UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Processos fotodinâmicos para bioestimulação tecidual em modelo *in vitro* de pele humana empregando-se laser de baixa potência e cloro alumínio ftalocianina em nanoemulsão

Fernando Lucas Primo

Ribeirão Preto
2009

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Processos fotodinâmicos para bioestimulação tecidual em modelo *in vitro* de pele humana empregando-se laser de baixa potência e cloro alumínio ftalocianina em nanoemulsão

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientado: Fernando Lucas Primo

Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco

Ribeirão Preto
2009

FICHA CATALOGRÁFICA

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Primo, Fernando Lucas
Processos fotodinâmicos para bioestimulação tecidual em modelo *in vitro* de pele humana empregando- se laser de baixa potência e cloro alumínio ftalocianina em nanoemulsão. Ribeirão Preto, 2009.
169p. : il. ; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Medicamentos e Cosméticos.
Orientador: Tedesco, Antonio Claudio.

1.Processos Fotodinâmicos. 2.Nanoemulsão. 3. Equivalente Dermal.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernando Lucas Primo

Processos fotodinâmicos para bioestimulação tecidual em modelo *in vitro* de pele humana empregando-se laser de baixa potência e cloro alumínio ftalocianina em nanoemulsão.

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS.

Área de Concentração: Medicamentos e Cosméticos.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco

Aprovado em: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____Assinatura:_____

Dedicatória

À Deus pela vida, pela saúde e pelas
oportunidades concedidas.

Aos meus pais Wilson e Maria pelo amor,
ensinamentos, educação e
incentivos constantes em minha vida.

Ao meu irmão Helton pelo amor, amizade,
incentivos e companheirismo mesmo que distante.

À Graziela Vieira Lucas pelo carinho e
pelo imenso amor, razão da minha felicidade.

Agradecimentos

Em especial ao Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco, por todos os ensinamentos oferecidos, pela amizade e sem dúvida pelo exemplo de profissionalismo a ser seguido.

Aos amigos Marigilson e Andreza pela confiança, pela amizade sincera, pelos conselhos e pelos ótimos momentos de convivência durante estes anos de companheirismo.

À amiga Olímpia pelo profissionalismo, pela amizade e pela disposição em ajudar.

À todos os amigos do Laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina pelo companheirismo e pela ótima convivência durante toda a elaboração deste trabalho.

Aos docentes e funcionários da FCFRP-USP e do Departamento de Química da FFCLRP-USP.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, pela bolsa de doutorado concedida sob processo nº 06/50562-1.

Epígrafe

“...o verdadeiro conhecimento se
dirige sempre à sabedoria e,
em vez de restringir o horizonte da mente,
nos convida a elevar o olhar
para o reino alto do espírito.
Na contemplação do universo
reconhecemos a obra de Deus...”

Papa Bento XVI

RESUMO

Primo, F. L. **Processos fotodinâmicos para bioestimulação tecidual em modelo *in vitro* de pele humana empregando-se laser de baixa potência e cloro alumínio ftalocianina em nanoemulsão.** 2009. 169f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

Este trabalho de tese de doutorado baseia-se em um desenvolvimento científico amplamente multidisciplinar combinando-se protocolos, técnicas e ensaios experimentais da área de tecnologia farmacêutica, nanotecnologia, engenharia tecidual e fotobiologia. O trabalho foi realizado em duas etapas subsequentes. Primeiramente realizaram-se os estudos de desenvolvimento e caracterização de um sistema de veiculação de fármacos, o qual foi amplamente avaliado a partir de testes físico-químicos e ensaios de citotoxidade *in vitro* em cultura de fibroblastos humanos. Na sequencia realizaram-se estudos fotobiológicos combinando-se a aplicação de luz laser de baixa potência e fármaco fotossensível nanoestruturado com modelos teciduais, para avaliação da resposta biológica ao fotoestímulo. Para se mimetizar ao máximo as condições *in vivo*, construiu-se com sucesso um modelo tridimensional *in vitro* de pele humana, o qual se apresentou como uma ferramenta ideal para se avaliar a resposta fotobiológica após a indução de processos fotodinâmicos. Avaliou-se também o emprego dos equivalentes dermais como sistemas alternativos em testes de permeação e retenção cutânea *in vitro*. Os resultados obtidos foram promissores, auxiliando na compreensão dos mecanismos de interação dos processos fotodinâmicos com a matriz extracelular em combinação com a engenharia tecidual, mimetizando assim as condições *in vivo* da pele humana. Foi possível estabelecer também as bases para novos protocolos disponíveis para testes dermatológicos envolvendo produtos do segmento farmacêutico, cosmecêutico e áreas correlatas.

Palavras-chave: Processos Fotodinâmicos, Nanoemulsão, Ftalocianina, Fibloblastos, Equivalentes Dermais.

ABSTRACT

Primo, F. L. **Photodynamic Process for tissue biostimulation on *in vitro* human skin model using low-intensity laser and chloroaluminium phthalocyanine nanoemulsion.** 2009. 169f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

This work of doctorate thesis bases on a scientific development thoroughly multidiscipline combining protocols, techniques and experimental assays of the pharmaceutical technology, nanotechnology, tissue engineering and photobiology. The work was accomplished in three subsequent stages. Firstly were carried out studies and characterization of a drug delivery system with nanotechnology, which was evaluated thoroughly starting from physical-chemical tests and assays of cytotoxicity in human fibroblast culture. In the sequence were carried photobiological studies combining the application of low-intensity laser and nanosized photosensitizers with tissue models, for evaluation of the biological photostimulation. In mimetic conditions it was developed an *in vitro* three-dimensional human skin model, as tool to evaluate the photobiological response after the induction of the photodynamic processes and also as alternative for *in vitro* assays of drug permeation/retention. Results were promising, aiding in the understanding of interaction of extracellular matrix with photodynamic processes. Therefore, the work was based in combination of techniques with application in dermatology, pharmaceutical process, cosmetics and correlate areas.

Keywords: Photodynamic Process, Nanoemulsion, Phthalocyanine, Fibroblasts, Dermal Equivalents.

I – Introdução

1.1 – Cicatrização

A habilidade do corpo para restabelecer sua integridade subsequente a dano é essencial para a manutenção da vida, reconstituindo estruturas danificadas e restabelecendo as funções celulares e teciduais. A cura de feridas ou o processo de cicatrização é uma resposta organizada e complexa do organismo aos danos ocorridos no tecido após a perda de sua integridade (AMADEU et al., 2003; SINGER e CLARK, 1999).

A cicatrização é um processo complexo durante o qual o organismo tenta reconstituir os tecidos danificados por uma causa externa (um acidente, uma cirurgia, uma doença, etc.) restabelecendo sua completa funcionalidade. Este processo tende, na maioria das vezes, a uma reparação satisfatória quanto ao aspecto externo da lesão, e quanto à função primária do tecido ou órgão afetado.

Entretanto, raramente se observa uma regeneração que restabeleça completamente toda a arquitetura e a fisiologia do tecido ou órgão afetado (SKOPIN e MOLITOR, 2009; SOUSA et al., 2009; AL WATBAN, 2009; FERREIRA et al., 2009; MALGRANGE, 2008; BOUKERROU et al., 2008).

O essencial no processo de cicatrização é a regeneração do tecido conjuntivo e a constante demanda de troca de informação e contato entre todos os tipos de células e sinalizadores químicos envolvidos neste processo. Nos casos específicos de reparação de danos cutâneos, os queratinócitos, as células endoteliais, os fibroblastos e os neutrófilos (células inflamatórias) comunicam-se frequentemente através de contatos diretos células–células, mas principalmente por intermédio de citoquinas (ou citocinas) e outros mediadores químicos. Estes contatos necessitam sem dúvida da presença da matriz extracelular indispensável para se promover as interações intercelulares em nível molecular (LIPKA e BORATYNSKI, 2008; SEGUIER et al., 2001; VAALAMO et al., 1997; COULOMB et al., 1983b).

Diferentes classificações didáticas são utilizadas para facilitar o entendimento de um processo totalmente dinâmico e com fases tão interdependentes como a cicatrização. Existem autores que consideram três estágios básicos no processo de cicatrização: inicialmente um estágio inflamatório, seguido por uma fase de proliferação e finalizando com o reparo tecidual em um estágio de remodelação. Entretanto, certos autores classificam de uma forma mais completa dividindo o processo em cinco fases principais (MANDELBAUM et al., 2003), destacando-se:

1 – coagulação;

2 – inflamação;

3 – proliferação;

4 – contração da ferida;

5 – remodelação.

1.1 – Fase de coagulação

O início desta fase é imediato, logo após o surgimento da ferida. Essa fase depende da atividade plaquetária e de uma cascata de eventos envolvidos no processo de coagulação. Ocorre a liberação de sinalizadores químicos como, substâncias vasoativas, proteínas adesivas, fatores de crescimento e proteases que controlam indiretamente o desencadeamento de outras fases do processo cicatricial. A formação do coágulo serve não apenas para auxiliar no fechamento das bordas das feridas, mas também para permitir o início da formação da rede de fibronectina, oferecendo uma matriz provisória, em que os fibroblastos, células endoteliais e queratinócitos possam se difundir pela região lesada (CLARK, 1985).

1.1.2 - Fase inflamatória

A ruptura do endotélio e exposição do sub-endotélio ativam as plaquetas que expressam um conjunto de moléculas de adesão e um conjunto de elementos matriciais, como os fatores de Von Willebrand, a vitro-nectina e o colágeno (JIMENEZ e JIMENEZ, 2004).

A ativação das plaquetas favorece a agregação das mesmas por formar o bloco plaquetário (corpúsculo branco) associado à secreção dos seus grânulos. De maneira concomitante tem-se início o processo de coagulação iniciado pela redução

da solubilidade das fibrinas, (após a clivagem do fibrinogênio pela trombina). Este trombo de fibrina ao qual se adiciona a fibronectina plasmática leva a estabilização do agregado plaquetário, ao qual se incorporam diferentes elementos séricos como os leucócitos, e os glóbulos vermelhos.

A liberação de fatores quimiotáticos pelas plaquetas (como PDGF, TGF-β, etc), permite a invasão dentro desta matriz temporária, dos neutrófilos polinucleares e pelos monócitos e macrófagos. Além do seu papel de contenção, estas células (mais particularmente os macrófagos) liberam todos os fatores quimiotáticos no local da ferida. Esta secreção induz a chegada de novos macrófagos e linfócitos do tipo T e também a migração para esta matriz temporária de fibroblastos oriundos dos tecidos conjuntivos circunvizinhos (DIPIETRO, 1995).

O processo de cicatrização entra, então, na fase de proliferação dominada pelo processo de migração e proliferação das células mesenquimatosas, associada à síntese de uma nova matriz extracelular temporária, indispensável ao processo de angiogênese (LIPKA e BORATYNSKI, 2008; SEGUIER et al., 2001; VAALAMO et al., 1997; COULOMB et al., 1983b).

1.1.3 - Fase Proliferativa

O tecido neo-formado que substitui as primeiras matrizes temporária, constituídas pelo corpúsculo vermelho, é chamado de tecido de granulação. Novamente os macrófagos presentes tem um papel essencial na secreção de fatores de crescimento e de citoquinas (TNF-α, TGF-β, IL-1β, PDGF) capazes de promover a angiogênese, a proliferação de fibroblastos e a síntese de colágeno (DIPIETRO, 1995). Os fibroblastos que invadem o tecido de granulação adquirem fenótipos de miofibroblastos contráteis. Estes miofibroblastos expressam a α-actina

(GABBIANI, 1994), e contribuem para a aproximação das bordas da ferida por contração do tecido de granulação. Nesta fase observa-se a síntese precoce de colágeno e de fibronectina (KOYAMA et al., 1996; GAILIT e CLARK, 1994).

Esta fase é marcada também por uma intensa neo-angiogênese. As formações de capilares a partir dos vasos danificados que circundam o ponto da lesão. Esta neo-angiogênese é facilitada pela baixa quantidade de ácido hialurônico depositado.

Paralelamente a esta fase, ocorre dentro dos tecidos conjuntivos, uma intensa atividade. A exposição dos tecidos conjuntivos sub-epiteliais e a destruição da membrana basal, induzem a migração e a proliferação de células epiteliais (usualmente após as primeiras horas do dano tecidual). Em contato com um ambiente não habitual, composto essencialmente por colágeno do tipo I, as células epiteliais das bordas da ferida expressam em sua superfície integrinas e proteases, o que permite a migração de novas células para esta nova matriz extracelular (LIPKA e BORATYNSKI, 2008; SEGUIER et al., 2001; VAALAMO et al., 1997; COULOMB et al., 1983b).

No epitélio normal, as integrinas α6β4, que são proteínas e peptídeos mediadores e reguladores bioquímicos do processo de interação celular, permitem a adesão da laminina-5 e outros aminoácidos e proteínas do meio extracelular. No epitélio cicatricial estas integrinas estão dispersas ao longo da membrana plasmática enquanto que inúmeras outras integrinas do tipo α2β1, encontram-se nas regiões basais favorecendo o contato direto com as moléculas que são capazes de reconhecê-las. Sob as influências dos fatores de crescimento, como o FGF-7 (KGF) (secretados pelos fibroblastos), ocorre à indução e a reforma do epitélio, fato este

observado entre o 7º e 8º dias após o dano inicial (MANDELBAUM et al., 2003; DIPIETRO, 1995; GAILIT e CLARK, 1994).

Acredita-se que nesta fase, de intensa atividade celular, o processo de foto-estimulação possa desempenhar um papel decisivo e modulador da resposta celular (PRIMO et al., 2008b; SILVA et al., 2004).

1.1.4 – Fase de contração

Esta fase é caracterizada pelo movimento centrípeto das bordas da ferida (espessura total). Uma ferida de espessura total tem contração mesmo quando há enxertos, que diminuem em 20% o tamanho da ferida. O efeito de contração pode reduzir em até 60%, aproximadamente, a área de superfície do defeito cutâneo (STEGMAN e TROMOVITCH, 1982).

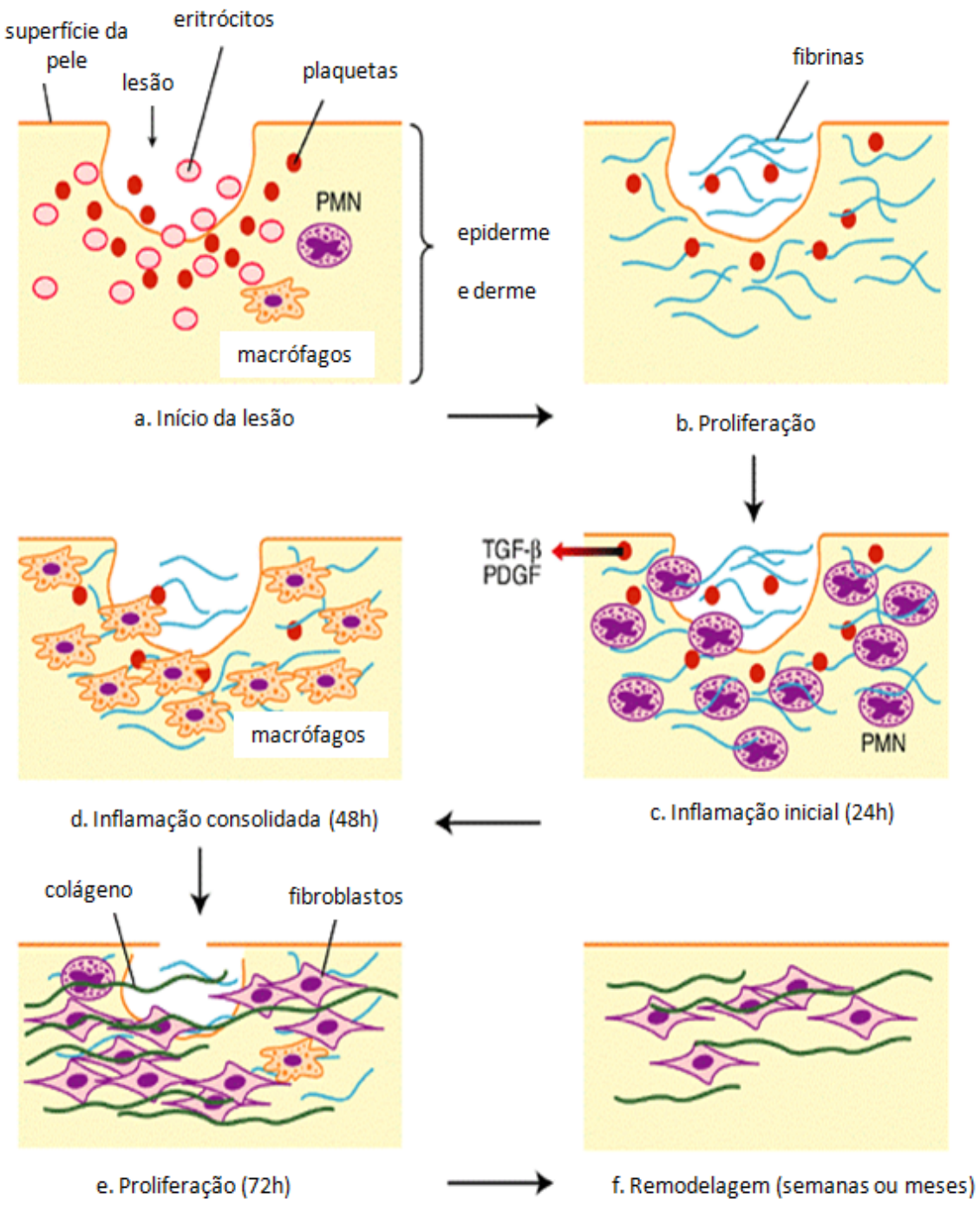
1.1.5 - Fase de remodelagem

Esta última fase pode levar vários meses; a qual é caracterizada essencialmente por uma remodelagem do tecido conjuntivo e a formação da cicatriz. O tecido de granulação desaparece dando lugar ao tecido conjuntivo fibroso (cicatriz definitiva) (GAILIT e CLARK, 1994).

As fibras muito finas de colágeno que caracterizam o tecido de granulação evoluem nesta fase para alcançar o diâmetro equivalente às fibras recuperadas, presentes em uma derme intacta, enquanto que os espaços interfibrilares diminuem. Este aumento no diâmetro das fibras esta relacionado diretamente à resistência final dos tecidos neo-formados em relação às forças de tração (DOILLON et al., 1985). Embora esta resistência se aproxime do tecido original, a mesma nunca alcançará os níveis de derme não lesada.

A maioria dos vasos capilares formados desaparece e a maior parte de miofibroblastos tem diferenciação terminal, que conduzem a sua morte (DESMOULIERE et al., 1995). Este tecido evoluirá por vários meses até que apresente as características de um tecido de substituição, que embora não apresente o aspecto de uma pele intacta, oferecem resistência necessária às forças mecânicas exercidas pelo ambiente externo.

Esta sequência de eventos traduz, de uma forma simplificada, a complexidade do processo cicatricial, o qual pode ser visualizado no Esquema 1 a seguir.



Esquema 1 – Fases sequenciais do processo de cicatrização (BEANES et al., 2003).

1.2 - Papel das Proteases Matriciais durante o processo de cicatrização

As metaloproteases de matriz (MMP) são denominadas como endopeptidases dependentes de cálcio, que contêm zinco, estrutural e funcionalmente relacionadas umas às outras (BODE e MASKOS, 2003). A família das MMP contém mais de 20 membros descritos na espécie humana, as quais são divididas em subfamílias devido à organização dos domínios e às especificidades do substrato (OVERALL e KLEIFELD, 2006).

Numa classificação geral, as MMP são enzimas extracelulares (exceto as MMP de membrana celular – MT-MMP), secretadas na forma de proenzimas. Todas as MMP são enzimas com multidomínios, contendo os domínios propeptídicos, domínio catalítico e domínio hemopexina. A presença de um resíduo de cisteína altamente conservado entre todas as MMP é essencial para manter a enzima na sua forma inativa. O grupamento sulfidril desse resíduo de cisteína é ligado ao íon zinco do domínio catalítico, sendo que a interrupção desta interação leva a ativação da enzima.

A principal função das MMP é promover a degradação da matriz extracelular. Entretanto, estudos recentes demonstram que seus alvos proteolíticos específicos têm sido expandidos para várias outras proteínas extracelulares, incluindo uma variedade de outras proteases, inibidores, fatores de coagulação, moléculas quimiotáticas, fatores de crescimento, proteínas ligantes de fatores de crescimento, receptores de superfície celular e moléculas de adesão (MCCAWLEY e MATRISIAN, 2001). Dessa forma, as MMP podem influenciar diversas propriedades celulares como crescimento, morte e migração (COUSSENS et al., 2002).

Pode-se observar que diferentes tipos de matrizes extracelulares se sucedem desde o dano tecidual até o final do processo cicatricial. Esta sucessão implica em um elaborado programa de síntese que permite variações qualitativas e quantitativas das matrizes extracelulares necessárias, não somente, ao processo sequencial de cicatrização, mais também a uma remodelagem intensa durante a fase proliferativa, na qual estão envolvidas várias famílias de proteases, dentre as quais se destacam as matriz-metaloproteases (MMP) (MURPHY e NAGASE, 2008).

1.2.1 - Expressão espaço-temporal das proteases matriciais e seus inibidores durante o processo de cicatrização

É devido à presença das proteases matriciais dentro das matrizes temporárias que, inicialmente, os leucócitos podem liberar seus grânulos e desencadear todo o processo cicatricial. Assim, as proteases de serina agem sobre a catepsina, elastase leucocitária ou sobre as metaloproteases matriciais, como a MMP-8 (colagenase do tipo 2), a MMP-9 (gelatinase do tipo B) ou a MMP-12 (elastase macrofágica).

De maneira concomitante, as células residentes (queratinócitos, células endoteliais, e fibroblastos) participam de sucessivas transformações qualitativas da matriz extracelular enquanto expressam proteases.

As MMP e seus inibidores teciduais (*Tissue Inhibitor of Metalloproteinases* - TIMP) podem ser reagrupados de acordo com sua localização tissular e a sua atividade biológica. Na Figura 1 apresentamos de forma geral a classificação bioquímica das MMP.

O primeiro grupo consiste na família da MMP-1 (colagenase do tipo 1), na MMP-10 (estromelisina 2) e o TIMP-1. A expressão dessas moléculas inicia-se

algumas horas depois do dano tecidual, alcançando-se um máximo entre o 1º e 2º dia, seguido de um decréscimo rápido.

A MMP-2 (gelatinase do tipo I), o complexo MT-MMP-1 (MMP de membrana), e o TIMP-2 são expressos em nível basal na derme normal. Com o final da fase inflamatória, observa-se um aumento sequencial da expressão dos inibidores TIMP-2 (24 horas) e depois do complexo MT-MMP-1 (2 dias após), e finalmente da MMP-2 (3 dias após sua detecção inicial). Todo processo é reflexo da intensa atividade observada no tecido de granulação (SOO et al., 2000; OKADA et al., 1997; VAALAMO et al., 1996). São detectados altíssimos nível de concentração destas moléculas ao longo da fase de maturação dos tecidos cicatriciais (SOO et al., 2000; OKADA et al., 1997; AGREN, 1994).

A MMP-7 (matrilisina) é normalmente detectada nos tecidos cutâneos na sua forma sub-expressa durante a formação tecidual granular e na fase de maturação. Sua expressão está associada ao desenvolvimento do epitélio granular (glândulas sudoríparas) (SOO et al., 2000).

Em camundongos, observa-se que o inibidor TIMP-3 está fortemente expresso em tecidos saudáveis. Esta expressão parece aumentar significativamente somente no término de reconstituição do epitélio (SOO et al., 2000). Em humanos, entretanto, uma expressão significante do TIMP-3 é detectada entre o 3° e 5° dias pós-trauma (o mesmo acontece para o TIMP-1 e as células epiteliais adjacentes na frente de migração (VAALAMO et al., 1997).

A MMP-3 (estromelisina 1) é expressa pelos queratinócitos, bem como por alguns fibroblastos sub-adjacentes (PARKS, 1999; OKADA et al., 1997).

A MMP-9 é segregada desde as primeiras horas após o dano tecidual pelas células inflamatórias e por algumas células estromais. Sua expressão distingue-se

da MMP-2, por diminuir rapidamente durante o desenvolvimento do processo cicatricial (BULLEN et al., 1995; AGREN, 1994).

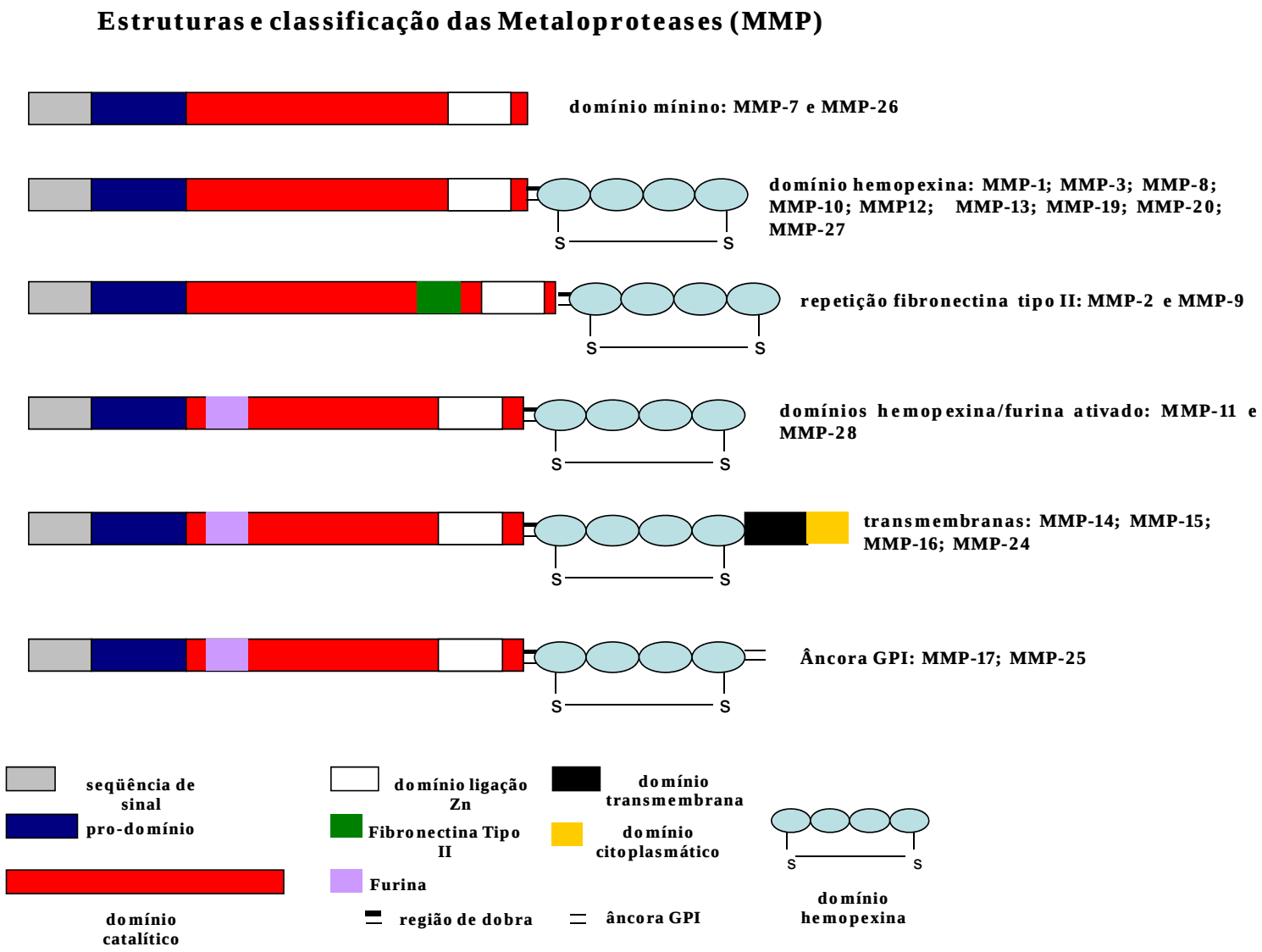


Figura 1 - Estrutura e classificação das metaloproteases matriciais (MMP).

1.3 – Processos Fotodinâmicos

Nas últimas décadas o interesse pelo uso de laser de baixa potência e/ou outras fontes luminosas nas áreas da saúde humana vem crescendo exponencialmente, com aplicações terapêuticas na área de reparo tecidual e cicatrização, para efeito analgésico e anti-inflamatório, na eliminação de depressões cutâneas e na redução da atividade anti-bacteriana, entre outras aplicabilidades (SIMIONI et al., 2009; PRIMO et al., 2008b; ALMEIDA-LOPES, L., 1999; TAM, 1999; RIES e SPEYER, 1996; BASFORD, 1995; OKAMOTO et al., 1992; BAXTER et al., 1991; KARU, 1989; MESTER e MESTER, 1986; MESTER et al., 1985; STEGMAN e TROMOVITCH, 1982).

Por muito tempo utilizaram-se os Processos Fotodinâmicos (PFD) no tratamento certos tipos de câncer não pigmentado, com resultados promissores obtidos em estudos clínicos no Brasil e em inúmeros países no mundo (PRIMO et al., 2007a; PRIMO et al., 2007b; SOUZA et al., 2005; TEDESCO et al., 2003a; BONNETT, 2000; TEDESCO et al., 1997; ASH e BROWN, 1993; DOUGHERTY, 1993; GOFF et al., 1992; JORI, 1990; DOUGHERTY, 1984).

A eficiência dos PFD deve ser atribuída à versatilidade e simplicidade do método, baseando-se na combinação de um fármaco fotossensível e luz visível (geralmente do tipo laser ou diodo-laser), que são relativamente inofensivos por si só, mas que quando combinados, em presença de oxigênio moleular, induzem aos PFD (CASTANO et al., 2007; CASTANO et al., 2004); caracterizados por uma sucessão de eventos biológicos, incluindo fototoxicidade, dano vascular e resposta do sistema imunológico ou fotoestimulação e laser-terapia quando modulados a baixa potência em comprimentos de ondas adequados (PRIMO et al., 2008a; SOBOLEV et al., 2004; TEDESCO et al., 2003b; FOOTE, 1991; GOMER, 1991;

BONNETT e BERENBAUM, 1989; KARU, 1989; KARU, 1988; MESTER et al., 1985; DOUGHERTY, 1984).

A interação de luz monocromática e fármaco fotossensível induz a uma série de processos fotofísicos e fotoquímicos em níveis quânticos, decorrente da interação da radiação eletromagnética com a matéria, os quais são detalhadamente ilustrados no diagrama de Jablonski (Figura 2).

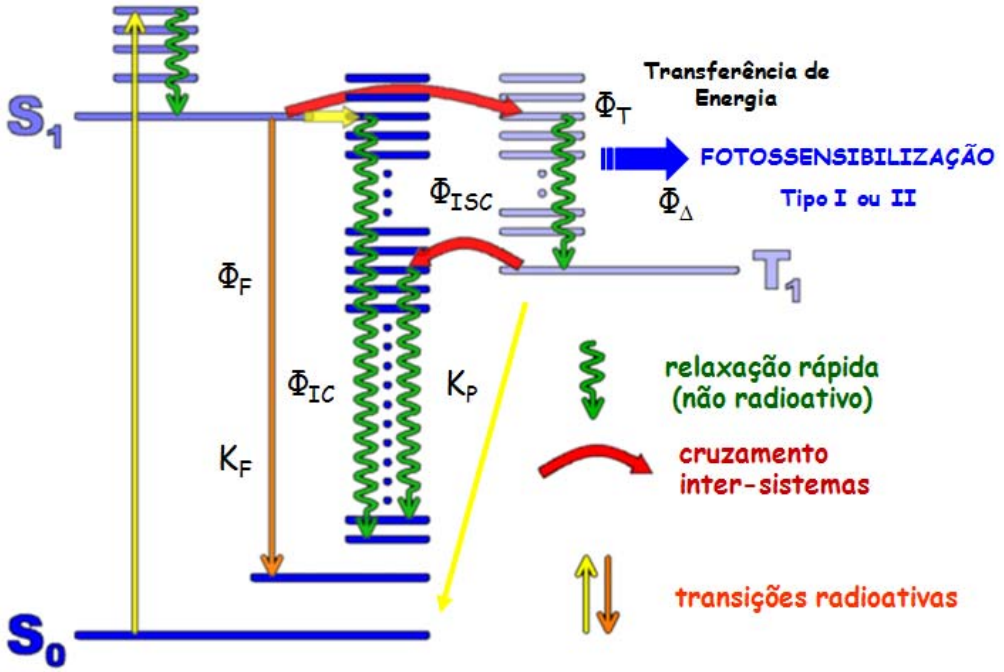


Figura 2 – Diagrama de Jablonski simplificado, ilustrando as transições eletrônicas que dão origem aos mecanismos fotodinâmicos de fotossensibilização molecular. Φ_F: rendimento quântico de fluorescência; Φ_T: rendimento quântico de triplete; Φ_{ISC}: rendimento quântico de cruzamento inter-sistemas; Φ_{IC}: rendimento quântico de conversão interna; Φ_Δ: rendimento quântico de oxigênio singlete; K_F: constante de supressão por fluorescência; K_P: constante de supressão por fosforescência; S_0: estado singlete fundamental; S_1: estado singlete excitado.

A metodologia baseia-se na administração sistêmica, transdêrmica ou tópica de um fármaco fotossensível (normalmente na presença de um sistema de liberação de fármacos específico) seguido por ativação com luz monocromática (DE ROSA et al., 2003; SHARMAN et al., 1999). Os fármacos fotossensíveis utilizados em PFD são compostos que absorvem a energia luminosa em comprimentos de ondas específicos induzindo a formação de estados excitados. Após seguirem um complexo mecanismo de reações fotoquímicas clássicas (FOOTE, 1991), levam à produção de espécies reativas de oxigênio e outras espécies ativas no processo fotodinâmico (NUNES et al., 2004; SOBOLEV et al., 2004; GOMES, A. J., 2003; TURCHIELLO et al., 2003; BONNETT, 1995; GOMER, 1991; DARWENT, 1982).

Após a absorção de um fóton de luz, o fármaco fotossensível passa a popular um estado eletrônico singlete excitado mais energético (S_n), podendo retornar ao seu estado fundamental (S_0) via processo de relaxação física conhecido como conversão interna ou através de processos radiativos de emissão de fluorescência. As propriedades fluorescentes dos fármacos fotossensíveis são úteis na visualização, localização e delineação de lesões malignas, favorecendo a utilização de diversas técnicas espectroscópicas modernas para obtenção de diagnósticos por imagem, entre outras aplicações (SHARMAN et al., 1999; STERNBERG et al., 1998; STILMAN, 1989).

Uma alta população do estado singlete excitado dos fármacos fotossensíveis pode dar origem ao estado triplete excitado (inversão da orientação vetorial do spin eletrônico), com conformação eletrônica e energia discretamente menor que o estado excitado singlete e com tempo de vida mais longo (10^{-6} à 10^{-3} segundos). A ação fotodinâmica é dependente do processo de cruzamento inter-sistemas,

responsável pela formação do estado triplete excitado a partir do estado singlete excitado.

Os fármacos fotossensíveis mais eficientes devem possuir necessariamente um alto rendimento quântico de conversão para o estado triplete excitado e por consequência tempos de vida na ordem de micro-segundos. A partir do estado triplete excitado, o fármaco fotossensível pode retornar diretamente ao estado fundamental pelo processo de conversão interna ou através do processo radiativo de emissão de fosforescência (LAKOWICZ, 1999).

O fármaco fotossensível no estado excitado triplete pode então desencadear interações fotoquímicas elucidadas basicamente por dois mecanismos distintos (FOOTE, 1991).

O **mecanismo do Tipo I** envolve a abstração de um átomo de hidrogênio ou reações de transferência de elétrons entre o fármaco fotossensível no estado triplete excitado e diferentes macromoléculas biológicas, levando à formação de radicais livres e/ou íons radicais. Poucos materiais biológicos apresentam facilidade de fotoredução (por exemplo, quinonas e citoquinonas) em processos nos quais temos a oxidação do composto a cátion radical-π e o substrato reduzido. As espécies reduzidas podem transferir um elétron ao oxigênio molecular presente no meio (em sua configuração triplete), formando espécies reativas de oxigênio como peróxidos de hidrogênio, ânion superóxidos, etc. Este mecanismo de fotossensibilização é conhecido como sendo do tipo I, sendo esquematizada a seguir.

Mecanismo de fotossensibilização do Tipo I – Reações redox com biomoléculas

$^{0}F \rightarrow {}^{1}F \rightarrow {}^{3}F$

$^{3}F + S \rightarrow F^{+\bullet} + S^{-\bullet}$ (transferência de energia)

$S^{-\bullet} + {}^{3}O_2 \rightarrow S + O_2^{-\bullet} \rightarrow HO^{\bullet} + HO^{\bullet}$

Sendo F = fármaco fotossensível e S = substrato biológico

Outro mecanismo possível para fotossensibilização é a transferência de energia para o oxigênio molecular a partir da configuração eletrônica triplete do fármaco, induzindo a formação do oxigênio singlete ($^{1}O_2$) conforme o mecanismo do tipo II. O oxigênio singlete é uma espécie altamente reativa que interage de forma a oxidar vários substratos biológicos resultado da sua interação por difusão molecular. Acredita-se que o oxigênio singlete seja o principal mediador dos efeitos fotodinâmicos nos sistemas biológicos, pois reage rápida e indiscriminadamente com os mais variados alvos eletrofílicos, como lipídeos insaturados, proteínas, ácidos, entre outros. O **mecanismo do tipo II** de fotossensibilização esta esquematizado a seguir.

Mecanismo de fotossensibilização do Tipo II – Mediado pela produção de $^{1}O_2$

$^{0}F \rightarrow {}^{1}F \rightarrow {}^{3}F$

$^{3}F + {}^{3}O_2 \rightarrow {}^{0}F + {}^{1}O_2$ (transferência de energia)

$^{1}O_2 + S \rightarrow S\text{-}OOH$ (peróxidos, etc.)

Sendo F = fármaco fotossensível e S = substrato biológico

O oxigênio singlete ($^1O_2$) gerado pela reação do tipo II é um intermediário chave em muitos processos oxidativos fotoinduzidos em sistemas químicos ou biológicos, sendo considerado a principal espécie produzida pelos PFD (DE ROSA e CRUTCHLEY, 2002) embora recentemente tenha sido mostrado que na maioria dos casos, os mecanismos do tipo I e II atuam simultaneamente.

As ftalocianinas são consideradas excelentes fármacos fotossensíveis para PFD, devido á sua estabilidade físico-química, pureza química e viabilidade econômica (STILMAN, 1989). Possuem muitas vantagens comparando-se aos fármacos fotossensíveis de primeira geração, pelo fato de possuírem uma alta taxa de absorção de luz na faixa espectral de 600 a 800 nm ($\varepsilon_{670} \approx 10^5$ mol/L^{-1}.cm^{-1}), exatamente na janela terapêutica (CASTANO et al., 2004), além de baixa toxicidade *in vitro*. Suas propriedades fotofísicas são fortemente influenciadas pela presença e natureza do íon metálico central, o que é refletido diretamente no rendimento quântico e tempo de vida dos estados excitados (Φ_T, τ_T) (BONNETT, 2000; BONNETT, 1995; GOMER, 1991; DARWENT, 1982).

Atualmente sua produção no mercado nacional, só reforça a idéia de que num futuro bem próximo, estará disponível à grande demanda, sendo necessária a implementação de um serviço assistencial de saúde pública com base nestes protocolos.

Entretanto, a baixa solubilidade destes compostos em meio aquoso (altamente lipofílicos) torna inviável sua administração direta, o que leva à necessidade de veiculação dos mesmos em sistemas de liberação adequados, que melhor solubilizem e modulem os processos de dissolução e biodistribuição *in vitro* e *in vivo*.

1.4 – Sistemas nanoestruturados de liberação de fármacos

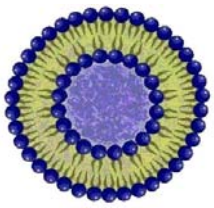
A eficiência dos PFD está diretamente relacionada com a capacidade do fármaco fotossensível ser administrado de forma adequada com biocompatibilidade e biodistribuição apropriadas (SOBOLEV et al., 2004; KONAN et al., 2001; DELAEY et al., 2000; BACHOR et al., 1991). Nas últimas décadas a tecnologia farmacêutica contribuiu fortemente para o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos (*DDS – drug delivery systems*) em diversos tipos de aplicações terapêuticas (SWARNALATHA et al., 2008; PRIMO et al., 2007b; SIMIONI et al., 2007b; MACAROFF et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2003; DE ROSA et al., 2003; DE PAOLI et al., 2002; WU et al., 2001; SANTOS-MAGALHÃES et al., 2000; COUVREUR et al., 1994; COUVREUR et al., 1979a; COUVREUR et al., 1979b). Atualmente, vários tipos de sistemas de liberação têm sido desenvolvidos associando-se um fármaco fotossensível para aplicação sistêmica e/ou tópica para tratamento de câncer. (SIMIONI et al., 2007a; NUNES et al., 2004; SOBOLEV et al., 2004; DE ROSA et al., 2003; NUNES, S. M. T., 2003).

Os DDS possuem capacidades físico-químicas muito importantes que levam à uma especificidade pelo tecido alvo, minimizando diversas limitações pertinentes à administração do fármaco fotossensível livres em meio homogêneo. A interação biológica de fármacos está diretamente relacionada com a afinidade química pelos sistemas de liberação, o que levou ao desenvolvimento de veículos com potencialidade biológica cada vez maior, favorecendo a absorção pelo alvo biológico, com uma farmacocinética adequada, minimizando-se os efeitos colaterais usualmente presentes e que limitam a utilização das terapias baseadas em PFD.

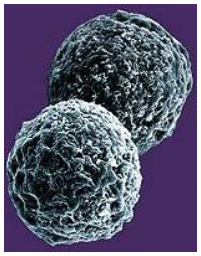
O emprego da tecnologia farmacêutica proporciona vantagens relacionadas ao transporte eficiente de fármaco, ocasionando uma maior absorção

alvo-específica, liberação controlada, biocompatibilidade, redução de fototoxicidade, entre outros fatores.

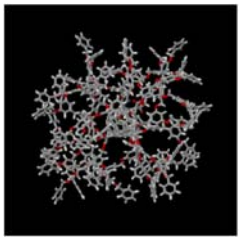
Vários tipos de DDS têm sido estudados e utilizados clinicamente, como as vesículas lipossomais (NUNES, S. M. T., 2000), micropartículas (GOMES, A. J., 2003), microemulsões (SOPPIMATH et al., 2000; LENAERTS et al., 1994) proteínas de baixa densidade (NUNES, S. M. T., 2003; TEDESCO et al., 2003b), sistemas dendriméricos (HUGHES, 2004; PATRI et al., 2002) (Figura 3), entre outros, com propriedades físico-químicas e biológicas muito interessantes (SHIM et al., 2004; SARIKAYA et al., 2003; JENNING et al., 1999).



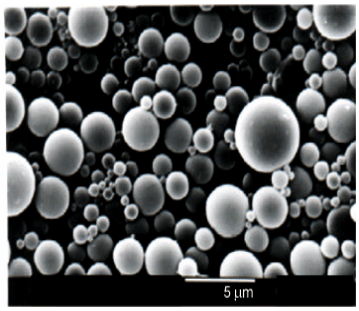
lipossomas



microcápsulas



dendrímeros



emulsões

Figura 3– Ilustração de alguns tipos de sistemas de liberação de fármacos fotossensíveis.

Com os recentes incentivos e fomentos à pesquisa envolvendo a nanotecnologia no início da década de 90 no Brasil, vários ramos da ciência foram

beneficiados com a expansão de tecnologias até então não incorporados pela comunidade científica (VAN HERRIKHUIZEN et al., 2005; YAMAMOTO et al., 2005; ALVAREZ-ROMÁN et al., 2004; HUGHES, 2004; SHIM et al., 2004; YAMAGUCHI et al., 2004; WISSING e MÜLLER, 2003). A busca por DDS nanoestruturados tem sido um desafio crescente da tecnologia química e farmacêutica, sempre objetivando o desenvolvimento de sistemas com novas morfologias e com características físico-químicas que confiram vantagens comparando-se aos sistemas de veiculação convencionais.

Os aspectos que combinam pesquisas nas áreas de "nanotecnologia" e "biotecnologia" resultaram na chamada "nanobiotecnologia" atuando em áreas como a genômica, biologia celular e molecular, tecnologia farmacêutica, cosmética, entre outras, as quais estão associadas à descoberta de novos fármacos e processos bioquímicos (MAILANDER e LANDFESTER, 2009; OCHEKPE et al., 2009; MODI et al., 2009; YANG e WEBSTER, 2009; MATHURIA, 2009; ROSEN e ELMAN, 2009; VAN HERRIKHUIZEN et al., 2005; SHIM et al., 2004; SARIKAYA et al., 2003; PATRI et al., 2002).

Sistemas de liberação controlada de fármacos oferecem várias vantagens quando comparados aos sistemas tradicionais. Nas formas de administração convencionais (nebulização *spray*, injeção, pílulas) a concentração do fármaco na corrente sanguínea apresenta um aumento, atinge um pico máximo e então declina. Desde que cada composto possua uma faixa de ação terapêutica acima da qual ela é tóxica e abaixo da qual ela é ineficaz, os níveis plasmáticos são dependentes das dosagens administradas. Este fato é problemático se a dose efetiva estiver próxima à dose tóxica. O objetivo dos sistemas de liberação controlada é manter a concentração do fármaco entre estes dois níveis por um tempo prolongado,

utilizando-se de uma única dosagem. A diferença de concentração plasmática efetiva em função do tempo, entre sistemas convencionais e de liberação controlada, pode ser melhor compreendido analisando-se a Figura 4.

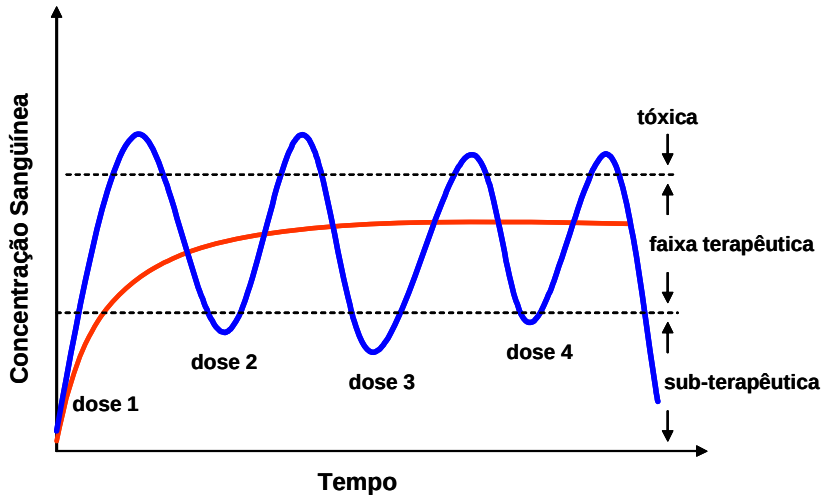


Figura 4 – Vantagens da liberação controlada e sustentada de fármacos: vantagens econômicas e terapêuticas. liberação sustentada, terapia convencional.

Trabalhos envolvendo liberação controlada têm fornecido inúmeras evidências que justificam a eficiência terapêutica além de muitas vezes estar aliada a vantagens econômicas. Dentre vários resultados podemos evidenciar o aumento na eficácia das terapias com liberação progressiva e controlada do fármaco a partir da degradação da matriz e maior tempo de permanência na circulação; diminuição significativa da toxicidade; natureza e composição dos veículos amplamente variada, observando o contrário do que se poderia esperar, pois não há predomínio de mecanismos de instabilidade e decomposição do fármaco (degradação biológica, por exemplo, enzimas, pH e outros). Tais características, portanto, conduzem a uma administração segura (sem causar reações inflamatórias locais, etc.) e maior conveniência ao paciente (menor número de doses). A possibilidade de

direcionamento a alvos específicos surge como mais uma vantagem fundamental que vem atraindo o interesse de aplicação em várias modalidades terapêuticas. A capacidade de associação tanto de substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas ampliadas circunstancialmente, também são pontos chaves para se motivar o desenvolvimento científico desta área da ciência ainda pouco explorada. O termo nanopartículas aplicado à liberação controlada de fármacos é amplo e refere-se a diferenciados tipos de estruturas como nanoesferas, nanocápsulas e nanoemulsões (SWARNALATHA et al., 2008; WANG et al., 2008; SIMIONI et al., 2007b; GUINEBRETIERE et al., 2002; WU et al., 2001; COUVREUR et al., 1994; COUVREUR et al., 1979a; COUVREUR et al., 1979b).

1.4.1 - Nanoemulsões

A interação de fármacos com a interface de agregados supramoleculares de compostos anfifílicos ou de polímeros representam um aspecto importante dentro da tecnologia farmacêutica, devido as implicações biológicas da presença destes compostos em formulações, os quais interferem diretamente no perfil de biodisponibilidade e 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 Å (OLIVEIRA et al., 2003). Além dos agregados esféricos, outros tipos de estruturas

internas, como as membranas bicontínuas e bicontínuas tubulares também foram demonstradas. 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.

O termo inicial microemulsão foi introduzido na literatura por Hoar e Shulman (HOAR e SCHULMAN, 1943), ao descreverem sistemas transparentes formados espontaneamente quando óleo e água eram misturados com quantidades relativamente grandes de tensoativo iônico misturado a um álcool de cadeia alquílica média de aproximadamente dez carbonos. Entretanto, o termo microemulsão foi utilizado somente no final da década de 1950 por Schulman e colaboradores (SCHULMAN et al., 1959).

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 5).

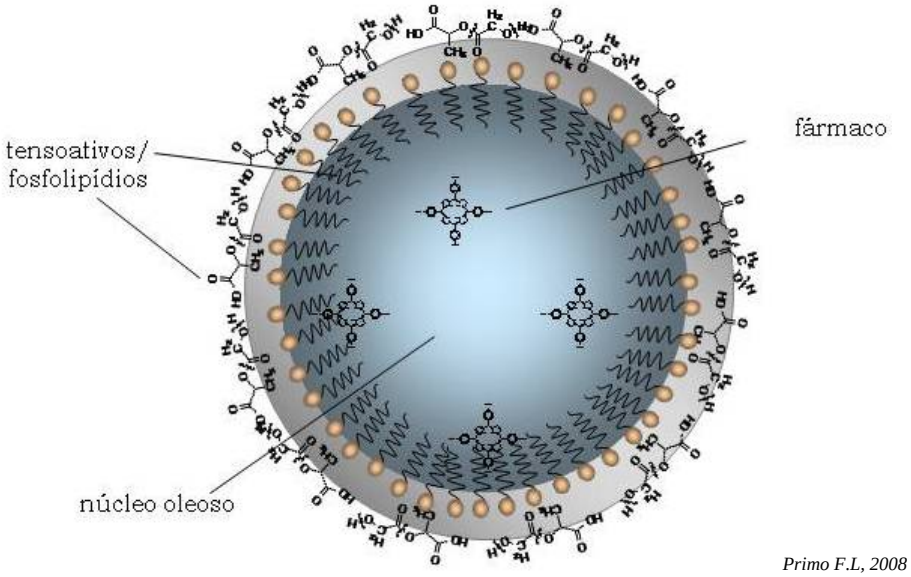


Figura 5 – Ilustração representando a estrutura de uma partícula coloidal de uma nanoemulsão do tipo óleo em água (PRIMO et al., 2008a).

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 homogeneização 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 lipofílicas e têm 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 et al., 2003).

Para explicar melhor a formação das NE, partimos do pressuposto que quando dois líquidos imiscíveis são misturados, mantendo-se agitação constante, as duas fases tendem, inicialmente, a formar gotículas dispersas de um dos líquidos no interior do outro. Quando a agitação cessa, as gotículas tendem a coalescer e os líquidos separam-se novamente. Podemos, então, definir o tempo de vida de uma emulsão, como o tempo decorrido desde o momento em que os líquidos estão completamente homogeneizados, até a separação total do sistema. Assim, o tempo de vida da NE é maior quanto melhor for a estabilidade do sistema. Portanto, os motivos que levam a esta desestabilização da emulsão são o ponto primordial para a compreensão da sua teoria de formação.

Quando um dos líquidos dividi-se no interior do outro forma-se uma fase interna, dispersa ou contínua. Assim, o processo de *nanoemulsificação* implica num grande aumento da área interfacial, a qual leva a um aumento brusco da energia livre de superfície. Este fenômeno, em condições de temperatura constante, pode ser descrito pela Equação (1):

$$\Delta G = G_2 - G_1 = \gamma i \times \Delta A \qquad (1)$$

sendo ΔG a variação na energia livre de superfície, γi a tensão interfacial entre as fases aquosa e oleosa, ΔA variação na área interfacial.

Através da Equação (1), pode-se verificar que o caminho mais viável para a estabilização do sistema é a diminuição da tensão interfacial da dispersão, como

forma de reduzir a energia livre derivada da expansão da área interfacial. É possível verificar, também, que a estabilidade da emulsão deverá ser maior, quanto menor for a energia livre remanescente da expansão da área interfacial, tendendo a um sistema termodinamicamente estável, caso o aumento da energia livre seja totalmente compensado pela diminuição da tensão superficial (FLORENCE e ATTWOOD, 2003; OLIVEIRA et al., 2003; LENAERTS et al., 1994).

Neste aspecto, os agentes tensoativos, com propriedades de diminuir a tensão interfacial entre o óleo e água, encontram seu papel fundamental na estabilização de emulsões, microemulsões e nanoemulsões. As emulsões comuns são consideradas sistemas termodinamicamente instáveis, sendo que o desenvolvimento tecnológico tende a intervir de forma direta a retardar da melhor maneira possível e pelo maior tempo o processo de separação de fases. Já as NE geralmente são formuladas com presença de co-tensoativos, cuja função é diminuir a tensão superficial para valores abaixo dos limites proporcionados pelos agentes emulsificantes comuns (FLORENCE e ATTWOOD, 2003; OLIVEIRA et al., 2003).

Assim em proporções adequadas de seus componentes e em condições de temperatura, pressão e força iônica constantes, o sistema forma-se espontaneamente quando a energia remanescente da interface está próxima de zero ($\Delta G \rightarrow 0$).

Sendo assim, decidiu-se desenvolver e caracterizar uma nanoemulsão do tipo óleo em água para veiculação de uma ftalocianina de cloro e alumínio (ClAlPc), utilizando-se de suas propriedades nanotecnológicas em estudos fotobiológicos e em modelo tecidual para avaliação da resposta dos PFD no meio biológico.

1.5 – Laser: aplicações biológicas e na saúde humana

A palavra laser é um acrônimo com origem na língua inglesa: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation* (Amplificação de Luz por Emissão Estimulada de Radiação). Esta radiação é do tipo eletromagnética não ionizante, sendo um tipo de fonte luminosa com características bastante distintas daquelas de uma luz fluorescente ou de uma lâmpada comum.

A radiação laser é monocromática, ou seja, emite radiações em um único comprimento de onda. É uma radiação com coerência espacial e temporal onde as ondas propagam-se com a mesma fase no espaço e no tempo. Sua direcionalidade permite a obtenção de alta densidade de energia concentrada em pequenos pontos. Com o auxílio de dispositivos ópticos, sua radiação pode ainda ser polarizada. São justamente as características especiais desse tipo de luz que a faz ter propriedades terapêuticas importantes (Laser de Baixa Potência ou Terapêutico) assim como ser utilizada em cirurgias com vantagens muito superiores ao uso do bisturi convencional (Laser de Alta Potência ou Cirúrgico). As radiações ópticas produzidas por esses lasers têm basicamente as mesmas características, porém se trabalha com o laser buscando resultados clínicos bastante específicos (ALMEIDA-LOPES, L., 1999; KARU, 1988).

A radiação laser pode ser refletida, transmitida, absorvida ou espalhada (*scattering*) pelo tecido (ALMEIDA-LOPES, L., 1999). A monocromaticidade do laser determina a absorção seletiva por parte dos cromóforos endógenos ou exógenos do tecido biológico, com resposta a um ou a vários comprimentos de onda, fenômeno este conhecido como ressonância à uma determinada frequência. Cada comprimento de onda, portanto, leva a um tipo diferente de interação segundo o tecido alvo.

No emprego de sistemas lasers clínicos, são utilizados termos específicos pelos fotobiologistas e profissionais da área da saúde para se padronizar as faixas operacionais dos protótipos e equipamentos. Os parâmetros e unidades mais comuns empregados são: potência média (mW), tempo (s), intensidade de energia (joules) e área de exposição (cm^2).

Estes parâmetros correlacionados dão origem aos termos irradiância e fluência, os quais são utilizados nos artigos e livros científicos para se designar a dose de luz (laser) aplicada diretamente nos tecidos.

A **irradiância** é o termo utilizado como sinônimo para densidade de potência, que é definida como sendo a potência óptica de saída do laser em Watts, dividida pela área irradiada em cm^2. É através do controle da irradiância que o cirurgião pode cortar, vaporizar, coagular ou "soldar" o tecido, quando da utilização de lasers cirúrgicos. A densidade de potência apropriada pode também gerar fotoativação com laser de baixa potência (CATORZE, 2009).

A **fluência** ou densidade de energia (dose de energia) em joules/cm^2 é outro termo sobre o qual o corpo clínico tem controle do tempo de exposição à irradiação laser. É obtido multiplicando-se diretamente a irradiância pelo tempo de exposição dado em segundos. Esta unidade é muito utilizada nos protocolos de bioestimulação e de tratamento de lesões (CATORZE, 2009).

A utilização do laser operando com baixa potência tem sido estudada desde os anos 60, sendo Mester em 1966 (MESTER, 1966), um dos pioneiros em demonstrar seus efeitos no reparo tecidual. A reparação tecidual é um processo complexo que envolve atividade local e sistêmica do organismo, sendo os fibroblastos uma das células diretamente envolvidas nesse complexo processo.

O laser operando em baixa potência foi considerado por Mester, em 1969, um *bioestimulador*, e por isso, por um determinado período de tempo, encontramos na literatura essa terminologia utilizada como sinônimo para designar esse tipo de laser, que também era chamado de laser de bioestimulação. Nessa época ainda não se conhecia muito bem seu mecanismo de ação, e o que se observava era que os terapeutas tinham excelentes resultados no tratamento de feridas e úlceras abertas, estimulando seu processo de cicatrização. Porém, com o passar do tempo, essa terapia começou a ser utilizada não só para estimular e acelerar processos, mas também para detê-los (MESTER et al., 1985).

O mecanismo de interação do laser em nível molecular foi descrito primeiramente por Karu em 1988 (KARU, 1988). Os incrementos de ATP mitocondrial que se produzem após a irradiação com o laser favorecem um grande número de reações que interferem no metabolismo celular. Em estados patológicos, o laser interfere no processo de troca iônica, acelerando o incremento de ATP (KARU, 1988), como descrito pelo diagrama de Karu e Smith (Figura 6).

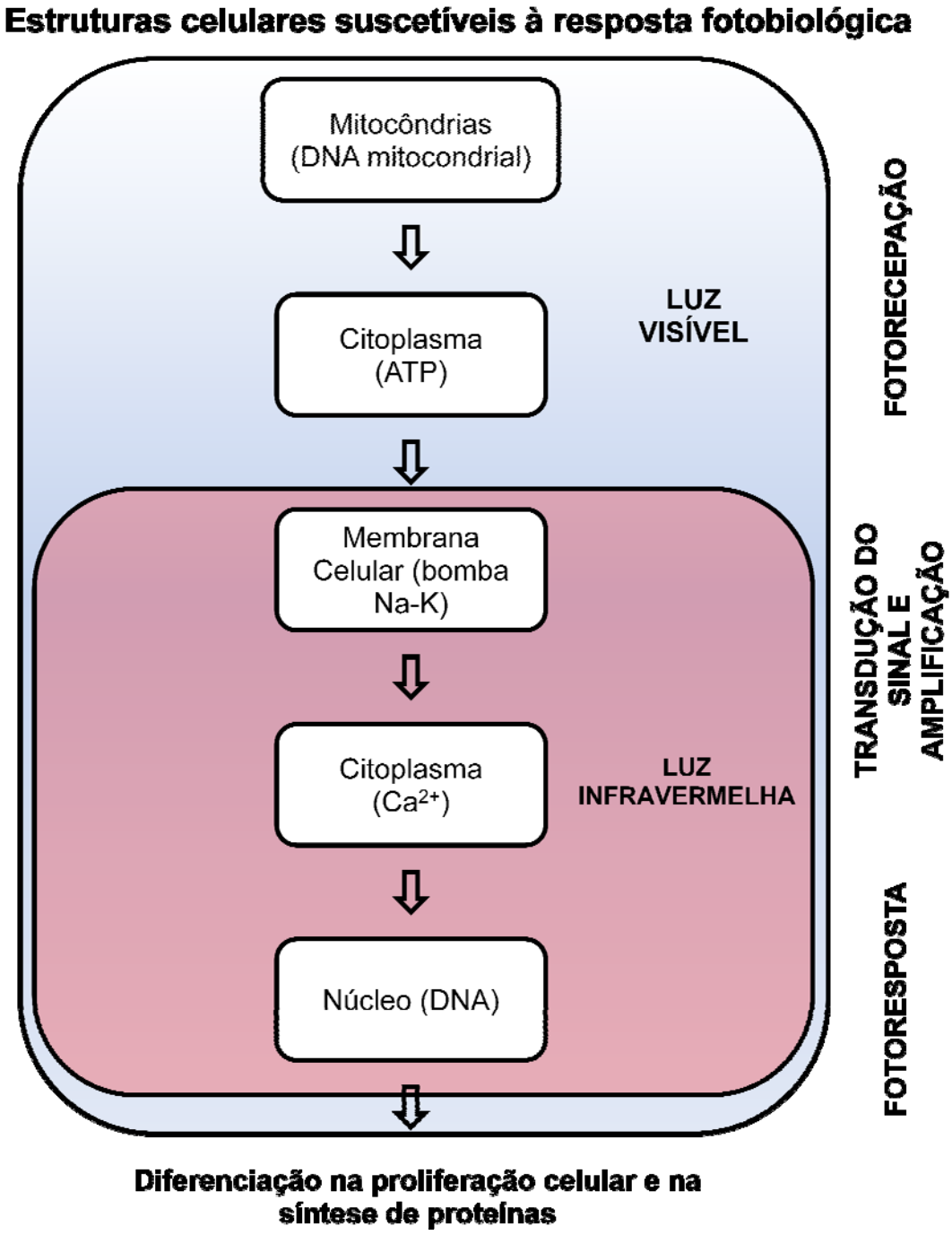


Figura 6 – Modelo de Karu e Smith para ação fotoquímica do laser visível na cadeia redox da mitocôndria e ação fotofísica do laser infravermelho na membrana celular. Ambos desencadeiam uma resposta celular, que gera uma cascata de reações bioquímicas (modificado de ALMEIDA-LOPES, L., 1999).

Estas descobertas conduziram a uma crescente aplicabilidade do laser em processos biológicos principalmente na área da saúde humana. Nas últimas

décadas a pesquisa científica favoreceu o desenvolvimento de protocolos clínicos para utilização dos lasers de baixa potência nos mais variados setores da saúde. Os resultados positivos quanto à bioestimulação e regeneração tecidual para o uso de laser de infravermelho direcionou o foco das indústrias ópticas para a produção de protótipos voltados para a área de tratamento estético e rejuvenescimento. Os centros clínicos empregam o laser em várias áreas da medicina, ressaltando a dermatologia (tratamento de anomalias de pele), oftalmológica (terapia da mácula degenerativa) e de fotodiagnóstico (lesão cutânea e órgãos de cavidade) (BAYAT et al., 2009; SAYGUN et al., 2008; WU et al., 2008; CASTANO et al., 2007; ZYCINSKI et al., 2007; DADRAS et al., 2006; COLIC et al., 2004).

1.5.1 – Fotoestímulo mitocondrial

O estado de equilíbrio de oxidação/redução (redox) celular é resultado do balanço intracelular entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas durante o metabolismo e a quantidade absorvida pelo sistema biológico antioxidante. As EROs são produzidas em grande quantidade pelos mecanismos oxidativos mitocondriais, estando diretamente relacionadas com o estado de equilíbrio eletrofisiológico. Altas concentrações destas moléculas podem levar a citotoxicidade, entretanto dentro de um limite de concentração apropriado, estas espécies reativas são consideradas importantes sinalizadores moleculares (TAFUR e MILLS, 2008). Em certos tipos de células, as EROs atuam em importantes funções biológicas, em particular como fatores reguladores de metabolismo e crescimento celular (BURDON, 1995). Nas plantas, os cloroplastos concentram a maior quantidade de EROs os quais são produzidos através de fotoestímulo na sua cadeia transportadora de elétrons. O processo de fotossíntese é diretamente dependente da absorção de

energia (fótons) a partir da luz visível e UV-visível. Através deste mecanismo há produção de grande quantidade de moléculas com alta capacidade energética, as quais influenciam o estado de redução/oxidação da célula. Toda esta cadeia é utilizada para criar a força motriz de prótons e então gerar energia para a célula.

Estudos recentes com luz monocromática de baixa intensidade têm revelado que comprimentos de onda específicos induzem uma variedade de efeitos biológicos em alguns tipos de células animais consideradas até então não-fotossintéticas (SCHINDL et al., 2003; YOUNG et al., 1989). Estes fenômenos são alcançados combinando-se minuciosos parâmetros como dose correta de laser, intensidade e frequencia apropriadas de pulsos. A melhor compreensão destes efeitos leva à determinação do procedimento clínico adequado para o emprego em clínica médica do laser de baixa potência e dos *light-emitting diodes* (LED).

Em determinados tecidos, a absorção de luz monocromática é responsável por uma série de processos fotobiológicos, afetando diretamente algumas etapas do mecanismo cicatricial e modulação de inflamações crônicas. Estudos realizados por Karu e colaboradores (KARU et al., 1994; KARU, 1989; KARU, 1988) demonstram que a luz infravermelha de baixa energia (espectro próximo ao vermelho) também induz respostas fotobiológicas e por sua vez atua em conjunto com a radiação visível (SCHINDL et al., 2003; MESTER et al., 1985). Os fotoreceptores celulares são classificados conforme sua função na cadeia transportadora de elétrons. A absorção de luz vermelha de baixa intensidade (670 nm) pode modular a função da citocromo-C oxidase, uma enzima terminal da cadeia mitocondrial de transporte de elétrons, ativando ou inibindo parcialmente sua atividade em função da quantidade de EROs. Uma vez fotoestimulada, a sequencia de reações da cadeia transportadora de elétrons é acelerada, resultando no aumento da produção de ATP e na eficiência de

vias de transdução de sinal intracelular, ocorrendo paralelamente ao aumento da quantidade de EROs produzidos pelo fotoestímulo.

Este conjunto de fenômenos fotobiológicos leva à efeitos bioquímicos que culminam em alterações macroscópicas, como o aumento na proliferação do epitélio celular ou aceleração da cicatrização em pacientes diabéticos (WHEELAND, 1993; KARU, 1989). Deve-se considerar que estes efeitos são diretamente dependentes do tipo de célula, da fase de crescimento celular e da condição do equilíbrio redox.

1.6 – Engenharia Tecidual

O termo Engenharia Tecidual (ET) foi empregado pela primeira vez durante o 1º Encontro da Fundação de Ciência Nacional (*National Science Foundation* - NSF) em 1988 nos Estados Unidos da América (EUA). A ET foi definida como *a aplicação de princípios e métodos de engenharia e ciências da vida para a compreensão da relação estrutura/função de tecidos saudáveis e de patologias e para o desenvolvimento de substitutos biológicos para o reparo ou regeneração de tecidos ou órgãos* (SHALAK e FOX, 1988). A ET difere de terapias tradicionais uma vez que a mesma integra diretamente paciente e a prótese/enxerto, a partir de um tratamento específico e de estado permanente. A ET é um campo científico multidisciplinar e emergente, combinando-se princípios da biologia e da engenharia para o desenvolvimento de substitutos viáveis que restaurem e mantenham a função de tecidos humanos (LANGER e VACANTI, 1993).

As diferentes possibilidades de criação e substituição de tecidos foram estudadas por mais de 20 anos por Bell e colaboradores (BELL et al., 1981). Durante os anos 90, a ET progrediu rapidamente, sendo desenvolvidos vários tipos de estruturas biológicas utilizadas como equivalentes teciduais. Os materiais

biológicos obtidos alcançaram o mercado em pouco tempo, tornando-se um segmento altamente lucrável com crescimento acentuado e faturamento anual de 3,5 bilhões de dólares (EUA) com destaque entre as indústrias emergentes no segmento biotecnológico mundial (LYSAGHT et al., 1998).

A ET tem sido empregada como uma alternativa potencial aos transplantes de órgãos e tecidos. Os neo-tecidos e órgãos obtidos pela ET são funcionalizados e implantados simultaneamente aos tratamentos clínicos, ou seja, paralelamente as terapias com enzimas reconstrutivas e intervenção cirúrgica para reabilitação da função original da região lesada, citando como exemplo a regeneração e substituição do fígado e de partes do trato-gastrointestinal (SACHLOS e CZERNUSZKA, 2003).

Atualmente a ET é dividida em três grandes áreas:

1 – Equivalentes Tridimensionais: desenvolvimento e crescimento *in vitro* de tecidos para implante e reparo de regiões lesadas. Geralmente os implantes são preparados a partir de cultura de células primárias em condições especiais para obtenção de modelos teciduais tridimensionais. Um exemplo comum de utilização são os enxertos de pele utilizados clinicamente nos EUA e Europa, para tratamento de queimaduras (Eldad et al 1987).

2 – Terapias celulares baseadas na aplicação de solução de células livres ou combinadas a sistemas biocompatíveis para indução de reparo e regeneração de órgãos e tecidos.

3 – Desenvolvimento de próteses e dispositivos que mimetizem os tecidos humanos para substituição e/ou funcionalização de lesões e órgãos danificados,

como estrutura óssea, musculatura, tendões, cartilagens e componentes do aparelho cardíaco (válvulas, coronárias e vasos ventriculares). Esta técnica envolve a utilização de polímeros sintéticos e naturais com alta compatibilidade biológica no preparo das peças e enxertos protéticos.

1.6.1 – Equivalentes Dermais

Os primeiros estudos envolvendo o desenvolvimento de modelos teciduais foram realizados no final da década de 70, buscando a obtenção de equivalentes dermais (DE) que reproduzissem ao máximo as condições *in vivo* da pele humana (BELL E. et al., 1979; HOSTETLER et al., 1975). Inicialmente foram obtidos modelos a partir de etapas experimentais extensas e de alta complexidade. Os precursores dos DE mimetizavam parcialmente a pele, representando individualmente cada camada tecidual. Bell e colaboradores foram os pioneiros no preparo dos modelos modernos com estrutura tridimensional a partir da combinação de cultura de fibroblastos, queratinócitos e uma matriz de colágeno (BELL E. et al., 1979).

Atualmente os DE são empregados como substitutos da pele humana em diferentes áreas tecnológicas como a biologia molecular, farmacologia, cosmética, engenharia tecidual e clínica médica (GAY et al., 1992; PONEC, 1991; REGNIER et al., 1990; EHRLICH e WHITE, 1983).

Os DE são ótimas ferramentas para se estudar a matriz extracelular, a qual é considerada a base de sustentação dos tecidos. Estudos recentes demonstraram que a composição da matriz extracelular é baseada em proteínas e polissacarídeos específicos (colágeno, elastina e metaloenzimas) secretados no ambiente intercelular, levando à fenômenos bioquímicos que se diferem em relação ao tipo e localização do tecido, o que influencia diretamente o crescimento, proliferação

celular e etapas da cicatrização e regeneração tecidual (HELARY et al., 2006; HELARY et al., 2004; BESSEAU et al., 2001; COULOMB et al., 1983a).

A partir da melhor compreensão da composição e da estrutura tecidual, foi possível o aprimoramento dos modelos tridimensionais que mimetizam com sucesso a matriz celular da derme humana. Como consequência, vários trabalhos científicos surgiram avaliando o comportamento desta matriz de colágeno extracelular (LIPKA e BORATYNSKI, 2008; VAALAMO et al., 1997; COULOMB et al., 1983b). Estes estudos envolvem ensaios de crescimento e migração monitorados por avaliações histológicas, além de fenômenos relacionados ao reparo e regeneração que têm sido intensamente estudados a partir de técnicas que permitem a identificação de metabólitos associados ao crescimento e cicatrização tecidual, como imunodetecção, *western blotting* e zimografia eletroforética (HELARY et al., 2006; COULOMB et al., 1983a) (SEGUIER et al., 2001).

Neste trabalho de pesquisa utilizamos pela primeira vez, junto ao grupo de Fotomedicina e Fotobiologia da FFCLRP-USP, o protocolo de preparo destes modelos tridimensionais os quais são fruto da colaboração internacional entre o Prof. Dr. Antonio Cláudio Tedesco e o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Bernard Coulomb do *Institut de Recherche sur La Peau, Inserm 532, Hospital Saint-Louis*, Paris, França.

Portanto, o presente trabalho de doutorado tem como foco principal o estudo e compreensão da interação do laser de baixa potência na região usual do espectro eletromagnético entre 600 e 800 nm e fármacos fotossensíveis nanoencapsulados em modelos de pele tridimensional *in vitro*.

Acredita-se que este desenvolvimento tecnológico multidisciplinar, envolvendo nanotecnologia, processos fotodinâmicos e engenharia tecidual, possa contribuir

para a elaboração de novos protocolos e modelos efetivos na compreensão dos processos cicatriciais e de bioestimulação tecidual.

4.3 – Conclusão Parcial – Parte I

Ao término da primeira parte do trabalho de tese, pode-se concluir que a proposta de desenvolvimento e caracterização do nanomaterial para veiculação do fármaco fotossensível foi realizada com sucesso. Obteve-se uma formulação com propriedades físico-químicas de acordo com o exigido pelos princípios da tecnologia farmacêutica e conforme proposto nos objetivos do projeto de tese, possuindo propriedades nanotecnológicas, alta compatibilidade biológica e eficiência adequada de incorporação de fármaco. Desenvolveu-se também um método analítico espectrofluorimétrico eficiente e reprodutível, para a quantificação de ftalocianinas e demais fármacos fotossensíveis utilizados em PFD.

Realizaram-se os estudos fotofísicos para a determinação dos tempos de vida, dos rendimentos quânticos e do perfil de absorção e emissão em modos

estáticos e cinéticos, para o fármaco fotossensível no estado fundamental, e nos estados singlete e triplete excitados. Os parâmetros fotofísicos obtidos foram importantes para se atestar o potencial fotodinâmico do fármaco em meio orgânico homogêneo e após a incorporação no sistema de liberação desenvolvido.

Portanto, conclui-se que o processo de veiculação da ClAlPc em nanoemulsão não alterou o perfil fotofísico da mesma, conferindo à formulação as propriedades necessárias para utilização em ensaios *in vitro* e testes biológicos empregando-se fotoestímulo a partir do uso de laser de baixa potência, como demonstrado nas etapas subsequentes desta tese de doutorado.

4.8 - Conclusão Parcial – Parte II

Ao término da segunda parte do trabalho de tese, conclui-se que o desenvolvimento do equivalente dermal de pele humana foi realizado de acordo com os objetivos propostos inicialmente pelo projeto de pesquisa. O cultivo de fibroblastos gengivais na matriz de colágeno do tipo I proporcionou a formação de uma rede intercelular tridimensional em múltiplos planos, os quais apresentaram uma contração acentuada em função do tempo, levando à formação de um tecido com espessura, composição e comportamento *in vitro* semelhante à pele humana.

A partir da determinação da viabilidade celular, monitorada pela atividade mitocondrial através do teste fotocolorimétrico de MTT, determinou-se uma faixa de concentração segura para a aplicação *in vitro* do fármaco fotossensível nanoveiculado em cultura celular em monocamada. Avaliaram-se também os efeitos

de bioestimulação a partir da modulação de tempos e de doses de laser adequados para ensaios em monocamada celular.

Demonstrou-se, com os estudos de lesão cicatricial *in vitro,* uma cinética de migração celular acentuada, confirmada pelo aumento do número de pontos mitóticos após ativação dos processos fotodinâmicos com laser visível de baixa potência e fármaco fotossensível nanoveiculado.

Na etapa final, avaliou-se o comportamento do DE em estudos de permeação e retenção cutânea *in vitro* para a ClAlPc/NE aplicada topicamente. Os resultados comprovaram a eficiência do modelo tecidual nos testes para determinação do coeficiente difusional e perfil de liberação cutânea do fármaco fotossensível em função do tempo após a aplicação tópica. Os dados obtidos favoreceram a utilização do sistema como uma ferramenta eficaz no desenvolvimento e caracterização de formulações tópicas e transdérmicas utilizadas nos segmentos cosmecêuticos e de tecnologia farmacêutica.

V – Conclusões Finais

Os resultados da Parte I demonstraram a obtenção e a caracterização físico-química de um novo material com nanotecnologia baseado em técnicas e protocolos de tecnologia farmacêutica, o qual está disponível para a veiculação de princípios ativos fotossensíveis empregados em processos fotodinâmicos. Realizou-se toda a caracterização fotofísica e fotoquímica do fármaco fotossensível, demonstrando o potencial fotodinâmico do mesmo após a incorporação em nanoemulsão.

Os resultados da Parte II foram obtidos a partir de ensaios fotobiológicos em cultura de células do tipo fibroblastos de origem humana. Nesta etapa desenvolveram-se os protocolos biológicos, os estudos e a compreensão dos mecanismos presentes no processo de bioestimulação luminosa. Desenvolveu-se um novo modelo de equivalente dermal como sistema mimetizador *in vitro* da pele humana. Este sistema pode ser funcionalizado e explorado em diversas áreas da

saúde, disponibilizado para testes biotecnológicos os quais necessitem avaliar o comportado da matriz extracelular e de cultura tridimensional de células humanas. Além disso, o equivalente dermal comportou-se como eficiente modelo de pele para ensaios de permeação e retenção de fármacos fotossensíveis, sendo uma alternativa viável para os protocolos farmacêuticos e cosmecêuticos de difusão de princípios ativos aplicados topicamente.

Portanto, conclui-se que os resultados finais deste trabalho científico multidisciplinar, proporcionaram o desenvolvimento de protocolos, técnicas e conhecimentos inéditos, que contribuirão diretamente para o uso dos processos fotodinâmicos e da nanotecnologia em futuros ensaios clínicos e pré-clínicos na área da saúde humana.

VI – Referências Bibliográficas

AGREN, M. S. Gelatinase activity during wound healing, ***British Journal of Dermatology***, v. 131, p. 634-640, Nov.1994.

AL WATBAN, F. A. H. Laser Therapy Converts Diabetic Wound Healing to Normal Healing, ***Photomedicine and Laser Surgery***, v. 27, p. 127-135, Feb.2009.

ALMEIDA-LOPES, L. **Análise in vitro da proliferação celular de fibroblastos de gengiva humana tratados com laser de baixa potência**. 79 f. Mestrado em Ciências no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica - Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade Vale do Paraíba, São José dos Campos - SP,1999.

ALVAREZ-ROMÁN, R.; NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H.; FESSI, H. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles, ***Journal of Controlled Release***, v. 99, p. 53-62, Aug.2004.

AMADEU, T. P.; COULOMB, B.; DESMOULIERE, A.; COSTA, A. M. Cutaneous wound healing: myofibroblastic differentiation and in vitro models, ***The International Journal of Lower Extremity Wounds***, v. 2, p. 60-68, June2003.

ASH, D. V.; BROWN, S. B. New drugs and future developments in photodynamic therapy, ***European Journal Cancer***, v. 29A, p. 1781-1783, 1993.

BACHOR, R.; SHEA, C. R.; GILLIES, R.; HASAN, T. Photosensitized destruction of human bladder carcionoma cells treated with chlorin e6-conjugated microspheres, ***Proceendings of the Natonal Academy of Sciences of United States of America***, v. 88, p. 1580-1584, 1991.

BASFORD, J. R. Low intensity laser Therapy: still not an establishd clinical tool, ***Lasers in Surgery and Medicine***, v. 16, p. 331-342, 1995.

BAUTISTA-SANCHEZ, A.; KASSELOURI, A.; DESROCHES, M.; BLAIS, J.; MAILLARD, P.; OLIVEIRA, D. M.; TEDESCO, A. C.; PROGNON, P.; DELAIRE, J. Photophysical properties of glucoconjugated chlroins and phophyrins and their associations with cyclodestrins, ***Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology***, v. 81, p. 154-162, Oct.2005.

BAXTER, G. D.; ALLEN, J. M.; BELL, A. J. The Effect of Low-Energy-Density Laser Irradiation Upon Human Median Nerve-Conduction Latencies, ***Journal of Physiology-London***, v. 435, p. 63, Apr.1991.

BAYAT, M.; KAMALI, F.; DADPAY, M. Effect of Low-Level Infrared Laser Therapy on Large Surgical Osteochondral Defect in Rabbit: A Histological Study, ***Photomedicine and Laser Surgery***, v. 27, p. 25-30, Feb.2009.

BEANES, S. R.; DANG, C.; SOO, C.; TING, K. The phases of cutaneous wound healing, ***Expert Reviews in Molecular Medicine***, v. 5, 2003.

BELL E.; INVARSSON, B.; MERRIL, C. Production of a tissue-like structure by contraction of collagen dermal equivalents by human fibroblasts of different

proliferative potencial in vitro, ***Proceedings of the National Academy of Sciences***, v. 76, p. 1274-1278, 1979.

BELL, E.; EHRLICH, L.; BUTTLE, D.; NAKATSUJI, T. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness, ***Science***, v. 211, p. 1052-1054, 1981.

BESSEAU, L.; COULOMB, B.; LEBRETON-DECOSTER, C.; GUILLE-GIRAUD, M. M. Production of ordered collagen matrices for three-dimensional cell culture, ***Biomaterials***, v. 23, p. 27-36, Dec.2001.

BODE, W.; MASKOS, K. Structural basis of the matrix metalloproteinases and their physiological inhibitors, the tissue inhibitors of metalloproteinases, ***Biological Chemistry***, v. 384, p. 863-872, June2003.

BONNETT, R. Photosensitizers of the Porphyrins and Phtalocyanine Series for Photodynamic Therapy, ***Chemical Society Reviews***, v. 60, p. 19-33, 1995.

BONNETT, R.; BERENBAUM, M. Porphyrins as photosensitizers, ***Ciba Foundation Symposium***, v. 146, p. 40-53, 1989.

BONNETT, R. **Chemical Aspects of Photodinamic Therapy - Chlorins and Bacteriochlorins** Advanced Chemistry Texts ed. London: Gordon and Breach Science Publischers, 2000, p. 176-197.

BOUKERROU, M.; RUBOD, C.; DEDET, B.; BOODHUM, R.; NAYAMA, M.; COSSON, M. Tissue resistance of the tension-free procedure: What about healing?, ***International Urogynecology Journal***, v. 19, p. 397-400, Mar.2008.

BULLEN, E. C.; LONGAKER, M. T.; UPDIKE, D. L.; BENTON, R.; LADIN, D.; HOU, Z.; HOWARD, E. W. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 is decreased and activated gelatinases are increased in chronic wounds, ***Journal of Investigative Dermatology***, v. 104, p. 236-240, Feb.1995.

BURDON, R. H. Superoxide and Hydrogen-Peroxide in Relation to Mammalian-Cell Proliferation, ***Free Radical Biology and Medicine***, v. 18, p. 775-794, Apr.1995.

CASTANO, A. P.; DAI, T. H.; YAROSLAVSKY, I.; COHEN, R.; APRUZZESE, W. A.; SMOTRICH, M. H.; HAMBLIN, M. R. Low-level laser therapy for zymosan-induced arthritis in rats: Importance of illumination time, ***Lasers in Surgery and Medicine***, v. 39, p. 543-550, July2007.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization, ***Photodiagnosis and Photodynamic Therapy***, v. 1, p. 279-293, 2004.

CATORZE, M. G. Laser: fundamentos e indicações em dermatologia, ***Medicina Cutánea Ibero-Latino-Americana***, v. 37, p. 5-27, 2009.

CHEN, Y.; LIU, H. R.; ZHANG, Z. C.; WANG, S. J. Preparation of polymeric nanocapsules by radiation induced miniemulsion polymerization, ***European Polymer Journal***, v. 43, p. 2848-2855, July2007.

CLARK, R. A. F. Cutaneous Tissue-Repair - Basic Biologic Considerations .1, ***Journal of the American Academy of Dermatology***, v. 13, p. 701-725, 1985.

COLIC, M. M.; VIDOJKOVIC, N.; JOVANOVIC, M.; LAZOVIC, G. The use of polarized light in aesthetic surgery, ***Aesthetic Plastic Surgery***, v. 28, p. 324-327, Sept.2004.

COULOMB, B.; DUBERTRET, L.; BELL, E.; MERRILL, C.; FOSSE, M.; BRETON-GORIUS, J.; PROST, C.; TOURAINE, R. Endogenous peroxidases in normal human dermis: a marker of fibroblast differentiation, ***Journal of Investigative Dermatology***, v. 81, p. 75-78, July1983a.

COULOMB, B.; DUBERTRET, L.; MERRILL, C.; TOURAINE, R.; BELL, E. The Collagen Lattice - A Physiological Model for Studying Fibroblasts, ***Journal of Investigative Dermatology***, v. 80, p. 324, 1983b.

COUSSENS, L. M.; FINGLETON, B.; MATRISIAN, L. M. Cancer therapy - Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: Trials and tribulations, ***Science***, v. 295, p. 2387-2392, Mar.2002.

COUVREUR, P.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F. Controlled Drug Delivery with Nanoparticles: Current Possibilities and Trends Future, ***European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics***, v. 41, p. 2-13, July1994.

COUVREUR, P.; KANTE, B.; ROLAND, M.; GUIOT, P.; BAUDUIN, P.; SPEISER, P. Polycyanoacrylate Nanocapsules As Potential Lysosomotropic Carriers - Preparation, Morphological and Sorptive Properties, ***Journal of Pharmacy and Pharmacology***, v. 31, p. 331-332, 1979a.

COUVREUR, P.; KANTE, B.; ROLAND, M.; SPEISER, P. Adsorption of Anti-Neoplastic Drugs to Polyalkylcyanoacrylate Nanoparticles and Their Release in Calf Serum, ***Journal of Pharmaceutical Sciences***, v. 68, p. 1521-1524, 1979b.

DADRAS, S.; MOHAJERANI, E.; EFTEKHAR, F.; HOSSEINI, M. Different photoresponses of Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa to 514, 532, and 633 nm low level lasers in vitro, ***Current Microbiology***, v. 53, p. 282-286, Oct.2006.

DARWENT, J. R. Metal phthalocyanines and porphyrins as photosensitizers for reduction of water to hidrogen, ***Coordination Chemistry Reviews***, v. 44, p. 83-126, 1982.

DE PAOLI, V. M.; DE PAOLI, S. H.; BORISSEVITCH, L. E.; TEDESCO, A. C. Fluorescence lifetime and quantum yield of TMPyPH2 associated with micelles and DNA, ***Journal of Alloys and Compounds***, v. 344, p. 27-31, Oct.2002.

DE ROSA, F. S.; TEDESCO, A. C.; LOPEZ, R. F. V.; PIERRE, M. B. R.; LANGE, N.; MARCHETTI, J. M.; ROTTA, J. C. G.; BENTLEY, M. V. L. B. In vitro skin permeation and retention of 5-aminolevulinic acid ester derivatives for photodynamic therapy, ***Journal of Controlled Release***, v. 89, p. 261-269, Apr.2003.

DE ROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications, ***Coordination Chemistry Reviews***, v. 233-234, p. 351-371, 2002.

DELAEY, E.; VAN LAAR, F.; DE VOS, D.; KAMUHABWA, A.; JACOBS, P.; DE WITTE, P. A comparative study of the photosensitizing characteristics of some cyanine dyes, ***Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology***, v. 55, p. 27-36, 2000.

DEMAS, J. N.; CROSBY, G. A. Measurement of photoluminescence quantum yields, ***Journal of Physical Chemistry***, v. 75, p. 991-1024, 1971.

DESMOULIERE, A.; REDARD, M.; DARBY, I.; GABBIANI, G. Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar, ***American Journal of Pathology***, v. 146, p. 56-66, Jan.1995.

DIPIETRO, L. A. Wound healing: the role of the macrophage and other immune cells, ***Shock***, v. 4, p. 233-240, Oct.1995.

DOILLON, C. J.; DUNN, M. G.; BENDER, E.; SILVER, F. H. Collagen fiber formation in repair tissue: development of strength and toughness, ***Collagen and Related Research***, v. 5, p. 481-492, Dec.1985.

DOUGHERTY, T. J. Photodynamic Therapy (PDT) of malignant tumors, ***CRC Critical Reviews of Oncology/Hematology***, v. 2, p. 83-116, 1984.

DOUGHERTY, T. J. Photodynamic therapy: yearly review, ***Journal of Photochemistry and Photobiology***, v. 58, p. 895-900, 1993.

EATON, D. F. Reference Materials for Fluorescence Measurement, ***International Union of Pure and Applied Chemistry***, v. 60, p. 1107-1114, 1988.

EHRLICH, H. P.; WHITE Effects of increased concentrations of prostaglandin E levels with epidermolysis bullosa dystrophica recessive fibroblasts within a populated collagen lattice, ***Journal of Investigative Dermatology***, v. 81, p. 572-575, 1983.

FERNANDEZ, J. M.; BILGIN, M. D.; GROSSWEINER, L. I. Singlet oxygen generation by photodynamic agents, ***Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology***, v. 37, p. 131-140, 1997.

FERREIRA, M. C.; GAMEIRO, J.; NAGIB, P. R. A.; BRITO, V. N.; VASCONCELLOS, E. D. C.; VERINAUD, L. Effect of Low Intensity Helium-Neon (HeNe) Laser Irradiation on Experimental Paracoccidioidomycotic Wound Healing Dynamics, ***Photochemistry and Photobiology***, v. 85, p. 227-233, Jan.2009.

FLORENCE, A. T.; ATTWOOD, D. **Princípios Físico-Químicos em Farmácia** 3th ed. São Paulo: Edusp - Editora da Universidade de São Paulo, 2003, p. 8-732.

FOOTE, C. S. Definition of Type I and Type II photosensitized oxidation, ***Journal of Photochemistry and Photobiology***, v. 54, p. 659, 1991.

GABBIANI, G. Modulation of fibroblastic cytoskeletal features during wound healing and fibrosis, ***Pathology, Research & Practice***, v. 190, p. 851-853, Oct.1994.

GAILIT, J.; CLARK, R. A. Wound repair in the context of extracellular matrix, ***Current Opinion in Cell Biology***, v. 6, p. 717-725, Oct.1994.

GAY, R.; SWIDEREK, M.; NELSON, D.; ERNESTI, A. The Living Skin Equivalent As A Model Invitro for Ranking the Toxic Potential of Dermal Irritants, ***Toxicology in vitro***, v. 6, p. 303-315, July1992.

GOFF, B. A.; BACHOR, R.; KOLLIAS, N.; HASAN, T. Effects of Photodynamic Therapy with Topical Application of 5-Aminolevulinic Acid on Normal Skin of Hairless Guinea-Pigs, ***Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology***, v. 15, p. 239-251, Aug.1992.

GOMER, C. J. Preclinical examination of first and second generation photosensitizers used in photodynamic therapy, ***Journal of Photochemistry and Photobiology***, v. 34, p. 1093-1107, 1991.

GOMES, A. J. **Obtenção, caracterização e avalaliação de micropartículas de PLGA contendo indocianina e bacterioclorofila-*a* como sistemas de liberação de fármacos na terapia fotodinâmica**. 103 f. Tese Doutorado - FFCLRP - USP, Riberão Preto, 2003.

GUINEBRETIERE, S.; BRIANCON, S.; FESSI, H.; TEODORESCU, V. S.; BLANCHIN, M. G. Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy, ***Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems***, v. 21, p. 137-142, Sept.2002.

HELARY, B.; FOUCAULT-BERTAUD, A.; GODEAU, G.; COULOMB, B.; GUILLE, M. M. G. Fibroblast populated dense collagen matrices: cell migration, cell density and metalloproteinases expression, ***Biomaterials***, v. 26, p. 1533-1543, June2004.

HELARY, C.; OVTRACHT, L.; COULOMB, B.; GODEAU, G.; GIRAUD-GUILLE, M. M. Dense fibrillar collagen matrices: A model to study myofibroblast behavior during wound healing, ***Biomaterials***, v. 27, p. 4443-4452, May2006.

HOAR, T. P.; SCHULMAN, J. H. Biotechnology applied in drug delivery systems development: microemulsion and nanoemulsions, ***Nature***, v. 152, p. 102, 1943.

HOSTETLER, J. R.; BERGGREN, R. B.; BERZON, D. Modifications in Fibroblasts During Burn Wound Repair and Scar Formation - Light and Electron-Microscopic Study, ***Anatomical Record***, v. 181, p. 379, 1975.

HUGHES, G. A. Nanostructure-mediated drug delivery, ***Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine***, v. 1, p. 22-30, Oct.2004.

IDOWU, M.; NYOKONG, T. Photophysical and photochemical properties of zinc and aluminium phthalocyanines in the presence of magnetic fluid, ***Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry***, v. 188, p. 200-206, 2007.

IDOWU, M.; NYOKONG, T. Photophysical and photochemical properties of tetrasulfonated silicon and germanium phthalocyanines in aqueous and non-aqueous media, ***Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry***, v. 197, p. 273-280, 2008.

JAYASREE, R. S.; GUPTA, A. K.; RATHINAM, K.; MOHANAN, P. V.; MOHANTY, M. The influence of photodynamic therapy on the wound healing process in rats, ***Journal of Biomaterials Applications***, v. 15, p. 176-186, Jan.2001.

JENNING, V.; SCHÄFER-KORTING, M.; GOHLA, S. Vitamin A-loaded solid lipid nanoparticles for topical use: drug release properties, ***Journal of Controlled Release***, v. 66, p. 115-126, Oct.1999.

JIMENEZ, P. A.; JIMENEZ, S. E. Tissue and cellular approaches to wound repair, ***American Journal of Surgery***, v. 187, p. 56S-64S, May2004.

JORI, G. Photosensitized Processes in vivo - Proposed Phototherapeutic Applications, ***Photochemistry And Photobiology***, v. 52, p. 439-443, Aug.1990.

KARMAKAR, A.; CHAUDHURI, R.; BERA, S. C.; ROHATGIMUKHERJEE, K. K. Fluorescence Quenching and Flash-Photolysis Studies of Photoinduced Electron-Transfer Across Zn-Tetraphenyl Porphyrin-Encapsulated Liposomes - Evidences for Reductive Quenching by Edta, ***Indian Journal of Chemistry Section A-Inorganic Bio-Inorganic Physical Theoretical & Analytical Chemistry***, v. 34, p. 83-93, Feb.1995.

KARU, T. Photobiology of low-power laser effects, ***Health Physics***, v. 56, p. 691-704, May1989.

KARU, T.; PYATIBRAT, L.; KALENDO, G. Irradiation with He-Ne-Laser Can Influence the Cytotoxic Response of Hela-Cells to Ionizing-Radiation, ***International Journal of Radiation Biology***, v. 65, p. 691-697, June1994.

KARU, T. I. Molecular mechanism of the therapeutic effect of low-intensity laser radiation, ***Lasers in the Life Sciences***, v. 2, p. 53-74, 1988.

KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy, ***Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology***, v. 66, p. 89-106, Nov.2001.

KOYAMA, H.; RAINES, E. W.; BORNFELDT, K. E.; ROBERTS, J. M.; ROSS, R. Fibrillar collagen inhibits arterial smooth muscle proliferation through regulation of Cdk2 inhibitors, ***Cell***, v. 87, p. 1069-1078, Dec.1996.

KRASNOVSKY JR, A. A.; NEVEROV, K. V.; EGOROV, Y. Photophysical studies of phephorbide a and pheophytin a. Phosphorescence and photosensitized singlet oxygen luminescence, ***Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology***, v. 5, p. 245-254, Aug.1989.

KRUK, N. N.; DZHAGAROV, B. M.; GALIEVSKY, V. A.; CHIRVONY, V. S.; TURPIN, P. Photophysics of the cationic 5,10,15,20-tetrakis(4-*N*-methylpyridyl)porphyrin bound to DNA, $[poly(dA\text{-}dT)]_2$ and $[poly(dG\text{-}dC]_2$: interaction with molecular oxygen studied by porphyrin triplet-triplet absorption and singlet oxygen luminescence, ***Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology***, v. 42, p. 181-190, Jan.1998.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy** 2 ed. Baltimore, Maryland: Kluwer Academic, 1999, p. 1-362.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue Engineering, ***Science***, v. 260, p. 920-926, May1993.

LENAERTS, V.; LABIB, A.; CHOUINARD, F.; ROUSSEAU, J.; ALI, H.; VAN LIER, J. Nanocapsules with a Reduced Liver Uptake: Targeting of Phthalocyanines to EMT-6 Mouse Mammary Tumor in vivo, ***European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics***, v. 41, p. 38-43, Apr.1994.

LIPKA, D.; BORATYNSKI, J. Metalloproteinases. Structure and function, ***Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej***, v. 62, p. 328-336, 2008.

LYSAGHT, M. J.; NGUY, N. A. P.; SULLIVAN, K. An economic survey of the emerging tissue engineering industry, ***Tissue Engineering***, v. 4, p. 231-238, 1998.

MACAROFF, P. P.; PRIMO, F. L.; DE AZEVEDO, R. B.; LACAVA, Z. G. M.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Synthesis and characterization of a magnetic nanoemulsion as a promising candidate for cancer treatment, ***I E E E Transactions on Magnetics***, v. 42, p. 3596-3598, Oct.2006.

MAILANDER, V.; LANDFESTER, K. Interaction of Nanoparticles with Cells, ***Biomacromolecules***, v. 10, p. 2379-2400, Sept.2009.

MALGRANGE, D. Physiopathology of the diabetic foot, ***Revue de Medecine Interne***, v. 29, p. S231-S237, Sept.2008.

MANDELBAUM, S. H.; DI SANTIS, E. P.; MANDELBAUM, M. H. S. Cicatrization: current concepts and auxiliary resources - Part I, ***Anais Brasileiros de Dermatologia***, v. 78, p. 393-410, 2003.

MATHURIA, J. P. Nanoparticles in Tuberculosis Diagnosis, Treatment and Prevention: A Hope for Future, ***Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures***, v. 4, p. 309-312, June2009.

MCCAWLEY, L. J.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore!, ***Current Opinion in Cell Biology***, v. 13, p. 534-540, Oct.2001.

MEDRADO, A. R. A. P.; PUGLIESE, L. S.; REIS, S. R. A.; ANDRADE, Z. A. Influence of low level laser therapy on wound healing and its biological action upon myofibroblasts, ***Lasers in Surgery and Medicine***, v. 32, p. 239-244, 2003.

MESTER, A. F.; MESTER, A. When and How to Use Laser Biostimulation, ***Lasers in Surgery and Medicine***, v. 6, p. 170-171, 1986.

MESTER, E. A laser sugar alkamazaea a gyogyaezatban, ***Orv Hetilap***, v. 107, p. 1012, 1966.

MESTER, E.; MESTER, A. F.; MESTER, A. The Biomedical Effects of Laser Application, ***Lasers in Surgery and Medicine***, v. 5, p. 31-39, 1985.

MICHALOWSKI, C. B.; GUTERRES, S. S.; COSTA, T. D. Microdialysis for evaluating the entrapment and release of a lipophilic drug from nanoparticles, ***Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*** Apr.2004.

MODI, G.; PILLAY, V.; CHOONARA, Y. E.; NDESENDO, V. M. K.; DU TOIT, L. C.; NAIDOO, D. Nanotechnological applications for the treatment of neurodegenerative disorders, ***Progress in Neurobiology***, v. 88, p. 272-285, Aug.2009.

MURPHY, G.; NAGASE, H. Progress in matrix metalloproteinase research, ***Molecular Aspects of Medicine***, v. 29, p. 290-308, Oct.2008.

NELSON, K. K.; MELENDEZ, J. A. Mitochondrial redox control of matrix metalloproteinases, ***Free Radical Biology and Medicine***, v. 37, p. 768-784, Sept.2004.

NOE, V.; FINGLETON, B.; JACOBS, K.; CRAWFORD, H. C.; VERMEULEN, S.; STEELANT, W.; BRUYNEEL, E.; MATRISIAN, L. M.; MAREEL, M. Release of an invasion promoter E-cadherin fragment by matrilysin and stromelysin-1, ***Journal of Cell Science***, v. 114, p. 111-118, Jan.2001.

NUNES, S. M.; SGUILLA, F. S.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives, ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research***, v. 37, p. 273-284, Feb.2004.

NUNES, S. M. T. ***Uso Potencial de LDE e Microesferas de Albumina como sistemas liberadores de ftalocianinas e clorinas ativas na Terapia***

Fotodinâmica de neoplasias. Dissertação Mestrado - FFCLRP-USP, Ribeirão Preto-SP, 2000.

NUNES, S. M. T. **A potencialidade do uso de diferentes sistemas de liberação de fármacos na Terapia Fotodinâmica: Preparação e estudos Fotofísicos**. 84 f. Tese Doutorado - FFCLRP-USP, Ribeirão Preto-SP, 2003.

OCHEKPE, N. A.; OLORUNFEMI, P. O.; NGWULUKA, N. C. Nanotechnology and Drug Delivery Part 2: Nanostructures for Drug Delivery, ***Tropical Journal of Pharmaceutical Research***, v. 8, p. 275-287, June2009.

OKADA, A.; TOMASETTO, C.; LUTZ, Y.; BELLOCQ, J. P.; RIO, M. C.; BASSET, P. Expression of matrix metalloproteinases during rat skin wound healing: evidence that membrane type-1 matrix metalloproteinase is a stromal activator of pro-gelatinase A, ***Journal of Cell Biology***, v. 137, p. 67-77, Apr.1997.

OKAMOTO, H.; IWASE, T.; MORIOKA, T. Dye-Mediated Bactericidal Effect of He-Ne-Laser Irradiation on Oral Microorganisms, ***Lasers in Surgery and Medicine***, v. 12, p. 450-458, 1992.

OLIVEIRA, A. G.; SCARPA, M. V.; CORREA, M. A.; CERA, L. F. R.; FORMARIZ, T. P. Microemulsões: estrutura e aplicações como sistema de liberação de fármacos, ***Quimica Nova***, v. 27, p. 131-138, 2003.

OLIVEIRA, D. M. **Estudos Sinergicos 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.

OLIVEIRA, D. M.; LACAVA, Z. G. M.; LIMA, E. C. D.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Zinc Phthalocyanine/Magnetic Fluid Complex: A Promising Dual Nanostructured System for Cancer Treatment, ***Journal of Nanoscience and Nanotechnology***, v. 6, p. 2432-2437, 2006.

OVERALL, C. M. Molecular determinants of metalloproteinase substrate specificity - Matrix metalloproteinase substrate binding domains, modules, and exosites, ***Molecular Biotechnology***, v. 22, p. 51-86, Sept.2002.

OVERALL, C. M.; KLEIFELD, O. Tumour microenvironment - Opinion - Validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy, ***Nature Reviews Cancer***, v. 6, p. 227-239, Mar.2006.

PAREKH, S. G.; TRAUNER, K. B.; ZARINS, B.; FOSTER, T. E.; ANDERSON, R. R. Photodynamic modulation of wound healing with BPD-MA and GASP, ***Lasers in Surgery and Medicine***, v. 24, p. 375-381, 1999.

PARKS, W. C. Matrix metalloproteinases in repair, ***Wound Repair and Regenaration***, v. 7, p. 423-432, Nov.1999.

PATRI, A. K.; MAJOROS, I. J.; BACKER JR, J. R. Dendritic Polymer Macromolecular Carriers for Drug Delivery, ***Current Opinion in Chemical Biology***, v. 6, p. 466-471, 2002.

PAZOS, M. D. C.; NADER, H. B. Effect of photodynamic therapy on the extracellular matrix and associated components, ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research***, v. 40, p. 1025-1035, Aug.2007.

PONEC, M. Reconstruction of Human Epidermis on De-Epidermized Dermis - Expression of Differentiation-Specific Protein Markers and Lipid-Composition, ***Toxicology in Vitro***, v. 5, p. 597-606, 1991.

PRIMO, F. L.; BENTLEY, M. V. L. B.; TEDESCO, A. C. Photophysical studies and in vitro skin permeation/retention of Foscan (R)/nanoemulsion (NE) applicable to photodynamic therapy skin cancer treatment, ***Journal of Nanoscience and Nanotechnology***, v. 8, p. 340-347, Jan.2008a.

PRIMO, F. L.; MACAROFF, P. P.; LACAVA, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Binding and photophysical studies of biocompatible magnetic

fluid in biological medium and development of magnetic nanoemulsion: A new candidate for cancer treatment, ***Journal of Magnetism and Magnetic Materials***, v. 310, p. 2838-2840, Mar.2007a.

PRIMO, F. L.; SIMIONI, A. R.; COULOMB, B.; TEDESCO, A. C. LASER stimulation on fibroblasts WI-26 based on photodynamic processes, ***Wound Repair and Regeneration***, v. 16, p. A80, Nov.2008b.

PRIMO, F. L.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; SIMIONI, A. R.; PETI, A. P. F.; TEDESCO, A. C. Preparation, characterization and citotoxicity assays of chloroaluminum phthalocyanine photosensitizer drug loaded in PLGA-nanocapsules, ***Drugs of the Future***, v. 32, p. 74, July2007b.

REDDY, G. K.; ENWEMEKA, C. S. A Simplified Method for the Analysis of Hydroxyproline in Biological Tissues, ***Clinical Biochemistry***, v. 29, p. 225-229, 1996.

REGNIER, M.; DARMON, M.; SCHAEFER, H. Human Epidermis Reconstructed Invitro As A Model for Studying Epidermal Permeability - Effect of Modulators of Keratinocyte Differentiation, ***Journal of Investigative Dermatology***, v. 95, p. 485, Oct.1990.

REINDL, S.; PENZKOFER, A. Higher excited-state triplet-singlet intersystem crossing of some organic dyes, ***Chemical Physics***, v. 211, p. 431-439, Nov.1996a.

REINDL, S.; PENZKOFER, A. Triplet quantum yield determination by picosecond laser double-pulse fluorescence excitation, ***Chemical Physics***, v. 213, p. 429-438, Dec.1996b.

RIES, W. R.; SPEYER, M. T. Cutaneous applications of lasers., ***Otolaryngologic Clinics of North America***, v. 29, p. 915-929, 1996.

ROSEN, Y.; ELMAN, N. M. Carbon nanotubes in drug delivery: focus on infectious diseases, ***Expert Opinion on Drug Delivery***, v. 6, p. 517-530, May2009.

SACHLOS, E.; CZERNUSZKA, J. T. Making tissue engineering scaffolds work. Review on the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffold, ***European Cells and Materials***, v. 5, p. 29-40, 2003.

SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; PONTES, A.; PEREIRA, V. M. W.; CAETANO, M. N. P. Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules, ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 208, p. 71-80, Aug.2000.

SARIKAYA, M.; TAMERLER, C.; JEN, A. K.-Y.; SCHULTEN, K.; BANEYX, F. Molecular biomimetics: nanotechnology through biology, ***Nature Materials***, v. 2, p. 577-585, Sept.2003.

SAYGUN, I.; KARACAY, S.; SERDAR, M.; URAL, A. U.; SENCIMEN, M.; KURTIS, B. Effects of laser irradiation on the release of basic fibroblast growth factor (bFGF), insulin like growth factor-1 (IGF-1), and receptor of IGF-1 (IGFBP3) from gingival fibroblasts, ***Lasers in Medical Science***, v. 23, p. 211-215, Apr.2008.

SCHINDL, A.; MERWALD, H.; SCHINDL, L.; KAUN, C.; WOJTA, J. Direct stimulatory effect of low-intensity 670 nm laser irradiation on human endothelial cell proliferation, ***British Journal of Dermatology***, v. 148, p. 334-336, Feb.2003.

SCHULMAN, J. H.; STOECKENIUS, W.; PRINCE, L. M.***Journal of Physical Chemistry***, v. 63, p. 1677, 1959.

SEGUIER, S.; GOGLY, B.; BODINEAU, A.; GODEAU, G.; BROUSSE, N. Is collagen breakdown during periodontitis linked to inflammatory cells and expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in human gingival tissue?, ***Journal of Periodontology***, v. 72, p. 1398-1406, Oct.2001.

SHALAK R. e C. FOX. **Tissue Engineering, Proceedings - Workshop Held at Granlibakken**, California - New York: Alan Liss, Feb 1988. 26-29.

SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J. E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications, ***Drug Discovery Today***, v. 4, p. 507-517, 1999.

SHARWANI, A.; JERJES, W.; HOPPER, C.; LEWIS, M. P.; EL MAAYTAH, M.; KHALIL, H. S. M.; MACROBERT, A. J.; UPILE, T.; SALIH, V. Photodynamic therapy down-regulates the invasion promoting factors in human oral cancer, ***Archives of Oral Biology***, v. 51, p. 1104-1111, Dec.2006.

SHIM, J.; KANG, H. S.; PARK, W.; HAN, S.; KIM, J.; CHANG, I. Transdermal delivery of mixnoxidil with block copolymers nanoparticles, ***Journal of Controlled Release***, v. 97, p. 477-484, Mar.2004.

SILVA, J. C.; LACAVA, Z. G. M.; KUCKELHAUS, S.; SILVA, L. P.; NETO, L. F. M.; SAURO, E. E.; TEDESCO, A. C. Evaluation of the use of Low level laser and photosensitizers drugs in healing, ***Laser in Surgery and Medicine***, v. in press, 2004.

SIMIONI, A. R.; COULOMB, B.; COUTY, L.; TEDESCO, A. C. Photodynamic Therapy Preserves Elastic Network from Degradation in An Ex Vivo Human Skin Model, ***Wound Repair and Regeneration***, v. 17, p. A80, July2009.

SIMIONI, A. R.; PRIMO, F. L.; RODRIGUES, M. M. A.; LACAVA, Z. G. M.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Preparation, characterization and in vitro toxicity test of magnetic nanoparticle-based drug delivery system to hyperthermia of biological tissues, ***I E E E Transactions on Magnetics***, v. 43, p. 2459-2461, June2007a.

SIMIONI, A. R.; PRIMO, F. L.; ZANCANELA, D. C.; RODRIGUES, M. M. A.; TEDESCO, A. C. Silicon(IV) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles as biodegradable drug delivery system for Photodynamic Therapy use, ***Drugs of the Future***, v. 32, p. 73-74, July2007b.

SIMPLÍCIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos, Aplicações e Avanços Recentes no Desenvolvimento de Medicamentos, ***Quimica Nova***, v. 25, p. 801-807, Dec.2001.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. F. Mechanisms of disease - Cutaneous wound healing, ***New England Journal of Medicine***, v. 341, p. 738-746, Sept.1999.

SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; PETI, A. P. F.; TEDESCO, A. C. Validated spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination of chloroaluminum phthalocyanine in nanocarriers, ***Die Pharmazie***, v. in press, 2009.

SKOPIN, M. D.; MOLITOR, S. C. Effects of near-infrared laser exposure in a cellular model of wound healing, ***Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine***, v. 25, p. 75-80, Apr.2009.

SOBOLEV, A. S.; JANS, D. A.; ROSENKRANZ, A. A. Targeted intracellular delivery of photosensitizers, ***Progress in Biophycs e Molecular Biology***, v. 73, p. 51-90, Mar.2004.

SOO, C.; SHAW, W. W.; ZHANG, X.; LONGAKER, M. T.; HOWARD, E. W.; TING, K. Differential expression of matrix metalloproteinases and their tissue-derived inhibitors in cutaneous wound repair, ***Plastic and Reconstructive Surgery***, v. 105, p. 638-647, Feb.2000.

SOPPIMATH, K. S.; AMINABHAVI, T. M.; KULKARNI, A. R.; AMINABHAVI, T. M. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices, ***Journal of Controlled Release***, v. 70, p. 1-20, Dec.2000.

SOUSA, L. R.; CAVALCANTI, B. N.; MARQUES, M. M. Effect of Laser Phototherapy on the Release of TNF-alpha and MMP-1 by Endodontic Sealer-Stimulated Macrophages, ***Photomedicine and Laser Surgery***, v. 27, p. 37-42, Feb.2009.

SOUZA, C. S.; FELICIO, L. B. A.; BENTLEY, M. V.; TEDESCO, A. C.; FERREIRA, J.; KURACHI, C.; BAGNATO, V. S. Topical photodynamic therapy for Bowen's disease of the digit in epidermolysis bullosa, ***British Journal of Dermatology***, v. 153, p. 672-674, Sept.2005.

STEGMAN, S. J.; TROMOVITCH, T. A. Cosmetic Dermatologic Surgery, ***Archives of Dermatology***, v. 118, p. 1013-1016, 1982.

STELUTI, R.; DE ROSA, F. S.; COLLETT, J.; TEDESCO, A. C.; BENTLEY, M. V. L. B. Topical glycerol monooleate/propylene glycol formulations enhance 5-aminolevulinic acid in vitro skin delivery and in vivo protophorphyrin IX accumulation in hairless mouse skin, ***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics***, v. 60, p. 439-444, Aug.2005.

STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRUCKNER, C. Porphyrin-based photosensitizers for use in Photodynamic Therapy, ***Tetrahedron***, v. 54, p. 4151-4202, 1998.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior, ***Annual Review of Cell and Developmental Biology***, v. 17, p. 463-516, 2001.

STILMAN, M. J. **Phthalocyanines: Properties and Applications** Ney York City: VCH Publishers, 1989.

SWARNALATHA, S.; SELVI, P. K.; KUMAR, A. G.; SEKARAN, G. Nanoemulsion drug delivery by ketene based polyester synthesized using electron rich carbon/silica composite surface, ***Colloids and Surfaces B-Biointerfaces***, v. 65, p. 292-299, Sept.2008.

TABOSA DO EGITO, Yu. W.; BARRAT, E. S.; FESSI, J. P.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. A novel approach to the preparation of injectable emulsions by spontaneous emulsification process, ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 89, p. 139-146, 1993.

TAFUR, J.; MILLS, P. J. Low-intensity light therapy: Exploring the role of redox mechanisms, ***Photomedicine and Laser Surgery***, v. 26, p. 323-328, Aug.2008.

TAM, G. Low power laser therapy and analgesic action, ***Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery***, v. 17, p. 29-33, Feb.1999.

TEDESCO, A. C.; ROTTA, J. C. G.; LUNARDI, C. N. Synthesis, Photophysical and Photochemical Aspects of Phthalocyanines for Photodynamic Therapy, ***Current Organic Chemistry***, v. 7, p. 187-196, 2003a.

TEDESCO, A. C. **Avaliação do uso de laser de baixa potência e agentes fotossensibilizadores no tratamento de feridas e/ou outras doenças cutâneas**. 123 f. Insitut National de la Sante el de la Recherche Medicale: Institute de Recherche sur la Peau, Paris, França, 2005.

TEDESCO, A. C.; MARTINEZ, L.; GONZALEZ, S. Photochemistry and photobiology of actinic erythema: Defensive and reparative cutaneous mechanisms, ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research***, v. 30, p. 561-575, May1997.

TEDESCO, A. C.; OLIVEIRA, D. M.; LACAVA, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; LIMA, E. C. D.; GANSAU, C.; BUSKE, N.; MORAIS, P. C. Determination of binding constant K-b of biocompatible, ferrite-based magnetic fluids to serum albumin, ***Journal of Applied Physics***, v. 93, p. 6704-6706, May2003b.

TEIXEIRA, Z. **Preparação e caracterização de nanocápsulas de poly(D,L-lactídeo) no encapsulamento de palmitato de retinila**. 80 f. Tese de Doutorado - Institudo de Química - UNICAMP, Campinas - SP,2009.

TURCHIELLO, R. F.; VENA, F. C. B.; MAILLARD, P.; SOUZA, C. S.; BENTLEY, M. V. B. L.; TEDESCO, A. C. Cubic phase gel as a drug delivery system for topical application of 5-ALA, its ester derivatives and m-THPC in photodynamic therapy (PDT), ***Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology***, v. 70, p. 1-6, Apr.2003.

VAALAMO, M.; MATTILA, L.; JOHANSSON, N.; KARINIEMI, A. L.; KARJALAINEN-LINDSBERG, M. L.; KAHARI, V. M.; SAARIALHO-KERE, U. Distinct populations of stromal cells express collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) in chronic

ulcers but not in normally healing wounds, ***Journal of Investigative Dermatology***, v. 109, p. 96-101, July1997.

VAALAMO, M.; WECKROTH, M.; PUOLAKKAINEN, P.; KERE, J.; SAARINEN, P.; LAUHARANTA, J.; SAARIALHO-KERE, U. K. Patterns of matrix metalloproteinase and TIMP-1 expression in chronic and normally healing human cutaneous wounds, ***British Journal of Dermatology,*** v. 135, p. 52-59, July1996.

VALEUR, B. **Molecular Fluorescence: Principles and Applications** Weinheim (Federal Republic of Germany): Wiley-YCH, 2001, p. 1-799.

VAN HERRIKHUIZEN, J.; JANSSEN, R. A. J.; MEIJER, E. W.; MESKERS, S. C. J.; SCHENNING, A. P. H. J. Fractal-like Self-Assembly of Oligo(p-phenylene vinylene) Capped Gold Nanoparticles, ***Journal of American Chemistry Society***, v. 128, p. 686-687, Dec.2005.

WANG, J. C.; CHEN, S. H.; XU, Z. C. Synthesis and properties research on the nanocapsulated capsaicin by simple coacervation method, ***Journal of Dispersion Science and Technology***, v. 29, p. 687-695, 2008.

WHEELAND, R. G. Lasers for the Stimulation Or Inhibition of Wound-Healing, ***Journal of Dermatologic Surgery and Oncology***, v. 19, p. 747-752, Aug.1993.

WISSING, S. A.; MÜLLER, R. H. The influence of solid lipid nanoparticles on skin hydration and viscoelasticity - in vivo study, ***European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceuts***, v. 56, p. 67-72, Feb.2003.

WONGSAGONSUP, R.; SHOBSNGOB, S.; OONKHANOND, B.; VARAVINITA, S. Zeta potential (zeta) analysis for the determination of protein content in rice flour, ***Starch-Starke***, v. 57, p. 25-31, Jan.2005.

WU, C. S.; HU, S. C. S.; LAN, C. C. E.; CHEN, G. S.; CHUO, W. H.; YU, H. S. Low-energy helium-neon laser therapy induces repigmentation and improves the

abnormalities of cutaneous microcirculation in segmental-type vitilligo lesions, ***Kaohsiung Journal of Medical Sciences***, v. 24, p. 180-188, Apr.2008.

WU, H.; RAMACHANDRAN, C.; BIELINSKA, A. U.; KINGZETT, K.; SUN, R.; WEINER, N. D.; ROESSLER, B. J. Topical transfenction using plasmid DNA in a water-in-oil nanoemulsion, ***International Journal of Pharmaceutics***, v. 221, p. 23-34, Mar.2001.

YAMAGUCHI, Y.; NAGASAWA, T.; NAKAMURA, N.; TAKENAGA, M.; MIZOGUCHI, M.; KAWAI, S.; MIZUSHIMA, Y.; IGARASHI, R. Successful treatment of photo-damaged skin of nano-scale atRA particles using a novel transdermal delivery, ***Journal of Controlled Release***, v. 104, p. 29-40, Nov.2004.

YAMAMOTO, H. M.; ITO, H.; SHIGETO, K.; TSUKAGOSHI, K.; KATO, R. Direct Formation of Micro-/Nanocrystalline 2,5-Dimethyl-N,N¢-dicyanoquinonediimine Complexes on SiO2/Si Substrates and Multiprobe Measurement of Conduction Properties, ***Journal of American Chemistry Society***, v. 128, p. 700-701, Dec.2005.

YANG, H.; ZHANG, Z.; HAN, Z.; YAO, S. An investigation of the triplet state of pheophorbide a using laser flash photolysis, ***Dyes and Pigments***, v. 46, p. 139-143, Apr.2000.

YANG, H. Y.; LI, M. F.; ZHANG, W. G.; ZHAO, H. X.; ZHANG, Z. Y. Characteristics of photosensitization of Pheophorbide a in liposomal media, ***Science in China Series C-Life Sciences***, v. 42, p. 471-480, Oct.1999.

YANG, L.; WEBSTER, T. J. Nanotechnology controlled drug delivery for treating bone diseases, ***Expert Opinion on Drug Delivery***, v. 6, p. 851-864, Aug.2009.

YOUNG, S.; BOLTON, P.; DYSON, M.; HARVEY, W.; DIAMANTOPOULOS, C. Macrophage Responsiveness to Light Therapy, ***Lasers in Surgery and Medicine***, v. 9, p. 497-505, 1989.

YU, C. L.; CHEN, S.; ZHANG, M. H.; SHEN, T. Spectroscopic studies and photodynamic actions of hypocrellin B in liposomes, ***Photochemistry and Photobiology***, v. 73, p. 482-488, May2001.

ZYCINSKI, P.; KRZEMINSKA-PAKULA, M.; PESZYNSKI-DREWS, C.; KIERUS, A.; TRZOS, E.; RECHCINSKI, T.; FIGIEL, L.; KURPESA, M.; PLEWKA, M.; CHRZANOWSKI, L.; DROZDZ, J. Laser biostimulation in end-stage multivessel coronary artery disease - a preliminary observational study, ***Kardiologia Polska***, v. 65, p. 13-23, Jan.2007.