATTGAA
CGAAGAAGAAGATTTAACATAAATGACCGCATTAAAGAACTAGGTACTTTGATTCCCAAGTCAAATGATC
CAGACATGCGCTGGAACAAGGGAACCATCTTAAAAGCATCCGTGGACTATATCCGAAAGTTGCAACGAGA
ACAGCAACGCGCAAAAGAACTTGAAAACCGACAGAAGAAACTGGAGCACGCCAACCGGCATTTGTTGCTC
AGAATACAGGAACTTGAAATGCAGGCTCGAGCTCATGGACTTTCCCTTATTCCATCCACGGGTCTCTGCT
CTCCAGATTTGGTGAATCGGATCATCAAGCAAGAACCCGTTCTTGAGAACTGCAGCCAAGACCTCCTTCA
GCATCATGCAGACCTAACCTGTACAACAACTCTCGATCTCACGGATGGCACCATCACCTTCAACAACAAC
CTCGGAACTGGGACTGAGGCCAACCAAGCCTATAGTGTCCCCACAAAAATGGGATCCAAACTGGAAGACA
TCCTGATGGACGACACCCTTTCTCCCGTCGGTGTCACTGATCCACTCCTTTCCTCAGTGTCCCCCGGAGC
TTCCAAAACAAGCAGCCGGAGGAGCAGTATGAGCATGGAAGAGACGGAGCACACTTGTTAGCGAATCCTC
CCTGCACTGCATTCGCACAAACTGCTTCCTTTCTTGATTCGTAGATTTAATAACTTACCTGAAGGGGTTT
TCTTGATAATTTTCCTTTAATATGAAATTTTTTTTCATGCTTTATCAATAGCCCAGGATATATTTTATTT
TTAGAATTTTGTGAAACAGACTTGTATATTCTATTTTACAACTACAAATGCCTCCAAAGTATTGTACAAA
TAAGTGTGCAGTATCTGTGAACTGAATTCACCACAGACTTTAGCTTTCTGAGCAAGAGGATTTTGCGTCA
GAGAAATGTCTGTCCATTTTTATTCAGGGGAAACTTGATTTGAGATTTTTATGCCTGTGACTTCCTTGGA
AATCAAATGTAAAGTTTAATTGAAAGAATGTAAAGCAACCAAAAAGAAAAAAAAAAAGAAAGAAAGAGGA
AAAGAAATCCATACTAACCCTTTTCCATTTTATAAATGTATTGATTCATTGGTACTGCCTTAAAGATACA
GTACCCCTCTAGCTTTGTTTAGTCTTTATACTGCAAACTATTTAAAGAAATATGTATTCTGTAAAAGAAA
AAAAAAATGCGGCCTTTTCATGAGGATCGTCTGGTTAGAAAACATAACTGATACCAACCGAAACTGAAGG
GAGTTAGACCAAGGCTCTGAAATATAAAGTCTAATCTTGCTCTCTTTTATTCTGTGCTGTTACAGTTTTC
TTCATCAATGAGTGTGATCCAGTTTTTCATAAGATATTTTATTTTGAAATGGAAATTAATGTCCTCTCAA
AGTAAAATATTGAGGAGCACTGAAAGTATGTTTTACTTTTTTTTTATTTTATTTTTGCTTTTGATAAGAA
AACCGAACTGGGCATATTTCTAATTGGCTTTACTATTTTTATTTTTAAATTATGTTTTACTGTTCATTTG
ATTTGTACAGATTCTTTATTATCATTGTTCTTTTCAATATATTTGTATTAATTTGTAAGAATATGCATCT
TAAAATGGCAAGTTTTCCATATTTTTACAACTCACTGGTGGTTTTCCGCATTCTTTGTACACCCATGAAA
GAAAACTTTTATGCAAGGTCTTGCATTTAAAAGACAGCTTTGCGAATATTTTGTAAATTACAGTCTCACT
CAGAACTGTTTTTGGACACATTTAAGGTGTAGTATTAATAGGTTAAAACCAGGCTTTCTAGAAAGAATAA
ACTTACATATTTATTTTTAGGACATGAAAATAGCAATATTCTTGGAGATTGATAACCATAGCATTAATAC
GCCCATTATGGTCATTTAAATTGGGGTTTATTTCAGCAAACTTGTTGAATTTATTTTTAAGAAAGAAATA
CTGTATTGGGAAGTTACTGTTACTTGATAACAATGTTTTAACAAGAAGCAATGTTATAAAGTTAGTTTCA
GTGCATTATCTACTTGTGTAGTCCTATGCAATAACAGTAGTGTTACATGTATCAAGCCTAGATGTTTTAT
ACAGATGCCATATAGTGTTATGAGCCAGGCTGTTGAATGGAATTTCTCAGTAGCAGCCTACAACTGAATA
GCAAGTGGCATAAAGCATATCCATTCAGAATGAAGTGCCTTAAATATAGCAGTAGTCTTTTTTGGACTAG
CACTGACTGAACTGTAATGTAGGGGAAAGTTTCATGATGGTATCTATAGTCAAGACGAACATGTAGCATG
GTGCCTATGTAGACAATATAAGAGCTTCCAATTTTCCTTCAGATATTTTTAATATTAAATATATTTTAGT
GACAGAGTGCCAACTTCTTTCATCAGGAAACCTTATTCAGGAGGGTTTTTAAAAAGTGTTTAAATGTCAA
ATGTGAATTGGTGATGGGTGATGGAGGGTTCAGAGAGGAGTGATCGTCAGATGTGTGAATGGACGGTTTA
GGTGAAAATAATCAACTGCATAGTTCCCATGCACGCTGGGCAATGAGAATCCTTGGAAACATTGGTGATG

CTATCAGTTTTATAGCTTTATTTCTTAAGGGGGTAGGGAAAATTAGTTCCCATTCTTTCAACCCCCTTAA
CTGTATAGCTCTTTTCCTAGAATAGTGACGCAAATCTGCATGAACAGCTAATTGTACCATAGTGTTCATT
GATACAATCATAGCATTGTCTATTTTTCTCTTCATATTTATATGGGGGGGAGGGCGCTGGATGCAAAAGT
TGAAGATCGTGATGCTATGATGTTAGTTTTCCTTAGCTGATTTTGAGGGTTTTTAAAAATAAAGCAAGGT
TGACTAACCTACGGCCACGGGAACAGGACCATGGTTAAGCAACCATATAGAAAGCTTTGTTGAAAGAAAG
TATGGCATCTTGTACCACTGCCCTGACTGTCACAACTCCTAACCTTGCCATTGCCTGCCTCCCCCTCCCC
TTCTCCTTAAGAGACAATTTCTGCAGGTGGCAGGTGAGCAAGCCCAGGAGAATGCTGCAATCTTGGGGGT
GGTTTTATTTATTTCTTTTTTGCCAAATAGAGTGTGGATTCATTTCAGGGGCTAGCTAAGCCAAGAGGCA
GTGGTTTGGGCTTGTTGTTTGTAACAAGAAAATGATCCACACCACTCCCCCGATTCCCGGGTGCAGAATT
GTAACTCGGGGTTGGGCCTCTATATGGAGTGACCAAAATGCCAAAATTGTCCATCTGCCTCTGAGTAGGG
CAATGGAAATACCAAACCTTCTGACTTTGCCAAAAAGCATACAAGCAACCTGGTCATACATAGGATGACA
AAATTCTTTCTGGTTGTTTTTAAACAATAAAGCAATAAGAACAAATACAATACATAGGAAGTTAAAAGCA
CAAAGGAATGAACTTATTAATATTTTTGAAAAATGCACTGGGAAAAAGTTGATGTCAATAACAGTATAAA
ACAGCCCTATTTCTTGATAAAAAATGACAAATGACTGTCTCTTGCGGATGCTTGGTACTGTAATGTTAAT
AATAGTCACCTGCTGTTGGATGCAGCAATAATTTCTGTATGGTCCATAGCACTGTATATTATGGATCGAT
ATTAATGTATCCAATGAAATAATCGACTTGTTCTTGATAGCCTCATTAAAGCATTTGGTTTTTCA

Fonte: NCBI *Reference Sequence*: NM_000248.4; *GenBank Graphics*;
>NM_000248.4 *Homo sapiens melanocyte inducing transcription factor* (MITF), *transcript variant* 4, mRNA.

5.2 DESENVOLVIMENTO E SELEÇÃO DA FORMULAÇÃO DE ETOSSOMA

Os resultados obtidos no planejamento fatorial 2^3 com ponto central demonstraram que as diferentes combinações dos componentes da formulação produziram sistemas com características físico-químicas distintas (**Tabela 5**). Inicialmente, o experimento 5 (1% de fosfolipídio, 30% de etanol e 0,20% de CTAB) foi considerado a condição mais promissora sob o ponto de vista físico-químico, apresentando diâmetro hidrodinâmico de 57,82 nm e índice de polidispersão de 0,123. Entretanto, a avaliação da viabilidade celular demonstrou que, apesar das características físico-químicas favoráveis, essa formulação apresentou elevada citotoxicidade, inviabilizando sua seleção para as etapas subsequentes do estudo.

Diante desse resultado, outras formulações do planejamento, incluindo os experimentos 6 e 2, foram avaliadas quanto à viabilidade celular. Entretanto, essas condições também apresentaram redução da viabilidade celular, indicando que a seleção da formulação não poderia ser baseada exclusivamente nos parâmetros físico-químicos obtidos pelo planejamento experimental. Dessa forma, a viabilidade celular foi incorporada como um critério adicional para a seleção da formulação mais adequada.

Tabela 5. Resultados do Planejamento fatorial 2^3 com ponto central

Experimento	Fatores			Interações				Resultados			Ordem de
	X1	X2	X3	X12	X13	X23	X123	DHM	PDI	pZ	Realização
1	-1	-1	-1	1	1	1	-1	69,11	0,209	35,3	4
2	1	-1	-1	-1	-1	1	1	73,95	0,305	30,8	11
3	-1	1	-1	-1	1	-1	1	116,30	0,398	52,7	6
4	1	1	-1	1	-1	-1	-1	300,30	0,599	52,0	1
5	-1	-1	1	1	-1	-1	1	57,82	0,123	28,5	7
6	1	-1	1	-1	1	-1	-1	79,95	0,048	44,5	2
7	-1	1	1	-1	-1	1	-1	73,68	0,256	52,7	8
8	1	1	1	1	1	1	1	120,00	0,431	56,3	10
9	0	0	0	0	0	0	0	87,80	0,070	45,4	5
10	0	0	0	0	0	0	0	78,60	0,172	49,2	3
11	0	0	0	0	0	0	0	62,78	0,100	43,0	9

Fonte: Elaborada pela autora, (2026); X1: % de fosfolipídio; X2: % Etanol; X3: % de CTAB; DHM: diâmetro hidrodinâmico médio; PDI: índice de polidispersividade; pZ: potencial Zeta.

A partir dos resultados obtidos, foi realizada uma etapa complementar de otimização experimental, tendo como referência a região de menores concentrações de etanol e tensoativo catiônico. O experimento 1, constituído por 1% de fosfolipídio, 30% de etanol e 0,10% de CTAB, apresentou características físico-químicas adequadas, com diâmetro hidrodinâmico de 69,11 nm e PDI de 0,209. Considerando que essa condição apresentava os menores níveis de etanol e CTAB avaliados no planejamento, optou-se por investigar uma modificação dessa composição, aumentando-se a concentração de fosfolipídio de 1 para 2%, enquanto foram mantidas as concentrações de etanol (30%) e CTAB (0,10%).

A escolha de 2% de fosfolipídio foi baseada na utilização de uma concentração intermediária desse componente, uma vez que o planejamento contemplava os níveis de 1, 2 e 3%. Entretanto, a combinação específica de 2% de fosfolipídio, 30% de etanol e 0,10% de CTAB não fazia parte da matriz experimental originalmente estabelecida. Assim, essa composição foi considerada uma condição experimental complementar, definida a partir da análise integrada dos resultados físico-químicos e de viabilidade celular, e não como uma condição diretamente prevista pelo planejamento fatorial.

Essa estratégia permitiu avaliar a possibilidade de manutenção de uma concentração intermediária do componente estrutural da vesícula, simultaneamente à utilização das menores concentrações de etanol e CTAB investigadas. A utilização de carreadores catiônicos para complexação e entrega de siRNA baseia-se na forte interação eletrostática entre os grupos fosfato do RNA e moléculas carregadas

positivamente, mecanismo amplamente descrito na literatura, como no trabalho de Ewert *et al*. (2010). Esse mecanismo é especialmente relevante para o desenvolvimento de nanocarreadores destinados à entrega de moléculas de RNA, uma vez que a complexação pode proteger o material genético e favorecer sua interação com as células. Contudo, embora a carga positiva seja importante para a associação e internalização do siRNA, o excesso de componentes catiônicos na superfície das nanopartículas pode comprometer a biocompatibilidade do sistema (Ewert *et al.*, 2010).

Estudos como o de Jia *et al*. (2020) demonstram que sistemas contendo tensoativos catiônicos podem apresentar efeitos citotóxicos, particularmente quando esses componentes estão presentes em elevada proporção na superfície dos nanomateriais, podendo afetar a viabilidade celular e induzir alterações relacionadas ao estresse oxidativo. Dessa forma, a utilização de componentes catiônicos requer um equilíbrio entre a capacidade de complexação e entrega do siRNA e a segurança biológica do sistema.

Nesse contexto, a modificação superficial com Polietileglicol-bloco-poliGlutamato (PEG-pGLU), foi empregada como estratégia para aprimorar o perfil da formulação selecionada, buscando reduzir os efeitos adversos associados à superfície catiônica sem comprometer a capacidade do etossoma de incorporar o siRNA (Jia *et al*., 2020).

A formulação obtida nessa etapa foi então submetida aos ensaios biológicos e subsequente caracterização físico-química. Dessa maneira, a seleção da formulação final foi baseada não somente na obtenção de propriedades físico-químicas favoráveis, mas também na necessidade de assegurar maior compatibilidade celular, aspecto essencial para a aplicação do sistema como nanocarreador de siRNA.

5.3 ESTUDO DA VIABILIDADE CELULAR PELO ENSAIO DE MTT

A viabilidade celular da formulação desenvolvida foi avaliada pelo ensaio de redução do MTT após exposição a duas linhagens celulares, SK-MEL-28 e HaCat, à diferentes condições experimentais, nas concentrações de 200, 100, 50, 25 e 12,5 nM. Os resultados foram expressos em porcentagem média em relação ao grupo controle, cuja viabilidade foi considerada como 100%. Os ensaios foram realizados de forma sequencial, acompanhando as etapas de seleção e otimização da formulação,

de modo que os resultados obtidos em cada avaliação orientaram a etapa experimental subsequente. Também foi avaliada a viabilidade celular em linhagem celular L929, apenas para o CTAB e para o Etanol isolados. Todos os resultados foram tratados estatisticamente com a ANOVA de fator único com Pós-Teste de *Dunnett*, com auxílio de software *GraphPad Prism* 5.0.

A significância estatística das diferenças observadas na viabilidade celular foi representada por asteriscos nos gráficos. O símbolo * indica diferença estatisticamente significativa para $p < 0,05$; ** indica $p < 0,01$; *** indica $p < 0,001$; e **** indica $p < 0,0001$. A ausência de asteriscos ou “ns” indica que não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos comparados ($p \geq 0,05$). As análises foram realizadas considerando nível de significância de 5%.

5.3.1 Viabilidade celular para a linhagem celular SK-MEL-28

Os resultados da viabilidade para esta linhagem estão apresentados na **Tabela 6**.

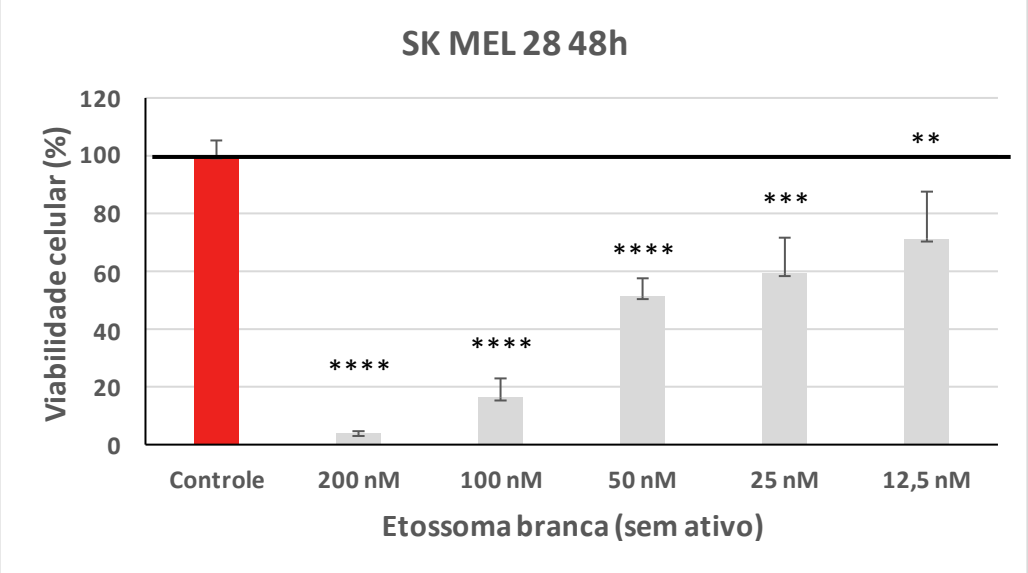
Tabela 6. Resultados do ensaio de viabilidade celular por MTT para a linhagem celular SK-MEL-28.

Viabilidade Celular em Célula SK-MEL-28					
Concentração	**Etossoma Branca**	**Etossoma siRNA**	**Etossoma siRNA PEG-GLU**	**siRNA Livre**	**Controle**
200 nM	4,03 ± 0,61%	3,59 ± 0,42%	18,56 ± 17,13%	105,44 ± 26,88%	
100 nM	16,25 ± 6,64%	5,04 ± 0,41%	48,42 ± 7,23%	135,55 ± 5,34%	
50 nM	51,39 ± 6,18	43,62 ± 6,99%	72, 73 ± 7,23%	89,63 ± 12,84%	100 ± 5,18%
25 nM	59,37 ± 12,29%	47,29 ± 16,60	88,27 ± 29,99%	100,80 ± 16,51%	
12,5 nM	71,34 ± 16,23%	71,23 ± 1,42%	93,88 ± 8,73%	97,82 ± 11,45%	

Fonte: Elaborado pela autora (2026); n=3

Inicialmente foi avaliada a viabilidade celular do etossoma branca, sem incorporação de siRNA, com o objetivo de determinar o efeito dos componentes da própria formulação sobre as células. Observou-se redução acentuada da viabilidade nas maiores concentrações avaliadas, com valores médios de 4,0 ± 0,6% e 16,3 ± 6,6% nas concentrações de 200 e 100 nM, respectivamente. Nas concentrações de 50, 25 e 12,5 nM, as viabilidades médias foram de 51,4 ± 6,2%, 59,4 ± 12,3% e 71,3 ± 16,2%, respectivamente (**Gráfico 1**). Dessa forma, apenas a concentração de 12,5 nM apresentou viabilidade superior a 70%, embora próxima ao limite adotado para a interpretação da citotoxicidade.

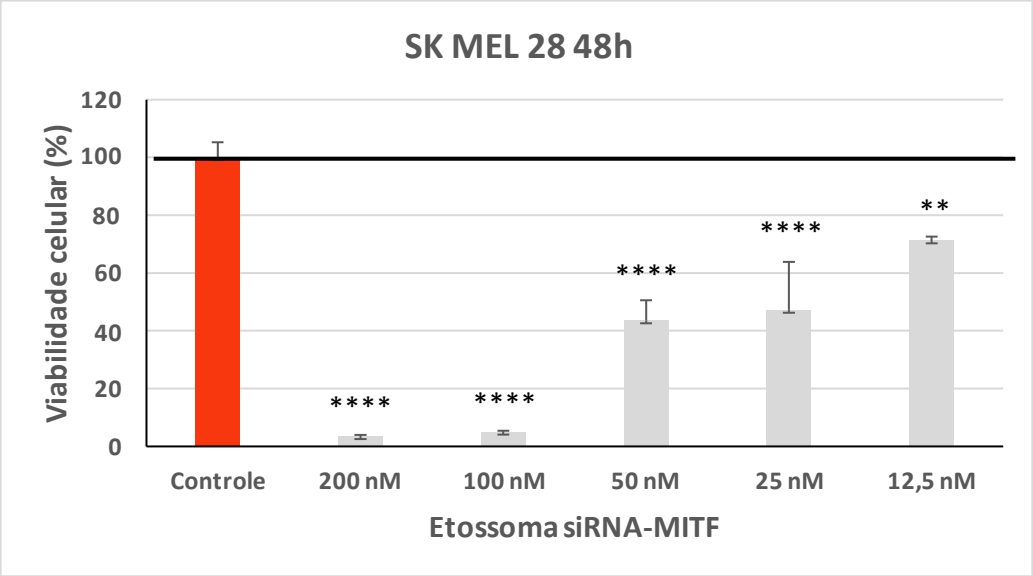
Gráfico 1. Viabilidade celular em etossoma branca (sem ativo) em linhagem celular SK-MEL-28



* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** indica p < 0,0001. ns: não apresentou diferença significativa (p ≥ 0,05).
Fonte: Elaborado pela autora, (2026).

Em seguida, foi avaliada a formulação de etossoma contendo siRNA. O perfil observado foi semelhante ao obtido para o etossoma branca, com viabilidades médias de 3,6 ± 0,4% e 5,0 ± 0,4% nas concentrações de 200 e 100 nM, respectivamente. Nas concentrações de 50 e 25 nM, foram observados valores de 43,6 ± 7,0% e 47,3 ± 16,6%, respectivamente, enquanto na concentração de 12,5 nM a viabilidade média foi de 71,2 ± 1,4% (**Gráfico 2**). Assim, somente a menor concentração avaliada apresentou viabilidade superior a 70%.

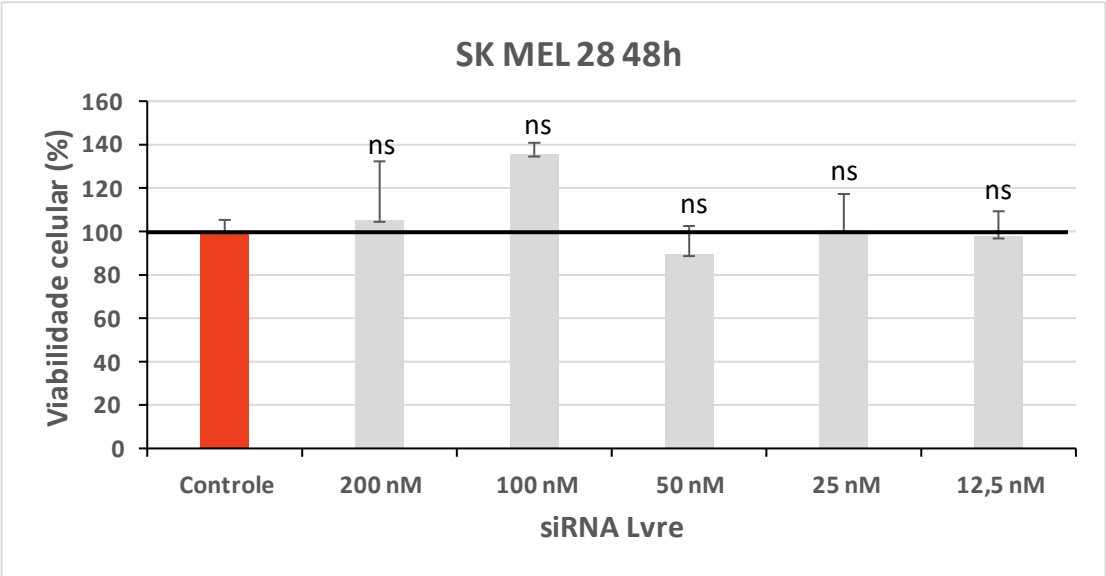
Gráfico 2. Viabilidade celular em etossoma siRNA em linhagem celular SK-MEL-28.



* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** indica p < 0,0001. ns: não apresentou diferença significativa (p ≥ 0,05).
Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Como etapa de controle para avaliar a contribuição do siRNA para os resultados observados, foi analisada também a viabilidade celular após exposição ao siRNA livre. Diferentemente das formulações vesiculares, o siRNA livre não promoveu redução relevante da viabilidade celular em nenhuma das concentrações avaliadas. Os valores médios variaram de 89,6 ± 12,8% a 135,6 ± 5,3% (**Gráfico 3**), permanecendo acima de 70% em todas as condições experimentais.

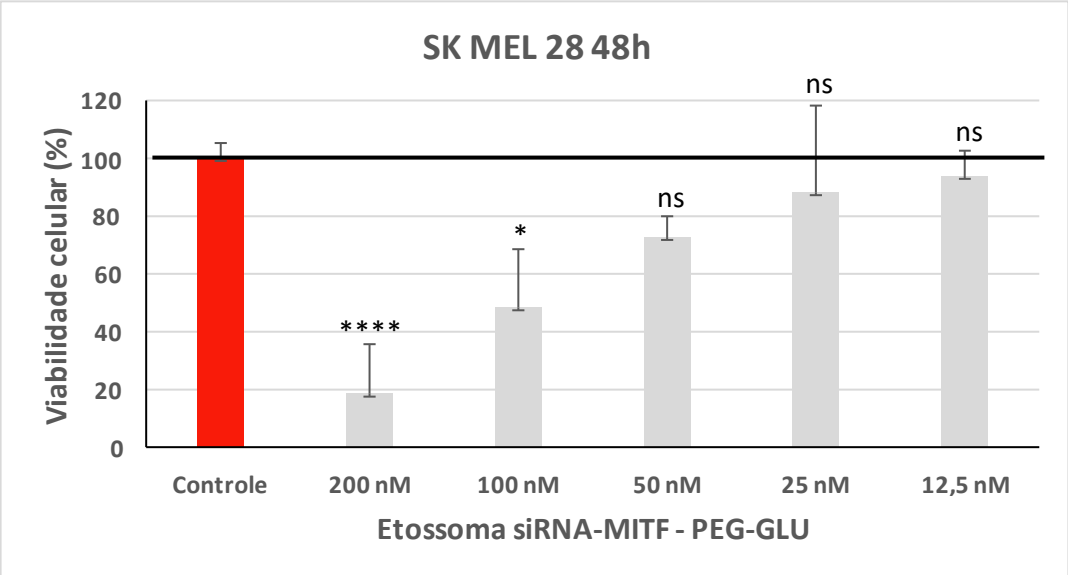
Gráfico 3. Viabilidade celular em siRNA Livre em linhagem celular SK-MEL-28



* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** indica p < 0,0001. ns: não apresentou diferença significativa (p ≥ 0,05).
Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Diante dos resultados obtidos com as formulações não modificadas, foi avaliada a formulação de etossoma contendo siRNA e modificado superficialmente com PEG-pGLU, visando à obtenção de um sistema com maior compatibilidade celular. Na concentração de 200 nM, foi observada viabilidade média de 18,6 ± 17,1%. Nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5 nM, os valores foram de 48,4 ± 20,1%, 72,7 ± 7,2%, 88,3 ± 30,0% e 93,9 ± 8,7%, respectivamente (**Gráfico 4**).

Gráfico 4. Viabilidade celular em etossoma siRNA-PEG-pGLU em linhagem celular SK-MEL-28.



* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** indica p < 0,0001. ns: não apresentou diferença significativa (p ≥ 0,05).
Fonte: Elaborado pela autora (2026).

A avaliação da viabilidade celular do ensaio de MTT na linhagem de melanoma humano SKMEL-28 revelou através da ANOVA com pós-teste de Dunnett marcantes diferenças de biocompatibilidade entre as formulações testadas.

Para as nanoestruturas não peguiladas (Etossoma Branca e Etossoma siRNA), observou-se acentuada citotoxicidade dose-dependente, com redução estatisticamente significativa da viabilidade celular (p<0,001). Em ambas as formulações e em todas as concentrações testadas houve diferença estatisticamente significativa comparada às células não tratadas.

Em contrapartida, a funcionalização superficial na formulação Etossoma siRNA PEG-pGLU atenuou significativamente o impacto citotóxico nas células SKMEL-28. Nas concentrações de 12,5; 25 e 50 nM não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle não tratado ($p > 0,05$). O efeito citotóxico desta nanoformulação ficou restrito às concentrações de 100 e 200 nM ($p < 0,001$).

Por fim, o siRNA livre não promoveu alterações na viabilidade em nenhuma das concentrações analisadas ($p > 0,05$), atestando a biocompatibilidade da macromolécula isolada e corroborando que a citotoxicidade observada nas altas doses das nanoformulações é decorrente do veículo etossomal.

5.3.2. Viabilidade celular para a linhagem celular HaCat

Os resultados da viabilidade celular para a célula HaCat estão mostrados na **Tabela 7**.

Tabela 7. Resultados do ensaio de viabilidade celular por MTT para a linhagem celular HaCat

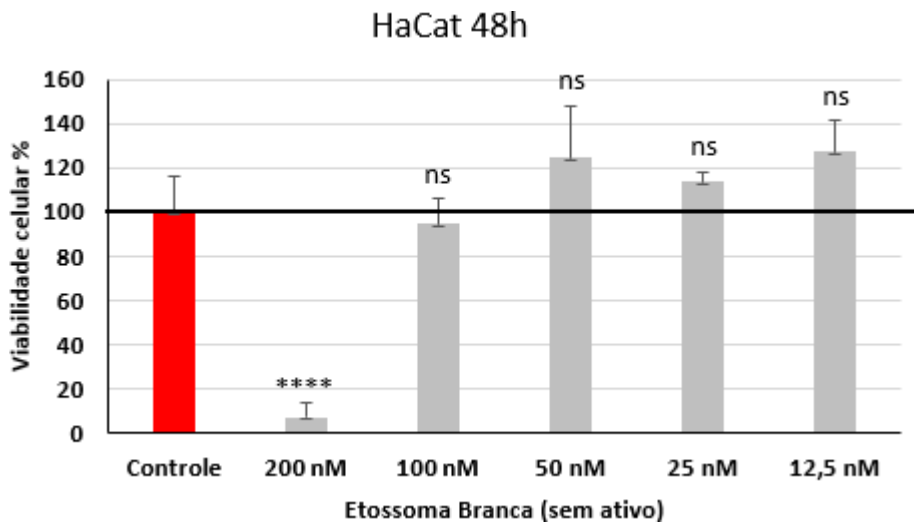
Viabilidade Celular em Célula HaCat					
Concentração	**Etossoma Branca**	**Etossoma siRNA**	**Etossoma siRNA PEG-GLU**	**siRNA Livre**	**Controle**
200 nM	7,52 ± 0,50%	7,25 ± 0,08%	36,07 ± 9,22%	93,04 ± 11,31%	
100 nM	94,68 ± 10,98%	100,20 ± 7,68%	100,34 ± 20,72%	104,87 ± 19,39%	
50 nM	124,74 ± 28,85	112,11 ± 1,47%	109,87 ± 3,88%	93,27 ± 13,50%	100 ±16,06%
25 nM	113,88 ± 4,57%	108,34 ± 1,92	110,49 ± 7,64%	109,39 ± 5,08%	
12,5 nM	127,46 ± 14,08%	106,12 ± 3,79%	108,45 ± 11,57%	104,18 ± 19,12%	

Fonte: Elaborada pela autora (2026); n=3

A avaliação da citotoxicidade da formulação etossomal branca revelou um perfil dose-dependente marcante. Na maior concentração testada (200 nM), observou-se uma redução drástica na viabilidade celular para 7,52%±0,50% ($p<0,0001$ vs. controle), caracterizando elevada citotoxicidade.

Por outro lado, as concentrações de 12,5 a 100 nM não apresentaram diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle não tratado ($p>0,05$), mantendo valores de viabilidade celular entre 94,68% e 127,46%. Esses achados mostram melhora da viabilidade e uma boa biocompatibilidade da formulação nessas faixas de concentração (**Gráfico 5**).

Gráfico 5. Viabilidade celular em etossoma branca (sem ativo) em linhagem celular HaCat.



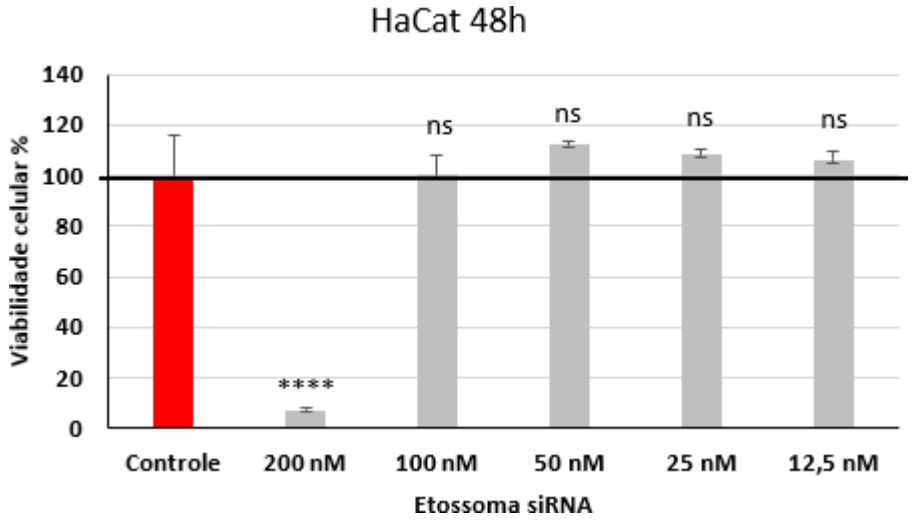
* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** indica p < 0,0001. ns: não apresentou diferença significativa (p ≥ 0,05).
Fonte: Elaborado pela autora (2026).

A avaliação do efeito da nanoformulação Etossoma siRNA sobre a viabilidade celular revelou um perfil de citotoxicidade dose-dependente bem delimitado.

Na concentração máxima de 200 nM, observou-se uma redução acentuada na viabilidade metabólica para 7,25% ± 0,08% (p<0,0001 vs. controle), caracterizando citotoxicidade severa.

Em contrapartida, as concentrações de 12,5 a 100 nM mantiveram taxas de viabilidade celular normais e elevadas (106,12; 108,34; 112,11; e 100,20%, respectivamente), sem diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle não tratado (p > 0,05). Esses dados sugerem a biocompatibilidade da nanoestrutura complexada ao siRNA nesta linhagem celular em faixas até 100 nM, assegurando uma janela terapêutica segura para os ensaios funcionais de silenciamento gênico (**Gráfico 6**).

Gráfico 6. Viabilidade celular em etossoma siRNA em linhagem celular HaCat.

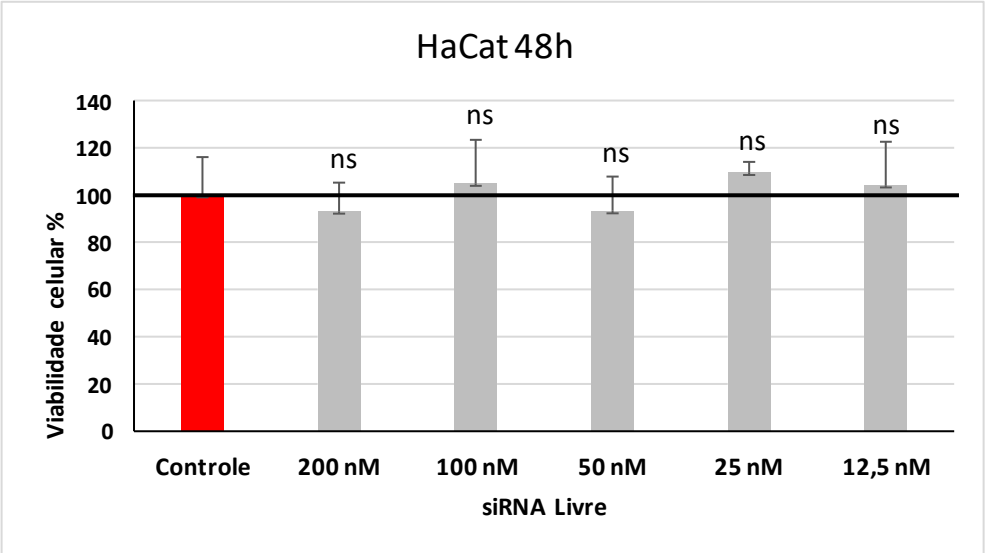


* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** indica $p < 0,0001$. ns: não apresentou diferença significativa ($p \geq 0,05$).
Fonte: Elaborado pela autora (2026).

A avaliação da citotoxicidade do siRNA livre demonstrou total ausência de toxicidade celular em todas as concentrações testadas (12,5 a 200 nM), não apresentando diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle não tratado ($p > 0,05$) (**Gráfico 7**).

A preservação da integridade metabólica e a ausência de resposta citotóxica pelo siRNA não encapsulado confirmam a segurança intrínseca da molécula de ácido nucleico isolada, evidenciando que os efeitos citotóxicos observados na concentração máxima de 200 nM para as formulações etossomais decorrem do componente vesicular carreador, e não da presença da macromolécula de ácidos nucleicos.

Gráfico 7. Viabilidade celular em etossoma siRNA Livre em linhagem celular HaCat.

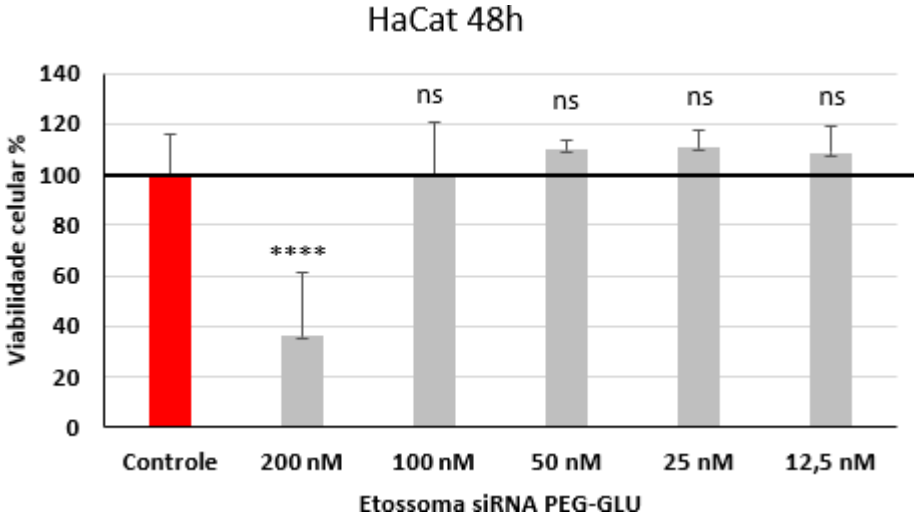


* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** indica p < 0,0001. ns: não apresentou diferença significativa (p ≥ 0,05).
Fonte: Elaborado pela autora (2026).

A avaliação da citotoxicidade do Etossoma siRNA PEG-pGLU revelou ausência de citotoxicidade nas concentrações de 12,5 a 100 nM, cujos percentuais de viabilidade mantiveram-se entre 100,34 e 110,49, sem diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle não tratado (p > 0,05) (Gráfico 8).

Na maior concentração avaliada (200 nM) observou-se redução da viabilidade celular para 36,07% ± 9,22% (p<0,0001 vs. controle), caracterizando perfil citotóxico. Contudo, destaca-se que a modificação superficial da nanoestrutura (PEGuilação) atenuou a citotoxicidade acentuada observada em 200 nM para as formulações sem o revestimento.

Gráfico 8. Viabilidade celular em etossoma siRNA-PEG-pGLU em linhagem celular HaCat.



* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001; **** indica p < 0,0001. ns: não apresentou diferença significativa (p ≥ 0,05).
Fonte: Elaborado pela autora, (2026).

A comparação dos diferentes sistemas demonstrou diferenças no perfil de viabilidade celular em função da composição da formulação e da concentração avaliada. O etossoma branca e o etossoma contendo siRNA apresentaram redução acentuada da viabilidade nas maiores concentrações, enquanto o siRNA livre manteve valores superiores a 70% em todo o intervalo avaliado. A formulação contendo siRNA e modificada com PEG-pGLU apresentou maior viabilidade, principalmente nas maiores concentrações.

Considerando-se o critério de viabilidade celular (diferença estatisticamente significativamente em relação ao controle), foram consideradas não citotóxicas as concentrações de 12,5 nM para o etossoma branca e para o etossoma contendo siRNA; as concentrações de 50, 25 e 12,5 nM para o etossoma contendo siRNA - PEG-pGLU; e todas as concentrações avaliadas para o siRNA livre (**Tabela 8**).

Tabela 8. Resumo do resultado do MTT para SK-MEL-28

Formulação	Concentrações com viabilidade (estatisticamente semelhantes ao controle)
Etossoma branca	12,5 nM
Etossoma siRNA	12,5 nM
Etossoma siRNA PEG-PGLU	50, 25 e 12,5 nM
siRNA livre	200, 100, 50, 25 e 12,5 nM

Fonte: Elaborado pela autora, (2026)

Os resultados de viabilidade celular foram utilizados em conjunto com os parâmetros físico-químicos previamente obtidos para a seleção da formulação a ser empregada nas etapas subsequentes do estudo. Embora algumas formulações tenham apresentado características físico-químicas favoráveis, os resultados do MTT demonstraram que essas propriedades não foram suficientes para garantir adequada compatibilidade celular. Nesse contexto, a formulação contendo siRNA-PEG-pGLU apresentou o perfil de viabilidade mais favorável entre os sistemas vesiculares avaliados, especialmente nas concentrações de 50 nM ou inferiores, sendo, portanto, selecionada para continuidade da caracterização e ensaios biológicos**.**

A avaliação da viabilidade celular constituiu uma etapa fundamental para a seleção da formulação, uma vez que o desempenho físico-químico de um nanocarreador não é suficiente, isoladamente, para determinar sua adequação para aplicações biológicas. No presente estudo, os resultados do ensaio de MTT demonstraram que a resposta celular foi dependente tanto da composição da formulação quanto da concentração avaliada, evidenciando a necessidade de considerar simultaneamente as características físico-químicas e a biocompatibilidade na seleção do sistema etossomal.

Dessa forma, os resultados sugerem que a redução da viabilidade observada nas formulações vesiculares está relacionada principalmente à composição do sistema de transporte e à concentração empregada.

Essa interpretação é consistente com estudos realizados com sistemas lipídicos catiônicos destinados à entrega de siRNA, nos quais a citotoxicidade é

influenciada pela natureza e pela concentração dos componentes catiônicos e pela razão entre o material catiônico e o siRNA. Moutou *et al*.; (2018), por exemplo, demonstraram que a toxicidade de lipossomas catiônicos contendo siRNA é dependente tanto da composição lipídica quanto da razão de complexação, sendo observada redução mais pronunciada da viabilidade em condições com maior proporção do componente catiônico.

No presente estudo, essa relação é particularmente relevante devido à presença do CTAB, um componente catiônico empregado na formulação para favorecer a associação com o siRNA. A natureza aniônica do siRNA, decorrente dos grupos fosfato presentes em sua cadeia, favorece sua associação com componentes de carga positiva por meio de interações eletrostáticas. Estudos demonstram que surfactantes catiônicos, incluindo o CTAB, podem se associar aos ácidos nucleicos por interações eletrostáticas e hidrofóbicas, formando complexos capazes de modificar suas propriedades físico-químicas (Sokolik *et al*., 2004). Entretanto, o aumento da carga positiva do sistema também pode intensificar sua interação com as membranas celulares, que apresentam caráter predominantemente aniônico, favorecendo a adsorção e a internalização, mas podendo também aumentar interações inespecíficas e efeitos citotóxicos. Dessa forma, embora o caráter catiônico seja desejável para favorecer a associação e a entrega intracelular de ácidos nucleicos, o excesso de carga positiva pode comprometer a integridade da membrana e, consequentemente, a biocompatibilidade do sistema (Xue; Liu; Wong, 2014).

A ausência de redução significativa da viabilidade observada para o siRNA livre constitui um resultado importante para a interpretação dos dados. Além de indicar que o siRNA, nas concentrações avaliadas, apresentou boa compatibilidade celular nas condições experimentais empregadas, esse resultado reforça que a redução da viabilidade observada para os sistemas etossomais está associada à própria plataforma de entrega. Esse aspecto é particularmente relevante para o desenvolvimento de sistemas de liberação de siRNA, nos quais a utilização de componentes catiônicos pode melhorar a associação com o ácido nucleico e favorecer sua entrega intracelular, mas simultaneamente aumentar a interação com as membranas celulares e, consequentemente, a citotoxicidade (Lechanteur *et al*., 2018).

A modificação superficial com PEG-pGLU promoveu uma melhora evidente no perfil de viabilidade celular do etossoma contendo siRNA. Enquanto a formulação não modificada apresentou viabilidade significativa somente na menor concentração

avaliada, a formulação contendo PEG-pGLU apresentou valores superiores nas concentrações de 50, 25 e 12,5 nM. Esse comportamento sugere que a modificação superficial alterou favoravelmente a interação entre a superfície vesicular e as células (Jia *et al*., 2020).

A literatura demonstra que a PEGilação de sistemas lipídicos catiônicos pode reduzir a citotoxicidade associada à superfície positivamente carregada. Moutou *et al*. (2018) destacaram que a incorporação de PEG pode reduzir a carga superficial dos lipossomas catiônicos e, consequentemente, diminuir a toxicidade celular. De forma semelhante, Kim *et al*. (2010) observaram que lipossomas catiônicos modificados com um componente PEG apresentaram menor citotoxicidade, mantendo, simultaneamente, capacidade de entrega intracelular de siRNA. Esses resultados são consistentes com o comportamento observado no presente estudo, ondel a introdução do PEG-pGLU esteve associada ao aumento da viabilidade celular.

A redução da citotoxicidade após a PEGilação pode estar relacionada à formação de uma camada hidrofílica na superfície das partículas, capaz de reduzir a exposição das cargas superficiais e as interações eletrostáticas inespecíficas com as membranas celulares. Entretanto, essa modificação deve ser cuidadosamente balanceada, uma vez que o excesso de PEG também pode interferir na interação das partículas com as células e na disponibilidade do siRNA para processos subsequentes de internalização e liberação intracelular. Nesse sentido, estudos com lipoplexos contendo siRNA demonstram que a PEGilação pode reduzir a citotoxicidade, mas densidades elevadas de PEG podem prejudicar etapas da entrega intracelular (Lechanteur *et al*., 2016).

Esse equilíbrio entre biocompatibilidade e eficiência de entrega é particularmente importante no desenvolvimento de nanocarreadores para siRNA. A simples redução da carga superficial pode diminuir interações inespecíficas e aumentar a segurança celular, mas, simultaneamente, pode modificar a interação do sistema com a membrana plasmática. Portanto, a formulação ideal deve apresentar carga e composição suficientes para favorecer a associação e a internalização do siRNA, sem produzir efeitos citotóxicos relevantes. Esse conceito é sustentado por estudos de lipossomas catiônicos para entrega de siRNA, nos quais alterações na composição lipídica modificaram simultaneamente a citotoxicidade, as propriedades físico-químicas e a eficiência de entrega intracelular (Lechanteur *et al*., 2016).

No presente estudo, a comparação entre o etossoma branca, o etossoma contendo siRNA e o siRNA livre permitiu ainda distinguir, de maneira indireta, a contribuição dos diferentes componentes para a resposta celular. A semelhança entre os perfis do etossoma branca e do etossoma contendo siRNA, associada à ausência de redução da viabilidade pelo siRNA livre, indica que a presença do siRNA não foi o principal determinante da citotoxicidade observada. Por outro lado, a melhora da viabilidade após a modificação com PEG-pGLU demonstra que alterações na superfície do sistema foram capazes de modificar sua interação com as células.

Assim, os resultados de viabilidade celular foram determinantes para a redefinição da formulação inicialmente selecionada com base exclusivamente nos parâmetros físico-químicos. A formulação que apresentava características físico-químicas favoráveis não poderia ser considerada ideal para as etapas biológicas sem que sua compatibilidade celular fosse estabelecida. A incorporação do critério biológico permitiu, portanto, selecionar uma condição que apresentasse melhor equilíbrio entre as propriedades necessárias à formação do sistema vesicular e a manutenção da viabilidade celular.

Considerando o conjunto dos resultados, a formulação etossomal contendo siRNA e modificada com PEG-pGLU apresentou o perfil de biocompatibilidade mais favorável entre os sistemas vesiculares avaliados, especialmente nas concentrações de 50 nM ou inferiores. Na avaliação comparativa entre as linhagens celulares, observou-se maior viabilidade dos queratinócitos HaCaT em relação às células de melanoma SK-MEL-28. Essa diferença é relevante para a interpretação dos resultados, uma vez que os queratinócitos representam um dos principais tipos celulares da epiderme e, portanto, apresentam maior relação com a via de administração tópica proposta para a formulação. Assim, a maior tolerabilidade observada nas células HaCaT constitui um aspecto favorável à biocompatibilidade do sistema no contexto de sua aplicação cutânea. Por outro lado, a utilização da linhagem SK-MEL-28 permanece fundamental, pois essas células constituem o modelo empregado nas etapas subsequentes destinadas à investigação da atividade biológica do siRNA-MITF e da produção de melanina.

Dessa forma, a menor viabilidade observada nessa linhagem deve ser considerada na interpretação dos resultados posteriores de melanogênese, evitando-se atribuir exclusivamente ao silenciamento de MITF eventuais alterações celulares decorrentes da exposição à formulação. A escolha da formulação etossomal

modificada com PEG-pGLU representa, portanto, uma etapa de otimização baseada na integração dos resultados físico-químicos e biológicos, sendo o aumento da viabilidade após a modificação superficial um indicativo de que o PEG-pGLU contribuiu para melhorar a compatibilidade celular do sistema. Ressalta-se, contudo, que a redução da citotoxicidade não deve ser interpretada isoladamente como comprovação de maior eficiência de entrega do siRNA. Essa conclusão deve ser sustentada pelos resultados subsequentes de internalização celular e, principalmente, pela avaliação da atividade biológica do siRNA sobre o alvo molecular MITF.

5.4 CARACTERIZAÇÃO DO ETOSSOMA

5.4.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio, do índice de polidispersividade e do potencial Zeta dos Etossomas otimizados

Para o DHM, o etossoma branca apresentou tamanho médio de 43,58 ± 0,75 nm, enquanto o etossoma siRNA-PEG-pGLU apresentou 47,56 ± 1,92 nm (**Tabela 9**; **Figura 9**). Observa-se, portanto, um aumento de aproximadamente 9,1% após a incorporação do siRNA e a modificação superficial com PEG-pGLU. Considerando os valores individuais e utilizando o teste de Welch, essa diferença apresentou $p = 0,055$, não atingindo o nível convencional de significância de 5%. Dessa forma, os resultados sugerem uma tendência de aumento do tamanho após a incorporação/modificação, mas não permitem afirmar diferença estatisticamente significativa entre as formulações.

Esse pequeno aumento é compatível com a incorporação de componentes adicionais à estrutura vesicular. A literatura descreve o tamanho das partículas como um dos principais parâmetros de caracterização de sistemas vesiculares, uma vez que alterações na composição e no processo de preparação podem modificar o tamanho e a distribuição das vesículas (Danei *et al*., 2018). Essa faixa também é considerada adequada para internalização celular via endocitose (Zhang *et al*, 2009). A formação de vesículas com características adequadas favorece o processo de entrega intracelular, especialmente relevante para sistemas carreados com siRNA.

Tabela 9 – Caracterização físico-química dos etossomas quanto ao diâmetro hidrodinâmico (DHM), índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta (ZETA).

	Etossoma Branca (sem ativo)			Etossoma siRNA - PEG-pGLU		
	DHM (nm)	PDI	ZETA (mV)	DHM (nm)	PDI	ZETA (mV)
Amostra 1	43,54	0,232	+46,80	45,38	0,191	+43,50
Amostra 2	42,85	0,171	+40,70	49,00	0,300	+44,10
Amostra 3	44,35	0,207	+41,50	48,3	0,206	+40,70
Média	43,58	0,203	+43,00	47,56	0,232	+42,77
Desvio Padrão	0,75	0,03	3,32	1,92	0,06	1,81

Valores como média ± desvio-padrão (n = 3). DHM: diâmetro hidrodinâmico, em (nm); PDI: índice de polidispersidade; ZETA: potencial Zeta, em (mV). Diferenças entre as formulações foram avaliadas pelo teste de Welch, considerando $p < 0,05$ como nível de significância.
Fonte: Elaborada pela autora, (2026)

Vesículas menores tendem a apresentar maior área superficial, maior eficiência de transporte transdérmico e maior internalização celular. Estudos demonstram que etossomas com diâmetros inferiores a 200 nm apresentam desempenho superior no transporte de fármacos e ácidos nucleicos (Touitou *et al*., 2000; Bhalekar *et al*., 2019).

Esse comportamento está relacionado à capacidade do etanol em diminuir a tensão superficial entre as fases lipídica e aquosa, promovendo vesículas menores e mais uniformes.

Para o índice de polidispersividade (PDI), os valores foram 0,203 ± 0,03 para o etossoma branca e 0,232 ± 0,06 para o etossoma siRNA-PEG-pGLU (**Tabela 9**; **Figura 9**), sem diferença estatisticamente significativa entre as formulações ($p = 0,505$, teste de Welch). Embora tenha ocorrido discreto aumento do PDI após a incorporação do siRNA e modificação com PEG-pGLU, ambos os sistemas apresentaram valores relativamente baixos, indicando distribuição de tamanho relativamente homogênea. O PDI é um parâmetro utilizado para avaliar a amplitude da distribuição do tamanho das vesículas, sendo que valores mais baixos indicam uma distribuição mais estreita e, consequentemente, maior homogeneidade da população vesicular. Valores de PDI inferiores a 0,3 são frequentemente associados a sistemas nanoparticulados com distribuição de tamanho relativamente homogênea (Danaei *et al*., 2018). No presente estudo, o PDI de 0,225 indica uma distribuição relativamente estreita dos tamanhos das vesículas, sugerindo boa homogeneidade da formulação.

Em relação ao potencial Zeta (**Tabela 9; Figura 9**), o etossoma branca apresentou +43,00 ± 3,32 mV, enquanto o etossoma siRNA-PEG-pGLU apresentou +42,77 ± 1,81 mV. Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre as formulações (p = 0,921, teste de Welch). A manutenção do potencial Zeta positivo após a incorporação do siRNA e a modificação superficial sugere que essas etapas não promoveram alteração relevante da carga superficial mensurada. O potencial zeta está relacionado às propriedades eletrostáticas da superfície das vesículas e pode contribuir para a estabilidade coloidal, além de influenciar as interações entre as partículas e as células (ABBASI *et al*., 2023). A elevada positividade observada pode estar relacionada à predominância de componentes catiônicos na interface vesicular, particularmente ao CTAB, que contribui para a manutenção da carga superficial positiva. Entretanto, esse resultado, isoladamente, não permite afirmar que exista excesso de CTAB na formulação. Durante o desenvolvimento do sistema, a redução da concentração de CTAB promoveu deslocamento do potencial Zeta para valores negativos, evidenciando a importância desse componente para o balanço de cargas da formulação e para a manutenção de uma superfície catiônica.

De modo geral, valores elevados de potencial Zeta em módulo estão associados a maior repulsão eletrostática entre as partículas, podendo reduzir sua tendência à agregação. Entretanto, a interpretação desse parâmetro deve considerar as características do meio de dispersão, especialmente o pH, a força iônica e a composição da fase aquosa (Bhattacharjee, 2016).

A permanência de valores positivos após a associação do siRNA sugere que a quantidade de grupos catiônicos disponíveis na interface vesicular foi suficiente para compensar, nas condições avaliadas, a contribuição dos grupos fosfato aniônicos do ácido nucleico. Essa interpretação é consistente com estudos que demonstram que a complexação de siRNA por sistemas lipídicos catiônicos depende da relação entre as cargas positivas do sistema e as cargas negativas do ácido nucleico, podendo resultar em diferentes valores de potencial zeta conforme a composição e a razão de cargas empregadas (Lechanteur *et al*., 2018).

A magnitude dos valores obtidos indica predominância de carga superficial positiva e sugere a presença de forças de repulsão eletrostática entre as vesículas, característica que pode contribuir para a manutenção da estabilidade coloidal da dispersão. Valores de potencial Zeta superiores a aproximadamente ±30 mV são frequentemente associados à maior estabilidade de sistemas coloidais por repulsão

eletrostática, embora esse parâmetro não deva ser utilizado isoladamente para estabelecer a estabilidade de uma formulação (Honary; Zahir, 2013; Bhattacharjee, 2016).

A predominância de carga positiva observada pode estar relacionada à presença do CTAB, tensoativo catiônico empregado na composição dos etossomas. A presença de grupos positivamente carregados na superfície das vesículas também apresenta relevância para a associação com o siRNA, cuja estrutura apresenta grupos fosfato negativamente carregados. Nesse contexto, interações eletrostáticas entre componentes catiônicos e o siRNA constituem um dos mecanismos empregados na formação de sistemas de transporte destinados à entrega intracelular de ácidos nucleicos. Além disso, a razão entre as cargas positivas disponíveis no sistema e as cargas negativas do siRNA pode influenciar propriedades físico-químicas dos complexos, incluindo tamanho, potencial Zeta e eficiência de associação (Barichello; Ishida; Kiwada, 2010).

Por outro lado, o potencial zeta não permite determinar diretamente a quantidade, a distribuição ou a localização do siRNA na estrutura vesicular. Dessa forma, a manutenção da carga positiva deve ser interpretada em conjunto com os demais parâmetros de caracterização, particularmente a eficiência de encapsulação e os resultados biológicos obtidos.

A incorporação do PEG-Glu deve ser interpretada considerando a via de administração proposta. Embora a PEGuilação seja amplamente empregada em sistemas destinados à administração intravenosa, principalmente por favorecer a estabilização estérica e reduzir interações com componentes biológicos, seus efeitos em sistemas destinados à aplicação tópica dependem da composição e do grau de modificação da superfície (Rangsimawong *et al*., 2016). Rangsimawong *et al*., (2016) compararam lipossomas, niossomas e nanopartículas lipídicas sólidas PEGuiladas e verificaram que a PEGuilação aumentou o fluxo cutâneo de um composto hidrofílico nos lipossomas, enquanto o efeito foi diferente nos outros nanossistemas.

Estudos com lipossomas PEGuilados demonstram que a presença do polímero pode aumentar a estabilidade coloidal sem necessariamente comprometer a deposição do ativo na pele (Knudsen *et al*., 2012). Os autores observaram que a PEGuilação aumentou a estabilidade coloidal e não comprometeu a entrega de calcipotriol na pele; com 1 mol% de PEG-DSPE, houve inclusive aumento significativo da deposição no estrato córneo. Assim, não é adequado considerar previamente o

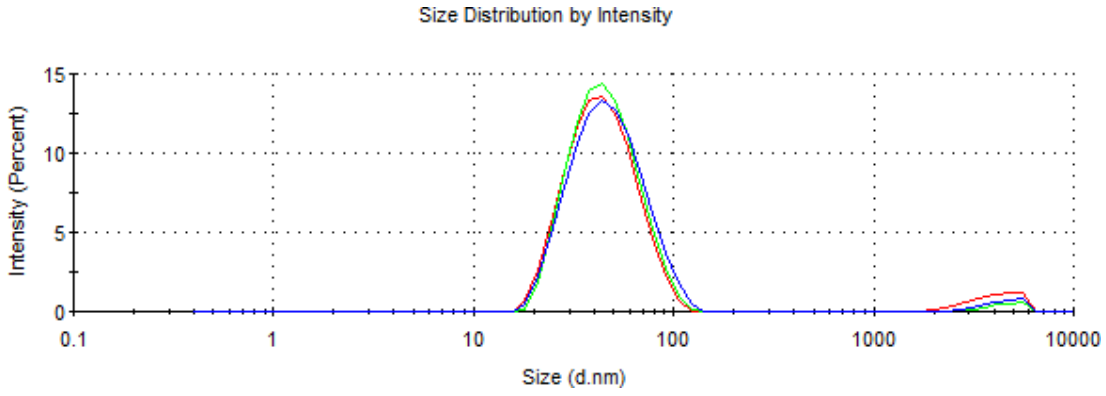
PEG-pGLU como uma barreira à permeação cutânea, sendo necessária a realização de estudos específicos de permeação e retenção cutânea para determinar seu efeito na formulação desenvolvida.

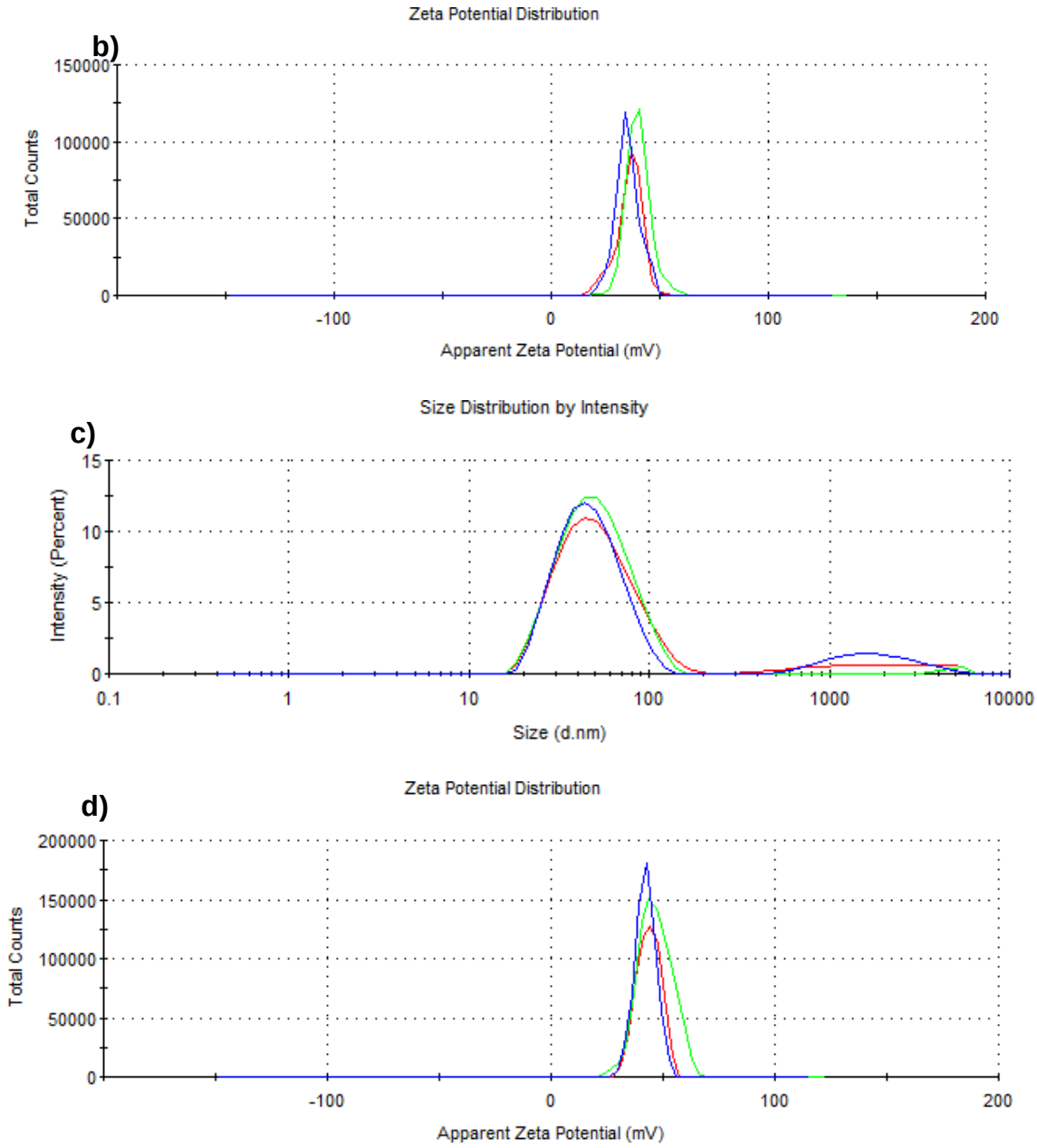
No presente estudo, a incorporação do PEG-pGLU foi associada à melhoria da viabilidade celular da formulação, que aumentou de aproximadamente 44% para 71%, sugerindo contribuição para a biocompatibilidade do sistema. Portanto, sua utilização foi considerada a partir de um equilíbrio entre as propriedades físico-químicas, a estabilidade e o desempenho biológico da formulação. Estudos futuros de permeação cutânea serão necessários para determinar especificamente o impacto do PEG-Glu sobre a penetração e a retenção do siRNA-PEG-Glu na pele.

De maneira geral, a incorporação do siRNA e a modificação superficial com PEG-pGLU não provocaram alterações estatisticamente significativas no PDI ou no potencial Zeta, enquanto o DHM apresentou apenas uma tendência de aumento. A manutenção desses parâmetros em valores próximos aos observados para o etossoma branca indica que a funcionalização não comprometeu de maneira evidente as características físico-químicas fundamentais da vesícula. Essa estabilidade é particularmente relevante para uma formulação destinada à aplicação cutânea, uma vez que o tamanho, a distribuição de tamanho e as propriedades de superfície estão entre os parâmetros importantes para o desempenho de sistemas vesiculares destinados à administração dérmica/transdérmica (Touitou, *et al*., 2000).

Figura 9 – Curvas de distribuição de tamanho por intensidade de deslocamento de luz (%) e distribuição de potencial Zeta

a)



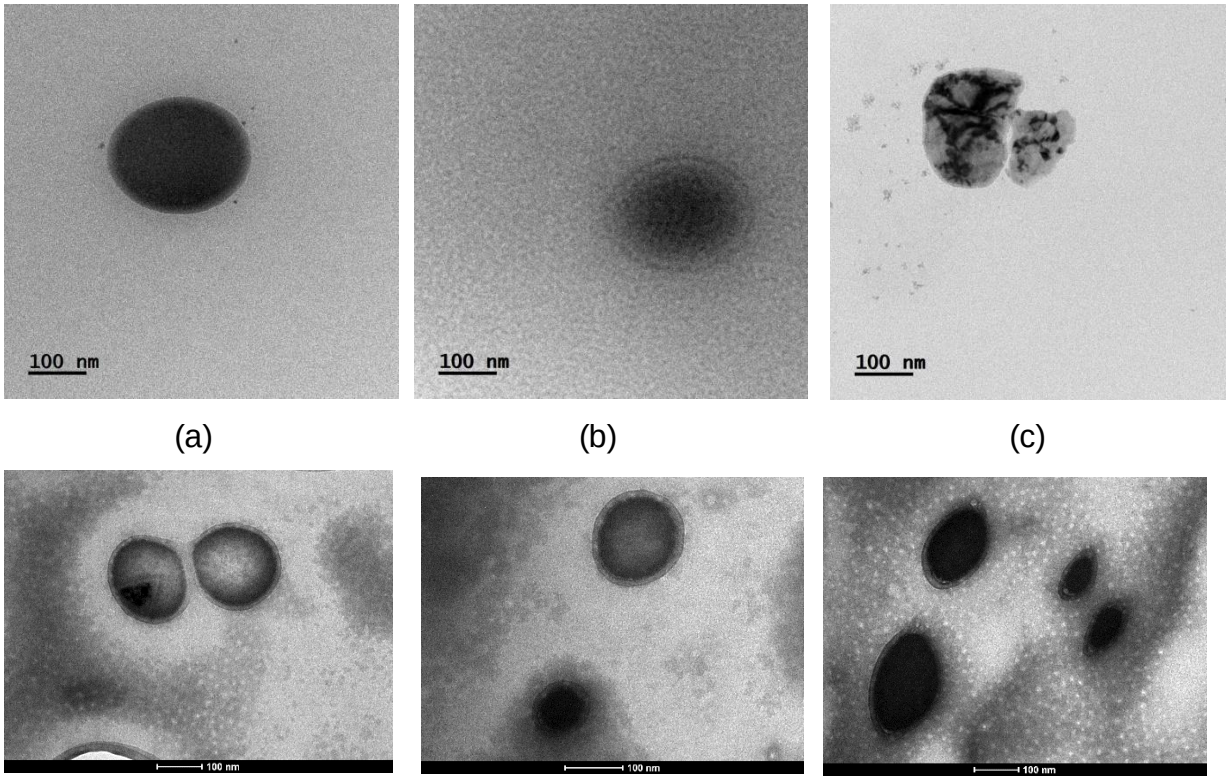


a) e b) Distribuição de tamanho por intensidade e pZ do etossoma sem ativo; c) e d) Distribuição de tamanho por intensidade e pZ do etossoma com siRNA-PEG-pGLU, respectivamente.
Fonte: Elaborado pela autora (2026).

5.2.2 Determinação da morfologia do etossoma branca [sem ativo]

As fotomicrografias de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) apresentadas na **Figura 15** (painéis **a**–**f**) evidenciam as características ultraestruturais e a arquitetura vesicular dos etossomas sintetizados.

Figura 15 – Imagem da morfologia do etossoma branca obtidas por Microscopia eletrônica de transmissão (MET) em escala de 100 nm.



Legenda: imagens de a–f representam imagens da microscopia de transmissão do etossoma desenvolvido.
Fonte: elaborado pela autora (2026).

De modo geral, as vesículas apresentaram morfologia predominantemente esférica a levemente ovoide, com contornos bem definidos e estruturas membranosas aparentemente contínuas e íntegras, características observadas principalmente nos painéis a, b, d, e e f. Ao contrário de outras formas, a forma arredondada não possui dependência orientacional, facilitando o seu englobamento pela célula (Nangia; Sureshkumar, 2012).

Nos painéis **d** e **e**, foram observadas vesículas com organização predominantemente unilamelar, caracterizadas pela presença de uma estrutura periférica mais eletrodensa, atribuída à bicamada fosfolipídica, delimitando uma região interna de menor densidade eletrônica. No painel **b** observa-se uma organização concêntrica constituída por múltiplas estruturas membranosas, compatível com uma organização oligolamelar ou multilamelar. A ocorrência de diferentes organizações lamelares é compatível com a natureza dos sistemas vesiculares fosfolipídicos, nos quais podem ser observadas estruturas uni-, oligo- e multilamelares, dependendo da composição e das condições de formação das vesículas (Zylberberg; Matosevic, 2016; Touitou *et al*., 2000). Essas diferenças morfológicas podem estar relacionadas à organização dos componentes lipídicos durante o processo de formação das vesículas e às condições empregadas no preparo das amostras para análise por MET.

A concordância entre as duas técnicas reforça a obtenção de estruturas vesiculares na faixa nanométrica (Ascenso, A. *et al*., 2015). Ressalta-se, entretanto, que os valores determinados por MET podem apresentar diferenças em relação ao diâmetro hidrodinâmico obtido por DLS, uma vez que as técnicas avaliam propriedades distintas. Enquanto o DLS determina o diâmetro hidrodinâmico das partículas em suspensão, considerando a camada de solvatação e o movimento browniano, a MET permite a avaliação direta da dimensão aparente das estruturas após o preparo e secagem da amostra (Filippov *et al*., 2023).

No painel **c**, observa-se maior proximidade entre algumas vesículas, com regiões de maior contraste. Esse aspecto é provavelmente decorrente de artefatos relacionados ao preparo das amostras para microscopia eletrônica de transmissão, especialmente às etapas de deposição, secagem e contrastação negativa, que podem promover alterações na distribuição espacial das vesículas durante a preparação da grade. Portanto, essas características morfológicas não devem ser interpretadas como evidência de agregação ou instabilidade do sistema em suspensão, especialmente quando consideradas em conjunto com os resultados obtidos por DLS, que demonstraram distribuição de tamanho relativamente homogênea. Alterações decorrentes do preparo das amostras constituem uma limitação conhecida na interpretação de imagens de MET de sistemas vesiculares (Michen *et al*., 2015; Franken *et al*., 2017).

A morfologia predominantemente esférica e a integridade aparente das estruturas vesiculares são compatíveis com a formação de sistemas etossomais

constituídos por fosfolipídios, etanol e tensoativo catiônico. A presença de etanol na composição dos etossomas exerce importante influência sobre a organização e as propriedades da bicamada fosfolipídica, promovendo maior fluidez e flexibilidade da membrana vesicular. Essa característica está associada à elevada deformabilidade dos etossomas, propriedade considerada relevante para sua interação com a barreira cutânea e para o transporte de moléculas através da pele (Touitou *et al*., 2000).

A observação de vesículas na escala nanométrica por MET, em concordância com os resultados obtidos por DLS, fornece evidências complementares da formação do sistema vesicular desenvolvido. Entretanto, a avaliação da homogeneidade e da distribuição de tamanho deve ser interpretada conjuntamente com o índice de polidispersão obtido por DLS, uma vez que a análise de imagens de MET representa uma fração da população de partículas e está sujeita a alterações decorrentes do preparo da amostra. Assim, a associação dos resultados morfológicos obtidos por MET com os parâmetros físico-químicos determinados por DLS permite uma caracterização mais abrangente das vesículas etossomais desenvolvidas (Filippov *et al*., 2023).

Muitos estudos compararam a internalização de partículas com morfologia esférica e alongada e foi observado que partículas esféricas possuíram translocação mais veloz e maior taxa de internalização que aquelas alongadas (Chitrani *et al*., 2006; Chithrani; Chan, 2007; Champion; Mitragotri, 2009; Lu *et al*., 2010). Uma explicação para isso pode ser a redução do número de receptores disponíveis devido a maior área de contato de nanopartículas alongadas na superfície celular (Chitrani *et al*., 2006).

5.4.3 Curva analítica e eficiência de encapsulação do siRNA (EE%)

A eficiência de encapsulação (EE%) foi determinada com o objetivo de quantificar a fração de siRNA associada à formulação etossomal em relação à quantidade total de siRNA utilizada no preparo. A formulação selecionada apresentou eficiência de encapsulação de 92,3% ± 0,52%, indicando elevada capacidade do sistema em incorporar e/ou associar o siRNA às vesículas.

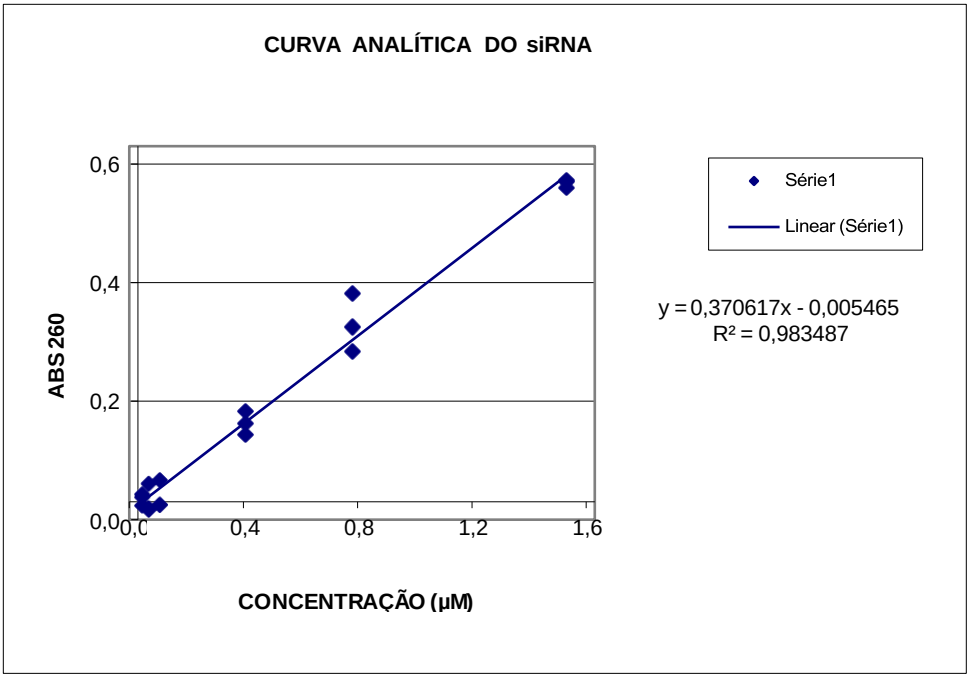
Esse resultado é particularmente relevante para o desenvolvimento de sistemas de liberação de ácidos nucleicos, uma vez que uma elevada eficiência de encapsulação pode favorecer a proteção do siRNA contra a degradação e aumentar

a disponibilidade do material para sua entrega às células (Song *et al*., 2009). A elevada associação observada pode estar relacionada às interações eletrostáticas entre o siRNA, que apresenta grupos fosfato negativamente carregados, e os componentes catiônicos presentes na formulação, particularmente o CTAB. Entretanto, a eficiência de encapsulação, isoladamente, não permite distinguir se o siRNA encontra-se efetivamente localizado no interior das vesículas ou associado à sua superfície, devendo esse resultado ser interpretado em conjunto com os dados de potencial Zeta e demais ensaios de caracterização. Dessa forma, a EE% de 92,3% ± 0,52% demonstram que a formulação desenvolvida apresenta elevada capacidade de retenção/associação do siRNA, constituindo uma característica favorável para sua aplicação como nanocarreador no sistema de entrega proposto.

A eficiência de encapsulação (EE%) do siRNA no Etossoma foi determinada a partir da quantificação do siRNA livre e encapsulado, utilizando absorbância a 260 nm e a curva de calibração previamente validada ($y = 0,370617x - 0,005465$; $R^2 = 0,983487$). A análise estatística da curva demonstrou que o modelo linear apresenta regressão significativa ($F_{calc} = 952,93 >> F_{crit} = 4,494$, $p < 0,0001$) e ausência de falta de ajuste ($F_{calc} = 1,24 < F_{crit} = 3,259$ $p = 0,3445$), confirmando sua adequação para estimativa das concentrações de siRNA (**Tabela 10**).

Tabela 10 – Curva analítica do siRNA Livre

CONC. (µM)	ABS 260
0,0150	0,0080
0,0150	-0,0060
0,0150	0,0130
0,0375	0,0310
0,0375	-0,0130
0,0375	-0,0100
0,0750	0,0370
0,0750	-0,0040
0,0750	-0,0050
0,3750	0,1520
0,3750	0,1320
0,3750	0,1140
0,7500	0,2950
0,7500	0,2530
0,7500	0,3520
1,5000	0,5400
1,5000	0,5430
1,5000	0,5300



ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA VALIDAÇÃO DO MODELO LINEAR					
Fonte de Variação	Soma Quadrática	Graus de Liberdade	Média Quadrática	$F_{calculado}$	$F_{crítico}$
Regressão	6,9956E-01	1	6,9956E-01	952,93	4,494
Resíduos	1,1746E-02	16	7,3411E-04		
Falta de ajuste	3,4411E-03	4	8,6028E-04	1,24	3,259
Erro Puro	8,3047E-03	12	6,9206E-04		
Total	7,1131E-01	17	4,1842E-02		

% de variação explicada: 98,35

% máxima de variação explicável: 98,83

Fonte: Elaborada pela autora, (2026)

Nos ensaios realizados com etossoma contendo siRNA na concentração teórica de 1,5 µM, observou-se que a concentração de siRNA quantificada no ultrafiltrado (fração não encapsulada) apresentou média de 1,5 ng/µL ± 0,12. Já o padrão de siRNA livre apresentou média de 21,5 ng/µL ± 0,26. A partir desses valores, a eficiência de encapsulação foi calculada segundo a relação entre o siRNA retido na vesícula e a quantidade total inicialmente adicionada (**Tabela 11**).

Os valores de EE% calculados indiretamente pela razão siRNA encapsulado/siRNA total demonstraram eficiências elevadas, com média de 94,9% ± 1,25. Esses resultados indicam que o sistema etossomal apresenta alta capacidade de aprisionamento do siRNA, o que pode ser atribuído à presença do etanol, que aumenta a fluidez da bicamada, e do surfactante catiônico, que favorece interações

eletrostáticas com o siRNA, melhorando a retenção no interior das vesículas (**Tabela 11**).

Tabela 11 – Resultados da Eficiência de encapsulação (EE%)

	Etossoma com siRNA (1,5 µM) peg-glu		Padrão siRNA Livre (1,5 µM)		Eficiência de Encapsulação	Eficiência de Encapsulação pela Curva Analítica y = 0,370617x - 0,005465
	ng/µL	ABS 260	ng/µL	ABS 260	%	%
1	1,6	0,039	21,6	0,540	93,7	92,0
2	1,4	0,034	21,7	0,543	94,8	92,9
3	1,6	0,039	21,2	0,530	96,2	92,0
Média	**1,5**	**0,037**	**21,5**	**0,538**	**94,9**	**92,3**
S	0,12	0,00	0,26	0,01	1,25	0,52

S: Desvio Padrão

Fonte: Elaborada pela autora, (2025)

Quando a eficiência foi calculada por meio da equação da curva de calibração, apresentou média de 92,3% ± 0,52. Embora ligeiramente inferiores, esses valores corroboram a elevada capacidade de encapsulação do sistema e refletem a sensibilidade analítica do método espectrofotométrico.

O cálculo pelo método indireto pode estar sujeito a interferências (como a presença de lipídios ou outros excipientes do Etossoma) na amostra de siRNA livre (ultrafiltrado), levando a uma superestimação da absorbância e, consequentemente, a um cálculo de eficiência mais alto (superestimado). Já o cálculo pela curva de calibração é mais específico para o siRNA e menos sujeito a interferências, pois usa uma relação comprovada (curva padrão) para determinar a concentração do siRNA realmente encapsulado, fornecendo um valor de eficiência mais realista (e, neste caso, menor) (Furst *et al*, 2016; Ahmed *et al*, 2021).

De forma geral, os resultados confirmam que os etossomas preparados apresentam excelente eficiência de encapsulação, frequentemente superior a 85 %, conforme amplamente descrito na literatura (Touitou *et al*, 2000; Verma; Pathak, 2010). Essa alta taxa de aprisionamento é fundamental para assegurar estabilidade, proteção contra degradação e entrega eficaz do siRNA às células-alvo (Rawat; Dewangan; Prusty, 2025).

5.5 ESTABILIDADE COLOIDAL DO SISTEMA ETOSSOMAL

A estabilidade coloidal do etossoma contendo siRNA-PEG-pGLU e do etossoma sem ativo foi avaliada pelo acompanhamento do diâmetro hidrodinâmico (DHM), índice de polidispersividade (PDI) e potencial Zeta durante 60 dias de armazenamento sob refrigeração e temperatura ambiente. Esses parâmetros são particularmente relevantes para sistemas vesiculares, uma vez que alterações no tamanho e na distribuição das partículas podem indicar processos de agregação, fusão ou reorganização vesicular, enquanto o potencial Zeta fornece informações sobre as interações eletrostáticas que contribuem para a estabilidade da dispersão. A literatura reconhece esses parâmetros como importantes indicadores da estabilidade física de sistemas etossomais (Abdulbaqi *et al*., 2016).

Os resultados do estudo de estabilidade estão apresentados na **Tabela 12; Gráfico 10** e **Tabela 13**; **Gráfico 11 e Tabela 14**.

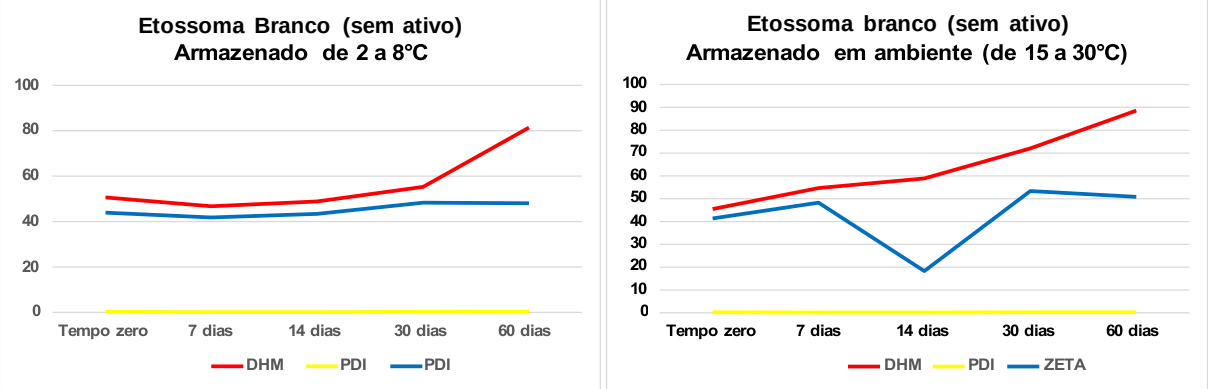
Tabela 12. Estabilidade de Etossoma branca (sem ativo) armazenado sob refrigeração e em temperatura ambiente

Etossoma Branco (sem ativo) Temperatura: 2 a 8°C			
	DHM (nm)	PDI	ZETA (mV)
Tempo zero	50,60 ± 2,90	0,257 ± 0,02	+43,95 ± 5,59
7 dias	46,73 ± 3,89	0,180 ± 0,05	+41,80 ± 2,70
14 dias	48,86 ± 4,79	0,139 ± 0,07	+43,40 ± 0,87
30 dias	55,34 ± 3,54	0,218 ± 0,02	+48,35 ± 2,29
60 dias	81,35 ± 3,82	0,320 ± 0,06	+48,10 ± 4,01

Etossoma Branco (sem ativo) Temperatura ambiente			
	DHM (nm)	PDI	ZETA (mV)
Tempo zero	45,50 ± 2,16	0,220 ± 0,01	+41,37 ± 5,50
7 dias	54,64 ± 2,77	0,141 ± 0,02	+48,23 ± 1,67
14 dias	58,87 ± 2,16	0,137 ± 0,03	+18,33 ± 6,54
30 dias	72,04 ± 6,69	0,221 ± 0,02	+53,40 ± 4,74
60 dias	88,61 ± 8,34	0,270 ± 0,03	+50,80 ± 1,65

n = 3.
Fonte: Elaborado pela autora (2026)

Gráfico 10. Estabilidade do Etossoma Branca armazenado sob refrigeração e em temperatura ambiente



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

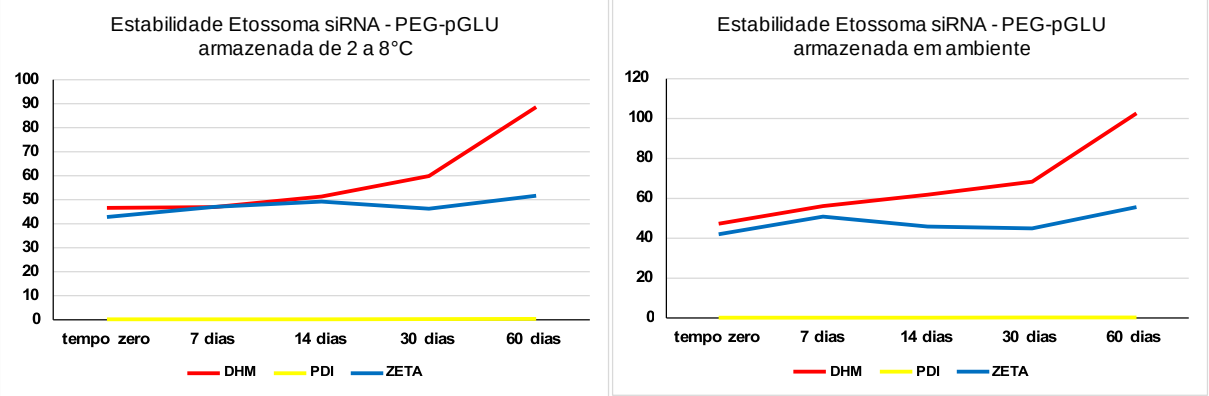
Tabela 13. Estabilidade de Etossoma siRNA-PEG-pGLU armazenado sob refrigeração e em temperatura ambiente

Etossoma siRNA - PEG-pGLU Temperatura: 2 a 8°C			
	DHM (nm)	PDI	ZETA (mV)
tempo zero	46,58 ± 1,98	0,216 ± 0,04	+42,80 ± 1,81
7 dias	46,91 ± 2,14	0,149 ± 0,02	+47,00 ± 2,69
14 dias	51,37 ± 1,51	0,203 ± 0,05	+49,23 ± 4,83
30 dias	59,90 ± 2,46	0,275 ± 0,06	+46,23 ± 0,31
60 dias	88,60 ± 5,52	0,386 ± 0,06	+51,70 ± 4,16

Etossoma siRNA - PEG-pGLU Temperatura ambiente			
	DHM (nm)	PDI	ZETA (mV)
tempo zero	47,32 ± 1,68	0,226 ± 0,06	+42,03 ± 4,55
7 dias	56,20 ± 4,50	0,167 ± 0,04	+50,87 ± 5,07
14 dias	61,83 ± 8,06	0,240 ± 0,07	+45,87 ± 7,48
30 dias	68,31 ± 4,18	0,264 ± 0,08	+45,00 ± 4,26
60 dias	102,66 ± 4,05	0,323 ± 0,04	+55,63 ± 2,80

n = 3
Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Gráfico 11. Estabilidade de Etossoma siRNA-PEG-pGLU armazenado sob refrigeração e em temperatura ambiente



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

A estabilidade físico-química do etossoma branca foi avaliada por análise de variância bifatorial, considerando temperatura (2–8 °C e temperatura ambiente) e tempo de armazenamento (0, 7, 14, 30 e 60 dias) como fatores. Para o diâmetro hidrodinâmico (DHM), foram observados efeitos significativos da temperatura ($p < 0,001$), do tempo ($p < 0,001$) e da interação entre os fatores ($p = 0,009$). O teste de Shapiro-Wilk não indicou desvio significativo da normalidade dos resíduos ($p = 0,304$), enquanto o teste de Levene indicou homogeneidade das variâncias ($p = 0,884$). O teste de Tukey revelou aumento significativo do DHM principalmente aos 60 dias, em ambas as condições de armazenamento. Para o PDI, observou-se efeito significativo do tempo ($p < 0,001$), mas não da temperatura ($p = 0,268$) ou da interação temperatura × tempo ($p = 0,741$). Para o potencial zeta, foram observados efeitos significativos da temperatura ($p = 0,032$) e do tempo ($p = 0,009$), sem interação significativa entre os

fatores (p = 0,278). Os pressupostos de normalidade e homocedasticidade foram atendidos para os três parâmetros.

A estabilidade físico-química do etossoma contendo siRNA-PEG-Glu também foi avaliada por análise de variância bifatorial, considerando temperatura de armazenamento (2–8 °C e temperatura ambiente) e tempo (0, 7, 14, 30 e 60 dias). Para o diâmetro hidrodinâmico (DHM), foram observados efeitos significativos da temperatura (p < 0,001) e do tempo (p < 0,001), sem interação significativa entre os fatores (p = 0,108). A ausência de interação significativa entre tempo e temperatura para DHM, PdI e potencial Zeta indica que o efeito do armazenamento sobre esses parâmetros ocorreu predominantemente de maneira independente, sem evidência estatística de que o efeito do tempo tenha sido substancialmente modificado pela temperatura nas condições avaliadas (Mota *et al*., 2021).

O índice de polidispersidade (PDI) foi significativamente influenciado pelo tempo de armazenamento (p < 0,001), enquanto não foram observados efeitos significativos da temperatura (p = 0,926) ou da interação entre os fatores (p = 0,581). Para o potencial zeta, observou-se efeito significativo do tempo (p = 0,003), mas não da temperatura (p = 0,696) ou da interação temperatura × tempo (p = 0,509). Os pressupostos de normalidade dos resíduos e homogeneidade das variâncias foram atendidos para todos os parâmetros avaliados. O teste de Tukey demonstrou que as principais alterações ocorreram nos períodos mais prolongados de armazenamento, especialmente aos 60 dias.

O aumento progressivo do DHM constitui o principal indicativo de alteração física observada durante o armazenamento. Para o sistema contendo siRNA-PEG-pGLU, o tamanho das vesículas permaneceu estatisticamente semelhante aos tempos iniciais durante o armazenamento refrigerado, apresentando aumento significativo a partir de 30 dias e novo incremento aos 60 dias. Em temperatura ambiente, as alterações foram mais pronunciadas, culminando em DHM de 102,66 ± 4,05 nm aos 60 dias. Esse resultado sugere que a temperatura ambiente favoreceu maior alteração do tamanho vesicular ao longo do período avaliado.

Tabela14. Análise de variância para o etossoma branca e para o etossoma siRNA-PEG-pGLU.

ANOVA bifatorial para Etossoma Branco (sem ativo)									
	DHM			PDI			potrencial Zeta		
Fonte de variação	**F**	**p-valor**	**Significativo**	**F**	**p-valor**	**Significativo**	**F**	**p-valor**	**Significativo**
Temperatura	20,28	<0,001	Sim	1,3	0,268	Não	5,3	0,032	Sim
Tempo	67,78	<0,001	Sim	15,03	<0,001	Sim	4,49	0,009	Sim
Temperatura × Tempo	4,51	0,009	Sim	0,49	0,741	Não	1,37	0,278	Não
Pressupostos									
Normalidade (Shapiro-Wilker)		p = 0,304	não significativo		p = 0,252	não significativo		p = 0,678	não significativo
Homocedasticidade (Levene)		p = 0,884	não significativo		p = 0,836	não significativo		p = 0,828	não significativo

ANOVA bifatorial para Etossoma siRNA-PEG-pGLU									
	DHM			PDI			potrencial Zeta		
Fonte de variação	**F**	**p-valor**	**Significativo**	**F**	**p-valor**	**Significativo**	**F**	**p-valor**	**Significativo**
Temperatura	33,09	< 0,001	Sim	0,009	0,926	Não	0,157	0,696	Não
Tempo	131,86	< 0,001	Sim	10,85	<0,001	Sim	5,715	0,003	Sim
Temperatura × Tempo	2,18	0,108	Não	0,732	0,581	Não	0,852	0,509	Não
Pressupostos									
Normalidade (Shapiro-Wilker)		p = 0,851	não significativo		p = 0,363	não significativo		p = 0,340	não significativo
Homocedasticidade (Levene)		p = 0,641	não significativo		p = 0,993	não significativo		p = 0,845	não significativo

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Na avaliação múltipla pelo teste Tukey para o etossoma sem ativo, sob refrigeração, o DHM permaneceu estatisticamente semelhante entre 0 e 30 dias, apresentando aumento significativo somente aos 60 dias (**Tabela 15**).

Tabela 15. Resultados do Teste de Tukey

Etossoma Branca (sem ativo)				
Temperatura	**Tempo**	**DHM (nm)**	**PdI**	**Potencial Zeta (mV)**
2–8 °C	0	50,29 ± 2,90 **a**	0,257 ± 0,02 **ab**	+43,95 ± 5,59 **a**
	7 dias	46,73 ± 3,89 **a**	0,180 ± 0,05 **a**	+41,80 ± 2,70 **a**
	15 dias	48,86 ± 4,79 **a**	0,139 ± 0,07 **a**	+43,40 ± 0,87 **a**
	30 dias	55,34 ± 3,54 **a**	0,218 ± 0,02 **ab**	+48,40 ± 2,29 **a**
	60 dias	81,35 ± 3,82 **b**	0,320 ± 0,06 **b**	+48,13 ± 4,01 **a**
Ambiente	0	45,50 ± 2,16 **a**	0,220 ± 0,01 **a**	+41,37 ± 5,50 **a**
	7 dias	54,64 ± 2,77 **a**	0,141 ± 0,02 **b**	+48,23 ± 1,67 **a**
	15 dias	58,87 ± 2,16 **ab**	0,137 ± 0,03 **b**	+48,33 ± 6,54 **a**
	30 dias	72,04 ± 6,69 **b**	0,221 ± 0,02 **a**	+53,40 ± 4,74 **a**
	60 dias	88,61 ± 8,34 **c**	0,270 ± 0,03 **a**	+50,77 ± 1,65 **a**

Etossoma contendo siRNA-MITF/PEG-GLU				
Temperatura	**Tempo**	**DHM (nm)**	**PdI**	**Potencial Zeta (mV)**
2–8 °C	0	46,58 ± 1,98 **a**	0,216 ± 0,04 **a**	+42,80 ± 1,81 **a**
	7 dias	46,91 ± 2,14 **a**	0,149 ± 0,02 **a**	+47,00 ± 2,69 **ab**
	14 dias	51,37 ± 1,51 **a**	0,203 ± 0,05 **a**	+49,23 ± 4,83 **ab**
	30 dias	59,90 ± 2,46 **b**	0,275 ± 0,06 **ab**	+46,23 ± 0,31 **ab**
	60 dias	88,36 ± 5,52 **c**	0,386 ± 0,06 **b**	+51,70 ± 4,16 **b**
Ambiente	0	47,32 ± 1,68 **b**	0,226 ± 0,06 **ab**	+42,03 ± 4,55 **a**
	7 dias	56,20 ± 4,50 **ab**	0,167 ± 0,04 **a**	+50,87 ± 5,07 **a**
	14 dias	61,83 ± 8,06 **a**	0,240 ± 0,07 **ab**	+45,87 ± 7,48 **a**
	30 dias	68,31 ± 4,18 **a**	0,264 ± 0,08 **ab**	+45,60 ± 4,26 **a**
	60 dias	102,66 ± 4,05 **c**	0,323 ± 0,04 **b**	+55,63 ± 2,80 **a**

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Esse comportamento é consistente com estudos anteriores realizados com sistemas etossomais. Em estudo de estabilidade de etossomas contendo triptantrina, observou-se aumento gradual do tamanho das partículas durante o armazenamento tanto a 4 °C quanto a 25 °C, enquanto o PDI apresentou alterações muito menores (WANG *et al*., 2024). Os autores relacionaram essas modificações às características físico-químicas das vesículas e demonstraram que as condições de armazenamento podem influenciar o tamanho e outros parâmetros do sistema. De maneira semelhante, estudos com etossomas contendo feniletil resorcinol observaram aumento do tamanho vesicular durante o armazenamento, sendo esse comportamento atribuído à possibilidade de agregação e fusão das vesículas (Limsuwan *et al*., 2017).

O aumento do DHM observado no presente estudo pode, portanto, estar relacionado à ocorrência gradual de aproximação, agregação ou fusão parcial das vesículas durante o armazenamento (Limsuwan *et al*., 2017). Entretanto, essa interpretação deve ser feita com cautela, uma vez que o aumento do tamanho hidrodinâmico determinado por espalhamento dinâmico de luz não permite, isoladamente, distinguir entre agregação, fusão vesicular ou alterações conformacionais da população de partículas (Bhattacharjee, 2016). Assim, os resultados indicam alteração do comportamento coloidal, mas não permitem afirmar que tenha ocorrido especificamente fusão vesicular sem evidências morfológicas complementares.

A maior alteração observada em temperatura ambiente também é coerente com a influência da temperatura sobre os componentes lipídicos dos sistemas vesiculares. Os etossomas apresentam membranas contendo fosfolipídios cuja organização e fluidez são influenciadas pelas condições ambientais. Além disso, o etanol exerce importante efeito sobre a organização da bicamada, modificando sua fluidez e contribuindo para as propriedades físico-químicas características dos etossomas. Dessa forma, alterações decorrentes do armazenamento podem modificar progressivamente a organização da membrana e favorecer alterações no tamanho das vesículas (Natsheh; Toitou, 2020).

O comportamento do PDI complementa os resultados obtidos para o DHM. A análise de variância demonstrou efeito significativo do tempo de armazenamento ($p < 0,001$), mas não da temperatura ($p = 0,926$). Sob refrigeração, o aumento significativo do PDI foi observado aos 60 dias em comparação aos períodos iniciais. Em temperatura ambiente, embora tenha ocorrido aumento do tamanho vesicular, as diferenças estatísticas no PDI foram menos pronunciadas, sendo observada diferença significativa principalmente entre 60 e 7 dias. Esse resultado é particularmente relevante porque demonstra que o aumento do tamanho das partículas não foi necessariamente acompanhado por uma alteração proporcional da distribuição de tamanhos.

A manutenção de valores de PDI relativamente baixos durante parte significativa do período experimental sugere que, apesar do aumento do tamanho médio, a população vesicular permaneceu relativamente homogênea. Estudos com diferentes formulações etossomais também demonstram que é possível ocorrer aumento do tamanho das vesículas durante o armazenamento sem alterações expressivas do PDI. Por exemplo, em estudo com etossomas contendo ginsenosídeos, o tamanho aumentou de aproximadamente 132 para 163 nm após 90 dias, enquanto o PDI permaneceu próximo de 0,2 (Wang *et al*., 2024). De modo semelhante, etossomas contendo gossipina apresentaram apenas aumento discreto do tamanho após 60 dias, acompanhado de pequena alteração do índice de dispersividade (Bondi *et al*., 2025).

No presente estudo, portanto, o aumento do PDI aos períodos mais avançados, especialmente aos 60 dias, pode ser interpretado como um indicativo de maior heterogeneidade da população vesicular. Entretanto, como a temperatura não apresentou efeito significativo sobre esse parâmetro, a alteração parece estar

predominantemente associada ao tempo de armazenamento. Esse achado reforça a importância de considerar conjuntamente DHM e PDI na avaliação da estabilidade, uma vez que o tamanho médio isoladamente não fornece informações suficientes sobre a homogeneidade da dispersão (Bondi *et al*., 2025).

Em relação ao potencial Zeta, apesar de ter sido identificado efeito significativo do tempo de armazenamento (p = 0,003), não foram observados efeitos significativos da temperatura ou da interação entre temperatura e tempo. Sob refrigeração, foi identificada diferença significativa entre o tempo zero e 60 dias para o sistema contendo siRNA-PEG-pGLU, enquanto os períodos intermediários apresentaram comportamento intermediário. Em temperatura ambiente, por outro lado, não foram observadas diferenças significativas entre os tempos.

A manutenção de valores elevados de potencial Zeta constitui um aspecto favorável à estabilidade coloidal da formulação. Valores elevados de potencial Zeta, em módulo, estão tradicionalmente associados à maior repulsão eletrostática entre partículas e, consequentemente, à menor tendência de agregação. Entretanto, esse critério não deve ser considerado isoladamente, especialmente em sistemas vesiculares nos quais mecanismos adicionais de estabilização, incluindo efeitos estéricos e de hidratação, também podem contribuir para a estabilidade. Estudos recentes ressaltam justamente que a estabilidade de sistemas etossomais não depende exclusivamente do potencial Zeta, podendo ser influenciada pela composição da vesícula, pelo etanol, pela distribuição de tamanho e pelas interações entre os componentes da formulação (Abdulbaqi *et al*., 2016).

No caso da formulação desenvolvida neste trabalho, a presença de componentes catiônicos provavelmente contribui para a manutenção da carga superficial positiva observada. A magnitude dessa carga pode favorecer a repulsão eletrostática entre as vesículas, dificultando sua aproximação e agregação. Além disso, a presença de etanol pode contribuir para a estabilidade do sistema por modificar a organização e a fluidez da bicamada fosfolipídica. A literatura descreve o etanol como um componente fundamental dos etossomas, capaz de modificar o tamanho, a carga superficial, a fluidez da membrana e a estabilidade das vesículas (Natsheh; Toitou, 2020).

Um aspecto particularmente relevante dos resultados é a comparação entre o sistema etossomal sem ativo e o sistema contendo siRNA-PEG-pGLU. No sistema sem ativo, o aumento do DHM foi mais tardio sob refrigeração, ocorrendo diferença

significativa somente aos 60 dias, enquanto em temperatura ambiente o aumento foi detectado a partir de 30 dias. Para o sistema contendo siRNA-PEG-pGLU, observou-se comportamento semelhante sob refrigeração, com aumento significativo a partir de 30 dias, porém uma alteração mais evidente em temperatura ambiente, alcançando 102,66 ± 4,05 nm aos 60 dias.

Esses resultados sugerem que a incorporação do siRNA podem ter contribuído para a alteração do comportamento físico do sistema durante o armazenamento. Entretanto, não é possível atribuir diretamente o aumento do tamanho exclusivamente ao siRNA, uma vez que a estabilidade de sistemas vesiculares resulta da interação complexa entre fosfolipídios, etanol, componentes carregados, material encapsulado e condições de armazenamento. Estudos de estabilidade de sistemas etossomais demonstram que a incorporação de diferentes ativos pode modificar o tamanho, a distribuição e a carga superficial das vesículas, tornando necessária a avaliação experimental de cada formulação (Abdulbaqi *et al*., 2016).

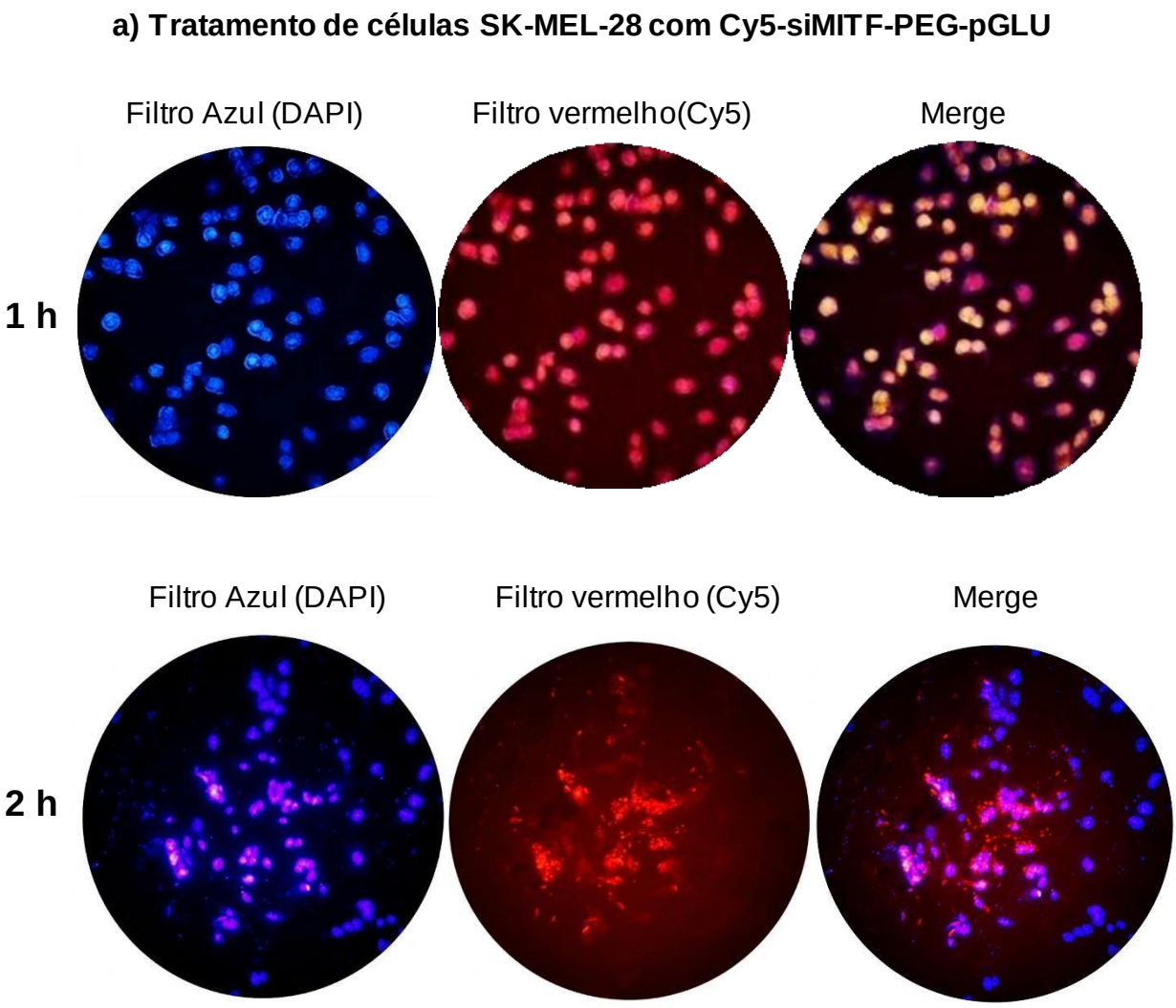
De modo geral, os resultados demonstram que a formulação contendo siRNA-PEG-pGLU apresentou boa estabilidade coloidal durante os períodos iniciais de armazenamento, especialmente sob refrigeração, mas apresentou alterações progressivas após períodos mais prolongados. O aumento do DHM e do PDI aos 30–60 dias indica que o sistema sofreu modificações físicas ao longo do armazenamento, sendo essas alterações mais evidentes para o tamanho vesicular em temperatura ambiente. Por outro lado, a manutenção de valores elevados de potencial Zeta durante o período experimental sugere que a carga superficial das vesículas permaneceu favorável à estabilidade eletrostática, mesmo diante das alterações observadas no tamanho.

5.6 AVALIAÇÃO DA INTERNALIZAÇÃO CELULAR POR MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA

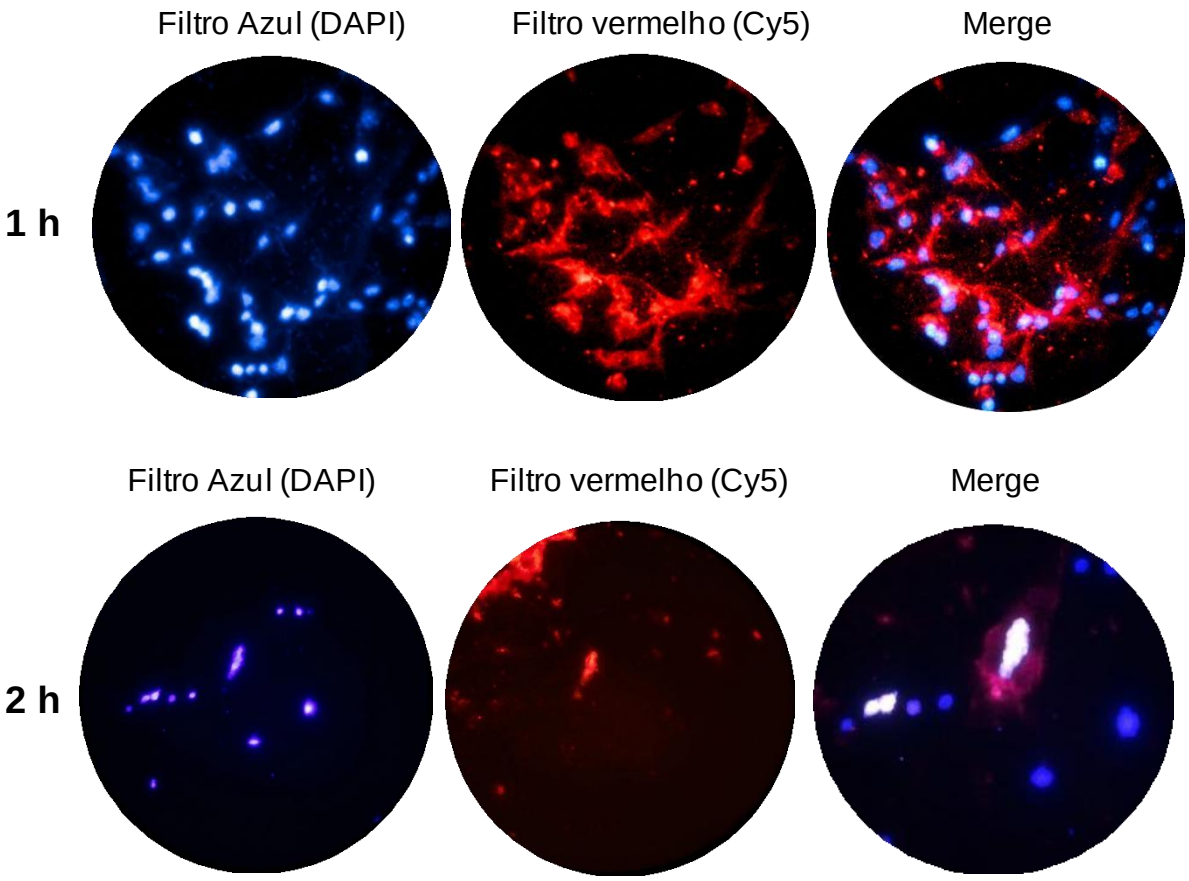
A análise por microscopia de fluorescência evidenciou a associação do siRNA marcado com Cy5 às células nos tempos avaliados. Na formulação etossomal contendo Cy5-siMITF-PEG-pGLU, observou-se sinal fluorescente associado às células após 1 h de incubação, mantendo-se a presença da fluorescência após 2 h. A sobreposição das imagens correspondentes aos canais de fluorescência e DAPI (merge) demonstrou a distribuição do sinal Cy5 nas regiões celulares. O tratamento

com Cy5-siMITF livre também apresentou sinal fluorescente associado às células, permitindo sua utilização como condição comparativa para avaliação da influência do sistema etossomal na interação celular do siRNA (**Figura 16**).

Figura 16. Imagens de microscopia de fluorescência da internalização celular de Cy5-siRNA



b) Tratamento de células SK-MEL-28 com Cy5-siMITF Livre



Legenda: A) Imagens de microscopia de fluorescência de células SKMEL, tratadas com etossomas Cy5-siMITF-PEG-pGLU, obtidas após 1 e 2 horas de tratamento; B) Imagens de microscopia de fluorescência de células SKMEL, tratadas com Cy5-siMITF livre, obtidas após 1 e 2 horas de tratamento

Fonte: elaborado pela autora (2026).

A presença de sinal fluorescente associado às células após a exposição ao etossoma contendo Cy5-siMITF-PEG-pGLU sugere que o sistema foi capaz de favorecer a interação do siRNA com as células e apresenta comportamento compatível com internalização celular. Esse resultado é particularmente relevante para a estratégia proposta, uma vez que a atividade do siRNA depende de sua entrada nas células-alvo para que possa alcançar os mecanismos intracelulares envolvidos no silenciamento gênico. A observação de fluorescência nos tempos de 1 e 2 h indica ainda que o material associado ao sistema permaneceu detectável durante o período experimental.

A presença de sinal também após o tratamento com Cy5-MITF livre sugere que existe a associação celular por parte desse material livre. Embora a internalização de siRNA não modificado seja geralmente pouco eficiente, oligonucleotídeos livres podem ser internalizados por diferentes mecanismos de endocitose, incluindo processos de endocitose em fase fluida (pinocitose), permanecendo inicialmente em compartimentos endossomais. Dessa forma, a presença do sinal intracelular observado no grupo tratado com Cy5-MITF livre pode estar relacionada à internalização espontânea do oligonucleotídeo, ainda que em menor extensão quando comparada àquela proporcionada pelo sistema de entrega. (Juliano, 2018; Juliano; Ming; Nakagawa, 2012).

No entanto, a internalização do siRNA não implica necessariamente sua disponibilidade no citoplasma. Após a entrada celular por mecanismos endocíticos, a maior parte das moléculas permanece retida em compartimentos endossomais e pode ser direcionada à via endossomo-lisossomo, na qual ocorre sua degradação enzimática, sendo digeridos no interior da célula (Juliano, 2018). Apenas uma pequena fração do material internalizado consegue escapar desses compartimentos e alcançar o citoplasma, constituindo o principal obstáculo à atividade funcional dos RNA terapêuticos (Dowdy, 2023).

A detecção do sinal de Cy5 em regiões intracelulares após 1 h de exposição sugere uma rápida internalização do siRNA-MITF carreado pela formulação. Resultados semelhantes têm sido descritos para sistemas de entrega de siRNA, nos quais a fluorescência associada ao siRNA marcado com Cy5 pode ser detectada progressivamente no interior das células após a exposição aos nanocarreadores (Choi *et al*., 2013). Entretanto, a presença de fluorescência intracelular, isoladamente, não permite determinar a localização subcelular precisa do siRNA nem comprovar seu escape de compartimentos endossomais. Para essa finalidade, seriam necessárias análises complementares de localização com marcadores de endossomos/lisossomos ou técnicas de microscopia com resolução adequada.

5.7 PERFIL DE LIBERAÇÃO DO siRNA *IN VITRO* POR DIÁLISE

O perfil de liberação do siRNA foi avaliado por meio do ensaio de diálise, comparando-se o comportamento do siRNA livre com o da formulação etossomal contendo siRNA modificada com PEG-pGLU. A análise teve como objetivo verificar a

capacidade do sistema vesicular de modificar a disponibilidade do siRNA no meio receptor e avaliar o mecanismo predominante envolvido em sua liberação.

O siRNA livre apresentou uma liberação inicial acentuada, sendo aproximadamente 43% do siRNA liberado nos primeiros 15 minutos. Esse comportamento foi caracterizado por uma rápida disponibilidade do material no meio receptor, seguida de uma evolução mais gradual ao longo do período experimental. A elevada velocidade de liberação observada para o siRNA livre é esperada, uma vez que, nessa condição, o material não se encontra associado a uma estrutura vesicular capaz de atuar como barreira à sua difusão.

Em contraste, a formulação etossomal apresentou um perfil de liberação mais gradual ao longo das 24 horas de acompanhamento, demonstrando que a associação do siRNA às vesículas modificou substancialmente sua disponibilidade no meio receptor. Dessa forma, a presença da estrutura vesicular atuou como uma barreira adicional à difusão do siRNA, reduzindo sua liberação imediata quando comparada ao material livre **Tabelas 16** e **17** e **Gráfico 12**.

Tabela 16. Perfil de liberação de siRNA Livre.

siRNA -LIVRE						
Tempo (h)	**Concentração C (ng/μL)**	**Quantidade na Célula C*2000 (ng)**	**Perda na Coleta (ng)**	**Perda acumulada das Coletas (ng)**	**Qt Acumulada (ng)**	**Qt Acumulada (%)**
0,25	0,867	1734,00	8,67	8,67	1725,33	43,13
2	0,967	1934,00	9,67	18,34	1915,66	47,89
4	1,200	2400,00	12,00	30,34	2369,66	59,24
6	1,333	2666,00	13,33	43,67	2622,33	65,56
8	1,867	3734,00	18,67	62,34	3671,66	91,79
24	2,033	4066,00	20,33	82,67	3983,33	99,58

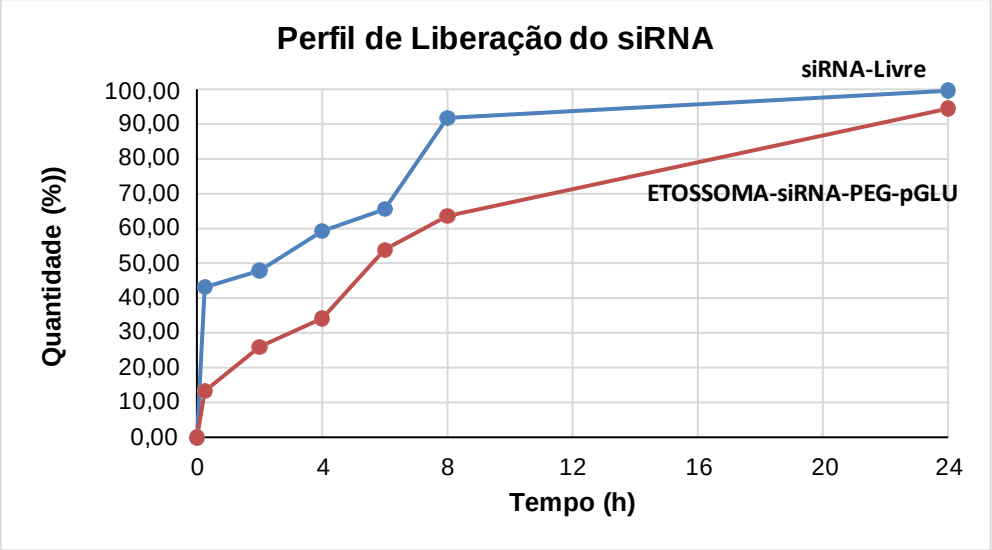
Fonte: Elaborado pela autora, (2026)

Tabela 17. Perfil de liberação de siRNA-PEG-pGLU

ETOSSOMA - siRNA - PEG-GLU						
Tempo (h)	Concentração C (ng/μL)	Quantidade na Célula C*2000 (ng)	Perda na Coleta (ng)	Perda acumulada das Coletas (ng)	Qt (Acumulada) (ng)	Qt (Acumulada) %
0,25	0,267	534,00	2,67	2,670	531,33	13,28
2	0,533	1066,67	5,33	26,003	1040,66	26,02
4	0,700	1400,00	7,00	33,003	1367,00	34,17
6	1,100	2200,00	11,00	44,003	2156,00	53,90
8	1,300	2600,00	13,00	57,003	2543,00	63,57
24	1,933	3866,00	19,33	87,000	3779,00	94,48

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

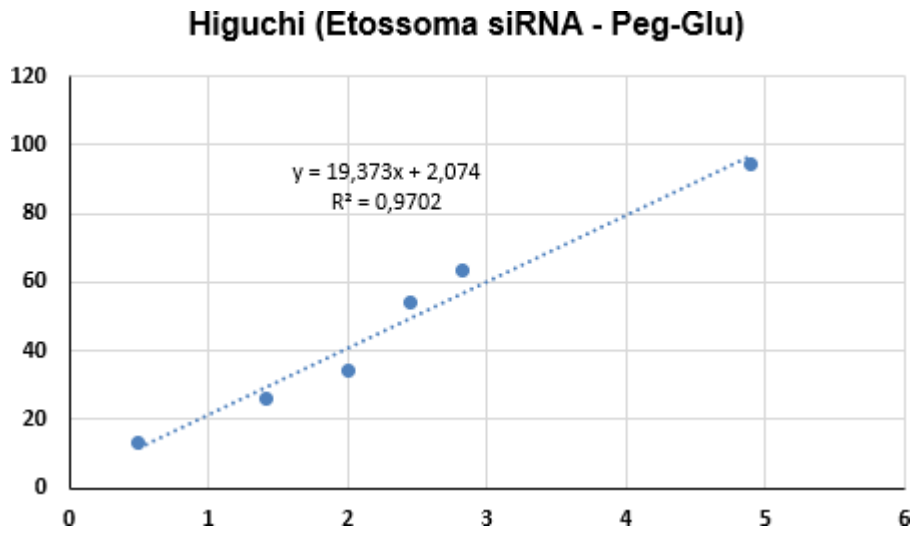
Gráfico 12. Perfil de Liberação siRNA Livre e siRNA PEG-pGLU



Fonte: elaborado pela autora (2026).

Para investigar o mecanismo de liberação, os dados experimentais foram ajustados aos modelos matemáticos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi e Korsmeyer–Peppas (Higuchi, 1961; Higuchi, 1963; Mircioiu *et al*., 2019). Para o etossoma, os coeficientes de determinação (R^2) obtidos foram de 0,882 para o modelo de ordem zero, 0,678 para primeira ordem, 0,970 para Higuchi e 0,962 para Korsmeyer–Peppas. O maior coeficiente de determinação foi observado para o modelo de Higuchi (R^2 = 0,970), seguido pelo modelo de Korsmeyer–Peppas (R^2 = 0,962), indicando que ambos descrevem adequadamente o comportamento experimental, com melhor ajuste do modelo de Higuchi (**Gráfico 13**).

Gráfico 13. Modelo cinético de Higuchi

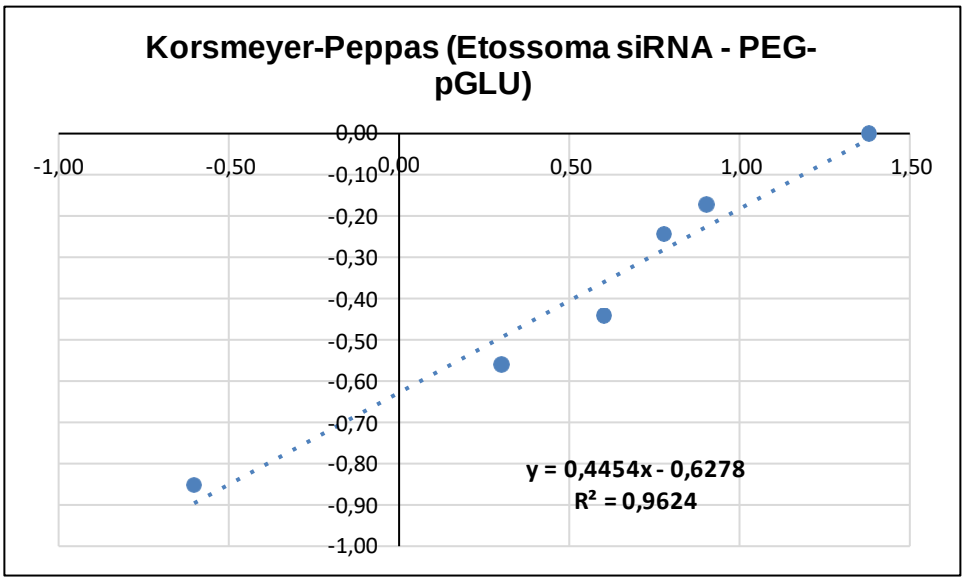


Fonte: Elaborado pela autora, (2026)

O modelo de Higuchi descreve sistemas nos quais a liberação do composto ocorre predominantemente por difusão a partir de uma matriz, sendo particularmente utilizado para interpretar sistemas de liberação controlada nos quais a difusão constitui uma etapa determinante (Higuchi, 1963). A predominância desse modelo no presente estudo sugere que a liberação do siRNA a partir dos etossomas está relacionada principalmente à sua difusão através da estrutura vesicular.

Essa interpretação é reforçada pelo modelo de Korsmeyer–Peppas, para o qual foi obtido $R^2 = 0,962$ e um expoente de difusão (n) de 0,445. Esse valor encontra-se muito próximo do limite clássico de aproximadamente 0,45 utilizado para caracterizar comportamento predominantemente Fickiano em determinadas geometrias de sistemas de liberação (Korsmeyer *et al*., 1983). Assim, os resultados são compatíveis com um mecanismo predominantemente controlado por difusão, embora a proximidade do valor-limite recomende cautela na atribuição de um mecanismo exclusivamente Fickiano (**Gráfico 14**).

Gráfico 14. Modelo cinético de Kormeyer-Peppas



Fonte: elaborado pela autora (2026).

Em comparação, o siRNA livre apresentou valores de R^2 inferiores aos observados para a formulação etossomal: 0,746 para ordem zero, 0,702 para primeira ordem, 0,855 para Higuchi e 0,810 para Korsmeyer–Peppas. Nenhum dos modelos apresentou ajuste tão elevado quanto aquele observado para o etossoma. Esse comportamento está de acordo com a rápida liberação inicial do siRNA livre, particularmente evidenciada pela liberação de aproximadamente 43% do material nos primeiros 15 minutos, dificultando a descrição do perfil por modelos destinados a sistemas de liberação controlada.

A diferença observada entre o siRNA livre e o siRNA associado ao etossoma demonstra que a incorporação do ácido nucleico à estrutura vesicular foi capaz de modificar sua cinética de disponibilidade no meio receptor. Enquanto o siRNA livre apresentou rápida difusão, o sistema etossomal promoveu uma liberação progressiva durante o período avaliado. Esse comportamento é desejável em sistemas de liberação controlada, pois a associação do fármaco ou material bioativo a uma estrutura vesicular pode atuar como uma barreira à sua difusão imediata, permitindo maior controle sobre sua disponibilidade (Solomon *et al*., 2020).

No caso do presente sistema, o ajuste ao modelo de Higuchi, associado ao elevado R^2 obtido pelo modelo de Korsmeyer–Peppas, sugere que a difusão através da matriz lipídica constitui o principal processo envolvido na liberação do siRNA. A

estrutura organizada pelos fosfolipídios, juntamente com a presença de outros componentes da formulação, pode dificultar a passagem imediata do siRNA para o meio externo, resultando no perfil gradual observado experimentalmente (Siepmann; Peppas, 2011).

O comportamento observado também é coerente com a própria natureza do sistema etossomal. As vesículas são constituídas por uma organização lipídica capaz de atuar como uma barreira física à difusão de moléculas associadas à sua estrutura. Assim, diferentemente do siRNA livre, que se encontra diretamente disponível para difusão, o siRNA associado ao sistema necessita atravessar ou se dissociar da estrutura vesicular antes de alcançar o meio receptor. Essa diferença explica, pelo menos em parte, a redução da velocidade de liberação observada para a formulação nanoestruturada (Pande, 2023).

A presença do PEG-pGLU também deve ser considerada na interpretação do perfil obtido. A modificação superficial pode alterar as propriedades interfaciais das vesículas e influenciar a interação do siRNA com a estrutura do sistema e com o meio de liberação. Entretanto, com os dados disponíveis, não é possível atribuir isoladamente ao PEG-pGLU a alteração da cinética, uma vez que não foi realizada, nesse ensaio, uma comparação direta entre etossoma-siRNA sem PEG-pGLU e etossoma-siRNA PEG-pGLU. Portanto, a interpretação mais adequada é que o sistema etossomal como um todo, incluindo sua organização lipídica e modificação superficial, proporcionou uma liberação mais gradual do siRNA (Lechanteur *et al*., 2016).

É importante ressaltar ainda que o ensaio de diálise caracteriza principalmente o perfil de liberação *in vitro* e não reproduz integralmente as condições encontradas no tecido cutâneo. Dessa forma, a liberação gradual observada não deve ser interpretada diretamente como evidência de liberação sustentada *in vivo*. Entretanto, o resultado demonstra que a formulação possui capacidade de modificar a disponibilidade do siRNA em comparação ao material livre, constituindo uma característica favorável para seu desenvolvimento como sistema de entrega (Solomon *et al*., 2020).

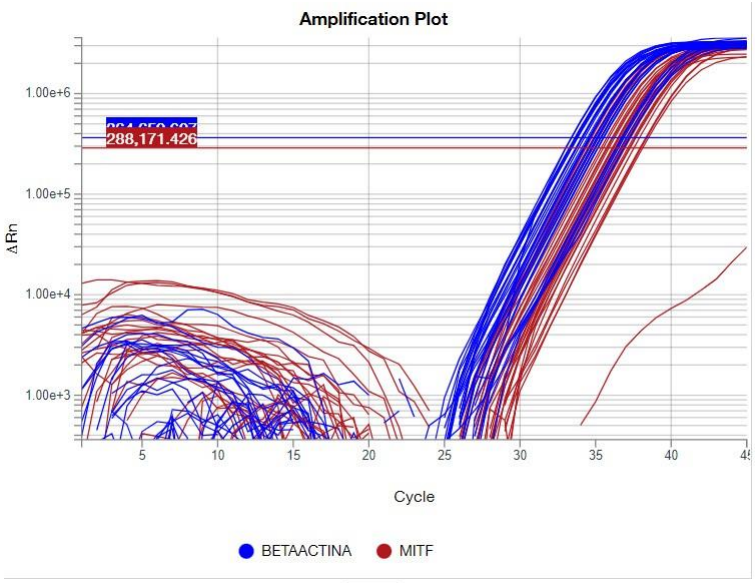
Em conjunto, os resultados demonstram que a associação do siRNA ao etossoma-PEG-pGLU modificou seu comportamento de liberação, reduzindo o fenômeno de liberação inicial rápida observado para o siRNA livre e proporcionando uma liberação progressiva durante as 24 horas de avaliação. O modelo de Higuchi

apresentou o melhor ajuste (R^2 = 0,970), enquanto o modelo de Korsmeyer–Peppas apresentou ajuste igualmente elevado (R^2 = 0,962) e n = 0,445, resultados que sustentam a predominância de um mecanismo de liberação associado à difusão. Esses achados complementam os resultados de caracterização físico-química e eficiência de encapsulação, indicando que a estrutura etossomal não apenas possibilitou a associação de elevada quantidade de siRNA (92,6% de eficiência de encapsulação), mas também modificou sua disponibilidade no meio, característica relevante para a utilização do sistema como nanocarreador de siRNA (Mircioiu *et al*., 2019).

5.8 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA PELO METODO RT-qPCR

A expressão relativa do gene *MITF* foi avaliada por RT-qPCR, utilizando o gene *β-actina* como controle endógeno. As curvas de amplificação apresentaram perfil sigmoidal característico, com aumento progressivo da fluorescência nas amostras avaliadas, indicando a ocorrência de amplificação dos alvos analisados (**Figura 17**).

Figura 17. Curva de amplificação de MITF e β-actina

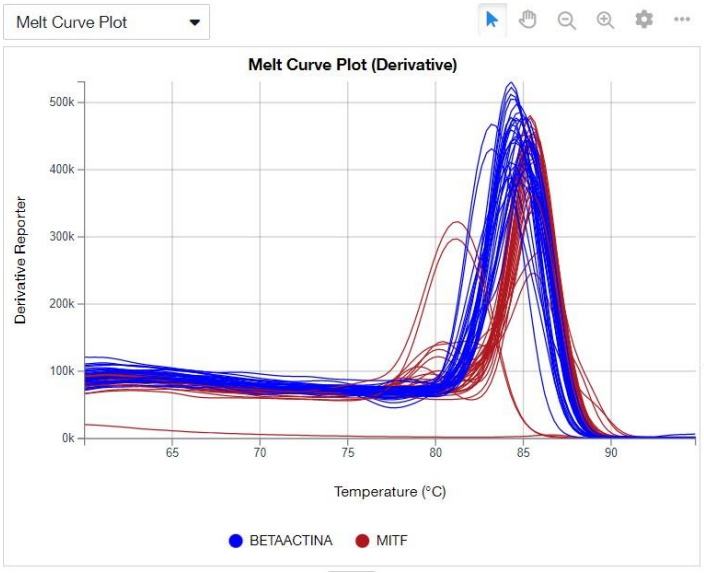


Fonte: Elaborado pela autora (2026).

A análise das curvas de dissociação revelou um pico de amplificação predominante, localizado aproximadamente entre 84 e 85 °C, com comportamento semelhante entre as amostras analisadas. A presença de um pico predominante na

curva de melting é compatível com a formação de um produto de amplificação majoritário, não sendo observada, nas condições avaliadas, a presença de múltiplos picos de elevada intensidade que sugerissem amplificação predominante de diferentes produtos (**Figura 18**).

Figura 18. Curva de melting de MITF e Beta-actina



Fonte: Elaborado pela autora (2026).

A avaliação da curva padrão, entretanto, revelou diferenças em relação aos parâmetros esperados para um ensaio quantitativo de RT-qPCR. Para *β-actina*, foi obtido coeficiente de determinação (R^2) de 0,991, com slope de 1,4, enquanto para MITF foi observado R^2 de 0,965 e slope de 1,773. Os valores de eficiência calculados pelo *software* foram de -80,84% para *β-actina* e -72,72% para MITF, valores um pouco abaixo a faixa de eficiência normalmente esperada para ensaios de RTqPCR.

A avaliação da eficiência de silenciamento gênico por RT-qPCR demonstrou que a formulação Etossoma siRNA-PEG-pGLU promoveu uma redução estatisticamente significativa na expressão de mRNA do gene MITF em relação ao grupo controle (100,00%). O tratamento resultou em uma expressão normalizada de 64,57 ± 19,34% ($p = 0,0068$, $p < 0,01$, teste t de Student), correspondendo a uma taxa de silenciamento de 35,43% (**Tabela 18**; **Figura 19**).

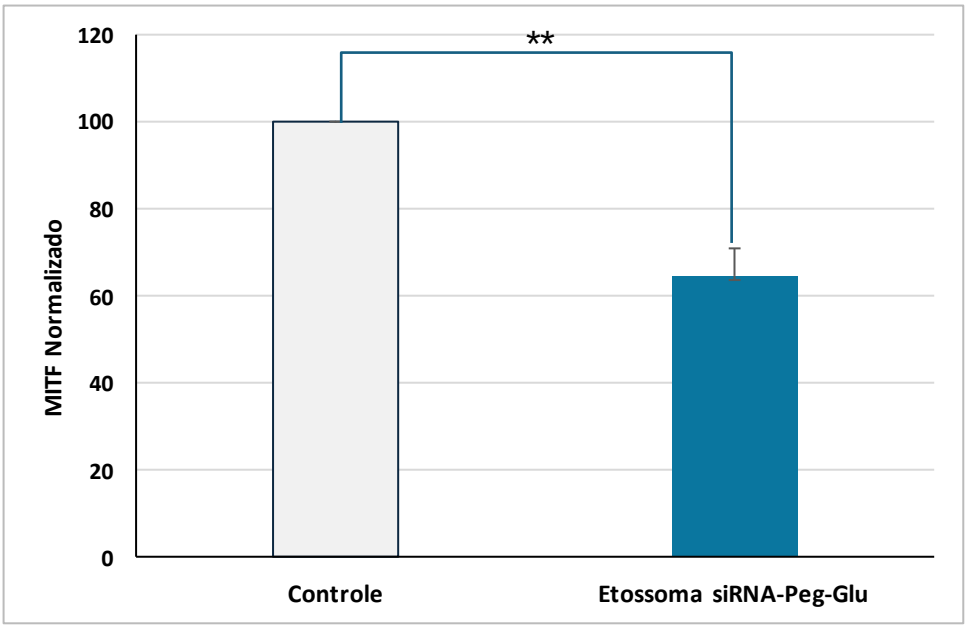
Tabela 18. Expressão do gene MITF em SKMEL-28 após administração de Etossoma siRNA-PEG-pGLU.

Grupo	n	Média ± desvio padrão	Erro Padrão da Média (EPM)	Expressão Normalizada	Taxa de silenciamento
Controle	4	100% ± 0,0054%*	0,0027	100%	0,00%(Basal)
Etossoma-siRNA-PEG-pGLU	4	64,57% ± 19,34%	9,67	64,57%	35,43%

*Nota: O Desvio Padrão e o EPM apresentados no Controle e Etossoma-siRNA-PEG-pGLU refletem a dispersão dos dados brutos originais da réplica antes da fixação da média em 100%.
Teste *t* de *Student*: $t = 6{,}679$, df=3; $p = 0{,}0068$ ($p < 0{,}01$).

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Figura 19. Expressão do gene MITF em SKMEL-28 após administração de Etossoma siRNA-PEG-pGLU



n = 4; Teste *t* de *Student*: Controle vs Etossoma siRNA-PEG-pGLU $p = 0{,}0068$ ($p < 0{,}01$); ** ($p < 0{,}01$).

Fonte: Elaborado pela autora (2026).

A avaliação da expressão do gene *MITF* por RT-qPCR demonstrou que o tratamento das células SK-MEL-28 com o Etossoma-siRNA-PEG-pGLU foi capaz de reduzir a expressão relativa do gene em comparação ao grupo controle. Considerando o controle como 100% de expressão, o grupo tratado apresentou expressão normalizada de 64,57% ± 19,34%, correspondendo a uma taxa de silenciamento de 35,43%. Esse resultado sugere que o sistema desenvolvido foi capaz de promover redução mensurável da expressão do alvo molecular *MITF* nas condições experimentais avaliadas (Nakai *et al*., 2007).

A análise estatística corroborou essa redução, uma vez que a comparação entre o grupo controle e o tratamento com Etossoma-siRNA-PEG-pGLU apresentou diferença estatisticamente significativa pelo Teste *t* de *Student* ($p < 0,01$). Dessa forma, a redução observada não deve ser atribuída exclusivamente à variabilidade experimental, indicando efeito associado à administração do siRNA direcionado ao MITF. O resultado é particularmente relevante porque o MITF constitui um regulador central da diferenciação, sobrevivência e função dos melanócitos, estando diretamente relacionado à regulação de genes envolvidos na melanogênese. Assim, a redução de sua expressão representa um importante indicador molecular do potencial de interferência do sistema sobre a via melanogênica (Goding; Arnheiter, 2019).

Outro aspecto importante é que a redução da expressão de MITF observada neste experimento deve ser analisada em conjunto com os resultados de internalização celular obtidos para o sistema. A presença do sinal associado ao siRNA demonstra a entrada do material nas células, porém a atividade de silenciamento depende de etapas subsequentes, incluindo o escape dos compartimentos endossomais, a liberação do siRNA no citoplasma e sua incorporação à maquinaria celular. (Dowdy *et al*., 2022). Assim, a redução de 35,43% observada por RT-qPCR sugere uma evidência funcional de que uma parcela do siRNA administrado pelo sistema permaneceu biologicamente disponível para interferir na expressão do gene-alvo.

A magnitude do silenciamento também deve ser interpretada em conjunto com os demais resultados biológicos obtidos neste estudo. A redução da expressão do MITF observada por RT-qPCR fornece uma evidência molecular inicial de ação sobre o alvo, enquanto alterações posteriores na produção de melanina representam uma resposta fenotípica que pode ocorrer com intensidade e temporalidade diferentes. A

expressão de mRNA não necessariamente apresenta relação linear e imediata com a quantidade de proteína funcional ou com a produção final de melanina, uma vez que esses processos envolvem etapas regulatórias adicionais e diferentes tempos de resposta celular (Dowdy, 2023). Dessa maneira, a redução de 35,43% na expressão de MITF pode contribuir para alterações posteriores na atividade melanogênica sem que seja necessariamente acompanhada por uma redução proporcional e simultânea da produção de melanina.

Em conjunto, os resultados demonstram que o Etossoma-siRNA-PEG-pGLU promoveu redução significativa da expressão de MITF em células SK-MEL-28, alcançando 35,43% de silenciamento em relação ao controle. Esses dados sugerem evidência de atividade molecular do sistema desenvolvido e sustentam seu potencial como estratégia de entrega de siRNA direcionado ao MITF. A integração desses resultados com os dados de internalização celular, viabilidade e produção de melanina permite uma avaliação mais abrangente da eficácia do sistema, desde a entrega intracelular do material genético até sua consequência funcional sobre o fenótipo melanogênico.

5.9 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DA PRODUÇÃO DE MELANINA

Na avaliação do conteúdo de melanina, os tratamentos com etossoma contendo siRNA sem modificação (Etossoma-siRNA) e com a formulação modificada com PEG-pGLU (Etossoma-siRNA-PEG-pGLU) promoveram redução da produção de melanina em relação ao controle negativo, correspondendo a 35,22% e 23,01% de inibição, respectivamente (**Tabela 19**).

Entretanto, a análise desses resultados foi realizada em conjunto com os dados de viabilidade celular e do silenciamento do gene, uma vez que alterações na atividade metabólica e na quantidade de células viáveis podem influenciar a determinação do conteúdo de melanina. O ensaio de viabilidade celular demonstrou que o tratamento com o Etossoma-siRNA convencional resultou em viabilidade de aproximadamente 43%, enquanto a formulação Etossoma-siRNA-PEG-pGLU apresentou viabilidade de aproximadamente 71% (**Tabela 20**).

Tabela 19. Avaliação do efeito inibitório da produção de melanina

Produção de Melanina - 405 nm / 144h / 50nM				
	Etossoma Branca (sem ativo)	Etossoma siRNA	Etossoma siRNA-PEG-pGLU	Controle negativo
	50nM	50nM	50nM	50nM
	0,065	0,065	0,085	0,103
	0,065	0,071	0,080	0,107
	0,066	0,070	0,083	0,106
	---	---	0,078	0,108
	---	---	0,082	---
Média	**0,065**	**0,069**	**0,082**	**0,106**
Desvio Padrão	0,001	0,003	3,311	0,002
Efeito Inibitório %	**38,365**	**35,220**	**23,019**	---

Fonte: Elaborado pela autora, (2026)

Tabela 20. Estatística aplicada ao efeito inibitório da produção de melanina (Anova e Teste de Tukey)

Tratamento/ Grupo	**Absorbância (405 nm) Média ± DP**	**Signf. Estatística (Tukey, α = 0,05)**	**Efeito Inibitório (%)**	**Viabilidade Celular (%)**
Controle Negativo	0,106 ± 0,002	a	---	100%
Etossoma siRNA-PEG-pGLU (50nM)	0,082 ± 0,003	b	23,02%	71%
Etossoma siRNA (50nM)	0,069 ± 0,003	c	35,22%	43%
Etossoma Branca (sem ativo)	0,065 ± 0,001	c	38,37%	

Nota: Médias seguidas pela mesma letra na coluna não apresentam diferença estatisticamente significativa pelo teste de Tukey ($p > 0,05$). Valores de absorbância expressos como: Média; Desvio Padrão (n=3) para os grupos etossoma Branca e etossoma siRNA; (n=5) para siRNA-PEG-pGLU; (n=4) para o Controle Negativo. ANOVA: ($F = 208,55$); ($p < 0,001$).
Fonte: Elaborado pela autora (2026).

Embora o Etossoma-siRNA convencional tenha apresentado maior percentual de inibição da produção de melanina (35,22%), esse resultado foi acompanhado por uma redução acentuada da viabilidade celular. Dessa forma, a maior redução de melanina observada para essa formulação deve ser interpretada com cautela, uma vez que não é possível atribuir integralmente o efeito observado ao silenciamento específico do gene-alvo sem considerar a influência da redução da viabilidade celular.

Por outro lado, o Etossoma-siRNA-PEG-pGLU apresentou 23,01% de inibição da produção de melanina associada a uma viabilidade celular de aproximadamente 71%, indicando um perfil mais favorável entre atividade biológica e viabilidade celular nas condições experimentais avaliadas. Esses resultados sugerem que a modificação da superfície do sistema pode ter contribuído para uma maior biocompatibilidade da formulação, mantendo, simultaneamente, um efeito sobre a produção de melanina.

Assim, considerando conjuntamente os resultados de produção de melanina e viabilidade celular, o Etossoma-siRNA-PEG-pGLU apresentou o perfil mais favorável e biocompatível, particularmente quanto à investigação da expressão do gene MITF e à confirmação do mecanismo molecular associado à redução da melanogênese.

A redução observada no grupo tratado com Etossoma-siRNA sugere que o sistema de entrega contendo siRNA foi capaz de interferir no processo melanogênico. De fato, o tratamento com etossoma-siMITF-PEG-pGLU reduziu a expressão do gene MITF para cerca de 64% da expressão normal das células não tratadas. Observa-se dessa forma uma relação direta na redução da expressão de MITF com a redução da produção de melanina nas células SK-MEL-28 Esse resultado é relevante considerando a proposta deste trabalho de utilizar siRNA direcionado ao MITF.

O MITF exerce papel central na regulação da melanogênese, controlando a expressão de genes envolvidos na síntese de melanina, incluindo aqueles relacionados à tirosinase. Dessa forma, a redução da atividade melanogênica observada experimentalmente está diretamente correlacionada com a redução da expressão do gene MITF

O efeito observado também deve ser interpretado em conjunto com os resultados de internalização celular. A presença de fluorescência associada às células após a exposição ao Etossoma-Cy5-MITF-PEG-pGLU fornece evidência qualitativa de que o sistema é capaz de interagir com as células e apresentar comportamento compatível com internalização. Assim, a redução da produção de melanina pode representar uma consequência funcional da entrega intracelular do siRNA, seguida da redução da expressão de MITF (**Figura 19**), observada por por RT-qPCR.

Um aspecto relevante é que o Etossoma-siRNA apresentou maior redução da produção de melanina que o Etossoma-siRNA-PEG-pGLU. Esse comportamento pode estar relacionado às características da formulação e à influência da PEGilação sobre a interação das vesículas com as células. Embora a incorporação de PEG possa modificar propriedades superficiais das nanopartículas e favorecer determinadas

características físico-químicas, a formação de uma camada hidrofílica também pode reduzir interações entre a superfície da vesícula e a membrana celular. Consequentemente, dependendo do grau de PEGilação e das características do sistema, pode ocorrer alteração da interação celular e da disponibilidade intracelular do siRNA.

Entretanto, essa diferença deve ser analisada com cautela em função dos resultados de viabilidade celular. A formulação sem PEG apresentou viabilidade de aproximadamente 44%, enquanto a formulação PEG-pGLU apresentou viabilidade de aproximadamente 71%. Portanto, a menor produção de melanina observada para o Etossoma-siRNA pode estar parcialmente associada à menor viabilidade celular com perda de massa celular e não necessariamente representar exclusivamente um efeito específico sobre a via melanogênica. Esse aspecto é particularmente importante para a interpretação do ensaio, uma vez que uma redução do número de células metabolicamente ativas pode resultar, consequentemente, em menor quantidade total de melanina detectável.

Por outro lado, o grupo Etossoma-siRNA-PEG-pGLU apresentou menor inibição da melanina, porém maior viabilidade celular, e redução da expressão do gene MITF, compatível com a redução do efeito melanogênico em baixa citotoxicidade. Assim, a formulação PEG-pGLU apresenta um perfil potencialmente mais favorável quando se considera conjuntamente o silenciamento do gene MITF, a atividade antimelanogênica e a preservação da viabilidade celular.

Dessa forma, os resultados obtidos demonstram que ambas as formulações contendo siRNA foram capazes de reduzir a produção de melanina em relação ao controle, sendo o efeito mais pronunciado para o Etossoma-siRNA. Entretanto, a interpretação da atividade antimelanogênica deve considerar simultaneamente a viabilidade celular, a internalização e, principalmente, os resultados de expressão do MITF por RT-qPCR. A demonstração de redução da expressão de MITF acompanhada da diminuição da produção de melanina, especialmente em uma condição que preserve a viabilidade celular, fornece evidência mais robusta de que o efeito observado decorre do mecanismo de silenciamento gênico proposto, e não apenas de redução da atividade ou do número de células.

A maior magnitude de redução observada no mRNA em comparação à melanina acumulada pode estar relacionada ao fato de que a redução da expressão gênica não implica necessariamente em uma diminuição imediata dos produtos

proteicos já presentes na célula, uma vez que proteínas e enzimas melanogênicas preexistentes podem permanecer funcionalmente ativas durante determinado período. Dessa forma, o bloqueio da expressão de MITF pode preceder a manifestação fenotípica sobre a melanogênese, considerando o papel central desse fator de transcrição na regulação de genes melanogênicos, como TYR e TRP1 (Yi *et al*., 2011; Bellei *et al*., 2010).

A diferença entre a magnitude do silenciamento do *MITF* e a redução do conteúdo de melanina pode ser explicada pela dinâmica temporal entre a modulação da expressão gênica e a manifestação do efeito fenotípico. A redução do mRNA de *MITF* indica a inibição da expressão gênica no momento da avaliação; entretanto, essa redução não implica a eliminação imediata das proteínas melanogênicas previamente sintetizadas. A tirosinase e outras proteínas envolvidas na melanogênese podem permanecer funcionalmente presentes após a redução da expressão de *MITF*, sendo sua estabilidade e degradação fatores relevantes para a dinâmica da pigmentação (Bellei *et al*., 2010). Além disso, como o MITF atua como regulador transcricional de diferentes genes envolvidos na melanogênese, incluindo *TYR*, *TYRP1* e *DCT*, a redução de sua expressão pode anteceder a diminuição efetiva da atividade melanogênica e, consequentemente, do conteúdo de melanina acumulado (Levy; Khaled; Fisher, 2006). Assim, a maior redução observada no nível de mRNA em comparação ao conteúdo de melanina é biologicamente compatível com uma resposta molecular que precede a manifestação fenotípica (Kondo; Hearing, 2011).

Esse comportamento também é consistente com estudos que demonstram que o silenciamento de *MITF* por siRNA foi capaz de reduzir a expressão de genes associados à melanogênese e a produção de melanina, evidenciando a participação central desse fator de transcrição na regulação da pigmentação (Yi *et al*., 2011).

6 CONCLUSÃO

O presente estudo permitiu desenvolver e avaliar uma estratégia baseada em etossomas para o carreamento de siRNA direcionado ao gene MITF, com o propósito de interferir de forma específica na regulação da melanogênese. A abordagem adotada integrou etapas de desenvolvimento e otimização da formulação, caracterização do sistema, avaliação de sua interação com células e investigação de seu efeito sobre o processo de pigmentação.

De maneira integrada, os achados demonstram que o etossoma constitui uma plataforma capaz de associar as propriedades necessárias ao transporte de uma molécula de natureza genética às demandas relacionadas à sua utilização em sistemas celulares.

A incorporação do PEG-pGLU promoveu melhora da viabilidade celular da formulação, evidenciando a importância do equilíbrio entre as características de entrega do nanocarreador e sua biocompatibilidade. A presença do siRNA na formulação foi acompanhada de internalização celular e de liberação progressiva do material, demonstrando o potencial do sistema para disponibilização do ácido nucleico no ambiente celular.

A utilização do siRNA como ferramenta de modulação da expressão de MITF também representa uma abordagem distinta das estratégias convencionais de despigmentação, uma vez que busca atuar em um importante regulador molecular da melanogênese, em vez de direcionar exclusivamente etapas enzimáticas finais da síntese de melanina. Nesse sentido, o trabalho contribui para ampliar as possibilidades de investigação de abordagens moleculares e nanobiotecnológicas voltadas ao controle da pigmentação cutânea, como o melasma.

A comparação entre diferentes estratégias de composição da vesícula evidenciou ainda a importância do equilíbrio entre eficiência de entrega e compatibilidade celular. Esse aspecto reforça que o desenvolvimento de nanossistemas para aplicação biológica não deve considerar apenas a capacidade de transportar o agente terapêutico, mas também as características da interação entre o nanocarreador e o sistema celular.

Os resultados obtidos sustentam, portanto, a viabilidade conceitual da utilização de etossomas como nanocarreadores de siRNA direcionado ao MITF, estabelecendo uma base experimental para o aprofundamento dessa abordagem. A

associação entre nanotecnologia e silenciamento gênico apresenta potencial para o desenvolvimento de estratégias mais direcionadas para a modulação da melanogênese e pode contribuir para a busca de alternativas terapêuticas para condições associadas à hiperpigmentação.

7 PERSPECTIVAS FUTURAS

Embora os resultados obtidos sejam promissores, a transposição dessa estratégia para uma aplicação terapêutica requer investigações complementares. Como perspectivas para a continuidade deste estudo, destacam-se:

- aprofundar a investigação dos mecanismos celulares envolvidos na internalização e no silenciamento do MITF pelo sistema desenvolvido;
- avaliar o efeito da formulação sobre a expressão da proteína MITF e de outros marcadores relacionados à melanogênese, complementando os resultados obtidos por análise de mRNA;
- investigar a permeação, penetração e retenção cutânea do etossoma contendo siRNA-PEG-pGLU por meio de modelos de pele adequados;
- avaliar o comportamento da formulação em modelos tridimensionais de pele reconstruída e em modelos experimentais que reproduzam de forma mais próxima as características do melasma;
- investigar a influência da composição e da concentração dos componentes da formulação, especialmente do CTAB e do PEG-pGLU, sobre as propriedades físico-químicas, a biocompatibilidade e a entrega do siRNA;
- ampliar os estudos de estabilidade da formulação, incluindo a avaliação da integridade do siRNA e da manutenção de sua atividade biológica durante o armazenamento;
- avaliar a segurança e a citotoxicidade da formulação em modelos celulares adicionais e em sistemas experimentais mais complexos;
- investigar, em estudos futuros, a eficácia e a segurança do sistema em modelos pré-clínicos, visando estabelecer parâmetros necessários para sua possível aplicação terapêutica na hiperpigmentação cutânea.

8 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

1 Publicação de artigo científico “Ethosomes as delivery system for treatment of melanoma: a mini-review” no ***Journal Oncologie***, publicado em 13 de julho de 2023. **Apêndice I**

2 Participação no IV Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (IV CDNB) de 13 a 16 de junho de 2023, organizado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, com apresentação do trabalho “Etossoma: Potencial nanocarreador para entrega de fármacos de uso tópico”, no formato de resumo simples e e-poster. **Apêndice II**

3 Participação no V Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (V CDNB) de 13 a 16 de junho de 2024, organizado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, com apresentação do trabalho “Etossoma: Nanocarreador capaz de incorporar siRNA na modulação da expressão gênica”, no formato de resumo simples e e-poster. **Apêndice III**

4 Participação em simpósio: Self-Assembled Hybrid Materials in Nanomedicine: From Non-Viral Vectors to Cancer Therapy and Neurostimulation**,** com apresentação de comunicação oral intitulada **Development of ethosomes as nanocarriers for MITF siRNA in melasma,** ocorrido em San Sebatian, na Espanha de 25 a 27 de fevereiro de 2026. **Apêndice IV**

5 Publicação de artigo científico: Breakthroughs in the nanoparticle-mediated delivery of siRNA for breast cancer treatment. **Nanomedicine,** Volume 20, 2025. **Apêndice V**

REFERÊNCIAS

ABDULBAQI, I. M.; DARWIS, Y.; KHAN, N. A. K.; ASSI, R. A.; KHAN, A. A. Ethosomal nanocarriers: The impact of constituents and formulation techniques on ethosomal properties, in vivo studies, and clinical trials. **Int. J. Nanomed.** 2016, 11, 2279–2304.

ABBASI, H.; KOUCHAK, M.; MIRVEIS, Z.; HAJIPOUR, F.; KHODARAHMI, M.; RAHBAR, N.; HANDALI, S. What we need to know about liposomes as drug nanocarriers: an updated review. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 13, n. 1, p. 7-23, 2023. DOI: 10.34172/apb.2023.009.

AIN, Q. U. *et al.*. Gene delivery to the skin – how far have we come? **Trends in biotechnology**, p. 1-14, ago 2020.

ALJUFFALI, I. A.; LIN, Y. K.; FANG, J. Y. Non invasive approach for enhancing small interfering RNA delivery percutaneously. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v.13, n. 2, p. 265-280, 2016.

ALMEIDA, R. F. M. de; LOURA. L. M. S. **Tópicos de biofísica de membranas**; Editora: LIDEL. Lisboa. 2004. ISBN9789727573240.

ALMEIDA, R. F. M. de; LOURA, L. M. S.; FEDOROV, A.; PRIETO, M. Nonequilibrium phenomena in the phase separation of a two-component lipid bilayer**. Biophysical Journal,** 2002. 82: 823-834 ISI:000173497600025.

ANCANS, J. *et al*. Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/fhaeomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells. **Experimental Cell Research**, 268(1), p. 26-35. 2001.

AYRES, E. L.; COSTA, A.; JORGE, A. C. F.; JUNIOR, J. E. G.; SZRAJBMAN, M; SANT'ANNA, B. Monocentric propesctive study for assessing the efficacy and tolerability of a cosmeceutical formulation in patients with melasma. **Surg Cosmet Dermatol**. 2016; 8 (3): 232-40.

BAULCOMBE, D. RNA silencing. **Curr Biol.** 2002; 12(3):R82-4.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? Journal of Controlled Release, v. 235, p. 337–351, 2016. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.06.017.

BERNSTEIN, E.; CAUDY, A. A.; HAMMOND, S. M.; HANNON, G. J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature.** 2001; 409 (6818):363-6.

BIBI, S.; KAUR, R.; HENRIKSEN-LACEY, M.; MCNEIL, S. E.; WILKHU, J.; LATTMANN, E.; CHRISTENSEN, D.; MOHAMMED, A. R.; PERRIE, Y. Microscopy imaging of liposomes: from coverslips to environmental SEM. International Journal of Pharmaceutics, v. 417, n. 1-2, p. 138-150, 2011. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.12.021.

BONDI, Agnese; PULA, Walter; BENEDUSI, Mascia; TRINCHERA, Giulia; BALDISSEROTTO, Anna; MANFREDINI, Stefano; ORTORE, Maria Grazia; PEPE, Alessia; MARIANI, Paolo; STUART, Marc C. A.; VALACCHI, Giuseppe; ESPOSITO, Elisabetta. Gossypin-loaded ethosome gel for cutaneous administration: a preliminary study on melanoma cells. Antioxidants, Basel, v. 14, n. 2, p. 186, 2025. DOI: 10.3390/antiox14020186.

BOUKAMP, P. *et al*. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. The Journal of Cell Biology, v. 106, n. 3, p. 761-771, 1988.

BRYS, A.K.; GOWDA, R.; LORIAUX, D.B., ROBERTSON, G.P.; MOSCA, P.J., Nanotechnology based strategies for combating toxicity and resistance in melanoma therapy. **Biotechnol. Adv.** 34, 565–577. 2016.

CARIO, M. How hormones may modulate human skin pigmentation in melasma: An in vitro perspective. **Exp Dermatol**. 2019 Jun;28(6):709-718. doi: 10.1111/exd.13915. Epub 2019 May 15. PMID: 30883945.

CASSIANO, D. P.; ESPÓSITO, A.C.C.; SILVA, C. N. da; LIMA, P. B.; DIAS, J. A. F.; HASSUN, K.; MIOT, L. D. B.; MIOT, H. A.; BAGATIN, E. Update on Melasma-Part II: Treatment. Dermatol Ther (Heidelb). 2022 Sep;12(9):1989-2012. doi: 10.1007/s13555-022-00780-4. Epub 2022 Jul 29. PMID: 35906506; PMCID: PMC9464276.

CASTANEDO-CAZARES, J. P. HERNANDEZ-BLANCO, D.; CARLOS-ORTEGA, B.; FURNTES-AHUMADA, C.; TORRES-ÁLVAREZ, B. Near-visible light and UV photoprotection in the tratamento of melasma: a double-blind randomizade trial. Photodermatol Photoimmunol Photomed. 2013. Feb, 30(1): 35-42;

CESTRARI, T. F.; DANTAS, L. P.; BOZA, J. C. Aquired hyperpigmentations. **An Bras Dermatol**, 2014 jan-Feb; 89(1): 11-25.

CHAVEZ, K.J.; GARIMELLA; S.V.; LIPKOWITZ, S. Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer. **Breast Dis**, 2010. 32(12):35–48

CHALBATANI, G. M.; DANA, H.; GHARAGOUZLOO, E.; GRIJALVO, S.; ERITJA, R.; LOGSDON, C. D.; MEMARI, F.; MIRI, S. R.; RAD, M. R.; MARMARI V. Small interfering RNAs (siRNAs) in cancer therapy: a nano-based approach, **International Journal of Nanomedicine**. 2019. 3111-3128, DOI: 10.2147/IJN.S200253.

CHAMPION, J.; MITRAGOTRI, S. Shape induced innibition of phagocytosis of polymer particles. **Pharm Res**, 26 (1): 244-249. 2009.

CHEN, Yi-Shyan; LEE, Shu-Mei; LIN, Chih-Chien; LIU, Chia-Yi. Hispolon decreases melanin production and induces apoptosis in melanoma cells through the downregulation of tyrosinase and microphthalmia-associated transcription factor (MITF) expressions and the activation of caspase-3, -8 and -9. **International Journal**

of Molecular Sciences, v. 15, n. 1, p. 1201-1215, 2014. DOI: 10.3390/ijms15011201.

CHEN, M. *et al*. Topical delivery of siRNA into skin using SPACE-peptide carriers. **Journal of Controlled Release**, v. 179, p. 33-41, 2014. DOI: 10.1016/j.jconrel.2014.01.005.

CHITHRANI, B.; CHAZANI, A; CHAN, W. Determining the size and shape dependence os gold nanoparticle uptake into mammalian cells. **Nano Letters**. 6 (4): 662-668. 2006.

CHITHRANI, B.; CHAN, W. Elucidating the mechanism of cellular uptake and removal of protein-coated gold nanoparticles of different sizes and shapes. **Nano Letters**. 7 (6): 154201550. 2007.

CHOI, Chung Hang J.; HAO, Liangliang; NARAYAN, Suguna P.; AUYEUNG, Evelyn; MIRKIN, Chad A. Mechanism for the endocytosis of spherical nucleic acid nanoparticle conjugates. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 110, n. 19, p. 7625-7630, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1305804110.

COLFERAI, M. M. T.; MIQUELIN, G. M.; STEINER, D. Evaluation of oral tranexamic acid in the treatment of melisma. **J Cosmet Dermatol**. 2018 Dec 9.

DAI, Q.; ZHANG, J.; PRUETT, S. B. Ethanol alters cellular activation and CD14 partitioning in lipid rafts. **Biochemical and Biophysical Research Communications,** 2005, 332: 37-42 ISI:000229355200007.

DAMEVSKA, Katerina. New Aspects of Melasma. **Serbian Journal of Dermatology and Venereology**, 2014; 6 (1): 5-18. < Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/265412421> Acesso em 13 de setembro 2023.

DANAEI, M.; DEHGHANKHOLD, M.; ATAEI, S.; HASANZADEH DAVARANI, F.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KHORASANI, S.; MOZAFARI, M. R. Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 2018. DOI: 10.3390/pharmaceutics10020057.

DONG, Y.; SIEGWART, D. J.; ANDERSON, D. G. Strategies, design, and chemistry in siRNA delivery systems, **Advanced Drug Delivery Reviews**, Volume 144, 2019, Pages 133-147, ISSN 0169-409X, https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.05.004.

DONGARE, S. U.; RAUT, S.; BONDE, S.; TAYSHETE, S.; GURAV, K. Ethossomes as novel vesicular carries for enhanced drug delivery. **Citeseer**, v. 4, p. 2100-2018, 2012.

DOWDY, Steven F.; SETTEN, Ryan L.; CUI, Xian-Shu; JADHAV, Satish G. Delivery of RNA therapeutics: the great endosomal escape! Nucleic Acid Therapeutics, v. 32, n. 5, 2022. DOI: 10.1089/nat.2022.0004.

DOWDY, S. F. Endosomal escape of RNA therapeutics: how do we solve this rate-limiting problem? **RNA**, v. 29, n. 4, p. 396-401, 2023. DOI: 10.1261/rna.079507.122.

DURYMANOV, M.; REINEKE, J. Non-viral delivery of nucleic acids: insight into mechanisms of overcoming intracellular barriers. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, n. Aug, p. 1-15, 21 ago. 2018

ELBASHIR, S. M.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. **Genes Dev** 2001;15(2):188-200.

ELKOSHI, N.; PARIKH, S.; MALCOV-BROG, H.; PARIKH, R. *et al.*. Ataxia Telangiectasia Mutated Signaling Delays Skin Pigmentation upon UV Exposure by Mediating MITFFunction toward DNA Repair Mode, **Journal of Investigative Dermatology**, 2023, ISSN 0022-202X, https://doi.org/10.1016/j.jid.2023.03.1686.

EPÓSITO, A. C. C.; CASSIANO, D. P.; SILVA, C. N.; LIMA, P. B.; DIAS, J. A. F.; HASSUN, K.; BAGATIN, E.; MIOT, L. D. B.; MIOT, H. A. Update on Melasma—Part I: Pathogenesis. **Dermatol Ther (Heidelb)** (2022) 12:1967–1988

EPÓSITO, A. C. C.;BRIANEZI, G.; SOUZA, N. P. de; MIOT, L. D. B.; MIOT, H. A. Exploratory study of epidermis, basement membrane zone, upper dermis alterations and Wnt pathway activation in melasma compared to adjacent and retroauricular skin. **Ann Dermatol.** 2020;32(2):101–8.

FILIPPOV, S. K.; KHUSNUTDINOV, R.; MURMILIUK, A.; INAM, W.; ZAKHAROVA, L. Y.; ZHANG, H.; KHUTORYANSKIY, V. V. Dynamic light scattering and transmission electron microscopy in drug delivery: a roadmap for correct characterization of nanoparticles and interpretation of results. Materials Horizons, v. 10, n. 12, p. 5354-5370, 2023. DOI: 10.1039/D3MH00717K.

FIRE, A.; XU, S.; MONTGOMERY, M. K.; KOSTAS, S. A.; DRIVER, S. E.; MELLO, C. C. Potent and specific genetic interference by doublestranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. **Nature.** 1998; 391(6669):806-11.

FISHER, D. E. Microphthalmia, a critical factor in melanocyte development, defines a discrete transcription factor family. **Genes. Dev**., 8(22), 2770–2780 (1994).

FRANKEN, L. E.; *et al*. Transmission electron microscopy as a tool for the characterization of soft materials: application and interpretation. Advanced Science, v. 4, n. 6, 1600476, 2017. DOI: 10.1002/advs.201600476.

FREITAS, C.; MULLER, R. Correlation between long-term stability of solid lipd nanoparticles (SLNTM) and crystallinity of the lipid phase. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. V. 47, p. 155-132, 1999.

GARTNER, L.P. Tratado de histologia. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

GADALLA, Hytham H. *et al*. Size optimization of carfilzomib nanocrystals for systemic delivery to solid tumors. Journal of Controlled Release, v. 352, p. 637-651, 2022. DOI: 10.1016/j.jconrel.2022.10.041.

GHASEMIYEH, Parisa; MOHAMMADI-SAMANI, Soliman. siRNA-based delivery systems: technologies, carriers, applications, and approved products. **European Journal of Pharmacology**, v. 996, p. 177441, 2025. DOI: 10.1016/j.ejphar.2025.177441.

GELMI, M. C.; HOUTAGERS, L. E.; STRUB, T.; KROSSA, I.; JAGER, M. J. MITF in Normal Melanocytes, Cutaneous and Uveal Melanoma: A Delicate Balance. **Int. J. Mol. Sci.** 2022, 23, 6001. https://doi.org/10.3390/ijms23116001

GEUSENS, Barbara; BRAAT, Sien; STUART, M.; DE SMEDT, Stefaan; SANDERS, Niek; PROW, T.; ROBERTS, M.; LAMBERT, Jo; VAN GELE, Mireille. Evaluation of ethosomes for delivery of siRNA into cultured primary melanocytes and skin. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, p. S40, 2009.

GODIN, B.; TOUITOU, E. Ethossomes: new prospect in transdermal delivery**.** **Critical reviews in therapeutic drug Carrier systems**, 2003. V. 20, p. 63-102.

GODING, C. R.; ARNHEITER, H. MITF-the first 25 years, **Genes & Development**, 2019. ISSN 0890-9369/19; 983-1007

GROSSI, L. N.; BRAZ, W. R.; SILVA, N. P.; CAZARIM, E. L. C. C.; PALMIERI, M. G. S.; TAVARES, G. D.; PITTELLA, F. Ethossomes as delivery system for treatment of melanoma: a mini-review. Miscellaneous. De Gruyter. **From the journal Oncologie**, 2023. https://doi.org/10.1515/oncologie-2023-0177

HEMESATH; STEINGRIMSSON, E.; MCGILL, G.; HANSEN, M. J.; VAUGHT, J.; HODGKINSON, C. A.; AMHEITER, H.; COPELAND, N. G.; JENKINS, N. A.; HOFFMAN, A. S. The origins and evolution of “controlled” drug delivery systems. **Journal of controlled release**. 2008;132(3):153-63.

HIGUCHI, T. Rate of release of medicaments from ointment bases containing drugs in suspension. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 50, n. 10, p. 874-875, 1961. DOI: 10.1002/jps.2600501018.

HIGUCHI, T. Mechanism of sustained-action medication: theoretical analysis of rate of release of solid drugs dispersed in solid matrices. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 12, p. 1145-1149, 1963. DOI: 10.1002/jps.2600521210.

ITO, Shosuke; WAKAMATSU, Kazumasa. Chemistry of mixed melanogenesis—pivotal roles of dopaquinone. Photochemistry and Photobiology, v. 84, n. 3, p. 582-592, 2008. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2007.00238.x.

JULIANO, R. L. Intracellular trafficking and endosomal release of oligonucleotides: what we know and what we don't. **Nucleic Acid Therapeutics**, v. 28, n. 3, p. 166-177, 2018. DOI: 10.1089/nat.2018.0727.

JULIANO, R. L.; MING, X.; NAKAGAWA, O. Cellular uptake and intracellular trafficking of antisense and siRNA oligonucleotides. Bioconjugate Chemistry, v. 23, n. 2, p. 147-157, 2012. DOI: 10.1021/bc200377d

KAMAKCHI, R. Fairness via formulations: a review of cosmetic skin-lightening ingredients. **J Cosmet Sci**, 63(1), 43–54 (2012).

KIM, J; KIM, Y.H.; BANG, S.; YOO, H.; KIM, I.; CHANG, S. E.; SONG, Y. L-765,314 Suppresses melanin synthesis by Regulating tyrosinase activity. **Molecules**, 2019. Feb 21; 24 (4).

KIM, H.-K.; DAVAA, E.; MYUNG, C.-S.; PARK, J.-S. Enhanced siRNA delivery using cationic liposomes with new polyarginine-conjugated PEG-lipid. International Journal of Pharmaceutics, v. 392, n. 1-2, p. 141–147, 2010. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2010.03.047.

KIM, S. J.; PARK, J. Y.; SHIBATA, T.; FUJIWARA, R; KANG, H. Y; CHANG, S. E. Efficacy and possible mechanisms of topical tranexamic acid in melasma. **Clin Exp Dermatol.** 2016 Jul; 41 (5): 480-5.

KNUDSEN, N. Ø.; RØNHOLT, S.; SALTE, R. D.; *et al*. Calcipotriol delivery into the skin with PEGylated liposomes. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, v. 81, n. 3, p. 532-539, 2012. DOI: 10.1016/j.ejpb.2012.04.005.

KONDO, Taisuke; HEARING, Vincent J. Update on the regulation of mammalian melanocyte function and skin pigmentation. **Expert Review of Dermatology**, v. 6, n. 1, p. 97-108, 2011. DOI: 10.1586/edm.10.70.

KORSMEYER, R. W.; GURNY, R.; DOELKER, E.; BURI, P.; PEPPAS, N. A. Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers**. International Journal of Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 25-35, 1983. DOI: 10.1016/0378-5173(83)90064-9.

KÜÇÜK, Ö. S. Current treatment approaches for melasma. **Bezm. Sci**. 2018, 6, 54–62. [CrossRef]

KUMAWAT, D.; KUMAR, V.; SAHAY, P.; NONGREM, G.; CHANDRA, P. Bilateral asymmetrical partial heterochromia of iris and fundus in Waardenburg syndrome type 2A with a novel *MITF* gene mutation. **Indian J Ophthalmol.** 2019 Sep;67(9):1481-1483. doi: 10.4103/ijo.IJO_181_19. PMID: 31436206; PMCID: PMC6727726.

LECHANTEUR, Anna; FURST, Tania; EVRARD, Brigitte *et al*. PEGylation of lipoplexes: the right balance between cytotoxicity and siRNA effectiveness. European **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 93, p. 493-503, 2016. DOI: 10.1016/j.ejps.2016.08.058.

LECHANTEUR, A.; SANNA, V.; DUCHEMIN, A.; EVRARD, B.; MOTTET, D.; PIEL, G. Cationic liposomes carrying siRNA: impact of lipid composition on physicochemical properties, cytotoxicity and endosomal escape. Nanomaterials, Basel, v. 8, n. 5, p. 270, 2018. DOI: 10.3390/nano8050270.

LEVY, C.; KHALED, M.; FISHER, D. E. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. Trends in Molecular Medicine, v. 12, n. 9, p. 406-414, 2006. DOI: 10.1016/j.molmed.2006.07.008.

LIMSUWAN, Tunyaluk; BOONME, Prapaporn; KHONGKOW, Pasarat; AMNUAIKIT, Thanaporn. Ethosomes of phenylethyl resorcinol as vesicular delivery system for skin lightening applications. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 8310979, 2017. DOI: 10.1155/2017/8310979.

LIU, F. *et al.*. Current transport systems and clinical applications for small interfering RNA (siRNA) Drugs. **Molecular Diagnosis & Therapy**, v.22, n. 5. 552-569, 20 out 2018a.

LORZ, L. R.; YOO, B. C.; KIM, M. Y.; CHO, J. Y. Anti-wrinkling and melanogenic effect of *Pradosia mutisii* methanol extract. **Int J Mol Sci**. 2019. Feb 27; 20 (5). Pii: E1043.

LOVINGER, D. M. Alcohols and neurotransmitter gated ion channels: Past, present and future. **Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology**. 1997. 356: 267-282 ISI:A1997XU14200001.

LOZER, Priscila Enlich, DAVID, Renata Boscaini. Melasma uma abordagem nutricional. **Braspen, Rev. Bras. Nutr. Clin.** 2014. Disponível em <http://www.braspen.com.br/home/wp-content/uploads/2016/12/15-Melasma-uma-abordagem.pdf> Acesso em: 13 setembro de 2023

LU *et al*. Effect of particle shape on phagocytosis of Cdte quantum dot-cysteine composites. **Med Cham Comm**. 1: 84-86. 2010.

LU, G. W.; GAO, P. **Emulsions and microemulsions for Topical and transdermal drug delivery**. In book: Handbook of Non-Invasive Drug Delivery Systems (pp.59-94). 2010. DOI:10.1016/B978-0-8155-2025-2.10003-4.

LUO, C.; SHEN, J. Research progress in advanced melanoma. **Cancer Lett**. 397, 120–126. 2017

MAHAJAN, V. K.; PATIL, A.; BLICHARZ, L. *et al.*. Medical therapies for melasma. ***J Cosmet Dermatol*.** 2022;21:3707-3728. doi: 10.1111/jocd.15242

MAHAJAN, Karishma; SHARMA, Poonam; ABBOT, Vikrant; CHAUHAN, Kalpana. Ethosomes as a carrier for transdermal drug delivery system: methodology and recent developments. **Journal of Liposome Research**, v. 34, n. 4, p. 697-714, 2024. DOI: 10.1080/08982104.2024.2339896.

MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**; v. 6, p. 1-37, 2009.

MARCORIN, L. Avalição da variabilidade genética do gene MITF e suas associações com fenótipos de pigmentação em amostra da população brasileira (Dissertação de mestrado), **Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras**, Ribeirão Preto – SP, 188 p. 2017.

MARQUÊS, J. M. T. **Efeitos do etanol na organização lateral de bicamadas lipídicas complexas em diferentes suportes sólidos e interação com uma enzima** (Dissertação de Mestrado). Universidade de Lisboa. Faculdade de Ciências. Departamento de Química e Bioquímica. 2009.

MARTINEZ, J.; PATKANIOWSKA, A.; URLAUB H, LUHRMANN, R.; TUSCHL, T. Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. **Cell** 2002; 110 (5):563-74.

MCKESEY, J.; TOVAR-GARZA, A.; PANDYA, A. G. Melasma Treatment: An Evidence-Based Review. **Am. J. Clin. Dermatol**. 2020, 21, 173–225. [CrossRef] [PubMed]

MEHNERT, W. MADER, K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 64, p. 83-101, 2012.

MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER. SK-MEL-28: Human Melanoma Cell Line (ATCC HTB-72). New York, [s.d.]. Disponível em: https://www.mskcc.org/research-advantage/support/technology/tangible-material/human-melanoma-cell-line-sk-mel-28. Acesso em: 7 ago. 2026.

MICHEN, B.; GEERS, C.; VANHECKE, D.; ENDES, C.; ROTHEN-RUTISHAUSER, B.; BALOG, S.; PETRI-FINK, A. Avoiding drying-artifacts in transmission electron microscopy: characterizing the size and colloidal state of nanoparticles. Scientific Reports, v. 5, p. 9793, 2015. DOI: 10.1038/srep09793

MILLER, A. J.; MIHM, M.C. Jr. Melanoma, **N. Engl. J. Med**., 355(1), 51–65 (2006).

MIRCIOIU, C.; VOICU, V.; ANUTA, V.; TUDOSE, A.; CELIA, C.; PAOLINO, D.; FRESTA, M.; SANDULOVICI, R.; MIRCIOIU, I. Mathematical modeling of release kinetics from supramolecular drug delivery systems. Pharmaceutics, v. 11, n. 3, p. 140, 2019. DOI: 10.3390/pharmaceutics11030140.

MONISHA C.; GNK. G.; MYTHILI, L.; KAYALVIZHI, R. A Review on Ethosomes for Transdermal Application. **Research J. Pharm**. and Tech. 2019; 12(7): 3133-3143. doi: 10.5958/0974-360X.2019.00529.8

MOUTOU, K. *et al*. Cationic liposomes carrying siRNA: impact of lipid composition on physicochemical properties, cytotoxicity and endosomal escape. International Journal of Pharmaceutics, v. 550, p. 123–134, 2018.

MOTA, Ana Henriques; PRAZERES, Inês; MESTRE, Henrique; BENTO-SILVA, Andreia; RODRIGUES, Maria João; DUARTE, Noélia; SERRA, Ana Teresa; BRONZE, Maria Rosário; RIJO, Patrícia; GASPAR, Maria Manuela; VIANA, Ana Silveira; ASCENSÃO, Lia; PINTO, Pedro; KUMAR, Pradeep; ALMEIDA, António José; REIS, Catarina Pinto. A newfangled collagenase inhibitor topical formulation

based on ethosomes with Sambucus nigra L. extract. **Pharmaceuticals,** Basel, v. 14, n. 5, p. 467, 2021. DOI: 10.3390/ph14050467

MOUSA, I. A.; HAMMADY, T. M.; GAD, S.; ZAITONE, S. A.; EL-SHERBINY, M.; SAYED, O M. Formulation and Characterization of Metformin-Loaded Ethosomes for Topical Application to Experimentally Induced Skin Cancer in Mice. **Pharmaceuticals** 2022, 15, 657

NANGIA, S.; SURESHKUMAR, R. Effects of nanoparticles charge and shape anisotropy on translocation through cell membrane. **Langmuir**, 28: 17666-27671. 2012

NAKAI, N.; KISHIDA, T.; SHIN-YA, M.; IMANISHI, J.; UEDA, Y.; KISHIMOTO, S.; MAZDA, O. Therapeutic RNA interference of malignant melanoma by electrotransfer of small interfering RNA targeting Mitf. **Gene Therapy**, v. 14, n. 4, p. 357-365, 2007. DOI: 10.1038/sj.gt.3302868. Epub 5 Oct. 2006

NATSHEH, H.; VETTORATO, E.; TOUITOU, E. Ethosomes for dermal administration of natural active molecules. **Curr. Pharm. Des**. 2019, 25, 2338–2348

NATSHEH, Hiba; TOITOU, Elka. Phospholipid vesicles for dermal/transdermal and nasal administration of active molecules: the effect of surfactants and alcohols on the fluidity of their lipid bilayers and penetration enhancement properties. **Molecules**, v. 25, n. 13, p. 2959, 2020. DOI: 10.3390/molecules25132959.

NEAGU, N.; CONFORTI, C.; AGOZZINO, M.; MARANGI, G. F.; MORARIU, S. H.; PELLACANI, G.; PERSICHETTI, P.; PICCOLO, D.; SEGRETO, F.; ZALAUDEK, I.; DIANZANI, C. Melasma treatment: a systematic review, **Journal of Dermatological Treatment**, 2021. DOI: 10.1080/09546634.2021.1914313

NOURISSAT, P., TRAVERT, M.; CHEVANNE, M.; TEKPLI, X.; REBILLARD, A.; LE MOIGNE-MULLER, G.; RISSE, M.; CILLARD, J.; DIMANCHE-BOITRE, M. T.; LAGADIC-GOSSMANN, D.; SERGENT, O. Ethanol induces oxidative stress in

primary rat hepatocytes through the early involvement of lipid raft clustering. **Hepatology,** 2008. 47: 59-70 ISI:000252143200012.

NYKANEN, A.; HALEY, B.; ZAMORE, P. D. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. **Cell.** 2001;107(3):309-21.

PANDE, S. Liposomes for drug delivery: review of vesicular composition, factors affecting drug release and drug loading in liposomes. Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology, v. 51, n. 1, p. 428-440, 2023. DOI: 10.1080/21691401.2023.2247036.

PARK, S. N.; LEE, H. J.; GU, H. A. Enhanced skin delivery and characterization of rutin-loaded ethossomes. **Korean Journal of Chemical Engineering**. v. 31, p. 485 – 489, 2014.

PASSERON, T.; LIM, H. W.; GOH, C. L.; KANG, H. Y.; LY, F.; MORITA, A. *et al.*. Photoprotection according to skin phototype and dermatoses: practical recommendations from an expert panel. **J Eur Acad Dermatol Venereol**. 2021; 35(7): 1460–9.

PILLAIYAR, Thanigaimalai; NAMASIVAYAM, Vigneshwaran; MANICKAM, Manoj; JUNG, Sang-Hun. Inhibitors of melanogenesis: an updated review. Journal of Medicinal Chemistry, Washington, DC, v. 61, n. 17, p. 7395-7418, 2018. DOI: 10.1021/acs.jmedchem.7b00967.

RAHIMI, H.; MIRNEZAMI, M.; YAZDABADI, A.; HAJIHASHEMI, A. Evaluation of systemic oxidative stress in patients with melasma. ***J Cosmet Dermatol*.** 2023;00:1-5. doi:10.1111/jocd.15924.

RANGSIMAWONG, W.; OPANASOPIT, P.; ROJANARATA, T.; DUANGJIT, S.; NGAWHIRUNPAT, T. Skin transport of hydrophilic compound-loaded PEGylated lipid nanocarriers: comparative study of liposomes, niosomes, and solid lipid nanoparticles**. Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 39, n. 8, p. 1254-1262, 2016. DOI: 10.1248/bpb.b15-00981.

REGAZZETTI, C.; SORMANI, L; DEBAYLE, D.; BERNERD, F.; TULIC, M. K. D. E.; DONATIS, G. M.; CHIGNON-SICARD, B.; ROCCHI, S; PASSERON, T. Melanocytes sense blue light and regulate pignmentation through opsin-3. **J Invest Dermatol.** 2018. Jan, 138(1): 171-178.

REYNOLDS *et al*.. Rational siRNA design for RNA form recombinant human RISC. **Nature structural and molecular biology**, 12(4): 240-349. 2005.

RIESZ, J. *et al*. The spectroscopic properties of melanin. **Tese (Doctorado) – University of Queensland**, p.1-239. 2007.

RITTER, C.G.; FISS,D.V.C.; COSTA, J. A. T. B.; CARVALHO, da R. R. de; BAUERMANN, G.; CESTARI. T.F. Extra-facial melasma: clinical, histopathological, and immunohistochemical case-control study. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**. v. 27, Issue9, p. 1088-1094, 2013.

ROMERO, C.; ABERDAM, E.; LARNIER, C.; ORTONNE, J. P. Retinoic acid as modulator of UVB-induced melanocyte differentiation involvement of the melanogenic enzymes expression. **J. Cell. Sci**. 1994, 107, 1095–1103. [CrossRef]

ROSA, J. *et al*.. Current non-viral siRNA delivery systems as a promising treatment of skin deseases. **Current Pharmaceutical Design**, v. 24, n. 23, p. 2644-2663, ago. 2018.

ROSS, M.H.; PAWLINA, W. **Histologia: texto e atlas**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

RUSSO, L.; BERARDI, V.; TARDANI, F.; LA MESA, C.; RISULEO, G. Delivery of RNA and its intracellular translation into protein mediated by SDS-CTAB vesicles: potential use in nanobiotechnology. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 734596, 2013. DOI: 10.1155/2013/734596.

SADICK, N.; EDISON, B. L.; JOHN, G.; BOHNERT, K. L.; GREEN, B. An advanced, physician-strength retinol Peel Improves Signs of Aging and acne across a range of skin types including melasma and skin of color. **J. Drugs Dermatol**. 2019, 18, 918–923. [PubMed]

SHAH, S. D.; AURAGABADKAR, S. J. Laser toning in melasma. **J. Cutan. Aesthet. Surg**. 2019, 12, 76–84. [CrossRef]

SARKAR, R.; GARG, V.; BANSALI, S.; SETHI, S.; GUPTA, C. Comparative evaluation of efficacy and tolerability of glycolic acid, salicylic, mandelic acid, and phytic acid combination peels in Melasma. **Dermatol. Surg.** 2016, 42, 384–391. [CrossRef] [PubMed]

SCHROEDER, F.; HUBBELL, T; COLLES, S. M.; WOOD, W. G.. Expression of liver fatty-acid-binding protein in L-cells -plasma-membrane response to ethanol. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 1995, 316: 343-352. ISI:A1995QJ93300046.

SCHROEDER, F.; COLLES, S. M.; KREISHMAN, G. P.; HEYLIGER, C. E.; WOOD, W. G. Synaptic plasma-membrane structure and polarity of long-sleep and short-sleep mice. **Archives of Biochemistry and Biophysics** 1994. 309: 369-376 ISI:A1994MY85800024.

SHCHMIDT, N.; GANS, E. H. Clindamycin 1.2% tretinoin 0.025% gel versus clindamycin gel treatment in acne patients: a focus on Fitzpatrick skin types. **J Clin Aesthet Dermatol**. 2011 jun; 4(6): 31-40.

SCHIMITES, P. G. **Desenvolvimento de suspensões de nanocápsulas poliméricas contendo quercetina ou crisina e avaliação biológica em células b16f10 e em modelo de melanoma *in vivo*** (Dissertação de Mestrado). Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas. Centro de ciências da vida. Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, 2020.

SEO, M. D.; KANG, T. J.; LEE, C. H.; LEE, A. Y.; NOH, M. HaCaT keratinocytes and primary epidermal keratinocytes have different transcriptional profiles of cornified envelope-associated genes to T helper cell cytokines. **Biomolecules & Therapeutics, Seoul**, v. 20, n. 2, p. 171–176, mar. 2012. DOI: https://doi.org/10.4062/biomolther.2012.20.2.171.

SINGH, S.; ZAFAR, A.; KHAN, S.; NASEEM, I., Towards therapeutic advances in melanoma management: An overview. **Life Sci**. 174, 50–58. 2017.

SINGH, Y.; TOMAR, S.; KHAN, S.; MEHER, J. G.; PAWAR, V. K.; RAVAL, K.; SHARMA, K.; SINGH, P. K.; CHAURASIA, M.; REDDY, B. S.; CHOURASIA, M. K. Bridging small interfering RNA with giant therapeutic outcomes using nanometric liposomes, **Journal of Controlled Release**, v. 220, Part A, 2015, p. 368-387, ISSN 0168-3659, https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.10.050.

SIEPMANN, Juergen; PEPPAS, Nicholas A. Higuchi equation: derivation, applications, use and misuse**. International Journal of Pharmaceutics**, v. 418, n. 1, p. 6-12, 2011. DOI: 10.1016/j.ijpharm.2011.03.051.

SIEGRIST, Walter; EBERLE, Alex N. In situ melanin assay for MSH using mouse B16 melanoma cells in culture. **Analytical Biochemistry**, v. 159, n. 1, p. 191–197, 1986. DOI: 10.1016/0003-2697(86)90327-1

SOLANO, Francisco; BRIGANTI, Stefania; PICARDO, Mauro; GHANEM, Ghanem. Hypopigmenting agents: an updated review on biological, chemical and clinical aspects. Pigment Cell Research, v. 19, n. 6, p. 550-571, 2006. DOI: 10.1111/j.1600-0749.2006.00334.x.

SOLOMON, D.; GUPTA, N.; MULLA, N. S.; SHUKLA, S.; GUERRERO, Y. A.; GUPTA, V. Role of in vitro release methods in liposomal formulation development: challenges and regulatory perspective. **AAPS Journal**, v. 19, n. 6, p. 1669-1681, 2017. DOI: 10.1208/s12248-017-0142-0.

STURM, R. A. Molecular genetics of human pigmentation diversity. **Human Molecular Genetics**, 18 (R1). P. R9-R17, 2009

SZABO, G.,DOLGANIUC, A.; DAI, Q.; PRUETT, S. B. TLR4, ethanol, and lipid rafts: A new mechanism of ethanol action with implications for other receptor-mediated effects**. Journal of Immunology**, 2007. 178: 1243-1249 ISI:000243820900003

TAI, W.; GAO, X. Functional peptides for siRNA delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 110-111, n. 6188, p157-168, fev, 2017.

TARAZ, M.; NIKNAM, S; EHSANI, A. H. Tranexamic acid intratment of melisma: A comprehensive review of clicnical studies. **Dermatol Ther**. 2017 May, 30(3). Epub 2017 Jan 30

THOMAS, Aaron J.; ERICKSON, Carol A. The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 21, n. 6, p. 598-610, 2008. DOI: 10.1111/j.1755-148X.2008.00506.x

TOUITOU, E.; ALKABES, M.; DAYAN, N.; ELIAZ, M. Ethosomes: the novel vesicular carriers for enhanced skin delivery. **Pharm Res**. 1997, 14:305–6.

TOUITOU, E.; DAYAN, N.; BERGELSON, L.; GODIN, B.; ELIAZ, M. Ethosomes — novel vesicular carriers for enhanced delivery: characterization and skin penetration properties. **Journal of Controlled Release**, v. 65, n. 3, p. 403-418, 2000. DOI: 10.1016/S0168-3659(99)00222-9

TRACEY, E.H.; VIJ, A. Updates in Melanoma. **Dermatol. Clin**. 37, 73–82. 2019

TSUCHIYA, k.; NAKANISHI, N.; UETSUJI, Y.; NAKAMACHI, E. Development of blood extraction system for health monitoring system. **Biomedical microdevices**. 2005;7(4):347-53.

TULLY, G. Genotype versus phenotype: Human pigmentation. **Forensic Science International: Genetics**, 1(2), p. 105-110. 2007.

VALLE, A. B. C. dos. Silenciamento do gene HOXB7 em linhagens de câncer de mama utilizando nanopartículas hibridas contendo siRNA e co-tratamento com tamoxifeno (Dissertação de mestrado). **Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Imunologia e Dip/Genética e Biotecnologia. Universidade Federal de Juiz de Fora – MG**. 2019.

VERMA, P.; PATHAK, K., 2010. Therapeutic and cosmeceutical potential of ethosomes: An overview. **Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research** | Jul-Sep 2010 | Vol 1 | Issue 3

VICENTINI, F. T. M. D. C. *et al.*. Delivery systems and local administration routes for therapeutic si RNA. **Pharmaceutical Research**, v. 30, n. 4, p. 915-931, 24 abr 2013b.

VIERL, U.,; LOBBECKE, L.; NAGEL, N.; CEVC, G.. Solute Effects on the Colloidal and Phase-Behavior of Lipid Bilayer-Membranes - Ethanol-Dipalmitoylphosphatidylcholine Mixtures. **Biophysical Journal**. 67: 1067-1079. 1994 ISI:A1994PE37700014.

WAKAMATSU, Kazumasa; ZIPPIN, Jonathan H.; ITO, Shosuke. Chemical and biochemical control of skin pigmentation with special emphasis on mixed melanogenesis. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 34, n. 4, p. 730-747, 2021. DOI: 10.1111/pcmr.12970.

WANG, J. V.; SCHOENBERG, E.; SAEDI, N. Bakuchiol as a trendy ingredient in skincare: Recent Evidence. **Skinmed** 2019, 17, 188–189. [PubMed]

WANG, Zeyu; ZHANG, Daiyan; SHUI, Mingju; HO, Ian Wa; KOU, Weng Si; WEI, Jianwen; WAN, Jian-Bo; WANG, Ruibing; ZHANG, Qing-Wen. Investigation of the whitening activity of ginsenosides from Panax notoginseng and optimization of the

dosage form. **Journal of Ginseng Research**, v. 48, n. 6, p. 543-551, 2024. DOI: 10.1016/j.jgr.2023.12.005.

WENG, Y. *et al.*. RNAi therapeutic and its innovative biotechnological evolution. **Biotechnology Advances**, v.37, n. 5, p. 801-825, set. 2019

Whitehead siRNA Selection Server: an automated siRNA oligonucleotide predidtion server. Bingbing Yuan, Robert Latek, Mrkus Hossbach, Thomas Tuschl, and Fren Lewiter. **Nucl. Acids**. **Res**. 2004.

WHITEHEAD, K; LANGER, R; ANDERSON, D Knocking down barriers: advances in siRNA deliver. **Nature Reviews**, 8: 129-138. 2009.

WOLFF, K. *et al.*. **Fitzpatrick's dermatology in general medicine**. 8. ed. New York: McGraw-Hill, 2011.

XIA, Y.; TIAN, J.; CHEN, X. Effect of surface properties on liposomal siRNA delivery. **Biomaterials**, v. 79, p. 56-68, Feb. 2016. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.11.056.

XIANG, B.; JIA, X. L.; QI, J. L.; YANG, L. P.; SUN, W. H.; YAN, X.; YANG, S. K.; CAO, D. Y.; DU, Q.; QI, X. R. Enhancing siRNA-based cancer therapy using a new pH-responsive activatable cell-penetrating peptide-modified liposomal system. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 2385-2405, 2017. DOI: 10.2147/IJN.S129574.

XUE, Hui Yi; LIU, Shimeng; WONG, Ho Lun. Nanotoxicity: a key obstacle to clinical translation of siRNA-based nanomedicine. **Nanomedicine**, London, v. 9, n. 2, p. 295-312, 2014. DOI: 10.2217/nnm.13.204.

YUAN, X. H.; JIN, Z. H. Paracrine regulation of melanogenesis. **Br J Dermatol.**, 2018, Mar, 178 (3): 632-639.

YADAV, A.; GARG, T.; MANDAL, A. K.; CHANDER, R. Quality of life in patients with acquired pigmentation: An observational study. **Journal of cosmetic dermatology**. 2018; 17(6):1293–4. https://doi.org/10.1111/jocd.12686 PMID: 29998547

YI, X.; ZHAO, G.; ZHANG, H.;GUAN, D.; MENG, R.; HANG, Y.; YANG, Q.;JIA, H.; DOU, K.; LIU, C.; QUE, F.; YIN, J.Q. MITF-siRNA formulation is a safe and effective therapy for human melasma. **Mol. Ther**, 19(2), 362–371 (2011).

ZEIDLER, J. D. **Vulnerabilidades específicas de células malignas humanas dependentes de Ras oncogênico: FGF2 e PMA como supressores de tumor** (Tese de Doutorado). Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (Bioquímica). Universidade de são Paulo, Instituto de Química, São Paulo. 2012.

ZHAO, G.; YIN, Q.; MENG, R.; YANG, Q.; JIA, H.; ZHANG, H. Clinical efficacy and safety observation of topical 0.5% MITF-siRNA cream on melasma. **The Chin. J. Dermatovenereol.**, 24(8), 692–695 (2010).

ZYLBERBERG, Claudia; MATOSEVIC, Sandro. Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape. **Drug Delivery**, v. 23, p. 1-11, 2016. DOI: 10.1080/10717544.2016.1177136.

ZHOU, L. L.; BAIBERGENOVA, A. Melasma systematic Review of the systemic treatments**. Int J Dermatol**. 2017 Sep; 56 (9): 902-908. Epud 2017 Feb 27.

ZOLGHADRI, Samaneh *et al*. Targeting tyrosinase in hyperpigmentation: current status, limitations and future promises. **Biochemical Pharmacology**, v. 212, 115574, 2023. DOI: 10.1016/j.bcp.2023.115574.

APÊNDICE I

Artigo Publicado

Miscellaneous

Livia Nascimento Grossi, Wilson Rodrigues Braz, Natália Prado da Silva, Estael Luzia Coelho Cruz Cazarim, Miguel Gontijo Siqueira Palmieri, Guilherme Diniz Tavares and Frederico Pittella*

Ethosomes as delivery system for treatment of melanoma: a mini-review

https://doi.org/10.1515/oncologie-2023-0177
Published online July 13, 2023

Abstract: Many dermatological diseases still do not have an adequate treatment, such as melanoma. The treatments are usually lengthy, complex, with low cure rates and with severe side effects. This leads to low patient compliance, generating recurrence and/or worsening of the disease. Ethosomes, which are phospholipid-based vesicles containing ethanol, have shown great potential as drug delivery systems for the treatment of melanoma and other skin diseases. The unique structure of ethosomes allows for enhanced skin penetration and efficient delivery of therapeutic agents to the target site, improving the efficacy of treatment. The use of ethosomes in melanoma treatment holds promise for overcoming the limitations of conventional therapies, offering the potential for improved patient outcomes, reduced treatment duration, and minimized side effects. In this mini-review we present the advances, challenges, limitations and advantages, and future perspectives of the use of ethosomes in the treatment of the melanoma.

Keywords: ethosomes; lipid vesicular carriers; transdermal delivery; transdermal drug delivery

Introduction

Drug delivery systems are important components in the strategy to carry drugs for the treatment of several diseases, including cancer and other dermatological conditions [1]. Among these, ethosomes are a type of nanocarrier used for topical and transdermal applications because they combine the properties of their organic components (phospholipids and ethanol 20–45 %) to overcome low skin permeability and achieve therapeutic efficacy while reducing adverse effects [2].

Ethosomes

Ethosomes (lipid vesicular carriers) were developed as novel lipid carriers, composed of phospholipids, ethanol, and water (Figure 1). These vesicular systems can be defined as the second generation of liposomes, characterized by greater malleability, stability and ability to trap hydrophilic and hydrophobic molecules. They possess attractive properties in terms of cost-effectiveness and ease of application [3].

Alcohol induces a mechanism in which it interacts with the polar region of the lipid molecules, resulting in a reduction of the melting point of the corneal layer lipids (Figure 2). Due to the fluidizing effect of alcohol on lipids, ethosomes can penetrate the stratum corneum and reach the deeper layers of the skin [4].

Among the techniques for preparing ethosomes, the literature highlights simple and low-cost methods: (I) thin film hydration [5]; (II) mechanical dispersion [6]; (III) a cold method based on dropwise addition of bidistilled water to an ethanol solution [7] and (IV) single-step injection [8].

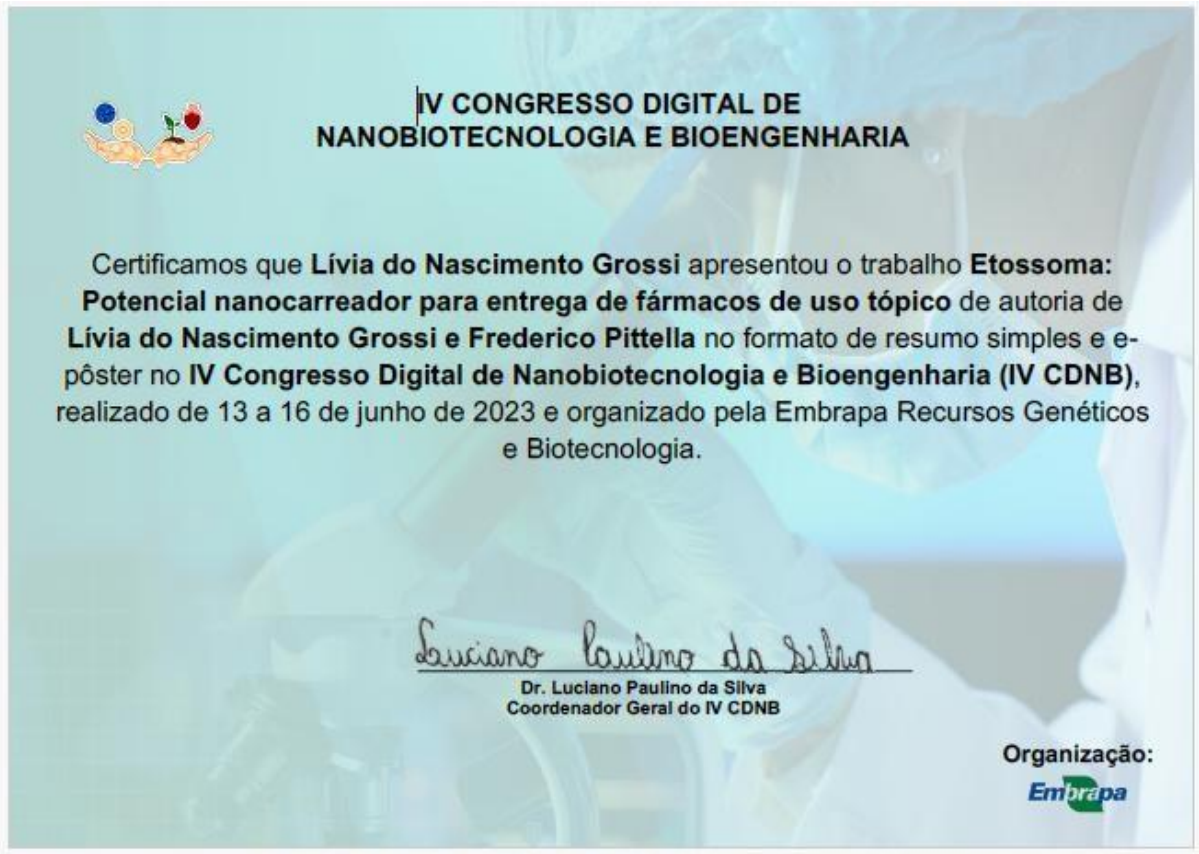
The commercialization of ethosome technology began in 2000 and is an increasingly evolving field. Several commercial products based on ethosomal technology have been developed. These include Nanominox®, a product containing minoxidil, a hair growth promoter, from Sirene of Germany; Supravir® cream, for the treatment of the herpes virus, from Trima of Israel; Cellutight EF®, a topical cream for cellulite, from Hampden Health of the USA; Decorin® cream, an anti-aging cream, from Genome Cosmetics, Pennsylvania, U. S.; the Noicellex®, topical anti-cellulite cream, from Novel Therapeutic Technologies of Israel and

***Corresponding author: Frederico Pittella**, Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil, E-mail: frederico.pittella@ufjf.br. https://orcid.org/0000-0002-7847-9512
Livia Nascimento Grossi, Wilson Rodrigues Braz, Natália Prado da Silva, Estael Luzia Coelho Cruz Cazarim, Miguel Gontijo Siqueira Palmieri and Guilherme Diniz Tavares, Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Juiz de Fora, Juiz de Fora, MG, Brazil

Open Access. © 2023 the author(s), published by De Gruyter. This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License.

APÊNDICE II

Apresentação de trabalho em Congresso



IV CONGRESSO DIGITAL DE NANOBIOTECNOLOGIA E BIOENGENHARIA

Certificamos que **Lívia do Nascimento Grossi** apresentou o trabalho **Etossoma: Potencial nanocarreador para entrega de fármacos de uso tópico** de autoria de **Lívia do Nascimento Grossi e Frederico Pittella** no formato de resumo simples e e-pôster no **IV Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (IV CDNB)**, realizado de 13 a 16 de junho de 2023 e organizado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Luciano Paulino da Silva

Dr. Luciano Paulino da Silva
Coordenador Geral do IV CDNB

Organização:
Embrapa

APÊNDICE III

Apresentação de trabalho em Congresso



V CONGRESSO DIGITAL DE NANOBIOTECNOLOGIA E BIOENGENHARIA

Certificamos que **Livia do Nascimento Grossi** apresentou o trabalho **Etossoma: nanocarreador capaz de incorporar siRNA na modulação da expressão gênica** de autoria de **Lívia do Nascimento Grossi, Wilson Rodrigues Braz, Guilherme Diniz Tavares, Frederico Pittella Silva, Davi Trombini Aleixo, Késia Cristine, Estael Cruz Cazarim** no formato de resumo simples e e-pôster no **V Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (V CDNB)**, realizado de 11 a 14 de junho de 2024 e organizado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia.

Luciano Paulino da Silva

Dr. Luciano Paulino da Silva
Coordenador Geral do V CDNB

Laboratório de Nanobiotecnologia

Embrapa

APÊNDICE IV

Apresentação de trabalho em Congresso

MAIDER KORTAXARENA RUBIO
Euskal Herriko Unibertsitateko Uda Ikastaroen Idazkari Akademikoak **ZIURTATZEN DU**
Secretaria Académica de los Cursos de Verano de la Universidad del País Vasco **CERTIFICA QUE:**

Livia Do Nascimento GROSSI

parte hartu duela
Self-Assembled Hybrid Materials in Nanomedicine: From Non-Viral Vectors to Cancer Therapy and Neurostimulation
kongresuan. 2026(e)ko otsailaren 25 - 2026(e)ko otsailaren 27 an Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitateak antolatzen dituen 43. Uda Ikastaroetan izan da.

Bertan honoko komunikazioa/k eman du/ditu:
Development Of Ethosomes as Nanocarriers for Mitf siRNA in Melasma

Eta hau jasota gera dadin, honako ziurtagiri hau sinatu dut, interesatuak eskatuta.

ha participado en el Congreso
celebrado durante los días 25 de febrero de 2026 - 27 de febrero de 2026 en el marco de la 43 edición de los Cursos de Verano de la Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea..

Ha presentado la/las siguiente/s comunicación/es:

V.º B.º
Onerizia
ZUZENDARI AKADEMIKOA
DIRECTORA ACADÉMICA

IDAZKARI AKADEMIKOA
SECRETARIA ACADÉMICA

Cursos de Verano de la UPV/EHU/Uda Ikastaroak
Miramar Jauregia - Paseo Miramar
Nº Miramón pasealekua 48 | 20007 Donostia / San Sebastián

T. +34 943 21 80 11
info@ulk.eus
www.ulk.eus

Firmado digitalmente por 34065469H ITZIAR AZKUE (R:G20448056)

APÊNDICE V

Artigo publicado

NANOMEDICINE
2025, VOL. 20, NO. 22, 2765–2789
https://doi.org/10.1080/17435889.2025.2567842

Taylor & Francis
Taylor & Francis Group

REVIEW

Check for updates

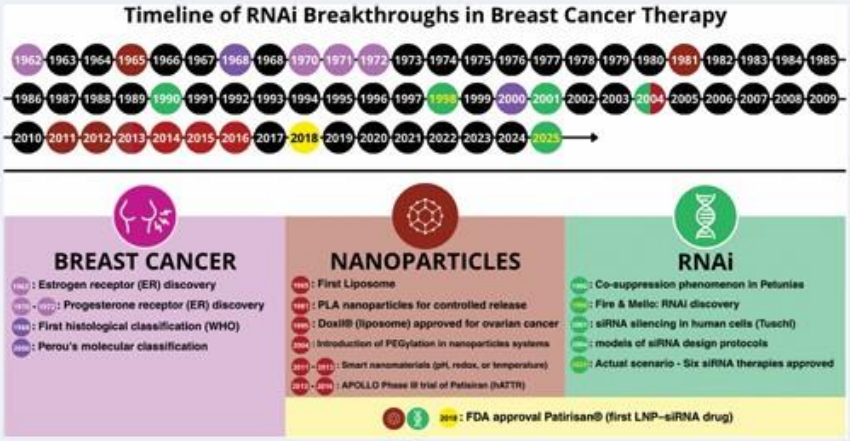
Breakthroughs in the nanoparticle-mediated delivery of siRNA for breast cancer treatment

Davi Trombini Aleixo [a], Estael L.C. Cruz-Cazarim [a], Kezia C.B. Ferreira [a], Lívia N. Grossi [a], Wilson R. Braz [a], Natália P. Silva [a], Fábio Pittella-Silva [b], Marina F. Dias [c], Silvia L. Fialho [c], Guilherme D. Tavares [a] and Frederico Pittella [a]

[a]Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Juiz de Fora (UFJF), Juiz de Fora, Brazil; [b]Laboratory of Molecular Pathology of Cancer, Faculty of Healthy Sciences, University of Brasília (unB), Brasília, Brazil; [c]Pharmaceutical Research and Development, Ezequiel Dias Foundation, Belo Horizonte, Brazil

ABSTRACT

Although breast cancer treatments have improved, challenges like tumor heterogeneity and drug resistance remain. RNA interference (RNAi), especially through small interfering RNA (siRNA), is a promising strategy to silence specific genes and improve clinical outcomes. However, the clinical translation of siRNA has been limited by barriers related to stability, biodistribution, cellular uptake, among others. Nanoparticle-based delivery systems have emerged as transformative platforms to address these limitations, enhancing siRNA protection, targeting, and intracellular release. This review discusses the major breakthroughs in nanoparticle-mediated siRNA delivery for breast cancer treatment, focusing on how innovations in nanocarrier design have enhanced siRNA stability, targeting, and therapeutic efficacy. We highlight key characteristics in RNA interference mechanisms, the evolution of computational tools for optimizing siRNA design, and the approval of RNAi-based therapies that laid the foundation for oncologic applications. Special emphasis is given to the development of lipid, polymeric, and inorganic nanoparticles engineered for efficient siRNA delivery, their role in overcoming drug resistance when combined with conventional therapies, and the current progress of clinical trials against solid tumors. By integrating nanotechnology and RNAi, these breakthroughs offer new opportunities for precise, durable, and personalized strategies in breast cancer treatment, with the potential to transform the current therapeutic landscape.



ARTICLE HISTORY
Received 23 June 2025
Accepted 25 September 2025

Keywords
breast cancer; RNA interference; nanoparticles; targeted therapy; siRNA breakthroughs; siRNA delivery