



Avaliação de técnica microfluídica para a associação entre lipossomas catiônicos e ovoalbumina com potencial aplicação para o tratamento de alergias

Palavras-Chave: Lipossoma, Microfluídica, Nanotecnologia, Imunoterapia

Autores(as):

Davi Bonifácio Freitas, FEQ – UNICAMP

Maria Fernanda Ferreira, FEQ - UNICAMP

Matheus Augusto Silva Santos, FEQ - UNICAMP

Prof^a. Dr^a. Lucimara Gaziola de La Torre (orientadora), FEQ- UNICAMP

1. Resumo

Este projeto tem como objetivo a produção, através da rota microfluídica, de nanoestruturas lipídicas catiônicas, os lipossomas, bem como sua associação com a ovoalbumina (OVA), visando a aplicação na área médica como um modelo de alergia experimental para futuras aplicações em vacinas.

2. Introdução

A microfluídica é uma área da ciência multidisciplinar que explora volumes extremamente pequenos, em miniatura de sistemas, abrindo portas para diversas aplicações, como por exemplo para a síntese de nanopartículas (WHITESIDES, 2006). Quando se reduz à escala micrométrica, o regime de escoamento nos canais do sistema se torna laminar, com mistura, ocorrendo predominantemente por difusão (BEEBE; MENSING; WALKER, 2002; CONVERY; GADEGAARD, 2019; WHITESIDES, 2006).

A OVA é uma proteína que corresponde a 54% do conteúdo proteico presente na clara do ovo, tendo utilização ampla na indústria alimentícia e na composição de vacinas, como por exemplo a vacina contra o vírus influenza (HU et al, 2016 e CAUBET, et al, 2011). É responsável por causar reações alérgicas, sendo a segunda alergia mais comum em crianças, estando atrás somente das reações causadas pelo leite (CAUBET, et al, 2011).

Devido ao seu potencial alergênico, uma boa estratégia seria a utilização da OVA no desenvolvimento de técnicas imunoterápicas. A imunoterapia é um método de tratamento que baseia-se na exposição do paciente ao alérgeno repetidamente, com doses sofrendo aumento gradativo, induzindo a reação alérgica. Entretanto, este tratamento cria um potencial para o desenvolvimento de uma anafilaxia, podendo ser fatal para o alérgico (ALBERCA-CUSTODIO, 2020). Uma alternativa para minimizar o risco de anafilaxia é a utilização de OVA associada com lipossomas. (ALBERCA-CUSTODIO, 2020).

Lipossomas são sistemas coloidais formados por lipídios de caráter anfifílico, que, em meio aquoso, são capazes de se auto-organizar em bicamadas aproximadamente esféricas, formando um núcleo aquoso. Essa auto-agregação é resultado de um balanço das forças de atração e repulsão das moléculas, em estrutura similar à membrana das células (de la TORRE; de PINHO, 2015).

Estudos na área de produção de lipossomas foram realizados e descobriu-se que ao utilizar sistemas microfluídicos em corrente contínua, é possível observar a formação de lipossomas no tamanho ideal para as aplicações médicas, sendo possível reduzir etapas de pós processamento (Balbino et al., 2013).

Sendo assim, este estudo irá explorar a produção de nanopartículas de lipídio “Lipo_{DOTAP}”, bem como suas possíveis interações com a OVA, com o objetivo de avançar no desenvolvimento da imunoterapia.

3. Materiais e Métodos

3.1 Produção de dispositivo microfluídico (HFR-MD):

O dispositivo microfluídico foi construído utilizando-se o polímero polidimetilsiloxano (PDMS), material comumente utilizado nesta área do conhecimento. O procedimento de fabricação se baseou na metodologia proposta por Firmino et al. (2021) para a fabricação do micromisturador helicoidal baseado em advecção caótica *High Flow Rate 3D Microfluidic device* (HFR-MD).

3.2 Produção dos lipossomas em sistemas microfluídicos

A síntese dos lipossomas foi realizada utilizando o processo microfluídico com o dispositivo HFR-MD. As correntes laterais foram compostas por tampão fosfato-salino (PBS), e a central de solução lipídica (lipídio 1,2-Dioleoil-3-trimetilamônio propano (DOTAP) solubilizado em etanol anidro na concentração de 10 mg/ml, preparado em ambiente estéril). Os parâmetros adotados para a síntese foram: FRR 3 (razão entre o somatório das correntes laterais pela corrente central) e TFR 5 (vazão total). O processo foi acompanhado utilizando o microscópio invertido da Nikon, modelo ECLIPSE Ti-U e bombas seringas modelo PHD2000 (Infuse/Withdraw), da Harvard Apparatus. Após a formação e a coleta das amostras, os lipossomas foram armazenados em microtubo tipo *ependorf* sob refrigeração por 24h para posteriores caracterizações físico-químicas.

3.3 Caracterização Físico-Química dos lipossomas

3.3.1 Diâmetro Hidrodinâmico Médio e Índice de Polidispersidade:

O diâmetro hidrodinâmico médio e o índice de polidispersidade (PDI) das nanoestruturas foram medidos utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, WORCS, Reino Unido) através da técnica de espalhamento dinâmico de luz (em inglês DLS - Dynamic Light Scattering). As medidas foram realizadas utilizando laser He-Ne a 633 nm, com detecção em ângulo de espalhamento de 173° (backscattering). Cada medida de cada amostra foi realizada em triplicata e os valores obtidos foram utilizados para obter o tamanho médio das partículas em termos de número.

3.3.2 Potencial Zeta

O potencial zeta dos lipossomas foi obtido em triplicata de leitura para cada amostra, em PBS à temperatura ambiente, utilizando o equipamento Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, WORCS, Reino Unido).

3.4 Estudo da associação de Lipo_{DOTAP} com a OVA em processo bulk

Foram adicionados ao eppendorf, em processo *bulk* (regime batelada em escala laboratorial, especificamente com a utilização de micropipetas), as soluções contendo lipossoma e OVA, nesta ordem, em diferentes concentrações e proporções mássicas, em seguida realizada uma agitação vórtex, para posterior avaliação do efeito das mesmas sobre a associação de ambas estruturas, fazendo as devidas caracterizações.

4. Resultados e Discussão

4.1 Caracterizações individuais:

Foram realizadas as caracterizações tanto de diâmetro, quanto de potencial zeta das amostras individuais de lipossoma e OVA, e foram registrados na Figura 4.1.

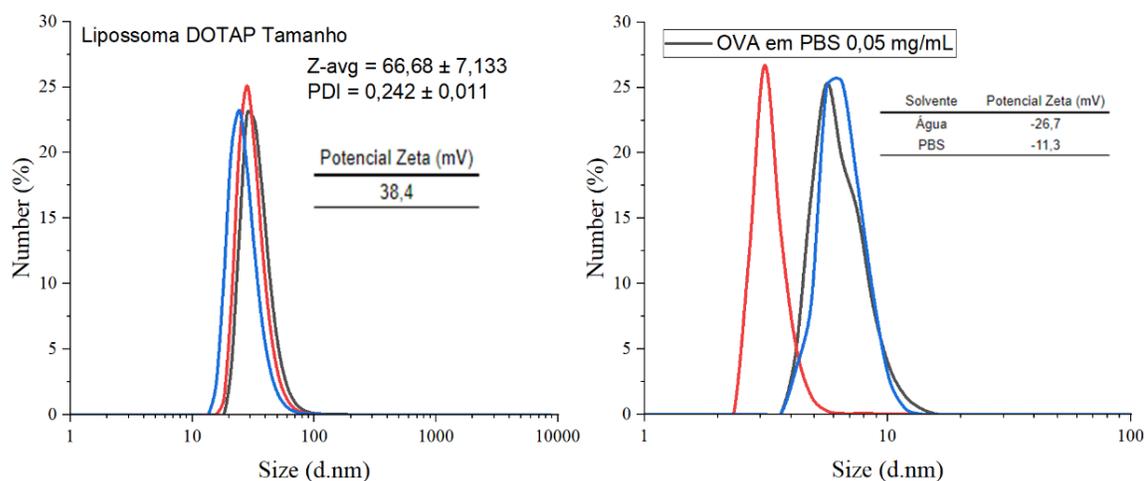


Figura 4.1 - Média de tamanho, polidispersidade e potencial zeta do lipossoma DOTAP e da proteína, feitos em triplicata de processo independentes.

Observa-se que o lipossoma possui uma baixa polidispersidade, o que evidencia a reprodutibilidade do processo, ademais, seu diâmetro médio é de 66,68 nm e seu potencial zeta é de 38,4 mV. Já a OVA, através

de repetidas análises com baixa qualidade de leitura, foi visto que seu tamanho em número está situado por volta de 10 nm e seu zeta por volta de -11 mV.

4.2 Associação LipoDOTAP-OVA em Bulk

Foi investigada a associação de lipossomas com a OVA, testando e caracterizando-a quanto ao tamanho e potencial zeta, utilizando o DLS. Este processo foi realizado em “*bulk*” utilizando *eppendorf*, variando as proporções entre 1:0,05 a 1:1 (proporções mássicas de lipossoma/OVA) e observando como esta influencia as propriedades como o diâmetro médio e o potencial Zeta.

Observou-se que, ao variar a proporção mássica de lipossoma e OVA, existe uma correlação entre essa proporção e o potencial zeta. À medida que a concentração de OVA diminui, a carga do lipossoma predomina, enquanto, com o aumento de OVA, o potencial zeta apresenta uma redução. Em relação ao tamanho das partículas, constatou-se que, ao aumentar a quantidade de OVA, não foi possível obter qualidade de leitura, com os tamanhos das partículas ultrapassando a escala nanométrica. No entanto, foi possível obter leituras de qualidade com uma baixa proporção mássica de 1:0,1 e 1:0,05 (lipossoma:OVA). Como é possível observar na Figura 4.2, há indícios de uma associação devido ao aumento de tamanho do lipossoma em relação ao seu tamanho inicial, além de uma diminuição do valor do potencial Zeta como visto na Tabela 4.1.

Estas mudanças estão congruentes com as características físicas de cada componente da associação, dado que a OVA possui valor de potencial negativo, ao se associar com o lipossoma positivo, o potencial total da solução diminuiu.

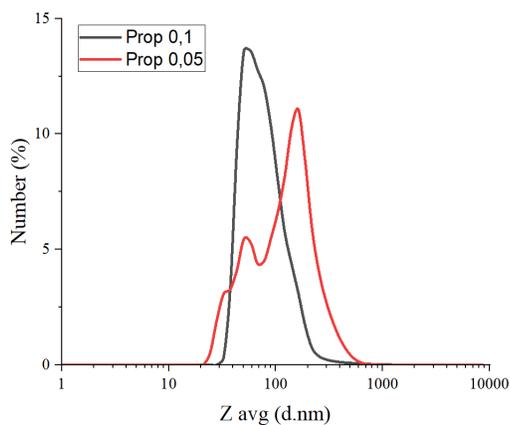


Figura 4.2 - Média do tamanho do lipossoma DOTAP associado com a OVA, nas proporções a) 0,1 e b) 0,05, realizados em triplicata de processos independentes.

Proporção	Potencial Zeta (mV)
OVA	-11,3
1	6,3
0,5	19,5
0,4	21,0
0,3	21,5
0,25	21,8
0,2272	21,9
0,2	22,1
0,15	23,2
0,1	24,1
0,05	26,7
Lipossoma	38,4

Tabela 4.1 - Média do potencial Zeta nas diferentes proporções testadas, feito em triplicata de processos independentes.

5. Conclusão

A presente pesquisa demonstrou a eficácia da técnica microfluídica na produção e caracterização de lipossomas catiônicos associados à ovoalbumina (OVA) para aplicações médicas. Foi possível produzir lipossomas com diâmetro médio de 66,68 nm e potencial zeta de 38,4 mV, evidenciando baixa polidispersidade e alta reprodutibilidade. A associação com a OVA, testada em diferentes proporções mássicas, mostrou que menores quantidades de OVA (1:0,1 e 1:0,05) resultam em associações mais estáveis, com aumento no tamanho dos lipossomas e redução do potencial zeta. Esses resultados indicam que a técnica microfluídica é promissora para a produção de lipossomas aplicados à imunoterapia.

6. Bibliografia

- ALBERCA-CUSTODIO R. W. et al. Allergen-Specific Immunotherapy With Liposome Containing CpG-ODN in: Murine Model of Asthma Relies on MyD88 Signaling in Dendritic Cells. *Frontiers in Immunology*, v.11 , p.692 , abr. 2020.
- BALBINO, T. A. et al. Continuous flow production of cationic liposomes at high lipid concentration in microfluidic devices for gene delivery applications. *Chemical Engineering Journal*, v. 226, p. 423–433, jun. 2013.
- BEEBE, D. J.; MENSING, G. A.; WALKER, G. M. Physics and Applications of Microfluidics in Biology. *Annual Review of Biomedical Engineering*, v. 4, n. 1, p. 261–286, ago. 2002.
- CAUBET, Jean-Christoph; WANG, J. Current understanding of egg allergy. *Pediatr. Clin. North Am., USA*, v. 58, n. 2, p. 427-443, Abr. 1, 2011
- de la TORRE L. G. & de PINHO S. C. Lipid Matrices for Nanoencapsulation in Food: Liposomes and Lipid Nanoparticles. In: HERNANDES-SANCHES H. & GUTIÉRREZ-LOPEZ G. F. *Food Nanoscience and Nanotechnology*. Washington State University, USA p 100-103, 2015