Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Preparo, caracterização e aplicação em engenharia de tecidos de suportes
de alginato/quitosana, associados a processos fotodinâmicos para
fotobioestimulação”**

Maryanne Trafani de Melo

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutora em Ciências,

Área: Química

Ribeirão Preto-SP

2019

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Preparo, caracterização e aplicação em engenharia de tecidos de suportes
de alginato/quitosana, associados a processos fotodinâmicos para
fotobioestimulação”**

Maryanne Trafani de Melo

Tese apresentada à Faculdade de Filosofia,
Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo, como parte das exigências para a
obtenção do título de Doutora em Ciências,

Área: Química

Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco

Ribeirão Preto-SP

2019

Ficha catalográfica

De Melo, Maryanne Trafani

Preparo, caracterização e aplicação em engenharia de tecidos de suportes de alginato/quitosana, associados a processos fotodinâmicos para fotobioestimulação, Ribeirão Preto, 2019.

p.189 : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientador: Tedesco, Antonio Claudio.

1. *Scaffolds*. 2. Alginato. 3. Quitosana. 4. Ftalocianina de Cloro Alumínio. 5. Fotobioestimulação

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maryanne Trafani de Melo

Preparo, caracterização e aplicação de suportes de alginato/quitosana, associados a processos fotodinâmicos para fotobioestimulação.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química para obtenção do título de Mestre

Área de concentração: Química

Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

À minha dedicada e amada mãe, pelo amor, ensinamentos, educação e incentivos
constantes em minha vida.

A todos que acreditam e torcem por mim.

Agradecimentos

À Deus, autor da infinita sabedoria que transcende todo entendimento humano. Obrigada por ter me iluminado neste caminho cheio de barreiras, mas que com suas bênçãos guiou-me e permitiu-me enxergar saída nos momentos mais complexos e difíceis da pesquisa.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco, pela oportunidade e confiança de desenvolver esta pesquisa, bem como pelo grande apoio, paciência e aprendizado científico.

À minha mãe, Érica, por seu amor incondicional e sem limites; por toda atenção, afeto e suporte sem os quais eu jamais teria conseguido chegar até aqui.

Ao meu querido e amado vô, Valdemar, pelo amor, por acreditar em mim, carinho, conversas, ajuda, apoio e toda sabedoria.

Ao meu melhor amigo, companheiro e namorado, Saulo, por me ajudar a superar os desafios e medos, com muita paciência e fé em Deus, tornando os meus dias mais felizes e leves e principalmente por estar sempre ao meu lado e à sua família pelo apoio e carinho.

A minha tia Adriana, por sempre me colocar para cima, pelos conselhos, alegria de viver e amor.

A toda a minha família, por serem meu alicerce e meu porto seguro.

Aos amigos do Laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina, pelo dia-a-dia de trabalho e por partilharem seus conhecimentos. Especialmente aos meus amigos Alex, Leo Barcelos, Leo Franchi, Henrique e Jayme pelos bons conselhos científicos, longas conversas e boas risadas. Às minhas queridas Gra, Jay, Luandra e Dani por tornarem meus dias mais felizes e pela amizade sincera. Ao meu grande amigo Maiko que tem uma alegria e energia única. À Olimpia, por toda dedicação, preocupação e disposição em ajudar.

À minha querida amiga Laís, a você um agradecimento especial, por toda sua atenção, pelos conselhos, apoio, conversas e desabafos, companheirismo e exemplo de dedicação.

À minha irmã de coração Paty, que mesmo de longe sempre se mostrou tão presente. Minha gratidão eterna a você que me fez crescer e conhecer a bondade de perto.

Aos meus amigos de Ribeirão Preto Nathy, Tacila, Dani e Rafa pela amizade sincera e pelos momentos maravilhosos e divertidos vividos que me deram força para enfrentar os desafios.

Aos meus amigos da academia Flow Fit, especialmente a Professora Paula, agradeço por toda dedicação a sua profissão, pela alegria nas aulas de dança e por todo amor que tem por nós.

Aos amigos de São João da Boa Vista, Marília, Camila e Renato pela amizade duradoura e sincera, por compreenderem muitas vezes minha ausência e pelo apoio incondicional.

À Universidade de São Paulo e aos docentes e funcionários da FFCLRP-USP.

À CAPES pela concessão da bolsa de doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À FAPESP pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

À Universidade Paris Diderot, Laboratoire Matière et Systèmes Complexes e ao Professor Alain Ponton pelo estágio e por me proporcionarem uma das experiências mais incríveis da minha vida, crescimento pessoal e profissional.

“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”

Galileo Galilei

Resumo

Trafani-de Melo, M. **Preparo, caracterização e aplicação em engenharia de tecidos de suportes de alginato/quitosana, associados a processos fotodinâmicos para fotobioestimulação** 2019.189f. Tese (Doutorado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A engenharia tecidual é um campo novo e multidisciplinar cujo principal objetivo é a regeneração de tecidos e órgãos danificados empregando biomateriais, biomoléculas e células. Nesse contexto, *scaffolds* são estruturas porosas biodegradáveis e biocompatíveis que mimetizam a matriz extracelular (MEC) fornecendo uma estrutura ideal para o crescimento de células e tecidos. A utilização de laser de baixa potência é uma terapia inovadora e não invasiva, que pode ser empregada na engenharia tecidual atuando no processo de cicatrização, proliferação e diferenciação celular. O presente trabalho foi baseado em abordagens multidisciplinares para o desenvolvimento de um sistema, abrangendo áreas da engenharia tecidual, nanotecnologia e fotobiologia. Este trabalho foi dividido em três etapas principais. Primeiramente, realizou-se o desenvolvimento e a caracterização dos *scaffolds* à base de alginato e quitosana para adesão e proliferação de fibroblastos humano (HFF-1) e queratinócitos humano (HACAT). Posteriormente, em uma segunda etapa, realizou-se o desenvolvimento e caracterização físico-química de dois sistemas nanoestruturados (nanoemulsão (NE) e nanopartícula proteica (NpP)) para veiculação do fármaco fotossensibilizante (ftalocianina de cloro-alumínio AlClPc), seguidos por ensaios de citotoxicidade *in vitro* utilizando cultura de fibroblasto (NIH 3T3). Na terceira e última etapa, foi avaliada a resposta biológica através da fotobiomodulação usando luz visível, aplicando luz laser de baixa potência na fluência de 40, 70, 100 e 120 mJ/cm² a células cultivadas em modelos tridimensionais (*scaffolds*) mimetizando ao máximo as condições *in vivo*. Os resultados obtidos foram promissores e mostraram que os *scaffolds* à base de alginato e quitosana funcionam como um sistema mimético eficiente da MEC, para crescimento da derme e epiderme em um sistema biológico. A fotobiomodulação utilizando a NE como nanossistema foi mais eficiente quando comparado com NpP acelerando o crescimento celular sobre a matriz polimérica.

Palavras chave: *scaffolds*; biomateriais; quitosana; alginato; pele; engenharia de tecidos; nanossistemas; ftalocianina de cloro alumínio; fotobiomodulação

Abstract

Trafani - de Melo, M. **Preparation, characterization and application in tissue engineering of alginate/chitosan *scaffolds* associated with photodynamic processes for photobiostimulation** 2019.189f.Thesis (Doctoral). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Tissue engineering was a new field focusing on regeneration of damaged tissues and organs using biomaterials, biomolecules and cells. In this context, *scaffolds* are biodegradable and biocompatible porous structures mimicking the extracellular matrix (ECM), providing an ideal structure for cell and tissue growing. The use of low power laser is an innovative and noninvasive therapy, that could be employed in tissue engineering acting in the process of cell healing, proliferation and differentiation. The present work was based in multidisciplinary approaches for the development of a system, covering fields of tissue engineering, nanotechnology and photobiology. This, work was divided into three main topics: First, the development and characterization of alginate and chitosan-based scaffolds useful for adhesion and proliferation of human fibroblasts (HFF-1) and human keratinocytes (HACAT). Subsequently, in a second topic, the development and physicochemical characterization of two nanostructured systems, such as nanoemulsion (NE) and protein nanoparticle (NpP) were carried out designed for delivering of photosensitizing drug as chlorine aluminum phthalocyanine (AlClPc). Followed by *in vitro* cytotoxicity assays using fibroblast culture (NIH 3T3). In the third and last topic, evaluated the biological response through the Photobiomodulation using visible light, applying low power laser light (LLT) at the fluence of 40, 70, 100 and 120 mJ/cm² to cells growing into a three-dimensional models (*scaffolds*) mimicking, as much as possible, the *in vivo* conditions. The results obtained were promising and showed that alginate and chitosan-based *scaffolds* function as an efficient system mimic as expected ECM for dermal and epidermal growing biological system. Photobiomodulation using the NE as nanosystem showed more efficient increasing cell growth on the polymeric matrix when compared to NpP.

Keywords: *scaffolds*; biomaterials; chitosan; alginate; skin; tissue engineering; nanosystems; aluminum chlorine phthalocyanine; photobiomodulation.

Lista de figuras

Figura 1. Desenho esquemático das estruturas da pele divididas em epiderme, derme, hipoderme e anexos.....	1
Figura 2. Pé com prótese de madeira no dedão	6
Figura 3. Conceito de engenharia de tecidos	10
Figura 4. Estrutura química do alginato	14
Figura 5. Estrutura química da a) quitina e b) quitosana.....	17
Figura 6. Representação esquemática da estrutura da ftalocianina de cloro alumínio	20
Figura 7. Mecanismo de ação da luz vermelha nível molecular	25
Figura 8. Principais sistemas nanoestruturados empregados em estudos atualmente	26
Figura 9. Estrutura das nanoemulsões.....	27
Figura 10. Modelo de <i>spray dryer</i> de bancada	30
Figura 11. Fluxograma dos métodos utilizados no trabalho divididos em 3 etapas subsequentes: preparo e caracterização dos <i>scaffolds</i> , preparo e caracterização dos nanossistemas veiculadores do FS e estudos de fotobioestimulação em ambiente tridimensional utilizando <i>scaffold</i>	Erro! Indicador não definido.
Figura 12. Esquema do corpo de prova do teste de tração	Erro! Indicador não definido.
Figura 13. Ilustração do ângulo de contato da gota de água com a superfície teste	Erro! Indicador não definido.
Figura 14. Ilustração do biorreator de leito fixo utilizado para a produção de células HACAT a) espaço para a montagem com os <i>scaffold</i> b) Sistema completo do Biorreator.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 15. A) Homogeneizador de alta pressão, Micro Debee B) Nozzle Z8.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 16. Equipamento utilizado para realizar as medidas de tamanho de partícula, índice de polidispersão e potencial zeta.	Erro! Indicador não definido.
Figura 17. Ilustração do equipamento Q nano Gold utilizado para medidas de diâmetro e concentração de partículas.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 18. Ilustração do Lumisizer utilizado para fazer as medidas de estabilidade acelerada das formulações.	Erro! Indicador não definido.
Figura 19. Sistema de irradiação com fibra-óptica difusa usado nos estudos de fotoestimulação (luz monocrática $\lambda = 675$ nm).....	Erro! Indicador não definido.
Figura 20. Métodos de preparo das soluções de formação dos <i>scaffolds</i> a) utilizando bomba de infusão com agitação magnética constante (Stirrer/Hot, Corning) b) solução vertida uma sobre a outra com agitação do homogeneizador de alta velocidade ultraturrax T25 (Ika Werke).....	Erro! Indicador não definido.

Figura 21. Fotografias tiradas com um microscópio de contraste de fase invertida dos scaffolds alginato/quitosana (a,b) preparados por agitação magnética seguida de ultrassom e pH 5,28 (c,d) preparados por agitação ultraturrax e pH 5,28. Objetiva usada 20 x. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 22. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (EVO 50, Carl Zeiss) de seções transversais dos *scaffolds* porosos de alginato/quitosana (a e b) obtidos por agitação magnética constante de 2 horas, seguido de ultrassom e pH 5,3. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 23. Ajuste de pH das soluções de preparo dos scaffolds a) pH 5,3 b) 7,4 **Erro! Indicador não definido.**

Figura 24. Solubilidade da quitosana em diferentes pHs **Erro! Indicador não definido.**

Figura 25. Secagem das amostras através de A) liofilizador a -45°C B) amostras secas (1. Reticulada com 1,5% de CaCl_2 2. Reticulada com 2% de CaCl_2 3. Reticulada com 1,25% de CaCl_2 4. Reticulada com 1,0% de CaCl_2 5. Preparada com 4% de quitosana e 2% de alginato 6. Preparada com agitação magnética). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 26. Scaffolds de alginato/quitosana (A) sem glicerol (B,C) com glicerol **Erro! Indicador não definido.**

Figura 27. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de seções transversais dos *scaffolds* porosos de alginato/quitosana (A, B, C, D) obtidos por agitação ultraturrax e pH 5,28; (E, F, G, H) *scaffolds* porosos de alginato/quitosana com adição de 0,5% de glicerol **Erro! Indicador não definido.**

Figura 28. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de seções transversais dos *scaffolds* porosos de alginato (A, B) obtidos por agitação ultraturrax e pH 5,28; (C, D, E, F) *scaffolds* porosos de quitosana obtidos por agitação ultraturrax e pH 5,28. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 29. Micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de seções transversais dos scaffolds porosos de alginato/quitosana esterilizados A) luz ultravioleta B) álcool 70° **Erro! Indicador não definido.**

Figura 30. Fotomicrografias bidimensionais (A, B) e tridimensionais (C) do scaffold de alginato/quitosana obtidas por microscopia de força atômica. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 31. Espectros de infravermelho (ATR-FTIR) dos *scaffolds* A) quitosana B) alginato/quitosana C) alginato/quitosana com reticulação usando CaCl_2 D) alginato/quitosana com glicerol reticulado com CaCl_2 **Erro! Indicador não definido.**

Figura 32. Foto registrada pelo equipamento OCA mostrando a gota de água sobre o scaffold A) de PS comercial Biotek e B) de alginato/quitosana/glicerol após 2 segundos de análise. ... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 33. Curva de calorimetria (DSC) (A) Alginato e quitosana (B) scaffold alginato/quitosana na presença e na ausência de glicerol. **Erro! Indicador não definido.**

- Figura 34. Curva termogravimétrica (TG) de (A) Alginato e quitosana e (B) Scaffold alginato/quitosana na presença e na ausência de glicerol..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 35. Análise qualitativa do efeito da irradiação ultravioleta e álcool 70° na esterilização do scaffold de alginato/quitosana/glicerol em ágar Mueller Hinton. . **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 36. Fotografias tiradas com um microscópio Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss) de contraste de fase invertida de cultura celular de fibroblasto sadio de murino e de humano a) NIH 3T3 b) HFF-1. Objetiva usada de 20x. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 37. Fotografias tiradas com um microscópio de contraste de fase invertida Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss) de cultura celular de queratinócitos humano HACAT a) baixa densidade b) confluenta. Objetivas usadas de 10 x e 20x. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 38. Curva de crescimento celular em monocamada das linhagens A) HFF-1 B)HACAT **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 39. Ensaio de citotoxicidade das células NIH 3T3 em contato com o meio de cultura proveniente da degradação dos *scaffolds* por 24, 48, 72, 96, 120 e 144 horas. Com significância estatística * $p < 0,05$ em relação ao controle de 100%. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 40. Ensaio de citotoxicidade direta celular das células NIH 3T3 e HACAT incubadas por 24 horas com *scaffold* alginato/quitosana reticulado com 2% de CaCl_2 sem glicerol e com glicerol 0,5% e *scaffold* comercial de PS B) *scaffold* alginato/quitosana e scaffold comercial PS incubados com MTT na presença e na ausência de células (Com significância estatística * $p < 0,05$ em relação ao controle de 100%) **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 41. Análise de citotoxicidade dos *scaffolds* por citometria de fluxo utilizando o reagente Anexina V do controle (A) e das amostras de células retiradas dos *scaffolds* nos dias 1 e 7 (B,C); (D) Interpretação do gráfico do ensaio de anexina V no citometro de fluxo **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 42. Fotomicrografias de fluorescência das células após 7 dias de cultivo no biorreator e sobre o *scaffold* A,B)comercial de PS e C,D,E,F) de alginato/quitosana/glicerol. Células marcadas em verde apresentam-se viáveis e os pontos marcados em vermelho representam células mortas **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 43. Fotografias tiradas com um microscópio de contraste de fase invertida de cultura celular de fibroblasto murino NIH 3T3 semeado sobre A)*scaffolds* de alginato/quitosana/glicerol e B) *scaffold* comercial de PS . Objetiva usada de 20x. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 44. Crescimento celular da linhagem de fibroblasto NIH 3T3 nos *scaffolds* de A/Q/G e PS por 10 dias. **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 45. Micrografias tiradas por microscopia eletrônica de varredura para avaliação da adesão e morfologia celular sobre os *scaffolds* A) A/Q/G e B) PS cultivados por 10 dias. .. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 46. Avaliação da fluorescência dos *scaffolds* por varredura de 400 a 555 nm utilizando o microscópio confocal de fluorescência A) *scaffold* PS sem cultivo de célula B) *scaffold* A/Q/G sem cultivo de célula C) *scaffold* A/Q/G na presença células fixadas. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 47. Avaliação da adesão e morfologia celular por microscopia confocal de fluorescência. A coloração azul mostra o núcleo, corado com DAPI e a coloração verde o citoesqueleto, corado com Faloidina 488. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 48. Avaliação da adesão e da morfologia celular por microscopia confocal de fluorescência nas células de fibroblasto e queratinócitos. A coloração vermelha mostra o citoesqueleto, corado com Alexa Fluor Faloidina 594; **Erro! Indicador não definido.**

Figura 49. Equipamento Micro Spray Dryer LaB Maq (A) Nanopartículas Vazia e com AlClPc produzidas por ele (B) **Erro! Indicador não definido.**

Figura 50. Resultados de diâmetro médio (A), Índice de polidispersão (IPd) (B) e os valores médios do potencial zeta (ζ) (C) das formulações NpP na presença e na ausência de AlClPc antes de ser atomizada e após processo de secagem ($\pm$ DP). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 51. Resultados de diâmetro médio (A), Índice de polidispersão (IPd) (B) e os valores médios do potencial zeta (ζ) (C) da formulação NpPVazia, feita no micro *spray dryer*, nas condições 1,2 e 3 acompanhada por 7 dias ($\pm$ DP) **Erro! Indicador não definido.**

Figura 52. Resultados de diâmetro médio (A), Índice de polidispersão (IPd) (B) e os valores médios do potencial zeta (ζ) (C) das formulações NpPVazia e NpPAIcPc para o estudo de estabilidade de 1, 15,30,60, 90,120 e 180 dias ($\pm$ DP). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 53. Caracterização de nanopartículas pelo diagrama representativo da distribuição de tamanho e contagem de partículas obtidas com análise de detecção de pulso resistiva sintonizável (qNano Gold, IZON) A)NpPVazia e B)NpPAIcPc **Erro! Indicador não definido.**

Figura 54. Eletromicrografias para caracterização superficial das nanopartículas vazias produzidas pela condição 0 (A e B), condição 1 (C e D), condição 2 (E e F), condição 3 (G e H) e nanopartícula de AlClPc (I e J) **Erro! Indicador não definido.**

Figura 55. Eletromicrografias utilizando o FEG para caracterização superficial das nanopartículas NpPVazia (A, B,C,D) e NpPAIcPc (E,F). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 56. Fotomicrografias bidimensionais (A,C,E,G), tridimensionais (B,F) e perfil topográfico (D,H) das formulações de NpPVazia e NpPAIcPc, respectivamente obtidas por microscopia de força atômica. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 57. Resultados de diâmetro médio(A), Índice de polidispersão (IPd) (B) e os valores médios do potencial zeta (ζ) (C) das formulações NEVazia e NEAlcPc para o estudo de estabilidade de 1, 15,30,60, 90,120 e 180 dias ($\pm$ DP). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 58. Resultados de diâmetro médio (A), Índice de polidispersão (IPd) (B) e os valores médios do potencial zeta (ζ) (C) da formulação vazia feita no homogeneizador de alta pressão, circulada pelo equipamento 1 vez, 4 vezes e 8 vezes, utilizando o óleo Miglyol em sua composição ($\pm$ DP) **Erro! Indicador não definido.**

Figura 59. Resultados de diâmetro médio (A), Índice de polidispersão (IPd) (B) e os valores médios do potencial zeta (ζ) (C) da formulação vazia feita no homogeneizador de alta pressão, circulada pelo equipamento 1 vez, 4 vezes e 8 vezes, utilizando o óleo Lipmol em sua composição $\pm$ DP..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 60. Resultados de diâmetro médio (A), Índice de polidispersão (IPd) (B) e os valores médios do potencial zeta (ζ) (C) da formulação contendo o fármaco fotossensibilizante, feita no homogeneizador de alta pressão, circulada pelo equipamento 1 vez, 2 vezes e 4 vezes, utilizando o óleo Lipmol em sua composição ($\pm$ DP). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 61. Princípios da tecnologia STEP (Space and Time Resolved Extinction Profiles). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 62. Evolução dos perfis de transmissão das formulações NEVazia_4ciclos feita por homogeneizador de alta pressão (A), NEVazia_8ciclos feita por homogeneizador de alta pressão (B) NEVazia feita por deposição interfacial (C), NEAICIPc_4ciclos homogeneizada com alta pressão (D), NEAICIPc_4ciclos homogeneizada com alta pressão (E) NEAICIPc produzida por deposição interfacial (F), centrifugadas a 3618 rpm por 4,5 h. Primeiro registro inferior, último perfis superior direito. A abscissa mostra a posição (nm) e a ordenada a transmissão de luz. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 63. Integral da Transmissão na dependência de tempo (s) para (A)NEVazia_4 ciclos,NEVazia_8ciclos feitas por homogeneizador de alta pressão e NEVazia feita por deposição interfacial (B) NEAICIPc produzida por deposição interfacial e (C)NEVazia_Lipmol_4ciclos, NEAICIPc_Lipmol_2 ciclos e NEAICIPc_Lipmol_4ciclos produzidas por homogeneização de alta pressão usando LUMiSizer1 a 3618 rpm e 4,5 h... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 64. Caracterização de nanopartículas pelo diagrama representativo da distribuição de tamanho e contagem de partículas obtidas com análise de detecção de pulso resistiva sintonizável (qNano, IZON) A)NEVazia B)NEAICIPc..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 65. Fotomicrografias bidimensionais (A,D,G), tridimensionais (B,E,H) e perfil topográfico (C,F,I) das formulações vazias produzidas por deposição interfacial e por homogeneização de alta pressão e NEAICIPc, respectivamente obtidas das formulações por micros microscopia de força atômica..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 66. Espectros de absorção UV-Visível das curvas de calibração da AICIPc em acetonitrila, com comprimento de onda máximo em 674 nm, e gráfico da curva padrão

relacionando concentração de AICIPc versus absorvância; $y = 0,3815x + 0,03313$, $r = 0,999$.

..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 67. Espectros de emissão de fluorescência da AICIPc utilizando como solvente acetonitrila (comprimento de onda de emissão máximo em 676 nm), curva padrão de calibração, relacionando concentração de AICIPc versus emissão de fluorescência $y = 256992x \pm 8572,901$, $r = 0,994$ **Erro! Indicador não definido.**

Figura 68. Espectros de absorção de AICIPc (vermelho) encapsulada em nanopartícula de *whey protein* feita no *Micro Spray Dryer*. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 69. Espectros de absorção de AICIPc (vermelho) encapsulada pelo procedimento de deposição interfacial e (preto) encapsulada no equipamento *Micro Debee*. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 70. Absorção de AICIPc após a incubação por até 24 horas em células de queratinócitos (FS veiculado em nanoemulsão)..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 71. Absorção de AICIPc após a incubação por até 24 horas em células de queratinócitos (FS veiculado em nanopartícula de *whey protein*)..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 72. Ensaio de biocompatibilidade in vitro pelo método colorimétrico MTT, com células NIH 3T3 tratadas com A) NEVazia em diferentes concentrações B) NpPVazia em diferentes concentrações. Resultados com significância estatística $*p < 0,05$ em relação ao controle de 100% **Erro! Indicador não definido.**

Figura 73. Ensaio de citotoxicidade celular em linhagem de fibroblasto incubados com formulações de (A) NEAICIPc e (B) NpPAICIPc; sem ação de luz. Com significância estatística $*p < 0,05$ em relação ao controle de 100%. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 74. Mapeamento da AICIPc veiculada em NpPAICIPc, em microscopia confocal de fluorescência nas células de queratinócitos (HACAT) após 2 horas de incubação com NpPAICIPc e 24 após tratamento e em fibroblasto após 2 horas de incubação com NpPAICIPc. Na primeira coluna, a coloração verde mostra o citoesqueleto, corado com Faloidina; a coloração azul o núcleo corado com DAPI; na terceira coluna a coloração rosa é resultado da emissão de fluorescência da AICIPc intracelular e na quarta coluna as imagens estão sobrepostas. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 75. Mapeamento da AICIPc veiculada em NEAICIPc, em microscopia confocal de fluorescência nas células de fibroblasto após 1 hora e 30 minutos de incubação com NEAICIPc, 24 e 48 horas após tratamento e queratinócitos após 1 hora e 30 minutos de incubação. Na primeira coluna, a coloração verde mostra o citoesqueleto, corado com Faloidina; a coloração azul o núcleo corado com DAPI; na terceira coluna a coloração rosa é resultado da emissão de fluorescência da AICIPc intracelular e na quarta coluna as imagens estão sobrepostas. **Erro! Indicador não definido.**

Figura 76. Ensaio de fotobioestimulação usando o teste de viabilidade MTT após incubação com a formulação de NEAIClPc e NpPAIClPc sobre células de queratinócitos (HACAT) e posterior irradiação com diferentes doses (40,70,100 e 120 mJ.cm⁻²) e frequência A,C) Irradiação feita uma vez (24 horas após tratamento) B,D) Irradiação feita 2 vezes (24 e 48 horas após tratamento) Neste ensaio usou-se como controle negativo apenas com células (0 mJ.cm⁻²) e um controle do laser, ou seja, células e a maior dose (**p* < 0,05 comparado ao controle de 100%). **Erro! Indicador não definido.**

Figura 77. Ensaio de proliferação celular utilizando o corante resazurina de células semeadas sobre *scaffold* de A/Q/G, tratadas com A)NEAIClPc e B)NpPAIClPc e fotoestimuladas com doses de 40 a 120 mJ/cm²..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 78. Imunofluorescência para marcador de células em proliferação (ki-67 +, verde). A dupla marcação com DAPI demonstra a expressão dessa proteína no núcleo das células em mitose. As células foram semeadas em scaffold A/Q/G, tratadas com NEAIClPc e fotobioestimuladas nas doses de 40 mJ/cm² e 70 mJ/cm² **Erro! Indicador não definido.**

Lista de tabelas

Tabela 1. Vantagens e desvantagens de diferentes tipos de <i>scaffolds</i> usados em engenharia de tecidos	13
Tabela 2. Valores do número de onda das bandas atribuídas a quitosana, ao <i>scaffold</i> de alginato/quitosana antes do <i>cross link</i> , pós <i>cross link</i> e na presença de glicerol.....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 3. Espessura e propriedades mecânicas do scaffold de alginato/quitosana	Erro! Indicador não definido.
Tabela 4. Porcentagem de eventos celulares contabilizados por quadrante pela citometria de fluxo	Erro! Indicador não definido.
Tabela 5. Quantidade de célula no teste de adesão celular nos <i>scaffolds</i> após 1,5,7 e 10 dias	Erro! Indicador não definido.
Tabela 6. Propriedades físico químicas de nanopartícula de <i>whey protein</i> contendo ftalocianina de cloro alumínio em meio de cultura DMEM 3% de SBF.....	Erro! Indicador não definido.
Tabela 7. Propriedades físico químicas de nanoemulsão vazia e contendo ftalocianina de cloro alumínio em meio de cultura DMEM 3% de SBF	Erro! Indicador não definido.

Tabela 8. Taxa de separação representada pela inclinação e calculado pelo software SEPView 5.1, depois de integrar os arquivos de transmissão. **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 9. Resultado dos tempos de vida de prateleira (*shelf life*) de cada amostra **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 10. Capacidade de veicular o fármaco fotossensibilizante (AlClPc) em nanoemulão produzida por DI (NEAlClPcDI) , feita com HPH (NEAlClPcHPH) e encapsulada em nanopartícula proteica (NpP)..... **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 11. Rendimento quântico de oxigênio singlete para a nanoemulsão e para a nanopartícula de *whey protein* contendo AlClPc..... **Erro! Indicador não definido.**

Lista de abreviaturas e siglas

AA	Aminoácidos essenciais
A/Q	Alginato e quitosana
A/Q/G	Alginato, quitosana e glicerol
AlClPc	Ftalocianina de cloro-alumínio
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC®	American Type Culture Collection
CT	Controle
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole

DDS	Drug delivery systems
DI	Deposição Interfacial
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
DSC	Calorimetria Diferencial Exploratória
EMP	Erro médio padrão
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ET	Engenharia Tecidual
FS	Fármaco fotossensibilizante
HPH	Homogeneização de alta pressão
IPd	Índice de polidispersão
ISO	Organização Internacional de normalização
LED	Light Emitting Diode
MEC	Matriz Extracelular
MFA	Microscopia de força atômica
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
m/m	massa/massa
m/v	massa/volume
NE	Nanoemulsão
NEVazia	Nanoemulsão vazia
NEAlClPc	Nanoemulsão contendo ftalocianina de cloro alumínio

NpP	Nanopartícula proteica
NpPVazia	Nanopartícula proteica vazia
NpPAIClPc	Nanopartícula proteica contendo ftalocianina de cloro alumínio
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
$^3\text{O}_2$	Oxigênio molecular
PCL	Policaprolactona
PEC	Complexo Polieletrólítico
PS	Poliestireno
PDT	Photodynamic Therapy
SFB	Soro fetal bovino
TGA	Análise termogravimétrica
TFD	Terapia Fotodinâmica
TRPS	Sensor de pulso resistivo sintonizável
ζ	Potencial zeta
$\Phi\Delta$	Rendimento quântico de oxigênio singleto

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1A pele humana	1
1.2 Queimaduras	3
1.3 Biomateriais	5
1.4 Engenharia tecidual e os <i>scaffolds</i>	8
1.5 Alginato	14
1.6 Quitosana	16
1.7 Os fármacos fotossensibilizante: Ftalocianinas	19
1.8 Fotoprocessos biológicos: fotobiomodulação	21
1.9 Mecanismos moleculares da ação da luz de baixa intensidade	24
1.10 Nanotecnologia e os sistemas carreadores	25
1.10.1 Nanoemulsão	26
1.10.2 Nanopartícula polimérica	28
2. OBJETIVOS	Erro! Indicador não definido.
2.1 Objetivos gerais	Erro! Indicador não definido.
2.2 Objetivos específicos	Erro! Indicador não definido.
3. MATERIAIS E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
3.1 Materiais	Erro! Indicador não definido.
3.2 Equipamentos	Erro! Indicador não definido.
3.3 Métodos	Erro! Indicador não definido.
Primeira etapa: Preparo e caracterização de <i>scaffolds</i>	Erro! Indicador não definido.
3.3.1. Padronização das condições de preparo dos <i>scaffolds</i>	Erro! Indicador não definido.
3.3.2 Caracterização de <i>scaffold</i>	Erro! Indicador não definido.
3.3.2.1. Aspecto morfológico dos <i>scaffolds</i>	Erro! Indicador não definido.
3.3.2.2 Análise de Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (ATR-FTIR) dos <i>scaffolds</i>	Erro! Indicador não definido.
3.3.2.3 Espessura e teste mecânico dos <i>scaffolds</i>	Erro! Indicador não definido.

- 3.3.2.4 Molhabilidade *dos scaffolds* (ângulo de contato)..... **Erro! Indicador não definido.**
- 3.3.3 Ensaios *in vitro* **Erro! Indicador não definido.**
- 3.3.3.1 Cultura celular **Erro! Indicador não definido.**
- 3.3.3.1 Fibroblasto NIH 3T3 (ATT[®]CRL-1658TM) **Erro! Indicador não definido.**
- 3.3.3.2 Fibroblasto HFF-1(ATT[®]SCRC-1041TM) **Erro! Indicador não definido.**
- 3.3.3.3 Queratinócitos humano HACAT (Banco de Células do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro/RJ, Brasil, N° Catálogo 0341) **Erro! Indicador não definido.**
- 3.3.3.4 Micrografias das culturas celulares **Erro! Indicador não definido.**
- 3.3.3.5 Análise da cinética de crescimento celular e tempo de dobra populacional (*doubling time*) das linhagens celulares HFF-1 e HACAT **Erro! Indicador não definido.**
- 3.3.4 Ensaios de citotoxicidade dos *scaffolds*..... **Erro! Indicador não definido.**
- 3.3.4.1 Plaqueamento celular de fibroblasto e queratinócitos sobre os *scaffolds* de alginato/quitosana **Erro! Indicador não definido.**
- 3.3.4.2 Ensaio de citotoxicidade: avaliação da atividade mitocondrial através do teste de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio - MTT..... **Erro! Indicador não definido.**
- 3.3.4.3 Ensaio de citotoxicidade celular do meio de cultura proveniente da incubação com *scaffolds* **Erro! Indicador não definido.**
- 3.3.4.4 Ensaio de citotoxicidade das linhagens celulares cultivadas nos sistemas *scaffolds* ... **Erro! Indicador não definido.**
- 3.3.4.5 Identificação da via de morte celular (Apoptose e necrose)**Erro! Indicador não definido.**
- 3.3.4.5 Uso de sistemas do tipo biorreator para cultivo celular em modelos de *scaffolds* **Erro! Indicador não definido.**
- Para isso foram plaqueadas $5,0 \times 10^3$ células de fibroblasto (NIH 3T3) por *scaffold* comercial (Biotek 3D InsertTM Poliestireno (PS)) e também nos *scaffolds* quitosana/alginato em placa de 31 mm de diâmetro não tratada e aguardou-se por um período de 4 horas em incubador, a 37°C e 5% de CO₂..... **Erro! Indicador não definido.**
- 3.3.5 Estudos de adesão celular aos sistemas *scaffolds*..... **Erro! Indicador não definido.**
- 3.3.5.1 Avaliação com base na contagem direta de células em câmara de Neubauer **Erro! Indicador não definido.**
- 3.3.5.2 Avaliação com base em microscopia eletrônica de varredura**Erro! Indicador não definido.**

3.3.5.3 Avaliação com base em microscopia de fluorescência confocal **Erro! Indicador não definido.**

3.3.5.4 Estudo de viabilidade celular de HFF-1 cultivada sobre o *scaffold* de alginato/quitosana utilizando o ensaio Live/Dead® **Erro! Indicador não definido.**

Segunda Etapa: Preparo e caracterização de sistemas veiculadores de fármaco fotossensibilizante..... **Erro! Indicador não definido.**

3.4. Preparo dos nanossistemas **Erro! Indicador não definido.**

3.4.1 Preparo de nanopartícula de *whey protein* isolado (NpP) na presença e na ausência de ftalocianina de cloro alumínio (AlClPc) pelo método de Micro *Spray Dryer* **Erro! Indicador não definido.**

3.4.2 Preparo de nanoemulsões na presença e na ausência do fármaco fotossensibilizante (AlClPc) **Erro! Indicador não definido.**

3.4.2.1 Preparo de nanoemulsão na presença e na ausência de ftalocianina de cloro alumínio (AlClPc) por deposição interfacial..... **Erro! Indicador não definido.**

3.4.2.2 Preparo de nanoemulsão na ausência e na presença de ftalocianina de cloro alumínio usando o homogeneizador de alta pressão..... **Erro! Indicador não definido.**

3.4.3 Estudo de caracterização das nanopartículas NE e NpP na presença e na ausência do FS **Erro! Indicador não definido.**

3.4.3.1 Análise de diâmetro médio hidrodinâmico das partículas e índice de polidispersidade por espalhamento dinâmico de luz (DLS) **Erro! Indicador não definido.**

3.4.3.2 Medida de potencial Zeta..... **Erro! Indicador não definido.**

3.4.3.3 Estudos de estabilidade ao longo do tempo das formulações em condições adversas **Erro! Indicador não definido.**

3.4.3.4 Análise de diâmetro médio e concentração das partículas utilizando NE e NpP na presença e na ausência do FS o equipamento Q-Nano Gold **Erro! Indicador não definido.**

3.4.3.5 Caracterização de estabilidade acelerada das formulações das nanoemulsões na presença e na ausência do FS com uso do Lumisizer **Erro! Indicador não definido.**

3.4.3.6 Análise morfológica por microscopia de força atômica (MFA) das nanoemulsões e das nanopartículas de *whey protein* na presença e na ausência do FS **Erro! Indicador não definido.**

3.4.3.7 Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura das NpP **Erro! Indicador não definido.**

3.4.3.8 Estudos espectroscópicos do fármaco fotossensibilizante ftalocianina de cloro alumínio (AlClPc) **Erro! Indicador não definido.**

3.4.3.8.1 Linearidade de AIClPc.....	Erro! Indicador não definido.
3.4.3.9 Quantificação total de AIClPc em nanoemulsão e em nanopartícula de <i>whey protein</i>	Erro! Indicador não definido.
3.4.3.10 Quantificação de AIClPc incorporada em NE e NpP (<i>Drug loading</i>).....	Erro! Indicador não definido.
3.4.3.11 Determinação indireta do rendimento quântico de produção de oxigênio singlete ($\Phi\Delta$)	Erro! Indicador não definido.
3.4.4 Ensaios biológicos <i>in vitro</i>	Erro! Indicador não definido.
3.4.4.1 Estudos de taxa de internalização celular do fármaco Ftalocianina de Cloro Alumínio nanoencapsulado (<i>uptake</i>)	Erro! Indicador não definido.
3.4.4.2 Ensaio de biocompatibilidade celular em linhagem de fibroblasto NIH 3T3 de NE e NpP na ausência do fármaco fotossensibilizante.....	Erro! Indicador não definido.
3.4.4.3 Ensaio de citotoxicidade em linhagem de fibroblasto NIH 3T3 de NEAIClPc e NpPAIClPc (ausência do estímulo luminoso)	Erro! Indicador não definido.
3.4.4.4 Estudo de microscopia confocal de fluorescência das NEAIClPc e da NpPAIClPc em monocamada.....	Erro! Indicador não definido.
Terceira etapa	Erro! Indicador não definido.
3.5 Estudos de fotobioestimulação <i>in vitro</i> com diodo-laser em 675 nm.....	Erro! Indicador não definido.
3.5.1 Estudo de fotobioestimulação em monocamada de fibroblasto HFF-1.....	Erro! Indicador não definido.
3.5.2 Ensaios de fotobioestimulação nos <i>scaffolds</i> de alginato/quitosana cultivados com fibroblasto HFF-1	Erro! Indicador não definido.
3.5.3 Avaliação da proliferação celular sobre os <i>scaffolds</i> de alginato/quitosana utilizando o ensaio de Resazurina	Erro! Indicador não definido.
3.5.4 Ensaio de Imunofluorescência em fibroblasto HFF-1 cultivados em <i>scaffold</i> de alginato/quitosana após fotobioestimulação	Erro! Indicador não definido.
3.6 Análise estatística.....	Erro! Indicador não definido.
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	Erro! Indicador não definido.
4.1 Padronização das condições de preparo e análise morfológica dos <i>scaffolds</i>	Erro! Indicador não definido.
4.2. Caracterização dos <i>scaffolds</i>	Erro! Indicador não definido.

4.2.1 Aspecto morfológico	Erro! Indicador não definido.
4.2.2 Análise de Espectroscopia de infravermelho (ATR-FTIR) dos <i>scaffolds</i>	Erro! Indicador não definido.
4.2.3 Espessura e Testes mecânicos dos <i>scaffolds</i>	Erro! Indicador não definido.
4.2.4 Molhabilidade dos <i>scaffolds</i> (ângulo de contato).....	Erro! Indicador não definido.
4.2.5. Análises térmicas dos <i>scaffolds</i> : ensaios de calorimetria diferencial exploratória (DSC) e análise termogravimétrica (TGA)	Erro! Indicador não definido.
4.2.6 Estudo para avaliar as condições de esterilização dos <i>scaffolds</i>	Erro! Indicador não definido.
4.3. Ensaio <i>in vitro</i>	Erro! Indicador não definido.
4.3.1 Cultura celular de Fibroblasto NIH 3T3 (ATT [®] CRL-1658 TM) e HFF-1 (ATT [®] SCRC-1041 TM)	Erro! Indicador não definido.
4.3.2 Cultura celular de queratinócitos humano HACAT (Banco de células do Rio de Janeiro, N ^o catálogo 0341)	Erro! Indicador não definido.
4.3.3. Análise da cinética de crescimento e tempo de dobra populacional (<i>Doubling Time</i>) das linhagens celulares HFF-1 e HACAT	Erro! Indicador não definido.
4.3.3 Ensaio de citotoxicidade celular do meio de cultura proveniente da incubação com <i>scaffolds</i>	Erro! Indicador não definido.
4.3.4 Ensaio de citotoxicidade celular sobre os sistemas <i>scaffolds</i> : avaliação da atividade mitocondrial através do teste de MTT	Erro! Indicador não definido.
4.3.5. Identificação da via de morte celular (Anexina V)	Erro! Indicador não definido.
4.3.6. Uso de sistemas do tipo biorreator para cultivo celular em modelos de <i>scaffolds</i>	Erro! Indicador não definido.
4.4 Estudos de adesão celular aos sistemas <i>scaffolds</i> alginato/quitosana	Erro! Indicador não definido.
4.4.1 Avaliação com base na contagem direta de células em câmara de Neubauer.....	Erro! Indicador não definido.
4.4.2 Avaliação com base em microscopia eletrônica de varredura	Erro! Indicador não definido.
4.4.3. Avaliação com base em microscopia confocal de fluorescência	Erro! Indicador não definido.
4.4 Preparo dos sistemas de liberação nanoestruturados	Erro! Indicador não definido.

4.4.2 Preparo de nanopartículas de *whey protein* em *Micro Spray Dryer* na ausência e na presença do fármaco fotossensibilizante **Erro! Indicador não definido.**

4.5. Estudos de caracterização das partículas NpP na ausência e na presença do fármaco fotossensibilizante..... **Erro! Indicador não definido.**

4.5.1. Análise de tamanho das partículas, índice de polidispersidade e potencial zeta **Erro! Indicador não definido.**

4.4.4 Análise de diâmetro médio e concentração de partícula das NpP na presença e na ausência do FS utilizando o equipamento Q Nano Gold..... **Erro! Indicador não definido.**

4.5.3 Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das NpP na presença e na ausência de AlClPc..... **Erro! Indicador não definido.**

4.4.4 Análise de microscopia de força atômica (MFA) da NpPVazia e NpPAlClPc..... **Erro! Indicador não definido.**

4.4 Preparo de nanoemulsão na ausência e na presença de fármaco fotossensibilizante (AlClPc) **Erro! Indicador não definido.**

4.4.1 Caracterização de nanoemulsão na ausência e na presença do fármaco fotossensibilizante feita por deposição interfacial..... **Erro! Indicador não definido.**

4.4.2 Caracterização de nanoemulsão na presença e na ausência de AlClPc produzida por homogeneização de alta pressão **Erro! Indicador não definido.**

4.4.3 Estudo de estabilidade acelerada das NE na ausência e na presença de fármaco fotossensibilizante (Lumisizer)..... **Erro! Indicador não definido.**

4.4.4 Análise de diâmetro médio e concentração de partícula das NEVazia e NEAlClPc utilizando o equipamento Q Nano Gold..... **Erro! Indicador não definido.**

4.4.4 Análise de microscopia de força atômica (MFA) da NEVazia e NEAlClPc **Erro! Indicador não definido.**

4.4.3 Estudos espectroscópicos da Ftalocianina de Cloro Alumínio **Erro! Indicador não definido.**

4.4.3 Linearidade **Erro! Indicador não definido.**

4.4.6 Análise espectrofotométrica, quantificação total e *drug loading* **Erro! Indicador não definido.**

4.3.2 Determinação indireta do rendimento quântico de produção de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) **Erro! Indicador não definido.**

4.3.3 Ensaios <i>in vitro</i>	Erro! Indicador não definido.
4.3.3.1 Estudos de taxa de internalização celular do fármaco Ftalocianina de Cloro Aluminio nanoencapsulado (<i>uptake</i>)	Erro! Indicador não definido.
4.3.3.2 Ensaio de biocompatibilidade celular de NE e NpP na ausência do fármaco fotossensibilizante.....	Erro! Indicador não definido.
4.3.3.2 Ensaio de citotoxicidade do fármaco na ausente do estímulo luminoso	Erro! Indicador não definido.
4.3.3 Estudo de microscopia confocal de fluorescência das NEAlClPc e da NpPAlClPc em monocamada.....	Erro! Indicador não definido.
Terceira fase	Erro! Indicador não definido.
4.3.3.3 Estudo de fotobioestimulação em monocamada de queratinócitos: monitoramento da viabilidade celular após irradiação.....	Erro! Indicador não definido.
4.5.1 Ensaio de fotobioestimulação nos <i>scaffolds</i>	Erro! Indicador não definido.
4.5.1.1 Ensaio de proliferação celular utilizando resazurina	Erro! Indicador não definido.
4.5. Estudo de imunofluorescência em linhagem de fibroblasto cultivado em <i>scaffold</i> após fotobioestimulação.....	Erro! Indicador não definido.
5.0 Conclusão	32
6. REFERÊNCIAS.....	34

1. Introdução

1.1A pele humana

A pele, com uma área de aproximadamente $1,8 \text{ m}^2$, é o maior órgão do corpo humano e reveste todo o nosso organismo (DI MEGLIO , PERERA e NESTLE, 2011). Este órgão é dividido estruturalmente em três camadas distintas: externamente encontra-se a epiderme, como camada intermediária, a derme e abaixo da derme encontra-se a camada mais interna da pele, chamada de hipoderme ou tecido adiposo cutâneo (**Figura 1**).

Figura 1. Desenho esquemático das estruturas da pele divididas em epiderme, derme, hipoderme e anexos.

Fonte: (MACNEIL, 2007)

A pele atua como uma importante barreira bioquímica, física e imunológica. A barreira física consiste, principalmente, de estrato córneo composto por queratinócitos, os quais produzem uma proteína impermeável, a queratina. Essa barreira evita a perda de água e entrada de toxinas e agentes patogênicos (DENNING, 2004). A barreira bioquímica inclui lipídeos, enzimas, peptídeos antimicrobianos e macrófagos. E por fim, a barreira imunológica (originalmente conhecida como tecido linfóide associado à pele) que é composta por constituintes humorais e celulares do sistema imune (DI MEGLIO , PERERA e NESTLE, 2011). A pele protege ainda os tecidos mais profundos do organismo, garante hidratação adequada, regula a temperatura corporal e permite a síntese de vitaminas e hormônios.

A epiderme é uma camada formada de células epiteliais escamosas que sofrem um processo contínuo de auto-renovação, subdividida em quatro estratos: estrato basal,

espinhoso, granuloso e córneo (PROKSCH , BRANDNER e JENSEN, 2008). Estas camadas são compostas por queratinócitos com diferentes características e que se diferenciam à medida que vão do estrato basal para o córneo. Os queratinócitos sofrem processos de proliferação e diferenciação. Um balanço controlado e coordenado entre o sistema imune e os processos de proliferação e diferenciação celular é importante para o reparo de lesões cutâneas. Durante a reparação de lesões, os queratinócitos executam processos complexos que desencadeiam a inflamação e também a proliferação celular para manter a estrutura e a função da epiderme(ECKERT, 1989; ECKERT et al., 2002; ECKERT et al., 2011). Além dos queratinócitos, estão presentes na epiderme as células de Langerhans (células imunes), melanócitos, linfócitos T e as células de Merkel. A epiderme não possui vasos sanguíneos, por isso ela recebe nutriente e suporte sanguíneo da derme(ECKERT et al., 2013).

A derme encontra-se logo abaixo da epiderme, e pode ser dividida em duas camadas distintas. A primeira delas é a derme papilar, localizada em contato direto com a epiderme e constituída por tecido conjuntivo frouxo, contendo pequenas fibras de elastina e colágeno. A outra camada é a derme reticular, localizada entre a derme papilar e o tecido celular subcutâneo, constituída por fibras colágenas grossas, responsáveis pela absorção de choques mecânicos. Esta estrutura acolhe vasos sanguíneos e células imunes, como dendríticas dérmicas, células T, células natural Killer, células B, mastócitos e macrófagos. Na derme também são encontrados os fibroblastos, os quais tem origem nas células mesenquimais indiferenciadas. Os fibroblastos têm como principal função a manutenção da integridade do tecido conjuntivo pela síntese de componentes da matriz extracelular. Eles são capazes de modular a capacidade metabólica do tecido conjuntivo, passando a mudanças fenotípicas acentuadas, ou seja, do fenótipo de células imaturas migratórias e replicativas no início do processo de reparação, para o fenótipo característico de células ativamente engajadas na síntese proteica. Com isso passa a secretar grandes quantidades de colágeno (DI MEGLIO , PERERA e NESTLE, 2011; MARKESON et al., 2015).

Abaixo da derme encontra-se a hipoderme, composta por tecido conjuntivo que envolve células gordurosas, os adipócitos, e age como isolante térmico e reserva de energia. Subdivide-se a hipoderme em duas camadas: uma superficial, caracterizada por fibras de reticulina perpendiculares ao plano cutâneo, e uma profunda, com fibras de reticulina paralelas (YILDIRIMER , THANH e SEIFALIAN, 2012).

Para que a pele desempenhe com eficácia suas funções de proteção e homeostase do organismo, é importante que sua integridade seja mantida. Danos à pele devido a traumas e lesões interferem em suas funções, expondo o organismo a ação de agentes externos e comprometendo a homeostase.

1.2 Queimaduras

Queimaduras são consideradas como sendo a causa da morte de aproximadamente 265 mil pessoas por ano no mundo e 2,5 mil no Brasil (CRUZ , CORDOVIL e BATISTA, 2012).

A queimadura está entre os traumas mais graves, pois, além dos problemas físicos que podem levar o paciente à morte, pode acarretar outros problemas de ordem psicológica e social. O grau de comprometimento é classificado em função da profundidade da lesão. Assim, as queimaduras são classificadas como de primeiro, segundo e terceiro grau. No último caso, invariavelmente, há necessidade de enxertos para que ocorra a cicatrização. O evento da cicatrização é um processo que envolve aspectos bioquímicos e celulares complexos, sendo dividido em cinco etapas por alguns autores (coagulação, inflamação, proliferação, contração da ferida e remodelação) (MARIA DE F+ÍTIMA , ANDRADE e MORIYA, 2008).

A técnica cirúrgica é a mais utilizada para o tratamento de queimaduras, procedimentos conhecidos como autoenxertos, aloenxertos ou xenoenxertos, onde tecidos de sítios doadoras do próprio indivíduo afetado, tecidos cadavéricos humanos ou tecidos de espécies distintas (porcina, por exemplo), respectivamente, são transplantados para a região afetada (ATIYEH , GUNN e HAYEK, 2005; ROWAN et al., 2015) . A enxertia de pele de um sítio doador é responsável por uma segunda lesão dolorosa e, geralmente, de difícil cicatrização (FERREIRA et al., 2003).

Em função da carência de esterilidade, vida útil reduzida e disponibilidade limitada dos aloenxertos e heteroenxertos, uma série de biomateriais tem sido desenvolvidos, indicados quando em caráter temporário, não tendo a capacidade de substituir os enxertos autólogos (autoenxertos) (BOYCE, 1996; HALIM , KHOO e YUSSOF, 2010; SHEVCHENKO , JAMES e JAMES, 2009).

Estudos clínicos e científicos comprovam a importância dos curativos como agentes terapêuticos locais criando um ambiente ideal, favorecendo o processo de cicatrização e aumentando a qualidade de vida das pessoas acometidas por esses ferimentos. Os curativos são utilizados de acordo com a natureza e condições

fisiológicas dos ferimentos. Propriedades como manter o ferimento úmido, promover proteção física e mecânica, absorver o exsudato impedindo a proliferação bacteriana, promover as trocas de curativo sem prejudicar o ferimento além de proporcionar boa aceitação do indivíduo e gerar baixos custos são os objetivos buscados quanto ao desenvolvimento de determinado curativo (FERREIRA et al., 2003; FRANCO e GONÇALVES, 2008).

Existem vários tipos de curativos que são classificados de acordo com o biomaterial utilizado na fabricação e sua forma (JONES, GREY e HARDING, 2006). Os curativos mais conhecidos são:

Derivados de alginato (Sorbisan®, Algisite®): Compostos por alginato de cálcio tem capacidade de intumescimento possuindo boa absorção ao exsudato, possibilita o debridamento, diminuindo o risco de infecções.

Hidrofibras (Aquacel®): produzidos a partir de celulose que em contato com os fluidos do ferimento formam um gel de alta capacidade de absorção de exsudato.

Hidrogéis (Nu-gel®, Aquaform®): Normalmente constituídos por amido, possuem alta capacidade de retenção de água.

Hidrocolóide (Granuflex®, Tegaserb®): Constituído por gelatina, pectina e celulose, formam um gel adesivo que interage com o ferimento.

Filmes (Tegaderm®, Bioclusive®): Produzidos a partir de poliuretano e revestidos por adesivo, são permeáveis possibilitando trocas gasosas e vapor de água.

Atualmente, um seguimento diferente vem se projetando no desenvolvimento de substitutos de pele. Estes sistemas são constituídos de biomateriais, biomoléculas e células, participando ativamente da formação de novos tecidos e auxiliando o processo de cicatrização.

Muitos autores propuseram uma classificação para os estes materiais substitutivos da pele: i) Classe I – equivalentes epidermais; ii) Classe II – equivalentes dermais a partir do processamento da pele ou em componentes baseados em colágeno e outras proteínas dermais; iii) Classe III – materiais substitutivos com componentes dermais e epidermais, popularmente referidos como “compostos de pele”.

De acordo com Balasubramani 2001, a eficácia de um substituto de pele constitui uma função de vários fatores: a) biocompatibilidade, b) uniformidade na composição c) controle da composição biológica e d) avaliação padronizada. Além disso, espera-se que os materiais substitutivos possuam o mais alto grau de semelhança estrutural e funcional com os autoenxertos. Deve também ter baixo custo; longa

validade; ser usado sem a necessidade de proteção mecânica à parte; não-antigênico; flexível; prevenir a perda d'água; constituir uma barreira para bactérias; ser adaptável a superfícies irregulares e ao crescimento de crianças; de fácil aderência e ser inserido em apenas um procedimento; de preferência não cirúrgico (BALASUBRAMANI , KUMAR e BABU, 2001; GALLICO e OCONNOR, 1985; GALLICO, 1990; RUE et al., 1993; SHAKESPEARE, 2005).

O produto mais conhecido é o fabricado pela marca francesa EpiSkin TM, que possui modelos de pele reconstituída (derme e epiderme) e outros tipos de epitélio (córneo, vaginal, mucosa oral). O Orcel® (Ortec International, EUA) é um substituto de pele composto de colágeno bovino tipo I formando uma dupla camada em formato de esponja sobre a qual são semeados queratinócitos e fibroblastos. Orcel® foi aprovado FDA para tratar queimaduras. A esponja de colágeno é capaz de produzir fatores de crescimento que facilitam a cicatrização das feridas. Em geral, é bem tolerado e promove cicatrização mais rápida com mínima irritação em comparação com o curativo acelular. Embora estas construções demonstrassem excelente delineação de camadas da epiderme e da derme, a pele transplantada normalmente é viável por poucas semanas pós-transplante (PRADITSUKTAVORN e MUANGMAN, 2015).

1.3 Biomateriais

A utilização de biomateriais como substitutos de partes do corpo humano é conhecida há muito tempo. Segundo historiadores, estruturas feitas de tendões de animais eram utilizadas no Egito antigo, já na Grécia e na Índia, os médicos utilizavam biomateriais para a reparação de mutilações provenientes da guerra (COBURN e PANDIT, 2007).

A **Figura 2** mostra o pé de uma múmia de 3000 anos de idade descoberta por pesquisadores da Universidade Ludwig Maximilians. Há evidências de que um médico no Egito tenha criado uma prótese de madeira para ajudar um paciente cujo dedo foi amputado em um acidente (NERLICH et al., 2000). Hoje, após séculos de história, eles foram evoluindo juntamente com outros setores da ciência. Em 2016 o mercado de biomateriais movimentou 70,9 bilhões de dólares, com expectativas de alcançar 149 bilhões em 2021, um aumento devido a fatores como o aumento global de doenças cardiovasculares, avanços tecnológicos, aumento de fundos do governo, aumento no mercado de implantes, um maior taxa de população geriátrica, aumento nos casos de cirurgias ortopédicas e um crescente desenvolvimento na área de engenharia tecidual.

Figura 2. Pé com prótese de madeira no dedão

Fonte: (NERLICH et al., 2000)

Segundo a Conferência de Consenso em Biomateriais para aplicações clínicas de 1982, entende-se por biomaterial *“Toda substância (com exceção de drogas) ou combinação de substâncias, de origem sintética ou natural, que durante um período de tempo indeterminado é empregado como um todo ou parte integrante de um sistema de tratamento, ampliação ou substituição de quaisquer tecidos, órgãos ou funções corporais”* (WILLIAMS, 1987a).

Os biomateriais são materiais utilizados na substituição de tecidos humanos que devem apresentar propriedades físicas e biológicas compatíveis com os tecidos vivos hospedeiros, de modo a estimular uma resposta adequada dos mesmos (WILLIAMS, 1987). Tais propriedades caracterizam a biocompatibilidade, envolvendo a capacidade do material de não sofrer danos no meio fisiológico, bem como não provocar danos nos tecidos locais ou distantes, toxicidade, respostas inflamatórias ou imunogenicidade.

Paralelamente à biocompatibilidade, é importante que o material do implante permita o desempenho imediato da função específica (estática e dinâmica) da parte do corpo que está sendo substituída. Esta característica está embutida no conceito de biofuncionalidade (RAVAGLIOLI e KRAJEWSKI, 2012), cujas características mecânicas e biológicas do material são adequadas para cumprir a função desejada pelo tempo desejado.

Os biomateriais podem ser classificados pela origem e pelas aplicações a que se destinam, sendo esta última geralmente dividida em três grupos: substituição de tecidos moles, duros e materiais cardiovasculares.

Quanto à classificação de acordo com a origem, os biomateriais apresentam como classificação geral: os biomateriais biológicos ou naturais (autógenos, homogêneos

e heterógenos) e biomateriais artificiais (metálicos, poliméricos, cerâmicos ou compósitos) (NAIR e LAURENCIN, 2007; PARK e LAKES, 2007; WILLIAMS, 1987b).

Os biomateriais metálicos são raramente utilizados na sua forma pura e geralmente apresentam alta resistência mecânica à tração, impacto, fadiga e desgaste. Porém, apresentam baixa biocompatibilidade, corrosão em meio fisiológico alta densidade e diferença de propriedades mecânicas com relação aos tecidos. Os materiais poliméricos são largamente empregados devido à facilidade de fabricação, boa biocompatibilidade e baixa densidade, porém apresenta baixa resistência mecânica. O grande interesse pelas cerâmicas para aplicações biológicas ocorre devido à sua diversidade, oferecendo características como biocompatibilidade, osteocondutividade, dureza e boa resistência mecânica à compressão. Possui a desvantagem de ter baixa resistência à tração. Os materiais compósitos são formados através da associação de dois ou mais materiais, dos quais um será uma matriz e os outros componentes serão o reforço, o que objetiva obter propriedades específicas para aplicações em implantes, dependendo dos biomateriais empregados.

Outra classificação dos biomateriais é feita de acordo com suas características de interação com o tecido, conforme segue abaixo.

Materiais biotoleráveis são aqueles apenas tolerados pelo organismo, sendo isolados dos tecidos adjacentes através de formação de camada envoltória de tecido fibroso. Esta camada é induzida pela liberação de compostos químicos, íons, produtos de corrosão e outros por parte do material implantado. Os materiais biotoleráveis são todos os polímeros sintéticos e a grande maioria dos metais.

Materiais bioinertes são aqueles tolerados pelo organismo e a formação de envoltório fibroso é mínima. O material não libera nenhum tipo de componente ou libera quantidades mínimas. Os materiais bioinertes mais utilizados são o titânio, alumina, zircônia, ligas de carbono e titânio. De acordo com a Conferência da Sociedade Européia para Biomateriais realizada na Inglaterra em 1986, o termo bioinerte não é adequado, já que todo material induz algum tipo de resposta do tecido hospedeiro, mesmo que seja mínima, por este motivo o termo deve ser evitado. No entanto, ainda é comumente utilizado, tendo sido definido com sendo um material que apresenta uma resposta interfacial mínima que não resulta na ligação ou rejeição do tecido hospedeiro.

Materiais bioativos são aqueles em que ocorrem ligações químicas entre material e tecido em função da similaridade química entre eles. Os principais materiais desta classe são os vidros, hidroxiapatita, compostos de fosfato de cálcio e vitro-cerâmicas.

Materiais bioreabsorvíveis são aqueles que após certo período de tempo em contato com os tecidos, acabam sendo degradados, solubilizados ou fagocitados pelo organismo. Os principais exemplos destes materiais são o fosfato tricálcio, PGA, PLA (WILLIAMS, 1987b).

Os biomateriais já são utilizados em diversas aplicações médicas (DE CASTRO BRAS et al., 2010; LU et al., 2009):

- Dispositivos odontológicos (implantes e restaurações);
- Dispositivos oftalmológicos (lentes de contato e prótese de córnea);
- Dispositivos para reconstrução de tecido mole (pele artificial e matriz);
- Dispositivos para liberação controlada de fármacos (microcápsulas, implantes e sistemas transdérmicos).
- Implantes cardiovasculares (válvulas cardíacas, marca passo, *stents* e enxertos);
- Implantes para cirurgia plástica e reconstrutiva (reconstrução maxilofacial e de mamas);
- Próteses ortopédicas (de joelho e quadril, fixação de fratura);

Assim, nos últimos anos vem ocorrendo grande avanço nas pesquisas de biomateriais para estas áreas no que se refere principalmente à reconstrução e regeneração tecidual, envolvendo diretamente a engenharia de tecidos.

1.4 Engenharia tecidual e os *scaffolds*

O termo Engenharia Tecidual (ET) foi empregado pela primeira vez durante o 1º Encontro da Fundação de Ciência Nacional (*National Science Foundation* - NSF) em 1988 nos Estados Unidos da América (EUA). A ET foi definida como *a aplicação de princípios e métodos de engenharia e ciências da vida para a compreensão da relação estrutura/função de tecidos saudáveis e de patologias e para o desenvolvimento de substitutos biológicos para o reparo ou regeneração de tecidos ou órgãos* (SHALAK e FOX, 1988). Hoje é um campo emergente e interdisciplinar.

Embora o campo da engenharia de tecidos possa ser relativamente novo, a ideia de substituir um tecido por outro teve início no século XVI. Gasparo Tagliacozzi, professor de cirurgia e anatomia na Universidade de Bolonha descreveu em seu trabalho

publicado em 1597 um substituto nasal construído a partir de um retalho do antebraço (MURPHY et al., 2013; O'BRIEN, 2011).

Um dos objetivos da ET é a substituição das próteses por matrizes teciduais biodegradáveis que auxiliem a regeneração de tecidos perdidos ou danificados. A vantagem em se utilizar matrizes tridimensionais na ET é que, além da substituição de tecidos perdidos ou danificados, há a possibilidade de controlar o formato, tamanho e composição do enxerto *in vitro*. Além disso, as matrizes podem ser utilizadas na regeneração *in vivo* de tecidos saudáveis remanescentes, recuperando a estrutura e função dos tecidos através do restabelecimento dos tecidos próximos (LEOR e COHEN, 2004).

A ET vem sendo abordada juntamente com os *scaffolds* com a finalidade de preparar um apoio tridimensional feito de materiais biocompatíveis e biodegradáveis usados para apoiar e orientar o crescimento das células, que formam o modelo de colonização celular, proliferação, bem como ser capaz de fornecer diferentes conjuntos de sinais fisiológicos para o tecido em desenvolvimento (BIDARRA , BARRIAS e GRANJA, 2014b). Esta estratégia irá proporcionar uma proteção das células, a retenção prolongada no sítio da lesão e um ambiente fisiológico mais tridimensional (3-D). A implantação de um *scaffold* cultivado com células se inicia com o isolamento de células a partir do paciente. Logo depois, o *scaffold* é semeado com as mesmas e finalmente é implantado na área lesionada (**Figura 3**). Antes desse procedimento, o *scaffold* cultivado com células pode ser submetido a um ambiente *in vitro* que mimetize o ambiente *in vivo* da área. Este ambiente *in vitro* geralmente é gerado com a utilização de um biorreator. Neste sistema são proporcionados nutrientes, fatores de crescimento e estímulos mecânicos para facilitar o desenvolvimento de um tecido funcional(LANZA; LANGER e VACANTI, 2011).

Figura 3. Conceito de engenharia de tecidos

Fonte: Adaptado (STOCK e VACANTI, 2001)

Portanto, os *scaffolds* (arcabouços ou suportes) executam as funções estruturais e bioquímicas da matriz extracelular nativa (MEC) até que as células sejam capazes de produzir a sua própria MEC (BARUD et al., 2015; SHI et al., 2014). A MEC nativa proporciona um substrato com moléculas bioativas específicas que controla processos celulares, tais como a adesão celular, proliferação, migração, diferenciação, sobrevivência e suporte físico para células, características estas que desafiam os pesquisadores para elaborar um *scaffold* ideal.

A arquitetura do *scaffold* é muito importante como o conceito básico de ET. As seguintes características garantem o sucesso dessa matriz: (I) A estrutura deve fornecer extensa rede de interconexão dos poros; para fornecer o oxigênio e nutrientes para as células que estão distantes da superfície (normalmente mais do que 1 mm), (II) os materiais que são utilizados devem ser biocompatíveis e biodegradáveis, e (III) a forma e o tamanho do esqueleto deve associar o tecido nativo com propriedades mecânicas adequadas (SOBRAL et al., 2011). Para células em crescimento e melhor transporte de nutrientes as porosidades devem ser superiores a 90% (FREYMAN, YANNAS e GIBSON, 2001; LEONG, CHEAH e CHUA, 2003). Em termos de tamanho de poros, um intervalo entre 200 e 400 µm tem sido sugerido para regeneração *in vitro* de tecido ósseo (LEONG, CHEAH e CHUA, 2003), enquanto que outro estudo recomenda

tamanhos entre 300 e 500 μm (HUTMACHER, 2000). Outros ainda apontam que para o crescimento ósseo, o tamanho ideal dos poros varia entre 75-250 μm . Por outro lado, para crescimento de tecido fibro-cartilaginoso, o poro recomendado varia de 200 a 300 μm (CHEUNG et al., 2007; RATNER et al., 1996; RATNER et al., 2004). Os poros, portanto, precisam ser grandes o suficiente para permitir que as células migrem pela estrutura, e eventualmente fiquem ligadas dentro do *scaffold*, mas pequeno o suficiente para estabelecer uma superfície específica suficientemente alta, permitindo a ligação eficiente de um número crítico de células. Os poros devem possuir tamanhos iguais ao longo de todo *scaffold*, porque é bem estabelecido que uma distribuição não homogênea das células após a semeadura está associada com baixas taxas de formação de tecido (KIM et al., 1998; LI et al., 2001). A matriz também deve ter uma integridade mecânica suficiente durante a cultura in vitro de células para manter os espaços necessários pra o crescimento e o desenvolvimento do tecido (DRURY , DENNIS e MOONEY, 2004).

Os biomateriais vêm ganhando espaço na produção dos *scaffolds* (BARUD et al., 2015; FRAJKOROVA et al., 2015; MARTEL-ESTRADA et al., 2015; NGADIMAN et al., 2015). Ao longo das duas últimas décadas, um meticuloso trabalho foi realizado para explorar biomateriais e superfícies para a engenharia de tecidos (BURG , PORTER e KELLAM, 2000; PARK et al., 2015; SUH e MATTHEW, 2000a). A indústria de compósitos era dominada por polímero sintético, mas, recentemente, a sua popularidade tem diminuído devido à sua não-biocompatibilidade, possibilidade de rejeição e adesão insuficiente de células a polímeros não modificados (SIMKOVIC, 2008). A utilização de polissacáridos suplantou os polímeros sintéticos "verdes" tradicionais, tais como o ácido polilático (PLA) e o poli-3-hidroxibutirato (PHB) (VILAPLANA , STROMBERG e KARLSSON, 2010).

Os polissacáridos são largamente utilizados para este fim devido a sua solubilidade em água, estabilidade às variações de pH, ausência de toxicidade, por serem biodegradáveis, biologicamente ativos, possuem papel crítico na sinalização celular , em particular, no domínio do reconhecimento imunológico, (BACAKOVA , NOVOTNA e PARIZEK, 2014; CUADROS , ERICES e AGUILERA, 2015a) e capacidade de formar géis fortes e termorresistentes. A quitosana e o alginato são os principais polissacarídeos utilizados para fins farmacêuticos e biomédicos. (VENKATESAN et al., 2015a).

A fabricação dos *scaffolds* pode ser classificada em cinco técnicas principais. As técnicas convencionais, tais como evaporação de solvente em combinação com a lixiviação de partículas e separação de fases em combinação com secagem por congelamento, e as técnicas como *electrospinning*, forma sólida livre, impressão 3-D e mais recentemente a descelularização de matriz extracelular (BURKOTH , BURDICK e ANSETH, 2000; DAS et al., 2003; FREED et al., 2006; KUCUKGUL et al., 2015; MIKOS et al., 1993; TAYLOR et al., 2006; XU et al., 2004).

A prototipagem rápida ou impressão 3D consiste na deposição de material camada por camada por meio de um software. Podem ser utilizados vários materiais com uma reprodutibilidade precisa, possui arquitetura e porosidade bem definidas e capacidade de incorporação de células e moléculas bioativas. Mas ainda é um processo demorado (BOSE , VAHABZADEH e BANDYOPADHYAY, 2013; BRUNELLO et al., 2016).

A eletrofiação ou *electrospining* consiste na extrusão de fibras poliméricas por meio de alta voltagem. Pode-se produzir nanofibras por este método. Porém apresenta pouco controle na porosidade e deposição de fibras, assim como uma resistência mecânica deficiente (PHAM , SHARMA e MIKOS, 2006).

O método de separação de fases consiste na dissolução do polímero em um solvente seguido de processos de resfriamento, congelamento e sublimação do solvente. A lixiviação de partículas consiste na deposição de solução polimérica com sal atarrado dentro do molde e evaporação do solvente seguida da lixiviação dos cristais de sal, formando poros. Apresenta alto grau de porosidade, porém sem interconectividade e com possibilidade de resíduos do solvente. Por fim, a técnica de freeze-drying consiste no processo de congelamento da estrutura polimérica dentro do molde. Apresenta interconectividade entre os poros, mas essa porosidade é menor que a produzida por outros métodos (TRACHTENBERG; KASPER e MIKOS, 2014).

Exceto a biocompatibilidade e alguns aspectos mecânicos que estão relacionadas aos materiais, todas as outras características mencionadas de um *scaffold* são altamente dependentes dos parâmetros que podem ser modificadas através de diferentes métodos de fabrico, produzindo *scaffolds* porosos, fibrosos, microesferas, hidrogéis, compósitos ou *scaffolds* acelulares (MIKOS et al., 1993; TAYLOR et al., 2006). Na perspectiva de fabricação, cada *scaffold* produzido tem vantagens e desvantagens (**Tabela 1**).

Tabela 1. Vantagens e desvantagens de diferentes tipos de *scaffolds* usados em engenharia de tecidos

Tipo de <i>scaffold</i>	Vantagens	Desvantagens	Perspectiva futura
<i>Scaffold</i> poroso	Alta porosidade fornecendo um ambiente adequado para secreção de matriz extracelular e nutriente para as células. Tamanhos de poros específicos para cada tipo de células impedem aglomeração das células, evitando assim formação de centro necrótico	A natureza porosa limita a distribuição homogênea das células. Diferentes tamanhos de poros são necessários para tipos de células específicas	Melhoria na conectividade dos poros e, consequentemente na estrutura dos <i>scaffolds</i>
<i>Scaffolds</i> fibrosos	Estrutura altamente microporosa adequada para adesão celular, proliferação e diferenciação. Baixa resposta inflamatória após a implantação.	A funcionalização da superfície é necessária para criar as nanofibras nesse tipo de <i>scaffold</i> .	Drogas e moléculas biológicas como proteínas, genes fatores de crescimento, etc., podem ser incorporados nesses <i>scaffolds</i> para liberação de ativos
Hidrogel	Altamente biocompatível e taxa controlada de biodegradação	Resistência mecânica limitada por possuir estruturas moles.	Definir comportamento de degradação dos e tenacidade Incorporação de fatores de crescimento para facilitar a diferenciação celular.
Microesferas	Facilmente fabricado com características adequadas Fornece conexão celular aprimorada e propriedades de migração.	Métodos de produção de microesferas muitas vezes não são compatíveis com as células e reduzem a viabilidade celular.	Podem ser usados como veículo de entrega de drogas para tecido alvo
Compósitos	Altamente biodegradável e oferecem alta força mecânica. Maior absorvidade.	Subprodutos ácidos são gerados após a degradação. Pobre afinidade com a célula. Exigem esforços no desenvolvimento	Nano-biocerâmica e compósitos de polímeros com maior taxa de degradação estão sendo desenvolvidos.
Acelulares	A MEC nativa é preservada e, portanto, as características anatômicas são mantidas. Menos resposta inflamatória e imune Maior resistência mecânica.	Descelularização completa é necessária para evitar respostas imunes.	Esses <i>scaffolds</i> são promissores para o desenvolvimento órgãos artificiais.

Fonte: (CHAUDHARI et al., 2016)

Portanto, mais pesquisas devem ser feitas para o desenvolvimento de *scaffolds* ideais para o crescimento e regeneração tecidual da pele, pois ainda existem desafios a serem superados tais como melhorar a interação das células com o *scaffold*, rapidez na

proliferação e diferenciação celular, bem como a vascularização dos tecidos. Atualmente, com o rápido avanço no campo do *organ on chip*, os esforços direcionados ao desenvolvimento da tecnologia *skin-on-chip* tem demonstrado uma promessa notável na geração de pele artificial para cura de feridas e teste de drogas (MASCHMEYER et al., 2015; MORI , MORIMOTO e TAKEUCHI, 2017; WUFUER et al., 2016). O sucesso recente dessa tecnologia foi alcançado através do desenvolvimento de biorreatores de perfusão que oferecem estresse mecânico variável e melhoram as condições das culturas celulares. Ao mesmo tempo, tecnologias microfluídicas destinadas ao desenvolvimento de culturas de equivalente de pele mostram-se promissoras na aplicação clínica de fármacos, particularmente associado à cicatrização de feridas teciduais (ATA⁺ et al., 2013).

1.5 Alginato

O alginato é um copolímero aniônico linear constituído de ácidos α -L-gulurônicos e β -D-manurônicos com ligações 1-4 (**Figura 4**). O material varia extensamente em termos de sua proporção entre os resíduos manurônicos (M) e gulurônicos (G), bem como em sua estrutura sequencial e grau de polimerização. Desta forma, o material pode apresentar sequências alternadas de resíduos MG e blocos constituídos de dois ou mais resíduos M ou G (CUADROS , ERICES e AGUILERA, 2015a; SIKORSKI et al., 2007; VALLA e SKJAKBRAEK, 1996). É um biopolímero encontrado e extraído de algas marinhas castanhas (Phaeophyceae).

Figura 4. Estrutura química do alginato

Fonte: (VENKATESAN et al., 2015b)

O alginato tem uma estrutura de anel de seis membros na espinha dorsal; por conseguinte, é difícil aumentar a rigidez ou compactar. Esta estrutura cria volumes

vazios maiores, e permite a absorção de moléculas de água (absorvendo de 200 a 300 vezes o seu próprio peso) (DE MORAES et al., 2013; SHAARI e KAMARUDIN, 2015). Infelizmente, a absorção de água excessiva causa o inchamento da membrana e, assim, diminui a seletividade.

O alginato é usado como espessante na indústria de alimentos em molhos, coberturas, maioneses e iogurtes. Também é usado como estabilizante, reduzindo a formação de cristais de gelo e o derretimento de sorvetes. Na indústria farmacêutica, este composto tem sido usado na liberação controlada de medicamentos e produtos químicos devido a sua sensibilidade ao pH (GEORGE e ABRAHAM, 2006).

Hidrogéis de alginato podem ser formados usando diversas estratégias de reticulação química ou física e métodos iônicos, sendo este o mais amplamente utilizado, fornecendo melhores resultados porque o complexo de polímero produzido é ao mesmo tempo robusto e hidrofílico. Processos como gelificação externa, gelificação interna, reticulação covalente e fotoreticulação também são usados (BIDARRA , BARRIAS e GRANJA, 2014b; SHAARI e KAMARUDIN, 2015).

Hidrogéis e *scaffolds* de alginato podem ser preparados por gama diversificada de agentes de reticulação que são substâncias majoritariamente à base de cálcio (BERRIDGE , LIPP e BOOTMAN, 2000). Quando o alginato de sódio é colocado em contato com cloreto de cálcio, o íon cálcio substitui o íon sódio no polímero; cada íon de cálcio é reticulado com duas porções de cadeias poliméricas. Os íons de cálcio liberados do material possuem a capacidade de promover a hemóstase, que é a prevenção da perda de sangue além de contribuir como uma matriz para que plaquetas e eritrócitos se agreguem. Cuadros e colaboradores em 2012 estudaram o efeito das concentrações de CaCl_2 sobre as propriedades mecânicas das fibras de alginato de cálcio; em que a tensão de tração máxima foi determinada e foi produzida com um 1,41% (m/v) ou 127 mM de concentração de cloreto de cálcio (CUADROS , SKURTYS e AGUILERA, 2012).

Além disso, os alginatos são quimicamente versáteis, permitindo a fácil incorporação de moléculas bioquímicas para respostas de células específicas (MAIA et al., 2014; ZHENG et al., 2015). A principal desvantagem desse biomaterial é a sua baixa força mecânica. Para driblar essa limitação, vários pesquisadores têm combinado o alginato com outros materiais (alginato-polímero como PLGA, PEG e quitosana, alginato-proteínas como colágeno e gelatina, alginato-cerâmica, alginato-biovidro, alginato-biosilica) para produzir biocompósitos que forneçam vantagens biológicas e

maior resistência mecânica devido ao reforço material, além de mostrar propriedades bioquímicas importantes em termos de porosidade, adesão celular, biocompatibilidade, biodegradabilidade, proliferação celular, excelente mineralização e diferenciação osteogénica (BIDARRA, BARRIAS e GRANJA, 2014b).

Prang e colaboradores (PRANG et al., 2006) projetaram hidrogéis capilares à base de alginato que foram usados para regeneração de axônios e reinervação de neurônios em ratos. Isto foi conseguido revestindo os hidrogéis com colágeno ou fibronectina sem respostas inflamatórias. E assim, possibilitar o uso do implante de células progenitoras neurais para regeneração nervosa direta após lesão medular. Alginato foi reticulado com outros polímeros como colágeno e oligossacarídeos para regeneração do tecido da pele (CHANDIKA et al., 2015).

Em resumo, os alginatos são um material promissor para a fabricação de suportes porosos em 3D por causa da boa biocompatibilidade, degradação controlável e de gelificação rápida em presença de cálcio.

Os métodos mais utilizados e extensivamente estudados para preparar os *scaffolds* de alginato são a liofilização, *electrospinning* e reticulação (KI et al., 2013; KIM et al., 2015; SUN et al., 2015; VALLA e SKJAKBRAEK, 1996; NISTA, BETTINI e MEI, 2015; SUN et al., 2015; VALLA e SKJAKBRAEK, 1996).

1.6 Quitosana

A quitosana é um polissacárido obtido por desacetilação de quitina, principal componente orgânico dos exoesqueletos de crustáceos (por exemplo, camarões, caranguejos). O processo de desacetilação ocorre em meios fortemente básicos ou por hidrólise enzimática na presença de quitina deacetilase. Essa desacetilação promove a substituição de alguns grupos N-acetil presente na cadeia de quitina por grupamento amino. A quitosana é composta por β - (1,4) 2-amino-desoxi-d-glucopiranosose; assim, é um copolímero de glucosamina e N-acetilglucosamina (DE GODOI et al., 2013; SUSANTO et al., 2013). Os grupos amino e hidroxilo da quitosana podem atuar como doadores de elétrons. A quitosana tem três tipos de grupos funcionais reativos, um grupo amino/acetamida, assim como ambos os grupos hidroxilo primário e secundário na posição C-2, C-3 e C-6, respectivamente (**Figura 5**). O conteúdo de amino é o principal fator que contribuem para as diferenças nas suas estruturas e propriedades físico-químicas (MA e SAHAI, 2013; SHAARI e KAMARUDIN, 2015). Além disso, a

sua distribuição aleatória torna fácil para gerar ligações de hidrogênio intra e inter moleculares (ZHANG et al., 2010).

Figura 5. Estrutura química da a) quitina e b) quitosana

Fonte: (ISLAM, BHUIYAN e ISLAM, 2017)

Dependendo de onde é extraída e do processo de desacetilação, a média de peso molecular da quitosana pode variar de 50 a 1000 kDa, com graus de desacetilação variando de 50 a 90%. A quitosana é um polímero semi-cristalino e o grau de cristalinidade é uma função do grau de desacetilação. Por causa da estrutura estável cristalina, a quitosana é normalmente insolúvel em soluções aquosas acima de pH 7. No entanto, em ácidos diluídos, os grupos aminos são protonados e a molécula se torna totalmente solúvel abaixo de pH 5 (CHANG et al., 2015).

A quitina é vista como um sub-produto da indústria pesqueira, principalmente de crustáceos, sendo que na grande maioria das vezes é tratada como dejetos. No entanto sua conversão é economicamente viável, principalmente se considerada na recuperação de carotenoides como a astaxantina utiliza como aditivo alimentar. Países como EUA, Japão, Austrália e Noruega já produzem a quitosana de forma comercial, o mercado norte-americano em 2015 foi estimado em 1,42 bilhão de dólares, e espera-se um grande crescimento previsto para 2025 alcançar em torno de 17,84 bilhões, com grande utilização nas áreas farmacêuticas e alimentícia, dependendo do seu grau de pureza (ZARGAR, ASGHARI e DASHTI, 2015).

Uma das características mais promissoras da quitosana é a sua excelente capacidade de ser processado em estruturas porosas para uso em transplante celular e regeneração tecidual. Estruturas porosas de quitosana podem ser formadas por congelamento e liofilização de soluções em ácido acético. O tamanho do poro pode ser controlado variando a taxa de congelamento e, portanto, o tamanho do cristal de gelo. As propriedades mecânicas da quitosana são dependentes do tamanho dos poros. O teste de tração de amostras hidratadas mostram que membranas porosas reduziram os módulos elásticos (0,1/0,5 MPa) em comparação com membranas de quitosana não porosas (7 MPa) (SUH e MATTHEW, 2000b).

Depois da celulose, a quitosana é o polissacarídeo mais abundante encontrado na natureza. É conhecida por ser biocompatível e biodegradável, e possuir propriedades antibacteriana, fungicida e antitumoral (JAYAKUMAR et al., 2011), sendo esta última devido a sua capacidade de ativar macrófagos, além disso, tem sido descrito como capaz de melhorar a cicatrização de feridas através do aumento da infiltração de células inflamatórias para a zona da ferida, através da promoção de migração e proliferação de fibroblastos, bem como, a deposição de colágeno e ácido hialurônico no local da ferida (UENO, MORI e FUJINAGA, 2001). Tem sido mostrado também que pode ter propriedades hemostáticas que promovem a agregação de eritrócitos (LIU et al., 2004; TAMURA et al., 2004) e tem baixo custo (BERGER et al., 2005; KONG et al., 2010). Este material tem sido aplicado como um biomaterial para auxiliar a regeneração do tecido ósseo e da cartilagem (BUSILACCHI et al., 2013; MUZZARELLI, 2009; MUZZARELLI et al., 2012; MUZZARELLI, EL MEHTEDI e MATTIOLI-BELMONTE, 2014). No entanto, quando foi utilizado sozinho, as propriedades mecânicas pobres limitaram as suas aplicações, são muito frágeis devido a uma elevada temperatura de transição vítrea (BIDARRA, BARRIAS e GRANJA, 2014b; DE SILVA et al., 2013; FALLAHIAREZOUZAR et al., 2015a; NOROUZI et al., 2015; ZHANG et al., 2009). Essa desvantagem pode ser superada através da mistura de quitosana com outros polímeros como o alginato, cargas inorgânicas ou modificando os quimicamente.

A quitosana e o alginato são polieletrólitos de cargas opostas, sendo que a quitosana pode apresentar carga líquida positiva e o alginato, carga líquida negativa quando em solução. O complexo polieletrólítico (PEC) possui uma menor tendência ao

intumescimento em relação ao alginato e maior resistência à solubilização em baixos valores de pH, quando comparado à quitosana (HEIN et al., 2008; LI et al., 2009).

O comportamento do PEC varia de acordo com o pH. Em pH muito alto, a interação entre alginato e quitosana é desfavorecida, assim como em pH muito baixo visto que, nestas condições, ocorre preponderância de ionização do alginato e quitosana isolados, respectivamente. Para promover a formação de um PEC estável, Cardenas e colaboradores em 2003 propuseram o ajuste do pH para 5,28, um valor intermediário aos valores de pKa da quitosana e do alginato, garantindo que a quitosana esteja potencialmente protonada e o alginato, desprotonado (CARDENAS et al., 2003).

A associação destes dois polímeros origina complexos ligados por forças eletrostáticas, pontes de hidrogênio, forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas.

Diante disso, a pesquisa por compostos naturais não tóxicos e com propriedades de reparo tecidual ganhou importância nos últimos anos. Neste cenário, a quitosana e o alginato, polissacarídeos com grande disponibilidade comercial, com baixo custo e propriedades de biocompatibilidade, biodegradabilidade e cicatrizante tornam-se materiais promissores para confecção de curativos.

1.7 Os fármacos fotossensibilizante: Ftalocianinas

Os fármacos fotossensibilizante (FS) são compostos químicos que absorvem a energia proveniente da radiação em comprimento de onda específico induzindo a geração de espécies reativas de oxigênio e/ou outras espécies ativas como oxigênio singlete, durante o processo fotodinâmico (DOUGHERTY, 1983; FOOTE, 1991; KENNEDY e POTTIER, 1992).

As características ideais de um fotossensibilizante são pureza química, intervalo pequeno entre a administração do fármaco e o acúmulo no tecido, seletividade pelo tecido alvo, farmacocinética favorável e baixa toxicidade no escuro. Quanto às características fotofísicas, um fator importante é o comprimento de onda da luz. Na região do visível, quanto maior o comprimento de onda da luz incidente, maior o grau de penetração no tecido, e consequentemente, maior eficiência no tratamento do tecido. Portanto, fármacos desenvolvidos para o uso em processos fotodinâmicos devem ser cromóforos que absorvam na região próxima ao infravermelho, onde ocorre maior absorção. Porém, acima de 800 nm ocorre a absorção da radiação pela água, restringindo o comprimento de onda a este limite superior (MEHRABAN e FREEMAN, 2015; SIMPLICIO, MAIONCHI e HIOKA, 2002).

Hematoporfirinas e seus derivados são considerados fotossensibilizantes de primeira geração, e foram desenvolvidos principalmente durante as décadas de 70 e 80. Com relação ao seu espectro de absorção de luz, tais compostos apresentam uma banda intensa na região de 370 nm e outras bandas com menor coeficiente de extinção molar em maiores comprimentos de onda. Esses compostos apresentavam diversas desvantagens como baixa seletividade, toxicidade no escuro, fotossensibilização cutânea e composição indefinida dos produtos comerciais, que eram vendidos como uma mistura complexa de hematoporfirina. Essas desvantagens levaram ao desenvolvimento de fotossensibilizantes de segunda geração, como as ftalocianinas, clorinas e benzoporfirinas (DOUGHERTY, 1983; ZHANG et al., 2018).

As ftalocianinas são pigmentos sintéticos, quimicamente puros, considerados fármacos fotossensibilizantes de segunda geração, semelhantes às porfirinas naturais, em seu macrociclo central, o qual consiste de uma unidade cíclica tetrapirrólica (**Figura 6**). Entretanto, nas ftalocianinas, as subunidades pirrólicas são unidas por átomos de nitrogênio, enquanto nas porfirinas as subunidades são unidas via ponte de metileno. A conjugação do macrociclo da ftalocianina é estendida por anéis benzênicos sobre quatro unidades pirrólicas e contém um íon metálico diamagnético. São altamente eficientes no tratamento com terapia fotodinâmica, pois possuem efeitos fototóxicos adversos reduzidos e formam complexos com alto rendimento quântico de estados singleto excitado e estado tripleto com tempo de vida longo, possibilitando maior interação com o substrato celular. Além disso, são muito estáveis e são eliminados do organismo de forma rápida, com quase nenhuma fluorescência observada no tecido e nas células-alvo após 24 horas de sua administração tópica (DE ROSA e BENTLEY, 2000; OCHSNER, 1997) (GALLEGO-GOMEZ et al., 2009).

Figura 6. Representação esquemática da estrutura da ftalocianina de cloro alumínio

Fonte: (Sigma Aldrich, 2019)

As ftalocianinas apresentam duas bandas de absorção no espectro UV-visível, sendo a banda solet ou banda-B, na região do violeta ou ultravioleta (300-350 nm), e a banda Q (650-700 nm), de maior intensidade, exatamente na janela terapêutica, faixa espectral na qual ocorre penetração mais profunda de luz na pele (ALLISON e MOGHISSI, 2013).

Porém a baixa solubilidade da AlClPc impede sua aplicação direta no tecido biológico alvo (ROCHA et al., 2012). Uma maneira de solucionar esse problema é com a utilização de sistemas de veiculação de fármacos (*Drug delivery system-DDS*). Além disso, sua estrutura pode ser modificada quimicamente inserindo outros metais entre os quatro nitrogênios ou substituintes axiais que mudam sua solubilidade (ZHENG et al., 2013b; ZHENG et al., 2013a).

A interação do fármaco fotossensibilizante e luz monocromática, em presença de oxigênio molecular geram uma complexa resposta fotoquímica e fotofísica (CASTANO et al., 2007). Se uma reação fotodinâmica do tipo I acontece, radicais livres como radical hidroxil, peróxidos de hidrogênio e superóxidos são gerados, enquanto que o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), espécie altamente reativa que pode oxidar vários substratos biológicos, é gerado quando ocorre uma reação fotodinâmica do tipo II. A razão entre estes dois tipos de reação depende do fotossensibilizante utilizado e do microambiente no qual o composto está imerso (CROUS, KUMAR e ABRAHAMSE, 2019).

1.8 Fotoprocessos biológicos: fotobiomodulação

A aplicação da luz como tratamento foto-terapêutico é bastante antigo. Em 1903, Finsen recebeu o Premio Nobel pelo avanço no tratamento do Lupus Vulgar utilizando fonte de luz ultravioleta. Por essa razão, alguns autores, consideraram Finsen como o pai da Foto-medicina moderna.

A luz laser (*light amplification by stimulated emission of radiation*) tem características que a diferencia da luz de outras fontes luminosas, como a monocromaticidade, por ser composta de fótons de um comprimento de onda específico, sendo que a radiação emitida tem uma frequência única que determina a cor da luz se ela estiver no espectro visível. Porém a radiação também pode estar na faixa do infravermelho, dependendo das características do material utilizado na sua fabricação. Outra propriedade da luz laser é a coerência, ou seja, todos os fótons seguem em uma única direção, movendo-se em fases no tempo e no espaço, sendo altamente ordenada e organizada. Finalmente a luz laser possui colimação, ela é unidirecional,

paralela ao seu eixo de geração e com convergência angular muito pequena, devido aos feixes de fótons serem colimados (polarizados e paralelos) (COSTA et al., 2002). A partir da década de 90, diferentes dopantes foram introduzidos nessa tecnologia para obtenção de diodos laser gerando uma larga faixa de comprimentos de onda. Com esses dispositivos se pode ter aparelhos pequenos, de fácil manuseio e transporte, com alta durabilidade e baixa frequência de manutenção.

O laser operando em baixa intensidade de energia, com potência menor ou igual a 500 mW, foi considerado por Mester, em 1969, um bioestimulador. Ainda não se conhecia muito bem seu mecanismo de ação, e o que se observava era que os terapeutas tinham excelentes resultados no tratamento de feridas e úlceras abertas, estimulando a cicatrização. Porém, com o passar do tempo, essa terapia começou a ser utilizada não só para estimular e acelerar processos, mas também para detê-los. Foi utilizada para remover excessos de pigmento, mas também para restaurar a falta deles, para tratar cicatrizes deprimidas, mas também as hipertróficas, para aliviar a dor, mas também para fazer com que a sensibilidade voltasse a instalar-se em áreas de parestesia. A partir de estudos, pôde-se concluir que essa terapia não somente acelerava determinados processos, retardava outros, ou simplesmente modulava outros tantos ((Mester, 2013); MESTER , MESTER e MESTER, 1985).

Nas últimas décadas o interesse pelo uso de laser de baixa potência nas áreas da saúde humana vem crescendo exponencialmente, com diversas aplicações terapêuticas na área de reparo tecidual e cicatrização, para efeito analgésico e anti-inflamatório, na eliminação de depressões cutâneas e na redução da atividade anti-bacteriana, entre outras aplicabilidades (ALBERTINI et al., 2007; ALMEIDAGÇÉLOPES et al., 2001; HAMBLIN e HASAN, 2004; MINICUCCI et al., 2012; PRIMO et al., 2012; PRIMO et al., 2011; SAHU et al., 2013; SILVA et al., 2004; STERN et al., 1990). Estes fenômenos são alcançados combinando-se minuciosos parâmetros como dose correta de laser, intensidade e frequência apropriada de pulsos.

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica versátil, seletiva e não invasiva, que embora tenha sido originalmente desenvolvida visando à terapia de doenças neoplásicas e infecciosas em suas diversas formas, tem ficado cada vez mais evidente sua aplicação em diversas outras áreas da medicina como na oftalmologia, odontologia, cardiologia, imunologia e dermatologia (BENOV, 2015). A técnica baseia-se na administração sistêmica, transdérmica ou tópica do fármaco fotossensibilizante

(geralmente em um sistema de entrega de drogas), seguida por irradiação do tecido com luz visível (oriunda de uma fonte luminosa do tipo Laser ou LED), em comprimentos de onda adequados capaz de excitar a molécula fotoativa aos seus estados mais energéticos singlete e triplete. Na presença de oxigênio molecular, a interação das espécies excitadas como $^3\text{O}_2$ levam a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)(ISSA , BOECHAT e FASSINI, 2016).

Sabe-se que altas concentrações de EROs apresentam efeitos danosos aos tecidos levando a senescência, apoptose e carcinogênese. Entretanto, em concentrações baixas, ou seja, em concentrações fisiológicas, EROs têm sido apontados como sinalizadores e estimuladores de processos biológicos, como na diferenciação celular, proliferação celular e modulação de canais iônicos (MITTLER, 2017).

Lubart e colaboradores foram os primeiros a estudaram a hipótese de que a fotobioestimulação poderia ser mediada pela produção de pequenas quantidades de espécies reativas de oxigênio, utilizando concentrações baixas de derivados de hematoporfirina e irradiação com laser de HeNe adicionados às culturas de fibroblastos. O resultado obtido foi um aumento da proliferação celular (LUBART et al., 1995; LUBART et al., 2005). Outros estudos posteriores também demonstraram este efeito estimulatório (ALMEIDAGÇÉLOPES et al., 2001; SAHU et al., 2013; SILVA et al., 2004; STERN et al., 1990).Primo e colaboradores observaram os efeitos estimulatórios do uso de laser de baixa potência combinado com ftalocianina de cloro alumínio na migração celular e no processo de cicatrização. Utilizando um modelo *ex vivo*, Jesus e colaboradores observaram um aumento de mais de 20% na produção de colágeno e elastina, 14 dias após o tratamento com ftalocianina de cloro alumínio veiculada em nanoemulsão combinada com laser de baixa potência (DE JESUS , SAEKI e TEDESCO, 2016; LUCAS PRIMO; PRIMO et al., 2011). Sperandio e colaboradores investigaram o processo de cicatrização de feridas em ratos após a TFD mediada pelo corante azul de metileno e chegaram a conclusão de que a interação do laser com o tecido é de alguma forma alterada quando expostos ao corante. A TFD mediada por azul de metileno não foi prejudicial a cicatrização de feridas, nenhum atraso ocorreu em comparação com o grupo controle, porém aqueles grupos tratados apenas com a luz laser demonstraram uma menor área da ferida (SPERANDIO et al., 2010).

É importante ressaltar que os resultados controversos observados na literatura são frequentemente relacionados aos parâmetros de irradiação não padronizados e

especificações inadequadas de dosimetria (potência, área do feixe, tempo, dose, contato ou modo de irradiação desfocado) (K++BLER et al., 1996; SPERANDIO et al., 2010). Nesse sentido, mais estudos são necessário para verificar o efeito da TFD em processos estimulatórios, visando a padronização de parâmetros do laser e também da concentração da droga.

1.9 Mecanismos moleculares da ação da luz de baixa intensidade

Uma reação fotobiológica envolve a absorção de luz em um comprimento de onda específico por moléculas especializadas fotorreceptoras como citocromo c oxidase, as flavoproteínas e as porfirinas fotoativas. Diante da luz absorvida com determinado comprimento de onda, essas moléculas assumem um estado excitado que desencadeiam efeitos biológicos em determinadas circunstâncias.

O mecanismo de ação da luz laser a nível molecular foi descrito primeiramente por Karu e colaboradores em 1988 que sugeriram a cadeia respiratória como sendo o primeiro fotorreceptor celular. A absorção de luz visível monocromática por componentes celulares como citocromo c oxidase, uma enzima situada na membrana interna mitocondrial, pode ocasionar a ativação da cadeia respiratória, gerando mudanças no estado redox citoplasmático e na própria mitocôndria. Os incrementos de ATP mitocondrial e a produção de EROs após a irradiação com laser, favorecem um grande número de reações que interferem no metabolismo celular, como a estimulação de fatores de transcrição como NF- κ B e AP-1 ligados a resposta celular que desempenham papel fundamental na resposta imunológica a infecções, sendo provado em estudos recentes estarem ligados a diferenciação celular, proliferação, desenvolvimento do organismo e migração celular (GILMORE, 2006; SHAULIAN e KARIN, 2002).

A redução das atividades metabólicas celulares em situações adversas é um mecanismo de proteção, e em consequência, há diminuição dos ciclos respiratórios. Isso se dá pela ligação do óxido nítrico (NO), ao invés de oxigênio, reduzindo assim a taxa de conversão de ADP em ATP. O NO, por sua vez, é uma molécula reguladora do fluxo de elétrons na cadeia mitocondrial. Variações no fluxo de elétrons na cadeia respiratória, portanto, ditarão a produção de maior ou menor quantidade de ATP. Por outro lado, o desligamento de NO implica em reestabelecimento do ciclo de elétrons normal na cadeia respiratória. Existem evidências de que os fótons de luz possam desfazer a ligação do NO nos sítios do citocromo c oxidase (**Figura 7**). O aumento de

ciclos respiratórios com a remoção do NO gera energia, mas também maior disponibilidade de elétrons para captura pelo oxigênio molecular, levando a produção de EROs (CHUNG et al., 2012).

A luz infravermelha, por outro lado, ativa diretamente a membrana celular (canais de Na/K) liberando cálcio para o citoplasma, que participa do estímulo na proliferação e diferenciação celular ou na síntese de proteínas (CHUNG et al., 2012; KARU, 1988; KARU, 1989; KARU, 1990).

Figura 7. Mecanismo de ação da luz vermelha nível molecular

Fonte: Adaptado(CHUNG et al., 2012).

1.10 Nanotecnologia e os sistemas carreadores

As propriedades chave de qualquer nanomaterial utilizado na entrega da droga são a sua biodegradabilidade e biocompatibilidade, de modo que o transportador é descarregado metabolizado ou degradado em componentes não tóxicos (MALAM, LOIZIDOU e SEIFALIAN, 2009).

As vantagens de incorporar fármacos em nanosistemas comparado aos sistemas convencionais, em suma são: transporte eficiente do fármaco, biocompatibilidade, liberação controlada impedindo doses tóxicas ou subterapêuticas e efeitos adversos inerentes a substância, bem como poder ser administrado por diferentes vias como oral, transdérmica, ocular, nasal, subcutânea, intraperitoneal e intramuscular, e podem ser

injetadas diretamente para circulação sistêmica sem o risco de bloqueio dos vasos sanguíneos (FATTAL et al., 1998; LETCHFORD e BURT, 2007a).

Dentre os principais carreadores coloidais de fármacos conhecidos hoje, encontramos as nanopartículas poliméricas (nanoesferas e nanocápsulas), nanopartícula lipídica sólida, lipossomas, nanoemulsão, micelas poliméricas e dendrímeros (**Figura 8**) (CHATTERJEE, FONG e ZHANG, 2008; HAMIDI, AZADI e RAFIEI, 2008; KIRILOV et al., 2008; KONAN, GURNY e ALLEMANN, 2002). Até o momento, as nanoemulsões representam uma das classes de nanomateriais mais versáteis e estáveis e as nanopartículas proteicas representam uma classe emergente e promissora de nanopartícula polimérica para entrega de drogas, por isso elas foram focos do trabalho e serão discutidas com mais detalhes no próximo tópico (HAWKINS, SOON-SHIONG e DESAI, 2008; LOHCHAROENKAL et al., 2014; PRIMO et al., 2011; SALVIA-TRUJILLO et al., 2017; WEBER et al., 2000).

Figura 8. Principais sistemas nanoestruturados empregados em estudos atualmente

Fonte: (ZORZI et al., 2017)

1.10.1 Nanoemulsão

Emulsões são dispersões de uma fase líquida em outra fase líquida imiscível (geralmente água e óleo). Devido às diferenças nas interações atraentes entre as moléculas das duas fases líquidas, existe uma tensão interfacial entre os dois líquidos em todos os lugares em que eles estão em contato. Esta tensão interfacial pode ser

reduzida significativamente pela adição de moléculas ativas de superfície anfifílicas, ou "surfactantes", que são altamente solúveis em pelo menos uma das fases líquidas. Os surfactantes preferencialmente adsorvem nas interfaces, uma vez que suas estruturas moleculares possuem caudas de hidrocarbonetos não polares que preferem estar em líquidos não polares, como óleos, e grupos de cabeças polares ou carregadas que preferem residir em líquidos polares, como a água. A fase líquida superior (por exemplo, um óleo de hidrocarboneto) tem uma densidade de massa que é menor do que a da fase líquida inferior (por exemplo, água). Na ausência de quaisquer surfactantes, durante um longo período de tempo, o sistema sempre reverterá para essa configuração de menor energia no equilíbrio termodinâmico (DE GENNES e TAUPIN, 1982; SCHWUGER, STICKDORN e SCHOMAECKER, 1995).

Nanoemulsões consistem em emulsões com glóbulos de diâmetro na faixa de 100 a 500 nm. Esses sistemas podem ser de dois tipos: água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A) (**Figura 9**). A orientação e formação dos sistemas A/O ou O/A depende das propriedades físico-químicas do tensoativo escolhido e é determinado pelo seu equilíbrio hidrófilo/lipófilo (EHL). Nas nanoemulsões do tipo O/A, o fármaco pouco solúvel pode estar dissolvido no núcleo oleoso e/ou adsorvido na interface óleo-água.

Figura 9. Estrutura das nanoemulsões

Fonte:(OLIVEIRA et al., 2004)

Segundo CAPEK em 2004 as nanoemulsões apresentam aparência translúcida quando o tamanho de glóbulo é inferior a 200 nm e aparência leitosa quando este se encontra entre 200 e 500 nm. Esses sistemas exigem quantidades não excessivas de surfactantes, na faixa de 5 a 10%. São sistemas isotrópicos e metaestáveis, ou seja, estáveis por longo período de tempo, cuja estrutura depende do processo de preparo e da

estabilização estérica quando se emprega tensoativo não iônicos e/ou polímeros na preparação (CAPEK, 2004).

As nanoemulsões não se formam espontaneamente, sendo necessária a doação de energia ao sistema. De acordo com a literatura, as nanoemulsões podem ser preparadas por métodos que envolvem alta energia de emulsificação ou por métodos que utilizam baixa energia. De maneira geral, a preparação de nanoemulsões através do uso de homogeneizadores de alta pressão pode ser dividida em duas fases distintas. Em uma primeira etapa as fases, oleosa e aquosa, são aquecidas separadamente e emulsionadas através do uso de homogeneizadores de alta rotação. Após o resfriamento, na segunda etapa, o diâmetro da gotícula é progressivamente reduzido até valores de 100 a 300 nm através de homogeneizadores de alta pressão. Eles consistem basicamente de uma bomba de deslocamento positivo que injeta o líquido a ser homogeneizado sob pressão elevada em uma válvula homogeneizadora (CAPEK, 2004; JOVANOVIĆ e DUBE, 2004).

1.10.2 Nanopartícula polimérica

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que incluem nanoesferas ou nanocápsulas, estes sistemas diferem entre si segundo a sua organização estrutural e sua composição. As nanoesferas são constituídas apenas de uma matriz polimérica, onde o fármaco encontra-se retido dentro da matriz ou adsorvido na superfície da esfera. As nanocápsulas consistem em uma camada de um agente encapsulante, geralmente um material polimérico que atua como um filme protetor, isolando a substância ativa (gotículas líquidas, partículas sólidas ou material gasoso) e evitando o efeito de sua exposição inadequada. Essa membrana se desfaz sob estímulo específico, liberando a substância no local ou momento ideais (BRIGGER, DUBERNET e COUVREUR, 2012; COUVREUR et al., 2002; LETCHFORD e BURT, 2007b). Esses sistemas coloidais poliméricos permitem a inclusão, em sua estrutura, de princípios ativos com características físico-químicas bem diferenciadas: desde moléculas altamente hidrofóbicas a princípios ativos hidrofílicos e polares (BRIGGER, DUBERNET e COUVREUR, 2012).

As proteínas são uma classe de biomoléculas ideais para preparação de nanopartículas poliméricas por causa de sua anfifilicidade o que lhes permite interagir bem com a droga e com o solvente. Nanopartículas derivadas de proteínas naturais são

biodegradáveis, metabolizáveis e facilmente passíveis de modificações na superfície para permitir a fixação de drogas.

O uso de proteínas do leite para o preparo de nanopartículas de entrega de drogas é uma nova tendência que tem recebido muita atenção. O leite contém duas fontes primárias de proteína, as caseínas e soro de leite (KERI MARSHALL, 2004; MORR e HA, 1993).

Whey protein ou soro do leite é um complexo proteico derivado da produção de leite, sendo considerado o maior subproduto da indústria leiteira. O soro do leite é um importante co-produto gerado pelos laticínios após a coagulação da caseína. No processo de coagulação para produção de queijo, cerca de nove litros de soro de leite são produzidos para cada quilograma de queijo. Devido a sua versatilidade e seu alto valor nutricional, as empresas tem buscado inovação utilizando-se do soro do leite como matéria-prima. Além de um rico efluente, sob o ponto de vista nutricional, o soro de leite possui atividade antimicrobiana, antitumoral, imunomodulatória, melhora a força do músculo, composição corporal, e ajuda na prevenção de doenças cardiovasculares e osteoporose. Avanços na tecnologia de processamento, incluindo ultrafiltração, microfiltração, osmose reversa e troca iônica, resultaram no desenvolvimento de vários produtos derivados de *whey protein*. Estes produtos são comercializados como concentrados de proteína de soro de leite (variando de 80-95% de proteína), soro de leite com lactose reduzida, isolado de proteína de soro de leite, soro de leite desmineralizado e soro de leite hidrolisado. Cada um deles varia na quantidade de proteínas, carboidratos, imunoglobulinas, lactose, minerais e gordura no produto final (KERI MARSHALL, 2004).

Várias técnicas têm sido empregadas na elaboração de nanocápsulas poliméricas, tais como: *spray drying*, *spray cooling*, coacervação, extrusão, extrusão centrífuga, recobrimento em leito fluidizado, lipossomas e complexação por inclusão (FAVARO-TRINDADE, PINHO e ROCHA, 2008).

Na técnica microencapsulação por *spray drying* o material ativo a ser encapsulado é misturado a uma solução do composto que constitui o material encapsulante, formando uma emulsão. Ao ser atomizado dentro do secador, ocorre a evaporação do líquido da solução do agente encapsulante com a formação da membrana ao redor das gotas do material ativo. Nanopartículas contendo um agente ativo podem

ser preparadas por *spray-drying* a partir de sistemas homogêneos (soluções) ou heterogêneos (dispersões). No caso de soluções, o ativo e o polímero estão co-dissolvidos em um mesmo solvente. No caso de dispersões, partículas finamente divididas do ativo são incorporadas a uma solução polimérica (RÉ, 2006). O processo envolve quatro estágios sequenciais: (1) Atomização dos materiais de alimentação através de um bico atomizador; (2) Contato das gotículas produzidas com o ar e secagem (3) Coleta do produto sólido (partículas) obtido (FAHEEM e HAGGAG, 2015) (MAA e PRESTRELSKI, 2000).

Figura 10. Modelo de *spray dryer* de bancada

Fonte: (AMERI e MAA, 2006)

Em comparação com as outras técnicas de nanoencapsulação, a secagem por atomização oferece algumas vantagens, como a reprodutibilidade da técnica para obtenção de partículas, a aplicabilidade tanto com materiais sensíveis quanto resistentes à temperatura, a capacidade de processar diversas matérias-primas, baixo custo de produção em comparação com outras tecnologias de secagem, como por exemplo, a liofilização, a flexibilidade na formulação e a capacidade de controlar o tamanho e a morfologia da partícula. Diversos formatos de partículas podem ser preparados por *spray-drying* como os multi-núcleos, esféricos, colapsados, “donut”, enrugados

(semelhante a passas) e partículas altamente amassadas ou dobradas (ARPAGAUS et al., 2018). Os componentes da formulação e os parâmetros do processo determinam as propriedades e a morfologia das partículas produzidas (RÉ, 2006). Os parâmetros do processo fundamentais no controle de secagem são: temperatura de entrada e saída do ar, fluxo do ar de secagem, distribuição de temperatura e umidade, tempo de resistência da amostra, parâmetros de injeção da amostra e geometria da câmara. As desvantagens da produção de nanopartículas por *spray drying* são problemas relacionados com a agregação e perda de atividade dos sistemas nanoestruturados. Porém, esse problema pode ser facilmente contornado pela inclusão de dissacarídeos ou surfactantes na solução líquida para proteger da agregação.

5.0 Conclusão

Os *scaffolds* à base de alginato e quitosana com e sem glicerol foram preparados pelo método de separação de fases termicamente induzida e a subsequente sublimação do solvente por liofilização. Após o preparo dos *scaffolds*, foram realizados diversos estudos de caracterização (FTIR, MEV, DSC, TGA e MFA), os quais indicaram que os sistemas apresentaram estruturas com características morfológicas desejadas e ideais para serem empregadas na regeneração de tecidos fibro-cartilagosos. Os estudos de tensão e módulo de elasticidade dos *scaffolds* com e sem glicerol, indicaram melhora das propriedades mecânicas na presença de glicerol, apresentando hidrofiliicidade ideal para a adesão e proliferação celular. Os ensaios de citotoxicidade celular (MTT e citometria de fluxo), MEV e microscopia confocal utilizando linhagens de queratinócitos e fibroblastos comprovaram a biocompatibilidade do material por um período de até 7 dias de cultivo e demonstraram que a matriz polimérica foi capaz de fornecer um microambiente adequado para adesão celular, crescimento em colônias, bem como expansões celulares e alta taxa de proliferação durante os dias de cultivo. Estes resultados comprovam também que este modelo como preconizado pode se comportar como uma matriz para a migração e proliferação celular da derme e da epiderme. As nanoemulsões (NE) foram desenvolvidas por dois métodos e apresentaram alta estabilidade, compatibilidade biológica e excelente taxa de incorporação de fármaco fotossensibilizante. As nanopartículas proteicas *whey protein* (NpP) preparadas pela técnica de *spray drying* apresentaram estruturas esféricas e características físico-químicas desejadas para a aplicação na terapia de laser de baixa potência, como tamanho de partícula na escala nanométrica (~150 nm), o que aumenta seu tempo de circulação no organismo e facilita sua internalização celular. As formulações foram estáveis por um período de 6 meses, armazenados a 25°C. Os Estudos de citotoxicidade *in vitro* indicaram que as NE e NpP preparadas, foram biocompatíveis com o sistema celular e eficazes na administração de fármaco fotossensibilizante para aplicação em terapia de laser de baixa potência. Na fotobioestimulação celular incorporado aos *scaffold* à base de alginato e quitosana utilizando laser de baixa potência induzida pela NEAlCIPc verificou-se um aumento na viabilidade celular de cerca de 30% com a dose mais baixa de luz (40 mJ/cm²). O ensaio de imunofluorescência corroborou com os resultados de resazurina apresentando um aumento na quantidade de células marcadas com ki-67 indicando proliferação celular daquelas fotoestimuladas com 40 mJ/cm².

O mesmo efeito não foi observado para as células tratadas com NpPAICIPc. A estimulação com laser de baixa potência não provocou aumento da proliferação celular com relação ao controle nas doses testadas de 40 mJ/cm², 70 mJ/cm² e 120 mJ/cm². Portanto, estes resultados obtidos incentivam estudos futuros com as nanopartículas de *whey protein* carregadas com fármacos fotossensibilizantes para uso no tratamento não só de patologias cutâneas como queimaduras, úlceras, variando a concentração de FS e as doses de luz, mas também para doenças neoplásicas em associação com os *scaffolds*.

6. REFERÊNCIAS

- AFSHAR, H. A.; GHAEI, A. Preparation of aminated chitosan/alginate scaffold containing halloysite nanotubes with improved cell attachment, *Carbohydrate Polymers*, v. 151, p. 1120-1131, 2016.
- AHMAD, S.; ULLAH, F.; ZEB, A.; AYAZ, M.; ULLAH, F.; SADIQ, A. Evaluation of Rumex hastatus D. Don for cytotoxic potential against HeLa and NIH/3T3 cell lines: chemical characterization of chloroform fraction and identification of bioactive compounds, *BMC complementary and alternative medicine*, v. 16, p. 308, 2016.
- ALLISON, R. R.; MOGHISSI, K. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms, *Clinical endoscopy*, v. 46, p. 24, 2013.
- ALMEIDAGÇÉLOPES, L.; RIGAU, J.; AMARO Z+ÓNGARO, R.; GUIDUGLIGÇÉNETO, J.; MARQUES JAEGER, M. M. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence, *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, v. 29, p. 179-184, 2001.
- AMERI, M.; MAA, Y. F. Spray drying of biopharmaceuticals: stability and process considerations, *Drying Technology*, v. 24, p. 763-768, 2006.
- ANDERSON, W.; KOZAK, D.; COLEMAN, V. A.; J+ÑMTING, +. K.; TRAU, M. A comparative study of submicron particle sizing platforms: accuracy, precision and resolution analysis of polydisperse particle size distributions, *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 405, p. 322-330, 2013.
- ANTON, N.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review, *Journal of Controlled Release*, v. 128, p. 185-199, 2008.
- ARCHANA, D.; UPADHYAY, L.; TEWARI, R. P.; DUTTA, J.; HUANG, Y. B.; DUTTA, P. K. Chitosan-pectin-alginate as a novel scaffold for tissue engineering applications, *Indian Journal of Biotechnology*, v. 12, p. 475-482, 2013.
- ARPAGAUS, C.; COLLENBERG, A.; R++TTI, D.; ASSADPOUR, E.; JAFARI, S. M. Nano spray drying for encapsulation of pharmaceuticals, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 546, p. 194-214, 2018.
- ARRUDA, P. V. d.; RODRIGUES, R. C. L. B.; FELIPE, M. d. Glicerol: um subproduto com grande capacidade industrial e metab+lica, *Revista Analytica*, v. 26, p. 56-62, 2007.
- ASSIS, O. B. Altera+º+úo do car+íter hidrof+ílico de filmes de quitosana por tratamento de plasma de HMDS, *Qu+ímica Nova*, v. 33, p. 603-606, 2010.
- ATA+º, B.; WAGNER, I.; HORLAND, R.; LAUSTER, R.; MARX, U.; TONEVITSKY, A. G.; AZAR, R. P.; LINDNER, G. Skin and hair on-a-chip: in vitro skin models versus ex vivo tissue maintenance with dynamic perfusion, *Lab on a chip*, v. 13, p. 3555-3561, 2013.
- ATIYEH, B. S.; GUNN, S. W.; HAYEK, S. N. State of the art in burn treatment, *World journal of surgery*, v. 29, p. 131-148, 2005.

- AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e quitosana: aplica^oes como biomateriais, *Revista eletr^onica de Materiais e processos*, v. 2, p. 27-34, 2007.
- BACAKOVA, L.; NOVOTNA, K.; PARIZEK, M. Polysaccharides as Cell Carriers for Tissue Engineering: the Use of Cellulose in Vascular Wall Reconstruction, *Physiological Research*, v. 63, p. S29-S47, 2014.
- BALASUBRAMANI, M.; KUMAR, T. R.; BABU, M. Skin substitutes: a review, *Burns*, v. 27, p. 534-544, 2001.
- BARUD, H. G. O.; BARUD, H. D.; CAVICCHIOLI, M.; DO AMARAL, T. S.; DE OLIVEIRA, O. B.; SANTOS, D. M.; PETERSEN, A. L. D. A.; CELES, F.; BORGES, V. M.; DE OLIVEIRA, C. I.; DE OLIVEIRA, P. F.; FURTADO, R. A.; TAVARES, D. C.; RIBEIRO, S. J. L. Preparation and characterization of a bacterial cellulose/silk fibroin sponge scaffold for tissue regeneration, *Carbohydrate Polymers*, v. 128, p. 41-51, 2015.
- BAYSAL, K.; AROGUZ, A. Z.; ADIGUZEL, Z.; BAYSAL, B. M. Chitosan/alginate crosslinked hydrogels: Preparation, characterization and application for cell growth purposes, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 59, p. 342-348, 2013.
- BENOV, L. Photodynamic therapy: current status and future directions, *Medical Principles and Practice*, v. 24, p. 14-28, 2015.
- BERGER, J.; REIST, A.; CHENITE, A.; FELT-BAEYENS, O.; MAYER, J. M.; GURNY, R. Pseudo-thermosetting chitosan hydrogels for biomedical application, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 288, p. 197-206, 2005.
- BERRIDGE, M. J.; LIPP, P.; BOOTMAN, M. D. The versatility and universality of calcium signalling, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 1, p. 11-21, 2000.
- BIDARRA, S. I. J.; BARRIAS, C. C.; GRANJA, P. L. Injectable alginate hydrogels for cell delivery in tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, v. 10, p. 1646-1662, 2014a.
- BIDARRA, S. J.; BARRIAS, C. C.; GRANJA, P. L. Injectable alginate hydrogels for cell delivery in tissue engineering, *Acta Biomaterialia*, v. 10, p. 1646-1662, 2014b.
- BOSE, S.; VAHABZADEH, S.; BANDYOPADHYAY, A. Bone tissue engineering using 3D printing, *Materials today*, v. 16, p. 496-504, 2013.
- BOUALI, B.; GANACHAUD, F.; CHAPEL, J. P.; PICHOT, C.; LANTERI, P. AcidGÇôbase approach to latex particles containing specific groups based on wettability measurements, *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 208, p. 81-89, 1998.
- BOYCE, S. T. Cultured skin substitutes: a review, *Tissue engineering*, v. 2, p. 255-266, 1996.
- BREITKREUTZ, D.; BOUKAMP, P.; RYLE, C. M.; STARK, H. J.; ROOP, D. R.; FUSENIG, N. E. Epidermal morphogenesis and keratin expression in c-Ha-ras-transfected tumorigenic clones of the human HaCaT cell line, *Cancer Research*, v. 51, p. 4402-4409, 1991.
- BRIGGER, I. n.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, p. 24-36, 2012.

- BRUNELLO, G.; SIVOLELLA, S.; MENEGHELLO, R.; FERRONI, L.; GARDIN, C.; PIATTELLI, A.; ZAVAN, B.; BRESSAN, E. Powder-based 3D printing for bone tissue engineering, *Biotechnology advances*, v. 34, p. 740-753, 2016.
- BRYANT, S. J.; NUTTELMAN, C. R.; ANSETH, K. S. Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems on cultured NIH/3T3 fibroblasts in vitro, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, v. 11, p. 439-457, 2000.
- BURG, K. J. L.; PORTER, S.; KELLAM, J. F. Biomaterial developments for bone tissue engineering, *Biomaterials*, v. 21, p. 2347-2359, 2000.
- BURKOTH, A. K.; BURDICK, J. A.; ANSETH, K. S. Surface and bulk modifications to photocrosslinked polyanhydrides to control degradation behavior, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 51, p. 352-359, 2000.
- BUSILACCHI, A.; GIGANTE, A.; MATTIOLI-BELMONTE, M.; MANZOTTI, S.; MUZZARELLI, R. A. A. Chitosan stabilizes platelet growth factors and modulates stem cell differentiation toward tissue regeneration, *Carbohydrate Polymers*, v. 98, p. 665-676, 2013.
- C+ÍRDENAS, A.; ARG++ELLESGÇÉMONAL, W.; GOYCOOLEA, F. M.; HIGUERAGÇÉCIAPARA, I.; PENICHE, C. Diffusion through membranes of the polyelectrolyte complex of chitosan and alginate, *Macromolecular Bioscience*, v. 3, p. 535-539, 2003.
- CAETANO, G. F. Biomembrana de quitosana-alginato na cicatriza+º+úo de +lceras cut+óneas em ratos, 2012.
- CALORI, I. R.; TEDESCO, A. C. Lipid vesicles loading aluminum phthalocyanine chloride: Formulation properties and disaggregation upon intracellular delivery, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 160, p. 240-247, 2016.
- CANDIDO, N. M.; DE MELO, M. T.; FRANCHI, L. P.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. n. C.; RAHAL, P.; CALMON, M. I. F. Combining photodynamic therapy and chemotherapy: improving breast cancer treatment with nanotechnology, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 14, p. 994-1008, 2018.
- CANEVAROLO JR, S. V. T+©cnicas de caracteriza+º+úo de pol+ímeros, *Artliber, S+úo Paulo*, v. 430, 2004.
- CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions, *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 107, p. 125-155, 2004.
- CHANDIKA, P.; KO, S. C.; OH, G. W.; HEO, S. Y.; NGUYEN, V. T.; JEON, Y. J.; LEE, B.; JANG, C. H.; KIM, G.; PARK, W. S.; CHANG, W.; CHOI, I. W.; JUNG, W. K. Fish collagen/alginate/chitooligosaccharides integrated scaffold for skin tissue regeneration application, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 81, p. 504-513, 2015.
- CHANG, S. H.; LIN, H. T. V.; WU, G. J.; TSAI, G. J. pH Effects on solubility, zeta potential, and correlation between antibacterial activity and molecular weight of chitosan, *Carbohydrate Polymers*, v. 134, p. 74-81, 2015.
- CHATTERJEE, D. K.; FONG, L. S.; ZHANG, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, p. 1627-1637, 2008.

- CHATTERTON, D. E. W.; SMITHERS, G.; ROUPAS, P.; BRODKORB, A. Bioactivity of +/- lactoglobulin and +/- lactalbuminGÇöTechnological implications for processing, *International Dairy Journal*, v. 16, p. 1229-1240, 2006.
- CHAUDHARI, A.; VIG, K.; BAGANIZI, D.; SAHU, R.; DIXIT, S.; DENNIS, V.; SINGH, S.; PILLAI, S. Future prospects for scaffolding methods and biomaterials in skin tissue engineering: a review, *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, p. 1974, 2016.
- CHEN, A. K.-L.; REUVENY, S.; OH, S. K. W. Application of human mesenchymal and pluripotent stem cell microcarrier cultures in cellular therapy: achievements and future direction, *Biotechnology advances*, v. 31, p. 1032-1046, 2013.
- CHEN, Y. H.; DONG, W. R.; XIAO, Y. Q.; ZHAO, B. L.; HU, G. D.; AN, L. B. Preparation and bioactivity of human hair keratin-collagen sponge, a new type of dermal analogue, *Nan fang yi ke da xue xue bao= Journal of Southern Medical University*, v. 26, p. 131-138, 2006.
- CHEUNG, H. Y.; LAU, K. T.; LU, T. P.; HUI, D. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development, *Composites Part B: Engineering*, v. 38, p. 291-300, 2007.
- CHUNG, H.; DAI, T.; SHARMA, S. K.; HUANG, Y. Y.; CARROLL, J. D.; HAMBLIN, M. R. The nuts and bolts of low-level laser (light) therapy, *Annals of biomedical engineering*, v. 40, p. 516-533, 2012.
- CLEMENT, S.; DENG, W.; CAMILLERI, E.; WILSON, B. C.; GOLDYS, E. M. X-ray induced singlet oxygen generation by nanoparticle-photosensitizer conjugates for photodynamic therapy: determination of singlet oxygen quantum yield, *Scientific Reports*, v. 6, p. 19954, 2016.
- COBURN, J. C.; PANDIT, A. Development of naturally-derived biomaterials and optimization of their biomechanical properties, *Topics in tissue engineering*, v. 3, p. 1-14, 2007.
- COOPER, J. A.; LU, H. H.; KO, F. K.; FREEMAN, J. W.; LAURENCIN, C. T. Fiber-based tissue-engineered scaffold for ligament replacement: design considerations and in vitro evaluation, *Biomaterials*, v. 26, p. 1523-1532, 2005.
- COSTA, A. M.; YAMAGUTI, P. M.; DE, L. P.; BEZERRA, A. C. In vitro study of laser diode 655 nm diagnosis of occlusal caries, *ASDC journal of dentistry for children*, v. 69, p. 249-253, 2002.
- COUVREUR, P.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F. Controlled Drug-Delivery with Nanoparticles - Current Possibilities and Future-Trends, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 41, p. 2-13, 1995.
- COUVREUR, P.; BARRATT, G.; FATTAL, E.; VAUTHIER, C. Nanocapsule technology: a review, *Critical ReviewsGäö in Therapeutic Drug Carrier Systems*, v. 19, 2002.
- CROUS, A.; KUMAR, S. S. D.; ABRAHAMSE, H. Effect of dose responses of hydrophilic aluminium (III) phthalocyanine chloride tetrasulphonate based photosensitizer on lung cancer cells, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 194, p. 96-106, 2019.

- CRUZ, B. d.; CORDOVIL, P. B.; BATISTA, K. d. N. Perfil epidemiológico de pacientes que sofreram queimaduras no Brasil: revisão de literatura, *Rev Bras Queimaduras*, v. 11, p. 246-250, 2012.
- CUADROS, T. R.; ERICES, A. A.; AGUILERA, J. M. Porous matrix of calcium alginate/gelatin with enhanced properties as scaffold for cell culture, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 46, p. 331-342, 2015a.
- CUADROS, T. R.; ERICES, A. A.; AGUILERA, J. M. Porous matrix of calcium alginate/gelatin with enhanced properties as scaffold for cell culture, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 46, p. 331-342, 2015b.
- CUADROS, T. R.; SKURTYS, O.; AGUILERA, J. M. Mechanical properties of calcium alginate fibers produced with a microfluidic device, *Carbohydrate Polymers*, v. 89, p. 1198-1206, 2012.
- DAS, S.; HOLLISTER, S. J.; FLANAGAN, C.; ADEWUNMI, A.; BARK, K.; CHEN, C.; RAMASWAMY, K.; ROSE, D.; WIDJAJA, E. Freeform fabrication of Nylon-6 tissue engineering scaffolds, *Rapid Prototyping Journal*, v. 9, p. 43-49, 2003.
- DASH, M.; CHIELLINI, F.; OTTENBRITE, R. M.; CHIELLINI, E. Chitosan-GlcA versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications, *Progress in polymer science*, v. 36, p. 981-1014, 2011.
- DE CASTRO BRAS, L. E.; PROFFITT, J. L.; BLOOR, S.; SIBBONS, P. D. Effect of crosslinking on the performance of a collagen-GlcA-derived biomaterial as an implant for soft tissue repair: A rodent model, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, v. 95, p. 239-249, 2010.
- DE GENNES, P. G.; TAUPIN, C. Microemulsions and the flexibility of oil/water interfaces, *The Journal of physical chemistry*, v. 86, p. 2294-2304, 1982.
- DE GODOI, F. C.; RODRIGUEZ-CASTELLON, E.; GUIBAL, E.; BEPPU, M. M. An XPS study of chromate and vanadate sorption mechanism by chitosan membrane containing copper nanoparticles, *Chemical Engineering Journal*, v. 234, p. 423-429, 2013.
- DE JESUS, P. d. C.; SAEKI, S. I.; TEDESCO, A. C. An ex vivo study of photobiostimulation in the treatment of skin pathologies, *Journal of biophotonics*, v. 9, p. 1189-1198, 2016.
- DE MORAES, M. A.; COCENZA, D. S.; VASCONCELLOS, F. D.; FRACETO, L. F.; BEPPU, M. M. Chitosan and alginate biopolymer membranes for remediation of contaminated water with herbicides, *Journal of Environmental Management*, v. 131, p. 222-227, 2013.
- DE PAULA, L. B.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C. Nanomedicine associated with photodynamic therapy for glioblastoma treatment, *Biophysical reviews*, v. 9, p. 761-773, 2017.
- DE ROSA, F. S.; BENTLEY, M. V. L. B. Photodynamic therapy of skin cancers: Sensitizers, clinical studies and future directives, *Pharmaceutical Research*, v. 17, p. 1447-1455, 2000.
- DE SILVA, R. T.; PASBAKHSH, P.; GOH, K. L.; CHAI, S. P.; ISMAIL, H. Physico-chemical characterisation of chitosan/halloysite composite membranes, *Polymer Testing*, v. 32, p. 265-271, 2013.

- DE SOUZA, T. D.; ZIEMBOWICZ, F. I.; MALLER, D. F.; LAUERMANN, S. C.; KLOSTER, C. L.; SANTOS, R. C. V.; LOPES, L. Q. S.; OURIQUE, A. F.; MACHADO, G.; VILLETTI, M. A. Evaluation of photodynamic activity, photostability and in vitro drug release of zinc phthalocyanine-loaded nanocapsules, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 83, p. 88-98, 2016.
- DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability, *Journal of immunological methods*, v. 89, p. 271-277, 1986.
- DENNING, M. F. Epidermal keratinocytes: regulation of multiple cell phenotypes by multiple protein kinase C isoforms, *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 36, p. 1141-1146, 2004.
- DEROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications, *Coordination Chemistry Reviews*, v. 233, p. 351-371, 2002.
- DI GIOIA, L.; GUILBERT, S. p. Corn protein-based thermoplastic resins: effect of some polar and amphiphilic plasticizers, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 47, p. 1254-1261, 1999.
- DI MEGLIO, P.; PERERA, G. K.; NESTLE, F. O. The Multitasking Organ: Recent Insights into Skin Immune Function, *Immunity*, v. 35, p. 857-869, 2011.
- DOUGHERTY, T. J. Hematoporphyrin as a photosensitizer of tumors, *Photochemistry and photobiology*, v. 38, p. 377-379, 1983.
- DRURY, J. L.; DENNIS, R. G.; MOONEY, D. J. The tensile properties of alginate hydrogels, *Biomaterials*, v. 25, p. 3187-3199, 2004.
- ECKERT, R. L. Structure, Function, and Differentiation of the Keratinocyte, *Physiological Reviews*, v. 69, p. 1316-1346, 1989.
- ECKERT, R. L.; ADHIKARY, G.; BALASUBRAMANIAN, S.; RORKE, E. A.; VEMURI, M. C.; BOUCHER, S. E.; BICKENBACH, J. R.; KERR, C. Biochemistry of epidermal stem cells, *Biochimica et Biophysica Acta-General Subjects*, v. 1830, p. 2427-2434, 2013.
- ECKERT, R. L.; ADHIKARY, G.; RORKE, E. A.; CHEW, Y. C.; BALASUBRAMANIAN, S. Polycomb Group Proteins Are Key Regulators of Keratinocyte Function, *Journal of Investigative Dermatology*, v. 131, p. 295-301, 2011.
- ECKERT, R. L.; EFIMOVA, T.; DASHTI, S. R.; BALASUBRAMANIAN, S.; DEUCHER, A.; CRISH, J. F.; STURNIOLO, M.; BONE, F. Keratinocyte survival, differentiation, and death: Many roads lead to mitogen-activated protein kinase, *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, v. 7, p. 36-40, 2002.
- ECKERT, R. L.; RORKE, E. A. Molecular biology of keratinocyte differentiation, *Environmental Health Perspectives*, v. 80, p. 109, 1989.
- FAHEEM, A.; HAGGAG, Y. Evaluation of nano spray drying as a method for drying and formulation of therapeutic peptides and proteins, *Frontiers in pharmacology*, v. 6, p. 140, 2015.
- FALLAHIAREZOUDAR, E.; AHMADIPOURROUDPOSHT, M.; IDRIS, A.; YUSOF, N. M. A review of: Application of synthetic scaffold in tissue engineering heart valves,

- Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, v. 48, p. 556-565, 2015a.
- FALLAHIAREZOUZDAR, E.; AHMADIPOURROUDPOSHT, M.; IDRIS, A.; YUSOF, N. M. A review of: application of synthetic scaffold in tissue engineering heart valves, *Materials Science and Engineering: C*, v. 48, p. 556-565, 2015b.
- FATTAL, E.; VAUTHIER, C.; AYNIE, I.; NAKADA, Y.; LAMBERT, G.; MALVY, C.; COUVREUR, P. Biodegradable polyalkylcyanoacrylate nanoparticles for the delivery of oligonucleotides, *Journal of Controlled Release*, v. 53, p. 137-143, 1998.
- FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Review: microencapsulation of food ingredients, *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 11, p. 103-109, 2008.
- FERNÁNDEZ, M. A.; MENDOZA, J. B.; MARTINEZ, P. B.; CHARRO, M. B. D.; ALEGRE, M. E. G.; AMOZA, J. L. G.; NAVARRO, M. G.; DOMÍNGUEZ, M. H.; BALLESTEROS, M. R. J. C.; PERALES, M. C. M. Tecnología farmacéutica aspectos fundamentales de los sistemas farmacéuticos y operaciones básicas, *Editorial Síntesis*, v. 1.
- FERREIRA, E. a.; LUCAS, R.; ROSSI, L. d. A.; ANDRADE, D. Curativo do paciente queimado: uma revisão de literatura, *Revista da Escola de Enfermagem da USP*, v. 37, p. 44-51, 2003.
- FOOTE, C. S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation, *Photochem. Photobiol.*, v. 54, p. 659, 1991.
- FRAJKOROVA, F.; BODISOVA, K.; BOHAC, M.; BARTONICKOVA, E.; SEDLACEK, J. Preparation and characterisation of porous composite biomaterials based on silicon nitride and bioglass, *Ceramics International*, v. 41, p. 9770-9778, 2015.
- FRANCHI, L. P.; AMANTINO, C. F.; MELO, M. T.; DE LIMA MONTALDI, A. P.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C. In vitro effects of photodynamic therapy induced by chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion, *Photodiagnosis and photodynamic therapy*, v. 16, p. 100-105, 2016.
- FRANCO, D.; GONÇALVES, L. F. Feridas cutâneas: a escolha do curativo adequado, *Rev Col Bras Cir*, v. 35, p. 203-206, 2008.
- FREED, L. E.; GUILAK, F.; GUO, X. E.; GRAY, M. L.; TRANQUILLO, R.; HOLMES, J. W.; RADISIC, M.; SEFTON, M. V.; KAPLAN, D.; VUNJAK-NOVAKOVIC, G. Advanced tools for tissue engineering: Scaffolds, bioreactors, and signaling, *Tissue Engineering*, v. 12, p. 3285-3305, 2006.
- FRESHNEY, R. I. **Culture of specific cell types** Wiley Online Library, 2005.
- FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications** John Wiley & Sons, 2015.
- FREYMAN, T. M.; YANNAS, I. V.; GIBSON, L. J. Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering, *Progress in Materials Science*, v. 46, p. 273-282, 2001.
- GALLEGO-GOMEZ, F.; QUINTANA, J. A.; VILLALVILLA, J. M.; DIAZ-GARCIA, M. A.; MARTIN-GOMIS, L.; FERNANDEZ-LAZARO, F.; SASTRE-SANTOS, A. Phthalocyanines as Efficient Sensitizers in Low-T-g Hole-Conducting Photorefractive Polymer Composites, *Chemistry of Materials*, v. 21, p. 2714-2720, 2009.

- GALLICO, G. G. Biologic Skin Substitutes, *Clinics in Plastic Surgery*, v. 17, p. 519-526, 1990.
- GALLICO, G. G.; OCONNOR, N. E. Cultured Epithelium As A Skin Substitute, *Clinics in Plastic Surgery*, v. 12, p. 149-157, 1985.
- Garza-Licudine Edolfo, Darrel Deo, Sam Yu, Asma Uz-Zaman, and William B. Dunbar. **Portable Nanoparticle Quantization Using a Resizable Nanopore Instrument-the IZON QNanoGäó**, IEEE, 2010. 5736-5739.
- GEORGE, M.; ABRAHAM, T. E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosanGÇöa review, *Journal of Controlled Release*, v. 114, p. 1-14, 2006.
- GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A. e.; SAUREL, R. +. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview, *Food Research International*, v. 40, p. 1107-1121, 2007.
- GILMORE, T. D. Introduction to NF-+B: players, pathways, perspectives, *Oncogene*, v. 25, p. 6680, 2006.
- GOTO, P. L.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; DOS SANTOS, O. D. H. Preparation and Characterization of Polymeric Nanocapsules Produced by in Situ Polymerization From Nanoemulsions Produced by Direct Emulsification, *Journal of Dispersion Science and Technology*, v. 34, p. 228-233, 2013.
- GROSS, A. J.; JELKMANN, W. HeliumGÇÉNeon laser irradiation inhibits the growth of kidney epithelial cells in culture, *Lasers in surgery and medicine*, v. 10, p. 40-44, 1990.
- GROSSMAN, N.; SCHNEID, N.; REUVENI, H.; HALEVY, S.; LUBART, R. 780 nm low power diode laser irradiation stimulates proliferation of keratinocyte cultures: involvement of reactive oxygen species, *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, v. 22, p. 212-218, 1998.
- GUNASEKARAN, S.; KO, S.; XIAO, L. Use of whey proteins for encapsulation and controlled delivery applications, *Journal of Food Engineering*, v. 83, p. 31-40, 2007.
- HALIM, A. S.; KHOO, T. L.; YUSSOF, S. J. M. Biologic and synthetic skin substitutes: An overview, *Indian journal of plastic surgery: official publication of the Association of Plastic Surgeons of India*, v. 43, p. S23, 2010.
- HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P. Hydrogel nanoparticles in drug delivery, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, p. 1638-1649, 2008.
- HAWKINS, M. J.; SOON-SHIONG, P.; DESAI, N. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, p. 876-885, 2008.
- HEIN, S.; WANG, K.; STEVENS, W. F.; KJEMS, J. +. Chitosan composites for biomedical applications: status, challenges and perspectives, *Materials Science and Technology*, v. 24, p. 1053-1061, 2008.
- HUTMACHER, D. W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, *Biomaterials*, v. 21, p. 2529-2543, 2000.

- ISKANDAR, F.; GRADON, L.; OKUYAMA, K. Control of the morphology of nanostructured particles prepared by the spray drying of a nanoparticle sol, *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 265, p. 296-303, 2003.
- ISKANDAR, F.; MIKRAJUDDIN, a.; OKUYAMA, K. In situ production of spherical silica particles containing self-organized mesopores, *Nano Letters*, v. 1, p. 231-234, 2001.
- ISLAM, S.; BHUIYAN, M. R.; ISLAM, M. N. Chitin and chitosan: structure, properties and applications in biomedical engineering, *Journal of Polymers and the Environment*, v. 25, p. 854-866, 2017.
- ISSA, M. C. A.; BOECHAT, M.; FASSINI, A. C. Terapia fotodin+ômica no Brasil: 10 anos de hist+ria, *Surgical & Cosmetic Dermatology*, v. 8, p. 17-22, 2016.
- IWASAKI, N. Development of cartilage tissue engineering techniques based on biomedical research, *Journal of Orthopaedic Science*, v. 19, p. 699-706, 2014.
- IWASAKI, N.; YAMANE, S. T.; MAJIMA, T.; KASAHARA, Y.; MINAMI, A.; HARADA, K.; NONAKA, S.; MAEKAWA, N.; TAMURA, H.; TOKURA, S. Feasibility of polysaccharide hybrid materials for scaffolds in cartilage tissue engineering: evaluation of chondrocyte adhesion to polyion complex fibers prepared from alginate and chitosan, *Biomacromolecules*, v. 5, p. 828-833, 2004.
- JAISWAL, M.; DUDHE, R.; SHARMA, P. K. Nanoemulsion: an advanced mode of drug delivery system, *3 Biotech*, v. 5, p. 123-127, 2015.
- JARZABEK, K.; KODA, M.; KOZLOWSKI, L.; MITTRE, H.; SULKOWSKI, S.; KOTTLER, M. L.; WOLCZYNSKI, S. Distinct mRNA, protein expression patterns and distribution of oestrogen receptors +l and +l in human primary breast cancer: Correlation with proliferation marker Ki-67 and clinicopathological factors, *European Journal of Cancer*, v. 41, p. 2924-2934, 2005.
- JAYAKUMAR, R.; PRABAHARAN, M.; KUMAR, P. S.; NAIR, S. V.; TAMURA, H. Biomaterials based on chitin and chitosan in wound dressing applications, *Biotechnology advances*, v. 29, p. 322-337, 2011.
- JEON, H.; LEE, H.; KIM, G. A surface-modified poly (+ø-caprolactone) scaffold comprising variable nanosized surface-roughness using a plasma treatment, *Tissue Engineering Part C: Methods*, v. 20, p. 951-963, 2014.
- JONES, V.; GREY, J. E.; HARDING, K. G. ABC of wound healing: wound dressings, *BMJ: British Medical Journal*, v. 332, p. 777, 2006.
- JOVANOVI-Ç, R.; DUBE, M. A. EmulsionGÇÉbased pressureGÇÉsensitive adhesives: a review, *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*, v. 44, p. 1-51, 2004.
- K++BLER, A.; FINLEY III, R. K.; BORN, I. A.; MANG, T. S. Effect of photodynamic therapy on the healing of a rat skin flap and its implication for head and neck reconstructive surgery, *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, v. 18, p. 397-405, 1996.
- KANIMOZHI, K.; BASHA, S. K.; KUMARI, V. S. Processing and characterization of chitosan/PVA and methylcellulose porous scaffolds for tissue engineering, *Materials Science and Engineering: C*, v. 61, p. 484-491, 2016.

- KARU, T. I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation, *Lasers Life Sci*, v. 2, p. 53-74, 1988.
- KARU, T. Photobiology of low-power laser effects, *Health phys*, v. 56, p. 691-704, 1989.
- KARU, T. I. Effects of visible radiation on cultured cells, *Photochemistry and photobiology*, v. 52, p. 1089-1098, 1990.
- KENNEDY, J. C.; POTTIER, R. H. New trends in photobiology: endogenous protoporphyrin IX, a clinically useful photosensitizer for photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 14, p. 275-292, 1992.
- KERI MARSHALL, N. D. Therapeutic applications of whey protein, *Alternative medicine review*, v. 9, p. 136-156, 2004.
- KI, S. B.; SINGH, D.; KIM, S. C.; SON, T. W.; HAN, S. S. Effect of cross-linkers in fabrication of carrageenan-alginate matrices for tissue engineering application, *Biotechnology and Applied Biochemistry*, v. 60, p. 589-595, 2013.
- KIERSZENBAUM, A.; TRES, L. **Histologia e biologia celular: uma introdução á patologia** Elsevier Brasil, 2016.
- KIM, B. S.; PUTNAM, A. J.; KULIK, T. J.; MOONEY, D. J. Optimizing seeding and culture methods to engineer smooth muscle tissue on biodegradable polymer matrices, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 57, p. 46-54, 1998.
- KIM, H. L.; JUNG, G. Y.; YOON, J. H.; HAN, J. S.; PARK, Y. J.; KIM, D. G.; ZHANG, M. Q.; KIM, D. J. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite/alginate/chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, v. 54, p. 20-25, 2015.
- KIRILOV, P.; LUKYANOVA, L.; FRANCESCHI-MESSANT, S.; PERIER, V.; PEREZ, E.; RICO-LATTES, I. A new type of colloidal dispersions based on nanoparticles of gelled oil, *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 328, p. 1-7, 2008.
- KITTUR, F. S.; PRASHANTH, K. H.; SANKAR, K. U.; THARANATHAN, R. N. Characterization of chitin, chitosan and their carboxymethyl derivatives by differential scanning calorimetry, *Carbohydrate Polymers*, v. 49, p. 185-193, 2002.
- KODA, M.; SULKOWSKI, S.; KANCZUGA-KODA, L.; SURMACZ, E.; SULKOWSKA, M. Expression of ER⁺, ER⁺ and Ki-67 in primary tumors and lymph node metastases in breast cancer, *Oncology reports*, v. 11, p. 753-759, 2004.
- KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLEMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v. 66, p. 89-106, 2002.
- KONG, M.; CHEN, X. G.; XING, K.; PARK, H. J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review, *International Journal of Food Microbiology*, v. 144, p. 51-63, 2010.
- KOURNIATIS, L. R.; SPINELLI, L. S.; MANSUR, C. R.; GONZÁLEZ, G. Nanoemulsões de óleo de laranja/água preparadas em homogeneizador de alta pressão, *Quim. Nova*, v. 33, p. 295-300, 2010.

- KUCUKGUL, C.; OZLER, S. B.; INCI, I.; KARAKAS, E.; IRMAK, S.; GOZUACIK, D.; TARALP, A.; KOC, B. 3D Bioprinting of Biomimetic Aortic Vascular Constructs With Self-Supporting Cells, *Biotechnology and Bioengineering*, v. 112, p. 811-821, 2015.
- LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J. P. **Principles of tissue engineering** Academic press, 2011.
- LEE, H.; KIM, G. Enhanced cellular activities of polycaprolactone/alginate-based cell-laden hierarchical scaffolds for hard tissue engineering applications, *Journal of Colloid and Interface Science*, v. 430, p. 315-325, 2014.
- LEE, H.; KIM, Y.; KIM, S.; KIM, G. Mineralized biomimetic collagen/alginate/silica composite scaffolds fabricated by a low-temperature bio-plotting process for hard tissue regeneration: fabrication, characterisation and in vitro cellular activities, *Journal of Materials Chemistry B*, v. 2, p. 5785-5798, 2014a.
- LEE, H. J.; AHN, S. H.; KIM, G. H. Three-Dimensional Collagen/Alginate Hybrid Scaffolds Functionalized with a Drug Delivery System (DDS) for Bone Tissue Regeneration, *Chemistry of Materials*, v. 24, p. 881-891, 2012.
- LEE, K.; AHN, S.; CHOI, C. H.; LEE, D.; JUNG, W. K.; KIM, G. Functionalized alginate/chitosan biocomposites consisted of cylindrical struts and biologically designed for chitosan release, *Current Applied Physics*, v. 14, p. 1105-1115, 2014b.
- LEE, S. H.; CHUNG, H. Y.; SHIN, H. I.; PARK, D. J.; CHOI, J. H. Osteogenic activity of chitosan-based hybrid scaffold prepared by polyelectrolyte complex formation with alginate, *Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 11, p. 106-112, 2014c.
- LEE, Y. H.; FANG, C. Y.; CHIU, H. W.; CHENG, F. Y.; TSAI, J. C.; CHEN, C. W.; WANG, Y. J. Endoplasmic reticulum stress-triggered autophagy and lysosomal dysfunction contribute to the cytotoxicity of amine-modified silver nanoparticles in NIH 3T3 cells, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 13, p. 778-794, 2017.
- LEONG, K. F.; CHEAH, C. M.; CHUA, C. K. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs, *Biomaterials*, v. 24, p. 2363-2378, 2003.
- LEOR, J.; COHEN, S. Myocardial tissue engineering: creating a muscle patch for a wounded heart, *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 1015, p. 312-319, 2004.
- LETCHFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 65, p. 259-269, 2007a.
- LETCHFORD, K.; BURT, H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 65, p. 259-269, 2007b.
- LI, X.; ANTON, N.; ARPAGAU, C.; BELLETEIX, F.; VANDAMME, T. F. Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The B++chi Nano Spray Dryer B-90, *Journal of Controlled Release*, v. 147, p. 304-310, 2010.

- LI, X.; XIE, H.; LIN, J.; XIE, W.; MA, X. Characterization and biodegradation of chitosanGÇôalginate polyelectrolyte complexes, *Polymer Degradation and Stability*, v. 94, p. 1-6, 2009.
- LI, Y.; MA, T.; KNISS, D. A.; LASKY, L. C.; YANG, S. T. Effects of filtration seeding on cell density, spatial distribution, and proliferation in nonwoven fibrous matrices, *Biotechnology Progress*, v. 17, p. 935-944, 2001.
- LI, Z. S.; RAMAY, H. R.; HAUCH, K. D.; XIAO, D. M.; ZHANG, M. Q. Chitosan-alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, v. 26, p. 3919-3928, 2005a.
- LI, Z.; RAMAY, H. R.; HAUCH, K. D.; XIAO, D.; ZHANG, M. ChitosanGÇôalginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, v. 26, p. 3919-3928, 2005b.
- LI, Z.; RAMAY, H. R.; HAUCH, K. D.; XIAO, D.; ZHANG, M. ChitosanGÇôalginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials*, v. 26, p. 3919-3928, 2005c.
- LI, Z.; ZHANG, M. ChitosanGÇôalginate as scaffolding material for cartilage tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, v. 75, p. 485-493, 2005.
- LIN, H. Y.; YEH, C. T. Alginate-crosslinked chitosan scaffolds as pentoxifylline delivery carriers, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, v. 21, p. 1611-1620, 2010.
- LIU, Q.; LI, Q.; XU, S.; ZHENG, Q.; CAO, X. Preparation and Properties of 3D Printed AlginateGÇôChitosan Polyion Complex Hydrogels for Tissue Engineering, *Polymers*, v. 10, p. 664, 2018.
- LIU, W. G.; ZHANG, J. R.; CHENG, N.; CAO, Z. Q.; YAO, K. D. Anticoagulation activity of crosslinked N-sulfofurfuryl chitosan membranes, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 94, p. 53-56, 2004.
- LOHCHAROENKAL, W.; WANG, L.; CHEN, Y. C.; ROJANASAKUL, Y. Protein nanoparticles as drug delivery carriers for cancer therapy, *Biomed Research International*, v. 2014, 2014.
- LU, H.; CHEN, W. J.; XING, Y.; YING, D. J.; JIANG, B. Design and preparation of an electrospun biomaterial surgical patch, *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v. 24, p. 158-168, 2009.
- LUBART, R.; FRIEDMANN, H.; SINYKOV, M.; GROSSMAN, N. Biostimulation of photosensitized fibroblasts by low incident levels of visible light energy, *Laser Therapy*, v. 7, p. 101-105, 1995.
- LUBART, R.; EICHLER, M.; LAVI, R.; FRIEDMAN, H.; SHAINBERG, A. Low-energy laser irradiation promotes cellular redox activity, *Photomedicine and Laser Therapy*, v. 23, p. 3-9, 2005.
- LUCAS PRIMO, F. Processos fotodinômicos para bioestimulação tecidual em modelo in vitro de pele humana empregando-se laser de baixa potência e clorofitocianina em nanoemulsão.
- MALLER, E. J.; GALICHET, A.; WIENER, D.; MARTI, E.; DRÂGEMALLER, C.; WELLE, M.; ROOSJE, P.; LEEB, T.; SUTER, M. M. Keratinocyte biology and pathology, *Veterinary dermatology*, v. 25, p. 236-238, 2014.

- MA, J.; SAHAI, Y. Chitosan biopolymer for fuel cell applications, *Carbohydrate Polymers*, v. 92, p. 955-975, 2013.
- MAA, Y. F.; PRESTRELSKI, S. J. Biopharmaceutical powders particle formation and formulation considerations, *Current pharmaceutical biotechnology*, v. 1, p. 283-302, 2000.
- MACAROFF, P. P.; PRIMO, F. L.; LACAVA, Z. G. M.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Synthesis and characterization of a magnetic nanoemulsion as a promising candidate for cancer treatment, *IEEE transactions on magnetics*, v. 42, p. 3596-3598, 2006.
- MACNEIL, S. Progress and opportunities for tissue-engineered skin, *Nature*, v. 445, p. 874, 2007.
- MAIA, F. R.; FONSECA, K. B.; RODRIGUES, G.; GRANJA, P. L.; BARRIAS, C. C. Matrix-driven formation of mesenchymal stem cell-extracellular matrix microtissues on soft alginate hydrogels, *Acta Biomaterialia*, v. 10, p. 3197-3208, 2014.
- MAIER, K.; SCHMITT-LANDGRAF, R.; SIEGEMUND, B. Development of an in vitro test system with human skin cells for evaluation of phototoxicity, *Toxicology in vitro*, v. 5, p. 457-461, 1991.
- MALAM, Y.; LOIZIDOU, M.; SEIFALIAN, A. M. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer, *Trends in pharmacological sciences*, v. 30, p. 592-599, 2009.
- MANIGLIA, B. C. Elaboração de filmes biodegradáveis a partir do resíduo da extração do pigmento de Curcuma, 2012.
- MARIA DE FÁTIMA, G. S.; ANDRADE, Y. A. d. M. V.; MORIYA, T. Biologia da ferida e cicatrização, *Medicina (Ribeirão Preto. Online)*, v. 41, p. 259-264, 2008.
- MARKESON, D.; PLEAT, J. M.; SHARPE, J. R.; HARRIS, A. L.; SEIFALIAN, A. M.; WATT, S. M. Scarring, stem cells, scaffolds and skin repair, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, v. 9, p. 649-668, 2015.
- MARKOVITS, J.; POMMIER, Y.; KERRIGAN, D.; COVEY, J. M.; TILCHEN, E. J.; KOHN, K. W. Topoisomerase II-mediated DNA breaks and cytotoxicity in relation to cell proliferation and the cell cycle in NIH 3T3 fibroblasts and L1210 leukemia cells, *Cancer Research*, v. 47, p. 2050-2055, 1987.
- MARTEL-ESTRADA, S. A.; RODRIGUEZ-ESPINOZA, B.; SANTOS-RODRIGUEZ, E.; JIMENEZ-VEGA, F.; GARCIA-CASILLAS, P. E.; MARTINEZ-PEREZ, C. A.; ARMENDARIZ, I. O. Biocompatibility of chitosan/Mimosa tenuiflora scaffolds for tissue engineering, *Journal of Alloys and Compounds*, v. 643, p. S119-S123, 2015.
- MASCHMEYER, I.; LORENZ, A. K.; SCHIMEK, K.; HASENBERG, T.; RAMME, A. P.; HUBNER, J.; LINDNER, M.; DREWELL, C.; BAUER, S.; THOMAS, A. A four-organ-chip for interconnected long-term co-culture of human intestine, liver, skin and kidney equivalents, *Lab on a chip*, v. 15, p. 2688-2699, 2015.
- MASKARA, A.; SMITH, D. M. Agglomeration during the drying of fine silica powders, part II: The role of particle solubility, *Journal of the American Ceramic Society*, v. 80, p. 1715-1722, 1997.

- MEHRABAN, N.; FREEMAN, H. Developments in PDT sensitizers for increased selectivity and singlet oxygen production, *Materials*, v. 8, p. 4421-4456, 2015.
- MEISSNER, P.; SCHRÄDER, B.; HERFURTH, C.; BISELLI, M. Development of a fixed bed bioreactor for the expansion of human hematopoietic progenitor cells, *Cytotechnology*, v. 30, p. 227-234, 1999.
- MENDOZAGÇÉGARCIA, J.; SEBASTIAN, A.; ALONSOGÇÉRASGADO, T.; BAYAT, A. Optimization of an ex vivo wound healing model in the adult human skin: Functional evaluation using photodynamic therapy, *Wound Repair and Regeneration*, v. 23, p. 685-702, 2015.
- MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The biomedical effects of laser application, *Lasers in surgery and medicine*, v. 5, p. 31-39, 1985.
- MIKOS, A. G.; SARAOKINOS, G.; LEITE, S. M.; VACANTI, J. P.; LANGER, R. Laminated 3-Dimensional Biodegradable Foams for Use in Tissue Engineering, *Biomaterials*, v. 14, p. 323-330, 1993.
- MILLERET, V.; HEFTI, T.; HALL, H.; VOGEL, V.; EBERLI, D. Influence of the fiber diameter and surface roughness of electrospun vascular grafts on blood activation, *Acta Biomaterialia*, v. 8, p. 4349-4356, 2012.
- MISRA, R. D.; GIRASE, B.; DEPAN, D.; SHAH, J. S. Hybrid nanoscale architecture for enhancement of antimicrobial activity: immobilization of silver nanoparticles on thiolGÇÉfunctionalized polymer crystallized on carbon nanotubes, *Advanced Engineering Materials*, v. 14, p. B93-B100, 2012.
- MITTLER, R. ROS are good, *Trends in plant science*, v. 22, p. 11-19, 2017.
- MO, Y.; BARNETT, M. E.; TAKEMOTO, D.; DAVIDSON, H.; KOMPELLA, U. B. Human serum albumin nanoparticles for efficient delivery of Cu, Zn superoxide dismutase gene, *Molecular Vision*, v. 13, p. 746-757, 2007.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 385, p. 113-142, 2010.
- MORI, N.; MORIMOTO, Y.; TAKEUCHI, S. Skin integrated with perfusable vascular channels on a chip, *Biomaterials*, v. 116, p. 48-56, 2017.
- MORR, C. V.; HA, E. Y. W. Whey protein concentrates and isolates: processing and functional properties, *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, v. 33, p. 431-476, 1993.
- MURPHY, C. M.; O'BRIEN, F. J.; LITTLE, D. G.; SCHINDELER, A. Cell-scaffold interactions in the bone tissue engineering triad, 2013.
- MURUGESAN, R.; ORSAT, V. r. Spray drying for the production of nutraceutical ingredientsGÇöa review, *Food and Bioprocess Technology*, v. 5, p. 3-14, 2012.
- MUZZARELLI, R. A. A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone, *Carbohydrate Polymers*, v. 76, p. 167-182, 2009.
- MUZZARELLI, R. A. A.; EL MEHTEDI, M.; MATTIOLI-BELMONTE, M. Emerging Biomedical Applications of Nano-Chitins and Nano-Chitosans Obtained via Advanced

- Eco-Friendly Technologies from Marine Resources, *Marine Drugs*, v. 12, p. 5468-5502, 2014.
- MUZZARELLI, R. A. A.; GRECO, F.; BUSILACCHI, A.; SOLLAZZO, V.; GIGANTE, A. Chitosan, hyaluronan and chondroitin sulfate in tissue engineering for cartilage regeneration: A review, *Carbohydrate Polymers*, v. 89, p. 723-739, 2012.
- NAIR, L. S.; LAURENCIN, C. T. Biodegradable polymers as biomaterials, *Progress in polymer science*, v. 32, p. 762-798, 2007.
- NERLICH, A. G.; ZINK, A.; SZEIMIES, U.; HAGEDORN, H. G. Ancient Egyptian prosthesis of the big toe, *The Lancet*, v. 356, p. 2176-2179, 2000.
- NGADIMAN, N. H. A.; IDRIS, A.; IRFAN, M.; KURNIAWAN, D.; YUSOF, N. M.; NASIRI, R. gamma-Fe₂O₃ nanoparticles filled polyvinyl alcohol as potential biomaterial for tissue engineering scaffold, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, v. 49, p. 90-104, 2015.
- NISTA, S. V. G.; BETTINI, J.; MEI, L. H. I. Coaxial nanofibers of chitosan-alginate-PEO polycomplex obtained by electrospinning, *Carbohydrate Polymers*, v. 127, p. 222-228, 2015.
- NOLTE, S. V.; XU, W.; RENNEKAMPFF, H. O.; RODEMANN, H. P. Diversity of fibroblasts: a review on implications for skin tissue engineering, *Cells Tissues Organs*, v. 187, p. 165-176, 2008.
- NOROUZI, M.; BOROUJENI, S. M.; OMIDVARKORDSHOULI, N.; SOLEIMANI, M. Advances in Skin Regeneration: Application of Electrospun Scaffolds, *Advanced Healthcare Materials*, v. 4, p. 1114-1133, 2015.
- O'BRIEN, F. J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering, *Materials today*, v. 14, p. 88-95, 2011.
- OCHSNER, M. Photodynamic therapy: The clinical perspective - Review on applications for control of diverse tumorous and non-tumorous diseases, *Arzneimittel-Forschung-Drug Research*, v. 47, p. 1185-1194, 1997.
- OLIVEIRA, A. G. d.; SCARPA, M. V. n.; CORREA, M. A.; RODRIGUES CERA, L. F.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicação como sistema de liberação de fármacos, *Química Nova*, v. 27, p. 131-138, 2004.
- ORYAN, A.; KAMALI, A.; MOSHIRI, A.; BAHARVAND, H.; DAEMI, H. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 107, p. 678-688, 2018.
- PARK, H. J.; LEE, O. J.; LEE, M. C.; MOON, B. M.; JU, H. W.; LEE, J. M.; KIM, J. H.; KIM, D. W.; PARK, C. H. Fabrication of 3D porous silk scaffolds by particulate (salt/sucrose) leaching for bone tissue reconstruction, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 78, p. 215-223, 2015.
- PARK, J.; LAKES, R. S. **Biomaterials: an introduction** Springer Science & Business Media, 2007.
- PAROLIN, M. n. B.; REASON, I. J. M. Apoptosis as a mechanism of tissue injury in hepatobiliary diseases, *Arquivos de gastroenterologia*, v. 38, p. 138-144, 2001.

- PEREIRA, M. A.; MOSIQUEIRA, V. C.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; RAMALDES, G. A.; CARDOSO, V. N. PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with (99m)Technetium-HMPAO: Release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and photon correlation spectroscopy, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 33, p. 42-51, 2008.
- PERES, L. B. Obtenção de nanopartículas de PLLA e nanopartículas blenda PLLA/PMMA e PLLA/PS para incorporação de um antifúngico da isoniazida, 2012.
- PHAM, Q. P.; SHARMA, U.; MIKOS, A. G. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review, *Tissue engineering*, v. 12, p. 1197-1211, 2006.
- PORTER, B. D.; OLDHAM, J. B.; HE, S. L.; ZOBITZ, M. E.; PAYNE, R. G.; AN, K. N.; CURRIER, B. L.; MIKOS, A. G.; YASZEMSKI, M. J. Mechanical properties of a biodegradable bone regeneration scaffold, *Journal of biomechanical engineering*, v. 122, p. 286-288, 2000.
- PRABHAKARAN, M. P.; VENUGOPAL, J. R.; CHYAN, T. T.; HAI, L. B.; CHAN, C. K.; LIM, A. Y.; RAMAKRISHNA, S. Electrospun biocomposite nanofibrous scaffolds for neural tissue engineering, *Tissue Engineering Part A*, v. 14, p. 1787-1797, 2008.
- PRADITSUKTAVORN, B.; MUANGMAN, P. The use of artificial dermis for corrective surgery on burn scars, *Asian Biomedicine*, v. 9, p. 101-106, 2015.
- PRANG, P.; MILLER, R.; ELJAOUHARI, A.; HECKMANN, K.; KUNZ, W.; WEBER, T.; FABER, C.; VROEMEN, M.; BOGDAHN, U.; WEIDNER, N. The promotion of oriented axonal regrowth in the injured spinal cord by alginate-based anisotropic capillary hydrogels, *Biomaterials*, v. 27, p. 3560-3569, 2006.
- PREETZ, C.; HAUSER, A.; HAUSE, G.; KRAMER, A.; MADER, K. Application of atomic force microscopy and ultrasonic resonator technology on nanoscale: Distinction of nanoemulsions from nanocapsules, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 39, p. 141-151, 2010.
- PRIMO, F. L.; DE PAULA, L. B.; DE SIQUEIRA-MOURA, M. P.; TEDESCO, A. C. Photobiostimulation on wound healing treatment by CIAIPc-nanoemulsion from a multiple-wavelength portable light source on a 3D-human stem cell dermal equivalent, *Current medicinal chemistry*, v. 19, p. 5157-5163, 2012.
- PRIMO, L.; COSTA REIS, B. d.; PORCIONATTO, A.; TEDESCO, C. In vitro evaluation of chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion and low-level laser therapy on human skin dermal equivalents and bone marrow mesenchymal stem cells, *Current medicinal chemistry*, v. 18, p. 3376-3381, 2011.
- PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J. M. The skin: an indispensable barrier, *Experimental Dermatology*, v. 17, p. 1063-1072, 2008.
- R+, I. Microencapsulation by spray drying, *Drying Technology*, v. 16, p. 1195-1236, 1998.
- RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. An introduction to materials in medicine, *Biomaterials Science*, v. 484, 1996.
- RATNER, B. D.; HOFFMAN, A. S.; SCHOEN, F. J.; LEMONS, J. E. **Biomaterials science: an introduction to materials in medicine** Elsevier, 2004.

- RAVAGLIOLI, A.; KRAJEWSKI, A. **Bioceramics: Materials-À Properties-À Applications** Springer Science & Business Media, 2012.
- RHEINWALD, J. G.; GREEN, H. Epidermal growth factor and the multiplication of cultured human epidermal keratinocytes, *Nature*, v. 265, p. 421, 1977.
- RHEINWATD, J. G.; GREEN, H. Seria cultivation of strains of human epidemal keratinocytes: the formation keratinizin colonies from single cell is, *Cell*, v. 6, p. 331-343, 1975.
- ROCHA, M. S. T.; LUCCI, C. M.; LONGO, J. P. F.; GALERA, P. D.; SIMIONI, A. R.; LACAVA, Z. G. M.; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B. Aluminum-Chloride-Phthalocyanine Encapsulated in Liposomes: Activity Against Naturally Occurring Dog Breast Cancer Cells, *Journal of Biomedical Nanotechnology*, v. 8, p. 251-257, 2012.
- RODAL, G. H.; RODAL, S. K.; MOAN, J.; BERG, K. Liposome-bound Zn(II)-phthalocyanine. Mechanisms for cellular uptake and photosensitization, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 45, p. 150-159, 1998.
- ROSDIANI, A. F.; WIDIYANTI, P.; RUDYARJO, D. I. Synthesis and characterization biocomposite collagen-chitosan-glycerol as scaffold for gingival recession therapy, *Journal of International Dental and Medical Research*, v. 10, p. 118, 2017.
- ROWAN, M. P.; CANCIO, L. C.; ELSTER, E. A.; BURMEISTER, D. M.; ROSE, L. F.; NATESAN, S.; CHAN, R. K.; CHRISTY, R. J.; CHUNG, K. K. Burn wound healing and treatment: review and advancements, *Critical care*, v. 19, p. 243, 2015.
- RUE, L. W.; CIOFFI, W. G.; MCMANUS, W. F.; PRUITT, B. A.; PHILLIPS, L. G.; MEYER, A. A.; TOMPKINS, R. G.; SAFFLE, J. R. Wound Closure and Outcome in Extensively Burned Patients Treated with Cultured Autologous Keratinocytes, *Journal of Trauma-Injury Infection and Critical Care*, v. 34, p. 662-668, 1993.
- SAHU, K.; SHARMA, M.; BANSAL, H.; DUBE, A.; GUPTA, P. K. Topical photodynamic treatment with poly-l-lysineGÇôchlorin p6 conjugate improves wound healing by reducing hyperinflammatory response in Pseudomonas aeruginosa-infected wounds of mice, *Lasers in medical science*, v. 28, p. 465-471, 2013.
- SALVIA-TRUJILLO, L.; SOLIVA-FORTUNY, R.; ROJAS-GRA++, M. A.; MCCLEMENTS, D. J.; MARTIN-BELLOSO, O. Edible nanoemulsions as carriers of active ingredients: A review, *Annual review of food science and technology*, v. 8, p. 439-466, 2017.
- SCHNEIDER, E. L.; MITSUI, Y.; AU, K. S.; SHORR, S. S. Tissue-specific differences in cultured human diploid fibroblasts, *Experimental cell research*, v. 108, p. 1-6, 1977.
- SCHWUGER, M. J.; STICKDORN, K.; SCHOMAECKER, R. Microemulsions in technical processes, *Chemical reviews*, v. 95, p. 849-864, 1995.
- SHAARI, N.; KAMARUDIN, S. K. Chitosan and alginate types of bio-membrane in fuel cell application: An overview, *Journal of Power Sources*, v. 289, p. 71-80, 2015.
- SHAKESPEARE, P. G. The role of skin substitutes in the treatment of burn injuries, *Clinics in Dermatology*, v. 23, p. 413-418, 2005.
- SHALAK, R.; FOX, C. Tissue engineering proceedings: Workshop held at Granlibakken, *Lake Tahoe, California, February* p. 26-29, 1988.

- SHAULIAN, E.; KARIN, M. AP-1 as a regulator of cell life and death, *Nature cell biology*, v. 4, p. E131, 2002.
- SHEVCHENKO, R. V.; JAMES, S. L.; JAMES, S. E. A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction, *Journal of the Royal Society Interface*, v. 7, p. 229-258, 2009.
- SHI, L. B.; CAI, H. X.; CHEN, L. K.; WU, Y.; ZHU, S. A.; GONG, X. N.; XIA, Y. X.; OUYANG, H. W.; ZOU, X. H. Tissue engineered bulking agent with adipose-derived stem cells and silk fibroin microspheres for the treatment of intrinsic urethral sphincter deficiency, *Biomaterials*, v. 35, p. 1519-1530, 2014.
- SHUMEI, L.; DANFENG, M.; ZHIWEI, H.; YIHONG, X.; SONGYAN, C.; CHENG, L.; WEI, H.; DINGLIANG, T. A thin transition film formed by plasma exposure contributes to the germanium surface hydrophilicity, *Journal of Semiconductors*, v. 37, p. 093004, 2016.
- SIKORSKI, P.; MO, F.; SKJAK-BRAEK, G.; STOKKE, B. T. Evidence for egg-box-compatible interactions in calcium-alginate gels from fiber X-ray diffraction, *Biomacromolecules*, v. 8, p. 2098-2103, 2007.
- SILVA, A. P.; NUNES, B. R.; DE OLIVEIRA, M. C.; KOESTER, L. S.; MAYORGA, P.; BASSANI, V. L.; TEIXEIRA, H. F. Development of topical nanoemulsions containing the isoflavone genistein, *Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 64, p. 32-35, 2009.
- ALMEIDAGÇÉLOPES, L.; RIGAU, J.; AMARO Z+ÓNGARO, R.; GUIDUGLIGÇÉNETO, J.; MARQUES JAEGER, M. M. Comparison of the low level laser therapy effects on cultured human gingival fibroblasts proliferation using different irradiance and same fluence, *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, v. 29, p. 179-184, 2001.
- MENDOZAGÇÉGARCIA, J.; SEBASTIAN, A.; ALONSOGÇÉRASGADO, T.; BAYAT, A. Optimization of an ex vivo wound healing model in the adult human skin: Functional evaluation using photodynamic therapy, *Wound Repair and Regeneration*, v. 23, p. 685-702, 2015.
- R+®, M. I. s. Formulating drug delivery systems by spray drying, *Drying Technology*, v. 24, p. 433-446, 2006.
- SAHU, K.; SHARMA, M.; BANSAL, H.; DUBE, A.; GUPTA, P. K. Topical photodynamic treatment with poly-l-lysineGÇôchlorin p6 conjugate improves wound healing by reducing hyperinflammatory response in Pseudomonas aeruginosa-infected wounds of mice, *Lasers in medical science*, v. 28, p. 465-471, 2013.
- SILVA, J. C.; LACAVA, Z. G. M.; KUCKELHAUS, S.; SILVA, L. P.; NETO, L. F. M.; SAURO, E. E.; TEDESCO, A. C. Evaluation of the use of low level laser and photosensitizer drugs in healing, *Lasers in Surgery and Medicine: The Official Journal of the American Society for Laser Medicine and Surgery*, v. 34, p. 451-457, 2004.
- SIMKOVIC, I. What could be greener than composites made from polysaccharides?, *Carbohydrate Polymers*, v. 74, p. 759-762, 2008.

- SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Photodynamic therapy: pharmacological aspects, applications and news from medications development, *Quimica Nova*, v. 25, p. 801-807, 2002.
- SIVAKUMARAN, M.; PLATT, M. Tunable resistive pulse sensing: potential applications in nanomedicine, *Nanomedicine*, v. 11, p. 2197-2214, 2016.
- SOBRAL, J. M.; CARIDADE, S. G.; SOUSA, R. A.; MANO, J. F.; REIS, R. L. Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: Effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency, *Acta Biomaterialia*, v. 7, p. 1009-1018, 2011.
- SOLANS, C.; IZQUIERDO, P.; NOLLA, J.; AZEMAR, N.; GARCIA-CELMA, M. J. Nano-emulsions, *Current opinion in colloid & interface science*, v. 10, p. 102-110, 2005.
- SOUTO, L. S. R. M.; REHDER, J.; VASSALLO, J.; CINTRA, M. L. C.; KRAEMER, M. H. S.; PUZZI, M. B. Model for human skin reconstructed in vitro composed of associated dermis and epidermis, *Sao Paulo Medical Journal*, v. 124, p. 71-76, 2006.
- SPERANDIO, F. F.; SIMOES, A.; ARANHA, A. C. I. C. A.; CORRÊA, L.; ORSINI MACHADO DE SOUSA, S. Photodynamic therapy mediated by methylene blue dye in wound healing, *Photomedicine and laser surgery*, v. 28, p. 581-587, 2010.
- STAICU, A.; PASCU, A.; NUTA, A.; SORESCU, A.; RADITOIU, V.; PASCU, M. L. Studies about phthalocyanine photosensitizers to be used in photodynamic therapy, *Romanian Reports in Physics*, v. 65, p. 1032-1051, 2013.
- STEELE, J. A. M.; MCCULLEN, S. D.; CALLANAN, A.; AUTEFAGE, H.; ACCARDI, M. A.; DINI, D.; STEVENS, M. M. Combinatorial scaffold morphologies for zonal articular cartilage engineering, *Acta Biomaterialia*, v. 10, p. 2065-2075, 2014.
- STERN, S. J.; FLOCK, S. T.; SMALL, S.; THOMSEN, S.; JACQUES, S. Photodynamic therapy with chloroaluminum sulfonated phthalocyanine in the rat window chamber, *The American Journal of Surgery*, v. 160, p. 360-364, 1990.
- STOCK, U. A.; VACANTI, J. P. Tissue engineering: current state and prospects, *Annual review of medicine*, v. 52, p. 443-451, 2001.
- SUGIMOTO, M.; MORIMOTO, M.; SASHIWA, H.; SAIMOTO, H.; SHIGEMASA, Y. Preparation and characterization of water-soluble chitin and chitosan derivatives, *Carbohydrate Polymers*, v. 36, p. 49-59, 1998.
- SUH, J. K. F.; MATTHEW, H. W. T. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review, *Biomaterials*, v. 21, p. 2589-2598, 2000a.
- SUH, J.-K. F.; MATTHEW, H. W. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review, *Biomaterials*, v. 21, p. 2589-2598, 2000b.
- SUN, K. H.; LIU, Z.; LIU, C. J.; YU, T.; SHANG, T.; HUANG, C.; ZHOU, M.; LIU, C.; RAN, F.; PAN, L. J. Alginate Hydrogel Conglutinate Cells on the Surface of Polycaprolactone Vascular Scaffolds Fabricated by Electrospinning, *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, v. 5, p. 64-70, 2015.

- SUSANTO, H.; SAMSUDIN, A. M.; ROKHATI, N.; WIDIASA, I. N. Immobilization of glucose oxidase on chitosan-based porous composite membranes and their potential use in biosensors, *Enzyme and Microbial Technology*, v. 52, p. 386-392, 2013.
- TAKAHASHI, T.; TAKAYAMA, K.; MACHIDA, Y.; NAGAI, T. Characteristics of polyion complexes of chitosan with sodium alginate and sodium polyacrylate, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 61, p. 35-41, 1990.
- TALJA, R. A.; HELD, H.; ROOS, Y. H.; JOUPPIA, K. Effect of various polyols and polyol contents on physical and mechanical properties of potato starch-based films, *Carbohydrate Polymers*, v. 67, p. 288-295, 2007.
- TAMURA, H.; TSURUTA, Y.; ITOYAMA, K.; WORAKITKANACHANAKUL, W.; RUJIRAVANIT, R.; TOKURA, S. Preparation of chitosan filament applying new coagulation system, *Carbohydrate Polymers*, v. 56, p. 205-211, 2004.
- TAYLOR, P. M.; SACHLOS, E.; DREGER, S. A.; CHESTER, A. H.; CZERNUSZKA, J. T.; YACOB, M. H. Interaction of human valve interstitial cells with collagen matrices manufactured using rapid prototyping, *Biomaterials*, v. 27, p. 2733-2737, 2006.
- TRACHTENBERG, J. E.; KASPER, F. K.; MIKOS, A. G. Polymer scaffold fabrication. In: **Principles of Tissue Engineering**. Elsevier, 2014. p. 423-440.
- TWENTYMAN, P. R.; LUSCOMBE, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity, *British journal of cancer*, v. 56, p. 279, 1987.
- UENO, H.; MORI, T.; FUJINAGA, T. Topical formulations and wound healing applications of chitosan, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 52, p. 105-115, 2001.
- UNGARO, F.; D'ANGELO, I.; COLETTA, C.; DI VILLA BIANCA, R. d.; SORRENTINO, R.; PERFETTO, B.; TUFANO, M. A.; MIRO, A.; LA ROTONDA, M. I.; QUAGLIA, F. Dry powders based on PLGA nanoparticles for pulmonary delivery of antibiotics: modulation of encapsulation efficiency, release rate and lung deposition pattern by hydrophilic polymers, *Journal of Controlled Release*, v. 157, p. 149-159, 2012.
- VALLA, S.; SKJAKBRAEK, G. Alginate - A target molecule for genetic engineers and a versatile material for the biotechnologist, *Agro Food Industry Hi-Tech*, v. 7, p. 38-41, 1996.
- VAN WACHEM, P. B.; BEUGELING, T.; FEIJEN, J.; BANTJES, A.; DETMERS, J. P.; VAN AKEN, W. G. Interaction of cultured human endothelial cells with polymeric surfaces of different wettabilities, *Biomaterials*, v. 6, p. 403-408, 1985.
- VELZENBERGER, E.; EL KIRAT, K.; LEGEAY, G.; NAGEL, M. D.; PEZRON, I. Characterization of biomaterials polar interactions in physiological conditions using liquid-liquid contact angle measurements: relation to fibronectin adsorption, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 68, p. 238-244, 2009.
- VENKATESAN, J.; BHATNAGAR, I.; MANIVASAGAN, P.; KANG, K. H.; KIM, S. K. Alginate composites for bone tissue engineering: A review, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 72, p. 269-281, 2015a.
- VENKATESAN, J.; BHATNAGAR, I.; MANIVASAGAN, P.; KANG, K. H.; KIM, S. K. Alginate composites for bone tissue engineering: A review, *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 72, p. 269-281, 2015b.

- VILAPLANA, F.; STROMBERG, E.; KARLSSON, S. Environmental and resource aspects of sustainable biocomposites, *Polymer Degradation and Stability*, v. 95, p. 2147-2161, 2010.
- WALTON, D. E. The morphology of spray-dried particles a qualitative view, *Drying Technology*, v. 18, p. 1943-1986, 2000.
- WANG, L.; KHOR, E.; LIM, L. ChitosanGÇöalginateGÇöCaCl₂ system for membrane coat application, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 90, p. 1134-1142, 2001.
- WANG, M.; WANG, H.; ZHANG, R.; MA, M.; MEI, K.; FANG, F.; WANG, X. Photolysis of low-brominated diphenyl ethers and their reactive oxygen species-related reaction mechanisms in an aqueous system, *Plos One*, v. 10, p. e0135400, 2015.
- WANG, X. Y.; LIU, S.; ZHAO, Q.; LI, N.; ZHANG, H. S.; ZHANG, X. D.; LEI, X. H.; ZHAO, H. S.; DENG, Z. L.; QIAO, J. Q.; CAO, Y. J.; NING, L. N.; LIU, S.; DUAN, E. K. Three-dimensional hydrogel scaffolds facilitate in vitro self-renewal of human skin-derived precursors, *Acta Biomaterialia*, v. 10, p. 3177-3187, 2014a.
- WANG, Y. P.; WANG, X.; LI, L.; GU, Z. P.; YU, X. X. Controlled drug release from a novel drug carrier of calcium polyphosphate/chitosan/aldehyde alginate scaffolds containing chitosan microspheres, *Rsc Advances*, v. 4, p. 24810-24815, 2014b.
- WANG, Y. Y.; PENG, W. Z.; LIU, X.; ZHU, M. H.; SUN, T.; PENG, Q.; ZENG, Y.; FENG, B.; ZHI, W.; WENG, J.; WANG, J. X. Study of bilineage differentiation of human-bone-marrow-derived mesenchymal stem cells in oxidized sodium alginate/N-succinyl chitosan hydrogels and synergistic effects of RGD modification and low-intensity pulsed ultrasound, *Acta Biomaterialia*, v. 10, p. 2518-2528, 2014c.
- WATT, F. M. Terminal differentiation of epidermal keratinocytes, *Current opinion in cell biology*, v. 1, p. 1107-1115, 1989.
- WEBER, C.; COESTER, C.; KREUTER, J.; LANGER, K. Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 194, p. 91-102, 2000.
- WHANG, K.; HEALY, K. E.; ELENZ, D. R.; NAM, E. K.; TSAI, D. C.; THOMAS, C. H.; NUBER, G. W.; GLORIEUX, F. H.; TRAVERS, R.; SPRAGUE, S. M. Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture, *Tissue Engineering*, v. 5, p. 35-51, 1999.
- WILLIAMS, D. F. Tissue-biomaterial interactions, *Journal of Materials science*, v. 22, p. 3421-3445, 1987a.
- WILLIAMS, D. F. Tissue-biomaterial interactions, *Journal of Materials science*, v. 22, p. 3421-3445, 1987b.
- WONGSAGONSUP, R.; SHOBSNGOB, S.; OONKHANOND, B.; VARAVINIT, S. Zeta potential (+Å) analysis for the determination of protein content in rice flour, *StarchGÇöSt+nrke*, v. 57, p. 25-31, 2005.
- WUFUER, M.; LEE, G.; HUR, W.; JEON, B.; KIM, B. J.; CHOI, T. H.; LEE, S. Skin-on-a-chip model simulating inflammation, edema and drug-based treatment, *Scientific Reports*, v. 6, p. 37471, 2016.

- XU, C. Y.; INAI, R.; KOTAKI, M.; RAMAKRISHNA, S. Aligned biodegradable nanotibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering, *Biomaterials*, v. 25, p. 877-886, 2004.
- XU, K.; GANAPATHY, K.; ANDL, T.; WANG, Z.; COPLAND, J. A.; CHAKRABARTI, R.; FLORCZYK, S. J. 3D porous chitosan-alginate scaffold stiffness promotes differential responses in prostate cancer cell lines, *Biomaterials* p. 119311, 2019.
- YANG, S.; LEONG, K. F.; DU, Z.; CHUA, C. K. The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors, *Tissue Engineering*, v. 7, p. 679-689, 2001.
- YILDIRIMER, L.; THANH, N. T. K.; SEIFALIAN, A. M. Skin regeneration scaffolds: a multimodal bottom-up approach, *Trends in Biotechnology*, v. 30, p. 638-648, 2012.
- YUKUYAMA, M. N.; GHISLENI, D. D. M.; PINTO, T. J. A.; BOUGÇÉCHACRA, N. A. Nanoemulsion: process selection and application in cosmetics GÇõa review, *International journal of cosmetic science*, v. 38, p. 13-24, 2016.
- ZARGAR, V.; ASGHARI, M.; DASHTI, A. A review on chitin and chitosan polymers: structure, chemistry, solubility, derivatives, and applications, *ChemBioEng Reviews*, v. 2, p. 204-226, 2015.
- ZHANG, J. L.; XIA, W. S.; LIU, P.; CHENG, Q. Y.; TAHIROU, T.; GU, W. X.; LI, B. Chitosan Modification and Pharmaceutical/Biomedical Applications, *Marine Drugs*, v. 8, p. 1962-1987, 2010.
- ZHANG, J.; JIANG, C.; LONGO, J. P. F.; AZEVEDO, R. B.; ZHANG, H.; MUEHLMANN, L. A. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy, *Acta pharmaceutica sinica B*, v. 8, p. 137-146, 2018.
- ZHANG, W.; ZHONG, Q. Microemulsions as nanoreactors to produce whey protein nanoparticles with enhanced heat stability by thermal pretreatment, *Food Chemistry*, v. 119, p. 1318-1325, 2010.
- ZHANG, Y. W.; CUI, Z. M.; LIU, C. P.; XING, W.; ZHANG, J. J. Implantation of Nafion (R) ionomer into polyvinyl alcohol/chitosan composites to form novel proton-conducting membranes for direct methanol fuel cells, *Journal of Power Sources*, v. 194, p. 730-736, 2009.
- ZHENG, B. Y.; LIN, T.; YANG, H. H.; HUANG, J. D. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* sensitized by a series of novel axially di-substituted silicon (IV) phthalocyanines, *Dyes and Pigments*, v. 96, p. 547-553, 2013a.
- ZHENG, B. Y.; ZHANG, H. P.; KE, M. R.; HUANG, J. D. Synthesis and antifungal photodynamic activities of a series of novel zinc(II) phthalocyanines substituted with piperazinyl moieties, *Dyes and Pigments*, v. 99, p. 185-191, 2013b.
- ZHENG, L.; HU, X. F.; HUANG, Y. J.; XU, G. J.; YANG, J. S.; LI, L. In vivo bioengineered ovarian tumors based on collagen, matrigel, alginate and agarose hydrogels: a comparative study, *Biomedical Materials*, v. 10, 2015.
- ZORZI, G. K.; SCHUH, R. S.; CAMPOS, A. M.; CARVALHO, E. L.; ROTT, M. B.; TEIXEIRA, H. F. BIOMATERIALS FOR NANOTECHNOLOGY-BASED FORMULATIONS TARGETING OCULAR GENE THERAPY, *Quimica Nova*, v. 40, p. 74-84, 2017.