



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



Campus de Araraquara

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

STÉPHANIE ROCHETTI DO AMARAL

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ENSAIOS
BIOLÓGICOS *IN VITRO* DE NANOCÁPSULAS DE QUINIZARINA
PARA USO EM TERAPIA FOTODINÂMICA COM POTENCIAL DE
APLICAÇÃO EM DOENÇAS INFLAMATÓRIAS**

ARARAQUARA, SP

2023



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



Campus de Araraquara

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia

Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

STÉPHANIE ROCHETTI DO AMARAL

**DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ENSAIOS
BIOLÓGICOS *IN VITRO* DE NANOCÁPSULAS DE QUINIZARINA
PARA USO EM TERAPIA FOTODINÂMICA COM POTENCIAL DE
APLICAÇÃO EM DOENÇAS INFLAMATÓRIAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Lucas Primo

ARARAQUARA, SP

2023

A485d Amaral, Stéphanie Rochetti do.
Desenvolvimento, caracterização e ensaios biológicos *in vitro* de nanocápsulas de quinizarina para uso em terapia fotodinâmica com potencial de aplicação em doenças inflamatórias / Stéphanie Rochetti do Amaral. – Araraquara, 2023.
78 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Fernando Lucas Primo.

1. Quinizarina. 2. Nanocápsulas. 3. Fotodinâmica. 4. Nanotecnologia. 5. Psoríase. I. Primo, Fernando Lucas, orient. II. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas

CAPES: 33004030078P6

Esta ficha não pode ser modificada



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Campus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título da Dissertação: DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E ENSAIOS BIOLÓGICOS IN VITRO DE NANOCÁPSULAS DE QUINIZARINA PARA USO EM TERAPIA FOTODINÂMICA COM POTENCIAL DE APLICAÇÃO EM DOENÇAS INFLAMATÓRIAS

Autora: Stéphanie Rochetti do Amaral

Orientador: Prof. Dr. Fernando Lucas Primo

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS, área de conhecimento: Farmácia.

Prof. Dr. Fernando Lucas Primo

Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Câmpus de Araraquara.

Prof. Dr. Marigilson Pontes de Siqueira Moura

Colegiado Acadêmico de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Vale do São Francisco – Câmpus Petrolina

Profa. Dra. Carla Raquel Fontana

Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Câmpus de Araraquara.

Araraquara, 13 de Dezembro de 2023.

RESUMO

A psoríase consiste em uma doença cutânea inflamatória crônica, com mecanismos imunopatogênicos complexos, sendo caracterizada pela hiperproliferação de queratinócitos, responsáveis pelo desenvolvimento das lesões cutâneas características. Contudo, os tratamentos utilizados atualmente não proporcionam ação direcionada, sendo desejável o desenvolvimento de terapias mais específicas. No presente trabalho foram desenvolvidas nanocápsulas contendo Quinizarina (NC/QZ) avaliando sua ação em modelo de processo inflamatório *in vitro* com ação da TFD. Os nanomateriais foram desenvolvidos através da técnica da deposição interfacial e caracterizados através da técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz, os quais apresentaram características físico-químicas características e estáveis durante o período de análise. A incorporação da Quinizarina não provocou alterações no perfil fotofísico do fotossensibilizador, sendo possível a observação dos grupamentos químicos da molécula por meio da espectroscopia de FTIR. A quantificação realizada mostrou uma taxa de incorporação de 99% para o ativo associado ao nanocarreador. Os estudos de viabilidade preliminares com células NIH/3T3 mostraram ausência de citotoxicidade para a formulação de NC/QZ nas concentrações de 2,5, 5 e 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, QZ livre (50 e 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e na NC/Vazia a 50% (v/v). A permeação do nanomaterial observada em modelo de matriz extracelular e pele de porco apresentou resultados promissores, permeando todas as camadas analisadas. O estudo de *uptake celular* mostrou uma maior internalização celular no composto nanoencapsulado quando comparado com a sua forma livre. O estudo de viabilidade celular com células HaCaT apresentou toxicidade apenas na concentração mais elevada (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A indução do processo inflamatório *in vitro* foi desenvolvida adequadamente, onde foi possível observar a expressão de citocinas importantes no processo inflamatório. O tratamento realizado com TFD foi altamente eficiente quando comparado com a ledterapia e nanofármacos isolados. A partir dos resultados obtidos é possível indicar que o nanomaterial desenvolvido apresenta parâmetros físico-químicos satisfatórios, além de não apresentar citotoxicidade nas concentrações citadas, evidenciando sua biocompatibilidade *in vitro*, sendo observado que a nanotecnologia proporcionou uma maior internalização celular do ativo, resultando em uma ação direcionada, ainda, a TFD se mostrou um potencial candidato no tratamento de doenças autoimunes, diminuindo a concentração de citocinas no modelo inflamatório *in vitro*, possibilitando assim, experimentos subsequentes direcionados à terapias específicas.

Palavras-chave: quinizarina; nanocápsulas; fotodinâmica; nanotecnologia; psoríase.

ABSTRACT

Psoriasis constitutes a chronic inflammatory skin disease with complex immunopathogenic mechanisms which is characterized by the hyperproliferation of keratinocytes, responsible for the development of characteristic skin lesions. Currently used treatments, however, do not provide targeted action and the development of more specific therapies is desirable. In this study, nanocapsules containing Quinizarin (NC/QZ) were developed, and their action evaluated in an in vitro inflammatory process model with PDT action. The nanomaterials were developed using the interfacial deposition technique and characterized using the Dynamic Light Scattering technique, which showed characteristic and stable physicochemical characteristics during the analysis period. The incorporation of quinizarin did not cause any changes to the photophysical profile of the photosensitizer, and it was possible to observe the chemical groups of the molecule using FTIR spectroscopy. Quantification showed an incorporation rate of 99% for the active ingredient associated with the nanocarrier. Preliminary viability studies with NIH/3T3 cells showed no cytotoxicity for the NC/QZ formulation at concentrations of 2.5, 5 and 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, free QZ (50 and 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) and NC/empty at 50% (v/v). The permeation of the nanomaterial observed in an extracellular matrix model and pig skin showed promising results, permeating all the layers analyzed. The cellular uptake study showed greater cellular internalization of the nanoencapsulated compound when compared to its free form. The cell viability study with HaCaT cells showed toxicity only at the highest concentration (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). The inflammatory process was properly induced in vitro, where it was possible to observe the expression of important cytokines in the inflammatory process. The treatment carried out with PDT was highly efficient when compared to LED therapy and nanopharmaceuticals alone. Based on the results obtained, it is possible to indicate that the nanomaterial developed has satisfactory physical-chemical parameters, as well as not showing cytotoxicity at the concentrations mentioned, demonstrating its biocompatibility in vitro, and it was observed that nanotechnology provided greater cellular internalization of the active ingredient, resulting in a targeted action. Furthermore, PDT proved to be a potential candidate in the treatment of autoimmune diseases, reducing the concentration of cytokines in the inflammatory model in vitro, thus enabling subsequent experiments aimed at specific therapies.

Keywords: quinizarin; nanocapsules; photodynamic; nanotechnology; psoriasis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 Psoríase	19
2.2 Terapia Fotodinâmica.....	22
2.3 Fotossensibilizadores (FS).....	24
2.4 Nanotecnologia e Nanocarreadores.....	27
3. OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo Geral	29
3.2 Objetivos Específicos	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.2 Protocolo de preparo das nanocápsulas	30
4.3 Determinação do tamanho de partícula e potencial Zeta.....	30
4.4 Análise da superfície topográfica por Microscopia de Força Atômica (MFA) ...	31
4.5 Análise espectroscópica de absorção no infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR.....	31
4.6 Espectros de absorção e emissão no UV/VIS	32
4.7 Método espectroanalítico para quantificação da Quinizaria: Curva analítica ...	32
4.8 Quantificação de QZ em NC/QZ: Taxa de associação do fotossensibilizador .	33
4.9 Cultivo celular.....	33
4.10 <i>Uptake Celular</i>	34
4.11 Ensaio de viabilidade celular - método fotocolimétrico aplicando Resazurina	35
4.12 Permeação em matriz extracelular para impressão de equivalente de pele 3D e em pele de porco	37
4.13 Indução do processo inflamatório em células HaCaT e aplicação da Terapia Fotodinâmica	39
4.14 Ensaio Imunoenzimático – ELISA	40
5. RESULTADOS	42
5.1 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersidade, potencial Zeta e estudo de estabilidade	42
5.2 Análise por Microscopia de Força Atômica (MFA)	44
5.3 Determinação do espectro de absorção no infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR.....	45
5.4 Determinação dos espectros de absorção e emissão de fluorescência 2D e 3D UV/Vis no estado estacionário	46

5.4 Desenvolvimento do método espectro-analítico.....	50
5.5 Quantificação do teor de encapsulação da Quinizarina na nanocápsula.....	51
5.6 Ensaio de citotoxicidade - Método fotolorimétrico utilizando Resazurina em linhagem de células de fibroblasto de murinho NIH/3T3.....	51
5.7 Permeação das NC/QZ em MEC de equivalente dérmico e em pele de porco	53
5.8 Determinação do tempo de internalização (<i>Uptake</i> celular).....	55
5.9 Ensaio de citotoxicidade - Método fotolorimétrico utilizando Resazurina em linhagem de células de queratinócitos humano (HaCaT).....	57
5.10 Indução do processo inflamatório em queratinócitos humanos com aplicação de Terapia Fotodinâmica e posterior Ensaio Imunoenzimático.....	58
6. DISCUSSÃO.....	61
7. CONCLUSÕES.....	69
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração do modelo patogênico baseado no eixo IL-23/IL-17 induzindo o desenvolvimento do fenótipo da psoríase. O eixo IL-23/IL-17 encontra-se destacado em vermelho, enquanto outros sinais imunológicos se encontram em azul. IFN: interferon; IL: interleucina; KC: queratinócito; mDC: células dendríticas mielóides; TNF: fator de necrose tumoral; ILC3: células linfoides inatas. Fonte: Adaptado de CHIRICOZZI, et al., 2018.	21
Figura 2. Ilustração sistemática dos mecanismos de reação da TFD. Fonte: Adaptado de KWIATKOWSKI, et al., 2018.	24
Figura 3. Estrutura química da Quinizarina (1,4 di-hidroxi-antraquinona). Fonte: autora.....	27
Figura 4. Representação esquemática do ensaio de citotoxicidade em células NIH/3T3, a partir do desenho experimental empregando- se uma microplaca de 96 poços, através do método fotolorimétrico da Resazurina. Fonte: Autora.....	36
Figura 5. Representação esquemática do ensaio de citotoxicidade em células HaCaT, a partir do desenho experimental empregando- se uma microplaca de 96 poços, através do método fotolorimétrico da Resazurina. Fonte: Autora.....	37
Figura 6. Representação esquemática da matriz extracelular (MEC) desenvolvida pelo método de manufatura aditiva suspensa, com a presença de três camadas da pele: Camada Papilar, Camada Reticular e Hipoderme compostas por colágeno e pectina como bioink, nas respectivas proporções 2:1, 2:1 e 1:1. Fonte: Autora.....	38
Figura 7. Representação esquemática do ensaio de indução do processo inflamatório em células HaCaT onde, CT= Controle; LPS: Lipopolissacarídeo; LED = dose de irradiação de 10 J.cm^{-2} ; D1 = NE/QZ dose de irradiação de 1 J.cm^{-2} ; D2 = NE/QZ dose de irradiação de 5 J.cm^{-2} ; D3 = NE/QZ dose de irradiação de 10 J.cm^{-2} ; CF = Controle de formulação sem irradiação (NE/QZ $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Fonte: Autora.....	40
Figura 8. Estudo de estabilidade monitorando-se o tamanho de partículas, Pdl (A) e potencial Zeta (B) em função do tempo para NC/Vazia.....	43
Figura 9. Estudo de estabilidade monitorando-se o tamanho de partículas, Pdl (A) e potencial Zeta (B) em função do tempo para NC/QZ.	43
Figura 10. Fotomicrografia bidimensional das NC/QZ obtido através da técnica de MFA (A) e histograma evidenciando a distribuição de tamanho obtido por método do DLS (B) das NC/Vazia (cinza) e NC/QZ (preto).	44
Figura 11. Espectro de absorção no Infravermelho por Transformada de Fourier para a QZ livre, NC/QZ e NC/Vazia, utilizando como background o ar.....	45
Figura 12. Espectro de absorção no UV/Vis da NC/QZ em meio orgânico homogêneo acetonitrila (NC/ACN) e da QZ no respectivo meio (QZ/ACN), com máximo de absorção em 477 nm, onde A: análise padrão e B: análise normalizada.	47
Figura 13. Espectro de emissão de fluorescência 2D no UV/Vis da NC/QZ e da QZ em meio homogêneo acetonitrila (QZ/ACN), apresentando comprimento de onda de excitação em 470 nm, emissão 568 nm e fendas espectrais 3,0/3,0 nm respectivamente, onde A: análise padrão e B: análise normalizada.	47
Figura 14. Espectro de emissão de fluorescência 3D no UV/Vis da QZ livre em meio homogêneo acetonitrila (QZ/ACN), apresentando comprimento de onda de excitação entre 400 – 550nm , emissão entre 525 – 679nm e fendas espectrais 1,5/3,0 nm respectivamente.	48

Figura 15. Espectro de emissão de fluorescência 3D no UV/Vis da NC/QZ livre em meio homogêneo acetonitrila, apresentando comprimento de onda de excitação entre 400 – 550nm , emissão entre 525 – 679nm e fendas espectrais 1,5/3,0 nm respectivamente.....	48
Figura 16. Curva de espectro de absorção de QZ livre em 477 nm correlacionando a máxima absorção e a concentração em ACN variando de 2 – 14 µg.mL ⁻¹ com equação da reta $y = 0,0377x - 0,0013$, $R = 1$	50
Figura 17. Ensaio de Citotoxicidade in vitro de NC/QZ, NC/Vazia e QZ livre em linhagens de fibroblastos de murino NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658) nas concentrações de 2,5; 5; 15; 25; 50; 70 µg.mL ⁻¹ (NC/QZ), NC/Vazia a 50% (v/v) e QZ livre nas concentrações de 50 e 70 µg.mL ⁻¹ . Foi determinado significância estatística através do teste de análise de variância One-way ANOVA, com 95% de significância, seguido de pós teste Tukey para múltiplas comparações (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).	52
Figura 18. Design da Matriz Extracelular (MEC) desenvolvida: (i) ilustração sistemática do posicionamento da MEC junto com acessório (iii) utilizado para concentrar a amostra somente na parte superior. (iii) Modelo desenvolvido através do método layer by layer formando as seguintes camadas: Camada Papilar (CP 2:1 Colágeno:Pectina), Camada Reticular (CR 2:1 Colágeno:Pectina) e Hipoderme (H 1:1 Colágeno:Pectina).	53
Figura 19. Ensaio para análise de intensidade de fluorescência em Matriz Extracelular (MEC) em cortes transversais, onde A: Análise realizada em leitor de microplacas, sendo determinado o sinal de fluorescência direto (i) com excitação e emissão em 470nm/568nm respectivamente, tanto do controle somente com DMEM (ii) e das NC/QZ (15µg/mL) (iii) e B: Imagem das MEC internalizadas com NC/QZ (15µg/mL) obtidas na faixa de emissão de fluorescência da GFP através do microscópio EVOS M5000.....	54
Figura 20. Ensaio para análise de intensidade de fluorescência em cortes transversais de pele de porco (iv) a qual foi realizada em leitor de microplacas, sendo determinado o sinal de fluorescência direto (i) com excitação e emissão em 470nm/568nm respectivamente, tanto do controle somente com DMEM (ii) e das NC/QZ (15µg/mL) (iii).	55
Figura 21. Estudo de uptake celular em células HaCaT na concentração de 15 µg.mL ⁻¹ em PBS avaliando a internalização celular da Quinizarina livre (QZ) e da mesma nanoencapsulada (NC/QZ) nos tempos de 3, 6 e 24 horas. Foi determinado significância estatística através do teste de análise de variância One-way ANOVA, com 95% de significância, seguido de pós teste Tukey para múltiplas comparações, onde *diferença estatística obtida entre QZ e NC/QZ, **diferença estatística obtida entre NC/QZ nos três tempos testados.	56
Figura 22. Ensaio de Citotoxicidade in vitro de NC/QZ na concentração de 0,1 mg.mL ⁻¹ de QZ em linhagens de queratinócitos humano HaCaT (HaCaT – cell line service) nas concentrações de 2,5; 5; 10; 15; 17,5; 20; 25; 30; 35 e 50 µg.mL ⁻¹ (NC/QZ). Foi determinado significância estatística através do teste de análise de variância One-way ANOVA, com 95% de significância, seguido de pós teste Tukey para múltiplas comparações (* $p < 0,05$).	57
Figura 23. Ensaio imunoenzimático ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) para análise de citocinas IL-1 β em Queratinócitos Humanos (HaCaT – cell line service) sendo A = análise 6h após a irradiação e B = análise 24h após irradiação, onde: CT = Controle; LPS = Lipopolissacarídeo; LED = dose de irradiação de 10 J.cm ⁻² ; D1 = NE/QZ dose de irradiação de 1,0 J.cm ⁻² ; D2 = NE/QZ dose de irradiação de 5J.cm ⁻² ; D3 = NE/QZ dose de irradiação de 10 J.cm ⁻² ; CF= Controle de formulação (NE/QZ 15µg.mL ⁻¹). A significância estatística foi	

determinada através do teste de análise de variância One-way ANOVA, com 95% de significância, seguido de post hoc test Dunnett 's..... 59

Figura 24. Ensaio imunoenzimático ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) para análise de citocinas IL-8 em Queratinócitos Humanos (HaCaT – cell line service) sendo A= análise 6h após a irradiação e B = análise 24h após irradiação, onde: CT= Controle; LPS = Lipopolissacarídeo; LED = dose de irradiação de 10 J.cm⁻²; D1 = NE/QZ dose de irradiação de 1,0 J.cm⁻²; D2 = NE/QZ dose de irradiação de 5 J.cm⁻²; D3 = NE/QZ dose de irradiação de 10 J.cm⁻²; CF = Controle de formulação (NE/QZ 15µg.mL⁻¹). A significância estatística foi determinada através do teste de análise de variância One-way ANOVA, com 95% de significância, seguido do post hoc test Dunnett 's..... 59

Figura 25. Ensaio imunoenzimático ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) para análise de Proteína quimiotática de monócitos 1 - MCP1 Queratinócitos Humano (HaCaT – cell line service), sendo A = análise 6h após a irradiação e B = análise 24h após irradiação, onde: CT= Controle; LPS = Lipopolissacarídeo; LED = dose de irradiação de 10 J.cm⁻²; D1 = NE/QZ dose de irradiação de 1,0 J.cm⁻²; D2 = NE/QZ dose de irradiação de 5 J.cm⁻²; D3 = NE/QZ dose de irradiação de 10 J.cm⁻²; CF = Controle de formulação (NE/QZ 15µg.mL⁻¹). A significância estatística foi determinada através do teste de análise de variância One-way ANOVA, com 95% de significância, seguido do post hoc test Dunnett 's. 60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados de tamanho médio de partícula, índice de polidispersidade (Pdl) e potencial Zeta das nanocápsulas encapsuladas com Quinizarina (NC/QZ) e sem o ativo (NC/Vazia)	42
Tabela 2. Teor total de encapsulação da QZ em nanocápsulas.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

$^1\text{O}_2$ Oxigênio Singleto

ACN Acetonitrila

DLS Dynamic Light Scattering – Espalhamento dinâmico de luz

EROS Espécies Reativas de Oxigênio

FS Fotossensibilizador

FTIR Infravermelho por transformada de Fourier

IFN – γ Interferon gama

IL Interleucina

NC Nanocápsula polimérica

NC/QZ Nanocápsula com Quinizarina

NC/Vazia Nanocápsula sem o fotossensibilizador

PdI Índice de polidispersidade

PDT Photodynamic Therapy

PLGA Poli-láctico-co-glicólico

QZ Quinizarina

S⁰ Estado fundamental

S¹ Estado singleto excitado

T¹ Estado tripleto excitado

TFD Terapia Fotodinâmica

Th17 Células T auxiliares

TNF- α Fator de Necrose Tumoral Alfa

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Lucas Primo, pelos anos de orientação, ensinamentos, confiança e pela amizade que construímos durante todo esse tempo.

À minha família pelo apoio e incentivo incondicional.

Ao meu irmão, a quem devo todo o incentivo para permanecer na área acadêmica.

Às amigas Mariza, Camila, Brenda e Isabella pela amizade sincera durante esses anos e por todo suporte.

Ao meu grupo de pesquisa, GNanoEngineers do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da FCFAr/UNESP por toda experiência compartilhada e todo auxílio durante essa pesquisa.

Aos técnicos Adriana, Ana, Flavio e Matheus pelo profissionalismo e disposição. A todos os amigos e servidores do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)

Ao Programa de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas, por toda ajuda e pela oportunidade que me foi proporcionada durante o CAPES PrInt.

À Pro-Reitoria de Pós-Graduação da UNESP (ProPG) e a CAPES pela capacitação em missão realizada no Programa Institucional de Internacionalização (Print-UNESP) Processo n. 88887.839000/2023-00, realizado junto à *University of Birmingham* no Reino Unido.

Ao Prof. Dr. Liam Grover da *University of Birmingham* pela oportunidade de colaboração e por todo aprendizado oferecido no *Healthcare Technologies Institute* (HTI).

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Araraquara.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado que possibilitou a realização dessa pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

1. INTRODUÇÃO

A psoríase se trata de uma doença cutânea, crônica a qual envolve respostas inflamatórias multifatoriais ligadas a respostas autoimunes altamente complexas, possuindo impactos significativos na vida dos indivíduos que possuem, sendo que nos últimos anos, tem-se observado um aumento nos casos dessa doença, apresentando taxas de prevalência mundial entre 0,09% e 11,4% (HARI et al., 2022; MASCHARENHAS- MELO et al., 2022). Caracteriza-se pelo crescimento excessivo e diferenciação anormal dos queratinócitos levando a lesões cutâneas, resultado de estímulos inflamatórios e angiogênicos, sendo que em qualquer tipo clínico da doença, o desenvolvimento sempre é ligado ao aumento das expressões de células imunes e citocinas inflamatórias (HARI et al., 2022; JIN et al., 2015).

Atualmente, são utilizados como métodos para o tratamento da psoríase a terapia tópica, a fototerapia e terapia sistêmica (JIN et al., 2015). A primeira linha de tratamento consiste na terapia tópica, caso esse tratamento não seja mais eficaz, parte-se para a fototerapia e medicamentos sistêmicos, contudo, o problema relacionado a esses métodos, consiste nos efeitos colaterais indesejáveis, que podem envolver náuseas, irritações cutâneas, hepatotoxicidade e entre outros, sendo necessário então o desenvolvimento de alternativas terapêuticas com menores efeitos adversos secundários e mais eficazes (MASCHARENHAS-MELO et al., 2022).

Neste contexto, a Terapia Fotodinâmica (TFD), ou na língua inglesa *Photodynamic Therapy* (PDT), consiste em uma modalidade terapêutica amplamente utilizada em complemento clínico oncológico, e com resultados promissores em

pacientes com vários tipos de doenças de pele superficiais, inclusive a psoríase (LI et al., 2023; WANG et al., 2022).

O mecanismo central de ação da TFD baseia-se em reações fotoquímicas controladas, que ocorrem pela transferência de energia após a excitação de um composto, denominado fotossensibilizador, em um comprimento de onda específico do espectro-eletromagnético da luz, e resultando na produção de espécies químicas excitadas como o oxigênio singleto e outras espécies reativas de oxigênio, os quais podem induzir alteração no metabolismo celular de forma controlada, inclusive com indução de morte celular via apoptose e/ou necrose (JIN et al., 2015).

Um dos maiores desafios da TFD consiste na escolha da molécula do fotossensibilizador mais adequado, o qual deve apresentar algumas características essenciais muito importantes para sua aprovação em TFD, como afinidade biológica, biodistribuição e, principalmente, potencial fotodinâmico adequada para aplicação terapêutica (WANG et al., 2022). Nesta proposta, as Antraquinonas, que são corantes fenólicos utilizados há anos como pigmentos naturais, possuem atividades biológicas e farmacológicas primárias comprovadas como ação antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana (REE et al., 2021), e como potenciais compostos fotossensibilizadores. Contudo, são encontradas algumas limitações ao uso das Antraquinonas em TFD, visto sua baixa solubilidade em meio aquoso, podendo ocasionar a falta de seletividade no tratamento além de ineficácia farmacológica. Desta forma, a nanotecnologia farmacêutica é um recurso valioso, a qual pode influenciar de forma significativa na utilização de derivados antraquinônicos em TFD, bem como sua liberação controlada e sustentada como estratégia para o sucesso terapêutico desejado (AMANTINO et al., 2020).

Nesse contexto, o presente trabalho de pesquisa busca o desenvolvimento de uma nova formulação baseada na nanoencapsulação da Quinizarina (derivado de Antraquinona), sendo um potencial tratamento para doenças autoimunes, como a psoríase, unindo os princípios da TFD com a Nanotecnologia Farmacêutica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Psoríase

Psoríase consiste em uma doença crônica de pele inflamatória autoimune (QIAO, et al., 2019), causada devido a fatores genéticos e ambientais, afetando cerca de 2-3% da população mundial (JYOTHI, et al., 2021). A manifestação mais comum da doença se dá por meio de placas crônicas, chamada de psoríase vulgar, a qual se manifesta como placas de área vermelha, escamosas e bem demarcadas na pele inflamada. Essa inflamação é resultado da hiperproliferação de queratinócitos, onde geralmente é observado um aumento de até oito vezes no *turnover* das células da epiderme, desencadeando assim um espessamento da epiderme e diferenciação aberrante dos queratinócitos (BALIWAG; BARNES; JOHNSTON, 2015). Múltiplas complicações, como doenças cardiovasculares, foram associadas à psoríase, sugerindo que se pode tratar também de uma doença sistêmica, que ainda muitas vezes pode persistir por toda a vida do paciente (DENG, et al., 2021).

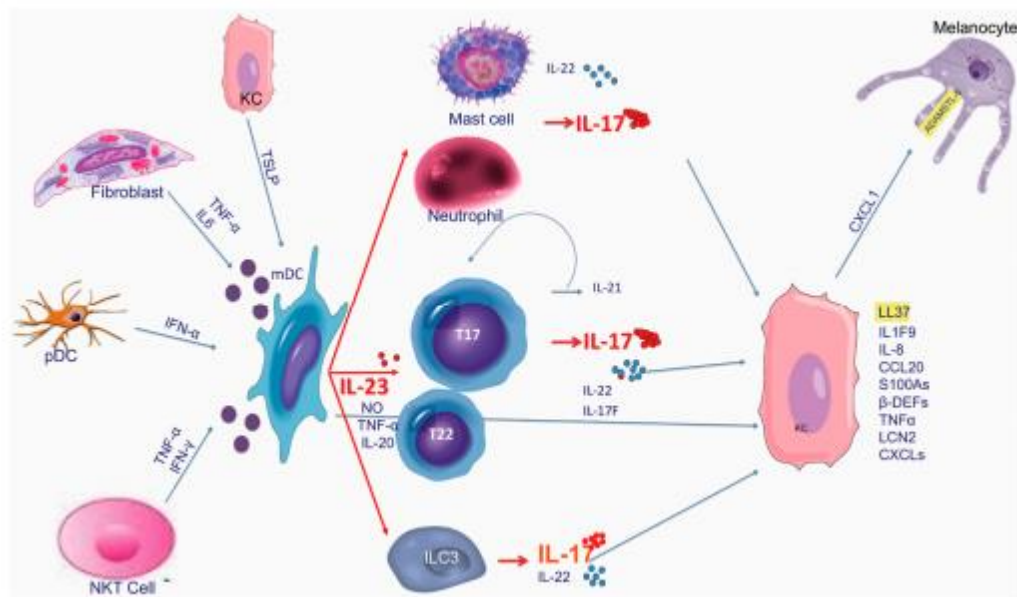
O mecanismo inflamatório da psoríase envolve a presença de queratinócitos, leucócitos, células T, macrófagos, neutrófilos, mastócitos, células dendríticas e suas vias migratórias em direção à epiderme, seguido pela liberação de citocinas inflamatórias (ALEEM; TOHID, 2018). Estudos indicam que, a maturação das

células-T em células Th17, através da influência de IL-6 e outras citocinas, acabam levando os neutrófilos para uma localização específica, sendo que os níveis de IFN – γ e TNF – α podem estar elevados e a presença de células Th125 ou Th17 aumente a inflamação. As vias inflamatórias são iniciadas pela liberação descontrolada de citocinas IL – 1, IL – 6 e TNF- α devido à atividade das células dendríticas e T (ALEEM; TOHID, 2018). A amplificação da inflamação psoriática é influenciada pela liberação de citocinas IL-17, interferon (IFN)- γ , fator de necrose tumoral (TNF)- α e IL-22, as quais mediam os efeitos sobre os queratinócitos (KIM, KRUEGER, 2015). Outra citocina com ação direta no mecanismo inflamatório da psoríase consiste na IL-1 β , sendo classificada como pró-inflamatória com papel altamente importante no desenvolvimento da doença, sendo crítica na ativação de células T produtoras de IL-17 (CAI et al., 2019).

Recentemente, uma caracterização precisa das vias imunológicas envolvidas, levaram a reconhecer o papel de subconjuntos específicos e seus produtos, como a influência do eixo IL-23/IL-17, sendo a IL-23 o indutor mais potente envolvido na produção de IL-17 por diferentes tipos de células (células T (Th17), neutrófilos, mastócitos), as quais possuem fortes contribuições na patogênese da psoríase (CHIRICOZZI, et al., 2018). A imunopatogênese da psoríase baseada no eixo IL-23/IL-17, observada na Figura 1, pode ser elucidada pelos eventos subsequentes, sendo que quando fatores desencadeantes causam lesão cutânea, os queratinócitos ativam células dendríticas mielóides (TNF α , NO, e IL-20), com consequente produção de IL-23 (IFN- α , TSLP), que, por sua vez, estimula principalmente os subconjuntos de células T, mas também ILC3 (IL-22, IL-17F e IL-21), mastócitos e neutrófilos, para secretar IL-17, contribuindo para o desenvolvimento da pele psoriática. As citocinas liberadas por estas células estimulam ainda mais os

queratinócitos e o circuito imunológico é amplificado, promovendo a sua hiperproliferação bem como a expressão de citocinas e quimiocinas (CHIRICOZZI, et al., 2018; KIM; KRUEGER, 2015).

Figura 1. Ilustração do modelo patogênico baseado no eixo IL-23/IL-17 induzindo o desenvolvimento do fenótipo da psoríase. O eixo IL-23/IL-17 encontra-se destacado em vermelho, enquanto outros sinais imunológicos se encontram em azul. IFN: interferon; IL: interleucina; KC: queratinócito; mDC: células dendríticas mielóides; TNF: fator de necrose tumoral; ILC3: células linfóides inatas. Fonte: Adaptado de CHIRICOZZI, et al., 2018.



Diversos tipos de terapias convencionais são utilizados atualmente no tratamento da psoríase, incluindo terapias orais, injetáveis, tópicas e fototerapia. Contudo, a utilização de medicamentos como esteroides, metotrexato, ciclosporina em altas doses levam à efeitos indesejados e tóxicos, resultando na supressão do sistema imunológico como um todo, podendo levar até ao comprometimento de órgãos vitais em alguns casos com administração à longo prazo. Em razão desse fato, os sistemas de administração de fármacos utilizados não conseguem tratar com sucesso a psoríase de fato, necessitando-se então do desenvolvimento de novas

terapias com maior direcionamento do fármaco, atividade biológica aprimorada e biodisponibilidade (TAMBE; NAUTIYAL; WAIRKAR, 2021).

2.2 Terapia Fotodinâmica

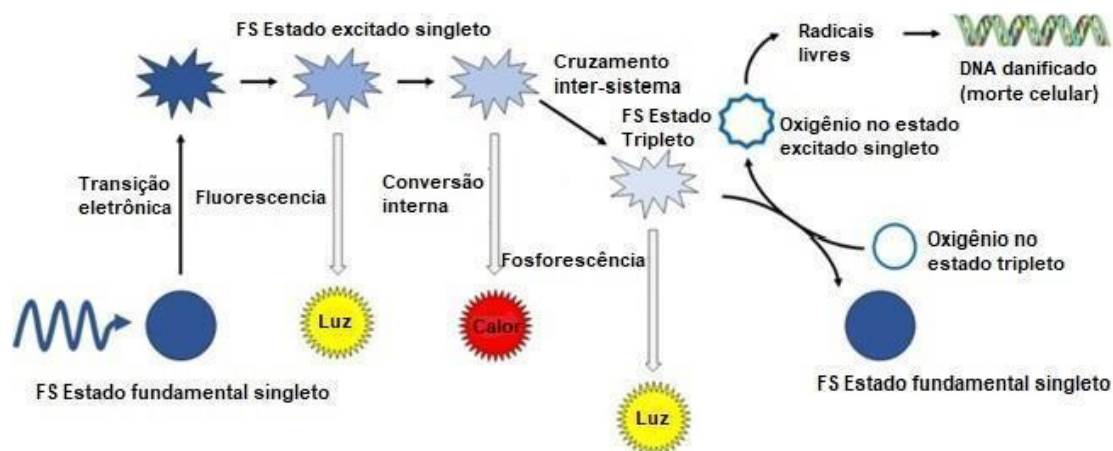
A TFD consiste em uma forma terapêutica não invasiva e que tem sido utilizada nos estudos para tratamento clínico de diversas doenças, sendo utilizada como uma única terapia ou terapia complementar aos tratamentos convencionais (KWIATKOWSKI, et al., 2018; AMANTINO, et al., 2020). A TFD tem recebido notável atenção em diversas áreas, principalmente no tratamento do câncer de pele, sendo uma abordagem eficiente a qual não apresenta toxicidade, não levando a elevados efeitos colaterais, além de não apresentar mecanismos de resistência adquiridos ou intrínsecos com excelente aceitação estética por ser minimamente invasiva (LI et al., 2023).

Os mecanismos de ação da TFD, apresentados na Figura 2, consistem na produção de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e outras espécies reativas de oxigênio (EROS), através da fotoexcitação de um composto fotossensibilizador (FS) que pode ser administrado por via tópica, transdérmica, intravenosa ou oral (sistêmica), utilizando-se em seguida a ativação biológica por irradiação de um sistema do tipo LASER ou LED operando em comprimento de onda específico na região do UV-visível e potência adequada (fluência em J/cm^2), desencadeando reações fotoquímicas controladas. Estas reações são denominadas mecanismos fotodinâmicos do Tipo I e Tipo II, os quais levam à produção controlada de $^1\text{O}_2$ e EROS (KWIATKOWSKI, et al., 2018). Estas espécies reativas induzem processos fotobiológicos controlados que podem desencadear a morte celular por mecanismos apoptóticos e/ou necróticos e, assim, afetar diretamente certas vias metabólicas e processos

bioquímicos do meio extracelular (KWIATKOWSKI, et al., 2018). Além disso a TFD pode também induzir uma alteração no equilíbrio eletrofisiológica mitocondrial celular, gerando efeitos de reposta direta no metabolismo intracelular. Nesse cenário, a existência destes dois mecanismos clássicos (Tipos I e II) na TFD, são necessariamente dependentes das moléculas de oxigênio disponíveis no microambiente celular. (KWIATKOWSKI, et al., 2018).

Após a internalização do FS nas células-alvo, a luz é irradiada em um comprimento de onda coincidente com a melhor região do espectro de absorção do FS, induzindo então a transição de estado de menor energia, ou fundamental (S_0), para os estados de maior energia, ou singletos ($S_n \rightarrow S_1$) resultado da absorção controlada de fótons. Parte desta energia de excitação é devolvida na forma de processo radiativo na forma de fluorescência e a outra parte residual pode ser transferida pelo mecanismo de conversão inter-sistema, no qual o FS passa para os estados excitados tripleto ($T_n \rightarrow T_1$), sendo este o transiente desejado para se atingir os efeitos foto-terapêuticos adequados (KWIATKOWSKI, et al., 2018). No mecanismo tipo I, o FS no estado T_1 , pode interagir com diferentes substratos biológicos, formando radicais livres por transferência de elétrons ou prótons, sendo que esses radicais podem induzir dano fotodinâmico controlada às células ou reagir com oxigênio formando novos EROS. Já no mecanismo tipo II, o FS também no estado T_1 é capaz de transferir energia para o oxigênio molecular (O_2), formando oxigênio singlete (1O_2), caracterizado por propriedades oxidantes fortes e ativação de processos de fotoestimulação (AGAZZI, et al., 2019).

Figura 2. Ilustração sistemática dos mecanismos de reação da TFD. Fonte: Adaptado de KWIATKOWSKI, et al., 2018.



No entanto, a TFD, como única alternativa terapêutica, ainda não tem sido utilizada, atuando de forma complementar aos protocolos tradicionais devidos à algumas limitações ainda existentes, as quais podemos destacar o baixo interesse da indústria farmacêutica em escalonar rotas de síntese e purificação química, e desafios na padronização dos parâmetros fotofísicos na rotina clínica (NIRMAL, et al., 2021).

2.3 Fotossensibilizadores (FS)

Nos estudos envolvendo TFD a escolha do FS é de extrema importância. O FS consiste na substância a qual produz, de forma controlada, intermediários ativos quando exposta à radiação monocromática. Sendo assim, a eficiência de conversão de luz pelo FS acaba determinando, geralmente, a eficiência dos mecanismos fotodinâmicos na TFD (ZHOU, et al., 2021). O grande desafio está na utilização de compostos FS que possuem melhor afinidade biológica, biodistribuição e potencial fotodinâmico adequado (WANG, et al., 2021). Durante muito tempo, a Photofrin® I, um derivado de hematoporfirina, HpD, foi muito utilizada como fotossensibilizador, sendo aprovada em 1995 pelo *Food and Drug Administration* (FDA) para o

tratamento de alguns tipos de câncer de cabeça e pescoço e posteriormente em 1998 para terapia de câncer de pulmão (KONAN; GURNY; ALLÉMAN, 2002). Contudo, esse FS faz parte da classe de primeira geração, os quais apresentam muitas desvantagens devido a baixíssima solubilidade em meio fisiológico, meia-vida muito alta comparando-se a fármacos antitumorais convencionais e pouca seletividade pelo tecido-alvo (WANG, et al., 2021). As limitações encontradas com os FS de 1º geração levaram à uma intensa busca científica pelo desenvolvimento de novas moléculas durante mais de duas décadas desde o fim dos anos 90, chamadas de fotossensibilizadores de segunda geração, caracterizados pela presença de outros derivados de hematoporfirina e fotossensibilizadores sintéticos com destaque para os ftalocianínicos e clorínicos. Estas novas gerações tendem a apresentar maior rendimento de formação de oxigênio singlete, menos efeitos colaterais, o que resulta de uma maior seletividade para tecidos cancerosos, entretanto, ainda apresentaram baixa solubilidade em água, sendo um fator muito significativo pelo fato de interferir na administração farmacêutica (KWIATKOWSKI, et al., 2018). Os fotossensibilizadores de terceira geração foram desenvolvidos incorporando estratégias avançadas de síntese e purificação e tecnologias inovadoras, como a nanotecnologia, buscando aumentar a biodisponibilidade e maior eficácia fotodinâmica relacionada aos FS das classes anteriores (MFOUO-TYNGA et al., 2021; KWIATKOWSKI, et al., 2018).

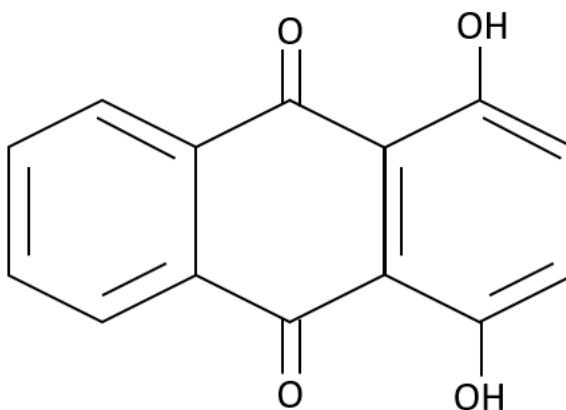
A busca por novos FS ainda é uma área de desenvolvimento científico em plena expansão, e vem de encontro com segmentos da biotecnologia que oferecem compostos de origem microbiológica com alta eficiência fotodinâmica, a exemplo os colorantes (corantes e pigmentos) com altíssimo coeficiente de extinção molar e ao mesmo tempo compatibilidade biológica avançada comparando-se aos seus

precursores de origem sintética da primeira e segunda geração de FS (AMANTINO, et al., 2020).

Neste contexto, as Antraquinonas (AQs) constituem o maior grupo de quinonas presentes no reino vegetal, sendo um importante grupo de metabólitos secundários com potenciais aplicações terapêuticas, demonstrando atividades biológicas significativas, como: hepatoprotetora, antiviral, antifúngica (SINGH, 2014); antimicrobiana, antioxidante (MALIK; MÜLLER, 2016) (VÁZQUEZ, et al., 2017). Considerando a vasta quantidade de atividades biológicas envolvidas, o interesse pelo desenvolvimento de novos derivados de antraquinona vem crescendo nos últimos anos (MALIK; MÜLLER, 2016). A exemplo temos a estrutura química da Quinizarina (QZ) (1,4 di-hidroxi-antraquinona), apresentada na Figura 3, possuindo funções químicas pertencentes ao grupo dos corantes naturais derivados de antraquinona, apresentando parâmetros espectroscópicos de absorção e emissão em 470 nm e 570 nm respectivamente. Em análise estrutural observa-se a presença de grupamentos aromáticos conjugados planares e quinoides de alta densidade eletrônica, o que pode contribuir para a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), a partir de transferência de elétron para o O₂ (QUINTI, et al., 2003) (HU, et al., 2019). Ainda, estudos indicam que a presença do grupamento planar cromóforo hidroxi-9,10-antraquinona substituído por um amino açúcar, como apresentado na estrutura da QZ e em diversas Antraquinonas, tende a interagir com o DNA, inibindo a enzima topoisomerase II e realizando uma intercalação entre os pares de base do DNA, resultando na estabilização do complexo intermediário da reação de topoisomerase II e consequentemente causando morte celular por apoptose (TOADER; ENACHE, 2021; DIAZ-MUÑOZ et al., 2018). Uma das desvantagens que dificulta o uso das Antraquinonas, consiste em sua baixa solubilidade em meio

aquoso, fator que leva a uma seletividade parcial e entrega pouco específica em tecidos alvos, assim, a nanoencapsulação se torna uma alternativa vantajosa na sua classificação como medicamento (AMANTINO et al., 2020).

Figura 3. Estrutura química da Quinizarina (1,4 di-hidroxi-antraquinona). Fonte: autora.



2.4 Nanotecnologia e Nanocarreadores

A nanotecnologia farmacêutica apresenta um enorme potencial no campo da medicina, sendo a ciência aplicada ao diagnóstico, tratamento e prevenção de doenças e lesões traumáticas, visando preservar e realizar melhorias à saúde humana (LU, et al., 2021). Os medicamentos tradicionais possuem diversas limitações, principalmente em relação à seletividade, os quais podem levar à efeitos colaterais graves, devido a necessidade de alta dosagem, além de possuírem eficácia comprometida pelo fato de não passarem por algumas barreiras biológicas. Em contrapartida, os sistemas de liberação nanoestruturados ou nanofármacos possuem ação direcionada, o que auxilia diretamente na redução da toxicidade, melhorando a biodisponibilidade (LU, et al., 2021). O sistema de liberação ideal deve permitir o acúmulo direcionado do FS no tecido alvo, seguido da distribuição terapêutica, não sendo o FS absorvido por células saudáveis, não causando ainda

perda ou alteração das atividades do fotossensibilizador, além de ser biodegradável e apresentar pouca ou nenhuma imunogenicidade (KONAN; GURNY; ALLÉMANN, 2002).

Dentre os principais nanocarreadores coloidais com potencial aplicação, são evidenciados os sistemas poliméricos e emulsionados, destacam-se as nanocápsulas poliméricas (NC). As NC são constituídas em sua maioria por polímeros biodegradáveis, biocompatíveis, evitando assim toxicidade, apresentando ainda, alta eficiência de encapsulamento de ativos (ABED, *et al.*, 2021). Além disso, o envoltório polimérico presente nas nanocápsulas preserva o fármaco dos efeitos degradativos de fatores como luz, oxigênio e ambiente ácido do estômago e modula e controla a liberação do ativo internalizado nos alvos biológicos de interesse (NETO, *et al.*, 2021).

Dessa forma, o presente estudo tem como proposta o desenvolvimento e caracterização de nanocápsulas poliméricas contendo o fotossensibilizador Quinizarina, a fim de avaliar sua ação potencial em modelo inflamatório *in vitro*, unindo os princípios fotofísicos da TFD e da nanotecnologia para potencial aplicação terapêutica da psoríase e outras doenças inflamatórias

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver e caracterizar nanocápsulas poliméricas contendo QZ buscando avaliar seu potencial de aplicação em Terapia Fotodinâmica empregando-se modelos *in vitro* de processo inflamatório em queratinócitos.

3.2 Objetivos Específicos

- Síntese das nanocápsulas poliméricas contendo QZ, e caracterização físico-química para determinação do tamanho de partícula e potencial Zeta;
- Análise de absorção no infravermelho por Transformada de Fourier - FTIR;
- Análise morfológica por Microscopia de Força Atômica - MFA;
- Determinação dos espectros de absorção e emissão de fluorescência no UV-visível;
- Análise de permeação em matriz extracelular para impressão de equivalente de pele 3D e em pele de porco;
- Indução da hiperproliferação das células de queratinócitos como modelo da psoríase com posterior aplicação em Terapia Fotodinâmica (TFD);
- Análise do processo inflamatório *in vitro* pelo efeito da expressão de sinalizadores antes e após TFD.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.2 Protocolo de preparo das nanocápsulas

As NC poliméricas (NC/QZ) foram preparadas usando o método de deposição interfacial de copolímero pré-formado (nanoprecipitação) como descrito por Primo et al. 2011, na concentração de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ de ativo. O co-polímero de revestimento poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) - PLGA 50:50 (0,75% m/v) e lecitina de soja (fosfatidilcolina de soja de alta pureza) a 1,75% m/v foram dissolvidos em 15 mL de acetona a 40°C (caracterizando a fase orgânica) e adicionados lentamente por gotejamento na velocidade de $1,0 \text{ g/s}$, sob a solução aquosa, contendo Pluronic F-68 (1,25% m/v) em 30 mL de água sob agitação moderada e constante (250 rpm) a 40°C . O processo de emulsificação e recobrimento interfacial foi iniciado após a mistura de fases diretamente em reator camisado de 250 mL acoplado em banho termostatizados em circulação constante. Posteriormente, foi realizada a remoção do solvente orgânico para finalização do processo de nanoemulsificação, através da etapa de rota-evaporação a 40°C e rotação de 225 rpm sob pressão reduzida, obtendo um volume final de formulação de 10 mL.

4.3 Determinação do tamanho de partícula e potencial Zeta

A fim de realizar a caracterização físico-química, foi utilizado a medida de tamanho de partícula (diâmetro hidrodinâmico), índice de polidispersidade (Pdl) e potencial Zeta (ξ) das nanocápsulas na ausência e presença do princípio ativo QZ. As análises foram realizadas seguindo os procedimentos operacionais padrões do equipamento Zetasizer®, da Malvern, do Laboratório de Tecnologia Farmacêutica do Departamento de Ciências Farmacêuticas da FCFAr-UNESP.

4.4 Análise da superfície topográfica por Microscopia de Força Atômica (MFA)

A MFA consiste em uma técnica microscópica utilizada amplamente para a caracterização de superfícies e de propriedades dos materiais, através da varredura ao longo da superfície de uma amostra, fornecendo imagens tridimensionais e bidimensionais em alta resolução, sendo uma ferramenta indispensável na caracterização de nanomateriais poliméricos e outros materiais (COLLINSON, *et al.*, 2021).

Foram realizadas imagens da NC/QZ a temperatura ambiente, utilizando o equipamento Scanning Probe Microscope modelo SPM-9600, da Shimadzu do Grupo de Pesquisa em Bioengenharia e Biomateriais do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da FCFAr-UNESP.

O preparo da amostra foi realizado em uma superfície de mica, onde foi depositada uma gota sob diluição 1:1 com água-ultrapura (5,0 μL) da formulação a qual foi submetida *overnight* a secagem natural. As imagens foram obtidas posteriormente pelo método de contato intermitente, com cantilever de 124 μm de comprimento, operando em uma frequência de ressonância no intervalo de 324-369 KHz, rigidez de 34-51 N/m e força constante.

4.5 Análise espectroscópica de absorção no infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR

A análise das NC foi realizada seguindo o método descrito por Alsharari, Tayel e Moussa (2018). Para a análise da QZ livre e das NC sintetizadas (NC/QZ) foi utilizado o FTIR ALFA II (BRUKER, USA) do Grupo de Pesquisa em Bioengenharia e Biomateriais do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da

FCFAR-UNESP, operando nos comprimentos de onda de 300 – 4000 cm^{-1} , *scan* de 128 varreduras, resolução de 4 cm^{-1} , utilizando módulo ATR e base de cristal de seleneto de zinco.

4.6 Espectros de absorção e emissão no UV/VIS

Os espectros de absorção e emissão de fluorescência da QZ em meio homogêneo (acetonitrila) e após a nanoencapsulação (NC/QZ) foram obtidos como parte da caracterização espectroscópica. Para as análises de absorção foi utilizado o espectrofotômetro UV/Vis de feixe duplo *Genesys 10s* da *Thermo Scientific*.

Para as análises de fluorescência 2D e 3D das amostras contendo QZ livre e em NC (NC/QZ) foi estabelecido um protocolo com excitações fixas em 470 nm, tempo de integração de 0,3 s, fendas de excitação e emissão de 3,0/3,0 nm e faixa de aquisição de 400 a 700 nm, utilizando-se espectrofluorímetro da *Shimadzu* modelo RF-6000 do Laboratório de Produção de Bioprodutos e Purificação (BioPPul) do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da FCFAR-UNESP

4.7 Método espectroanalítico para quantificação da Quinizarina: Curva analítica

A linearidade de um método analítico consiste na capacidade de se obter resultados experimentais diretamente proporcionais a concentração do analito. Assim, a regressão linear foi realizada construindo um gráfico de absorção *versus* concentração do fotossensibilizador em $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Inicialmente, a curva foi construída através de uma solução estoque contendo 0,2 mg.mL^{-1} de QZ em acetonitrila (ACN). Para o preparo das soluções em diferentes concentrações foi utilizado o método de diluições sucessivas, as quais foram realizadas diretamente em uma cubeta de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico, contendo 2,0 mL de ACN, adicionando-se

frações da solução estoque com micro seringas (Hamilton Co.) de 50 μ L para se obter as concentrações desejadas.

4.8 Quantificação de QZ em NC/QZ: Teor total do fotossensibilizador

O teor total do FS em NC foi determinado seguindo o método de digestão de amostra, conforme descrito por Siqueira-Moura et al. 2010. Foi utilizada a curva de correlação, realizada como descrito em 4.7, sendo então empregada a estratégia de digestão e rompimento da parede polimérica e liberação total do ativo efetivamente associado à NC para um meio homogêneo. A quantificação foi realizada através de uma alíquota de NC/QZ (250 μ L) em um balão volumétrico (5mL) o qual foi completado até o menisco com ACN. A amostra foi então colocada em banho ultrassônico (Banho-Ultrassônico Bramson 1510) durante 10min a fim de garantir a liberação total da formulação no solvente obtendo-se o meio homogêneo. Posteriormente, foi adicionado uma alíquota de 2,0 mL desta solução em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm e analisadas no espectrofotômetro empregando-se o método espectro analítico previamente desenvolvido como descrito na seção 4.5. O experimento foi realizado em triplicata para validação do método.

4.9 Cultivo celular

As linhagens comerciais de fibroblasto de murinhos (NIH/3T3 – ATCC® CRL-1658™) e queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT –Cell Lines Service (CLS) – GmbH Alemanha) foram utilizadas como modelo biológico. Os modelos biológicos *in vitro* foram cultivados em uma incubadora com 5% de CO₂ a 37 °C (Thermo Scientific modelo 3110) empregando-se meio DMEM suplementado com soro fetal

bovino (SFB) a 10% v/v, antibióticos penicilina/estreptomicina 10.000 UI e anfotericina 1,0 mg/mL, todos fornecidos pela Vitrocell Embriolife (Campinas, SP). O cultivo foi conduzido até obtenção do estágio de sub-confluência, onde as células foram replicadas empregando-se tripsina e cultivadas em garrafas de 25 cm² e 75 cm², previamente aos ensaios colorimétricos de citotoxicidade. Todas as soluções de meio de cultura foram filtradas previamente em sistema de filtração descartável Kasvi 0,22 µm, e o material previamente esterilizado em autoclave vertical Phoenix AB. A contagem de células seguiu o protocolo de azul de tripan em câmara de Neubauer, conforme os protocolos operacionais padrão (POP) do grupo de pesquisa.

4.10 Uptake Celular

As células da linhagem de queratinócitos humanos imortalizado (HaCaT –Cell Lines Service (CLS) – GmbH Alemanha) foram plaqueadas em placas de 24 poços (3x10⁴ células/poço) e mantidas a 37 °C em incubadora contendo 5% de CO₂ durante 24h. Posteriormente, as NC/QZ foram colocadas, na concentração de 15 µg.mL⁻¹, determinada em experimento prévio como limiar de segurança, em três tempos diferentes (3h, 6h e 24) a fim de analisar o melhor tempo para a internalização celular. Após os tempos mencionados, as respectivas placas foram lavadas com PBS, retirando o meio de cultivo. A quantificação da internalização foi realizada utilizando leitor de microplacas EnSpire™ (PerkinElmer, USA) do Laboratório de Produção de Bioprodutos e Purificação (BioPPul) do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da FCFAr-UNESP, onde foi analisada a intensidade de fluorescência.

4.11 Ensaio de viabilidade celular - método fotocolimétrico aplicando Resazurina

Nesta etapa as células NIH/3T3, após atingirem a subconfluência, foram transferidas para placas de 96 poços, sendo incubadas com diferentes concentrações da formulação, como mostrado na Figura 4, NC/QZ (2,5; 5; 15; 25; 50 e 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), formulação vazia 50% v/v (sem a presença do ativo) e Quinizarina livre (50 e 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) com ausência de fotoestímulo durante 3h, DMEM/SFB 3% v/v para determinação da curva de citotoxicidade conforme descrito por Amantino et al. 2020, baseando-se na norma ISO 10993-5 (*Biological evaluation of medical devices*). Após 24h foi adicionada uma solução de Resazurina 10%, podendo ser observada a mudança de coloração do composto de azul para rosa devido das células viáveis, que necessariamente reduzem a resazurina a resofurina. A fluorescência (F) foi lida usando comprimento de onda de excitação a 560 nm e comprimento de onda de emissão a 590 nm no leitor de microplacas EnSpire™ (PerkinElmer, USA). A porcentagem de células viáveis foi calculada de acordo com a seguinte Equação 1:

$$Viabilidade\ celular\ (\%) = \left(\frac{F_{amostra}}{F_{controle}} \right) \times 100 \text{ (Equação 1)}$$

O mesmo ensaio foi realizado para a linhagem de células HaCaT, as quais foram incubadas com diferentes concentrações da formulação como mostrado na Figura 5, NC/QZ (2,5; 5; 10; 15; 17,5; 20; 25; 30; 35 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) com ausência de fotoestímulo durante 24h.

Figura 4. Representação esquemática do ensaio de citotoxicidade em células NIH/3T3, a partir do desenho experimental empregando-se uma microplaca de 96 poços, através do método fotolorimétrico da Resazurina. Fonte: Autora.

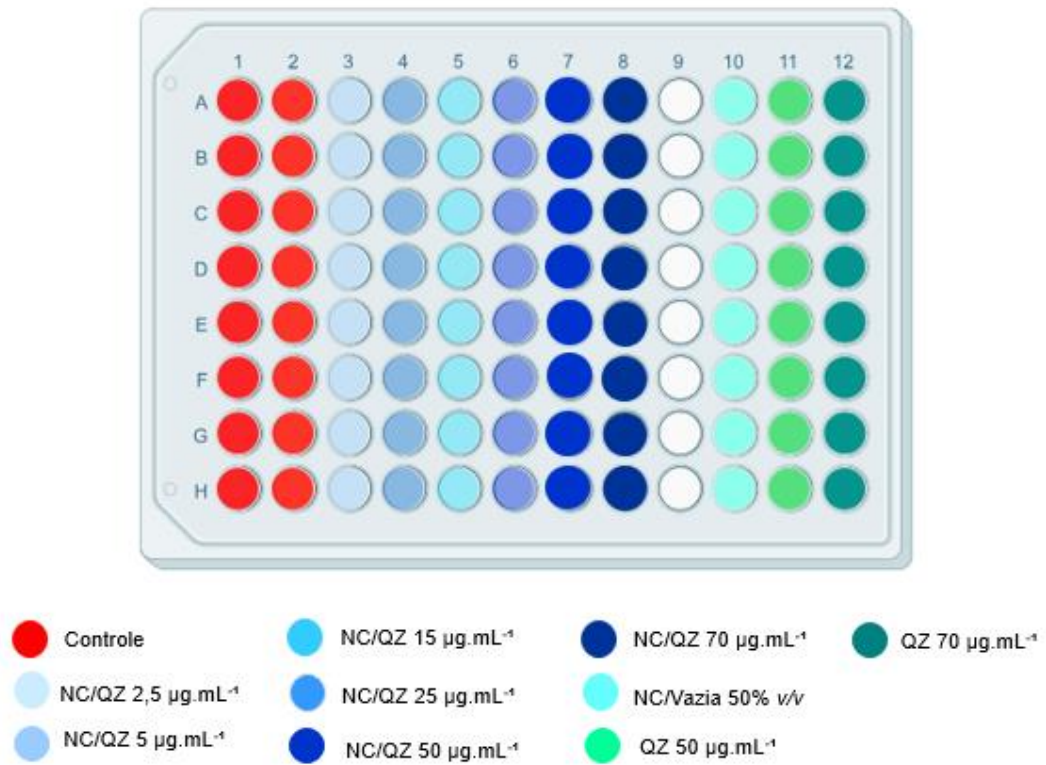
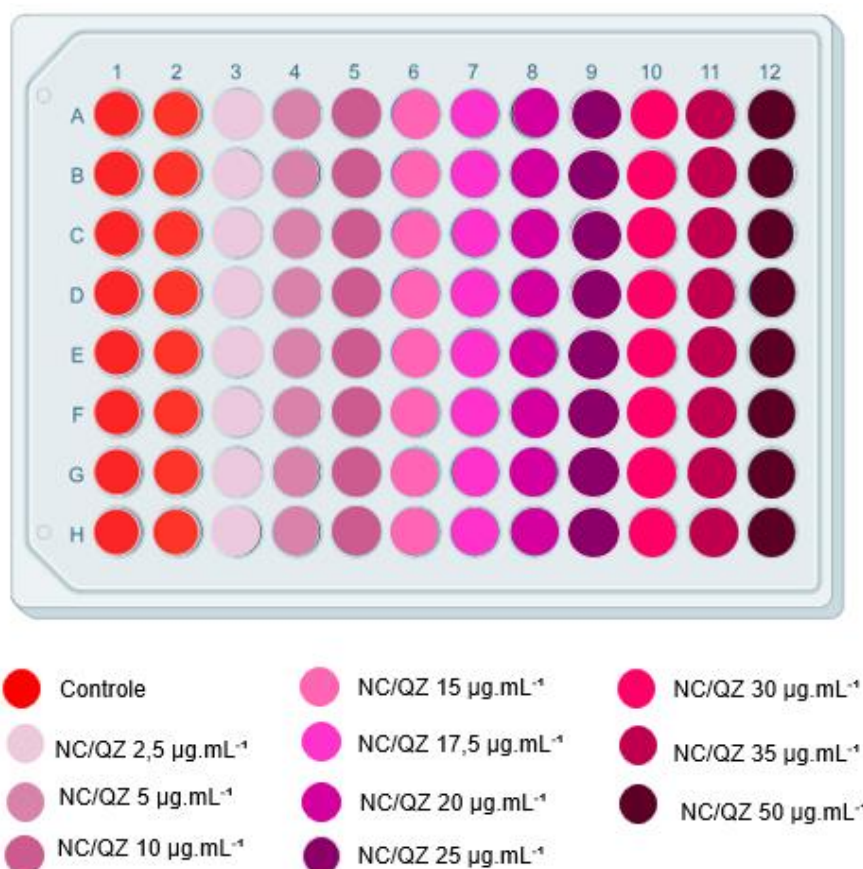


Figura 5. Representação esquemática do ensaio de citotoxicidade em células HaCaT, a partir do desenho experimental empregando-se uma microplaca de 96 poços, através do método fotocolorimétrico da Resazurina. Fonte: Autora.

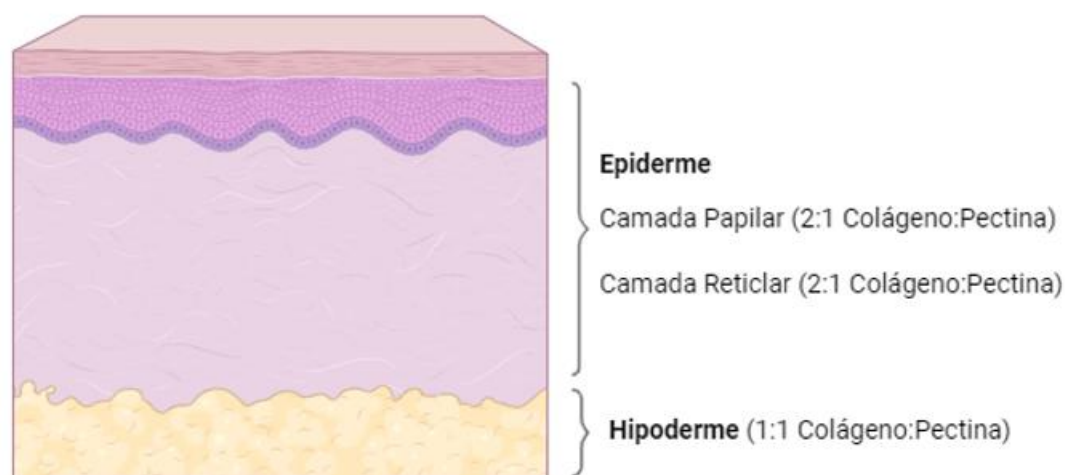


4.12 Permeação em matriz extracelular para impressão de equivalente de pele 3D e em pele de porco

A permeação do fármaco desenvolvido foi avaliada em pele de porco e em matriz extracelular (MEC) composta por colágeno e pectina, os quais foram impressos utilizando modelo de bioimpressão 3D *layer by layer* e posteriormente utilizados na produção de um modelo pele tridimensional (MOAKES, *et al.*, 2021). Os experimentos foram conduzidos no *Healthcare Technologies Institute (HTI)* na Universidade de Birmingham, no Reino Unido, em colaboração com o Professor Liam M. Grover durante capacitação realizado pelo programa CAPES-Print do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da FCFAr-UNESP.

As matrizes foram impressas seguindo o método descrito por Moakes et al. 2021, contudo, sem a internalização de células e alocadas em placas de 24 poços. Foram utilizadas as proporções de 2:1 (colágeno e pectina) para as camadas papilares e reticulares e proporção de 1:1 (colágeno e pectina) para a camada da hipoderme, como evidenciado na Figura 6.

Figura 6. Representação esquemática da matriz extracelular (MEC) desenvolvida pelo método de manufatura aditiva suspensa, com a presença de três camadas da pele: Camada Papilar, Camada Reticular e Hipoderme compostas por colágeno e pectina como *bioink*, nas respectivas proporções 2:1, 2:1 e 1:1. Fonte: Autora.



As NC/QZ, na concentração de 15µg/mL, definida como limiar de segurança, foram adicionadas no topo da MEC (80µL), dentro de um suporte cilíndrico, o qual assegurava que a amostra ficaria concentrada no topo da matriz desenvolvida, foi preparado também uma matriz internalizada apenas com DMEM para controle. Após 24h foram realizados cortes transversais e as amostras foram analisadas em leitor de microplacas SPARK (TECAN, SWI) e no microscópio EVOS M5000 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, USA) onde foi observada a intensidade de fluorescência.

Posteriormente foi realizada a análise em pele de porco (Fornecedor local), as quais foram dimensionadas seguindo as proporções: 3mmx1mm (comprimento x largura) e dispostas em placas de 24 poços. As NC/QZ (15µg/mL) foram colocadas

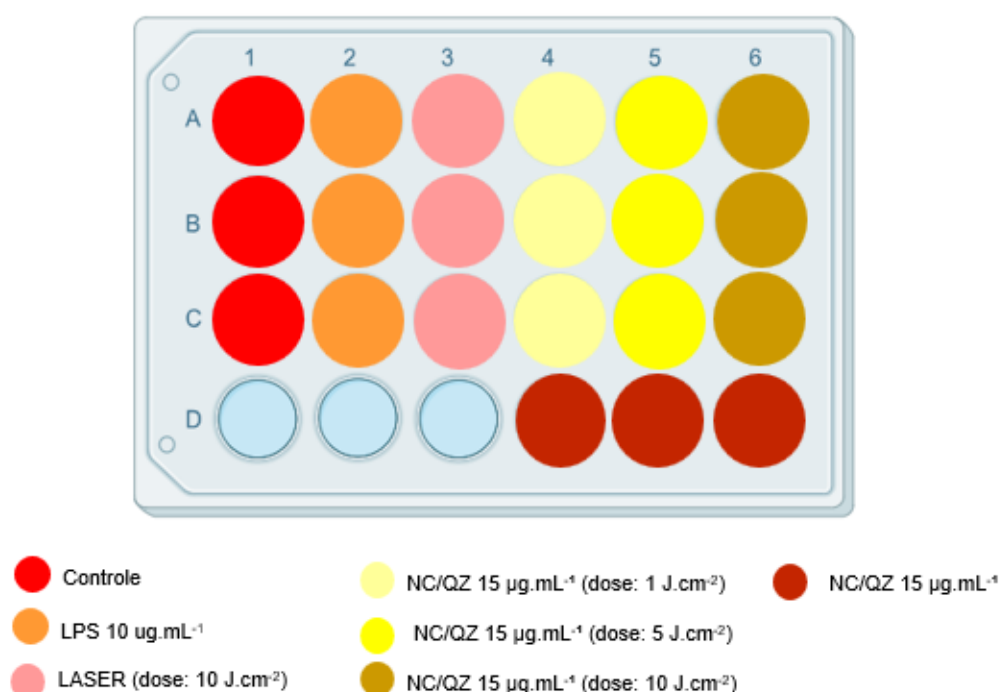
na parte superior (topo) das peles, sendo desenvolvida também uma amostra para controle. Foi realizada uma análise após 24h, avaliando a penetração das NC/QZ em cortes transversais utilizando leitor de microplacas SPARK (TECAN, SWI) onde foi observada a intensidade de fluorescência da QZ liberada no meio intracelular

4.13 Indução do processo inflamatório em células HaCaT e aplicação da Terapia Fotodinâmica

A fim de induzir um processo inflamatório *in vitro*, foi utilizado como modelo cultura de células de queratinócitos de humanos (HaCaT – Cell Lines Service (CLS) – GmbH Alemanha) as quais foram cultivadas, como descrito na seção 4.6 e posteriormente plaqueadas em placas de 24 poços a fim de analisar diferentes parâmetros, como mostrado na Figura 6. Inicialmente, as células foram plaqueadas e induzidas com lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano (sorotipo O127:B8, Sigma, UK) na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e incubadas durante 24h – 37°C , 5% CO_2 . Após o período mencionado, foram adicionadas amostras de nanocápsulas poliméricas contendo Quinizarina (NC/QZ) na concentração de $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a qual foi estabelecida como limiar de segurança *in vitro*. Na sequência, as células foram incubadas durante 24h. Posteriormente, as células ainda com o LPS e NC/QZ foram submetidas à TFD, onde foi utilizado um sistema de fotoativação de mesa LED de 24 poços (IrradLED/Biopdi) emitindo a 470 nm com 37,2 mW de potência óptica, do Laboratório de Microbiologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da FCFAR-UNESP. As densidades de energia (fluências) utilizadas, foram: $1,0 \text{ J.cm}^{-2}$ (D1), $5,0 \text{ J.cm}^{-2}$ (D2) e 10 J.cm^{-2} (D3) nos respectivos tempos de exposição: 27s, 134s e 269s. No desenho experimental das placas, como evidenciado na Figura 7, foi considerando o tempo de análise pós irradiação, sendo uma placa para análise

de 6h e outra 24h logo após a irradiação, a fim de obter análises imuno-enzimáticas mais direcionadas.

Figura 7. Representação esquemática do ensaio de indução do processo inflamatório em células HaCaT onde, CT= Controle; LPS: Lipopolissacarídeo; LED = dose de irradiação de 10 J.cm^{-2} ; D1 = NE/QZ dose de irradiação de 1 J.cm^{-2} ; D2 = NE/QZ dose de irradiação de 5 J.cm^{-2} ; D3 = NE/QZ dose de irradiação de 10 J.cm^{-2} ; CF = Controle de formulação sem irradiação (NE/QZ $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$). Fonte: Autora.



4.14 Ensaio Imunoenzimático – ELISA

Para os ensaios *in vitro*, os níveis de IL-1 , IL-8 e MCP-1 dos sobrenadantes de células foram detectados usando o kit ELISA disponível comercialmente (BD Biosciences, Califórnia, USA), e de acordo com as instruções do fabricante, seguindo o protocolo previamente descrito por Cardoso et al. 2023. Resumidamente, 100 µL de cada um dos padrões, controles e amostras foram carregados em microplacas de poliestireno de 96 poços, contendo 100 µL de diluente de ensaio em triplicata. Após incubação por 2h, as microplacas foram lavadas 4 vezes. Em seguida, 200 µL de soluções conjugadas específicas de IL-6, IL-8 ou MCP-1

humanas foram adicionadas a cada poço por 2h, lavadas e 200 μ L de uma solução de substrato foram adicionados. Após 20 min. de incubação, 50 μ L da solução de parada foram adicionados e a densidade óptica foi lida a 450 nm usando um leitor de microplacas (Molecular Devices, Sunnyvale, CA) com um comprimento de onda de correção de 540 nm, do Laboratório de Morfologia do Departamento de Biologia do IBILCE - UNESP. A concentração de citocinas de cada amostra foi calculada a partir da curva padrão e os dados estatísticos foram analisados utilizando o software Prism®GraphPad versão 8.0. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ desvio padrão (SD) e a análise estatística realizada por análise de variância para comparações múltiplas (ANOVA) seguido do *post test* Dunnett 's. Os valores de *p* inferiores a 0,05 foram considerados para indicar resultados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1 Determinação do tamanho de partícula, índice de polidispersidade, potencial Zeta e estudo de estabilidade

O tamanho das partículas, o índice de polidispersidade (Pdl) e o potencial Zeta (ζ), que fornece a carga superficial, foram determinados utilizando a técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz (*Dynamic Light Scattering* - DLS). A média dos valores de número de partículas obtidas para NC/QZ na concentração de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ e para a NC/Vazia foram expressos como média $\pm$ desvio padrão. Os valores apresentados para NC/QZ e NC/Vazia são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Dados de tamanho médio de partícula, índice de polidispersidade (Pdl) e potencial Zeta das nanocápsulas encapsuladas com Quinizarina (NC/QZ) e sem o ativo (NC/Vazia)

Nanomaterial	Tamanho Médio de Partícula (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
NC/QZ	103,9 (97,9%) $\pm$ 34,510	0,4 $\pm$ 0,028	-31,8 $\pm$ 0,723
NC/Vazia	137,2 (98,0%) $\pm$ 46,104	0,5 $\pm$ 0,058	-35,1 $\pm$ 1,107

Com base nos dados apresentados, ambos os nanomateriais sintetizados (NC/QZ e NC/Vazia) apresentaram um perfil satisfatório, sendo o esperado para os sistemas coloidais poliméricos submicrônicos. Os valores de Pdl próximo a 0,4 mostram uma tendência a polidispersão dos sistemas, indicando uma possível aglomeração e/ou variação do tamanho das partículas. Entretanto, os percentuais de número de partículas (97,9 %) na região do tamanho médio predominante, indicam um sistema com baixa variação relativa à maior distribuição de partículas.

Os valores médios dos tamanhos de partícula, Pdl e Potencial Zeta observados para os sistemas nanoencapsulados desenvolvidos evidenciam um potencial estabilidade durante o tempo de análise, como mostrado nas Figuras 8 e 9, durante o período de 61 dias após a síntese.

Figura 8. Estudo de estabilidade monitorando-se o tamanho de partículas, Pdl (A) e potencial Zeta (B) em função do tempo para NC/Vazia

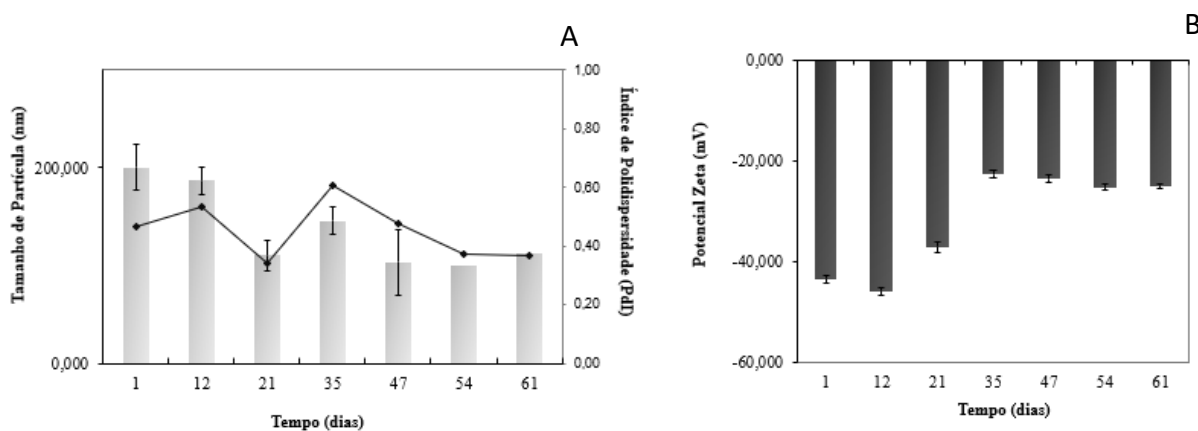
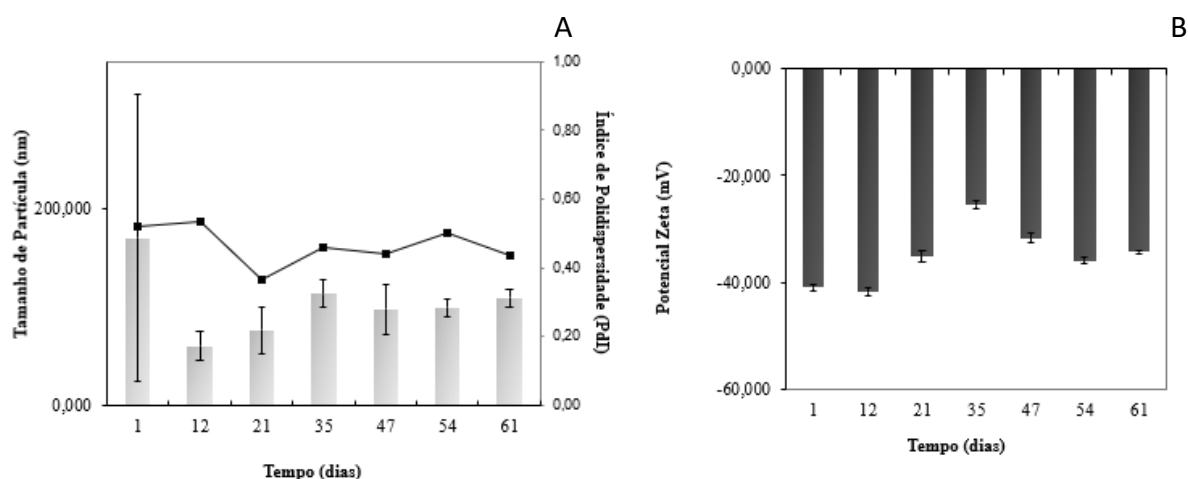


Figura 9. Estudo de estabilidade monitorando-se o tamanho de partículas, Pdl (A) e potencial Zeta (B) em função do tempo para NC/QZ.



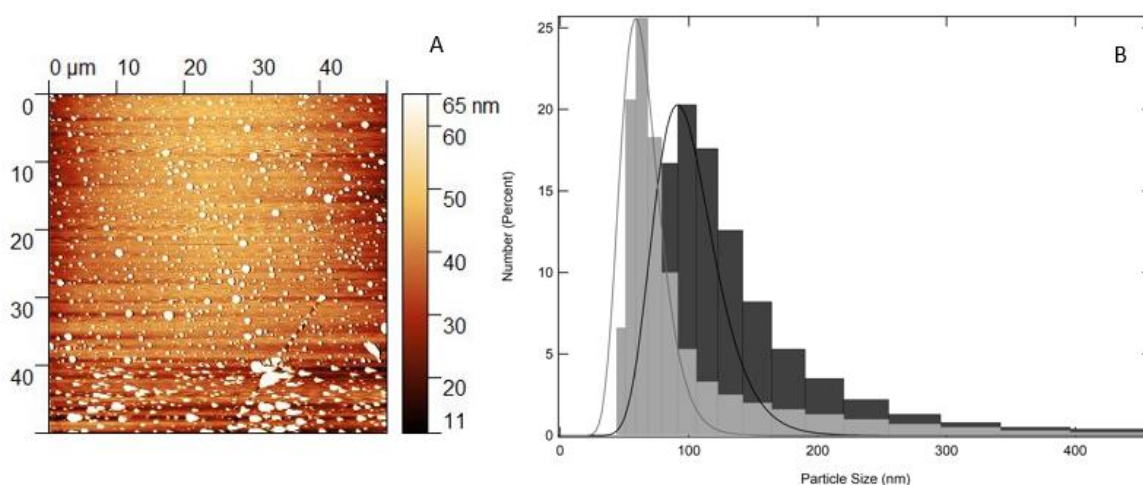
A determinação da estabilidade dos sistemas nanométricos é de extrema importância, sendo parâmetros requeridos para a aplicação dos nanomateriais em aplicações farmacêuticas e industriais, sendo que diversas forças como repulsão eletrostática, flutuabilidade, gravidade e atração de van der Waals (VDW) podem

acabar influenciando a estabilidade dos sistemas (DANESHFAR; ASHOORI; SOULGANI; 2023).

5.2 Análise por Microscopia de Força Atômica (MFA)

A análise topográfica bidimensional panorâmica MFA das NC/QZ, apresentadas na Figura 10 – A, apresenta imagens nítidas de partículas com formato esférico bem definido, com tamanho e morfologia dentro do esperado, com valores de tamanho médio de partícula de 65 nm. De forma comparativa podemos correlacionar os resultados com as análises prévias realizadas pela técnica do DLS, como mostrado na Figura 10 – B. Estes resultados indicam que as partículas analisadas apresentaram tamanho de partícula diferenciados, sendo maior em DLS do que a análise no MFA. Entretanto isso se dá devido ao fato de o *DLS* medir o raio hidrodinâmico da partícula ou raio de solvatação. Assim, a análise obtida através do MFA confirma o tamanho médio de partícula próximo ao real, esperado para sistemas poliméricos nanoestruturados, apresentando ainda morfologia esférica característica do sistema desenvolvido.

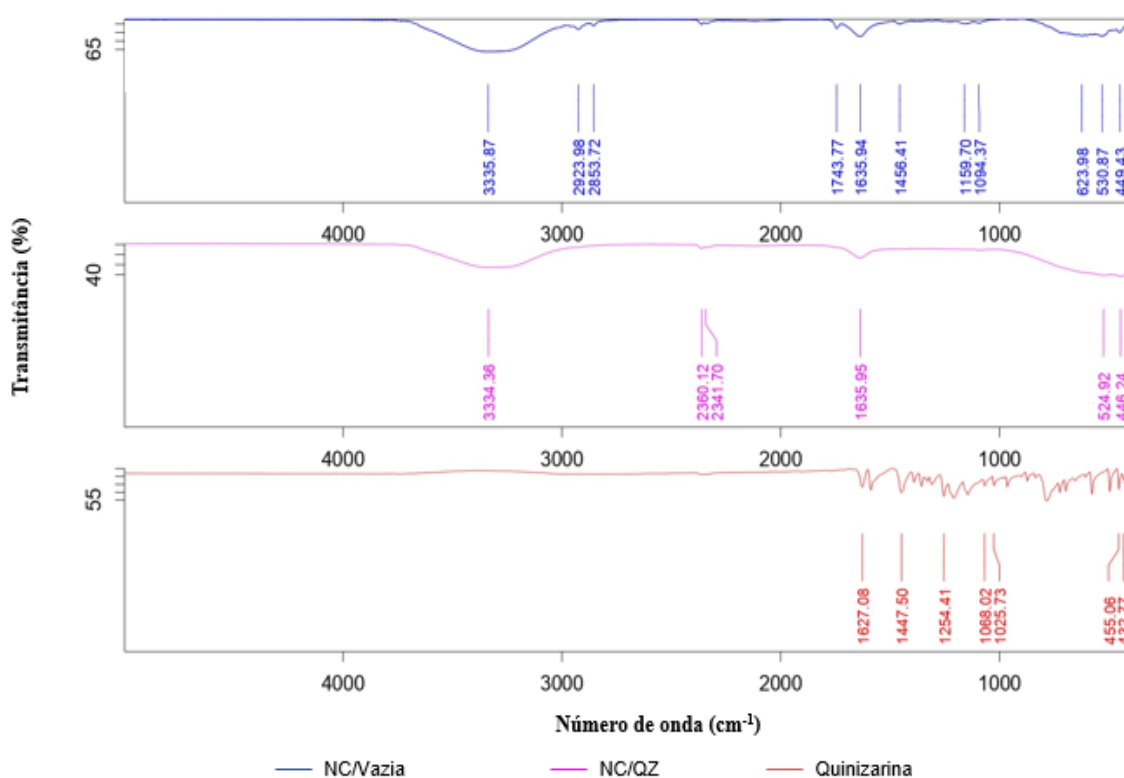
Figura 10. Fotomicrografia bidimensional das NC/QZ obtido através da técnica de MFA (A) e histograma evidenciando a distribuição de tamanho obtido por método do DLS (B) das NC/Vazia (cinza) e NC/QZ (preto).



5.3 Determinação do espectro de absorção no infravermelho por Transformada de Fourier – FTIR

A análise de absorção no Infravermelho por FTIR está apresentada na Figura 11. Foram observados picos característicos de interações presentes na molécula da Quinizarina, como ligações C=C em aromáticos (1600), anéis aromáticos (900 – 770) e grupamento O-H (~ 920). Ainda, foram observados picos exclusivos dos compostos nanoencapsulados, resultado da interação com o PLGA o qual apresenta grupamento OH associado (3600 – 3200).

Figura 11. Espectro de absorção no Infravermelho por Transformada de Fourier para a QZ livre, NC/QZ e NC/Vazia, utilizando como background o ar.



A análise através da técnica vibracional por FTIR é extremamente útil na caracterização de materiais puros, identificando diferentes grupos funcionais presentes na molécula, determinando suas funções e possíveis modificações

estruturais na molécula. A técnica é baseada na identificação dos grupos funcionais através da vibração que ocorre quando irradiados em comprimentos de onda específicos (BINISH et al., 2022). Como observado na quantificação realizada, não houve modificações estruturais resultantes da associação dos compostos utilizados no desenvolvimento das nanocápsulas, sendo observados todas as interações químicas características de cada composto.

5.4 Determinação dos espectros de absorção e emissão de fluorescência 2D e 3D UV/Vis no estado estacionário

O perfil bidimensional dos espectros de absorção e emissão da QZ e NC/QZ foram obtidos através de estudos de espectroscopia de absorção e emissão de fluorescência nos UV/Visível, como mostrado nas Figuras 12 e 13, respectivamente. O perfil de absorção máxima foi obtido a 477 nm e o espectro de emissão com um máximo de 568 nm a partir da excitação fixa fixada a 470 nm. Ainda, são apresentados os perfis tri-dimensionais (3D) de fluorescência da Quinizarina livre e NC/QZ, evidenciado nas Figuras 14 e 15 respectivamente.

Figura 12. Espectro de absorção no UV/Vis da NC/QZ em meio orgânico homogêneo acetonitrila (NC/ACN) e da QZ no respectivo meio (QZ/ACN), com máximo de absorção em 477 nm, onde A: análise padrão e B: análise normalizada.

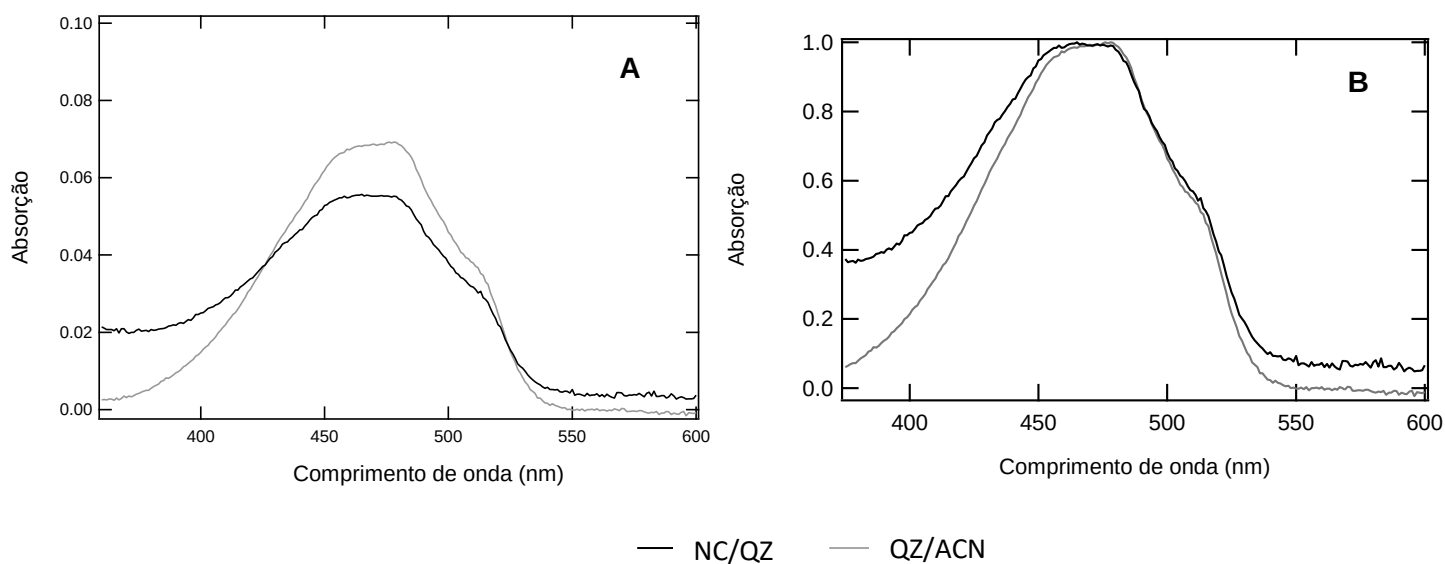


Figura 13. Espectro de emissão de fluorescência 2D no UV/Vis da NC/QZ e da QZ em meio homogêneo acetonitrila (QZ/ACN), apresentando comprimento de onda de excitação em 470 nm, emissão 568 nm e fendas espectrais 3,0/3,0 nm respectivamente, onde A: análise padrão e B: análise normalizada.

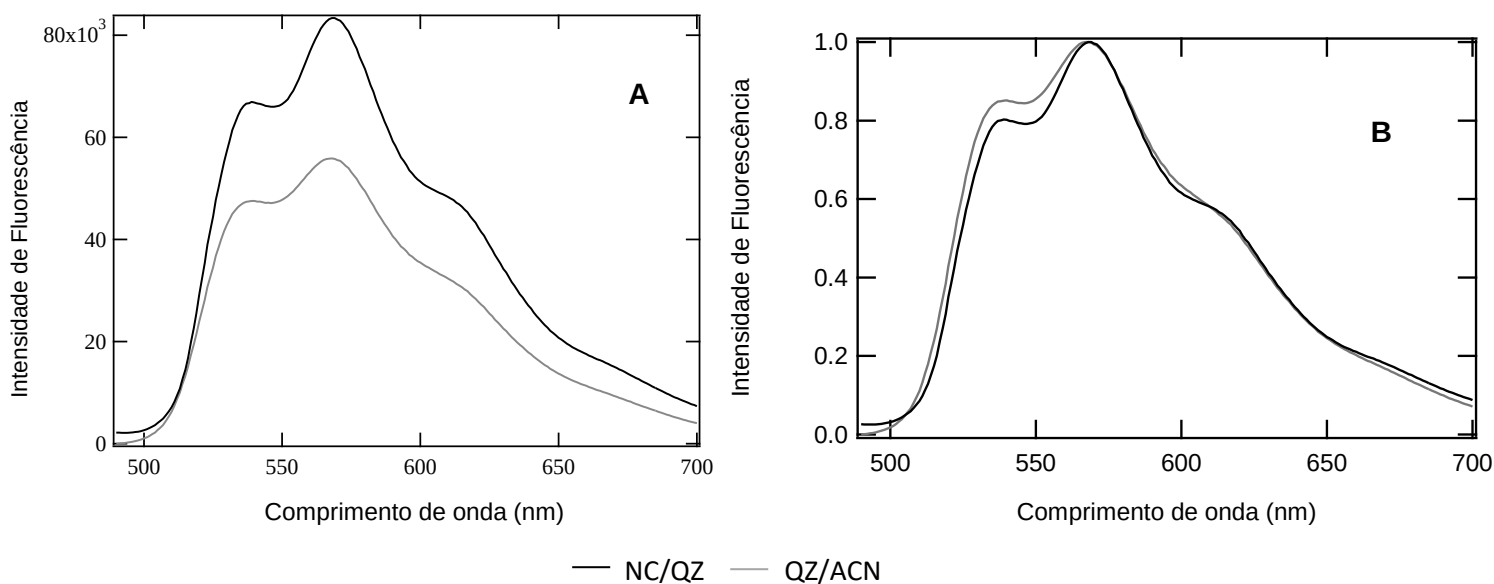


Figura 14. Espectro de emissão de fluorescência 3D no UV/Vis da QZ livre em meio homogêneo acetonitrila (QZ/ACN), apresentando comprimento de onda de excitação entre 400 – 550nm , emissão entre 525 – 679nm e fendas espectrais 1,5/3,0 nm respectivamente.

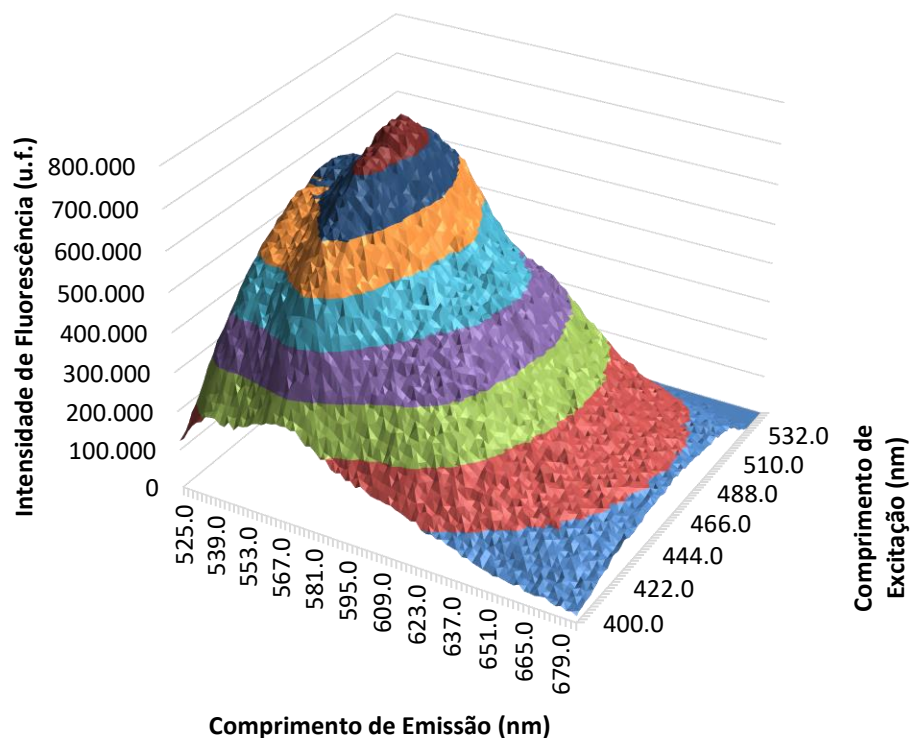
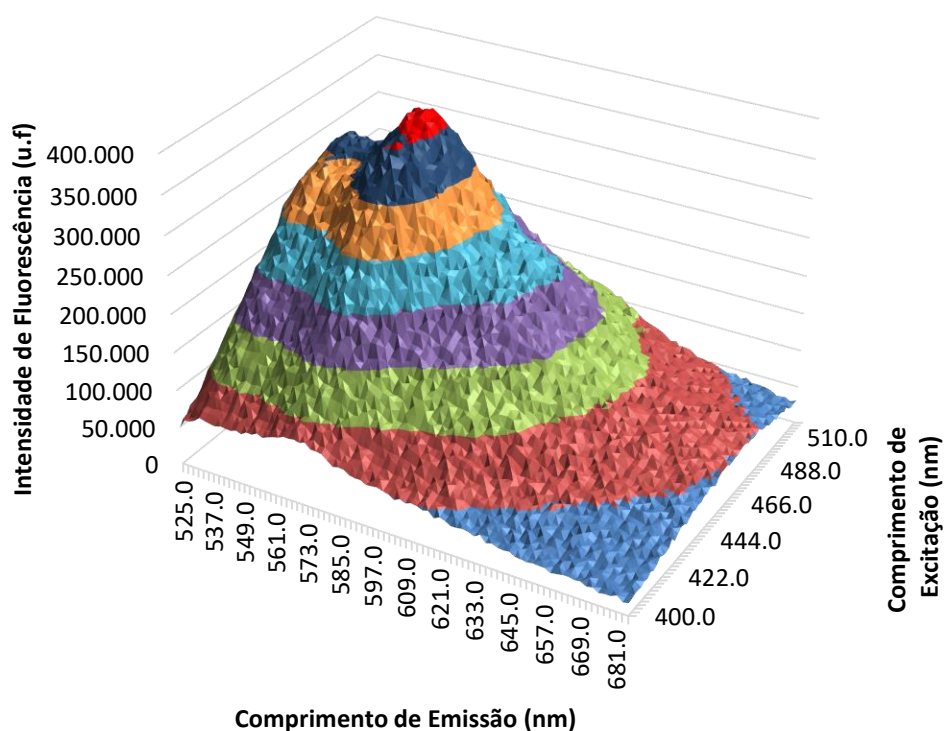


Figura 15. Espectro de emissão de fluorescência 3D no UV/Vis da NC/QZ livre em meio homogêneo acetonitrila, apresentando comprimento de onda de excitação entre 400 – 550nm , emissão entre 525 – 679nm e fendas espectrais 1,5/3,0 nm respectivamente.



A análise dos compostos é de suma importância, facilitando a sua caracterização e identificação de possíveis modificações. O método de fluorescência, quando comparados aos outros métodos espectrais, têm apresentado vantagens significativas, devido à sua simplicidade, velocidade, alta sensibilidade, com destaque para a espectroscopia de fluorescência em 3D, a qual mede espectros de emissão em um *range* de comprimentos de onda de excitação, permitindo uma identificação mais extensa das amostras, se tornando uma ferramenta poderosa na classificação e identificação das substâncias (LONG et al., 2023; PAN et al., 2021).

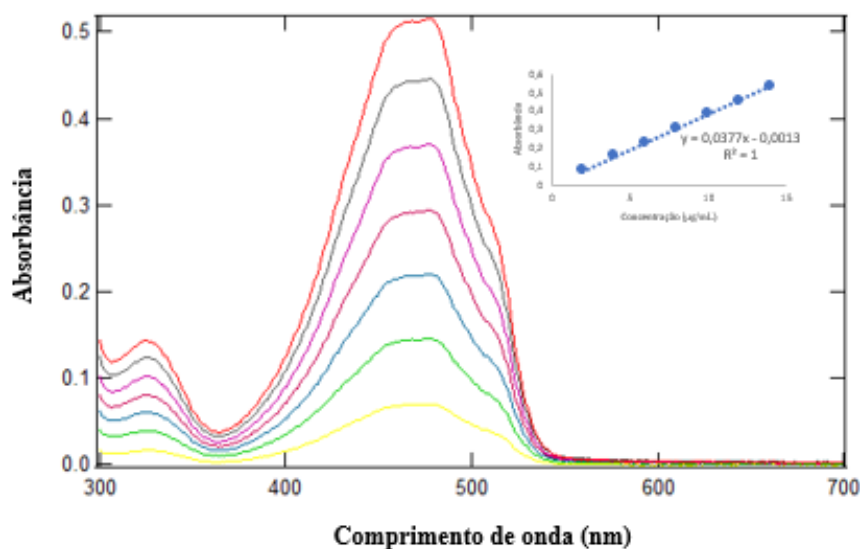
É possível observar que não houve mudanças significativas nos perfis de absorção e fluorescência 2D e 3D da QZ livre quando comparada com a forma nanoencapsulada, não havendo reação do ativo com os componentes utilizados para o preparo do sistema nanoestruturado, promovendo suporte para a utilização da NC/QZ em testes futuros.

Importante destacar que a manutenção das propriedades fotofísicas do FS no estado fundamental é um fator de extrema importância para moléculas que são utilizadas em TFD, visto a necessidade de garantida de absorção na região visível do espectro-eletromagnético no melhor comprimento de onda de excitação. Destacamos também a região de maior penetração biológica dos feixes de luz de fotoativação, que foi denominada anteriormente de “janela terapêutica” (600 nm – 800 nm). Entretanto com o avanço dos dispositivos médicos para emissão de luz de excitação, como os LEDs e LASERS biomédicos, tem-se uma melhor penetração tecidual e eficácia em comprimentos de onda abaixo de 600 nm (400 nm – 600 nm).

5.4 Desenvolvimento do método espectro-analítico

Através do método analítico de absorção em UV/vis foi delineada a curva padrão analítica, com equação da linha $y = 0,0377x - 0,0013$, $R^2 = 1$, $n = 3$, como apresentado na Figura 16. O método foi realizado como estabelecido pela Resolução da Diretoria Colegiada - RDC N°166 publicada em 25 de Julho de 2017 para a validação de métodos analíticos.

Figura 16. Curva de espectro de absorção de QZ livre em 477 nm correlacionando a máxima absorção e a concentração em ACN variando de 2 – 14 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ com equação da reta $y = 0,0377x - 0,0013$, $R = 1$.



Os modelos lineares para curva de calibração são criados com base na minimização de erros de mínimos quadrados, com sua qualidade de ajuste utilizando o quadrado do coeficiente de correlação (R^2), sendo essencial para a conversão dos sinais da instrumentação analítica em concentração, utilizado para análise de outros analitos. O valor de R^2 evidencia a correlação entre os dados apresentados, sendo baseado no erro absoluto da variável dependente, sendo 1 o ajuste “perfeito” e 0 indicando nenhuma correlação entre os dados analisados (LOGUE; MANANDHAR; 2018).

5.5 Quantificação do teor total de quantificação

A fim de quantificar teor total de ativo na nanocápsula, a curva analítica foi utilizada a fim de proporcionar as concentrações de Quinizarina presente. Como apresentado na Tabela 2, é possível observar que foi obtido um percentual de 99,02% de ativo dentro da nanoestrutura, valor altamente satisfatório uma vez que altas taxas de Quinizarina estão associadas ao sistema. O parâmetro utilizado foi a concentração teórica de quinizarina presente na amostra, sendo 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabela 2. Teor total de QZ em nanocápsulas.

	Quantificação ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)				%
	1	2	3	Média	
NC/QZ	101,19	100,00	95,88	99,02 $\pm$ 2,71	99,02

A partir da curva de correlação ($y = 0,0377x - 0,0013$, $R^2 = 1$, $n = 3$) foi possível a quantificação da concentração real de Quinizarina associada a NC/QZ, sendo extremamente importante para o desenvolvimento dos ensaios subsequentes os quais necessitam da concentração correta do ativo para análise em ensaios biológicos, como o ensaio de Citotoxicidade, *Uptake celular* e TFD.

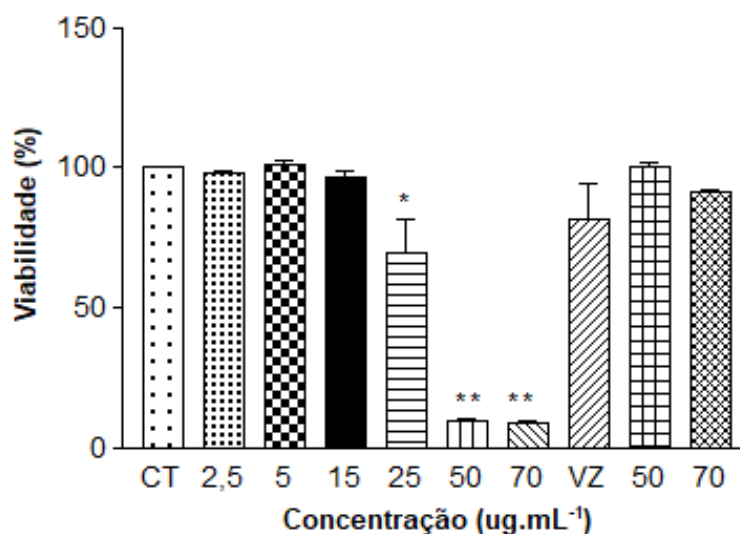
5.6 Ensaio de citotoxicidade - Método fotolorimétrico utilizando Resazurina em linhagem de células de fibroblasto de murinho NIH/3T3

Os ensaios de viabilidade celular utilizando as células NIH/3T3 foram utilizados como testes preliminares para análise da citotoxicidade do material. A determinação da citotoxicidade pode ser realizada através de alguns métodos clássicos, como MTT, Vermelho Neutro e Resazurina. Contudo, tanto o MTT quanto o Vermelho Neutro podem levar a interferências devido a precipitação dos sais,

formação de cristais e utilização de solventes químicos, enquanto a utilização da Resazurina não provoca a lise da célula ao ser internalizada, podendo ser utilizada em conjunto com outros testes, apresentando ainda elevada intensidade de fluorescência, facilitando a quantificação (MCGAW et al., 2014).

Os resultados do estudo são apresentados na Figura 17, na qual foi observada a ausência de citotoxicidade nas concentrações de 2,5, 5 e 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ utilizando as seguintes amostras: NC/QZ, QZ livre (50 e 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e na NC/Vazia a 50% (v/v) (IC50). Nas concentrações mais elevadas de NC/QZ (25, 50 e 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) verificou-se uma diminuição na viabilidade celular, de aproximadamente 30% (25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e 90% (50 e 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A concentração de 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ foi escolhida para o desenvolvimento dos ensaios biológicos investigativos sequenciais como descrito na seção 5.7, sendo esta concentração considerada o limiar de segurança *in vitro*.

Figura 17. Ensaio de Citotoxicidade *in vitro* de NC/QZ, NC/Vazia e QZ livre em linhagens de fibroblastos de murino NIH/3T3 (ATCC® CRL-1658) nas concentrações de 2,5; 5; 15; 25; 50; 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (NC/QZ), NC/Vazia a 50% (v/v) e QZ livre nas concentrações de 50 e 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Foi determinado significância estatística através do teste de análise de variância One-way ANOVA, com 95% de significância, seguido de pós teste Tukey para múltiplas comparações (* $p < 0,05$, ** $p < 0,001$).

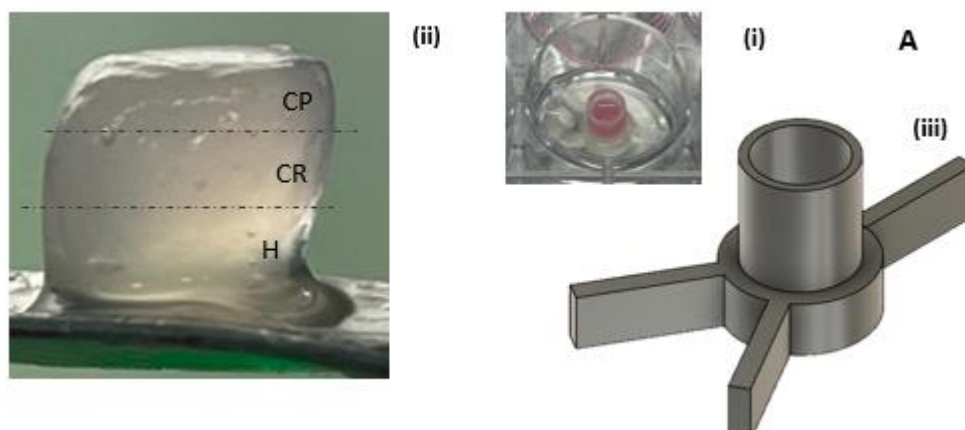


Os estudos de citotoxicidades são muito importantes e necessários para se avaliar o perfil de compatibilidade biológica *in vitro* de ativos e compostos com potencial de aplicação biológica. Além disso são ensaios que propiciam a determinação de importantes parâmetros de desenvolvimento nanotecnológicos, como os IC10 e IC50 que são exatamente as concentrações inibitórias que induzem a redução de 10% e 50% na viabilidade celular respectivamente.

5.7 Permeação das NC/QZ em MEC de equivalente dérmico e em pele de porco

A fim de avaliar a permeação do sistema nanotecnológico (NC/QZ) desenvolvido, foram utilizados como modelo um tipo de MEC aplicada no desenvolvimento de equivalente de pele 3D, apresentada na Figura 18, e pele de porco comercial. As análises foram conduzidas a fim de avaliar a permeação após 24h, utilizando os parâmetros de excitação e emissão de fluorescência da Quinizarina, determinados no tópico 5.4. A concentração utilizada das nanocápsulas foi a de 15µg/mL, definida em experimento de citotoxicidade como limiar de segurança do fármaco.

Figura 18. Design da Matriz Extracelular (MEC) desenvolvida: (i) ilustração sistemática do posicionamento da MEC junto com acessório (iii) utilizado para concentrar a amostra somente na parte superior. (iii) Modelo desenvolvido através do método layer by layer formando as seguintes camadas: Camada Papilar (CP 2:1 Colágeno:Pectina), Camada Reticular (CR 2:1 Colágeno:Pectina) e Hipoderme (H 1:1 Colágeno:Pectina).



As análises de fluorescência evidenciaram a permeação das NC/QZ em todas as camadas da MEC (Figura 19) e na pele de porco (Figura 20), onde foi possível observar sinal de fluorescência característicos da formulação desenvolvida, sendo um dos principais efeitos desejados e que justificam a utilização da nanotecnologia para aplicação biológica. Ainda, em comparação com controle desenvolvido, onde foi realizada a permeação somente com DMEM, não foi evidenciado sinal de fluorescência significativo, como indicado nas Figuras apresentadas.

Figura 19. Ensaio para análise de intensidade de fluorescência em Matriz Extracelular (MEC) em cortes transversais, onde A: Análise realizada em leitor de microplacas, sendo determinado o sinal de fluorescência direto (i) com excitação e emissão em 470nm/568nm respectivamente, tanto do controle somente com DMEM (ii) e das NC/QZ (15µg/mL) (iii) e B: Imagem das MEC internalizadas com NC/QZ (15µg/mL) obtidas na faixa de emissão de fluorescência da GFP através do microscópio EVOS M5000.

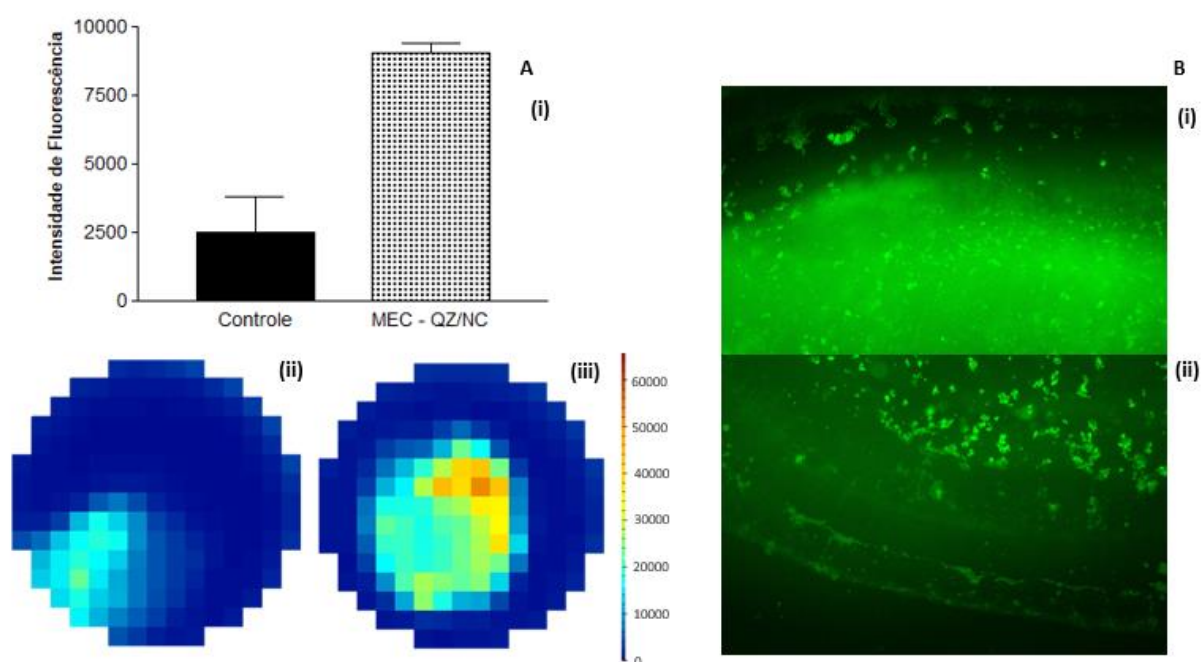
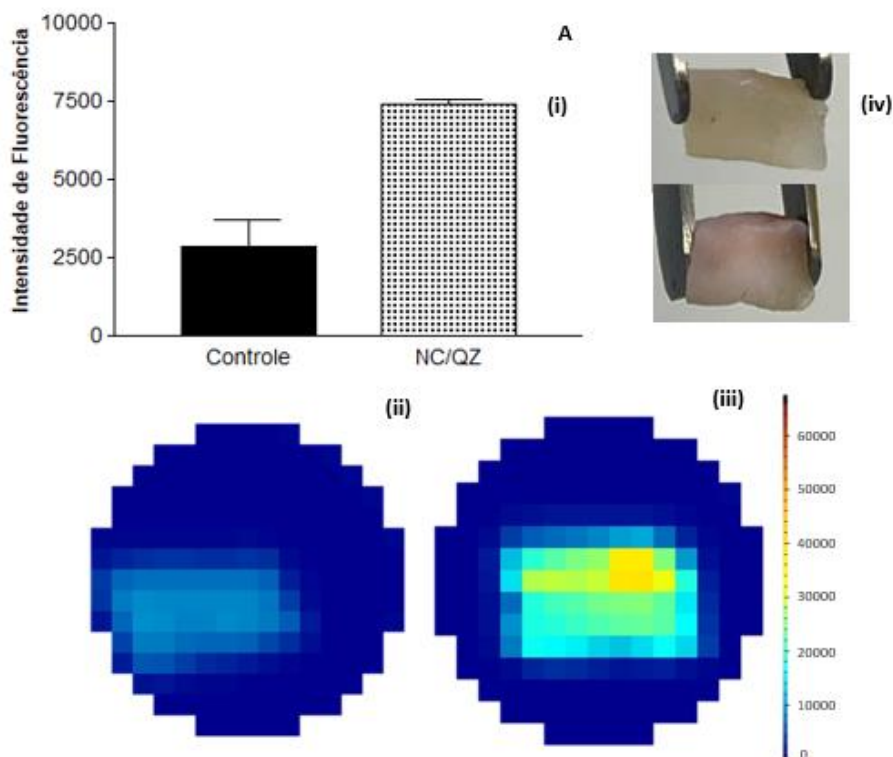


Figura 20. Ensaio para análise de intensidade de fluorescência em cortes transversais de pele de porco (iv) a qual foi realizada em leitor de microplacas, sendo determinado o sinal de fluorescência direto (i) com excitação e emissão em 470nm/568nm respectivamente, tanto do controle somente com DMEM (ii) e das NC/QZ (15µg/mL) (iii).

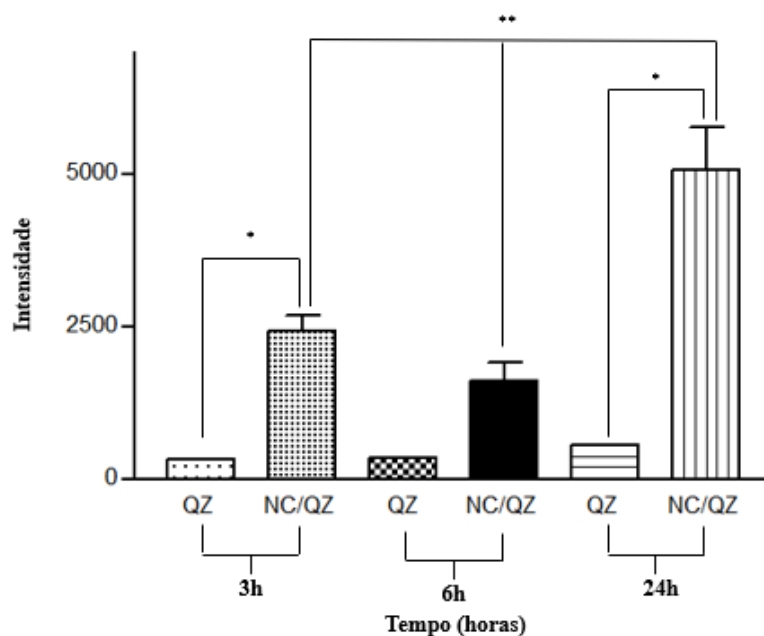


5.8 Determinação do tempo de internalização (*Uptake* celular)

A fim de determinar o melhor tempo para incubação nas células HaCaT com os nanomateriais desenvolvidos (NC/QZ) foi realizado o estudo de *uptake* celular, no qual foram analisados três diferentes tempos de incubação (3, 6 e 24 horas) na concentração de 15 µg.mL⁻¹.então, de modo comparativo, a intensidade de fluorescência da QZ livre e em NC.). Com os resultados são apresentados na Figura 21, é possível observar uma maior internalização celular para NC/QZ quando comparadas a QZ livre, demonstrando o efeito desejado de aumento da internalização citoplasmática do ativo nanocarreado. O efeito de nanoestruturação melhora a interação biológica, aumentando a biodisponibilidade do ativo com maior especificidade, e maior permeação nas células, devido ao aumento das

propriedades reativas, promovendo interações com a membrana celular por mecanismos específicos de fagocitose, como a pinocitose. Estes são considerados os principais fatores que ampliam o *uptake celular* nestas condições, além de favorecer a biocompatibilidade e, principalmente, aumentar a atividade biológica (fotodinâmica) desejada. Outro dado obtido no ensaio da Figura 21 foi o melhor tempo de incubação relativo às melhores taxas de internalização do ativo. Conforme os resultados a seguir o tempo de 24h apresentou uma intensidade de fluorescência de QZ bem superior aos tempos anteriores, indicando uma internalização 9x maior que as demais.

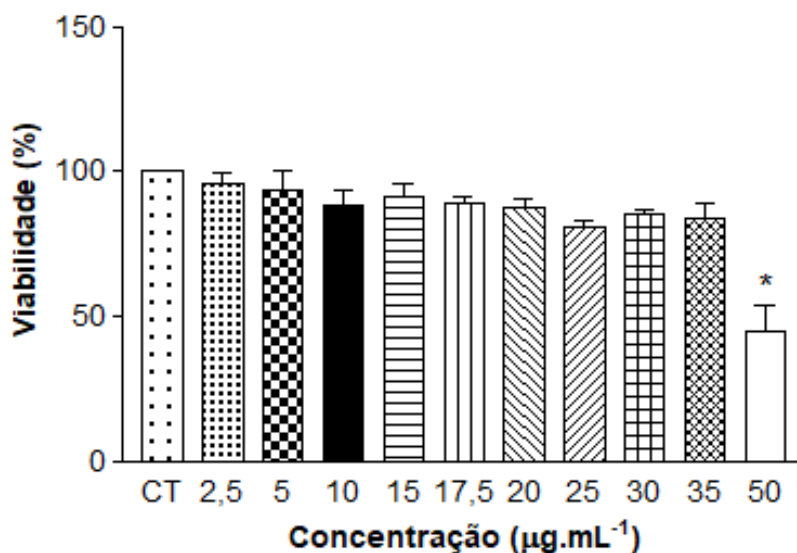
Figura 21. Estudo de uptake celular em células HaCaT na concentração de $15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em PBS avaliando a internalização celular da Quinizarina livre (QZ) e da mesma nanoencapsulada (NC/QZ) nos tempos de 3, 6 e 24 horas. Foi determinado significância estatística através do teste de análise de variância One-way ANOVA, com 95% de significância, seguido de pós teste Tukey para múltiplas comparações, onde *diferença estatística obtida entre QZ e NC/QZ, **diferença estatística obtida entre NC/QZ nos três tempos testados.



5.9 Ensaio de citotoxicidade - Método fotolorimétrico utilizando Resazurina em linhagem de células de queratinócitos humano (HaCaT)

Após a determinação do tempo de incubação para as células HaCaT, o teste de citotoxicidade utilizando o método da Resazurina como descrito na seção 4.11 foi realizado novamente, a fim de analisar a toxicidade apenas da NC/QZ no modelo *in vitro* escolhido para desenvolver o modelo de indução do processo inflamatório. Foram testadas as seguintes concentrações: 2,5; 5; 10; 15; 17,5; 20; 25; 30; 35 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Foram realizadas análises estatísticas subsequentes e os resultados estão apresentados na Figura 22.

Figura 22. Ensaio de Citotoxicidade *in vitro* de NC/QZ na concentração de 0,1 mg.mL⁻¹ de QZ em linhagens de queratinócitos humano HaCaT (HaCaT – cell line service) nas concentrações de 2,5; 5; 10; 15; 17,5; 20; 25; 30; 35 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (NC/QZ). Foi determinada significância estatística através do teste de análise de variância *One-way* ANOVA, com 95% de significância, seguido de pós teste Tukey para múltiplas comparações (*p<0,05).



Como evidenciado pela Figura 20, os resultados da análise estatística *One-way* ANOVA, mostram ausência de citotoxicidade para as concentrações entre 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 35 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, com viabilidade celular acima de 70%. A redução da viabilidade somente foi observada na maior concentração de NC/QZ testada

(50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), na qual foi possível observar uma diminuição de mais de 50%. Os resultados obtidos demonstram que a NC/QZ apresenta compatibilidade no *range* de concentração especificado, o qual não apresentou diminuição da viabilidade celular, podendo ser utilizado em protocolos com aplicação biológica e ensaios subsequentes futuros para avaliação de atividade fotodinâmica em modelos de processo inflamatório *in vitro*.

5.10 Indução do processo inflamatório em queratinócitos humanos com aplicação de Terapia Fotodinâmica e posterior Ensaio Imunoenzimático.

A indução do processo inflamatório foi desenvolvida como descrito na seção 4.13, com posterior análise através do ensaio imunoenzimático – ELISA, descrito na seção 4.14. Foram realizadas análises estatísticas após o ensaio, sendo o resultado apresentado nas Figuras 23, 24 e 25.

Citocinas consistem em pequenas proteínas secretadas em cascata, pelas células como resposta a um processo inflamatório, apresentando efeito nas interações e comunicação entre as células. No estudo desenvolvido foram analisadas as seguintes citocinas pró-inflamatórias: Interleucina IL–1 β (citocina pró-inflamatória essencial na resposta inflamatória e defesa das células, além de exacerbar danos em doenças crônicas e lesões agudas em tecidos (LOPEZ-CASTEJON; BROUGH, 2011)); Interleucina IL–8 (quimiocina responsável pelo estímulo migratório de neutrófilos e outras células imunes para o local da inflamação (EL AYADI; HERNDON; FINNERTY, 2018), e também estimular a proliferação celular dos queratinócitos (GILLIRTZER et al., 1991) e proteína quimiotática de

monócitos-1 MCP-1 (responsável pela regulação da liberação de monócitos/macrófagos no local de inflamação (DESHMANE et al., 2009)

Figura 23. Ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) para análise de citocinas IL-1 β em Queratinócitos Humanos (HaCaT – cell line service) sendo A = análise 6h após a irradiação e B = análise 24h após irradiação, onde: CT = Controle; LPS = Lipopolissacarídeo; LED = dose de irradiação de 10 J.cm⁻²; D1 = NE/QZ dose de irradiação de 1,0 J.cm⁻²; D2 = NE/QZ dose de irradiação de 5 J.cm⁻²; D3 = NE/QZ dose de irradiação de 10 J.cm⁻²; CF= Controle de formulação (NE/QZ 15 μ g.mL⁻¹). A significância estatística foi determinada através do teste de análise de variância *One-way ANOVA*, com 95% de significância, seguido de *post hoc test* Dunnett 's.

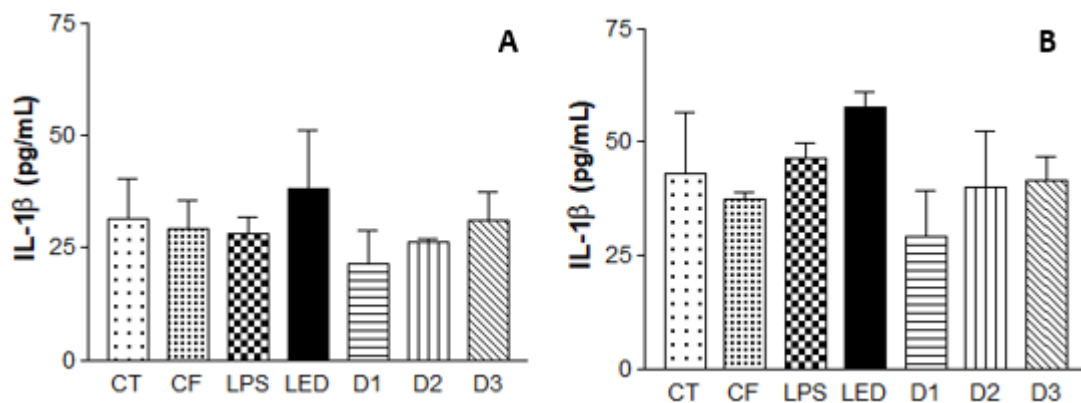


Figura 24. Ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) para análise de citocinas IL-8 em Queratinócitos Humanos (HaCaT – cell line service) sendo A= análise 6h após a irradiação e B = análise 24h após irradiação, onde: CT= Controle; LPS = Lipopolissacarídeo; LED = dose de irradiação de 10 J.cm⁻²; D1 = NE/QZ dose de irradiação de 1,0 J.cm⁻²; D2 = NE/QZ dose de irradiação de 5 J.cm⁻²; D3 = NE/QZ dose de irradiação de 10 J.cm⁻²; CF = Controle de formulação (NE/QZ 15 μ g.mL⁻¹). A significância estatística foi determinada através do teste de análise de variância *One-way ANOVA*, com 95% de significância, seguido do *post hoc test* Dunnett 's.

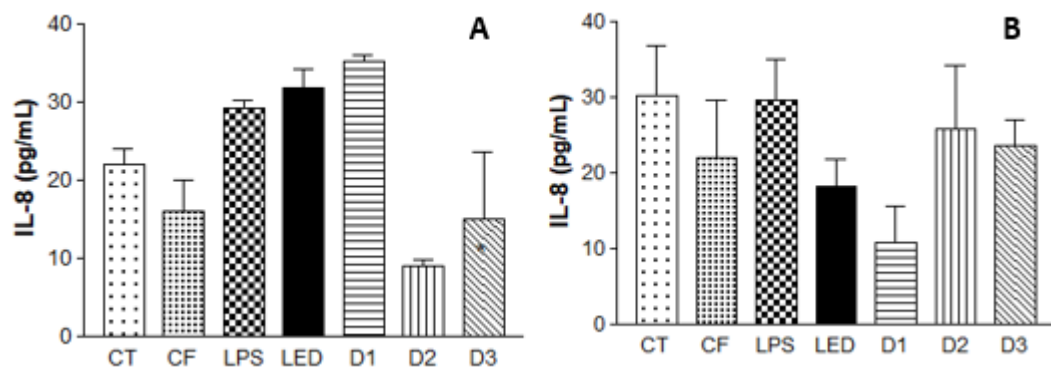
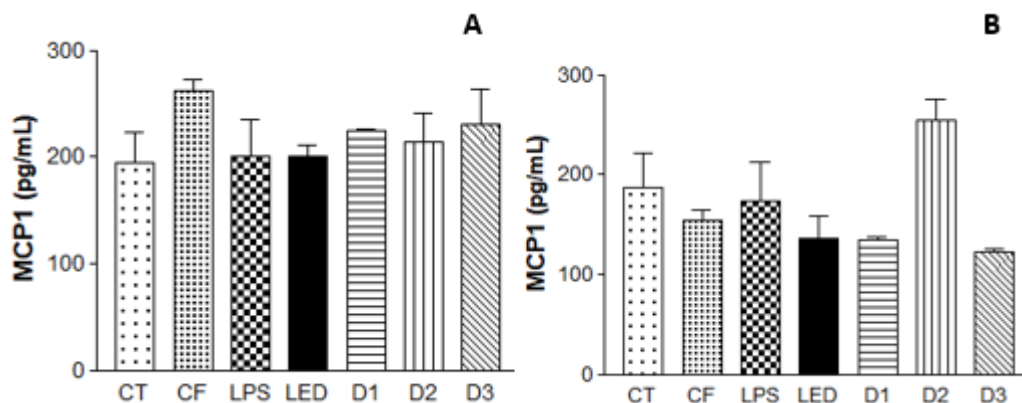


Figura 25. Ensaio imunoenzimático ELISA (*Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*) para análise de Proteína quimiotática de monócitos 1 - MCP1 Queratinócitos Humano (HaCaT – cell line service), sendo A = análise 6h após a irradiação e B = análise 24h após irradiação, onde: CT= Controle; LPS = Lipopolissacarídeo; LED = dose de irradiação de 10 J.cm⁻²; D1 = NE/QZ dose de irradiação de 1,0 J.cm⁻²; D2 = NE/QZ dose de irradiação de 5 J.cm⁻²; D3 = NE/QZ dose de irradiação de 10 J.cm⁻²; CF = Controle de formulação (NE/QZ 15µg.mL⁻¹). A significância estatística foi determinada através do teste de análise de variância *One-way ANOVA*, com 95% de significância, seguido do *post hoc test* Dunnett's.



Através da análise das Figuras 23, 24 e 25 é possível observar a indução do processo inflamatório, onde as células HaCaT induzidas através de LPS, expressaram a produção de citocinas IL-1 β , IL-8 e MCP1. É relevante destacar que em todos os resultados apresentados, é possível observar níveis altos da expressão de citocinas no controle denominado "LPS", o qual possui apenas células HaCaT e LPS, indicando assim, o desencadeamento do processo inflamatório *in vitro*. Com relação ao efeito da TFD, observa-se que a terapia apresentou efeito positivo comparado com os LED e a formulação, evidenciando o efeito sinérgico entre o uso da nanotecnologia e da aplicação do LED.

6. DISCUSSÃO

A determinação dos parâmetros físico-químicos é extremamente importante, descrevendo o nanomaterial e avaliando o seu comportamento quando inserido em ambiente biológico. O tamanho das partículas, o índice de polidispersidade e o potencial Zeta são análises fundamentais que descrevem as nanopartículas (VARENNE et al., 2017). Estes parâmetros, associados ao índice de polidispersidade (Pdl) indicam a estabilidade dos nanomateriais que é concebida a partir de um melhor desempenho em comparação com os macromateriais aplicados em uso biológico (SOUTO et al., 2022). A estabilidade de sistemas nanoencapsulados é fundamental para aplicações bem direcionadas, sendo a estabilidade cinética relacionada diretamente com a manutenção dessa propriedade ao longo do tempo. Alguns fenômenos físico-químicos podem afetar a estabilidade, como a separação gravitacional, floculação, coalescência e amadurecimento de Oswald, sendo que todos são influenciados pela energia livre positiva presente na interface (fase aquosa e oleosa), uma vez que o sistema é considerado dinâmico, as gotículas colidem frequentemente desencadeando a instabilidade (DE CARLI, 2017).

Características como o tamanho de partícula são essenciais para o desenvolvimento de nanomateriais efetivos para aplicação tópica, considerando a permeação cutânea (SOUTO et al., 2022). Partículas com tamanho em nanoescala tendem a penetrar de forma facilitada através da pele, alcançando a circulação sistêmica (GHASEMIYEH; MOHAMMADI-SAMANI, 2020). Os resultados destas análises mostraram que as formulações poliméricas (NC/QZ e QZ/Vazia) apresentam os parâmetros físico-químicos desejados, com um tamanho de partícula submicrônico, o que tende a facilitar a permeação da partícula dentro do tecido. A

análise do potencial Zeta mostra uma superfície carregada negativamente, com valores estáveis dentro do período de análise. A carga superficial é resultado dos grupos ionizáveis a partir de fosfolipídios e ácidos graxos livres, os quais podem causar a carga negativa de um revestimento superficial (SIQUEIRA-MOURA et al., 2013). O resultado obtido através da análise de MFA apresentou o perfil topográfico das nanocápsulas desenvolvidas, as quais apresentam ausência de deformações na superfície, indicando uma partícula homogênea e formada apenas pelo PLGA, o qual recobre a nanocápsula. Ainda, a imagem evidenciou um tamanho de partícula com excelente correlação com os tamanhos hidrodinâmicos obtidos pela técnica do DLS, como também indicado em estudos realizados por Dols-Perez et al.(2023).

A análise de FTIR demonstrou a presença de grupos funcionais característicos da Quinizarina e do poli (L-ácido láctico-co-ácido glicólico) – PLGA, destacando a presença desses grupos após a associação do ativo ao nanomaterial, podendo afirmar que não houve mudanças significativas. Os resultados da emissão e absorção de fluorescência mostram a ausência de alterações nas propriedades espectroscópicas do estado estacionário da QZ quando comparado a forma livre e nanoencapsulada, mantendo o espectro de emissão com o máximo a 568 nm, com excitação fixa a 470 nm e o perfil de absorção máxima a 477 nm. Portanto, o processo de nanoencapsulação não alterou este perfil espectral do fotossensibilizador, sendo assim, QZ e NC/QZ podem ser aplicados em protocolos de TFD (AMANTINO et al., 2020). Através do desenvolvimento da curva de correlação, foi possível obter um coeficiente de determinação satisfatório $R^2 = 1$, sendo possível a quantificação da concentração real de QZ associada à nanocápsula, com valor de 99,02% de teor total, indicando uma alta eficiência no desenvolvimento da nanocápsula, sendo um fator crucial para o delineamento dos

ensaios subsequentes *in vitro*, os quais necessitam da concentração real do ativo para a definição das concentrações a serem testadas para a internalização e citotoxicidade. Gobo et al., (2022) realizou estudos com nanocápsulas incorporadas em um sistema *spray-dryer* utilizando a Quinizarina como core do sistema desenvolvido. Foram encontrados resultados altamente favoráveis e em concordância com o apresentado, onde os autores também não observaram alterações no perfil da molécula pós encapsulação, com elevada taxa de associação (72,3%), o que é satisfatório para os estudos subsequentes *in vitro*.

Os testes *in vitro* permitem análises prévias da citotoxicidade do medicamento, precedendo estudos *in vivo* (REZENDE et al., 2019). Além disso, esses resultados são fundamentais em estudos de TFD para assegurar que a morte celular é causada por processos fotodinâmicos e não pela citotoxicidade do composto ou formulação, determinando uma concentração ideal para utilização (AMANTINO et al., 2020). Os resultados obtidos com a linhagem de células NIH/3T3 mostraram uma ausência de citotoxicidade para o NC/Vazia (50% v/v), nas concentrações de 2,5, 5 e 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de NC/QZ e QZ livre (50 e 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), sendo a concentração de 15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ determinada como limiar de segurança. Os resultados de análise estatística obtidos com a linhagem de células HaCaT apontaram redução da viabilidade apenas na concentração de 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ da NC/QZ. Portanto, nas concentrações nas quais não foi observado a diminuição da viabilidade através dos resultados de análise estatística é possível afirmar a existência de biocompatibilidade, fornecendo suporte para o desenvolvimento de estudos sequenciais de aplicação biológica e avaliação do uso da TFD *in vitro*.

Os processos de permeação e internalização celular são influenciados por diversas variáveis, como o tamanho do nanomaterial escolhido, sua concentração, forma farmacêutica, características da superfície e sua estrutura interna (HUERTA-GARCÍA, et al., 2015). As maiores limitações envolvidas no desenvolvimento de fármacos para aplicação tópica e transdérmica consiste na barreira de permeação, proporcionada pelo estrato córneo da pele, composta por camadas rígidas ricas em queratina e matriz intercelular lipídica, a qual influencia diretamente no resultado terapêutico (BATHEJA et al., 2011; BARBOSA, et al., 2019). Barbosa et al. 2019 analisou a permeação de nanopartículas de fucoïdan e quitosana carregadas com metotrexato, medicamento comercializado para o tratamento de doenças dérmicas inflamatórias, como artrite reumatoide de psoríase. Foi utilizado como modelo *in vitro* a pele da orelha de porco, devido a semelhança morfológica e funcional quando comparada a pele humana. Os resultados obtidos evidenciaram elevada permeação das nanopartículas, 3,3x maior, quando comparado ao medicamento livre, evidenciando as propriedades benéficas do nanomaterial desenvolvido. Casarini et al., 2021 observou a permeação nanopartículas poliméricas encapsuladas com floretina, flavonóide com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias incorporadas em hidrogel, sendo o modelo de barreira de permeação *in vitro* escolhido a pele de orelha de porco. Neste trabalho os resultados evidenciaram a presença de floretina em todas as camadas da pele analisadas (estrato córneo, epiderme e derme), sendo que o sistema nanoparticulado apresentou maior permeação, alcançando uma permeação profunda e eficaz, seguido por liberação controlada do ativo. Grillo et al., 2019 investigou a permeação de nanopartículas poliméricas carregadas com benzocaína e incorporadas em hidrogel, utilizando como modelo de barreira uma membrana sintética de pele (Strat-M ®), a qual é composta por múltiplas camadas

de poliéster sulfona e poros produzidos com lipídeos sintéticos, apresentando morfologia semelhante à da pele humana. Foi observado um perfil de retenção das nanocápsulas incorporadas ao hidrogel, nas primeiras camadas da membrana, a qual acaba por mimetizar somente epiderme e a derme, evidenciando a importância na escolha do modelo experimental *in vitro*, além das características do nanomaterial que influenciam diretamente na permeação, como o tamanho de partícula e a sua composição.

O estudo de permeação desenvolvido utilizou como modelo de barreira uma matriz extracelular utilizada para impressão de equivalente de pele 3D e a pele de porco. A matriz extracelular foi desenvolvida através da técnica de manufatura por adição (*suspended layer additive manufacture*), no qual foi utilizado o *Computer-aided design (CAD)* para a criação do *design* das três camadas. A composição do *bioink* consistiu em uma mistura de pectina, a qual é semelhante aos polissacarídeos encontrados na MEC nativa, com colágeno, mimetizando a composição da pele (MOAKES et al., 2021). Através dos resultados apresentados, foi possível observar pela análise de fluorescência a presença da NC/QZ em toda a sessão transversal dos modelos apresentados, evidenciando alta taxa de permeação do fármaco nanoestruturado. Ainda, considerando a estrutura da pele em doenças inflamatórias como a psoríase, onde a hiperproliferação dos queratinócitos e o processo inflamatório tornam a pele rígida e impermeável, a utilização de nanopartículas poliméricas proporciona elevada aplicação, uma vez que promovem maior biodisponibilidade e permeabilidade no estrato córneo da pele (AZIZ et al., 2023).

No ensaio de *uptake celular* desenvolvido foi possível observar uma internalização elevada no tempo de 24h para a QZ e NC/QZ quando comparado com

os outros tempos analisados, baseando-se nos tempos de incubação sugeridos nas normas internacionais ISO 10993-5 para ensaios de citotoxicidade de nanomateriais. Foram analisados ainda, os tempos de 3h e 6h de internalização, onde não foram observadas diferenças estatísticas significantes entre ambos. A NC/QZ mostrou um teor elevado de internalização quando comparado com a QZ livre, cerca de 9x maior, evidenciando uma das principais características da nanotecnologia, onde pode-se afirmar que a nanoencapsulação possibilitou uma maior internalização celular, proporcionando ação direcionada e biodisponibilidade, demonstrando o papel altamente importante da Nanomedicina, onde foi possível observar uma ação melhorada do ativo (QZ) em sua forma nanoencapsulada (NC/QZ).

Uma vez desencadeado o processo inflamatório *in vitro*, os mediadores inflamatórios iniciam a produção de citocinas, os quais desempenham papéis fundamentais na resposta inflamatória (YANG et al., 2022). Muñoz-mata et al. 2022 relatou os efeitos das citocinas em pacientes HIV positivos utilizando a TFD como método terapêutico combinado, onde é observado o aumento de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-8) ressaltando que a ação da TFD apresenta três fases: geração de radicais livres de oxigênio que destroem o tumor; expressão de danos endoteliais locais no tumor para estimular a resposta imunitária e os mecanismos antitumoral, assim, pacientes que respondem à TFD tiveram seus níveis de citocinas IL-6 e IL-8 aumentados. Algo similar foi encontrado por Suárez-valladares et al. 2018, onde os níveis de citocina IL-1 β , IL-8 e IL-6 aumentaram em pacientes contendo câncer basocelular, sendo um padrão de resposta imunológica diferente do encontrado para outras citocinas analisadas (IL-10, TNF- α). Ambos os estudos podem apresentar embasamento para explicar o perfil apresentado nas Figuras 24 e 25 respectivamente, onde com o tempo de 6h após a irradiação ocorre o aumento

da expressão das citocinas e após 24h da irradiação já é possível observar a diminuição nos níveis expressos, demonstrando o mecanismo anti-inflamatório.

Akram et al. 2016 analisou o efeito da TFD e da Laserterapia em doenças periodontais, sendo que em ambos os tratamentos foi observado uma melhora no nível de citocinas. Segundo o autor, a melhora teria influência direta da ação da TFD e da Laserterapia na redução dos patógenos encontrados na doença estudada. Ainda, parâmetros relacionados à TFD e Laserterapia, como densidade de energia, fluência, potência, irradiância, duração da aplicação e o comprimento de onda utilizado podem exercer influência direta nos estudos.

Lembo et al. 2013 analisou amostras de sangue de pacientes com psoríase, avaliando a presença da proteína quimiotática de monócitos-1 MCP1, onde foi observado o aumento da expressão (localmente e sistematicamente), sendo o MCP1 um potencial marcador inflamatório em pacientes com psoríase. Klaus et al. 2021 observou em seus estudos os níveis de citocinas, especialmente os níveis de MCP1 em casos de esquizofrenia. Os níveis de TNF α , ICAM1, e MCP1 foram elevados em pacientes doentes, quando comparado com pacientes normais. Tal acontecimento pode ser explicado pelo fato de que a quimiocina MCP1 recruta células imunes ao local de inflamação. O estudo avaliou a ação da TFD e da Laserterapia evidenciando os perfis descritos pela literatura, onde inicialmente ocorre um aumento na expressão de citocinas, seguido pela diminuição e consequente evidência da terapia aplicada. Ainda, a TFD se mostrou mais eficaz na diminuição da expressão de citocinas, 24h após a irradiação, quando comparado à ação somente do Laser (efeito laser terapêutico).

Na análise das citocinas IL-1 β e IL-8, após 24h de irradiação, é possível observar que a formulação não exerce qualquer influência no nível de citocinas, evidenciando ainda mais a hipótese de que a associação do fotossensibilizador com a ação do Laser se mostra mais eficaz (efeito fotodinâmico).

Com relação às doses de energia utilizadas, os resultados variaram dependendo da citocina analisada em relação ao tempo observado. IL-1 β , 6h após a irradiação, quase não apresentou diferença entre as doses analisadas. No entanto, a D1 possuiu uma redução considerável na expressão de citocinas após 24h. IL-8, 6h após, D2 e D3 apresentaram diferenças significativas quando comparadas ao controle. Após 24h, D1 possuiu a diferença mais significativa do grupo. MCP1 em 6h após a irradiação não apresentou qualquer diferença entre as doses. Contudo, após 24h, D1 e D3 apresentaram redução na expressão desta citocina.

Portanto, é possível concluir o desenvolvimento e padronização do ensaio de indução do processo inflamatório *in vitro* em células HaCaT através do LPS. Ainda, a TFD se mostrou com maior potencial comparando-se com a laser terapia (somente uso do laser) e a formulação aplicada NC/QZ sem qualquer irradiação. Considerando esses aspectos, os resultados são promissores para um futuro tratamento da psoríase e doenças inflamatórias de pele empregando-se a TFD, uma vez que as citocinas analisadas estão ligadas diretamente ao processo inflamatório de doenças autoimunes e inflamatórias, incluindo a psoríase.

7. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos, conclui-se que foi possível o desenvolvimento de uma nanocápsula predominantemente monodispersa e inovadora, para associação do derivado de antraquinona, Quinizarina, com características fotofísicas e biológicas de interesse. O sistema apresentou partículas submicrônicas, homogêneas e estabilidade no tempo de análise. Estudos espectroscópicos mostraram que a nanoencapsulação da QZ não levou a alterações nas características fotofísicas do FS em comparação com a QZ livre, podendo prosseguir com testes posteriores de TFD. A quantificação realizada evidenciou uma elevada taxa de incorporação de QZ na nanoestrutura, mostrando uma incorporação altamente efetiva do fotossensibilizador. O ensaio de viabilidade celular desenvolvido com linhagem de células NIH/3T3 e HaCaT não mostrou citotoxicidade nas concentrações mais baixas de NC/QZ. A nanocápsulas em sua forma vazia (NC/Vazia) e a QZ livre não apresentaram citotoxicidade nas concentrações testadas. Os estudos de permeação e *uptake celular* evidenciaram a permeação da NC/QZ em modelos similares à pele e a incorporação e internalização intracelular do fármaco, respectivamente, potencializando a sua ação na técnica do *drug delivery*. O processo inflamatório *in vitro* foi devidamente desenvolvido, com posterior aplicação da TFD e análise imuno-enzimática, no qual foi possível observar efeitos representativos da TFD quando comparado com a ação do laser e das NC/QZ isoladamente, apresentando resultados altamente favoráveis na utilização do modelo desenvolvido para indução do processo inflamatório *in vitro* e da utilização

do nanomaterial sintetizado , unido à TFD, representando assim uma possível nova abordagem terapêutica para doenças autoimunes, como a psoríase.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABED, Elham Maghareh et al. Use of nanotechnology in the diagnosis and treatment of coronavirus. **J Curr Biomed Rep**, v. 2, n. 2, p. 2717-1906, 2021.

AGAZZI, Maximiliano L. et al. BODIPYs in antitumoral and antimicrobial photodynamic therapy: An integrating review. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 40, p. 21-48, 2019.

AKRAM, Zohaib et al. Effect of photodynamic therapy and laser alone as adjunct to scaling and root planing on gingival crevicular fluid inflammatory proteins in periodontal disease: a systematic review. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 16, p. 142-153, 2016.

ALEEM, Daniyal; TOHID, Hassaan. Pro-inflammatory cytokines, biomarkers, genetics and the immune system: a mechanistic approach of depression and psoriasis. **Revista colombiana de psiquiatria**, v. 47, n. 3, p. 177-186, 2018.

AMANTINO, Camila F. et al. Anthraquinone encapsulation into polymeric nanocapsules as a new drug from biotechnological origin designed for photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 31, p. 101815, 2020.

BALIWAG, Jaymie; BARNES, Drew H.; JOHNSTON, Andrew. Cytokines in psoriasis. **Cytokine**, v. 73, n. 2, p. 342-350, 2015

BARBOSA, Ana Isabel; LIMA, Sofia A. Costa; REIS, Salette. Development of methotrexate loaded fucoidan/chitosan nanoparticles with anti-inflammatory potential

and enhanced skin permeation. **International journal of biological macromolecules**, v. 124, p. 1115-1122, 2019.

BATHEJA, Priya et al. Topical drug delivery by a polymeric nanosphere gel: formulation optimization and in vitro and in vivo skin distribution studies. **Journal of controlled release**, v. 149, n. 2, p. 159-167, 2011.

BINISH, M. B. et al. Potential of anaerobic bacteria in bioremediation of metal-contaminated marine and estuarine environment. **In: Microbial Biodegradation and Bioremediation**. Elsevier, 2022. p. 305-326.

CAI, Yihua et al. A critical role of the IL-1 β –IL-1R signaling pathway in skin inflammation and psoriasis pathogenesis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 139, n. 1, p. 146-156, 2019.

CARDOSO, Luana Pereira et al. Piperine Reduces Neoplastic Progression in Cervical Cancer Cells by Downregulating the Cyclooxygenase 2 Pathway. **Pharmaceuticals**, v. 16, n. 1, p. 103, 2023.

DE CARLI, CYNTHIA. **Nanoemulsões encapsulando quercetina produzidas pelo método do ponto de inversão da emulsão (ELP): estabilidade físico-química e avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e em produto cárneo**. 2017. 141f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo. Pirassununga, 2017.

CASARINI, Talita Pizza Anunciato et al. Innovative hydrogel containing polymeric nanocapsules loaded with phloretin: Enhanced skin penetration and adhesion. **Materials Science and Engineering: C**, v. 120, p. 111681, 2021.

CHIRICOZZI, Andrea et al. Scanning the immunopathogenesis of psoriasis. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 1, p. 179, 2018.

COLLINSON, David W. et al. Best practices and recommendations for accurate nanomechanical characterization of heterogeneous polymer systems with atomic force microscopy. **Progress in Polymer Science**, v. 119, p. 101420, 2021.

DANESHFAR, Reza; ASHOORI, Siavash; SOULGANI, Bahram Soltani. Interaction of electrolyzed nanomaterials with sandstone and carbonate rock: Experimental study and DLVO theory approach. **Geoenergy Science and Engineering**, v. 230, p. 212218, 2023.

DENG, Yadan et al. Evaluation of probiotics for inhibiting hyperproliferation and inflammation relevant to psoriasis in vitro. **Journal of Functional Foods**, v. 81, p. 104433, 2021.

DESHMANE, Satish L. et al. Monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1): an overview. **Journal of interferon & cytokine research**, v. 29, n. 6, p. 313-326, 2009.

DÍAZ-MUÑOZ, Manuel D.; TURNER, Martin. Uncovering the role of RNA-binding proteins in gene expression in the immune system. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1094, 2018.

DOLS-PEREZ, Aurora et al. Effect of surface functionalization and loading on the mechanical properties of soft polymeric nanoparticles prepared by nano-emulsion templating. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 222, p. 113019, 2023.

DOS SANTOS, Priscilla Pereira et al. Biodegradable polymers as wall materials to the synthesis of bioactive compound nanocapsules. **Trends in food science & technology**, v. 53, p. 23-33, 2016.

EL AYADI, Amina; HERNDON, David N.; FINNERTY, Celeste C. Biomarkers in burn patient care. In: HERNDON, David N. (editor). **Total burn care**. 5th. ed. Galveston, TX, USA: Elsevier, 2018. p. 232-235.e2. doi:10.1016/B978-0-323-47661-4.00021-6. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-47661-4.00021-6>.

FLORENTINO NETO, Serafim et al. α -amylin-loaded nanocapsules produce selective cytotoxic activity in leukemic cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 139, p. 111656, 2021.

GHASEMIYEH, Parisa; MOHAMMADI-SAMANI, Soliman. Potential of nanoparticles as permeation enhancers and targeted delivery options for skin: Advantages and disadvantages. **Drug Design, Development and Therapy**, v. 14, p. 3271, 2020

Gillitzer R, Berger R, Mielke V, Müller C, Wolff K, Stingl G. Upper keratinocytes of psoriatic skin lesions express high levels of NAP-8 mRNA in situ. **J Invest Dermatol**. v. 97, n. 1, p. 73–79. <https://doi.org/10.1111/1523-1747.ep12478128.1991>.

GOBO, Graciely Gomides et al. Novel quinizarin spray-dried nanoparticles for treating melanoma with photodynamic therapy. **Materials Today Communications**, v. 33, p. 104882, 2022.

GRILLO, Renato et al. Influence of hybrid polymeric nanoparticle/thermosensitive hydrogels systems on formulation tracking and in vitro artificial membrane permeation: A promising system for skin drug-delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 174, p. 56-62, 2019.

HARRI, Gangadhar et al. Treatments for psoriasis: A journey from classical to advanced therapies. How far have we reached?. **European Journal of Pharmacology**, v. 929, p. 175147, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2022>.

HAZARI, Sahim Aziz et al. An overview of topical lipid-based and polymer-based nanocarriers for treatment of psoriasis. **International Journal of Pharmaceutics**, p. 122938, 2023.

HU, Xiufang et al. Design and synthesis of various quinizarin derivatives as potential anticancer agents in acute T lymphoblastic leukemia. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 27, n. 7, p. 1362-1369, 2019.

HUERTA-GARCÍA, Elizabeth et al. Internalization of titanium dioxide nanoparticles by glial cells is given at short times and is mainly mediated by actin reorganization-dependent endocytosis. **Neurotoxicology**, v. 51, p. 27-37, 2015.

JIN, Yiguang et al. Nanostructures of an amphiphilic zinc phthalocyanine polymer conjugate for photodynamic therapy of psoriasis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 128, p. 405-409, 2015.

JYOTHI, S. L. et al. Drug delivery systems for the treatment of psoriasis: current status and prospects. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, p. 102364, 2021.

KIM, Jaehwan; KRUEGER, James G. The immunopathogenesis of psoriasis. **Dermatologic clinics**, v. 33, n. 1, p. 13-23, 2015.

KLAUS, Federica et al. Chemokine MCP1 is associated with cognitive flexibility in schizophrenia: A preliminary analysis. **Journal of psychiatric research**, v. 138, p. 139-145, 2021.

KONAN, Yvette Niamien; GURNY, Robert; ALLÉMANN, Eric. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 66, n. 2, p. 89-106, 2002.

KWIATKOWSKI, Stanisław et al. Photodynamic therapy–mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1098-1107, 2018.

LEMBO, Serena et al. MCP-1 in psoriatic patients: effect of biological therapy. **Journal of dermatological treatment**, v. 25, n. 1, p. 83-86, 2014.

LI, Xiaotong et al. Innovative strategies for photodynamic therapy against hypoxic tumor. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, p. 100775, 2023.

LOGUE, Brian A.; MANANDHAR, Erica. Percent residual accuracy for quantifying goodness-of-fit of linear calibration curves. **Talanta**, v. 189, p. 527-533, 2018.

LONG, Wanjun et al. A novel 3D-fluorescence sensing strategy based on HN-chitosan polymer probe for rapid identification and quantification of potential adulteration in saffron. **Food Chemistry**, v. 429, p. 136902, 2023.

LOPEZ-CASTEJON, Gloria; BROUGH, David. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 22, n. 4, p. 189-195, 2011.

LU, Weijia et al. Nanomedicines: Redefining traditional medicine. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 134, p. 111103, 2021.

MALIK, E. M.; MÜLLER, C.E. Anthraquinones as pharmacological tools and drugs. **Medicinal research reviews**, v. 36, n. 4, p. 705-748, 2016.

MASCARENHAS-MELO, Filipa et al. Nanocarriers for the topical treatment of psoriasis-pathophysiology, conventional treatments, nanotechnology, regulatory and toxicology. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 176, p. 95–107, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.05.012>.

MCGAW, Lyndy J.; ELGORASHI, Esameldin E.; ELOFF, Jacobus N. Cytotoxicity of African medicinal plants against normal animal and human cells. **In: Toxicological survey of African medicinal plants**. Elsevier, 2014. p. 181-233.

MFOUO-TYNGA, Ivan S. et al. Biophysical and Biological Features of Third Generation Photosensitizers Used in Anticancer Photodynamic Therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, p. 102091, 2021.

MOAKES, Richard JA et al. A suspended layer additive manufacturing approach to the bioprinting of tri-layered skin equivalents. **APL bioengineering**, v. 5, n. 4, 2021.

MUÑOZ-MATA, Lenin Saúl et al. Photodynamic therapy stimulates IL-6 and IL-8 in responding patients with HPV infection associated or not with LSIL. **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 11, p. 100137, 2022.

NIRMAL, G. R. et al. Photothermal treatment by PLGA–gold nanorod–isatin nanocomplexes under near-infrared irradiation for alleviating psoriasiform hyperproliferation. **Journal of Controlled Release**, v. 333, p. 487-499, 2021

PAN, Zhao et al. A simple and quick method to detect adulterated sesame oil using 3D fluorescence spectra. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 245, p. 118948, 2021.

QUINTI, Luisa et al. A study of the strongly fluorescent species formed by the interaction of the dye 1, 4-dihydroxyanthraquinone (quinizarin) with Al (III). **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 155, n. 1-3, p. 79-91, 2003.

REE, Jin et al. Quinizarin suppresses the differentiation of adipocytes and lipogenesis in vitro and in vivo via downregulation of C/EBP-beta/SREBP pathway. **Life Sciences**, v. 287, p. 120131, 2021.

REZENDE, Nayara et al. Standardization of a resazurin-based assay for the evaluation of metabolic activity in oral squamous carcinoma and glioblastoma cells. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 26, p. 371-374, 2019.

SINGH, A. **Herbal Drugs as Therapeutic Agents**. Boca Raton, FL.: CRC Press, 2014

SIQUEIRA-MOURA, Marigilson P. et al. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 3, p. 1744-1752, 2013.

SOUTO, Eliana B. et al. Physicochemical and biopharmaceutical aspects influencing skin permeation and role of SLN and NLC for skin drug delivery. **Heliyon**, p. e08938, 2022.

SUÁREZ-VALLADARES, María Jesús et al. Inflammatory response and cytokine levels induced by intralesional photodynamic therapy and 630-nm laser in a case series of basal cell carcinoma. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 79, n. 3, p. 580-582, 2018

TAMBE, Varunesh Sanjay; NAUTIYAL, Avni; WAIRKAR, Sarika. Topical lipid nanocarriers for management of psoriasis-an overview. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 64, p. 102671, 2021.

TOADER, Ana Maria; ENACHE, Mirela. Quinizarin interaction with bile salts micelles as biomimetic model membranes. **Revue roumaine de chimie**, v. 66, n. 1, p. 75-80, 2021.

VARENNE, F. et al. Towards quality assessed characterization of nanomaterial: Transfer of validated protocols for size measurement by dynamic light scattering and evaluation of zeta potential by electrophoretic light scattering. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 528, n. 1-2, p. 299-311, 2017.

VÁZQUEZ, MF Barrera et al. Reprint of “Experimental measurement and modeling of quinizarin solubility in pressurized hot water”. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 129, p. 63-74, 2017.

WANG, Yixuan et al. Chitosan/hyaluronan nanogels co-delivering methotrexate and 5-aminolevulinic acid: A combined chemo-photodynamic therapy for psoriasis. **Carbohydrate Polymers**, v. 277, p. 118819, 2022.

WANG, Zixuan et al. Application of photodynamic therapy in cancer: challenges and advancements. **Biocell**, v. 45, n. 3, p. 489, 2021.

YANG, Wenxian et al. Delicate regulation of IL-1 β -mediated inflammation by cyclophilin A. **Cell Reports**, v. 38, n. 11, p. 110513, 2022.

ZHOU, Zhaojie et al. Advances in Photosensitizer-related Design for Photodynamic Therapy. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 6, p. 668–686, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2020.12.003>.