

RESUMO

INTRODUÇÃO: A ulvana é um polissacarídeo sulfatado extraído de algas marinhas verdes, reconhecido pelas funções estrutural, lubrificante, antioxidante e anti-inflamatória. A ulvana é constituída por unidades dissacarídicas de ácido glucorônico unido a ramnose 3-sulfato por ligações do tipo α 1→4, formando um biopolímero de elevada massa molar. O padrão molecular repetitivo de sua estrutura origina epítomos funcionais que podem ser utilizados como alvos específicos para a ligação com receptores CD44 em tecidos epiteliais inflamados e células tumorais.

OBJETIVO: Preparar e caracterizar nanoestruturas híbridas na forma lipossomal, funcionalizadas com ulvana, com e sem DATK32-PE. **MÉTODOS:** A ulvana foi extraída da *Ulva ohnoi* e caracterizada por técnicas físico-químicas. Os lipossomas catiônicos (LCs) vazios, os LCs incorporados com o anticorpo monoclonal DATK32-PE, os LCs funcionalizados com ulvana e os LCs incorporados com DATK32-PE e funcionalizados com ulvana foram preparados e, em seguida, caracterizados por técnicas físicas e físico-químicas: calorimetria exploratória diferencial (DSC), espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR), espalhamento dinâmico de luz (DLS), espalhamento de luz por análise de fase (PALS), avaliação da estabilidade, criomicroscopia eletrônica de transmissão (CRYO-EM), microscopia confocal de varredura a laser (LSCM), espectrometria de fluorescência e estudos de citotoxicidade. **RESULTADOS:** Os LCs vazios e os LCs incorporados com DATK32-PE apresentam diâmetro hidrodinâmico (DH) \approx 70 nm, índice de polidispersidade (IPD) \approx 0,100 e potencial zeta (PZ) $>$ +30 mV, enquanto, os LCs funcionalizados com ulvana e LCs incorporados com DATK32-PE e funcionalizados com ulvana apresentam DH $<$ 200 nm, IPD $<$ 0,300 e PZ próximo de +30 mV. Todos os lipossomas preparados são mais estáveis quando armazenados sob refrigeração (4 – 8 °C). A adição do DATK32-PE e da ulvana não alterou o comportamento térmico dos LCs. Os resultados de FTIR mostraram as modificações no espectro ocasionadas pela ligação entre a ulvana e o 1,2-dioleoil-3-trimetilamônio-propano (DOTAP) presente nos LCs. A CRYO-EM mostrou as características da superfície dos lipossomas, e o surgimento de rugosidades e a modificação do formato dos LCs após a incorporação do DATK32-PE e a funcionalização com a ulvana. A eficiência de encapsulação do DATK32-PE nos LCs incorporados com DATK32-PE foi igual a $41,8 \pm 4,9\%$. Nos estudos de citotoxicidade, as células cancerígenas de fibroblasto humano tratadas com os LCs

funcionalizados com ulvana e os LCs incorporados com DATK32-PE e funcionalizados com ulvana apresentaram viabilidade celular de $60,4 \pm 5,6 \%$ e $57,6 \pm 7,0\%$, respectivamente. **CONCLUSÃO:** A análise dos resultados mostrou que as metodologias utilizadas foram eficientes para a preparação das formulações lipossômicas. As técnicas utilizadas na caracterização dos lipossomas comprovaram que os LCs incorporados com DATK32-PE e funcionalizados com ulvana têm potencial aplicação como sistemas de liberação de DATK32-PE na mucosa intestinal inflamada, uma vez que apresentaram estabilidade em temperatura fisiológica ($37 \text{ }^\circ\text{C}$) durante o tempo necessário para que os lipossomas alcancem a mucosa intestinal (menos de 24 h). Os estudos de citotoxicidade indicaram a necessidade de utilizar concentrações maiores das formulações lipossômicas em estudos futuros, com o intuito de aumentar a citotoxicidade celular contra linhagens celulares cancerígenas.

Palavras-chave: Ulvana. Lipossomas catiônicos. Nanoestruturas híbridas. Anticorpo monoclonal.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Ulvan is a sulfated polysaccharide extracted from green seaweed, recognized for its structural, lubricating, antioxidant and anti-inflammatory functions. Ulvan consists of disaccharide units of glucuronic acid linked to rhamnose 3-sulfate by α 1 \rightarrow 4 type bonds, forming a biopolymer with a high molar mass. The repetitive molecular pattern of its structure originates functional epitopes that can be used as specific targets for binding to CD44 receptors in inflamed epithelial tissues and tumor cells. **OBJECTIVE:** Prepare and characterize hybrid nanostructures in liposomal form, functionalized with ulvan, with and without DATK32-PE. **METHODS:** Ulvan was extracted from *Ulva ohnoi* and characterized using physicochemical techniques. Empty cationic liposomes (CLs), CLs incorporated with DATK32-PE monoclonal antibody, CLs functionalized with ulvan, and CLs incorporated with DATK32-PE and functionalized with ulvan were prepared and then characterized by physical and physical techniques. chemicals: differential scanning calorimetry (DSC), Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), dynamic light scattering (DLS), phase analysis light scattering (PALS), stability assessment, transmission electron cryomicroscopy (CRYO-EM), laser scanning confocal microscopy (LSCM), fluorescence spectrometry and cytotoxicity studies. **RESULTS:** Empty CLs and CLs incorporated with DATK32-PE have hydrodynamic diameter (DH) \approx 70 nm, polydispersity index (IPD) \approx 0.100 and zeta potential (PZ) $>$ +30 mV, while CLs functionalized with ulvan and incorporated LCs with DATK32-PE and functionalized with ulvan have DH $<$ 200 nm, IPD $<$ 0.300 and PZ close to +30 mV. All prepared liposomes are more stable when stored under refrigeration (4 – 8 °C). The addition of DATK32-PE and ulvan did not change the thermal behavior of the CLs. The FTIR results showed the changes in the spectrum caused by the bond between ulvan and 1,2-dioleoyl-3-trimethylammonium-propane (DOTAP) present in CLs. CRYO-EM showed the characteristics of the surface of the liposomes and the appearance of roughness and the modification of the shape of the CLs after the incorporation of DATK32-PE and functionalization with ulvan. The encapsulation efficiency of DATK32-PE in CLs incorporated with DATK32-PE was equal to $41.8 \pm 4.9\%$. In cytotoxicity studies, human fibroblast cancer cells treated with CLs functionalized with ulvan and CLs incorporated with DATK32-PE and functionalized with ulvan showed cell viability of $60.4 \pm 5.6\%$ and $57.6 \pm 7.0\%$, respectively. **CONCLUSION:** Analysis of the results showed that the methodologies

used were efficient for the preparation of liposomal formulations. The techniques used in the characterization of liposomes proved that CLs incorporated with DATK32-PE and functionalized with ulvan have potential application as DATK32-PE release systems in inflamed intestinal mucosa, since they showed stability at physiological temperature (37 °C) during the time required for the liposomes to reach the intestinal mucosa (less than 24 h). Cytotoxicity studies indicated the need to use higher concentrations of liposomal formulations in future studies, in order to increase cellular cytotoxicity against cancerous cell lines.

Keywords: Ulvan. Cationic liposomes. Hybrid nanostructures. Monoclonal antibody.