Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

**“Avaliação do uso do laser e processos fotodinâmicos na
estimulação e crescimento celular de osteoblastos.
Avaliação fotofísica e fotobiológica na presença e ausência
de fármacos fotossensíveis.”**

Aluna: Daniela Cervelle Zancanela

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
– USP, como parte das exigências para
obtenção do título de MESTRE EM
CIÊNCIAS – Área: Química.

RIBEIRÃO PRETO – SP

2009

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

**“Avaliação do uso do laser e processos fotodinâmicos na
estimulação e crescimento celular de osteoblastos.
Avaliação fotofísica e fotobiológica na presença e ausência
de fármacos fotossensíveis.”**

Daniela Cervelle Zancanela

Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
da USP, como parte das exigências para a
obtenção do título de Mestre em Ciências,
Área: **Química**

**RIBEIRÃO PRETO -SP
2009**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca Central do Campus Administrativo
de Ribeirão Preto / USP

Zancanela, Daniela Cervelle

“Avaliação do uso do laser e processos fotodinâmicos na estimulação e crescimento celular de osteoblastos. Avaliação fotofísica e fotobiológica na presença e ausência de fármacos fotossensíveis.”

73p. : il. ; 30cm

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

Orientador: Tedesco, Antonio Claudio.

1. Terapia Fotodinâmica.
2. Bioestimulação.
3. Ftalocianinas.
4. Nanoemulsão.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Folha de Aprovação

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Daniela Cervelle Zancanela,
apresentada ao Departamento de Química, da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de
Ribeirão Preto, __/__/__.

Comissão Julgadora:

(Nome/Instituição)

(Nome/Instituição)

(Nome/Instituição)

*“Que os nossos esforços desafiem as
impossibilidades. Lembrai-vos de
que as grandes proezas da
história foram conquistas do que
parecia impossível”.*

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais,

Agradeço antes de mais nada pela vida! Pela presença amiga. Pelos doces, presentes e passeios. Obrigado pelo suor na frente. Pelos braços cansados no final da jornada para que nada me faltasse. Pelas noites em claro. Pelos castigos quando eu estava errado, sempre tentando me mostrar o caminho da verdade.

Obrigado por tantas vezes que abdicaste de seus sonhos para realizar os meus, abrindo mão das suas vontades para realizar meus caprichos.

Obrigado!

Porque vocês existem!

Porque são meus pais!

Amo vocês!

Augusto Cury

Dedico ao meu orientador Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco,

Exemplo de verdadeiro mestre e cientista, que se destaca no meio universitário por sua competência pela sua constante preocupação na formação de seus alunos. Agradeço por seu precioso tempo dedicado a minha formação, durante o período que estive em seu laboratório. Sinto-me honrada e feliz pelas oportunidades de aprendizado e constantes discussões científicas que me foram proporcionadas por ele. As palavras são poucas para expressar minha profunda gratidão. Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus: “Para os crentes, Deus está no princípio das coisas. Para os cientistas, no final de toda reflexão” (Max Planck).

Ao Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco pela confiança, pelo apoio, pelo carinho, pelos momentos de descontração, pela enorme paciência e principalmente pelos grandes ensinamentos.

Aos meus irmãos Henrique e Leonardo pela cumplicidade, pelo apoio e pelo carinho. Aos meus familiares pelo incentivo, confiança e amor.

Ao meu namorado Pity por estar sempre ao meu lado nas horas boas e nos momentos ruins, pelo carinho, pela atenção e pela enorme compreensão. Muito obrigado. Amo você!

Ao grupo de Fotoquímica e Fotobiologia pelo apoio, especialmente ao Fernando, à Marcilene e ao Gilson pela amizade e pela disponibilidade em me ajudar. Aos colegas de laboratório: Ângelo, Ana, Camila, Dani Maranhão Dani Diniz, Gabi, Gisele, Laís, Laura, Nathália, Paty, Paula, Yves pelo carinho, atenção e pela ótima convivência.

Às amigas Deza e Carol pelo companheirismo, pelas risadas, pela sinceridade e pelo socorro nas horas de aperto.

À Olímpia agradeço não apenas como técnica do laboratório que sempre me socorreu nos momentos de sufoco, mas também pela amiga que se tornou.

Ao Prof. Dr. Adalberto Rosa pelo projeto temático e aos técnicos do laboratório de cultura de células da FORP/RP, Junia e Roger.

Ao pessoal da Secretaria do Departamento, da Secretaria de Pós-Graduação, em especial a Lâmia, pela enorme paciência e cooperação.

Aos Docentes e funcionários do Departamento de Química.

A todos que contribuíram para minha formação e para realização deste trabalho, mesmo que indiretamente.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro concedido durante a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	12
A luz	12
Implantodontia	15
Osteoblastos.....	19
Bioestimulação	21
Processos Fotodinâmicos.....	24
Os Fármacos Fotossensíveis.....	25
Sistemas de liberação de fármacos	27
II. OBJETIVOS	30
III. PARTE EXPERIMENTAL	31
III.1 Materiais	31
III.2 Equipamentos	32
III.3.2. Caracterização físico-química	34
III.3.2.1 Determinação do tamanho de partícula por espalhamento dinâmico da luz	34
III.3.2.2 Determinação do potencial Zeta	34
III.3.2.3 Monitoramento da estabilidade físico-química em função do tempo	34
III.3.3. Doseamento.....	34
III.3.3.1. Determinação da curva padrão de calibração por espectroscopia de fluorescência.....	34
III.3.3.2. Determinação do rendimento experimental de associação do fármaco fotossensível.....	35
III.3.4 Caracterização fotofísica	35
III.3.4.1 Determinação do espectro de absorção e emissão de fluorescência (UV-visível)	35
III.3.4.2 Determinação de rendimento quântico de fluorescência (Φ_f).....	35
III.3.5 Estudos <i>in vitro</i>	38
III.3.5.1. Obtenção de osteoblastos a partir da medula óssea de ratos. Crescimento e manutenção da cultura de células.....	38
III.3.5.3. Estudos de toxicidade na ausência de luz	39
III.3.5.4. Estudo da resposta celular sobre o uso de ftalocianina de cloro-alumínio (AlCIPc) em nanoemulsão em presença de luz (LASER).	39
III.3.5.5. Determinação da Viabilidade Celular (MTT).....	39
III.3.5.6. Medida de proteína total	41
III.3.5.7. Medida da atividade de fosfatase alcalina (ALP)	41
IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
IV.1. Determinação do tamanho de partículas e do potencial Zeta por espalhamento dinâmico de luz	44
IV.2 Monitoramento da estabilidade físico-química em função do tempo.....	44
4.3 Doseamento	44
4.3.1 – Determinação da curva padrão de calibração por espectroscopia de fluorescência e rendimento experimental de associação do fotossensibilizador	44
IV.4 – Caracterização fotofísica	44
IV.4.1 – Determinação do espectro de absorção e emissão de fluorescência (UV-Visível)	44

IV.4.2 – Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_f).....	47
IV.5 Estudos <i>in vitro</i>	53
IV.5.1. Crescimento e manutenção da cultura de células.	53
IV.5.2. Estudos de toxicidade na ausência de luz.....	54
IV.5.2. Estudos de resposta celular sobre o uso da ftalocianina de cloro-alumínio (AlClPc) em nanoemulsão em cultura celular na presença de luz (LASER).....	56
V. CONCLUSÕES.....	57
VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	1

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Osteoblastos, osteoclastos e osteócitos.	8
Figura 2	Estrutura básica de uma ftalocianina.	15
Figura 3	Estrutura geral das emulsões.....	17
Figura 4	Esquema para preparo das nanoemulsões biodegradáveis. Incorporação do fotossensibilizador AlClPc..	24
Figura 5	Metabolização do MTT para o sal Formazan pelas células viáveis.	33
Figura 6	Tamanho de partículas e polidispersidade da formulação AlClPc/NE em função do tempo.....	40
Figura 7	Potencial Zeta da formulação AlClPc/NE em função do tempo.....	40
Figura 8	Curva padrão de calibração para quantificação do fármaco fotossensível AlClPc ($n = 4$); $y = 25465886,296 x + 91842,1$; $R^2 =$ $0,993$, $\lambda_{exc} = 610 \text{ nm}$	42
Figura 9	Espectros de absorção normalizados no UV-visível para a AlClPc: etanol espectroscópico (—) e após incorporação em NE (—).....	44
Figura 10	Espectros normalizados de emissão de fluorescência no UV-visível para a AlClPc: etanol espectroscópico (—) e encapsulada em NE (—). $\lambda_{excitação} = 610 \text{ nm}$; fendas espectrais = 10/10 nm; tempo de integração = 0,1 s.....	45
Figura 11	Diagrama de Perrin-Jablonski e ilustração das posições espectrais relativas de absorção, fluorescência e fosforescência.	48
Figura 12	Espectro de absorção do transiente triplete no UV-visível para a AlClPc em nanoemulsão.	51
Figura 13	Cultura de Osteoblastos. Micrografias registradas a partir de um microcópio Axiovert 40 CFL com objetiva Ph 1 10x/0,25 com câmera acoplada 7.2.	53
Figura 14	Ensaio <i>in vitro</i> de toxicidade da AlClPc/NE em cultura de osteoblastos. Teste na ausência de luz após 3 horas de incubação com as concentrações de AlClPc/NE estudadas.....	54
Figura 15	Ensaio <i>in vitro</i> com AlClPc/NE em cultura de osteoblastos em presença de luz. Laser com dosagem de 0,5, 1,0 e 3,0 J/cm ²	56

Figura 16	Nódulos de matriz mineralizada. Micrografias registradas a partir de um microcópio Axiovert 40 CFL com objetiva Ph 1 10x/0,25 com câmera acoplada 7.2.....	58
Figura 17	Absorbância de alizarina (405 nm). Ensaio <i>in vitro</i> com AIClPc/NE em cultura de osteoblastos em presença de luz. Laser com dosagem de 0,5 e 3,0 J/cm ²	59

LISTA DE TABELAS

Tabela I	Tamanho de partícula e potencial zeta* para a nanoemulsão na presença e ausência do fotossensibilizador AlClPc.....	38
Tabela II	Rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_f).....	46
Tabela III	Tempos de vida triplete obtidos por <i>flash-fotólise</i> laser.....	49
Tabela IV	Ensaio <i>in vitro</i> de toxicidade da AlClPc/NE em cultura de osteoblastos. Teste na ausência de luz após 3 horas de incubação com as concentrações de AlClPc/NE estudadas.....	55
Tabela V	Ensaio <i>in vitro</i> com AlClPc/NE em cultura de osteoblastos em presença de luz. Laser com dosagem de 0,5, 1,0 e 3,0 J/cm ²	57
Tabela VI	Absorbância da alizarina (404 nm). Ensaio <i>in vitro</i> com AlClPc/NE em cultura de osteoblastos em presença de luz. Laser com dosagem de 0,5 e 3,0 J/cm ²	59

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

HÁ	Hidroxiapatita
ATP	Adenosina trifosfato
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
TFD	Terapia fotodinâmica
HpD	Derivados hematoporfirínicos
NE	Nanoemulsões
O/A	Óleo em água
A/O	Água em óleo
EHL	Equilíbrio hidrófilo/ lipófilo
$\cdot\text{OH}$, $\cdot\text{O}_2^-$	Radicais livres (radical hidroxila e ânion radical superóxido)
EROs	Espécies reativas de oxigênio
MTT	3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazolium
ALP	Atividade de fosfatase alcalina
AlClPc	Ftalocianina de cloro-alumínio
AlClPc/NE	Ftalocianina de cloro-alumínio incorporada em nanoemulsão
AlClPc/EtOH	Ftalocianina de cloro-alumínio em etanol
ZnPc	Ftalocianina de zinco
S ₀	Estado fundamental
S _n	Estado excitado singlete superior
S ₁	Estado excitado singlete
T ₁	Estado excitado triplete
ISC	Cruzamento intersistemas
IC	Conversão interna

Φ_f	Rendimento quântico de fluorescência
Φ_Δ	Rendimento quântico de produção de oxigênio singlete
τ_t	Tempo de vida dos estados tripletes
τ_Δ	Tempo de vida
Nd-YAG	Neodímio-Ítrio/Argônio
FFCLRP	Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto
α -MEM	Minimum Essential Medium
CEP-FOUSP	Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
χ^2	Função chi-quadrado
SEM	Erro Padrão Médio

RESUMO

Zancanela, D.C. **“Avaliação do uso do laser e processos fotodinâmicos na estimulação e crescimento celular de osteoblastos. Avaliação fotofísica e fotobiológica na presença e ausência de fármacos fotossensíveis”**. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2009.

O laser é uma fonte de radiação não ionizante altamente concentrada e coerente que, em contacto com os diferentes tecidos resulta, de acordo com o tipo de laser, em efeitos térmicos, fotoquímicos e não-lineares. Atualmente, o laser tem sido rotineiramente empregado em muitas áreas da ciência, assim como na medicina e odontologia.

Os tratamentos utilizando radiação laser de baixa intensidade na odontologia são de grande interesse especialmente nas áreas de cirurgia buco-maxilo-facial e implantodontia sendo utilizado para a estimulação do processo de osteogênese.

Um novo tratamento promissor na área odontológica envolve o processo fotodinâmico e emprega uma combinação de dois agentes terapêuticos: um fármaco fotossensível e uma baixa dosagem de luz visível que combinados com a presença de oxigênio poderia induzir a bioestimulação celular. É um método eficiente, não invasivo.

Avaliar o uso do sistema de liberação de fármaco para administrar fotossensibilizadores como derivados das ftalocianinas de cloro-alumínio especificamente para o uso no tratamento e estimulação da osteogênese é o principal objetivo deste trabalho. Também será avaliado o potencial terapêutico do processo.

Na tentativa de obter uma melhor biocompatibilidade desses fármacos, tem surgido nos últimos anos um interesse muito grande no desenvolvimento de formulações nanoestruturadas, dentro de uma linha altamente emergente de pesquisa da Nanobiotecnologia. A formulação nanoemulsão foi selecionada para este trabalho. Ela

mostrou que os fármacos hidrofóbicos escolhidos para este trabalho mantêm suas características fotofísicas e químicas em meio aplicável aos tecidos biológicos.

ABSTRACT

Zancanela, D.C. **"Evaluation of the use of laser and photodynamic processes in stimulation and cell growth of osteoblasts. Evaluation photophysical and photobiology in the presence and absence of photosensitive drugs"**. Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2009.

The laser is a source of non ionizing radiation highly concentrated and coherent that in contact with different tissues induce thermal, photochemical and non-linear effects according to the type of the laser. Currently, the laser has been used routinely in many areas of science, as well as in medicine and dentistry.

The treatments using laser radiation of low intensity in dentistry are of great interest specially in the areas of surgery bucco-maxillo-facial and dental implants and its being used to stimulate the process of osteogenesis.

A promising new treatment in dentistry area involves the photodynamic process and employs a combination of two therapeutic agents: a photosensitizers drug and a low dose of visible light that combined in the presence of oxygen could induce cellular biostimulation. It is an efficient non-invasive method.

Evaluate the use of the drug derived system to administrate photosensitizers as phthalocyanine derivatives chlorine-aluminum specifically for the use in treatment and stimulation of the osteogenesis is the main objective of this work. It will be also evaluated the therapeutic potential of the process.

In an attempt to obtain better biocompatibility of these drugs it has developed in recent years an additional interest in the development of nanostructured formulations, focused in a highly emerging line of research the Nanobiotechnology. The nanoemulsion formulation was

selected to this work. It was showed that the hydrophobic drugs choose for this work maintaining its photophysical and chemical characteristics in this medium applicable to biological tissue.

I. INTRODUÇÃO

A luz

A luz é tida como um fenômeno ondulatório, constituída por pequenas partículas de energia eletromagnética, os fótons. As ondas eletromagnéticas são caracterizadas por sua frequência, comprimento de onda e energia. Os comprimentos de onda da energia laser variam seus respectivos espectros, que vão desde a faixa do ultravioleta, ondas mais curtas e mais energéticas, até a região do infravermelho distante, ondas mais longas e menos energéticas. O laser visível apresenta comprimentos de onda, entre 400 e 800 nm, que ocupam pequena parte desse espectro eletromagnético (Genovese, 2000); (Henderson, 1997); (Mello e Mello, 2001); (Pinheiro, 1998).

Atualmente, o laser tem sido rotineiramente empregado em diversas áreas da ciência, inclusive na Medicina e Odontologia. Trata-se de uma fonte de radiação não ionizante, altamente concentrada, que em contato com diferentes tecidos resulta, de acordo com o tipo de laser, em efeitos térmicos, fotoquímicos e não lineares (Pinheiro, 1998).

O meio ativo utilizado em sua fabricação resulta em laser de comprimentos de onda específicos. Cada comprimento de onda reage de maneira diferente com os diferentes tipos de tecidos biológicos. As características de cada tecido, principalmente as que controlam reações moleculares e bioquímicas, devem ser observadas porque a extensão da interação entre o laser-tecido é determinada principalmente pelo comprimento de onda da emissão laser e pelas características ópticas do tecido alvo (Miserendino; Levy e Miserendino, 1995); (Pinheiro, 1998).

O uso do laser de baixa intensidade (não-cirúrgico) para terapia é distinto do uso do laser cirúrgico (alta intensidade), onde os efeitos terapêuticos aparentemente surgem direta ou indiretamente da interação eletromagnética da luz com o tecido e não dos efeitos térmicos ou fotoquímicos induzidos diretamente sobre o tecido (Rosenshein, 1997). Os lasers de baixa

potência utilizados na terapia estão situados na porção visível do espectro eletromagnético, bem como no infravermelho próximo.

Um grande número de estudos, avaliando aspectos variados dos efeitos do laser de baixa potência em eventos biológicos como produção de matriz extracelular, reparação de tecidos e reações imunes, tem sido publicado (Barushka et al., 1995; (Halcin e Uitto, 1997); Karu et al., 1995; Karu et al., 1994; (Karu, 1998); Kujawa et al., 2004; Ozawa et al., 1998; Ricci, R., 2003; (Rosenshein, 1997)). Os fatores biológicos que influenciam a interação laser-tecido são extensos e muitas vezes complexos. Entre estes fatores estão as propriedades ópticas de vários elementos teciduais que funcionam como moléculas específicas ou cromóforos endógenos responsáveis pela reação do tecido com a energia absorvida do laser (Miserendino; Levy e Miserendino, 1995). As propriedades ópticas do tecido determinam a natureza e extensão da resposta tecidual através de processos de absorção, transmissão, reflexão e espalhamento da radiação laser incidente. Toda radiação eletromagnética ao incidir sobre uma superfície qualquer se desdobra, sendo que uma parte é refletida e a outra é absorvida (Rigau i Mas, J., 1996). A energia radiante do laser interage com o tecido através de quatro fenômenos básicos destacando-se: (1) reflexão, onde não ocorre penetração ou interação da energia do laser com o tecido, (2) transmissão através do tecido, sem nenhum efeito no tecido alvo, (3) dispersão, onde a energia do laser se espalha pelo tecido sem produzir efeitos significativos e (4) absorção, realizada pelos componentes fotoreceptivos (cromóforos) do tecido alvo, o que resulta na transferência de energia para os mesmos (Gray, 1998); (Miserendino; Levy e Miserendino, 1995); (Rigau i Mas, 1998). Os efeitos teciduais desejados com o laser são baseados no fenômeno de absorção, porém reflexão, transmissão e dispersão contribuem para o efeito tecidual final (Gray, 1998).

A grande maioria dos cromóforos como fibras colágenas, células e organelas ocorrem em concentrações variadas no tecido e exercem influência na difusão do laser. Nos tecidos, a

absorção da luz pela água acontece próximo ao infravermelho com λ maiores que 900 nm e na faixa do ultravioleta com λ menores que 200 nm. Geralmente é a presença de substâncias pigmentadas em menor ou maior proporção que determina a menor ou maior transmissão de onda luminosa no tecido biológico. A monocromaticidade do laser determina a absorção seletiva por parte dos cromóforos endógenos que responde a um ou vários λ , fenômeno descrito como ressonância a uma determinada frequência (Rigau i Mas, 1998).

Os lasers de baixa potência emitem densidades de energia muito baixas para causar aumento da temperatura (em média na ordem de 0,5°C) no tecido alvo, sendo os efeitos observados atribuídos a eventos não térmicos (Halcin e Uitto, 1997). A terapia baseada na utilização do laser de baixa intensidade é, portanto, um processo não térmico que, aparentemente, não proporciona dilatação de artérias e aumento da permeabilidade de vênulas como ocorre normalmente na distribuição do calor (Genovese, 2000).

Os efeitos biológicos que resultam da absorção de energia depositada no tecido pelo laser são classificados em efeitos primários e secundários. Os efeitos primários estão relacionados ao aumento do metabolismo celular como, por exemplo, produção de substâncias liberadas nos processos de dor e inflamação (prostaglandinas, prostaciclina, histamina, bradicinina e leucotrienos) e produção de ATP (Karu et al., 1995; Kujawa et al., 2004; Passarella et al., 1984; Wilden e Karthein, 1998). A radiação atua também normalizando o potencial elétrico transmembrana, equilibrando a atividade funcional da célula (Genovese, 2000); (Low e Reed, 2001); (Rigau i Mas, 1998). Os efeitos secundários acontecem em nível da microcirculação, onde o laser atua no esfíncter pré-capilar, por meio de mediadores químicos, provocando uma dilatação persistente. Além disso, a radiação atua no processo de migração celular aumentando a velocidade de mitose. Estas observações indicam que o laser de baixa potência aumenta os processos de reparação tecidual estimulando a cicatrização do tecido conjuntivo e a neoformação de vasos a partir dos vasos já existentes (Genovese,

2000); (Rigau i Mas, 1998). Fatores como o nível de potência aplicado (densidade de potência), a energia total distribuída por área (fluência), a frequência de pulsos por segundo, a duração do pulso, o modo de interação da energia para o tecido alvo (contínuo ou pulsado), a distância focal (focado ou desfocado), a presença ou não de sistema de refrigeração e o tipo de tecido aliado a sua capacidade de absorção são essenciais para a compreensão do processo de interação laser-tecido. A manipulação desses fatores permite ao operador um controle preciso da radiação laser de forma a obter o efeito desejado sobre o tecido (Low e Reed, 2001); (Mello e Mello, 2001); (Miserendino; Levy e Miserendino, 1995). Atualmente, a radiação laser tem sido utilizada nas diversas especialidades da Odontologia. Lasers de alta potência são utilizados normalmente em cirurgias de tecido mole para realizar incisões, excisões além de apresentar ação coagulante (Strauss, 2000). Muitas condições patológicas intra-orais como hiperplasias, úlceras aftosas, além de outras lesões benignas e pré-malignas podem ser tratadas com laser (Convissar e Goldstein, 2001; Strauss, 2000).

De grande interesse para as áreas de cirurgia buco-maxilo-facial e implantodontia está a utilização da radiação laser de baixa intensidade na estimulação do processo de osteogênese. Com este objetivo, alguns estudos tem sido realizados e resultados favoráveis tem sido observados (Barushka et al., 1995; Dortbudak et al., 2000; Ozawa et al., 1998).

Embora muitos dos trabalhos citados acima tenham sido realizados com doses diferentes de energia, até o presente momento, não havia sido realizado nenhum estudo comparando o efeito de diferentes doses de energia, obtidas de radiação laser de baixa intensidade, quanto à capacidade osteogênica induzida por osteoblastos, na presença de um fármaco fotossensível com cromóforo exógeno.

Implantodontia

Um dos maiores avanços no tratamento odontológico é a restituição da forma e da

função dos dentes ausentes por meio do implante osseointegrado, pois representa uma alternativa vantajosa e eficaz para substituir ou favorecer as técnicas convencionais de reabilitação bucal.

Estes implantes são fabricados com um metal que apresenta propriedades mecânicas adequadas e excelente biocompatibilidade com o tecido ósseo, o titânio (Ti) (Lacefield, 1988; Williams, 1977a; Williams, 1977b). Introduzido na década de sessenta por Brånemark (Brånemark et al., 1969), o Ti tem desde então, gradualmente, substituído outros biomateriais metálicos, como o aço inoxidável e as ligas de cromo-cobalto, sendo também utilizado em outros procedimentos de cirurgias buco-maxilo-faciais e em cirurgias ortopédicas.

O titânio (Ti) é o material mais frequentemente usado para a fabricação de implantes endósseos devido a sua excelente biocompatibilidade. Desta propriedade resulta sua capacidade de osseointegração, que é caracterizada pelo contato direto, estrutural e funcional, entre o tecido ósseo, organizado e saudável, e a superfície do implante de Ti (Brånemark, 1983).

Apesar do titânio comercialmente puro (cpTi) ser somente capaz de união biomecânica, modificações químicas podem torná-lo um material bioativo (Albrektsson e Wennerberg, 2004).

Os eventos celulares e extracelulares que ocorrem durante o processo de osseointegração são bastante influenciados pelas propriedades da superfície do Ti, como morfologia, topografia e composição química (Boyan et al., 1998; Nishio et al., 2000; Redey et al., 2000). Assim sendo, o estudo das modificações de superfície de Ti é uma área de pesquisa bastante ativa por existir grande interesse em tratamentos de superfície que possam acelerar o processo fisiológico de reparo do tecido ósseo em contato com o Ti (Fini et al., 1999; Morra et al., 2003; Puleo e Nanci, 1999).

Recentemente, em uma revisão sobre a interface implante-osso, Puleo e Nanci (1999) descreveram três possíveis abordagens para a modificação de superfícies do Ti, sendo: métodos morfológicos, métodos bioquímicos e métodos físico-químicos.

Os métodos morfológicos, baseados no jateamento com óxido de alumínio (Al_2O_3) ou óxido de titânio (TiO_2) e/ou no ataque ácido com ácido nítrico, ácido clorídrico, ácido sulfúrico, são os mais comumente utilizados para promover modificações de superfície do Ti e também os mais abordados pela literatura (Martin et al., 1995; Rosa e Beloti, 2003; Wennerberg et al., 1998; Xavier et al., 2003). Estudos *in vitro* mostraram que a rugosidade de superfície altera a proliferação, a diferenciação osteoblástica e a produção de matriz extracelular (Kieswetter et al., 1996; Martin et al., 1995; Rosa e Beloti, 2003). Além disso, alguns estudos indicam que a rugosidade de superfície afeta a produção de citocinas, fatores de crescimento e RNAm sugerindo que a rugosidade de superfície modula a atividade das células adjacentes ao biomaterial e consequentemente, influencia a falha ou o sucesso do implante (Kieswetter et al., 1996; Schwartz et al., 1997).

Os métodos bioquímicos são uma alternativa ou um tratamento complementar aos métodos morfológicos e físico-químicos. O objetivo da modificação bioquímica da superfície é mobilizar enzimas, proteínas ou peptídeos sobre os biomateriais para induzir respostas celulares ou teciduais específicas ou, em outras palavras, controlar a interface osso-implante com moléculas liberadas diretamente na interface. Essa metodologia tem grande potencial para controlar as interações iniciais osso-implante. Para tanto, podem ser utilizadas moléculas de adesão celular, como a RGD (Arg-Gly-Asp), e moléculas que podem estimular a formação de tecido ósseo, como fatores de crescimento e proteínas morfogenéticas do osso. Porém, alguns problemas ocorrem com os métodos citados: adesão celular promovida pela RGD é mediada pelas integrinas, e considerando que uma variedade de células possui algumas integrinas, o resultado é a adesão não específica de células à superfície modificada; com

relação aos fatores de crescimento e proteínas morfogenéticas do osso, as dificuldades encontradas estão nas formas de imobilização de liberação local da molécula (Puleo e Nanci, 1999), além da antigenicidade e a vulnerabilidade físico-química devido à natureza protética desses fatores de crescimento (Hoshino et al., 2000).

Alguns autores consideram que entre os fatores mais importantes na determinação do grau de interação do implante estão as propriedades físico-químicas de sua superfície (Sandrini et al., 2003). Energia, carga e composição de superfície estão entre as características físico-químicas que podem ser alteradas com o objetivo de melhorar a osseointegração do Ti (Puleo e Nanci, 1999). Na última década tem sido demonstrado um aumento no interesse no desenvolvimento de novos tratamentos de superfície que resultem em modificações que mimetizem as propriedades da apatita, no intuito de alcançar uma melhora na osseointegração do Ti e suas ligas (Kim et al., 1996).

Entretanto, as tentativas de revestir a superfície com materiais quimicamente semelhantes à porção mineral do tecido ósseo tem sido extensivamente investigadas há mais tempo (Jarcho, 1981). Várias técnicas podem ser empregadas para revestir o Ti com um filme de hidroxiapatita (HA) ou de cálcio-fósforo (CaP), como por exemplo: jateamento, deposição por laser, deposição por irradiação, pressão isostática, deposição eletroforética, sol-gel e implantação de íons (Satsangi et al., 2003).

Entre os diferentes métodos, o mais utilizado para o revestimento de superfície do Ti, é o jateamento com HA (Satsangi et al., 2003). Foi observado que este tratamento melhora a osseointegração, especialmente em avaliações de curto período, impedindo a formação de tecido fibroso na interface osso-implante (Tisdell et al., 1994). No entanto, falhas no desempenho de implantes de Ti revestidos com HA ou CaP e o substrato, resultam na uniformidade na deposição (resultando diferentes espessuras do revestimento de HA), microfraturas e dissolução não controlada do revestimento (Filiaggi et al., 1991; Fini et al.,

1999; Kim et al., 1996; Puleo e Nanci, 1999). Além disso, em razão do processamento envolvido na confecção destes revestimentos, a superfície de HA ou CaP apresenta-se altamente texturizada, podendo também ocorrer uma transformação química, causada pelas altas temperaturas utilizadas no processamento, com a formação de outros produtos de composição e cristalinidade diferentes da HA utilizada como substituto ósseo (Rosa et al., 2000). Tais problemas, contudo, não refletem falhas inerentes ao filme de HA ou CaP, mas limitações das técnicas utilizadas para a deposição do revestimento (Satsangi et al., 2003).

Osteoblastos

Figura 1: Osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. (anatpat.unicamp.br)

O tecido ósseo contém três tipos de células: osteoblastos, osteoclastos e osteócitos. Os osteoblastos formam os ossos por deposição de materiais protéicos na matriz, levando à mineralização. A função dos osteoclastos é a reabsorção óssea. Essas células destroem a matriz sempre que o osso precisa ser remodelado. O terceiro tipo de células, os osteócitos, encontram-se localizados profundamente nas fibras protéicas da matriz óssea estando, provavelmente, envolvidos na homeostase do cálcio plasmático (Kipshidze et al., 2001).

As células estudadas foram os osteoblastos. Estas células são responsáveis por sintetizar a parte orgânica (colágeno tipo I, proteoglicanas e glicoproteínas) da matriz óssea.

Elas possuem a capacidade de concentrar fosfato de cálcio, participando ativamente da mineralização da matriz óssea.

Para que ocorra a osteogênese, é necessário que haja o recrutamento e a proliferação de células precursoras de osteoblastos, que elas se diferenciem em osteoblastos e produzam matriz extracelular não mineralizada, que será subsequentemente calcificada (Schwartz e Boyan, 1994). A utilização de cultura de células ósseas para o estudo da regulação tem sido gradativamente maior (Aubin, 1998). Sistemas *in vitro* proporcionam a oportunidade de se avaliar, em um ambiente controlado, eventos celulares e referentes à matriz extracelular que ocorrem durante a formação óssea (Irie et al., 1998).

Aumentar e/ou acelerar a osteogênese de forma a obter maior e/ou mais rápida aposição óssea junto ao implante representa um dos maiores desafios da Implantodontia na atualidade. Com esses objetivos, pesquisadores tem buscado experimentalmente condições ideais que contribuam para incrementar o processo de osseointegração.

Considerando a interface implante-osso, com o objetivo de incrementar a osseointegração, podem-se modificar seus dois componentes implante e tecido ósseo. Modificações do implante são feitas considerando-se que apenas suas camadas mais superficiais participam da interface implante-osso, sendo que dois tipos de modificações de superfície são possíveis: de composição química e de textura.

Visando-se então avaliar novos métodos que possam contribuir para estimular a osteogênese, por meio de técnicas de cultura de células, e, ao mesmo tempo, obter mais informações acerca da biologia do tecido ósseo, propôs-se o desenvolvimento deste trabalho.

Os resultados obtidos poderão trazer avanços para a Implantodontia, em particular ao indicar novas possibilidades de condutas terapêuticas no intuito de se obterem maiores índices de sucesso no uso dos implantes osseointegrados. No geral, alguns resultados poderão ter aplicação mais ampla nas áreas odontológica e médica.

Bioestimulação

Existe no organismo animal uma função reguladora a partir de certos fotoreceptores capazes de absorver um fóton de determinado comprimento de onda, chegando a provocar uma transformação na atividade funcional e metabólica da célula. Eles são os fotoreceptores especializados ou pigmentos fotocromáticos fotoreversíveis (PFF), como a clorofila, a rodopsina, a bacteriorrodopsina, o fitocromo (A, B, C, D); e os fotoreceptores não específicos, como as flavoproteínas, as porfirinas, a catalase, os citocromos, a citocromooxidase, as proteínas com cobre, as tirosinas, o superóxido dismutase, a ceruloplasmina, as asparaginas, etc. Os fotoreceptores específicos são capazes de absorver os fótons fornecidos por radiação luminosa levando essas espécies a mudanças no metabolismo celular. Estes processos são definidos como Processos de Bioestimulação e tem sido estudado com frequência (Barushka et al., 1995; Conlan et al., 1996; Dortbudak et al., 2000; (Halcin e Uitto, 1997); Karu et al., 1995; Karu et al., 1994; (Karu, 1998); Kipshidze et al., 2001; Kujawa et al., 2004; Lopes, A. L., 1999; (Pöntinen, 1992); Ricci, R., 2003; Schindl et al., 2000).

As características da luz laser determinam a resposta biológica final. A monocromaticidade do laser determina a absorção seletiva por parte dos cromóforos com resposta para um ou vários comprimentos de onda (ressonância a uma determinada frequência). A unidirecionalidade e coerência são outras características que nos permitem dispor de uma alta potência, observando-se diversas reações na zona de tecido irradiada pelo laser.

Os efeitos da luz visível ou não podem ser, dentre outros, fotoquímico ou fotofísico. O efeito fotoquímico ocorre quando a luz incide em culturas em monocamada de células in vitro se conserva a polaridade e a coerência e pode ser determinante nos resultados biológicos que se obtém (Fennyö, 1984; Oularamara, 1989; Pöntinen, 1992). A absorção de fótons visíveis por biomoléculas intracelulares específicas produz estimulação ou inibição de atividades enzimáticas e de reações fotoquímicas. Estas ações determinam mudanças ou processos

fotodinâmicos em cadeias complexas e em moléculas básicas que participam dos processos fisiológicos com conotações terapêuticas.

O efeito fotofísico afeta diretamente os processos que provocam mudanças dos potenciais elétricos de membrana incrementando a síntese de ATP (Coll, 1987); Passarella et al., 1984). A transmissão de estímulo doloroso se realiza mediante trocas entre estados eletrofisiológicos das membranas com as fibras nervosas. Para que a transmissão de impulso exista, é necessário um aumento da permeabilidade da membrana aos íons de sódio, os quais provocam uma variação de potencial de até 30 mV. A bomba de Na/K começa então a expulsar os íons extras levando a um consumo de ATP. Em estados patológicos, a luz laser visível intervém no processo de intercambio iônico, provocando a despolarização da membrana bloqueando a transmissão momentânea do estímulo neuronal, além também de acelerar o processo de aumento de ATP (Karu et al., 1995).

O modelo proposto por Karu modificado por Smith e cols implica que a ação fotoquímica da luz visível na cadeia redox da mitocôndria e a ação fotofísica da luz infravermelha na membrana celular desencadeiam a mesma cascata de fotoresposta celular.

Os aumentos de ATP mitocondrial (Passarella et al., 1984) que são produzidos pela irradiação laser favorecem um grande número de reações que:

I) intervém no metabolismo celular, como o aumento da síntese de DNA e RNA nas células eucariotas e procariotas ((Karu, 1985a); (Karu, 1985b); (Mester, 1983));

II) aumentam a formação de colágeno e precursores (Abergel et al., 1986; Mester, 1985);

III) provocam variações quantitativas de prostaglandinas E2 e F2 (Cseh et al., 1978), aumentam a capacidade imunossupressoras ((Mester, 1983));

IV) aumentam a adesão de macrófagos ou linfócitos ((Antikas, 1987); (Gamelaya, 1977)), e todos os efeitos sem a observação de alterações prejudiciais na imunidade celular (Hubacek, 1985).

Em nível enzimático tem-se descrito a liberação de substâncias pré-formadas como a acetilcolina e histamina. Observaram-se variações na atividade de NADH, catalase, citocromoxidase, fosfatases ácidas, superóxido dismutase, succinato e desidrogenase. A ação da luz sobre glândulas secretoras foi descrita sobre tireóides, hipófises e glândulas exócrinas (Rodrigo e Zaragoza, 1985; Smith-Agreda et al., 1986), sobre a estimulação da microcirculação vascular e sistema linfático (Lievens, 1991; Miró et al., 1984), ação na reparação e cicatrização tecidual na pele (Mester, 1985), e no sistema nervoso (Fork, 1971) e no tecido ósseo (Trelles e Mayayo, 1987).

Bioestimulação ou biomodulação são processos induzidos pela baixa intensidade (potência de saída dos aparelhos de laser na faixa mW) de irradiação que se caracterizam pela sua capacidade de induzirem efeitos estimulatórios (Conlan et al., 1996; Karu, 1988; Kujawa et al., 2004; Schindl et al., 2000).

Os efeitos biológicos da irradiação dependem portanto do comprimento de onda, potência, tempo de exposição e dose de irradiação ou fluência (Harris, 1988; Karu, 1988). Baixas dosagens induzem estímulos, altas dosagens deprimem processos fisiológicos, enquanto os extremos causam a destruição das estruturas biológicas (como, por exemplo, um lipoperoxidação ou aquecimento proteína que provoca desnaturação) (Girotti, 2001; Karu et al., 1994; (Karu, 1998)).

O efeito bioestimulatório na proliferação celular pode ser facilmente explicado, entre outros fatores, pelo aumento de fatores de crescimento no meio de cultura das células irradiadas (Ricci, R., 2003), demonstrando que o laser de baixa potência pode bioestimar

células em cultura, causando um aumento significativo da proliferação celular (Lopes, A. L., 1999).

Processos Fotodinâmicos

Considerando que o principal agente ativador no processo fotodinâmico é a utilização de um fármaco fotossensível, este composto deve possuir várias propriedades físico-químicas, farmacológicas e fotobiológicas que o qualifiquem como bom agente fotossensibilizador para a TFD, minimizando, assim, os possíveis efeitos colaterais.

Atualmente os processos fotodinâmicos são estudados principalmente para terapia contra câncer e recentemente para a bioestimulação. Estes processos em geral dependem da retenção de um fármaco fotossensível exógeno nos tecidos alvos e posterior irradiação com luz visível em comprimento de onda adequado. Após ativação, o fármaco pode gerar espécies como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), radicais livres ($\bullet\text{O}_2^-$, $\bullet\text{OH}$) e outras espécies reativas de oxigênio (EROs), responsáveis pelo processo fotooxidativo, induzindo a morte celular ou o processo de bioestimulação dependendo da intensidade de luz aplicada.

Sendo assim, o objetivo do nosso trabalho é modular a bioestimulação do crescimento celular utilizando lasers de baixa potência operando na faixa visível do espectro como fonte de ativação, associados aos fármacos fotossensíveis adequadamente veiculados, buscando alcançar o efeito fotodinâmico desejado.

A eficácia terapêutica dos lasers de baixa potência depende de uma reação em cadeia estimulada pelo fóton, como principal agente indutor da resposta biológica sobre as vias metabólicas levando aos resultados clínicos e terapêuticos esperados sobre patologias localizadas numa profundidade de vários centímetros (Velez e Coll, 1988).

Trabalhos recentes do grupo na área de TFD e Engenharia tecidual (Lunardi e Tedesco, 2005; Oliveira, D. M., 2006), fornecem os subsídios básicos para este trabalho de bioestimulação, um campo novo que se beneficia diretamente do Processos Fotodinâmicos.

Os Fármacos Fotossensíveis

Os fármacos fotossensíveis, como descritos anteriormente, são os agentes ativos nos processos fotodinâmicos. Estes compostos apresentam várias propriedades, as quais são responsáveis pelo início de uma série de reações fotofísicas e fotoquímicas desencadeadas pela absorção de luz.

Atualmente, um dos fármacos fotossensíveis mais utilizado e aprovado clinicamente é um derivado da Hematoporfirina (HpD) conhecido comercialmente como Photofrin II (Bellnier et al., 2003; Chaleix et al., 2003). Entretanto, esses derivados, chamados de *fármacos fotossensíveis de primeira geração*, apresentaram algumas desvantagens com relação ao seu uso. Os derivados da HpD possuem uma baixa seletividade com respeito à incorporação e retenção por células tumorais, e causam fotossensibilidade cutânea por algumas semanas. Além disso, esses fármacos exibem fraca absorção de luz na região do vermelho, região do espectro eletromagnético (próximo a 600 nm), onde usualmente ocorre a máxima penetração de luz através dos tecidos ((Jori, 1992)).

Os problemas encontrados com os compostos derivados da Hematoporfirina levaram ao desenvolvimento de novas moléculas, chamadas de *fármacos fotossensíveis de segunda e terceira geração*, como as ftalocianinas (Marti et al., 2000), clorinas e bacterioclorinas (Gillies et al., 1996; Roberts, 1988; Spikes e Bommer, 1993).

Dentre estes compostos de segunda geração, as ftalocianinas recebem destaque frente aos derivados da HpD por apresentarem diversas vantagens. Elas são eficientes geradoras de oxigênio singlete e possuem um alto coeficiente de absorvidade na faixa de 600-800 nm

(dentro da Janela Terapêutica), ou seja, dentro da faixa de comprimentos de onda na qual a penetração da luz no tecido é aumentada sem interferência de cromóforos endógenos do próprio sistema biológico (Wilson, 1989).

Além disso, muitas ftalocianinas são caracterizadas pelo seu elevado nível de hidrofobicidade. Esta propriedade é fundamental, uma vez que a mesma pode aumentar a afinidade do fármaco fotossensível pelo tecido neoplásico (Dougherty et al., 1998). Entretanto, a baixa solubilidade em água apresentada por alguns derivados das ftalocianinas, limita seu uso, uma vez que impede a administração da mesma via intravenosa clássica (meio fisiológico). Para superar este problema, substituintes periféricos polares, como carboxilatos, sulfonatos e grupos hidroxilas são frequentemente adicionados ao macrociclo (Pelisson et al., 2004; Rotta et al., 2003; Wohrle et al., 1999).

Figura 2: Estrutura básica de uma ftalocianina.

As ftalocianinas de cloro-alumínio vem demonstrando um grande potencial na terapia fotodinâmica. Estes corantes possuem alta absorção na região de 680 nm (região de maior transparência dos tecidos), são capazes de produzir $^1\text{O}_2$ (oxigênio singlete) com bons rendimentos quânticos (entre 0,25 até 0,39) e são relativamente fotoestáveis.

Sistemas de liberação de fármacos

Na tentativa de se obterem melhores resultados, tem surgido nos últimos anos um interesse muito grande no desenvolvimento de formulações nanoestruturadas, dentro de uma linha altamente emergente de pesquisa: a Nanobiotecnologia.

O desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos miniaturizados tem demonstrado que tais formulações apresentam estabilidade adequada, aumento de absorção e sítio especificidade pelos tecidos alvos associado a liberação controlada, transferência quantitativa e atividade farmacodinâmica dentro do esperado (Oliveira, D. M., 2006).

O tamanho extremamente reduzido das partículas (50-300 nm) tem garantido um aumento de incorporação, transferência e tolerância das mesmas pelos tecidos alvos. O maior objetivo nos estudos visando o uso destes sistemas nanoestruturados tem sido direcionar as moléculas especificamente e diretamente aos tecidos a serem tratados, diminuindo assim efeitos colaterais indesejáveis, usualmente presentes nas terapias convencionais.

Neste contexto, surgem dentre os vários sistemas carregadores disponíveis, as nanoemulsões, que permitem solubilizar fármacos hidrofóbicos em água, mantendo suas características físico-químicas (Hoebeke, 1995).

Através do uso das nanoemulsões poderemos obter um método de liberação mais eficiente e seletivo deste agente terapêutico ao sítio de ação e aumentar a localização do mesmo, e ao mesmo tempo reduzir a toxicidade desta droga nos tecidos normais.

A interação de fármacos com a interface de agregados supramoleculares de compostos anfifílicos ou de polímeros representa um aspecto importante dentro da tecnologia farmacêutica, devido suas implicações biológicas da presença destes compostos em formulações interferindo diretamente no perfil de biodisponibilidade, o que resulta na alteração das constantes de ionização dos fármacos cujos efeitos terapêuticos dependem

substancialmente da fração ionizada do mesmo, modificando drasticamente a estabilidade de um grande número de compostos de uso terapêutico ((Florence e Attwood, 2003)).

As nanoemulsões (NE) são sistemas coloidais, nos quais a fase interna constitui um microambiente dimensionalmente restrito, com propriedades particulares, podendo ligar ou associar moléculas com diferentes polaridades, atuando como agregados esféricos e com diâmetros menores que 1000 nm (Oliveira, 2003). As NE são, de forma geral, definidas como sistemas termodinamicamente estáveis, isotrópicos, de dois líquidos imiscíveis, (usualmente água e óleo) estabilizados por um filme de compostos tensoativos, localizados na interface óleo/água.

Do ponto de vista farmacêutico, as nanoemulsões podem ser definidas como emulsões, na maioria das vezes transparentes, nas quais um óleo ou um fármaco lipofílico é disperso num meio aquoso (ou vice-versa), contendo um tensoativo, associado ou não a um co-tensoativo apropriado, gerando um sistema termodinamicamente estável (Figura 3).

Figura 3: Estrutura geral das emulsões (modificado de (Oliveira, 2003)).

A formação da NE geralmente envolve a combinação de três a cinco componentes, tais como, tensoativo, fase aquosa, fase oleosa e, quando necessário, o co-tensoativo, sendo que a orientação para sistemas O/A ou A/O é dependente das propriedades físico-químicas do tensoativo, traduzidas principalmente pelo seu equilíbrio hidrófilo/lipófilo (EHL). A principal

característica do sistema é formar espontaneamente a fase interna por homogenização suave dos componentes da fórmula. Sua estabilidade termodinâmica oferece vantagens sobre as dispersões instáveis, tais como as suspensões e emulsões, podendo ser utilizada por um tempo muito mais longo de estocagem.

Considerando que as NE O/A são formadas por gotículas de óleo dispersas em água, contendo o tensoativo na interface óleo/água, estas possuem ótima capacidade de solubilização de substâncias hidrofílicas e/ou lipofílicas. Elas tem sido utilizadas para aumentar a estabilidade, a solubilidade e a biodisponibilidade de fármacos, pois permitem a incorporação de vários tipos de compostos na fase interna oleosa (baixa constante dielétrica), na região interfacial (constante dielétrica intermediária entre o óleo e água) ou na fase externa aquosa (alta constante dielétrica) (Oliveira, 2003).

II. OBJETIVOS

II.1 Objetivo Geral

A proposta central deste trabalho é investigar as características fotofísicas e fotobiológicas de sistemas de veiculação nanoparticulados, onde estão associados o fármaco fotossensível ftalocianina de cloro-alumínio e sua eficiência na bioestimulação celular e da osteogênese *in vitro* através do processo fotodinâmico.

II.2 Objetivos específicos

- a) Preparar nanoemulsões com e sem a presença do fármaco fotossensível a partir da mistura de surfactantes lipofílicos e hidrofílicos;
- b) Determinar o tamanho de partícula e o potencial Zeta da nanoemulsão preparada e realizar o monitoramento da estabilidade físico-química da formulação em função do tempo;
- c) Verificar o doseamento do fármaco no sistema de liberação com a determinação de uma curva padrão de calibração por espectroscopia de fluorescência e o cálculo do rendimento experimental de associação do fármaco fotossensível à formulação;
- d) Estudo fotofísico de caracterização do estado estacionário e resolvido no tempo;
- e) Obter a cultura primária de osteoblastos a partir da extração de medula óssea de ratos;
- f) Estudar a toxicidade da nanoemulsão na presença e na ausência do fármaco fotossensível observando a resposta celular da aplicação da nanoemulsão na presença do fármaco fotossensível no processo de osteogênese.

III. PARTE EXPERIMENTAL

III.1 Materiais

Todas as soluções aquosas foram preparadas com água ultra pura, obtida através de filtragem sequencial com colunas de troca iônica em um sistema E-Pure da Barnstead D 3750, com filtragem final em membrana de 0,2 μm de diâmetro, pressão máxima de operação em 50 % psi (3,4 Kg/cm²) e resistividade de 18 m Ω .

Em estudos de caracterização da nanoemulsão foram utilizados dimetil-sulfóxido (J.T. Baker), acetonitrila grau HPLC (Sigma).

Os estudos com células envolveram culturas primárias obtidas da extração da medula óssea de ratos durante procedimento cirúrgico em doador saudável sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CEP-FOUSP). O meio de cultura em que as células foram estabelecidas foi composto por α -MEM (Gibco), suplementado com 15% de soro fetal bovino (Gibco), 50 $\mu\text{g/mL}$ de gentamicina (Gibco), 0,3 $\mu\text{g/mL}$ de fungisona (Gibco), dexametasona 10^{-7} M (Sigma), 5 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico (Gibco) e β -glicerofosfato 7 mM (Sigma). Durante todo o tempo de cultivo as células foram mantidas a 37°C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. Os meios foram trocados a cada 3 ou 4 dias . Ao final deste período as células confluentes foram liberadas das placas pelo tratamento com tripsina 0,25% (Gibco) e EDTA 1mM (ácido etilenodiamino tetra-acético, Gibco) e transferidas para placas de 24 poços (Falcon, Franklin Lakes, USA) na concentração de 2×10^4 células/poço.

A solução de soro bovino fetal foi pré-aquecida a 56°C, para inativação das enzimas. Em seguida foi estocada em frascos de 50 mL e conservados no freezer a -20°C. O soro fetal bovino apresenta em sua composição básica insulina, hormônios e vários outros fatores, indispensáveis ao crescimento celular.

Foram usados também tampão Hank's (Gibco BRL), 3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazolium (MTT, Sigma), corante azul de tripan (Gibco BRL) para os testes de viabilidade e contagem em câmara de Neubauer.

Para as medidas de proteína total foram utilizados solução de lauril sulfatos de sódio 0,1% (Sigma), solução de Lowry (Sigma), solução de reagente de fenol de Folin e Ciocalteu (Sigma). O conteúdo de proteína total, em µg/mL, em cada poço foi calculado com base em uma curva padrão, utilizando albumina bovina (Sigma).

A atividade de fosfatase alcalina (ALP) foi medida através da liberação de timolftaleína pela hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato, utilizando um kit comercial (Labtest Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brasil).

Para a dosagem do conteúdo de colágeno foram utilizados a solução de ácido acético 6 N (Acros, Pittsburgh, PA, EUA), a cloramina T (Acros) e o reagente de Ehrlich (Acros).

A formação de matriz mineralizada foi avaliada com o uso da solução fixadora de glutaraldeído 3% (Electron Microscopy Science), do tampão cacodilato de sódio 0,1 M (Electron Microscopy Science) e do vermelho de alizarina (Sigma).

Além destes materiais foram utilizados diferentes solventes orgânicos bem como outros sais inorgânicos normalmente usados em laboratório.

III.2 Equipamentos

Nos estudos espectrofotométricos foram utilizados o espectrofotômetro de absorção modelo Lambda20 da Perkin Elmer e o espectrofluorímetro Fluorog 3 da Spex, ambos com controle de temperatura e agitação magnética, usando celas de quartzo de 1 cm de caminho óptico. Para análise de proteína total, atividade de fosfatase alcalina e conteúdo de colágeno foi utilizado o espectrofotômetro CE3021 (Cecil, Cambridge, UK).

Foi utilizado um laser de diodo modelo Eagle operando em comprimento de onda fixo em 670 nm do espectro eletromagnético visível (Quantum Tech, São Carlos, Brasil). O sistema é acoplado ao sistema de fibra óptica (200 μm) para entrega da luz. Para o laser vermelho o material ativo será um emissor de diodo operando com potência de 50 a 300 mW através de uma fibra óptica, com operação contínua.

O aparelho laser utilizado apresenta todas as especificações de exigência internacional, e um ponto de calibração que garante que a dosimetria programada seja a mesma emitida pelo spot de saída do laser.

No experimento para determinação de tamanho e potencial Zeta foi utilizado um Zetasizer modelo 3000 HS_A da Malvern, ajustado na potência de 10 mW com luz laser a 633 nm, possuindo capacidade para determinação de tamanhos de partículas no intervalo de 2 nm a 3 μm .

Os trabalhos em cultura de células foram realizados em capela de fluxo laminar, modelo A152 da Veco, esterilizada com luz germicida e fluxo contínuo de ar. Foram também utilizados os seguintes aparelhos nos estudos de cultura e crescimento celular: microscópio invertido Axiovert 40 CFL da Zeiss (para análise de forma, tamanho e crescimento de cultura), centrífuga da CentriBio, autoclave modelo AB-42 da Phoenix, banhos termostatizáveis Fischer Scientific, modelo 801 e espectrofotômetro de análise de multiplaca SAFIRE II (TECAN).

Os experimentos de fotólise por pulso de laser foram realizados utilizando-se um sistema laser de Nd-YAG modelo SURELITE I-10 do Continuum. Para os agentes fotossensibilizadores estudados, foram utilizados como fonte de excitação, o terceiro harmônico do laser Nd-YAG (355 nm).

Além destes equipamentos foram utilizados: balança eletrônica Libror (modelo AEL 200), sistema vortex Genie 2, ultrason Branson (modelo 2210), pH-metro (modelo accument[®])

50 da Fisher Scientific), rotaevaporador modelo R-124 da Büchi. Para o controle da temperatura nos experimentos foram utilizados banhos termostatizáveis da PolyScience.

III.3. Métodos

III.3.1. Preparo de nanoemulsões (NE) a partir da mistura de surfactantes lipofílicos e hidrofílicos.

Protegido.

III.3.2.Caracterização físico-química

III.3.2.1 Determinação do tamanho de partícula por espalhamento dinâmico da luz

Protegido.

III.3.2.2 Determinação do potencial Zeta

Protegido.

III.3.2.3 Monitoramento da estabilidade físico-química em função do tempo

Protegido.

III.3.3. Doseamento

III.3.3.1. Determinação da curva padrão de calibração por espectroscopia de fluorescência

Protegido.

III.3.3.2. Determinação do rendimento experimental de associação do fármaco fotossensível.

Protegido.

III.3.4 Caracterização fotofísica

III.3.4.1 Determinação do espectro de absorção e emissão de fluorescência (UV-visível)

Os espectros de absorção e emissão de fluorescência do fármaco fotossensível AlClPc em nanoemulsão foram determinados em estado estacionário afim de ilustrar o perfil das bandas de absorção características no UV-visível.

Os espectros foram obtidos utilizando-se cubetas de quartzo com 1 cm de caminho óptico. Como referência foi utilizada uma solução de AlClPc em etanol espectroscópico (5,0 μM).

Para as medidas de fluorescência estabeleceu-se um protocolo com excitação em 610 nm, tempo de integração de 0,1 s, fendas de excitação e emissão de 10/10 nm, respectivamente e faixa de aquisição de 650 a 750 nm.

III.3.4.2 Determinação de rendimento quântico de fluorescência (Φ_f).

Uma solução do composto padrão (Zinco ftalocianina) em meio homogêneo foi preparada inicialmente, de modo a obter uma absorbância constante na faixa de 0,05 para ser utilizada como padrão. As soluções contendo o fármaco fotossensibilizador AlClPc também foram preparadas por diluições infinitas para se obter absorbâncias também na ordem de 0,05 evitando, assim, que o efeito de filtro interno interfira no resultado.

Os rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_f) foram obtidos através do cálculo da área do espectro de emissão de fluorescência corrigido da solução padrão.

Com base no formalismo descrito por Eaton e Demas (Demas e Crosby, 1971; Eaton, 1988) foram obtidos os valores de Φ_f , registrando-se os espectros de absorção do padrão, bem como os espectros de emissão de fluorescência corrigido, tanto para o padrão, como das soluções preparadas nos meios considerados, utilizando o método relativo. Este método relaciona o rendimento quântico de fluorescência de cada composto com o rendimento quântico de fluorescência do padrão, de acordo com a equação 1:

$$\Phi_f = (A_x/A_p) \cdot (DO_p/DO_x) \cdot (n_p^2/n_x^2) \cdot \Phi_{f(p)} \quad \text{Equação 1}$$

sendo os subscritos x e p referentes à amostra e ao padrão, respectivamente, A é a área do espectro de emissão de fluorescência corrigido, DO é a densidade óptica no comprimento de onda de excitação, n é o índice de refração do meio e Φ_f é o rendimento quântico de fluorescência.

III.3.4.4 – Estudos de fotólise por pulso de laser (*flash-fotólise*)

III.3.4.4.1 – Determinação das espécies transientes e tempos de vidas (τ_T) *triplete-triplete*

As espécies triplete geradas foram determinadas a partir da técnica de fotólise por pulso laser utilizando-se o sistema Nd-YAG modelo SURELITE I-10 da Continuum. As amostras foram preparadas de modo a garantir uma densidade óptica de no mínimo 0,3 no comprimento de onda de excitação da radiação laser (355nm).

Os valores dos tempos de vida para as espécies excitadas foram obtidos coletando-se o decaimento no máximo de absorção do transiente (480 nm) a partir de excitação com disparos do laser em uma sequência de 10 tiros na frequência fixa de 0,5 Hz a 20 mW de potência média para cada disparo.

Os decaimentos, do tipo exponencial, foram tratados diretamente no software do equipamento, sendo as constantes e os tempos de vida calculados dentro dos limites de confiabilidade estatística e do melhor ajuste exponencial para cada curva.

Todas as medidas foram realizadas empregando-se cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho, óptico sob agitação magnética.

Esses estudos fazem parte do projeto de doutorado de Fernando Lucas Primo pertencente ao mesmo grupo de pesquisa.

III.3.4.4.2 – Determinação do espectro de absorção do transiente *triplete-triplete*

O espectro da espécie transiente gerada foi realizado sendo analisada diretamente a região espectral do ultravioleta-visível (300 nm-800 nm).

As medidas foram obtidas com ajuste de frequência igual a 1 Hz, potência aproximada de 20 mW por pulso, em intervalos de 3 disparos para cada intervalo de 10 nm.

Para cada intervalo de 50 nm foram registrados os espectros de absorção do fármaco fotossensível monitorando-se uma possível fotodegradação após irradiação laser.

Os espectros foram convertidos diretamente no software de aquisição do equipamento, levando-se em consideração os valores dos canais de melhor ajuste para o decaimento no máximo de absorção do transiente (480 nm).

Todas as medidas foram realizadas em cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico e agitação magnética.

III.3.5 Estudos *in vitro*

III.3.5.1. Obtenção de osteoblastos a partir da medula óssea de ratos. Crescimento e manutenção da cultura de células.

A matriz para cultura celular de osteoblastos foi obtida inicialmente da extração da medula óssea de ratos durante procedimento cirúrgico em doador saudável, sob aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CEP-FOUSP). As células foram cultivadas em garrafas de cultura primária contendo α -MEM completo com 15% de soro fetal bovino. Durante todo o tempo de cultivo as células foram mantidas a 37°C e atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico. O meio de cultura foi trocado a cada 3 ou 4 dias. O desenvolvimento da cultura de células foi avaliado em microscópio de fase invertido (Axiovert 25, Carl Zeiss, Germany) até atingir confluência com cerca de 7 dias. Ao final deste período as células foram tripsinizadas e transferidas para placas de 24 poços (Rosa, A. L., 2002) numa concentração de 5×10^4 células/poço. Este procedimento foi desenvolvido em colaboração com o grupo do Prof. Dr. Adalberto Luiz Rosa – FORP/USP, e sob sua coordenação.

III.3.5.2. Contagem de células em câmara de Neubauer

Após atingirem a confluência, as células foram desprendidas das garrafas de cultura, centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura. Em seguida, foram colocados 100 μ L de suspensão de células e 100 μ L do corante vital azul de tripan 0,4 % em um tubo *ependorf*. A suspensão foi homogeneizada e cerca de 10 μ L foram aplicados na câmara de Neubauer. As células dentro da câmara foram então observadas em microscópio óptico (Axiovert 40CFL da Zeiss) no campo claro na objetiva com aumento de 10 X. Foram contadas apenas as células vivas (não coradas em azul).

III.3.5.3. Estudos de toxicidade na ausência de luz

As células foram transferidas para placas de 24 poços e após 6 dias foram encubadas com solução do fármaco nas concentrações de AlClPc/NE desejadas junto com meio de cultura com 3% de soro fetal bovino (a diminuição na porcentagem do soro deve-se ao fato da sua influência na absorção do fármaco pela célula). Depois de três horas de incubação a 37° C, com ausência total de luz, retirou-se a solução do fármaco, lavou-se com tampão Hank's, adicionou-se meio de cultura 15% e as células voltaram para a incubadora para que após 24 horas fosse realizado o ensaio com MTT para determinar a atividade celular (III.3.5.5.).

III.3.5.4. Estudo da resposta celular sobre o uso de ftalocianina de cloro-alumínio (AlClPc) em nanoemulsão em presença de luz (LASER).

Protegido.

III.3.5.5. Determinação da Viabilidade Celular (MTT)

Este ensaio é apropriado para se determinar espectrofotometricamente o número total de células, como função da atividade mitocondrial intacta, ou seja, células vivas.

O método do MTT é simples e confiável e produz resultados reprodutíveis. A componente chave é o corante (3[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo difenil tetrazolium) ou MTT. A dehidrogenase mitocondrial das células viáveis atuam sobre o anel tetrazolium, produzindo cristais de formazan de cor púrpura, os quais são insolúveis em solução aquosa conforme o ilustrado na figura 5. Os cristais são então dissolvidos em isopropanol acidificado. O produto obtido é monitorado espectrofotometricamente em 560 e 690 nm. Um aumento ou diminuição no número de células resulta em uma mudança concomitante na quantidade do formazan formado, indicando assim o grau de citotoxicidade (Mosmann, 1983; Vistica, 1991).

Figura 5: Metabolização do MTT para o sal Formazan pelas células viáveis.

O método do MTT de monitoramento da citotoxicidade *in vitro* é bem estabelecido para o uso com placas de poços múltiplos. Para melhores resultados, devem ser empregadas as células na sua fase logarítmica de crescimento e o número final de células não deve exceder $1,0 \times 10^6$ células/mL. Cada teste deve incluir um controle contendo meio completo na ausência do fármaco em estudo.

Inicialmente, as células (osteoblastos) foram lavadas com tampão Hank's e foram adicionados 80 μ L da solução de MTT (5 mg/ml em Hank's) em 420 μ L de meio de cultura sem soro fetal bovino. As células foram incubadas por 4h retirou-se a solução de MTT e adicionado 500 μ L de isopropanol acidificado (HCl 0,004 M) para completa solubilização do formazan formado. O teste foi finalizado, através de medidas em um espectrofotômetro de análise de multiplaca SAFIRE II (TECAN), no comprimento de onda de 560 nm, descontando-se a absorbância de fundo a 690 nm (Freshney, 1986). Este procedimento foi realizado antes e após o dano fotoinduzido avaliando-se assim o efeito fototóxico das drogas em estudos. A viabilidade celular foi expressa em porcentagem relativa às células não tratadas (controle) e fotoirradiadas.

O teste foi finalizado através de medidas espectrofotométricas basal da absorbância no comprimento de onda de 560 nm, descontando-se a absorbância de fundo a 690 nm

(Freshney, 1986). Estas medidas foram determinadas utilizando-se um leitor espectrofotométrico do tipo Safire² – Tecan (Grödig, Austria).

Os dados encontrados através do teste de MTT foram analisados utilizando-se o teste Tukey(One-Way ANOVA, com $p < 0,05$) em triplicata.

III.3.5.6. Medida de proteína total

A dosagem de proteína total foi realizada aos 7 dias após plaqueamento, na qual a célula se encontra em uma fase logarítmica de crescimento, seguindo o método de Lowry e cols. (1951) modificado.

O meio de cultura dos poços foi removido, os poços lavados três vezes com tampão Hank's aquecido a 37°C e preenchidos com 2 mL de solução de lauril sulfato de sódio 0,1% (Sigma) para que a membrana celular seja rompida. Ao final de 30 minutos, 1 mL dessa solução, de cada poço, foi transferido para tubos de ensaio devidamente identificados, misturado com 1 mL de solução de Lowry (Sigma) e deixados em repouso à temperatura ambiente por 20 minutos. Após esse período, foram adicionados a cada tubo 0,5 mL da solução de reagente de fenol de Folin e Ciocalteau (Sigma) e novamente deixados em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos, para permitir o desenvolvimento da coloração. Em seguida, a absorbância de cada tubo foi medida em um espectrofotômetro (CE3021 - Cecil, Cambridge, UK), utilizando o comprimento de onda de 680 nm. O conteúdo de proteína total, em µg/mL, em cada poço foi calculado com base em uma curva padrão, utilizando albumina bovina (Sigma).

III.3.5.7. Medida da atividade de fosfatase alcalina (ALP)

A atividade de ALP foi medida aos 7 dias após plaqueamento, na qual a célula se encontra em uma fase logarítmica de crescimento, através da liberação de timolftaleína pela

hidrólise do substrato de timolftaleína monofosfato. Amostras das mesmas soluções utilizadas para quantificar a proteína total foram ensaiadas para medir a ALP. O ensaio foi realizado utilizando um kit comercial (Labtest Diagnóstica, Belo Horizonte, MG, Brasil) e seguindo as instruções do fabricante. Para isso foram utilizados tubos de ensaio branco, padrão e testes. Em todos os tubos foram adicionados 0,05 mL de substrato e 0,5 mL de tampão. No tubo padrão foi acrescentado 0,05 mL da solução padrão. Os tubos foram mantidos a 37°C por 2 minutos. Em seguida, foi adicionado, em cada tubo teste, 0,05 mL da solução com material celular dos mesmos poços utilizados para medida da proteína total. Os tubos foram mantidos a 37°C por 10 minutos. Após esse período foi adicionado em todos os tubos (branco, padrão e testes) 2 mL do reagente de cor e em seguida a absorbância foi medida em um espectrofotômetro utilizando o comprimento de onda de 590 nm. A atividade de ALP, expressa em μmol de timoftaleína/h/mL, foi calculada a partir da medida do tubo padrão.

III.3.5.8. Conteúdo de colágeno

A dosagem do conteúdo de colágeno foi realizada aos 7 dias após plaqueamento, na qual a célula se encontra em uma fase logarítmica de crescimento favorável, seguindo o método modificado de Reddy e Enwemeka (1996).

Amostras das mesmas soluções utilizadas para quantificar a proteína total foram ensaiadas para medir o conteúdo de colágeno. Alíquotas contendo 1 mL desta solução foram liofilizadas e diluídas em 0,1 mL de ácido acético 6 N. As amostras foram então hidrolizadas em autoclave a 120 °C por 30 minutos. Após este procedimento, 0,9 mL de cloramina T foi adicionado ao hidrolizado, misturado e os tubos foram mantidos à temperatura ambiente por 25 minutos para permitir a oxidação. Após este período, 1 mL de reagente de Ehrlich (Acros) foi adicionado em todas as amostras que foram incubadas por 20 minutos a 65°C. Em seguida, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Cecil) utilizando o comprimento de

onda de 550 nm e o conteúdo de colágeno foi calculado a partir de uma curva padrão.

III.3.5.9. Formação de matriz mineralizada

A formação de matriz mineralizada foi avaliada aos 21 dias após plaqueamento, quando os nódulos de matriz mineralizada começam a se formar. O meio de cultura foi removido, os poços lavados três vezes com tampão Hank's aquecido a 37°C e preenchidos com solução fixadora de formalina 10% por 24 horas. Os poços foram, após esse período, desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico (30, 50, 70 e 96%) permanecendo no poço por uma hora cada concentração. Em seguida, os poços foram processados para a coloração com vermelho de alizarina que cora áreas de mineralização ricas em cálcio.

Imagens foram obtidas para documentação, os campos foram selecionados aleatoriamente em poços diferentes a partir de um microcópio Axiovert 40 CFL com objetiva Ph 1 10x/0,25 com câmera acoplada 7.2.

A quantificação da coloração foi avaliada por método colorimétrico de acordo com Gregory e cols. (2004). Foram adicionados 360 µL de ácido acético 10% em cada poço previamente corado com vermelho de alizarina, e a placa foi levada a agitação por 30 minutos em temperatura ambiente. O conteúdo de cada poço foi transferido para tubos tipo *ependorf*. Os tubos foram levados para a centrifuga a 20000g por 15 minutos e 100 µL do sobrenadante de cada tubo foram transferidos para novos tubos. Então 40 µL de hidróxido de amônio 10% foram adicionados para neutralizar o ácido e foi medida a absorbância desse conteúdo em comprimento de onda de 405 nm.

IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

IV.1. Determinação do tamanho de partículas e do potencial Zeta por espalhamento dinâmico de luz

Protegido.

IV.2 Monitoramento da estabilidade físico-química em função do tempo

Protegido.

4.3 Doseamento

4.3.1 – Determinação da curva padrão de calibração por espectroscopia de fluorescência e rendimento experimental de associação do fotossensibilizador

Protegido.

IV.4 – Caracterização fotofísica

IV.4.1 – Determinação do espectro de absorção e emissão de fluorescência (UV-Visível)

As ftalocianinas são fármacos fotossensíveis amplamente estudados para aplicação em Processos Fotodinâmicos de diversas modalidades de câncer e outros tipos de doenças, de forma a atuar como uma alternativa às porfirinas. Semelhantes aos compostos porfirínicos, apresentam importantes diferenças complementares, como maior estabilidade química, alta resistência a fotodegradação além de rota sintética relativamente simples. Comparando-se às porfirinas, as ftalocianinas possuem semelhante perfil espectral com absorção entre 300 e 400 nm. Em adição, possuem alta absorção na região do vermelho do espectro visível ($\epsilon \approx 10^5 \text{ l.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), ou seja, bandas bem definidas exatamente na chamada *janela terapêutica* (600 – 800 nm) (ver Figura 9), região de melhor transparência biológica (maior penetração da radiação eletromagnética pelos tecidos).

Figura 9: Espectros de absorção normalizados no UV-visível para a AlClPc: etanol espectroscópico (—) e após incorporação em NE (---).

Os espectros de absorção normalizados foram registrados para AlClPc em meio orgânico homogêneo (EtOH), e após incorporação em NE (extração com DMSO grau analítico). As medidas foram realizadas em temperatura ambiente, após agitação e 1 cm de caminho óptico. Considerando como referência o espectro de absorção em EtOH, temos um perfil praticamente inalterado para a AlClPc após incorporação em NE, com leve deslocamento para o vermelho (670 nm $\rightarrow$ 674 nm) devido a mudança na constante dielétrica do meio. Estes dados confirmam a manutenção do perfil espectral da AlClPc, conduzindo a possível potencial em processos fotodinâmicos.

Dentre as principais propriedades fotofísicas das ftalocianinas, a emissão de fluorescência está entre as mais interessantes e de maior importância para estudos e aplicação nas mais variadas áreas tecnológicas.

Os espectros de emissão de fluorescência para a AlClPc estão apresentados na Figura 10 a seguir. As bandas espectrais foram registradas a partir excitação fixa em 610 nm.

Figura 10: Espectros normalizados de emissão de fluorescência no UV-visível para a AlClPc: etanol espectroscópico (—) e encapsulada em NE (—). $\lambda_{\text{excitação}} = 610 \text{ nm}$; fendas espectrais = 10/10 nm; tempo de integração = 0,1 s.

Comparando-se com o meio orgânico, o processo de encapsulamento da ftalocianina não acarretou nenhum deslocamento significativo à suas bandas de emissão características. O ambiente coloidal conduziu a um leve espalhamento próximo a região de maior energia (660 – 670 nm) resultado do efeito da interação da luz de excitação com as nanopartículas da formulação.

Portanto, foi possível determinar o perfil de emissão de fluorescência para a AlClPc nanoencapsulada, obtendo-se com sucesso as bandas de transição com máximo na região de 680 nm.

A emissão de fluorescência leva a importantes resultados, auxiliando de forma direta na determinação de uma série de parâmetros (fotofísicos e fotoquímicos) de grande significado quando se trata de processos fotodinâmicos.

IV.4.2 – Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_f)

O rendimento quântico de fluorescência é um importante dado fotofísico, que faz parte de um conjunto de propriedades fundamentais para se elucidar o potencial fotoquímico de uma molécula. A emissão por processos radiativos, em uma molécula orgânica, é determinada pelos rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_f) e fosforescência. Então, se para cada fóton absorvido a molécula sofrer apenas um determinado processo fotofísico, a soma dos valores de rendimento quântico de todos os processos deve possuir valor unitário. Se outro processo estiver em competição com aquele em análise, o rendimento quântico será menor que a unidade.

Desta forma, o rendimento quântico é fundamental na elucidação dos diversos caminhos pelos quais uma molécula excitada dispõe de sua energia. Através dos valores do rendimento quântico de fluorescência é possível observar se uma molécula excitada foi ou não desativada por emissão de fluorescência ou por outro processo fotofísico (Primo, F. L., 2006). Os Φ_f para a AlClPc foram determinados através do método relativo conforme descrito por Eaton (1988), discutidos na seção de metodologias (III.3.4.2).

Tabela II: Rendimentos quânticos de fluorescência (Φ_F)

	Φ_f
ZnPc/EtOH*	0,28
AlClPc/DMSO [§]	0,35
AlClPc/NE	0,40

*padrão (Oliveira, D. M., 2006); [§]referência (Idowu e Nyokong, 2007).

Os valores obtidos experimentalmente estão apresentados na Tabela II. Os rendimentos quânticos obtidos foram determinados relativamente a ZnPc em EtOH espectroscópico (Oliveira, D. M., 2006). A incorporação da AlClPc em NE resultou em um aumento de 14,3% no rendimento quântico indicando um possível favorecimento das transições *singlete-singlete* para o fármaco encapsulado. Este aumento pode ser resultado de uma melhor estabilização em ambiente químico favorável a relaxação por processo radioativo. Além disso, podemos considerar também a alta afinidade pelo ambiente lipofílico (núcleo oleoso das partículas coloidais), uma vez que o fármaco fotossensível é altamente hidrofóbico. A polaridade do meio é um fator limitante que pode afetar diretamente vários parâmetros fotofísicos. Entretanto, este aumento no rendimento quântico de fluorescência pode não afetar diretamente os mecanismos de cruzamento intersistemas, responsáveis pela formação dos estados eletrônicos excitados *triplete*.

4.2.4 – Determinação das espécies transientes e tempos de vidas *triplete-triplete* (τ_T)

O estudo das espécies triplete excitadas é fundamental para se compreender, e ao mesmo tempo comprovar, o comportamento fotofísico dos fármacos utilizados nos processos fotodinâmicos. Sabe-se que os mecanismos de fotossensibilização estão diretamente relacionados com a formação destas espécies excitadas, conforme mostra o diagrama de Perrin-Jablonski (Figura 11) (Primo, F. L., 2006).

Figura 11 - Diagrama de Perrin-Jablonski e ilustração das posições espectrais relativas de absorção, fluorescência e fosforescência. S_0 = estado fundamental singlete, S_n = estado excitado singlete, T_1 = estado excitado tripleto, ISC = cruzamento intersistemas, IC = conversão interna (processo não radioativo), Φ_F = rendimento quântico fluorescência, Φ_T = rendimento quântico de formação de estado tripleto, Φ_Δ = rendimento quântico de produção de oxigênio singlete (Tipo II) (Primo, F. L., 2006).

Utilizando-se a técnica de fotólise por pulso de laser pode-se induzir a formação de espécies tripleto obtidas a partir da absorção de energia necessária para se atingir o cruzamento intersistemas ($S_n \rightarrow T_1$). Os transientes formados foram investigados determinando-se uma cinética de decaimento que permite calcular o tempo de vida para estas espécies excitadas (T_1, T_n).

As análises foram realizadas empregando-se a técnica de fotólise por pulso de laser, empregando-se um sistema laser Nd-YAG como descrito na seção de metodologias (3.3.4.4).

Todas as amostras foram preparadas de forma a possuir absorbância mínima de 0,3 no comprimento de onda de excitação (355 nm), em cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico, sob agitação magnética e degaseadas por 30 minutos com $N_{2(g)}$. Como referência para a determinação, utilizou-se novamente uma amostra do próprio fármaco fotossensível em EtOH.

Os tempos de vida triplete foram determinados para cada ajuste exponencial, a partir da relação entre a absorbância do transiente em função do tempo. Primeiramente determinou-se uma cinética para a transição eletrônica, o que permitem calcular diretamente o tempo de vida das espécies pela relação inversa de proporcionalidade. Os dados estão apresentados na Tabela III a seguir.

Tabela III: Tempos de vida triplete obtidos por *flash-fotólise* laser.

	τ_T (ns)
AlClPc/EtOH	450
AlClPc/NE	300

Estes resultados demonstram a formação dos estados excitados triplete para ambos os casos. Comparando-se com a referência em meio orgânico, pode-se afirmar que a incorporação da AlClPc em nanoemulsão interferiu na formação desta espécie resultado do cruzamento intersistemas (Figura 11). O tempo de vida para a amostra de AlClPc apresentou uma diminuição, comparando-se com meio orgânico homogêneo, resultado do efeito do sistema heterogêneo polimérico e do encapsulamento do fármaco fotossensível em nanoemulsão ou do próprio espalhamento característico ao sistema coloidal. Entretanto, os

tempos de vida encontrados estão na mesma escala temporal (ns), confirmando a cinética de formação desta espécie no ambiente químico em estudo.

Estudos posteriores para determinação do rendimento quântico de triplete-triplete (Φ_T), bem como produção de oxigênio singlete (Φ_Δ) detalharão melhor a influência do nanoencapsulamento nestas propriedades fotofísicas desta ftalocianina.

A formação destes transientes é um fator limitante dentro dos processos de fotossensibilização em Terapia Fotodinâmica (Foote, 1991), pois estão diretamente relacionados com os mecanismos de transferência de energia via reações do tipo I ou II (interação direta com substrato celular e via EROS respectivamente).

Portanto, a técnica de fotólise laser permitiu verificar a existência dos transientes, direcionando ainda mais a aplicação desta ftalocianina, nanoencapsulada, como composto ativo em processos fotodinâmicos.

4.2.5 – Determinação do espectro de absorção do transiente triplete-triplete

Detectaram-se os espectros de absorção do transiente a partir de fotólise por pulso laser, utilizando-se o mesmo sistema laser Nd-YAG descrito anteriormente, ajustado para o terceiro harmônico em 355 nm.

As medidas foram realizadas registrando-se o espectro do transiente de 300 a 800 nm, com 3 disparos para cada intervalo de 10 nm.

Foram analisadas as amostras de AlClPc/EtOH e AlClPc/NE, como mostra a Figura 12.

Figura 12: Espectro de absorção do transiente triplete no UV-visível para a AlClPc em nanoemulsão.

A Figura 12 mostra o espectro de absorção do transiente triplete para a AlClPc em nanoemulsão. O máximo de absorção foi registrado em 490 nm, com regiões de fotobranqueamento entre 320 e 370 nm e 630 e 740 nm respectivamente.

Estas regiões de absorbância negativa se sobrepõem exatamente com as bandas de absorção no estado fundamental (Figura 9), fato este esperado uma vez que a presença de ambos estados energéticos ocorrem simultaneamente.

A partir destes resultados, pode-se afirmar com precisão a formação dos transientes triplete para o fármaco incorporado a nanoemulsão. Estas informações são fundamentais para se afirmar que a associação ao nanocarreador não ocasionou mudanças consideráveis ao potencial fotofísico no uv-vísível para a ftalocianina.

IV.5 Estudos *in vitro*

IV.5.1. Crescimento e manutenção da cultura de células.

Quando se trabalha com culturas de células, devem-se seguir procedimentos especiais, a fim de assegurar um crescimento fisiológico sadio da cultura de células, além da reprodutibilidade dos resultados experimentais. A metodologia de cultivo das linhagens celulares segue basicamente alguns tópicos como: escolha do local de trabalho adequado, técnicas assépticas para crescimento e manutenção de cultura, assepsia de materiais, controle bacteriológico de reagentes e meio de cultura.

Embora existam diferentes tipos de cultura celular, em geral todas apresentam uma fase logarítmica ou fase de crescimento. Esta representa a parte mais importante da cultura, onde usualmente encontra-se uma porcentagem de viabilidade celular em torno de 90 a 100% e as células se apresentam confluentes (condição onde a cultura celular está totalmente distribuída na superfície do frasco de cultura).

A fase de confluência é sem dúvida a melhor fase para execução dos estudos em sistemas celulares, uma vez que a cultura encontra-se em plena atividade metabólica com número máximo de células saudáveis.

A periodicidade que a cultura deve ser alimentada ou o tempo ideal para troca de meio de cultura é determinada por fatores como:

- 1) Variações bruscas no pH do meio, detectados visualmente pela mudança na cor do indicador presente no meio de cultura;
- 2) Altas concentrações celulares (observadas através do microscópio inverso), caracterizado por aglomeração celular;

As culturas celulares envolvidas neste trabalho foram cultivadas em incubadora, termostatizada à 37 °C, aerada continuamente com 5,0 % de CO₂, controlando-se sempre o volume, profundidade e superfície de área ocupado pela cultura nos respectivos frascos.

Figura 13: Cultura de osteoblastos. Micrografias registradas a partir de um microcópio Axiovert 40 CFL com objetiva Ph 1 10x/0,25 com câmera acoplada 7.2

IV.5.2. Estudos de toxicidade na ausência de luz

Os experimentos com cultura de células foram iniciados com a avaliação da toxicidade do fármaco AICIPc/NE sobre o meio biológico, representado por células de osteoblastos extraídas de ratos, na ausência de radiação. Para este objetivo, foram analisadas quatro diferentes concentrações (0,5, 1, 3 e 5 μ M) do fotossensibilizador, além da nanoemulsão vazia, que nos fornece a toxicidade da formulação nas células (III.3.5.3.). Estes estudos foram realizados empregando-se o teste de viabilidade celular MTT, análise da proteína total e atividade da fosfatase alcalina como descrito anteriormente nos itens III.3.5.5., III.3.5.6 e III.3.5.7.

Os resultados dos estudos *in vitro* utilizando os osteoblastos como um modelo biológico e o fármaco em nanoemulsão estão descritos nos gráficos da Figura 14 e na Tabela IV.

Figura 14: Ensaio *in vitro* de toxicidade da AICIPc/NE em cultura de osteoblastos. Teste na ausência de luz após 3 horas de incubação com as concentrações de AICIPc/NE estudadas. No teste de viabilidade celular temos a porcentagem de osteoblastos vivos. No teste de análise da proteína total a dosagem foi feita em $\mu\text{g}/10^4$ células. E no teste da atividade de fosfatase alcalina foi quantificada por μg timolftaleína/ h/ mL. Onde **ct** corresponde ao controle, **vz** corresponde à nanoemulsão sem a presença dos compostos em estudo, **0,5 μM , 1,0 μM , 3,0 μM e 5,0 μM** correspondem as concentrações de AICIPc/NE. Significância estatística das diferenças entre as concentrações foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido do pós-teste Tukey t-test para múltiplas comparações. Os resultados obtidos representam as médias $\pm$ SEM (n=3). Valores de P * $p < 0.001$ com relação ao controle.

Tabela IV: Ensaio *in vitro* de toxicidade da AlClPc/NE em cultura de osteoblastos. Teste na ausência de luz após 3 horas de incubação com as concentrações de AlClPc/NE estudadas.

	Controle	NE vazia	0,5 μM	1,0 μM	3,0 μM	5,0 μM
Viabilidade celular (%)	100	99,9	100,6	96,6	98,1	38,4
Proteína Total ($\mu\text{g}/10^4$ células)	21,1	20,9	20,4	19,9	19,6	15,0
ALP (μg timolftaleína/ h/ mL)	13,0	13,8	13,4	12,4	6,4	4,9

No estudo com concentração igual a 5,0 μM de AlClPc/NE houve um resultado de toxicidade no escuro significativo, porém nas demais concentrações a porcentagem de células viáveis não se altera muito. A partir desses dados foram realizados os demais estudos utilizando a concentração de AlClPc/NE igual a 0,5 μM . Nessa concentração não há possibilidade de interferência da citotoxicidade nos estudos com luz.

IV.5.2. Estudos de resposta celular sobre o uso da ftalocianina de cloro-alumínio (AlClPc) em nanoemulsão em cultura celular na presença de luz (LASER).

Protegido.

IV.5.3. Formação dos nódulos de matriz mineralizada.

Protegido.

V. CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo principal investigar as características fotofísicas e fotobiológicas de sistemas de veiculação nanoparticulados, nas quais estão associados o fármaco fotossensível ftalocianina de cloro-alumínio e sua eficiência na bioestimulação celular *in vitro* através do processo fotodinâmico.

Os resultados obtidos e nos permitem concluir que as nanoemulsões preparadas apresentam tamanho nanométrico como era esperado, assim como, o potencial zeta medido nestes sistemas de liberação indica uma boa estabilidade das formulações desenvolvidas. O monitoramento da estabilidade da formulação confirmou a alta estabilidade em período de 80 dias e o doseamento esclareceu a concentração real de 43,5 $\mu\text{mol/L}$ do fármaco fotossensível no sistema de liberação.

Os estudos espectroscópicos no estado estacionário permitiram determinar as bandas de absorção e emissão de fluorescência para a ftalocianina em nanoemulsão, confirmando a manutenção destas importantes propriedades fotofísicas.

O rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) da AlClPc em etanol e em nanoemulsão resultou em um aumento no rendimento quântico indicando um possível favorecimento das transições *singlete-singlete* para o fármaco encapsulado. Entretanto, este aumento pode não afetar diretamente os mecanismos de cruzamento intersistemas, responsáveis pela formação dos estados eletrônicos excitados *triplete*.

Os testes de viabilidade do meio biológico mostram uma alta biocompatibilidade da formulação na ausência de luz. Nos testes com presença de luz obtiveram-se resultados de inviabilidade celular com dosagem de 3,0 J/cm^2 . Em dosagem de 1,0 J/cm^2 a resposta celular não foi significativa pelo tratamento estatístico, porém foi observado um aumento na viabilidade celular na dosagem de 0,5 J/cm^2 levando a conclusão que baixas dosagens de irradiação combinada ao uso de um fármaco fotossensibilizador promove a bioestimulação

celular de osteoblastos, diferentemente dos tratamentos feitos com a Terapia Fotodinâmica onde são usadas altas dosagens de luz promovendo a morte celular. Assim pode-se concluir também que os tratamentos de Bioestimulação e Terapia Fotodinâmica, embora tenham resultados opostos, só se diferem na dosagem de luz utilizada.

VI. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abergel, R. P.; Lam, T. S.; Lask, G.; Dwyer, R. M.; Castel, J. C.; Uitto, J. Biological effects of laser, *Investigate Clinical Laser*, v. 3, p. 7-14, 1986.
- Albrektsson, T.; Wennerberg, A. Oral implant surfaces: part 1 - review focusing on topografic and chemical properties of different surfaces and in vivo responses to them., *International Journal of Prosthodontics*, v. 17, p. 536-543, 2004.
- Antikas, T. Effets du rayon laser á faible énergie sur les macrophages em model in vitro. In: 3th International Congress Lasertherapy. Brusela-B: 1987.p.
- Aubin, J. E. Advances in the osteoblast lineage., *Biochemistry Cell Biology*, v. 76, p. 889-910, 1998.
- Barushka, O.; Yaakobi, T.; Oron, U. Effect of low-energy laser (He-Ne) irradiation on the process of bone repair in the rat tibia, *Bone*, v. 16, p. 47-55, 1995.
- Bellnier, D.; Grecco, W.; Loewen, G. Population pharmacokinetics of the photodynamic therapy agent 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a in cancer patients, *Cancer Research*, v. 63, p. 1806-1813, 2003.
- Boyan, B. D.; Batzer, R.; Kieswetter, K.; Liu, Y.; Cochran, D. L.; Szmuckler-Moncler, S.; Dean, D. D.; Schwartz, Z. Titanium surface roughness alters responsiveness of MG63 osteoblast-like cells to 1 α ,25-(OH)₂D₃, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 39, p. 77-85, 1998.
- Brånemark, P. I. Osseintegration and its experimental background., *The Journal of Prosthetic Dentistry*, v. 50, p. 399-410, 1983.
- Brånemark, P. I.; Breine, U.; Adell, R.; Hansson, B. O.; Lindström, J.; Ohlsson, A. Intra-osseous anchorage of dental prostheses, *Scandinavian Journal of Plastic and Reconstructive Surgery and Hand Surgery*, v. 3, p. 81-100, 1969.

- Chaleix, V.; Sol, V.; Huang, Y. *RGD-porphyrin conjugates: Synthesis and potential application in photodynamic therapy*, *European Journal of Organic Chemistry*, v. 8, p. 1486-1493, 2003.
- Coll, J. *La terapia Láser, hoy*. 3^a edição, Editora CDL, 1987,
- Conlan, M. J.; Rapley, J. W.; Cobb, C. M. Biostimulation of wound healing by low-energy laser irradiation, *Journal of Clinical Periodontology*, v. 23, p. 492-496, 1996.
- Convissar, R. A.; Goldstein, E. E. *A combined carbon dioxide/erbium laser for soft and hard tissue procedures*, *Dentist Today*, v. 20, p. 66-71, 2001.
- Cseh, G. Y.; Szabo, J.; Görög, P.; Mester, E. Changes in prostaglandine content in wounds and after laser treatment, *Kiserleles Orvostudomány*, v. 30, p. 37, 1978.
- Demas, J.; Crosby, G. *Measurement of Photoluminescence Quantum Yields. A Review*, *The Journal of Physical Chemistry*, v. 75, p. 991-1113, 1971.
- Dortbudak, O.; Haas, R.; Mallath-Pokorny, G. *Biostimulation of bone marrow cells with a diode soft laser*, *Clinical Oral Implants Research*, v. 11, p. 540-545, 2000.
- Dougherty, T. J.; Gomer, C.; Andreson, B.; Jori, G.; Kessel, D.; Korbelik, J.; Peng, Q. *Photodynamic Therapy*, *Journal of the National Cancer Institute*, v. 90, p. 889-905, 1998.
- Eaton, D. F. Reference Materials for Fluorescence Measurement, *International Union of Pure and Applied Chemistry*, v. 60, p. 1107-1114, 1988.
- Fennyö, M. Theoretic and experimental basis of biostimulation by laser irradiation, *Optics Laser Technology*, v. 8, p. 209, 1984.
- Filiaggi, M. J.; Coombs, N. A.; Pilliar, R. M. Characterization of the interface in plasma-sprayed HA coating/ Ti-6Al-4V implant system, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 25, p. 1211-1229, 1991.

- Fini, M.; Cigada, A.; Rondelli, G.; Chiesa, R.; Giardino, R.; Giavaresi, G.; Aldini, N. N.; Torricelli, P.; Vicentini, B. In vitro and in vivo behavior of Ca- and P-enriched anodized titanium, *Biomaterials*, v. 20, p. 1587-1594, 1999.
- Florence, A. T.; Attwood, D. *Princípios Físico-Químicos em Farmácia*. 3ª edição, São Paulo: Edusp - Editora da Universidade de São Paulo, ed.Rothschild,2003,
- Foote, C. *Definition of type I and II photosensitized oxidation, Journal of Photochemistry and Photobiology*, v. 54, p. 66-69, 1991.
- Fork, R. L. Laser stimulation of nerve cells in Aplysia, *Science*, v. 171, p. 907-908, 1971.
- Freshney, R. *Animal Cell Culture-A Practical Approach*. London : IRC Press,1986,
- Gamelaya, N. F. Laser biomedical research in the U.S.S.R. In: WOLBARSHT, M. *Laser Applications in Medicine and Biology*. New York: Plenum, 1977. v.3, 1p.
- Genovese, W. J. *Laser de Baixa Intensidade: Aplicações Terapêuticas em Odontologia*. São Paulo: Lovise,2000,175p.
- Gillies, R.; Kollias, N.; Hasan, T.; Diddens, H. *Spectral characterization of the benzoporphyrin derivative monoacid ring-A photoproduct formed in fetal calf solutions during irradiation with 694 nm continuous-wave radiation , Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 33, p. 87-90, 1996.
- Girotti, A. W. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects and protective mechanisms, *Journal of Photochemistry and Phtobiology B: Biology*, v. 63, p. 103-113, 2001.
- Gray, H. *As Bases da Física do Laser de Dióxido de Carbono e Interação Tecidual*. In: *Rejuvenescimento Facial a Laser*. Rio de Janeiro: Revinter, 1998.cap.1, 1p.
- Halcin, C. H.; Uitto, J. *Biologic Effects of Low-Energy Lasers*. In: *Lasers in Cutaneous and Aesthetic Surgery*. Philadelphia: Lippincott- Raven, 1997.cap.15, 303p.

- Harris, D. M. Laser biostimulation, review and hypothesis, *Laser Topics.*, v. 1, p. 9-19, 1988.
- Henderson, A. R. *A Guide to Laser Safety*. London: Chapman & Hall, 1997, 63p.
- Hoebeke, M. *The importance of liposomes as models and tools in the understanding of photosensitization mechanisms*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 28, p. 189-196, 1995.
- Hoshino, T.; Muranishi, H.; Saito, K.; Notoya, K.; Makino, H.; Nagai, H.; Sohda, T.; Ogawa, Y. Enhancement of fracture repair in rats with streptozotocin-induced diabetes by a single injection of biodegradable microcapsules containing a bone formation stimulant, TAK-778, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 51, p. 299-306, 2000.
- Hubacek, J. Changes of the Phagocytic activity of neutrophil leucocytes after irradiation with and HeNe Laser" 34 (3), pp:141-146., *Cs. Otolaryng*, v. 34, p. 141-146, 1985.
- Idowu, M.; Nyokong, T. Photophysical and photochemical properties of zinc and aluminum phthalocyanines in the presence of magnetic fluid, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 188, p. 200-206, 2007.
- Irie, K.; Zalzal, S.; Ozawa, H.; Mckee, M. D.; Nanci, A. Morphological and immunocytochemical characterization of primary osteogenic cell cultures derived from fetal rat cranial tissue, *Anatomical Record*, v. 252, p. 554-567, 1998.
- Jarcho, M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics, *Clinical Orthopedics and Related Research*, v. 157, p. 259-278, 1981.
- Jori, G. *Photodynamic therapy: basic principles and clinical applications*. New York: Marcel Dekker, 1992, 173p.
- Karu, T. *Photobiochemistry of the regulation of cellular metabolism with low intensity visible light I*. SRCTL, 1985a, 7, 1p.

- Karu, T. *Photobiochemistry of the regulation of cellular metabolism with low intensity visible light II*. SRCTL,1985b,8, 1p.
- Karu, T.; Pyatibrat, L.; Kalendo, G. *Irradiation with He-Ne laser increases ATP level in cells cultivated in vitro*, *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v. 27, p. 219-223, 1995.
- Karu, T. I. Molecular mechanisms of therapeutic effects of lowintensity laser irradiation, *Laser Life Science*, v. 2, p. 53-74, 1988.
- Karu, T. I. *The Science of Low Power Laser Therapy*. London: Gordon and Breach Science Publish,1998,
- Karu, T. I.; Tiphlova, O.; Esenaliev, R.; Letokhov, V. Two different mechanisms of low-intensity laser photobiological effects, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 24, p. 155-161, 1994.
- Kieswetter, K.; Schwartz, Z.; Hummert, T. W.; Cochran, D. L.; Simpson, J.; Dean, D. D.; Boyan, B. D. Surface roughness modulates the local production of growth factors and cytokines by osteoblast-like MG-63 cells, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 32, p. 55-63, 1996.
- Kim, H. M.; Miyaji, F.; Kokubo, T.; Nakamura, T. Preparation of bioactive Ti and its alloys via simple chemical surface treatment, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 32, p. 409-417, 1996.
- Kipshidze, N.; Nikolaychik, V.; Keelan, M. H.; Shankar, L. R.; Khanna, A.; Kornowski, R.; Leon, M.; Moses, J. Low-Power Helium:Neon Laser Irradiation Enhances Production of Vascular Endothelial Growth Factor and Promotes Growth of Endothelial Cells *in vitro.*, *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 28, p. 355-364, 2001.

- Kolarova, H.; Nevrelouva, P.; Bajgar, R.; Jirova, D.; Kejlova, K.; Strnad, M. In vitro photodynamic therapy on melanoma cell lines with phthalocyanine, *Toxicology in Vitro*, v. 21, p. 249-253, 2007.
- Kujawa, J.; Zavodnik, L.; Zavodnik, I.; Buko, V.; Lapshyna, A.; Bryszewska, M. Effect of low-intensity (3.75-25 J/cm²) near-infrared (810 nm) laser radiation on red blood cell ATPase activities and membrane structure, *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery*, v. 22, p. 111-117, 2004.
- Lacefield, W. R. *Hydroxypatite coating*, *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 523, p. 72-80, 1988.
- Lievens, P. C. The effect of IR laser irradiation on the vasomotricity of the lymphatic system, *Laser of Medicine Science*, v. 6, p. 189-191, 1991.
- Lopes A. L. Análise *in vitro* da Proliferação celular de fibroblastos de Gengiva Humana tratados com laser de Baixa Potência. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica) .13 f. Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 1999.
- Low, J.; Reed, A. *Eletroterapia Explicada- Princípios e Práticas*. 3^a edição, São Paulo: Manole, 2001, 17p.
- Lunardi, C. N.; Tedesco, A. C. *Synergic photosensitizers: a new trend in photodynamic therapy*, *Current Organic Chemistry*, v. 9, p. 813-821, 2005.
- Maftoun-Costa, M.; Naves, K. T.; Oliveira, A. L.; Tedesco, A. C.; da Silva, N. S.; Pacheco-Soares, C. Mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filament behavior after PDT with chloroaluminum phthalocyanine liposomal in HeLa cells, *Cell Biology International*, v. 32, p. 1024-1028, 2008.
- Marti, C.; Nonell, S.; Nicolau, M.; Torres, T. Photophysical properties of neutral and cationic tetrapyrrolineporphyrans, *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v. 71, p. 53-59, 2000.

- Martin, J. Y.; Schwartz, Z.; Hummert, T. W.; Schraub, D. M.; Simpson, J.; Lankford Júnior, J.; Dean, D. D.; Cochran, D. L.; Boyan, B. D. Effect of titanium surface roughness on proliferation, differentiation and protein synthesis of human osteoblast-like cells (MG63), *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 29, p. 389-401, 1995.
- Mello, J. B.; Mello, G. P. S. *Laser em Odontologia*. São Paulo: Santos, 2001, 3p.
- Mester, E. *Mester's Method of laser biostimulation. Proceeding 7th International Congress Optoelectronic in Med Berlin - D.* Springer-Verlang: Waidelinch, 1983, 103p.
- Mester, E. The biomedical effects of laser application., *Laser Surgery Medical*, v. 5, p. 31-39, 1985.
- Miró, L.; Coupe, M.; Charras, C.; Jambon, C.; Chevalier, J. M. Estudio capiloroscópio de la acción de un láser de AsGa sobre la microcirculación, *Investigate Clinical Laser*, v. 1, p. 9-14, 1984.
- Miserendino, L. J.; Levy, G.; Miserendino, C. A. *Laser Interaction with Biologic Tissue*. In: Lasers in Dentistry. Chicago: Quintessence books, 1995. cap.3, 39p.
- Morra, M.; Cassinelli, C.; Cascardo, G.; Cahalan, P.; Cahalan, L.; Fini, M.; Giardino, R. Surface engineering of titanium by collagen immobilization. Surface characterization and in vitro and in vivo studies., *Biomaterials*, v. 24, p. 4639-4654, 2003.
- Mosmann, T. *Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays*, *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55-63, 1983.
- Nishio, K.; Neo, M.; Aniyama, H.; Nishigushi, S.; Kim, H. M.; Kokubo, T.; Nakamura, T. The effect of alkali and heat-treated titanium and apatite-formed titanium on osteoblastic differentiation of bone marrow cells, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 52, p. 652-661, 2000.

- Oliveira, D. M. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistemas de liberação de fármacos, *Quimica Nova*, v. 27, p. 131-138, 2003.
- Oliveira D. M. *Estudos Sinérgicos de fármacos fotossensibilizadores utilizados na Terapia Fotodinâmica e fluidos magnéticos utilizados em Hipertermia celular*. 162 f. Tese de Doutorado -, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto - SP, 2006.
- Oularamara, A. Biological activity measurements on botanical specimen surfaces using temporal decorrelation effect of laser speckle, *Journal Modern Optics*, v. 36, p. 165, 1989.
- Ozawa, Y.; Shimizu, N.; Kariya, G.; Abiko, Y. *Low-energy laser irradiation stimulates bone nodule formation at early stages of cell culture in rat calvarial cells*, *Bone*, v. 22, p. 347-354, 1998.
- Passarella, S.; Casamassima, E.; Molinari, S.; Pastore, D.; Quagliariello, E.; Catalano, I. M.; Cingolani, A. Increase of proton electrochemical potential and ATP synthesis in rat liver mitochondria irradiated in vitro by Helium-Neon laser, *Febs letters*, v. 175, p. 95-99, 1984.
- Pelisson, M.; Tomé, F.; Junior, M.; Simioni, A. R.; Tedesco, A. C. *Syntheses and photochemical properties of one tribenzonaphtho-condensed porphyrinato zinc complex*, *Journal Porphyrin and Phtalocyanine*, 2004.
- Pinheiro, A. L. B. *Evolução Histórica e Classificação dos Lasers*. In: Lasers na Odontologia Moderna. São Paulo: Pancast, 1998. 19p.
- Pöntinen, P. *Low level laser therapy as a medical treatment modality*. Tampere - Finland: Editora Art Urpo Ltd, 1992,
- Primo F. L. *Estudos fotofísicos e in vitro em modelo animal do fármaco fotossensibilizador incorporado em nanoemulsão: avaliação como sistema de liberação em Terapia Fotodinâmica do câncer de pele*. 126 f. Dissertação de Mestrado -, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, Ribeirão Preto - SP, 2006.

- Puleo, D. A.; Nanci, A. Understanding and controlling the bone implant interface, *Biomaterials*, v. 20, p. 2311-2321, 1999.
- Reddy, G. K.; Enwemeka, C. S. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues, *Journal Cell Biochemistry*, v. 29, p. 225-229, 1996.
- Redey, S. A.; Nardin, M.; Bernache-Assolant, D.; Rey, C.; Delannoy, P.; Sedel, L.; Marie, P. J. Behavior of human osteoblast cells on stoichiometric hydroxyapatite and type A carbonate apatite: role of surface energy, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 50, p. 353-364, 2000.
- Ricci R. Biomodulação em células endoteliais com dosimetrias diferentes do laser de baixa potência arsenito de Índio galio. Dissertação (Mestrado em Engenharia Biomédica). 30 f. Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2003.
- Rigau i Mas J. *Acción de la Luz Láser a Baja Intensidad en la Modulación de la Función Celular.*, Universitat Rovira i Virgili, 1996.
- Rigau i Mas, J. *Bioenergia e Propriedades Ópticas dos Tecidos*. In: Lasers na Odontologia Moderna. São Paulo: Pancast, 1998.cap.4, 63p.
- Roberts, W. G. *In vitro characterization of monoaspartyl chlorin e6 and diaspartyl chlorin e6 for photodynamic therapy*, *Journal of National Cancer Institute*, v. 80, p. 330-336, 1988.
- Rodrigo, P.; Zaragoza, J. R. Efectos de la irradiación laser sobre el tiroides. Estudio experimental em ratas blancas, *Investigate Clinical Laser* 2, p. 7-10, 1985.
- Rosa A. L. *Avaliação da biocompatibilidade do titânio (cpTi e Ti6Al14V) com diferentes texturas de superfície utilizando cultura de osteoblastos*. 67 f. Universidade de São Paulo, 2002.
- Rosa, A. L.; Beloti, M. M. Rat bone marrow cell response to titanium and titanium alloy with different surface roughness, *Clinical Oral Implants Research*, v. 14, p. 43-48, 2003.

- Rosa, A. L.; Shareef, M. Y.; Van Noort, R. Efeito das condições de preparação e sinterização sobre a porosidade da hidroxiapatita, *Brazilian Oral Research*, v. 14, p. 273-277, 2000.
- Rosenshein, J. S. *Laser Biostimulation: Photobioactivation, a Modulation of Biologic Processes by Low-Intensity Laser Radiation*. In: *Lasers in Maxillofacial Surgery and Dentistry*. New York: Thieme, 1997. 137p.
- Rotta, J.; Lunardi, C.; Tedesco, A. C. *Synthesis, Photophysical and Photochemical for Photodynamic Therapy*, *Current Organic Chemistry*, v. 7, p. 187-196, 2003.
- Sandrini, E.; Chiesa, R.; Rondelli, G.; Santin, M.; Cigada, A. A novel biomimetic treatment for an improved osteointegration of titanium, *Journal of Applied Biomaterials & Biomechanics*, v. 1, p. 33-42, 2003.
- Satsangi, A.; Satsangi, N.; Glover, R.; Satsangi, R. K.; Ong, J. L. Osteoblast response to phospholipid modified titanium surface, *Biomaterials*, v. 24, p. 4585-4589, 2003.
- Schindl, A.; Schindl, M.; Pernerstorfer-Scho'n, H.; Schindl, L. Lowintensity laser therapy: a review, *Journal Investigate Medicine*, v. 48, p. 312-326, 2000.
- Schwartz, Z.; Boyan, B. D. *Underlying mechanisms at the bone-biomaterial interface*, *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 56, p. 340-347, 1994.
- Schwartz, Z.; Kieswetter, K.; Dean, D. D.; Boyan, B. D. Underlying mechanisms at the bone surface interface during regeneration, *Journal of Periodontal Research*, v. 32, p. 166-171, 1997.
- Smith-Agreda, V.; Ferres, E.; Montesino, M.; Smith-Ferres, E.; Perez, J.; Zabaleta, M. Alteraciones de la ciclosis celular adeno-hipofisaria tras la estimulación con laser He/Ne e IR., *Investigate Clinical Laser III*, v. 3, p. 99-105, 1986.

- Spikes, J.; Bommer, J. *Photosensitizing properties of mono-L-aspartyl chlorin e6 (NPe6): a candidate sensitizer for the photodynamic therapy of tumors*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 17, p. 135-143, 1993.
- Strauss, R. A. *Lasers in oral and maxillofacial surgery*, *Dental clinics of North America*, v. 44, p. 851-873, 2000.
- Tabosa do Egito, Yu. W. A novel approach to the preparation of injectable emulsions by spontaneous process, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 89, p. 139-146, 1993.
- Tapajós, E. C. C.; Longo, J. P.; Simioni, A. R.; Lacava, Z. G. M.; Santos, M. F. M. A.; Morais, P. C.; Tedesco, A. C.; Azevedo, R. B. In vitro photodynamic therapy on human oral keratinocytes using chloroaluminum-phthalocyanine, *Oral Oncology*, v. 44, p. 1073-1079, 2008.
- Tisdell, C. L.; Goldberg, V. M.; Parr, J. A.; Bensusan, J. S.; Staikoff, L. S.; Stevenson, S. The influence of a hydroxyapatite and tricalcium-phosphate coating on bone growth into titanium fiber-metal implants, *The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume*, v. 76, p. 139-171, 1994.
- Trelles, M. A.; Mayayo, E. Bone fracture consolidates faster with low power laser, *Lasers in Surgery and Medicine*, v. 7, p. 36-45, 1987.
- Velez, M.; Coll, J. Comportamiento de la luz en la interacción con los tejidos, en especial el láser de baja potencia, *CDL*, v. 15-16, p. 6-21, 1988.
- Vistica, D. *Tetrazolium-based assays for cellular viability: A critical examination of selected parameters affecting formazan production*, *Cancer Research*, v. 51, p. 2515-2520, 1991.
- Wennerberg, A.; Hallgren, C.; Johansson, C.; Danelli, S. A histomorphometric evaluation of screw-shaped implants each prepared with two surface roughnesses, *Clinical Oral Implants Research*, v. 9, p. 11-19, 1998.

- Wilden, L.; Kartheim, R. *Import of Radiation Phenomena of Electrons and Therapeutic Low-Level Laser in Regard to the Mitochondrial energy Transfer*, *Journal of Clinical Laser Medicine and Surgery*, v. 16, p. 159-165, 1998.
- Williams, D. F. *Titanium as a metal for implantation. II. Biological properties and clinical applications*, *Journal of Medical Engineering & Technology*, v. 1, p. 266-270, 1977a.
- Williams, D. F. *Titanium as a metal for implantation. I. Physical properties*, *Journal of Medical Engineering & Technology*, v. 6, p. 202-203, 1977b.
- Wilson, P. *Photosensitizing Compounds: their Chemistry, Biology and Clinical Use*, Wiley Interscience: Chichester, p. 73, 1989.
- Wohrle, D.; Muller, S.; Shopova, M.; Mantareva, G.; Vietri, F.; Ricchelli, F.; Jori, G. *Effect of delivery system on the pharmacokinetic and phototherapeutic properties of bis(methoxyethylenecoxy)silicon-phthalocyanine in tumor-bearing mice*, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 50, p. 124-128, 1999.
- Xavier, S. P.; Carvalho, P. S. P.; Beloti, M. M.; Rosa, A. L. *Response of rat bone marrow cells to commercially pure titanium submitted to different surface treatments*, *Journal of Dentistry*, v. 31, p. 173-180, 2003.