

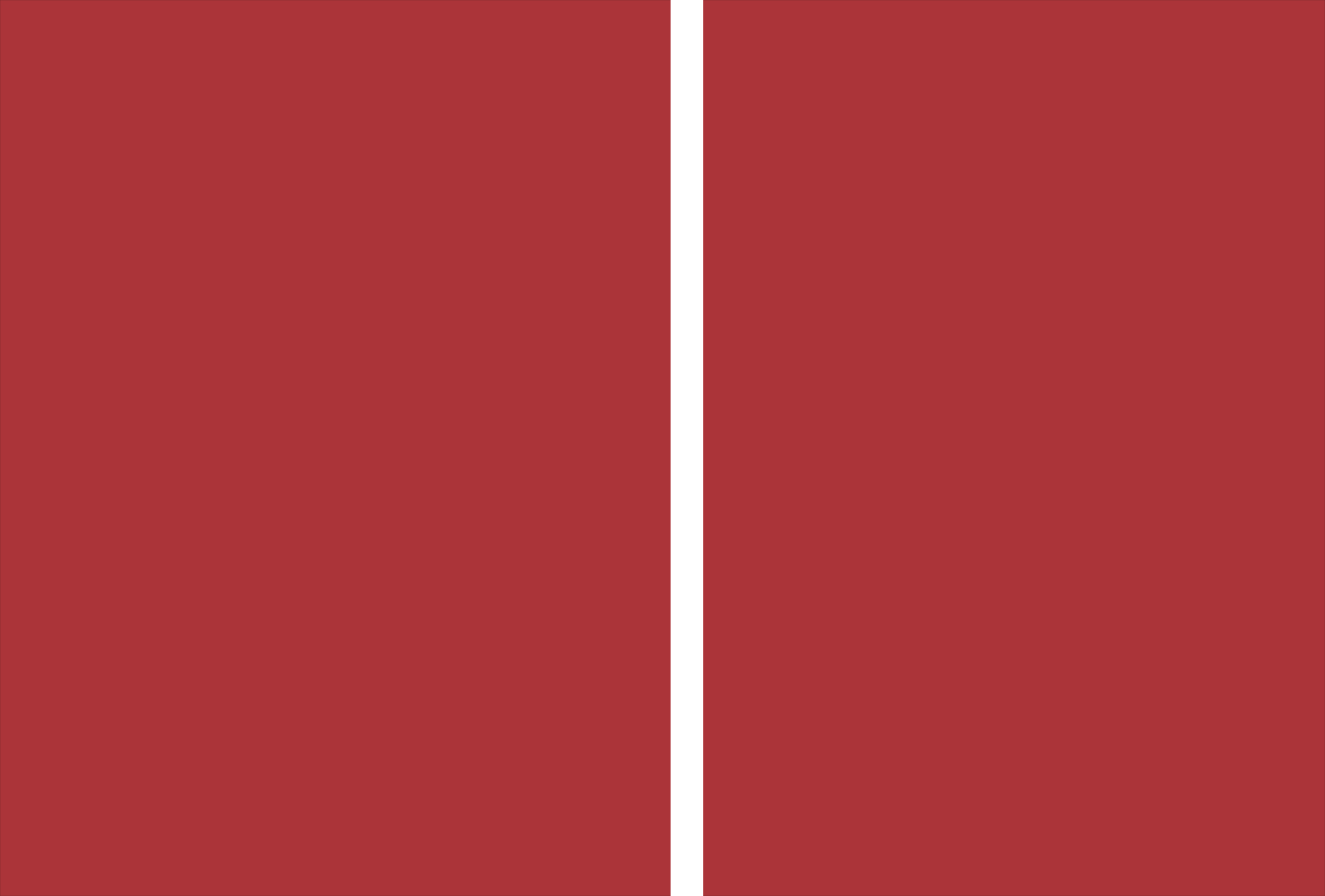


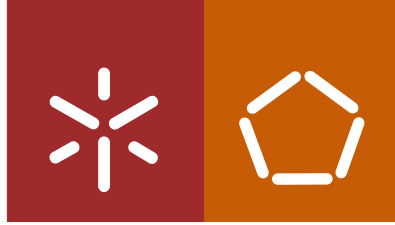
**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

José Artur Oliveira Rodrigues

**Terapia em dispositivos médicos invasivos  
com imagem**







**Universidade do Minho**  
Escola de Engenharia

José Artur Oliveira Rodrigues

## **Terapia em dispositivos médicos invasivos com imagem**

Tese de Doutoramento em Engenharia Biomédica

Trabalho efetuado sob a orientação do  
**Professor Doutor José Higinio Gomes Correia**

## DECLARAÇÃO DE INTEGRIDADE

Declaro ter atuado com integridade na elaboração da presente tese. Confirmo que em todo o trabalho conducente à sua elaboração não recorri à prática de plágio ou a qualquer forma de falsificação de resultados.

Mais declaro que tomei conhecimento integral do Código de Conduta Ética da Universidade do Minho.

Universidade do Minho, 25 / 01 / 2019

**Nome completo:** José Artur Oliveira Rodrigues

Assinatura: José Artur Oliveira Rodrigues



---

## **Agradecimentos**

A realização desta tese de doutoramento foi uma caminhada longa e difícil. Durante este período, os momentos de alegria foram muitas vezes polvilhados com alguns de relutância. De facto, um projeto como este não poderia ser realizado sozinho. Como tal, gostava de expressar alguns agradecimentos.

Em primeiro lugar, expresso um sincero e profundo agradecimento ao meu orientador professor doutor José Higinio Correia pela orientação, conselhos e disponibilidade sempre demonstrada ao longo deste percurso. Muito obrigado por tudo!

Ao professor Hélder Puga o meu muito obrigado pela disponibilidade, conselhos e apoio nos trabalhos de fabrico pelo processo de microfundição.

Agradeço também ao Manuel Silva por todas as considerações importantes sobre o trabalho, bem como pela amizade, presença contínua e apoio durante todo este período, e a todos os colegas de laboratório.

Um agradecimento especial às pessoas que me ajudaram diretamente nos trabalhos realizados, nomeadamente ao Ricardo Amorim e à Sara Granja pela ajuda prestada na execução dos testes em cultura de células, realizados nos laboratórios do Instituto de Investigação em Ciências da Vida e Saúde (ICVS) da Escola de Medicina da Universidade do Minho; ao Vítor Lopes e à Joana Machado pela ajuda nos vazamentos de microfundição realizados no Laboratório de Fundição do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade do Minho.

Por fim, agradeço à minha família por toda a paciência, apoio e força que me deram, especialmente nos momentos mais difíceis. Obrigado por tudo!

---

O autor, José Artur Oliveira Rodrigues, teve o apoio financeiro da FCT - Fundação para a Ciência e Tecnologia, no âmbito da bolsa de doutoramento com a referência SFRH/BD/103643/2014.



---

## Resumo

Os dispositivos médicos invasivos são amplamente utilizados em diversas especialidades médicas, sendo essenciais na prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças.

O aparecimento da cápsula endoscópica (CE) veio revolucionar totalmente a endoscopia digestiva uma vez que permite a realização de um exame indolor, sem administração de anestesia e a visualização de todo o trato gastrointestinal, o que não acontece na endoscopia convencional. No entanto, apresenta ainda algumas limitações, como a incapacidade de realizar terapia. A integração de técnicas de terapia na CE é um avanço importante para a nova geração de CEs terapêuticas.

Esta tese de doutoramento representa os primeiros passos para a integração de duas modalidades terapêuticas na CE: a terapêutica fotodinâmica (TFD) e o plasma de árgon neutro (PAN). A TFD utiliza um agente fotossensível e luz com um comprimento de onda específico para destruir células tumorais. O agente fotossensível é ativado pela luz, produzindo espécies de oxigênio reativo que exercem uma atividade citotóxica sobre as células tumorais. O PAN permite a coagulação de tecidos através de um fluxo eletricamente neutro de gás ionizado (árgon). Uma baixa tensão elétrica ioniza o árgon, produzindo um plasma de alta energia eletricamente neutro.

Foram realizados ensaios experimentais *in vitro* em duas linhas celulares do carcinoma colorretal humano, RKO e HCT-15, para avaliar o efeito da TFD mediada pelo mTHPC. Nestes ensaios foram utilizadas concentrações de mTHPC de 0.5, 1, 5 e 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e fluências de luz de 2.5, 5 e 10  $\text{J}/\text{cm}^2$ , a uma taxa de fluência de luz de 11  $\text{mW}/\text{cm}^2$ . Construiu-se uma fonte de luz vermelha a 653 nm para ativação do mTHPC. Uma concentração de mTHPC de 1-5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  e uma fluência de luz de 2.5  $\text{J}/\text{cm}^2$  levaram aos melhores resultados experimentais. Demonstrou-se que a iluminação a baixa fluência de luz e taxa de fluência de luz leva a uma boa resposta fotodinâmica.

Foi projetado, simulado e fabricado um pequeno reservatório de árgon para integrar na CE. Este reservatório foi projetado para fornecer o fluxo de árgon necessário para a realização da técnica de PAN durante um curto tempo de tratamento (1-3 segundos). As simulações foram realizadas para estudar o comportamento estrutural do reservatório e prever a sua espessura mínima para suportar 7 bar de pressão. A microfundição assistida a vácuo demonstrou ser um processo de manufatura eficiente no fabrico de um pequeno reservatório de paredes finas. Foram realizados testes experimentais de pressão em três reservatórios de diferentes espessuras. Os resultados experimentais revelaram que um reservatório de alumínio com uma espessura de 367  $\mu\text{m}$  é capaz de suportar 7 bar de pressão interna.



---

---

## Abstract

Invasive medical devices are widely used in various medical domains, being essential in the prevention, diagnosis and treatment of diseases.

The appearance of endoscopic capsule (EC) has completely revolutionized the digestive endoscopy, since it allows a painless examination, without administration of anesthesia and visualization of the entire gastrointestinal tract, which does not happen in conventional endoscopy. However, the EC has some limitations, such as the inability of performing therapy. The integration of therapy techniques into the EC is an important breakthrough for the new generation of therapeutic ECs.

This PhD thesis represents the first steps towards integration of two therapeutic modalities in EC: photodynamic therapy (PDT) and neutral argon plasma (NAP). The PDT uses a photosensitizer and light with specific wavelength to destroy tumor cells. The photosensitizer is activated by light, producing reactive oxygen species which exert cytotoxic activity on tumor cells. The NAP allows the coagulation of tissues through an electrically neutral jet of ionized gas (argon). A low-power voltage ionizes the argon gas, thereby producing electrically neutral, high-energy argon plasma.

*In vitro* experimental assays were performed on two human colorectal carcinoma cell lines, RKO and HCT-15, to evaluate the effect of mTHPC-mediated PDT. In these assays, mTHPC concentrations of 0.5, 1, 5 e 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and light fluences of 2.5, 5 e 10  $\text{J}/\text{cm}^2$  at 11  $\text{mW}/\text{cm}^2$  of light fluence rate were used. A red light source at 653 nm was assembled for mTHPC activation. A mTHPC concentration of 1-5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and light fluence of 2.5  $\text{J}/\text{cm}^2$  led to the best experimental results. It has been shown that illumination at low light fluence and light fluence rate leads to a good photodynamic response.

A small argon reservoir was designed, simulated and made for integration into the EC. This reservoir was designed to provide the argon flow needed to perform the NAP technique during a short treatment time (1 – 3 seconds). The numerical simulations were performed to study the structural behavior of the reservoir and to predict its minimum thickness to withstand 7 bar of pressure. Microcasting assisted by vacuum technique shown to be an efficient manufacturing process for the fabrication of a small and thin-walled argon reservoir. Experimental pressure tests were carried out on three reservoirs with different thicknesses. The experimental results revealed that an aluminum reservoir with a thickness of 367  $\mu\text{m}$  is capable of withstanding 7 bar of internal pressure.

---

---

## Índice

AGRADECIMENTOS .....	V
RESUMO .....	VII
ABSTRACT .....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS .....	XIII
ÍNDICE DE TABELAS .....	XIX
LISTA DE ABREVIATURAS .....	XXI
LISTA DE SÍMBOLOS QUÍMICOS .....	XXII
LISTA DE GRANDEZAS .....	XXIII
<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 DISPOSITIVOS MÉDICOS .....	1
1.2 ENDOSCOPIA CONVENCIONAL .....	4
1.3 ENDOSCOPIA POR CÁPSULA .....	8
1.3.1 Estado da arte .....	9
1.3.2 Novas funcionalidades da cápsula endoscópica .....	13
1.4 TÉCNICAS DE TERAPIA ENDOSCÓPICA DA MUCOSA .....	20
1.4.1 Técnicas de resseção da mucosa .....	21
1.4.2 Técnicas de ablação da mucosa .....	21
1.5 MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS .....	22
1.6 ORGANIZAÇÃO DA TESE .....	24
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 1 .....	25
<b>2 TERAPÊUTICA FOTODINÂMICA .....</b>	<b>29</b>
2.1 ESTADO DA ARTE .....	29
2.2 PRINCÍPIOS DA TERAPÊUTICA FOTODINÂMICA .....	31
2.2.1 Terapêutica fotodinâmica na prática clínica .....	31
2.2.2 Reação fotodinâmica .....	32
2.2.3 Mecanismos de ação no tumor .....	33
2.3 LUZ, AGENTE FOTOSSENSÍVEL E OXIGÊNIO .....	34
2.3.1 Luz .....	34
2.3.2 Agentes fotossensíveis .....	37
2.3.3 Oxigênio .....	40

---

2.4 VANTAGENS E LIMITAÇÕES .....	40
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	42
<b>3 PLASMA DE ÁRGON E MICROFUNDIÇÃO .....</b>	<b>45</b>
3.1 PLASMA .....	45
3.2 COAGULAÇÃO COM PLASMA DE ÁRGON .....	46
3.3 PLASMA DE ÁRGON NEUTRO .....	49
3.4 PROCESSOS DE FABRICO DE DISPOSITIVOS MÉDICOS .....	51
3.4.1 Processos de fabrico subtrativos .....	52
3.4.2 Processos de fabrico aditivos .....	53
3.4.3 Processos de fabrico forçados .....	57
3.5 MICROFUNDIÇÃO .....	62
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 3 .....	64
<b>4 TRABALHO EXPERIMENTAL E RESULTADOS .....</b>	<b>67</b>
4.1 TERAPÊUTICA FOTODINÂMICA .....	67
4.1.1 Agente fotossensível .....	67
4.1.2 Fonte de luz .....	68
4.1.3 Cultura de células .....	72
4.1.4 Ensaios in vitro .....	73
4.1.5 Ensaios de viabilidade celular .....	75
4.1.6 Protótipo da CE para a TFD .....	80
4.2 FABRICO DO RESERVATÓRIO DE ÁRGON .....	84
4.2.1 Design do reservatório .....	84
4.2.2 Simulações FEM .....	86
4.2.3 Fabrico do reservatório por microfundição .....	88
4.2.4 Ensaios experimentais de pressão .....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 4 .....	103
<b>5 CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS .....</b>	<b>105</b>
5.1 CONCLUSÕES .....	105
5.2 TRABALHOS FUTUROS .....	106
<b>ANEXOS .....</b>	<b>109</b>

---

## Índice de figuras

<b>Figura 1.1</b> – Risco de um dispositivo médico.....	4
<b>Figura 1.2</b> – a) Componentes do endoscópio atual: 1) conector; 2) secção de flexão; 3) ponta do instrumento; 4) tubo de inserção; 5) secção de controlo. b) Componentes de um sistema endoscópico: 1) monitor para visualização das imagens; 2) centro de gestão de imagens e outros acessórios, como bomba de água e bomba de CO <sub>2</sub> ; 3) centro do sistema de vídeo (o processador de vídeo converte os sinais elétricos do endoscópio em sinais de vídeo, mostrando-os no monitor); 4) fonte de luz. c) Manipulo de controlo do endoscópio. d) Esquemático da ponta do endoscópio que mostra os componentes típicos dos endoscópios atuais. Adaptado de [5]. .....	8
<b>Figura 1.3</b> – Constituição da M2A: 1) redoma ótica; 2) suporte da lente; 3) lente de focagem; 4) LEDs de luz branca; 5) sensor de imagem CMOS; 6) duas baterias de óxido de prata; 7) transmissor de RF; 8) Antena [16]. .....	10
<b>Figura 1.4</b> – Vista frontal (a) e vista superior (b) das CEs disponíveis comercialmente, com a imagem correspondente a raio-X (c). Da esquerda para a direita: cápsula Agile, PillCam SB3, EndoCapsule, CapsoCam, MiroCam, OMOM, PillCam ES02, PillCam COLON2 [7]. .....	11
<b>Figura 1.5</b> – Mecanismos de locomoção interna da CE propostos por P. Valdastrì et al. (a), B. Kim et al. (b) e H. M. Kim et al. (c). .....	15
<b>Figura 1.6</b> – CE modificada com a inclusão de pequenos magnetes permanentes no seu interior [36]. .....	16
<b>Figura 1.7</b> – a) Cápsula para biópsia desenvolvida por W. H. Crosby e H. W. Kugler; b) radiografia abdominal de um paciente normal com a cápsula no seu interior [41]. .....	17
<b>Figura 1.8</b> – a) Cápsula equipada com uma garra cirúrgica desenvolvida por P. Valdastrì <i>et al.</i> ; b) interface homem-máquina que permite a comunicação sem fios com a cápsula [43]. .....	18
<b>Figura 1.9</b> – Protótipo da cápsula de biópsias desenvolvida por M. Simi et al. Adaptado de [44]. .....	19
<b>Figura 1.10</b> – a) Cápsula magnética para libertação de fármacos proposta por S. Yim e M. Sitti; b) esquemático dos componentes internos da cápsula. Adaptado de [46]. .....	20
<b>Figura 1.11</b> – Cápsula com micro-agulhas desenvolvida por G. Traverso <i>et al.</i> : a) protótipo final; c) radiografia do protótipo final [47]. .....	20
<b>Figura 1.12</b> – Ilustração da integração da TFD na CE. ....	23
<b>Figura 1.13</b> – Ilustração da integração do PAN na CE. ....	23
<b>Figura 2.1</b> – Representação da aplicação clínica do protocolo da TFD para o tratamento de um tumor sólido e localizado. Adaptado de [5]. .....	32
<b>Figura 2.2</b> – Diagrama de Jablonski modificado do mecanismo de ação da TFD. Adaptado de [9]. .....	33
<b>Figura 2.3</b> – Mecanismos de ação no tumor da TFD. O PS absorve luz e passa ao estado excitado singlete e ao estado excitado tripleto. Este tripleto é capaz de transferir energia para o oxigénio molecular e formar o oxigénio singlete. Esta espécie pode interagir diretamente com as células tumorais, levando à sua morte por apoptose e/ou necrose, destruir a vasculatura tumoral e induzir uma resposta inflamatória que atrai leucócitos, como os neutrófilos e as células dendríticas. Adaptado de [15]. .....	34
<b>Figura 2.4</b> – Penetração da luz nos tecidos. O esquema representa um corte das camadas da pele (epiderme e derme). As setas representam o poder de penetração da luz com diferentes comprimentos de onda nos tecidos. A luz	

---

azul penetra menos eficientemente nos tecidos, enquanto a luz vermelha pode penetrar até 1 cm. Adaptado de [10]. .....	35
<b>Figura 3.1</b> – Esquemático dos diferentes estados da matéria. Adaptado de [3]. .....	45
<b>Figura 3.2</b> – Representação esquemática de um dispositivo de CPA. O argon flui através de um tubo que rodeia o elétrodo em forma de fio. A descarga é iniciada por uma tensão de alta frequência (HF) $U_{HF}$ entre o eletrodo e o tecido. A corrente de alta frequência $I_{HF}$ flui no tecido, provocando o efeito de coagulação, e retorna ao gerador HF através do eletrodo neutro. Adaptado de [4]. .....	47
<b>Figura 3.3</b> – Aplicação endoscópica da CPA. Adaptado de [4]. .....	48
<b>Figura 3.4</b> – Esquemático dos principais processos de fabrico de prototipagem rápida em função do estado do material de processamento. ....	53
<b>Figura 3.5</b> – Ilustração do processo de construção de objetos em lâminas. Adaptado de [21]. .....	54
<b>Figura 3.6</b> – Ilustração do processo de modelação por deposição de material fundido. Adaptado de [21]. .....	55
<b>Figura 3.7</b> – Ilustração do processo de estereolitografia. Adaptado de [21]. .....	55
<b>Figura 3.8</b> – Ilustração do processo de sinterização seletiva a laser. Adaptado de [21]. .....	56
<b>Figura 3.9</b> – Ilustração do processo de impressão tridimensional. Adaptado de [21]. .....	57
<b>Figura 3.10</b> – Classificação dos processos de conformação. ....	58
<b>Figura 3.11</b> – Processos básicos de conformação de massa: a) laminagem; b) forjamento; c) extrusão; d) trefilagem. Adaptado de [26]. .....	59
<b>Figura 3.12</b> – Processos básicos de conformação de chapa: a) quinagem; b) estampagem; c) corte. Adaptado de [26]. .....	59
<b>Figura 3.13</b> – Curva típica de tensão–deformação dos metais num ensaio de tração. Adaptado de [26]. .....	60
<b>Figura 3.14</b> – Esquemático de uma máquina de moldação de polímeros por injeção. Adaptado de [26]. .....	61
<b>Figura 3.15</b> – Ciclo de injeção: a) fecho do molde; b) injeção do material fundido na cavidade; c) retração do parafuso; d) abertura do molde e remoção da peça. Adaptado de [26]. .....	61
<b>Figura 3.16</b> – Etapas do processo de microfundição: a) fabrico do modelo; b) modelo incorporado no molde cerâmico; c) molde cerâmico (cavidade vazia); d) molde cerâmico preenchido por metal fundido; e) peça fundida [29]. .....	62
<b>Figura 3.17</b> – Esquemático do processo de microfundição: a) a vácuo; b) centrífuga. Adaptado de [25]. .....	63
<b>Figura 4.1</b> – Estrutura química e espectro de absorção do mTHPC com dois picos principais a 420 e 652 nm. Adaptado de [3]. .....	67
<b>Figura 4.2</b> – Diagrama de blocos do sistema ótico para a caraterização dos LEDs. ....	68
<b>Figura 4.3</b> – Espectros de emissão relativos dos LEDs WP813SRC/F, WP7113SURC/E e TLDR5800. A linha vermelha representa o comprimento de onda de máxima absorção do mTHPC na região do vermelho (652 nm). ..	69
<b>Figura 4.4</b> – Fonte de luz vermelha utilizada nos ensaios experimentais de cultura de células tumorais. ....	70
<b>Figura 4.5</b> – Ilustração da estrutura de suporte para posicionar a fonte de luz sobre a placa de cultura de 96 poços durante os ensaios <i>in vitro</i> . ....	71

---

<b>Figura 4.6</b> – Imagem real da estrutura com a fonte de luz usada nos ensaios experimentais.....	72
<b>Figura 4.7</b> – Irradiação das placas de cultura de 96 poços, no escuro, com a fonte de luz e a estrutura apresentadas na Figura 4.6.....	74
<b>Figura 4.8</b> – Disposição dos poços de controlo (C, 0 µg/ml) e das concentrações de mTHPC (0.5, 1, 5 e 10 µg/ml) na placa de cultura de 96 poços.....	74
<b>Figura 4.9</b> – Ensaio colorimétrico MTS.....	75
<b>Figura 4.10</b> – Placas de cultura das células RKO após incubação do MTS para uma fluência de luz de: a) 0 J/cm <sup>2</sup> ; b) 2.5 J/cm <sup>2</sup> ; c) 5 J/cm <sup>2</sup> ; d) 10 J/cm <sup>2</sup> .....	76
<b>Figura 4.11</b> – Placas de cultura das células HCT-15 após incubação do MTS para uma fluência de luz de: a) 0 J/cm <sup>2</sup> ; b) 2.5 J/cm <sup>2</sup> ; c) 5 J/cm <sup>2</sup> ; d) 10 J/cm <sup>2</sup> .....	76
<b>Figura 4.12</b> – Viabilidade das células RKO: a) normalizada ao controlo sem mTHPC (0 µg/ml) para cada fluência de luz; b) normalizada ao controlo sem irradiação (0 J/cm <sup>2</sup> ) para cada concentração de mTHPC.....	77
<b>Figura 4.13</b> – Viabilidade das células HCT-15: a) normalizada ao controlo sem mTHPC (0 µg/ml) para cada fluência de luz; b) normalizada ao controlo sem irradiação (0 J/cm <sup>2</sup> ) para cada concentração de mTHPC.....	78
<b>Figura 4.14</b> – Idealização da cápsula com dois lados funcionais para a realização da TFD: a) lado planar; b) lado redondo.....	80
<b>Figura 4.15</b> – Suporte para a montagem da matriz de LEDs: a) vista superior sem LEDs; b) vista inferior (conexão da bateria); c) vista superior com os LEDs montados; d) matriz de LEDs ligados.....	81
<b>Figura 4.16</b> – Esquemático geral da fonte de luz.....	81
<b>Figura 4.17</b> – Espectro de emissão relativo do LED LR QH9F. A linha vermelha representa o comprimento de onda de máxima absorção do mTHPC na região vermelha (652 nm). O comprimento de onda central é de 642 nm, a transmitância relativa a 652 nm é de 50.14 % e o FWHM é de 23 nm.....	82
<b>Figura 4.18</b> – Dimensões da CE convencional (esquerda) e da nova cápsula para a realização da TFD (direita).....	83
<b>Figura 4.19</b> – Imagem real do protótipo da nova cápsula para a realização da TFD. Fonte de luz vermelha ativada na presença de campo magnético.....	83
<b>Figura 4.20</b> – Geometria e dimensões (em mm) do reservatório de argon proposto.....	85
<b>Figura 4.21</b> – Simulação do reservatório de alumínio com 0.6 mm de espessura a uma pressão de 7 atm: a) deformação total; b) tensão equivalente.....	86
<b>Figura 4.22</b> – Simulação do reservatório de alumínio com 0.4 mm de espessura a uma pressão de 7 atm: a) deformação total; b) tensão equivalente.....	86
<b>Figura 4.23</b> – Simulação do reservatório de alumínio com 0.2 mm de espessura a uma pressão de 7 atm: a) deformação total; b) tensão equivalente.....	87
<b>Figura 4.24</b> – Variação da deformação total e da tensão equivalente em relação à espessura da parede do reservatório.....	88
<b>Figura 4.25</b> – Processo de microfundição: a) fabrico do modelo em PLA e montagem da árvore; b) produção do molde cerâmico; c) ciclo térmico; d) enchimento do molde cerâmico assistido a vácuo (microfundição a vácuo); e) peça fundida.....	89



<b>Figura 4.26</b> – a) Modelo do reservatório em PLA com o canal de entrada no topo e o furo na base; b) múltiplos modelos de PLA (árvore). .....	90
<b>Figura 4.27</b> – Ciclo térmico do molde cerâmico. ....	91
<b>Figura 4.28</b> – Forno de indução para fundição e vazamento do metal no processo de microfundição a vácuo: a) cadinho de SiC; b) molde cerâmico; c) Al fundido; d) termopar; e) cavidade no interior do molde cerâmico. ....	91
<b>Figura 4.29</b> – a) Peça fundida resultante do processo de microfundição; b) reservatório final.....	92
<b>Figura 4.30</b> – Ilustração da utilização de um furo de diâmetro reduzido no processo de fabrico do reservatório por microfundição. O modelo de PLA é convertido em peças fundidas com defeito, uma vez que o furo de diâmetro reduzido resulta num suporte de gesso da cavidade interna frágil. ....	93
<b>Figura 4.31</b> – Exemplos de reservatórios com defeitos resultantes da utilização de um furo de diâmetro reduzido. ....	93
<b>Figura 4.32</b> – Espessura das paredes do reservatório e microestrutura da liga Al7SiMg a diferentes escalas. ....	94
<b>Figura 4.33</b> – Acabamento da superfície externa do reservatório obtido a partir do modelo com revestimento (esquerda) e sem revestimento (direita). ....	95
<b>Figura 4.34</b> – Geometria e dimensões (em mm) do reservatório utilizado nos ensaios experimentais de pressão. 96	
<b>Figura 4.35</b> – a) Modelo em PLA (árvore); b) peça resultante do processo de microfundição. ....	96
<b>Figura 4.36</b> – Espessura das paredes do reservatório: a) do processo de microfundição; b) do modelo CAD. ....	97
<b>Figura 4.37</b> – Reservatório final utilizado nos ensaios de pressão (direita) e conector do aparato experimental (esquerda). ....	97
<b>Figura 4.38</b> – Representação esquemática (a) e imagem real (b) do aparato experimental utilizado nos ensaios de pressão do reservatório. O aparato experimental é composto por: PC – computador pessoal; MC – microcontrolador (Arduino); SP – sensor de pressão; CH – cilindro hidráulico (com uma bomba manual); EF – entrada do fluido; T – torneira; CD – comparador digital; C – conector; R – reservatório. ....	98
<b>Figura 4.39</b> – a) Reservatório em bruto resultante do processo de microfundição; b) reservatório de paredes mais finas resultante da redução da espessura das paredes do reservatório a). ....	99
<b>Figura 4.40</b> – Vista seccionada dos reservatórios experimentais com diferentes espessuras globais: a) 367 $\mu\text{m}$ ; b) 380 $\mu\text{m}$ ; c) 500 $\mu\text{m}$ . ....	100
<b>Figura 4.41</b> – Gráfico de pressão vs. deformação xx do reservatório de alumínio com diferentes espessuras. ....	100
<b>Figura 4.42</b> – Gráfico de pressão vs. deformação yy do reservatório de alumínio com diferentes espessuras. ....	101
<b>Figura 4.43</b> – Deformação experimental e deformação simulada do reservatório de alumínio com 367 $\mu\text{m}$ de espessura. ....	102
<b>Figura 4.44</b> – Deformação experimental e deformação simulada do reservatório de alumínio com 380 $\mu\text{m}$ de espessura. ....	102
<b>Figura 4.45</b> - Deformação experimental e deformação simulada do reservatório de alumínio com 500 $\mu\text{m}$ de espessura. ....	103
<b>Figura 5.1</b> – Ilustração de um sistema de controlo da abertura do reservatório de argon utilizando um material degradável pela exposição à luz. ....	107

---

<b>Figura A.1</b> – a) Tumor sobre a CAM no DDE 13; b) irradiação dos ovos com luz vermelha (DDE 14); c) tumor sobre a CAM no DDE 15; d) ex ovo da CAM (DDE 17).....	110
<b>Figura A.2</b> – Área tumoral relativa no DDE 13 e 17 sem irradiação (0 J/cm <sup>2</sup> ).....	110
<b>Figura A.3</b> – Área tumoral relativa no DDE 13 e 17 para uma fluência de luz de 2.5 J/cm <sup>2</sup> . ....	111

---

---

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1.1</b> – Classificação dos dispositivos médicos nos EUA e na Europa [2]–[4] .....	3
<b>Tabela 1.2</b> – Principais marcos na história da endoscopia .....	5
<b>Tabela 1.3</b> – Principais acontecimentos da endoscopia GI entre 1968 e 1990 .....	7
<b>Tabela 1.4</b> – Especificações técnicas das cápsulas endoscópicas disponíveis comercialmente .....	13
<b>Tabela 2.1</b> – PSs aprovados para a TFD [8], [19], [25], [27].....	39
<b>Tabela 2.2</b> – PSs em desenvolvimento clínico para a TFD [6], [8], [20], [27] .....	39
<b>Tabela 2.3</b> – Vantagens e limitações da TFD .....	41
<b>Tabela 3.1</b> – Efeitos da temperatura no tecido biológico .....	49
<b>Tabela 3.2</b> – Principais diferenças entre o PAN e a CPA .....	50
<b>Tabela 3.3</b> – Classificação dos processos de fabrico [15]–[17] .....	51
<b>Tabela 3.4</b> – Classificação dos processos de maquinaria baseada no tipo de energia usada [17] .....	52
<b>Tabela 4.1</b> – Comprimento de onda central, transmitância relativa a 652 nm e FWHM dos LEDs WP813SRC/F, WP7113SURC/E e TLDR5800.....	69
<b>Tabela 4.2</b> – Valores máximos de tensão equivalente, deformação total e fator de segurança para os reservatórios de alumínio com 0.6, 0.4 e 0.2 mm de espessura .....	87
<b>Tabela 4.3</b> – Deformação simulada e deformação experimental do reservatório com diferentes espessuras a 7 bar de pressão interna.....	103

---

---

## Lista de abreviaturas

Abreviatura	Descrição
3D	Tridimensional
3DP	Impressão Tridimensional
CAD	<i>Computer Aided Design</i>
CAM	<i>Chorioallantoic Membrane</i>
CCD	<i>Charge Coupled Device</i>
CE	Cápsula Endoscópica
CMOS	<i>Complementary Metal-Oxide-Semiconductor</i>
CNC	<i>Computer Numerical Control</i>
CPA	Coagulação com Plasma de Argon
DC	<i>Direct Current</i>
DIMIM	Dispositivo Médico Invasivo com Imagem
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EBM	Fusão por Feixe de Eletrões
EUA	Estados Unidos da América
FBS	Soro Fetal de Bovino
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FD&C Act	<i>Federal Food, Drug, and Cosmetic Act</i>
FEM	<i>Finite Element Methods</i>
FDM	Modelação por Deposição de Material Fundido
FWHM	<i>Full Width at Half-Maximum</i>
GHTF	<i>Global Harmonization Task Force</i>
GI	Gastrointestinal
HpD	<i>Hematoporphyrin Derivative</i>
LED	<i>Light Emitting Diode</i>
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LOM	Construção de Objetos em Lâminas
M2A	<i>Mouth to Anus</i>
MPE	Magnete Permanente Externo
MPI	Magnete Permanente Interno
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium

---

OMS	Organização Mundial de Saúde
PAN	Plasma de Árgon Neutro
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PLA	Ácido Polilático
PpIX	Protoporfirina IX
PS	Agente Fotossensível
RF	Radiofrequência
RM	Ressonância Magnética
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SELFOC	<i>Self-Focusing Optical</i>
SLA	Estereolitografia
SLS	Sinterização Seletiva a Laser
SMD	<i>Surface Mount Device</i>
TC	Tomografia Computorizada
TFD	Terapêutica Fotodinâmica
USB	<i>Universal Serial Bus</i>

### **Lista de símbolos químicos**

Símbolo	Designação
Al	Alumínio
B	Boro
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
Mg	Magnésio
O	Oxigénio
Si	Silício
SiC	Carbeto de silício
Sr	Estrôncio
Ti	Titânio

---

## Lista de grandezas

Grandeza	Designação
$P_0$	Potência ótica (W)
A	Área irradiada (cm <sup>2</sup> )
$\Delta t$	Tempo de tratamento (s)
E	Módulo de elasticidade (MPa)
$\sigma$	Tensão (MPa)
$\varepsilon$	Deformação
K	Coeficiente de força (MPa)
$e$	Expoente de endurecimento
P	Pressão (atm)
V	Volume (L)
n	Número de moles (mol)
R	Constante universal dos gases (L.atm.mol <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )
T	Temperatura (K)
	Fluência de luz (J/cm <sup>2</sup> )
	Taxa de fluência de luz (W/cm <sup>2</sup> )
	Frequência (Hz)
	Corrente elétrica (A)
	Potencial elétrico (V)
	Fluxo de gás (L/min)
	Velocidade de rotação (rpm – rotações por minuto)
	Massa (g)
	Comprimento (m)



---

# 1 Introdução

---

O termo “dispositivo médico” abrange uma vasta gama de equipamentos, desde uma simples espátula até aos equipamentos médicos computadorizados altamente sofisticados. Tal como os medicamentos, os dispositivos médicos são essenciais para o tratamento dos doentes. Com a inovação e o rápido avanço da tecnologia, os dispositivos médicos são atualmente uma das indústrias que mais crescem em todo o mundo.

Neste primeiro capítulo será analisado o estado da arte dos dispositivos médicos. Os dispositivos médicos invasivos com imagem (DIMIM) na área da gastroenterologia receberão especial destaque, descrevendo-se a evolução da endoscopia convencional até à cápsula endoscópica (CE) atual. Serão abordadas as novas funcionalidades da cápsula endoscópica incluindo alguns tipos de terapia. Posteriormente é descrita a motivação, os objetivos e a organização da presente tese.

## 1.1 Dispositivos médicos

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), existem cerca de 2 milhões de dispositivos médicos diferentes em todo o mundo, categorizados em mais de 22 000 tipos de grupos diferentes de dispositivos. Os dispositivos médicos são utilizados por profissionais de saúde, pacientes e por prestadores informais de cuidados médicos numa variedade de situações, incluindo hospitais, clínicas e em casa. São usados para diagnosticar doenças, monitorizar tratamentos, auxiliar pessoas com deficiência e intervir e tratar doenças, tanto as agudas como as crónicas. Apesar da variedade e quantidade de dispositivos médicos, muitos países não têm acesso a dispositivos e equipamentos de alta qualidade adequados às suas necessidades epidemiológicas. Isto verifica-se particularmente nos países em desenvolvimento, onde são raras as avaliações das tecnologias da saúde e onde existem poucos controlos de regulação para prevenir a importação ou o uso de dispositivos abaixo dos padrões, colocando em risco a vida dos pacientes [1].

Nos Estados Unidos da América (EUA), a definição de dispositivo médico está disponível na secção 201(h) da *Federal Food, Drug, and Cosmetic Act* (FD&C Act), supervisionada pela *Food and Drug Administration* (FDA). Em Portugal, a melhor forma de descrever um dispositivo médico é utilizar a definição da Comissão Europeia presente na diretiva europeia de dispositivos médicos, baseada na definição harmonizada para dispositivos médicos proposta pela *Global Harmonization*

*Task Force* (GHTF). Atendendo à Diretiva n.º 2007/47/CE, do Parlamento Europeu e do Conselho, de 5 de setembro, relativa aos dispositivos médicos, transposta para a lei nacional pelo Decreto-Lei n.º 145/2009, de 17 de junho, um dispositivo médico é “qualquer instrumento, aparelho, equipamento, *software*, material ou artigo utilizado isoladamente ou em combinação, incluindo o *software* destinado pelo seu fabricante a ser utilizado especificamente para fins de diagnóstico ou terapêuticos e que seja necessário para o bom funcionamento do dispositivo médico, cujo principal efeito pretendido no corpo humano não seja alcançado por meios farmacológicos, imunológicos ou metabólicos, embora a sua função possa ser apoiada por esses meios, destinado pelo fabricante a ser utilizado em seres humanos para fins de: diagnóstico, prevenção, controlo, tratamento ou atenuação de uma doença; diagnóstico, controlo, tratamento, atenuação ou compensação de uma lesão ou de uma deficiência; estudo, substituição ou alteração da anatomia ou de um processo fisiológico; controlo da conceção” [2], [3].

Pela mesma diretiva, entende-se por dispositivo médico ativo “qualquer dispositivo médico cujo funcionamento depende de uma fonte de energia elétrica, ou outra não gerada diretamente pelo corpo humano ou pela gravidade, e que atua por conversão dessa energia, não sendo considerados como tal os dispositivos destinados a transmitir energia, substâncias ou outros elementos entre um dispositivo médico ativo e o doente, sem qualquer modificação significativa e sendo que o *software*, por si só, é considerado um dispositivo médico ativo”. Um dispositivo médico ativo para diagnóstico é um “dispositivo médico ativo utilizado, isoladamente ou em conjunto com outros dispositivos médicos, para fornecer informações com vista à deteção, diagnóstico, controlo ou tratamento de estados fisiológicos, estados de saúde, doenças ou malformações congénitas”. Por sua vez, um dispositivo médico ativo de carácter terapêutico é “um dispositivo médico ativo utilizado isoladamente ou em conjunto com outros dispositivos médicos para manter, modificar, substituir ou restabelecer funções ou estruturas biológicas, no âmbito de um tratamento ou atenuação de uma doença, lesão ou deficiência” [2], [3].

Pela mesma diretiva, entende-se por dispositivo invasivo “o dispositivo que penetra parcial ou totalmente no corpo por um orifício corporal, ou atravessando a sua superfície”. Um orifício corporal é qualquer abertura natural do corpo (incluindo a superfície externa do globo ocular) ou qualquer abertura artificial permanente, como um estoma. Dispositivos que não penetram no corpo por um orifício natural são tratados como dispositivos invasivos do tipo cirúrgico. Um dispositivo invasivo do tipo cirúrgico é um dispositivo invasivo que “penetra no corpo por meio de uma intervenção cirúrgica ou no contexto de uma intervenção cirúrgica”. Os dispositivos médicos

implantáveis são “dispositivos destinados a ser introduzidos totalmente no corpo humano através de uma intervenção cirúrgica e conservados no local após a intervenção”. São também considerados dispositivos implantáveis, todos os “dispositivos destinados a ser introduzidos parcialmente no corpo humano, mediante uma intervenção cirúrgica, e conservados no local, após a intervenção, por um período não inferior a 30 dias” [2], [3].

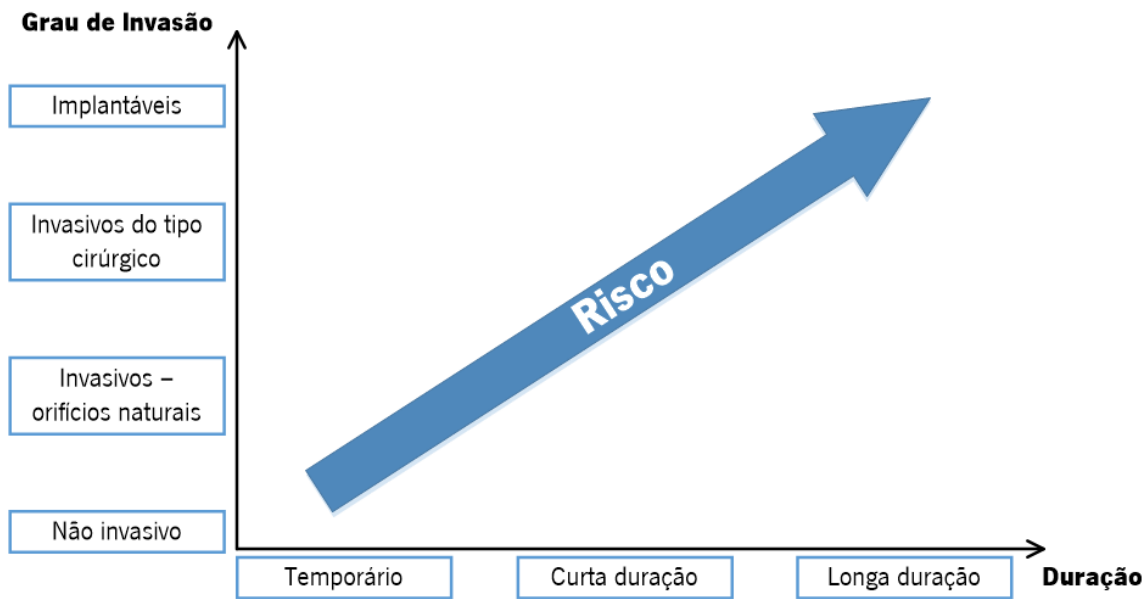
Quanto à duração, os dispositivos médicos podem ser temporários, quando são “destinados a ser utilizados de forma contínua por um período inferior a 60 minutos”, de curto prazo, quando são “utilizados de forma contínua por um período não superior a 30 dias” e de longo prazo, quando são “utilizados de forma contínua por um período superior a 30 dias” [2], [3].

Tanto na Europa como nos EUA, a classificação dos dispositivos médicos depende do nível de risco que representam. Enquanto nos EUA, a FDA classifica os produtos individualmente, na Europa, os produtores aplicam um conjunto de regras, disponível no anexo IX da diretiva relativa aos dispositivos médicos, para determinar a classe respetiva. Estas regras consideram os potenciais riscos inerentes à utilização do dispositivo médico e os possíveis incidentes relacionados com as suas características e/ou funcionamento, bem como a duração do contato do dispositivo com o corpo humano, o grau de invasão no corpo humano e a anatomia afetada pelo uso do dispositivo. A Tabela 1.1 apresenta a classificação dos dispositivos médicos nos EUA e na Europa.

**Tabela 1.1** – Classificação dos dispositivos médicos nos EUA e na Europa [2]–[4]

Sistema	Classe	Exemplos
EUA	I	Macas, óculos de sol
	II	Seringas, máscara cirúrgica
	III	<i>Pacemaker</i>
Europa	I	Gaze cirúrgica, cadeira de rodas
	IIa	Aparelho auditivo, equipamento de ultrassons
	IIb	Bombas de infusão, laser cirúrgico
	III	<i>Stent</i> coronário, válvulas cardíacas

O risco de um dispositivo médico aumenta com o grau de invasão e duração do contato do dispositivo com o corpo humano (Figura 1.1).



**Figura 1.1** – Risco de um dispositivo médico.

## 1.2 Endoscopia Convencional

A endoscopia é uma técnica que permite a inspeção, manipulação e tratamento de órgãos internos através da utilização de dispositivos médicos que permitem a visualização melhorada à distância dos órgãos alvo, sem a necessidade de uma incisão para que a mão ou os dedos do cirurgião entrem na área cirúrgica. A endoscopia desenvolveu-se em áreas onde os órgãos ocultos são conectados ao exterior por orifícios naturais, como a uretra, a vagina, o reto, o canal auditivo, a garganta e a faringe. A entrada no corpo humano através dos orifícios naturais era segura e sem ferimentos, e portanto com poucos riscos de infecção e morte [5].

A história da endoscopia não é uma ciência exata onde cada avanço pode ser colocado numa linha cronológica exata e atribuído com total certeza a um único inventor. A Tabela 1.2 apresenta os principais marcos (contribuições mais importantes e os seus inventores) nas fases iniciais da endoscopia e principalmente sobre a tecnologia da história mais recente da endoscopia [5]–[7].

**Tabela 1.2** – Principais marcos na história da endoscopia

Ano	Pessoa importante ou entidade	Contribuição
1806	Phillip Bozzini	O “Lichtleiter”; instrumento iluminado por luz de velas numa estrutura que refletia luz por um espelho inclinado
1853	Antonin Desmoreaux	Uso do termo “Endoscopia”; usou uma lâmpada de querosene com chama de parafina e espelho inclinado a 45°
1858	Nepomuk Czermak	Primeira imagem endoscópica
1867	Julius Bruck	Filamento de platina rodeado por água dentro de um sistema de arrefecimento de vidro para melhor iluminação
1879	Max Nitze	Cistoscópio com lâmpada de filamento de platina arrefecida a água e uma série de lentes num tubo de metal
1879	Thomas Edison	Invenção da lâmpada incandescente
1883	David Newman	Substituição dos fios de platina por lâmpadas incandescentes no endoscópio
1901	Georg Kelling	Primeira laparoscopia num cão
1910	Hans Christian Jacobaeus	Publicação da primeira laparoscopia num paciente
1924	Richard Zollikofer	Primeira utilização de CO <sub>2</sub> para insuflação
1948	Harold Hopkins	Desenvolvimento do <i>zoom</i> ótico
1953	Harold Hopkins/Narinder Kapany	Criação de fibras de vidro para transmitir imagens
1956	Basil Hirschowitz/Larry Curtis	Substituição das fibras de vidro de Hopkins por material de fibra ótica e revestimento de vidro mais flexível
1959	Harold Hopkins	Desenvolvimento das <i>rod-lens</i>
1966	Harold Hopkins/Karl Storz	Desenvolvimento de um novo endoscópio rígido com lentes SELFOC ( <i>Self-Focusing Optical</i> )
1969	Willard Boyle/George Smith	Invenção do CCD ( <i>Charge-Coupled Device</i> )
1971	Hiromi Shinya/William Wolff	Primeira polipectomia durante uma colonoscopia
1976	Bryce Bayer	Filtro de Bayer para criar o CCD a cores
1985	Erich Muhe	Primeira colecistectomia laparoscópica
1993	Becker <i>et al.</i>	Primeiro relato do sistema de endoscopia tridimensional (3D)
1996	<i>Visionsense Corp.</i>	Desenvolvimento do sistema de endoscopia 3D <i>Visionsense</i>
2000	FDA	Primeiro sistema robótico para cirurgias gerais aprovado para uso em humanos

Existe um conjunto de desafios que precisam de ser superados para que a endoscopia seja segura e bem-sucedida [5]:

1. É preciso haver um método seguro de acesso ao corpo: orifícios naturais ou pequenas incisões nas cavidades existentes em locais seguros sem risco de perfuração ou infecção.
2. Os orifícios naturais são relativamente seguros, no entanto requerem instrumentos flexíveis e de pequeno diâmetro.
3. Quando as imagens são transmitidas através de instrumentos, a sua qualidade pode ser deteriorada. Idealmente, a qualidade da imagem deve ser tão boa ou melhor do que a obtida a olho nu, e geralmente é preferível um ângulo amplo de inspeção.
4. É necessária uma fonte de luz externa para iluminação, uma vez que há pouca luz no interior do corpo humano.
5. O equipamento e a luz têm de ser neutros. Por exemplo, a fonte de luz não pode aquecer excessivamente os órgãos internos ou causar queimaduras externas.
6. Para permitir a visualização dos locais no corpo humano que estão colapsados no seu estado normal, é necessário um método para preencher temporariamente esses locais.
7. Embora a capacidade de obter diagnósticos sem cirurgia invasiva seja um avanço em relação ao diagnóstico obtido por meio de cirurgia aberta, o desígnio da endoscopia é realizar não só diagnósticos mas também procedimentos terapêuticos definitivos.

O diagnóstico de patologias gastrointestinais (GIs) como hemorragias, úlceras e tumores nos seus estágios iniciais é fundamental, no entanto não é fácil. Este tipo de patologias quando diagnosticadas precocemente podem ser curadas ou controladas, caso contrário podem evoluir para doenças graves, muitas vezes letais. A melhor maneira de detetar doenças GIs é através da visualização direta do trato GI, portanto a endoscopia é uma tecnologia de diagnóstico direta e eficaz. A invenção do endoscópio possibilitou a visualização de todo o estômago, do intestino delgado superior e do cólon. Devido à capacidade de permitir aos médicos a visualização direta do trato GI, a endoscopia tornou-se o método padrão e o critério para o diagnóstico de doenças GIs [8].

Entre 1968 e 1990, aconteceram os mais notáveis progressos na história da endoscopia GI. A Tabela 1.3 apresenta os principais acontecimentos da endoscopia GI [9], [10].

**Tabela 1.3** – Principais acontecimentos da endoscopia GI entre 1968 e 1990

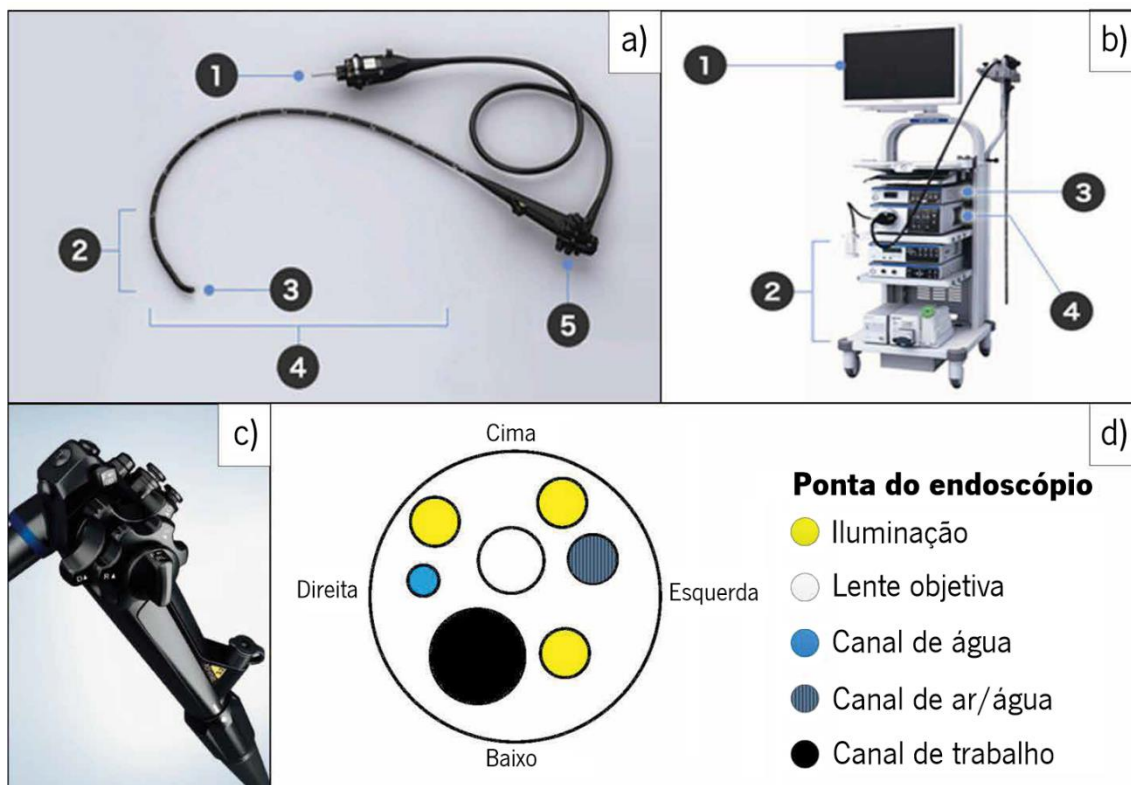
Ano	Acontecimento
1968	Pancreatografia retrógrada endoscópica
1969	Polipectomia colonoscópica
1970	Colangiografia retrógrada endoscópica
1974	Esfincterotomia endoscópica (com extração de pedras dos ductos biliares)
1979	Gastrostomia endoscópica percutânea
1980	Escleroterapia endoscópica Ultrassonografia endoscópica
1983	Endoscópio eletrónico CCD
1985	Controlo endoscópico de hemorragia digestiva alta
1990	Ligadura elástica endoscópica

A inovação dos endoscópicos continuou ao longo dos anos a par do desenvolvimento tecnológico. Os endoscópicos evoluíram dos primeiros projetos rígidos com capacidades limitadas para instrumentos flexíveis mais sofisticados com capacidades avançadas de imagem, recursos especializados para intervenções terapêuticas avançadas e diferentes estruturas para permitir o exame de áreas específicas do trato GI [11].

Atualmente, os endoscópicos utilizados para examinar o trato GI são constituídos essencialmente por três partes: o manípulo de controlo (secção de controlo), o tubo de inserção e o conector. O manípulo de controlo é mantido na mão esquerda e possui dois discos de controlo empilhados que permitem curvar a ponta do instrumento para cima/baixo e esquerda/direita. Estes discos de controlo podem ser bloqueados para manter a curvatura prolongada da ponta do instrumento. A secção de controlo possui também botões separados para sucção, insuflação de ar ou água e captura de imagens e uma entrada para a inserção de acessórios através do canal do instrumento. O tubo de inserção consiste num tubo flexível anexado à secção de controlo. Este tubo contém um canal de trabalho que permite a passagem de acessórios, a sucção e a insuflação de ar ou água. A extremidade do tubo de inserção possui um sensor de imagem CCD ou CMOS (*Complementary Metal-Oxide-Semiconductor*) para geração de imagens a cores, um sistema de iluminação de guia de luz, uma abertura para o canal de ar/água, um jato de água para limpar a lente e uma lente objetiva. A lente pode ser orientada para visualização frontal, lateral ou oblíqua, dependendo do tipo de endoscópio. O comprimento, o diâmetro e a flexibilidade do tubo de inserção variam do tipo de endoscópio e dos fabricantes. Finalmente, o conector permite a ligação do endoscópio a uma torre endoscópica, que geralmente contém um processador de imagem,



uma fonte de luz branca com fonte de alimentação elétrica, uma fonte de ar ou CO<sub>2</sub> e água. Como os endoscópios têm de ser limpos e esterilizados entre os exames, eles são projetados para serem totalmente à prova de água e resistentes a produtos químicos [5], [11], [12]. A Figura 1.2 mostra os componentes e as funções de um sistema de endoscopia *standard*.



**Figura 1.2** – a) Componentes do endoscópio atual: 1) conector; 2) secção de flexão; 3) ponta do instrumento; 4) tubo de inserção; 5) secção de controlo. b) Componentes de um sistema endoscópico: 1) monitor para visualização das imagens; 2) centro de gestão de imagens e outros acessórios, como bomba de água e bomba de CO<sub>2</sub>; 3) centro do sistema de vídeo (o processador de vídeo converte os sinais elétricos do endoscópio em sinais de vídeo, mostrando-os no monitor); 4) fonte de luz. c) Manipulo de controlo do endoscópio. d) Esquemático da ponta do endoscópio que mostra os componentes típicos dos endoscópios atuais. Adaptado de [5].

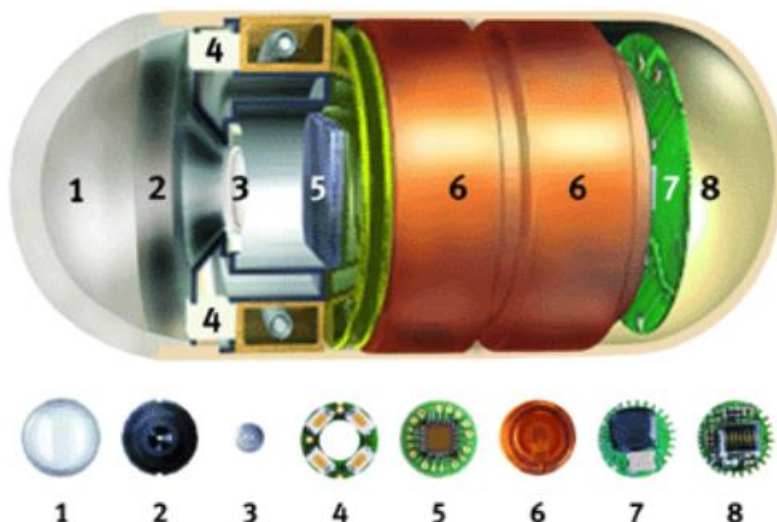
### 1.3 Endoscopia por cápsula

O intestino delgado humano é um órgão longo e tortuoso, de 5 a 7 metros de comprimento, e livremente móvel na cavidade abdominal. Por causa destas características anatómicas, tem sido desafiador realizar exames endoscópicos usando os endoscópios convencionais. Devido às dificuldades associadas ao exame endoscópico, o intestino delgado tem sido examinado principalmente por métodos radiológicos, como a radiografia com contraste, a tomografia computadorizada (TC), a ressonância magnética (RM) e a angiografia. O intestino delgado foi até ao início da década anterior o “parente pobre” da gastroenterologia [8] [13].

O aparecimento da cápsula endoscópica (CE) veio revolucionar totalmente a endoscopia digestiva, uma vez que as características desta cápsula inovadora tornaram possível a recolha de imagens de boa qualidade de todo o trato GI, com o mínimo desconforto para o paciente (sem dor e sem sedação) [14].

### **1.3.1 Estado da arte**

A primeira CE, M2A (*Mouth to Anus*), fabricada em 2000 pela *Given Imaging* e aprovada pela FDA em agosto de 2001 para a utilização em pacientes humanos, era constituída por uma lente de focagem, 4 LEDs (*Light Emitting Diode*) de luz branca, um sensor de imagem CMOS, duas baterias de óxido de prata, um transmissor de radiofrequência (RF) a 434.1 MHz e uma antena (Figura 1.3). Esta cápsula adquiria imagens a uma taxa de 2 imagens por segundo e permitia a realização de um exame endoscópico com a duração de 8 horas (aproximadamente igual à duração da viagem do bolo alimentar no trato GI). De referir ainda que esta cápsula possuía um campo de visão de 140°, ampliação de 1:8, profundidade de visão de 1 – 30 mm, tamanho mínimo de deteção de aproximadamente 0.1 mm, 3.7 g de peso, 26 mm de comprimento e 11 mm de diâmetro. A cápsula é passível de ser engolida, devido ao seu revestimento biocompatível, viajando pelo trato GI através dos movimentos peristálticos [12], [15]–[18]. As imagens adquiridas pela CE são transmitidas por RF para um conjunto de 8 antenas colocadas na região abdominal do paciente, que permitem a receção das imagens, mas também o cálculo e a indicação da posição da cápsula no interior do corpo do paciente. A contínua triangulação da localização da cápsula no abdómen do paciente permite a monitorização de todo o trajeto realizado pela cápsula, ajudando a localizar com mais precisão as anomalias detetadas pelas imagens adquiridas. As imagens recebidas são armazenadas num pequeno disco portátil localizado à cintura do paciente. Durante a realização do exame o paciente é livre de continuar a sua rotina diária, não havendo necessidade de estar confinado ao hospital ou ao ambiente clínico. Depois do exame realizado, as imagens são descarregadas do disco portátil e analisadas pelo médico gastroenterologista [17], [19].



**Figura 1.3** – Constituição da M2A: 1) redoma ótica; 2) suporte da lente; 3) lente de focagem; 4) LEDs de luz branca; 5) sensor de imagem CMOS; 6) duas baterias de óxido de prata; 7) transmissor de RF; 8) Antena [16].

Após o aparecimento da primeira CE, apresentada pela *Given Imaging*, surgiram outras semelhantes, como a *EndoCapsule (Olympus Medical System Corp., Japão)*, a *MiroCam (IntroMedic Co. Ltd., Coreia do Sul)*, a *OMOM (Jinshan Science and Technology Co. Ltd., China)* ou a *CapsoCam (CapsoVision Inc., EUA)* (Figura 1.4) [12], [17], [18], [20]. As variações entre as diferentes CEs incluem o número de sensores de imagem, a taxa de aquisição das imagens, o método de transmissão/armazenamento das imagens e a capacidade da bateria. A *MiroCam* utiliza a transmissão das imagens por campo elétrico, utilizando o corpo humano como meio condutor da corrente elétrica, em vez da convencional transmissão por RF. As imagens capturadas pela *CapsoCam* são armazenadas internamente, evitando assim a necessidade de um gravador externo, no entanto exige a recuperação da cápsula depois do exame para fazer o *download* das imagens por USB (*Universal Serial Bus*) [12], [21], [22].

A cápsula mais recente da linha de sucessão da M2A é a *PillCam SB3 (Medtronic, EUA)*. Esta terceira geração de cápsulas apresenta algumas melhorias. O tempo de funcionamento é agora de aproximadamente 11 horas, limitando o número de exames incompletos devidos à falha da bateria. As melhorias na resolução da imagem (30 %) resultam na obtenção de imagens mais nítidas e mais brilhantes, permitindo que os detalhes da mucosa intestinal possam ser vistos mais claramente. Além disso, o contraste foi melhorado, o que facilita a análise da superfície da mucosa. Uma das inovações mais importantes é a adaptação da taxa de aquisição das imagens de acordo com a velocidade da cápsula. Assim, se a cápsula se move rapidamente, por exemplo no duodeno distal, o número de imagens adquiridas por segundo aumenta de 2 para 6 [23].



**Figura 1.4** – Vista frontal (a) e vista superior (b) das CEs disponíveis comercialmente, com a imagem correspondente a raio-X (c). Da esquerda para a direita: cápsula *Agile*, *PillCam SB3*, *EndoCapsule*, *CapsoCam*, *MiroCam*, *OMOM*, *PillCam ESO2*, *PillCam COLON2* [7].

O alcance da CE vai para além do intestino delgado, estendendo-se ao esófago e ao cólon. A cápsula mais recente dedicada à visualização do esófago, a *PillCam ESO2* da *Given Imaging*, introduzida e aprovada pela FDA em 2007, tem as mesmas dimensões da *PillCam SB3* e está equipada com dois sensores de imagem CMOS (uma em cada extremidade da cápsula), com um ângulo de visão de  $169^\circ$ , sendo capaz de adquirir 18 imagens por segundo durante 30 minutos. A elevada taxa de aquisição de imagens e a existência de dois sensores de imagem permite enfrentar o desafio da elevada velocidade de passagem da cápsula no esófago (10 segundos num paciente normal). Esta cápsula tem uma taxa de deteção superior à esofagogastroduodenoscopia na suspeita de esófago de Barrett, com uma sensibilidade de 100 % e uma especificidade de 74 % [12], [20], [23]–[26]. Contudo, a CE ainda não pode substituir a esofagogastroduodenoscopia no diagnóstico e gestão do esófago de Barrett, porque não permite a confirmação histológica. Além disso, é questionável a eficiência em termos de custos económicos a utilização da CE para esta aplicação [12], [20].

A *PillCam COLON2* é a cápsula mais recente desenvolvida pela *Given Imaging* especificamente para o cólon. Esta cápsula possui 31 mm de comprimento e 11 mm de diâmetro,

sendo a cápsula de maiores dimensões produzida pela *Given Imaging*. Tal como a *PillCam ESO2*, a *PillCam COLON2* tem dois sensores de imagem e um campo de visão mais amplo (172°). Para garantir a total visualização do cólon, a cápsula conserva a bateria até chegar a este órgão e otimiza a taxa de aquisição de imagens (taxa de aquisição adaptativa) para 4 imagens por segundo quando está quase imóvel e 35 imagens por segundo quando está em movimento, funcionando durante aproximadamente 10 horas [8], [12], [23], [25]. Num estudo europeu com 100 pacientes, a *PillCam COLON2* obteve uma sensibilidade de 84 % e uma especificidade de 64 % em pólipos maiores que 6 mm, e uma sensibilidade de 88 % e especificidade de 95 % para pólipos maiores que 10 mm. Apesar dos resultados encorajadores, tanto a sensibilidade como a especificidade devem ser superiores a 90 % para ser comparável com a sensibilidade e especificidade da colonoscopia convencional [27]. Assim, a *PillCam COLON2* ainda não pode ser considerada um substituto do rastreio de colonoscopia. Esta cápsula não foi aprovada pela FDA.

A principal complicação que poderá decorrer da utilização da CE é o risco de retenção, normalmente causada por uma estenose intestinal. Pacientes com a doença de Crohn ou que tomam medicação anti-inflamatória não-esteróide têm um risco maior de retenção da CE. Para resolver este problema a *Given Imaging* projetou uma cápsula, a *Agile*, equipada com um pequeno sinalizador RF (2 mm x 12 mm) contido dentro de um revestimento de lactose e bário biodegradável (depois de 30 horas) de dimensões iguais à da CE padrão. Este dispositivo permite ao médico verificar a passagem adequada da cápsula antes da ingestão da CE não-biodegradável padrão em pacientes com conhecidas ou suspeitas de estenoses. A cápsula *Agile* recebeu em 2006 a aprovação da FDA [12], [20], [23], [28].

A Tabela 1.4 apresenta as principais características das CEs disponíveis comercialmente [7], [12], [20], [23], [25], [26], [29].

**Tabela 1.4** – Especificações técnicas das cápsulas endoscópicas disponíveis comercialmente

	<i>PillCam SB3</i>	<i>EndoCapsule</i>	<i>MiroCam</i>	<i>OMOM</i>	<i>CapsoCam</i>	<i>PillCam ES02</i>	<i>PillCam COLON2</i>
Comprimento (mm)	26	26	24	28	31	26	31
Diâmetro (mm)	11	11	11	13	11	11	11
Peso (g)	2.9	3.8	3.4	6	4	3.4	2.9
Sensor de imagem	CMOS	CCD	CMOS	CCD	4xCMOS	2xCMOS	2xCMOS
Resolução (pixels)	340x340	512x512	320x320	640x480	288x206	256x256	256x256
Imagens por segundo	2-6	2	3	2	16	18	4-35
Campo de visão	156°	145°	170°	140°	4x90°	2x169°	2x172°
Iluminação	4 LEDs brancos	6 LEDs brancos	6 LEDs brancos	6 LEDs brancos	16 Leds brancos	2x4 LEDs brancos	2x4 LEDs brancos
Autonomia (h)	11	8	11	8	15	0.5	10
Modo de transmissão	RF	RF	Campo elétrico	RF	Memória interna	RF	RF
Aprovação FDA	Sim (2013)	Sim (2007)	Sim (2012)	Não	Não	Sim (2007)	Não

### 1.3.2 Novas funcionalidades da cápsula endoscópica

Tendo em consideração as CEs disponíveis comercialmente, pode concluir-se que a única região do trato GI onde a CE conseguiu tornar-se num exame de primeira linha foi o intestino delgado. A principal razão é que o intestino delgado é tão longo e tão profundo que a endoscopia convencional não consegue ser realizada com o endoscópio convencional. Apesar dos claros benefícios de conforto para o paciente, de facilidade de utilização e de fornecerem uma razoável visualização, o facto é que as CEs ainda não substituíram a endoscopia convencional porque: a precisão de diagnóstico ainda não é equivalente às técnicas tradicionais; a realização do exame de endoscopia por cápsula é mais caro que a endoscopia convencional (os endoscópios são reutilizados, ao contrário das cápsulas que são descartáveis); não são capazes de interagir com o tecido para fazer biópsia ou realizar algum tipo de terapia [8], [12], [26].

De um modo geral, as CEs disponíveis comercialmente possuem três limitações principais:

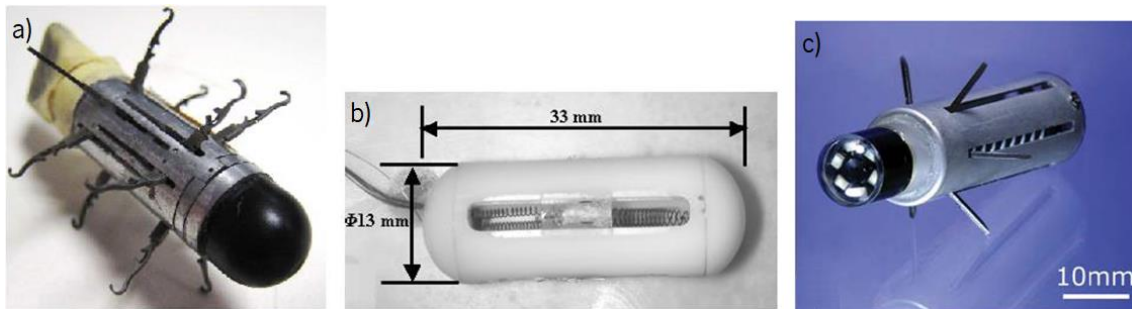
1. Locomoção passiva – é desejável que o médico gastroenterologista seja capaz de mover a cápsula como desejado, em vez de depender dos movimentos peristálticos. Muitas vezes, o médico pretende obter vários ângulos de visão e mover a cápsula para a frente e para trás nas proximidades de uma lesão suspeita [8], [12], [17].
2. Ausência de adaptação do diâmetro do lúmen – a necessidade da cápsula ser engolida, requer que seja pequena. Embora o tamanho da cápsula coincida com o diâmetro do intestino delgado, geralmente não é possível garantir a visualização da área superficial total quando a cápsula atinge o estômago ou o intestino grosso. Sem um mecanismo para criar espaço (e.g. insuflação usada na colonoscopia convencional), os pólipos podem permanecer ocultos no interior de dobras, resultando no diagnóstico de falsos negativos [12].
3. Ausência de interação com os tecidos – a recolha de biópsias e a realização de terapia são as principais vantagens da endoscopia convencional relativamente à endoscopia por cápsula [12], [26].

### **Locomoção da CE**

Grande parte da atenção da investigação em CE tem sido dada à locomoção ativa da cápsula, com o objetivo de entregar o controlo da posição e locomoção da CE ao médico gastroenterologista. A locomoção ativa permite o controlo remoto da direção e navegação do dispositivo em direção a áreas suspeitas. Isto permite também que os procedimentos terapêuticos e cirúrgicos possam ser realizados por cápsulas.

Podem ser utilizadas duas abordagens para a locomoção da CE: técnicas de locomoção em que todos os componentes que permitem a locomoção estão localizados no interior da cápsula (locomoção interna); e técnicas de locomoção externas, onde as forças e torques são transmitidos para a cápsula a partir do exterior, geralmente por campo magnético (locomoção externa).

Inicialmente, P. Valdastrì *et al.* [30], B. Kim *et al.* [31] e H. M. Kim *et al.* [32], propuseram mecanismos de locomoção que utilizam micromotores, engrenagens e parafusos para a locomoção da CE (Figura 1.5). Contudo, uma vez que são difíceis de miniaturizar e possuem limitações de energia, estes mecanismos não poderão ser aplicados às CEs atuais.



**Figura 1.5** – Mecanismos de locomoção interna da CE propostos por: a) P. Valdastris *et al.*; b) B. Kim *et al.*; c) H. M. Kim *et al.*

P. Glass *et al.* [33] em 2008 apresentou um mecanismo que permite a “ancoragem” da cápsula à parede intestinal. Este mecanismo é constituído por três pernas, que funcionam como atuadores, revestidas com adesivos de elastómeros inspirados nas lagartixas. São capazes de suportar as cargas axiais peristálticas, permitindo que a cápsula se mantenha num local fixo. Estes adesivos de elastómeros permitem uma nova visão de “ancoragem” da cápsula, até então baseada em ganchos metálicos afiados.

Ao contrário do intestino e do esófago, o estômago é uma cavidade grande e colapsada que requer uma locomoção em três dimensões. Este requisito levou a que G. Tortora *et al.* [34] desenvolve-se, em 2009, uma cápsula semelhante a um submarino que era ingerida pelo paciente depois de beber 1 L de água (que permanece no estômago durante 30 minutos). Esta cápsula utiliza quatro hélices independentes acionadas por motores DC (*Direct Current*) incorporados na cápsula, sendo que a velocidade e a direção da cápsula são controlados externamente por um *joystick*.

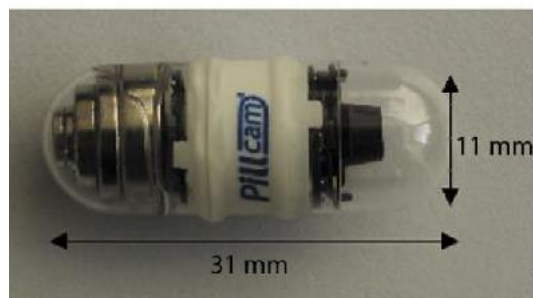
Embora a locomoção interna tenha vantagens significativas, como a distensão local de tecido a partir da cápsula e a ausência de interferências devido às forças do campo magnético, esta abordagem revela desvantagens dramáticas relacionadas com a presença de atuadores, mecanismos de transmissão e módulos de potência que levam a um excessivo número de componente internos, tornando difícil a redução do tamanho da cápsula [35].

Com o objetivo de diminuir o volume de componentes internos da CE, tem sido abordada a locomoção da cápsula através da propulsão externa, locomoção externa. Esta abordagem pode ter um percurso mais rápido para a aplicação clínica, uma vez que não exige a construção de atuadores e mecanismos de reduzidas dimensões. Para conseguir esta propulsão externa são utilizados normalmente campos magnéticos externos que interagem com componentes magnéticos no interior da CE. Esta interação resulta na transmissão de forças e binários para a



CE. A ideia é criar um grande campo magnético externo perto do paciente, através de eletromagnetes ou de magnetes permanentes, e um pequeno campo magnético no interior da CE. A interação entre os campos magnéticos interno e externo faz com que a cápsula experiencie forças e torques. Esta abordagem permite remover a necessidade de atuadores internos, mecanismos e baterias, em prol de um pequeno magnete interno [12], [35]. Utilizar eletromagnetes como geradores de campo magnético externo permite um melhor controlo do campo magnético, no entanto exigem equipamentos de maiores dimensões, quando comparados com os magnetes permanentes externos. Um dos pontos críticos da projeção de um mecanismo de locomoção magnética é o dimensionamento das fontes de campo magnético interno e externo necessário para obter as forças e os torques necessários para um controlo eficiente e confiável da cápsula no interior do trato GI [35].

Em 2011, J. Keller *et al.* [36] investigou a utilização de um magnete externo portátil na orientação da cápsula no interior do trato GI. Para tal utilizaram uma versão modificada da *PillCam Colon*, em que metade da cápsula era preenchida com pequenos magnetes permanentes (Figura 1.6). Este estudo demonstrou a viabilidade da locomoção magnética, no entanto revelou a necessidade de se realizar mais investigação para aumentar a confiabilidade e precisão do controlo magnético.



**Figura 1.6** – CE modificada com a inclusão de pequenos magnetes permanentes no seu interior [36].

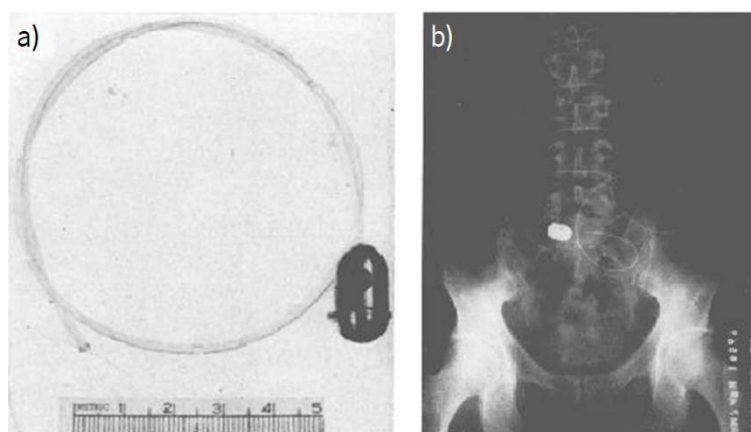
A *Olympus Inc.* em associação com a *Siemens Healthcare* desenvolveram uma nova tecnologia de locomoção magnética da CE. O sistema é constituído por uma cápsula da *Olympus Inc.* (31 mm de comprimento, 11 mm de diâmetro e dois sensores de imagens que capturam 4 imagens por segundo) e um equipamento de guia magnético da *Siemens Healthcare* composto por um equipamento de RM e um equipamento de TC. A cápsula é controlada pelo médico através de dois *joysticks* e pode ser movida no estômago com cinco graus de liberdade [37].

G. Ciuti *et al.* [38] e F. Capri *et al.* [39], [40] propuseram um método de controlo da CE com pequenos magnetes permanentes, através do uso de um braço robótico ou de um equipamento convencional de estereotaxia. No sistema proposto, os magnetes externos anexados ao braço robótico ou ao equipamento de estereotaxia, são capazes de controlar a CE com pequenos magnetes permanentes, através da rotação e posicionamento dos magnetes permanentes externos.

### **Cápsulas endoscópicas de intervenção**

A investigação conseguida e os resultados positivos obtidos na locomoção da CE abrem uma janela de oportunidade para o desenvolvimento de CE de intervenção.

A recolha de amostras de biópsias é um procedimento fundamental no diagnóstico GI. A biópsia convencional necessita de aproximadamente 1 mm<sup>3</sup> de tecido para ser posteriormente analisado. Isto é um grande desafio para a CE devido ao volume de tecido necessário, à necessidade de recolher este tecido de uma localização específica e à necessidade de o recolher rapidamente do corpo do paciente. Uma solução aparentemente fácil de desenvolver, que auxiliaria a recolha de biópsias e a posterior recuperação da amostra de tecido, é anexar um “cordel” à CE. No entanto esta solução destrói as vantagens da CE relativamente à endoscopia/colonoscopia convencional [12]. O primeiro dispositivo com “cordel” para recolha de biópsias do trato GI foi desenvolvido por W. H. Crosby e H. W. Kugler em 1957 (Figura 1.7). A biópsia nesta cápsula é desencadeada por um mecanismo de pressão de ar. A sucção aplicada ao “cordel” desencadeia um mecanismo no interior da cápsula que faz com que uma lâmina de mola rotativa varra a abertura da cápsula, cortando a mucosa saliente no seu interior [41].



**Figura 1.7** – a) Cápsula para biópsia desenvolvida por W. H. Crosby e H. W. Kugler; b) radiografia abdominal de um paciente normal com a cápsula no seu interior [41].

K. Kong *et al.* [42] apresentou em 2005 o primeiro exemplo de um módulo de biópsia para ser usado em CEs. Este dispositivo funciona de forma similar à cápsula de W. H. Crosby e H. W. Kugler, através de molas de torção e lâminas rotacionais de corte de tecido. Esta cápsula recolheu com sucesso amostras de tecido da mucosa intestinal de vaca e coelho.

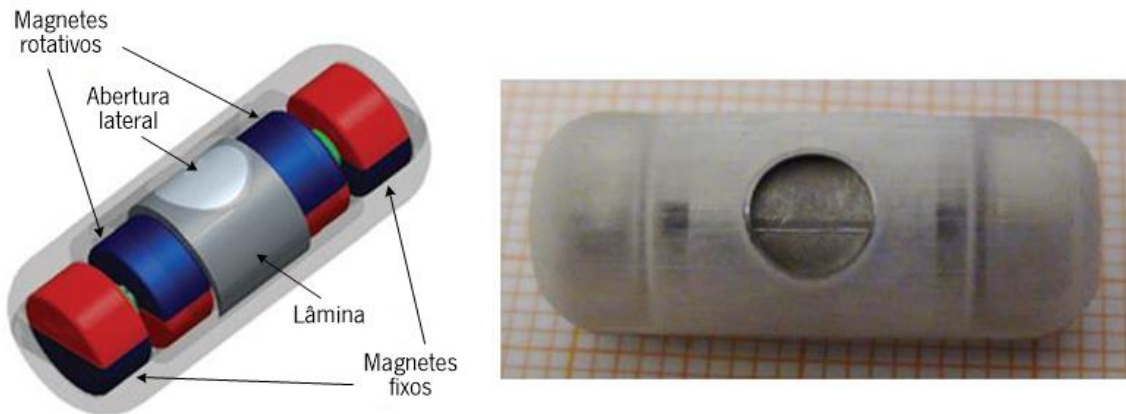
P. Valdastrì *et al.* [43] desenvolveu uma cápsula (12.8 mm de diâmetro e 33.5 mm de comprimento) equipada com 4 ímãs internos que permitem a sua locomoção e com uma garra cirúrgica de níquel-titânio para realizar intervenções remotamente (Figura 1.8). Esta garra é utilizada para parar hemorragias ou para fechar incisões no trato GI. A cápsula foi testada com sucesso em ensaios *in vivo* em porcos, sendo que a locomoção da cápsula até à lesão alvo foi realizada através de um braço magnético externo e a garra cirúrgica ativada por comandos sem fios efetuados pelo operador.



**Figura 1.8** – a) Cápsula equipada com uma garra cirúrgica desenvolvida por P. Valdastrì *et al.*; b) interface homem-máquina que permite a comunicação sem fios com a cápsula [43].

Novamente inspirado na cápsula de W. H. Crosby e H. W. Kugler, M. Simi *et al.* [44] desenvolveu em 2013 uma cápsula com uma configuração que, através do campo magnético, permite tanto estabilizar a cápsula como executar o mecanismo de recolha da amostra de tecido. Esta cápsula é constituída por dois pares de ímãs permanentes cilíndricos que funcionam como molas de torção magnética. De cada par de ímãs, um é integrado no corpo da cápsula, não se podendo mover, enquanto o outro é fixado num eixo com uma lâmina, sendo livre para rodar sob o efeito de um binário magnético. O acoplamento entre as forças dos ímãs fixos e rotativos obriga a lâmina a fechar uma abertura lateral. Quando este dispositivo é sujeito a um campo magnético externo forte, os ímãs do eixo de rotação rodam em conjunto com a lâmina, expondo a abertura lateral. O campo magnético externo permite estabilizar o dispositivo contra a

mucosa e promover a entrada de tecido para o interior da abertura lateral. Quando o campo magnético externo é removido, a lâmina e os magnetes rotativos voltam à posição original cortando o tecido.

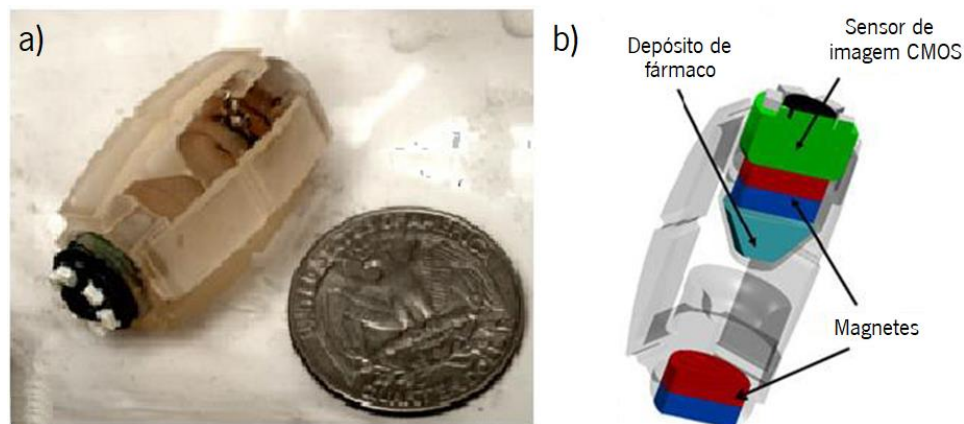


**Figura 1.9** – Protótipo da cápsula de biópsias desenvolvida por M. Simi *et al.* Adaptado de [44].

As cápsulas para libertação de fármacos têm sido um campo de estudo preeminente nos últimos anos devido a aplicações tanto no tratamento de doenças do trato GI como em estudos de absorção de drogas. O direcionamento da libertação do fármaco para os locais alvo no trato GI pode maximizar a concentração local do fármaco e evitar os seus efeitos nas áreas indesejadas.

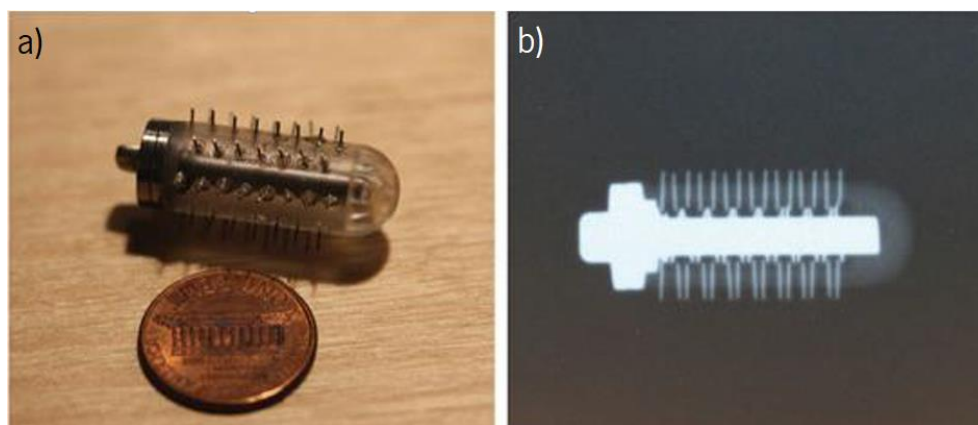
L. Hongying *et al.* [45] desenvolveu uma cápsula para libertação controlada de fármacos que utiliza uma matriz de aquecimento, elastómeros e um pistão. O pistão está unido à matriz de aquecimento através de um adesivo com baixo ponto de fusão. Quando a matriz de aquecimento é ativada, o adesivo é derretido e o pistão acionado. A potência do elastómero comprimido aciona o pistão para expelir a droga do interior da cápsula. O mecanismo de libertação do fármaco é acionado por comandos sem fios. A principal limitação deste dispositivo é o pequeno volume do reservatório da droga, limitado pelo tamanho grande dos componentes elétricos e mecânicos internos.

S. Yim e M. Sitti [46] desenvolveram uma cápsula magnética para libertação de fármacos no estômago. O dispositivo possui dois magnetes permanentes internos que permitem a locomoção e ativação da cápsula através de um ímã permanente externo. O corpo da cápsula é feito de um elastómero suave que permite a deformação da cápsula. A deformação axial da cápsula, conseguida pela atuação magnética externa, permite a libertação do fármaco do interior da cápsula (Figura 1.10).



**Figura 1.10** – a) Cápsula magnética para liberação de fármacos proposta por S. Yim e M. Sitti; b) esquemático dos componentes internos da cápsula. Adaptado de [46].

Em 2015, G. Traverso *et al.* [47] apresentou uma cápsula com micro-agulhas que permite a liberação de fármacos numa região específica da mucosa. A cápsula contém micro-agulhas encapsuladas por um revestimento sensível ao pH que se dissolve ao atingir a região alvo. Uma vez dissolvido o revestimento, o reservatório da droga é comprimido pelos movimentos peristálticos libertando o fármaco do seu interior (Figura 1.11).



**Figura 1.11** – Cápsula com micro-agulhas desenvolvida por G. Traverso *et al.*: a) protótipo final; b) radiografia do protótipo final [47].

## 1.4 Técnicas de terapia endoscópica da mucosa

O tratamento endoscópico é amplamente considerado uma opção promissora no tratamento de neoplasias GIs nos seus estágios iniciais [48].

### 1.4.1 Técnicas de ressecção da mucosa

As técnicas endoscópicas de ressecção da mucosa foram desenvolvidos para remover de forma minimamente invasiva lesões benignas e malignas nos seus estágios iniciais [48].

A **polipectomia** é a técnica que permite remover a maioria dos pólipos do trato GI. O procedimento é bastante simples, utilizando uma ansa diatérmica para simultaneamente cortar e coagular o pedículo do pólipo [49].

A **ressecção endoscópica da mucosa** foi desenvolvida para a remoção de neoplasias (até 2 cm) planas confinadas às camadas superficiais (mucosa e submucosa) do trato GI. O procedimento mais comum para a realização desta técnica passa pela injeção de uma solução salina na submucosa sob a lesão, criando uma “almofada” de segurança. A “almofada” de segurança ergue a lesão, facilitando a captura e remoção da lesão com uma ansa diatérmica e minimizando os danos nas camadas mais profundas da parede GI. A lesão pode ser removida de uma só vez ou de forma fragmentada [48]–[50].

A **dissecção endoscópica da submucosa** foi desenvolvida para a remoção em bloco de lesões extensas do trato GI (geralmente superiores a 2 cm). Numa primeira fase é injetada uma solução salina na submucosa para elevar a lesão. Depois, é realizada uma incisão circunferencial na submucosa em torno da lesão com facas de dissecção. Por fim, a lesão é dissecada, das camadas inferiores da parede do trato GI com as facas de dissecção, e removida [49].

### 1.4.2 Técnicas de ablação da mucosa

As técnicas de ablação da mucosa utilizam uma variedade de dispositivos para destruir a mucosa do trato GI, como complemento às técnicas de ressecção endoscópica ou para tratar lesões vasculares da mucosa que causam perda crónica de sangue [51].

A **coagulação com plasma de árgon** é um método térmico sem contacto que utiliza um gás inerte (árgon) ionizado para fornecer uma corrente elétrica monopolar à mucosa, permitindo uma coagulação efetiva dos tecidos [7], [48], [51].

A **ablação por RF** consiste em fornecer energia RF à mucosa durante um período de tempo pequeno, permitindo a ablação da mucosa sem lesionar a submucosa. Esta técnica pode ser realizada recorrendo a um cateter com balão ou a dispositivos focais [7], [48].

A **crioterapia** é um método de terapia sem contacto para destruição de tecido através da pulverização de uma substância fria (nitrogénio líquido ou dióxido de carbono) no tecido alvo [7], [48], [51].

A **terapia fotodinâmica** envolve a ativação de um agente fotossensível por luz com um comprimento de onda específico. São necessários três elementos: luz, agente fotossensível e oxigênio. O agente fotossensível quando exposto à luz com um comprimento de onda específico torna-se ativo, passando do estado normal para o estado excitado. Quando retorna ao estado normal, liberta energia que é transferida para o oxigênio presente nos tecidos, gerando espécies de oxigênio altamente reativas e outros radicais que causam danos celulares [48].

Os **lasers** são dispositivos térmicos que provocam a destruição de tecido pela absorção de luz laser. A profundidade de penetração da luz laser e da lesão térmica depende do comprimento de onda da luz, das propriedades do tecido alvo, da densidade de potência e da duração da aplicação [48], [51].

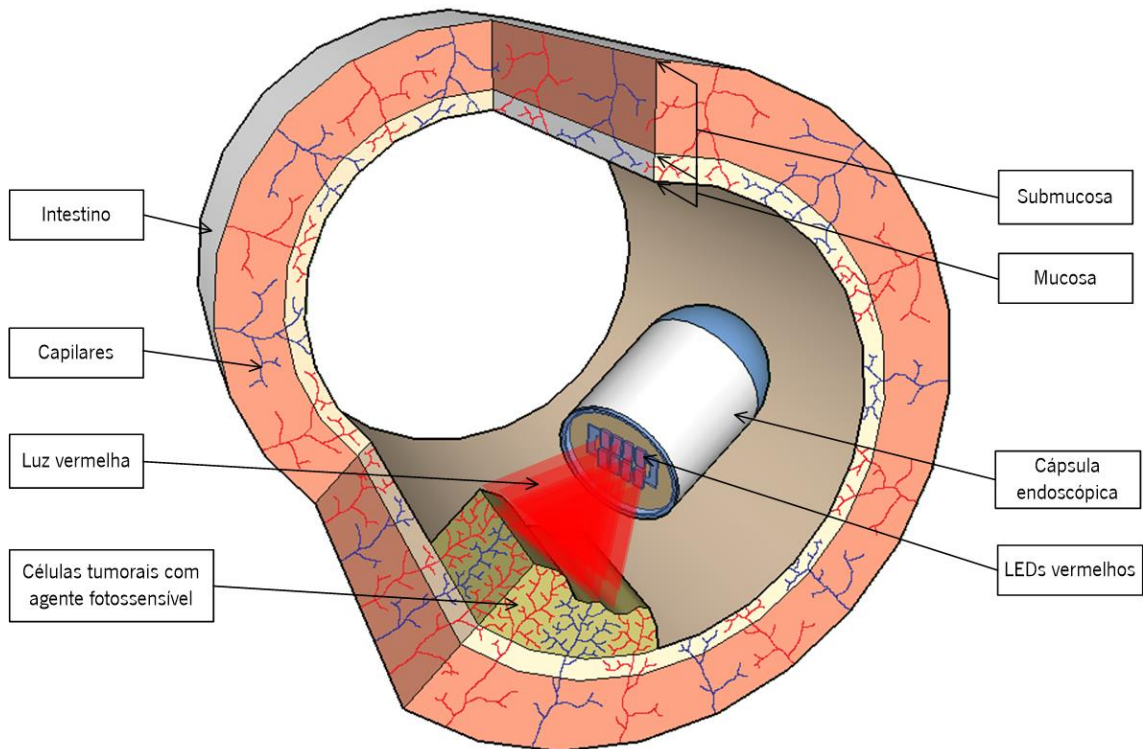
## 1.5 Motivação e objetivos

O aparecimento da CE veio revolucionar totalmente a endoscopia digestiva uma vez que permite a realização de um exame indolor, não invasivo, sem administração de anestesia e a visualização de todo o trato GI, o que não acontece na endoscopia convencional. No entanto, apresenta ainda algumas limitações, como a incapacidade de realizar terapia.

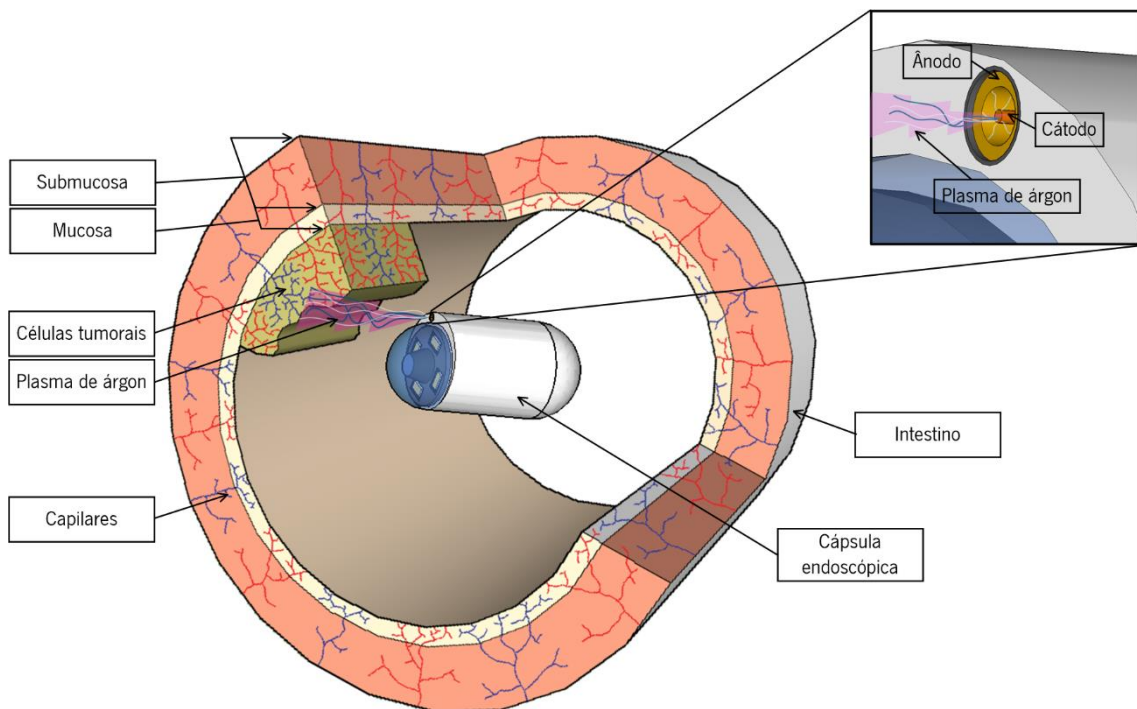
Recuando ao início da história da endoscopia GI, verifica-se que esta se encontrava limitada a pouco mais do que à visualização de órgãos. Só mais tarde é que se tornou numa ferramenta para realizar biopsias e depois para a realização de procedimentos terapêuticos. Ao contrário da CE, que permite a visualização e diagnóstico de todo o trato GI, na endoscopia convencional a visualização e diagnóstico do trato GI encontra-se limitada, não sendo possível em grande parte do intestino delgado. O desenvolvimento de cápsulas com capacidade terapêutica tem o potencial de fazer da CE uma arma muito mais poderosa, com a qual os médicos podem combater as doenças GIs.

A locomoção da CE, nomeadamente a locomoção magnética, permite o controlo da posição e locomoção da CE no interior do trato GI, possibilitando que procedimentos terapêuticos possam ser realizados por cápsula, como por exemplo a terapia fotodinâmica (TFD) e o plasma de argon neutro (PAN).

Com este trabalho pretende-se dar início à integração de duas modalidades terapêuticas na CE, a TFD e o PAN (Figura 1.12 e Figura 1.13).



**Figura 1.12** – Ilustração da integração da TFD na CE.



**Figura 1.13** – Ilustração da integração do PAN na CE.



Os principais objetivos desta tese de doutoramento são:

- Desenvolvimento de um módulo de TFD para integrar na CE. Projeção, construção e fabrico de uma fonte de luz vermelha com o comprimento de onda e potência necessária para ativar o agente fotossensível utilizado na TFD.
- Projeção, simulação e fabrico de um pequeno reservatório de árgon (microfundição a vácuo) para integrar na CE. Este reservatório deverá fornecer o fluxo de árgon necessário para realizar a técnica de PAN durante o tempo de tratamento (1 a 3 segundos).

Para validação dos objetivos serão realizados testes:

- *in vitro* em cultura de células tumorais do trato GI para validação da fonte de luz vermelha e avaliação da eficiência do agente fotossensível;
- mecânicos do reservatório fabricado para avaliação da sua resistência mecânica.

Como referido anteriormente, a introdução de técnicas de terapia na CE requer o controlo do movimento da CE no interior do trato GI, de forma a direcionar a CE para os tecidos alvo e desta forma realizar o procedimento terapêutico.

## **1.6 Organização da tese**

O presente documento encontra-se dividido em cinco capítulos.

Neste primeiro capítulo foram introduzidos os conceitos gerais dos dispositivos médicos e o estado da arte dos DIMIMs aplicados na área da gastroenterologia, descrevendo-se a evolução da endoscopia convencional até à CE atual. Foram abordadas as novas funcionalidades da CE assim como alguns tipos de terapia atualmente utilizadas na endoscopia convencional. Face a esta revisão foram introduzidos a motivação e os objetivos do presente trabalho.

O capítulo 2 aborda o estado da arte e a descrição pormenorizada da TFD, incluindo a explicação da reação fotodinâmica, os agentes fotossensíveis utilizados e o tipo de luz requerido e o procedimento associado a esta técnica de terapia.

No capítulo 3 é apresentada a técnica de PAN e os componentes necessários para a sua realização. São abordados os diversos processos de fabrico de dispositivos médicos, com especial destaque para o processo de microfundição.

O capítulo 4 contém o trabalho experimental e a discussão dos resultados. O desenvolvimento da fonte de luz vermelha e os ensaios fotodinâmicos *in vitro* em cultura de células

tumorais, bem como o *design*, simulação e fabrico do reservatório de árgon de paredes finas são apresentados neste capítulo.

Finalmente, no capítulo 5, são apresentadas as conclusões inerentes à realização dos trabalhos apresentados no âmbito deste programa de doutoramento. Face aos resultados apresentados será proposto o trabalho futuro.

No final de cada capítulo são apresentadas as referências bibliográficas utilizadas.

## Referências bibliográficas 1

- [1] World Health Organization, *WHO Global Model Regulatory Framework for Medical Devices including in vitro diagnostic medical devices*. World Health Organization, 2017, (2017).
- [2] Ministério da Saúde, *Decreto-Lei n.º 145/2009*. Portugal: Diário da República n.º 115/2009, Série I de 17 de junho de 2009, 3707–3765.
- [3] Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia, *Directiva 2007/47/CE de 5 de Setembro de 2007*. Jornal Oficial da União Europeia n.º L 247, 21–55.
- [4] U.S. Food and Drug Administration, “Classify Your Medical Device,” *Medical Devices*, 2018. [Online]. Available: <https://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/Overview/ClassifyYourDevice/default.htm>. [Accessed: 11-Sep-2018].
- [5] P. C. De Groen, “History of the Endoscope,” *Proc. IEEE* 105 (10), 1987–1995(2017).
- [6] A. Di Ieva, M. Tam, M. Tschabitscher, and M. D. Cusimano, “A Journey into the Technical Evolution of Neuroendoscopy,” *World Neurosurg.* 82 (6), e777–e789(2014).
- [7] S. Sridhar and G. Y. Wu, Eds., *Diagnostic and Therapeutic Procedures in Gastroenterology*. Cham: Springer International Publishing, 2018, (2018).
- [8] G. Pan and L. Wang, “Swallowable Wireless Capsule Endoscopy: Progress and Technical Challenges,” *Gastroenterol. Res. Pract.* 2012, 1–9(2012).
- [9] M. V. Sivak, “Gastrointestinal endoscopy: past and future,” *Gut* 55 (8), 1061–1064(2005).
- [10] I. C. Roberts-Thomson, R. Singh, E. Teo, N. Q. Nguyen, and I. Lidums, “The future of endoscopy,” *J. Gastroenterol. Hepatol.* 25 (6), 1051–1057(2010).
- [11] S. Varadarajulu *et al.*, “GI endoscopes,” *Gastrointest. Endosc.* 74 (1), 1–6.e6(2011).
- [12] P. Valdastri, M. Simi, and R. J. Webster, “Advanced Technologies for Gastrointestinal Endoscopy,” *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 14 (1), 397–429(2012).
- [13] T. Yano and H. Yamamoto, “Current state of double balloon endoscopy: The latest approach

- to small intestinal diseases,” *J. Gastroenterol. Hepatol.* 24 (2), 185–192(2009).
- [14] P. J. Pasricha, “Endoscopy 20 Years Into the Future,” *Clin. Gastroenterol. Hepatol.* 11 (2), 119–122(2013).
- [15] G. Iddan, G. Meron, A. Glukhovsky, and P. Swain, “Wireless capsule endoscopy,” *Nature* 405 (6785), 417(2000).
- [16] W. A. Qureshi, “Current and future applications of the capsule camera,” *Nat. Rev. Drug Discov.* 3 (5), 447–450(2004).
- [17] M. Mackiewicz, “Capsule Endoscopy - State of the Technology and Computer Vision Tools After the First Decade,” in *New Techniques in Gastrointestinal Endoscopy*, O. Pascu, Ed. InTech, 2011, 103–124(2011).
- [18] A. Wang *et al.*, “Wireless capsule endoscopy,” *Gastrointest. Endosc.* 78 (6), 805–815(2013).
- [19] P. Swain, “Wireless capsule endoscopy,” *Gut* 52 (90004), 48iv–50(2003).
- [20] S. Ladas *et al.*, “European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE): Recommendations (2009) on clinical use of video capsule endoscopy to investigate small-bowel, esophageal and colonic diseases,” *Endoscopy* 42 (03), 220–227(2010).
- [21] D. Bandorski *et al.*, “Contraindications for video capsule endoscopy,” *World J. Gastroenterol.* 22 (45), 9898(2016).
- [22] M. Keuchel, F. Hagenmüller, and H. Tajiri, Eds., *Video Capsule Endoscopy*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2014, (2014).
- [23] Z. Li *et al.*, “The Current Main Types of Capsule Endoscopy,” in *Handbook of Capsule Endoscopy*, Z. Li, Z. Liao, and M. McAlindon, Eds. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014, 5–45(2014).
- [24] D. Heresbach *et al.*, “Diagnostic accuracy of esophageal capsule endoscopy versus conventional upper digestive endoscopy for suspected esophageal squamous cell carcinoma,” *Endoscopy* 42 (02), 93–97(2010).
- [25] P. R. Slawinski, K. L. Obstein, and P. Valdastrì, “Emerging issues and future developments in capsule endoscopy,” *Tech. Gastrointest. Endosc.* 17 (1), 40–46(2015).
- [26] B. A. Whitmer, M. Raphael, and B. Warren, “Video Capsule Endoscopy: The Past, Present, and Future,” *J. Gastrointest. Dig. Syst.* 01 (S1), 1–6(2011).
- [27] C. Spada *et al.*, “Second-generation colon capsule endoscopy compared with colonoscopy,” *Gastrointest. Endosc.* 74 (3), 581–589.e1(2011).

- 
- [28] A. J. Postgate, D. Burling, A. Gupta, A. Fitzpatrick, and C. Fraser, "Safety, Reliability and Limitations of the Given Patency Capsule in Patients at Risk of Capsule Retention: A 3-Year Technical Review," *Dig. Dis. Sci.* 53 (10), 2732–2738(2008).
- [29] R. Eliakim, "Where do I see minimally invasive endoscopy in 2020: clock is ticking," *Ann. Transl. Med.* 5 (9), 202–202(2017).
- [30] P. Valdastrì, R. J. Webster, C. Quaglia, M. Quirini, A. Menciassi, and P. Dario, "A New Mechanism for Mesoscale Legged Locomotion in Compliant Tubular Environments," *IEEE Trans. Robot.* 25 (5), 1047–1057(2009).
- [31] B. Kim, S. Lee, J. H. Park, and J.-O. Park, "Design and Fabrication of a Locomotive Mechanism for Capsule-Type Endoscopes Using Shape Memory Alloys (SMAs)," *IEEE/ASME Trans. Mechatronics* 10 (1), 77–86(2005).
- [32] H. M. Kim *et al.*, "Active locomotion of a paddling-based capsule endoscope in an in vitro and in vivo experiment (with videos)," *Gastrointest. Endosc.* 72 (2), 381–387(2010).
- [33] P. Glass, E. Cheung, and M. Sitti, "A Legged Anchoring Mechanism for Capsule Endoscopes Using Micropatterned Adhesives," *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 55 (12), 2759–2767(2008).
- [34] G. Tortora *et al.*, "Propeller-based wireless device for active capsular endoscopy in the gastric district," *Minim. Invasive Ther. Allied Technol.* 18 (5), 280–290(2009).
- [35] G. Ciuti, A. Menciassi, and P. Dario, "Capsule Endoscopy: From Current Achievements to Open Challenges," *IEEE Rev. Biomed. Eng.* 4, 59–72(2011).
- [36] J. Keller *et al.*, "Inspection of the human stomach using remote-controlled capsule endoscopy: a feasibility study in healthy volunteers (with videos)," *Gastrointest. Endosc.* 73 (1), 22–28(2011).
- [37] J. Rey *et al.*, "Feasibility of stomach exploration with a guided capsule endoscope," *Endoscopy* 42 (07), 541–545(2010).
- [38] G. Ciuti *et al.*, "Robotic versus manual control in magnetic steering of an endoscopic capsule," *Endoscopy* 42 (02), 148–152(2009).
- [39] F. Carpi and C. Pappone, "Magnetic Maneuvering of Endoscopic Capsules by Means of a Robotic Navigation System," *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 56 (5), 1482–1490(2009).
- [40] F. Carpi, N. Kastelein, M. Talcott, and C. Pappone, "Magnetically Controllable Gastrointestinal Steering of Video Capsules," *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 58 (2), 231–234(2011).
- [41] W. H. Crosby, U. S. Army, and H. W. Kugler, "Intraluminal biopsy of the small intestine,"

- Am. J. Dig. Dis. 2 (5), 236–241(1957).
- [42] Kyoung-chul Kong, Jinhoon Cha, Doyoung Jeon, and Dong-il Dan Cho, “A rotational micro biopsy device for the capsule endoscope,” in *2005 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems*, 2005, 1839–1843(2005).
- [43] P. Valdastrì *et al.*, “Wireless therapeutic endoscopic capsule: in vivo experiment,” *Endoscopy* 40 (12), 979–982(2008).
- [44] M. Simi, G. Gerboni, A. Menciassi, and P. Valdastrì, “Magnetic Torsion Spring Mechanism for a Wireless Biopsy Capsule,” *J. Med. Device.* 7 (4), 041009(2013).
- [45] Liu Hongying, Pi Xitian, Zhou Chengwen, Zheng Xiaolin, Hou Whensheng, and Wen Zhiyu, “Design of site specific delivery capsule based on MEMS,” in *2008 3rd IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems*, 2008, 498–501(2008).
- [46] S. Yim and M. Sitti, “Design and Rolling Locomotion of a Magnetically Actuated Soft Capsule Endoscope,” *IEEE Trans. Robot.* 28 (1), 183–194(2012).
- [47] G. Traverso *et al.*, “Microneedles for Drug Delivery via the Gastrointestinal Tract,” *J. Pharm. Sci.* 104 (2), 362–367(2015).
- [48] N. Muguruma *et al.*, “Endoscopic ablation therapy for gastrointestinal superficial neoplasia,” *Dig. Endosc.* 24 (3), 139–149(2012).
- [49] S. V. Kantsevoy *et al.*, “Endoscopic mucosal resection and endoscopic submucosal dissection,” *Gastrointest. Endosc.* 68 (1), 11–18(2008).
- [50] J. H. Hwang *et al.*, “Endoscopic mucosal resection,” *Gastrointest. Endosc.* 82 (2), 215–226(2015).
- [51] S. A. Rodriguez *et al.*, “Mucosal ablation devices,” *Gastrointest. Endosc.* 68 (6), 1031–1042(2008).

## 2 Terapêutica fotodinâmica

---

As modalidades terapêuticas convencionais para o tratamento das lesões tumorais, como a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia, têm em comum a baixa seletividade e o aparecimento de efeitos secundários devido à elevada toxicidade provocada nas células saudáveis. A terapêutica fotodinâmica (TFD), quando comparada com os métodos de terapia convencionais, destaca-se pela elevada seletividade do agente fotossensível (PS) para as células tumorais, minimizando os danos nos tecidos saudáveis. Este fator associado a uma irradiação localizada da região tumoral acrescenta ainda mais seletividade a este método de tratamento.

Neste capítulo serão introduzidos os principais marcos históricos da TFD, a descrição pormenorizada e os procedimentos desta técnica terapêutica. Este tipo de terapia necessita da utilização de fármacos fotossensíveis, que também serão introduzidos neste capítulo.

### 2.1 Estado da arte

A luz tem sido utilizada como terapia há mais de 3 mil anos. As civilizações antigas, egípcia, indiana e chinesa, utilizavam a luz para tratar várias doenças, como a psoríase, raquitismo, vitiligo e o cancro de pele [1]–[3]. Na Grécia antiga, deitar-se ao sol todo nu era um passatempo popular. Os gregos utilizavam a exposição integral ao sol, chamada de helioterapia, no tratamento de doenças. O famoso médico grego Heródoto, considerado o pai da helioterapia, salientava a importância da exposição solar para a restauração da saúde [2]–[4]. Nos séculos XVIII e XIX, na França, a luz solar era usada no tratamento de várias doenças, como a tuberculose, raquitismo, escorbuto, reumatismo, paralisia, edema e fraqueza muscular [4]. Nos finais do século XIX, o médico dinamarquês Niels Finsen desenvolveu ainda mais a fototerapia. Ele descobriu que a exposição à luz vermelha previne a formação e descarga de pústulas de varíola, podendo ser usada para tratar esta doença. Usou também a luz ultravioleta do sol para tratar a tuberculose cutânea. Este foi o início da terapia de luz moderna. Em 1903 Niels Finsen recebeu o Prémio Nobel pelo seu trabalho dedicado à fototerapia [1], [3], [4].

A fototerapia descreve o uso da luz no tratamento de uma doença, por outro lado, a fotoquimioterapia requer a administração de um PS que subsequentemente é ativado por luz. Esta forma de terapia também remonta a mais de 3000 anos, quando os índios usavam psoralenos de plantas naturais no tratamento do vitiligo e, no século XII, os egípcios utilizavam diferentes psoralenos no tratamento da leucoderma [2], [4].

Em 1900, o estudante de medicina alemão Oscar Raab relatou pela primeira vez a morte celular induzida pela interação da luz com químicos. Enquanto trabalhava com o professor Herman von Tappeiner em Munique, descreveu o efeito letal que a combinação de luz e acridina vermelha tinham nos protozoários. Nas experiências subsequentes, Raab demonstrou que esse efeito letal era maior do que com a acridina vermelha sozinha, a luz sozinha ou a acridina vermelha exposta à luz e depois adicionado o protozoário. Ele relatou que a toxicidade ocorreu como resultado da fluorescência causada pela transferência de energia da luz para a substância química [1], [2], [4]. No mesmo ano, o neurologista francês J. Prime descobriu que os pacientes com epilepsia que foram tratados com eosina, administrada oralmente, desenvolveram dermatites nas áreas expostas à luz solar [1]. Mais tarde, Herma von Tappeiner e A. Jesionek trataram tumores da pele com aplicações tópicas de eosina e luz branca [1], [2].

Em 1904, Herma von Tappeiner e Jodlbauer identificaram que o oxigênio era componente integral nas reações de fotossensibilização e em 1907 introduziram o termo “ação fotodinâmica” para descrever este fenômeno [4].

As porfirinas foram identificadas em meados do século XIX, mas somente no início do século XX foram usadas na medicina. A hematoporfirina foi produzida pela primeira vez por H. Scherer em 1841 enquanto investigava a natureza do sangue. No entanto as suas propriedades fluorescentes não foram descritas até 1867, sendo esta substância somente nomeada por hematoporfirina em 1871 [4].

W. Hausmann realizou os primeiros estudos sobre os efeitos biológicos da hematoporfirina. Em 1911 relatou os efeitos da hematoporfirina e da luz nos protozoários e nas células sanguíneas e descreveu as reações da pele de um rato exposto à luz após ser administrado com hematoporfirina [4].

Em 1913, o cientista alemão Friedrich Meyer-Betz foi o primeiro a tratar humanos com porfirinas, testando os efeitos de 200 mg de hematoporfirina na sua própria pele. Observou inchaço e dor especificamente nas áreas expostas à luz [1], [3].

Na década de 1960, Richard Lipson e os seus colegas iniciaram a era moderna da TFD na *Mayo Clinic*. Foi sintetizado, por Samuel Schwartz, o primeiro fármaco associado à TFD, denominado derivado da hematoporfirina (HpD, do inglês *Hematoporphyrin Derivative*) [1], [3].

Em 1975 ocorreu um avanço significativo na TFD, quando Thomas Dougherty relatou que a administração do HpD e a sua ativação com luz vermelha erradicou por completo o crescimento

do tumor mamário em ratos. No mesmo ano, J. F. Kelly comprovou a eliminação do cancro da bexiga em ratos, através da ativação do HpD com luz [1], [4].

Outro marco importante no desenvolvimento da TFD ocorreu em 1976. Após o tratamento bem-sucedido de tumores em animais usando a TFD baseada em porfirinas, Kelly e Snell realizaram os primeiros testes em seres humanos com HpD, em pacientes com cancro da bexiga [1], [4].

O uso desta técnica no tratamento de patologias no trato GI foi realizada pela primeira vez em 1984 por J. S. McCaughan, que usou a TFD para tratar pacientes com cancro do esófago. Um ano depois, Y. Hayata usou a TFD para tratar pacientes com carcinoma gástrico [1].

O desenvolvimento da TFD continuou e foram efetuadas várias experiências no tratamento de outras patologias, como o tumor cutâneo, pulmonar, esofágico, gástrico, ginecológico recorrente, cerebral, retal, lesões intraoculares, na cabeça e no pescoço. Esta técnica de terapia mostrou resultados promissores em pacientes com patologias nos seus estágios iniciais, tendo sido recomendada em pacientes com cancros em estágios iniciais. Foram desenvolvidos também PSs mais sensíveis e mais potentes. Com esta nova linha de medicamentos, bem como com melhores métodos de localização e melhores protocolos e equipamentos, a eficácia da TFD pode ser melhorada [1], [2], [4].

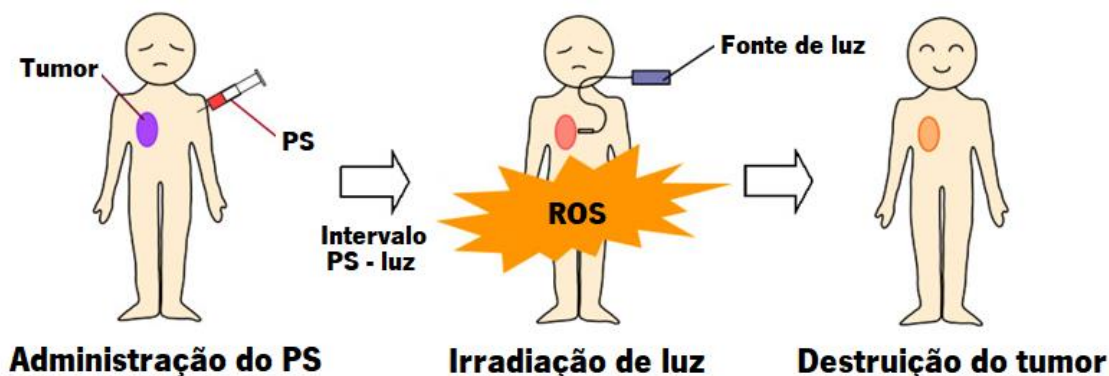
## **2.2 Princípios da terapêutica fotodinâmica**

### **2.2.1 Terapêutica fotodinâmica na prática clínica**

O protocolo da TFD é aplicado em duas etapas sequenciais: administração (sistêmica ou tópica) do PS ao tecido alvo e posterior irradiação de luz com um comprimento de onda específico (Figura 2.1). A combinação do PS e da luz inicia a reação fotodinâmica que gera as espécies de oxigênio reativas (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) responsáveis pelos danos celulares oxidativos que poderão levar à destruição do tecido alvo. Após a administração do PS, é necessário esperar um determinado período de tempo para que o PS atinja e se acumule no tecido alvo. Este período de tempo é designado de intervalo PS – luz e depende da via de administração, do tipo de PS e das suas propriedades farmacocinéticas e de biodistribuição. Após este período de tempo, quando a quantidade de PS no tecido alvo atinge o seu valor ideal, é realizada a irradiação de luz com um comprimento de onda específico (comprimento de onda de maior absorção do PS) para fornecer uma dose de luz predeterminada. Durante a irradiação, as ROS produzidas vão causar



danos oxidativos às biomoléculas e às estruturas celulares, promovendo assim a morte celular e, eventualmente a destruição do tumor [5], [6].

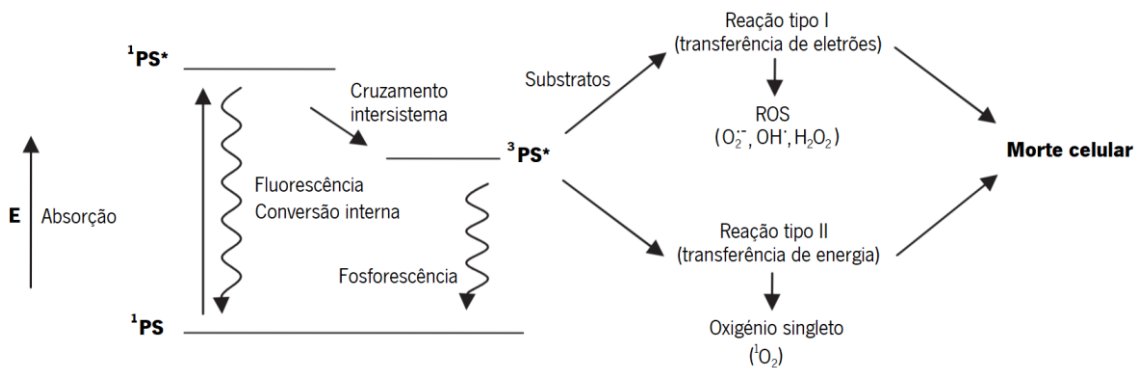


**Figura 2.1** – Representação da aplicação clínica do protocolo da TFD para o tratamento de um tumor sólido e localizado. Adaptado de [5].

### 2.2.2 Reação fotodinâmica

A TFD é uma modalidade terapêutica que se baseia na combinação de três fatores, sem os quais não é possível a sua realização: PS, luz com comprimento de onda específico e a presença de oxigênio molecular. Uma das vantagens da TFD é que o PS pode ser administrado de várias formas, como injeção intravenosa ou aplicação tópica na pele. O PS no seu estado fundamental ( $^1\text{PS}$ ) possui uma configuração eletrônica estável, ou seja, possui dois elétrons com *spins* opostos. A absorção de um fóton de luz com um comprimento de onda específico leva o PS a um estado excitado de curta duração (singleto,  $^1\text{PS}^*$ ). Este estado excitado é muito instável, perdendo o excesso de energia por emissão de luz (fluorescência) ou por produção de calor (conversão interna). Contudo, o estado singleto pode passar por um processo conhecido por cruzamento intersistema, para formar um estado excitado mais estável de longa duração (triplete,  $^3\text{PS}^*$ ). O PS no estado tripleto pode decair de volta ao estado fundamental através da emissão de luz (fosforescência) ou sofrer dois tipos de reações. A longa vida útil do estado tripleto é suficiente para transferir a sua energia diretamente para o oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ), ele próprio um tripleto no estado fundamental. Este passo de transferência de energia leva à formação de oxigênio singleto ( $^1\text{O}_2$ ) e ao estado fundamental do PS, chamando-se de reação tipo II. A reação tipo I pode também ocorrer se o estado excitado do PS reagir diretamente com um substrato, como a membrana celular ou uma molécula, e sofrer reações de transferência de elétrons, formando ROS. Este mecanismo pode envolver a aquisição ou a doação de um elétron para formar radicais catiónicos ou aniônicos, respetivamente. Esses radicais reagem com o oxigênio, produzindo produtos

oxigenados, como radicais aniônicos superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radicais hidroxila ( $HO^{\cdot}$ ) e peróxidos de hidrogénio ( $H_2O_2$ ) [1], [5], [7]–[12]. Como os efeitos de quase todos os fármacos usados na TFD são dependentes de oxigénio, normalmente não ocorre a fotossensibilização das áreas anóxicas do tecido [1]. A Figura 2.2 apresenta o diagrama de Jablonski modificado, onde se podem visualizar os estados energéticos do PS e as transições entre eles, bem como os produtos das reações tipo I e II.



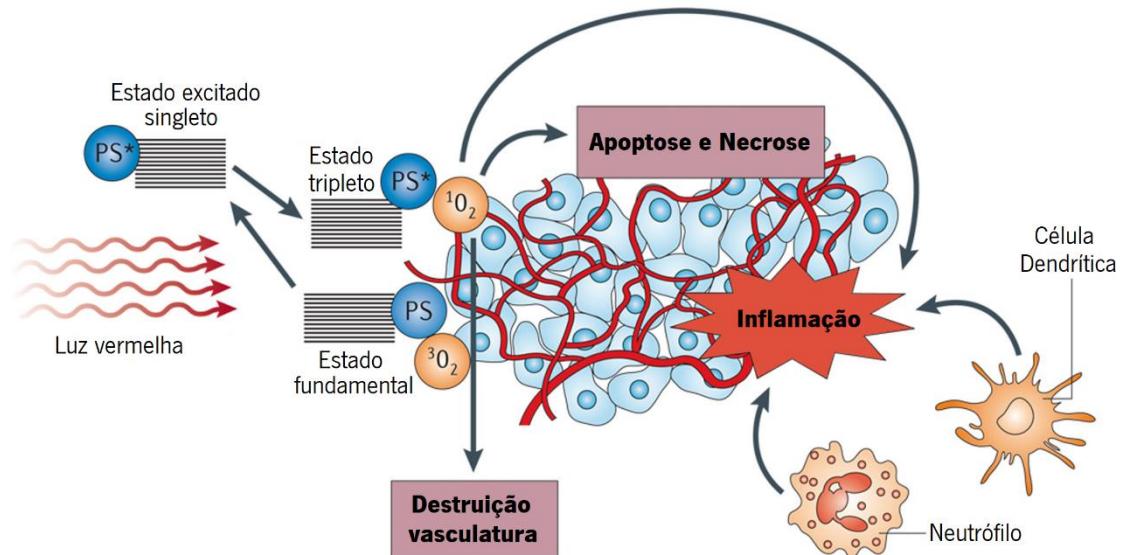
**Figura 2.2** – Diagrama de Jablonski modificado do mecanismo de ação da TFD. Adaptado de [9].

### 2.2.3 Mecanismos de ação no tumor

Os produtos resultantes das reações tipo I e II são responsáveis pelo efeito de morte celular e terapêutico na TFD. Ambas as reações ocorrem simultaneamente, no entanto o rácio entre estes dois processos depende do tipo de PS utilizado, das concentrações de substrato e de oxigénio molecular presentes, bem como da afinidade de ligação do PS ao substrato [1], [8]. Devido à elevada reatividade e curta semivida das ROS, apenas as células que estão próximas da área de produção das ROS (área de localização do PS) são diretamente afetadas pela TFD. A extensão do dano e da citotoxicidade resultante da TFD é multifatorial, dependendo do tipo de PS, da sua localização extracelular e intracelular e da dose total administrada, da dose de luz (fluência de luz) e da taxa de fluência de luz, da disponibilidade de oxigénio e do tempo entre a administração do PS e a exposição à luz [1], [8], [10], [13].

Existem três mecanismos principais pelos quais a TFD medeia a destruição tumoral (Figura 2.3). As ROS produzidas pelas reações fotoquímicas da TFD podem destruir diretamente as células tumorais pela indução da **apoptose e necrose**. A TFD pode também provocar a **destruição da vasculatura** associada ao tumor e dos vasos saudáveis circundantes, levando à interrupção do suprimento de oxigénio e nutrientes e, conseqüentemente, à morte celular indireta

por hipoxia. Por fim, a TFD pode induzir uma resposta inflamatória que ativa uma **resposta imunológica** contra as células tumorais remanescentes. O resultado da TFD é dependente de todos estes mecanismos e a contribuição de cada um depende do regime de tratamento dado [1], [10], [13], [14].



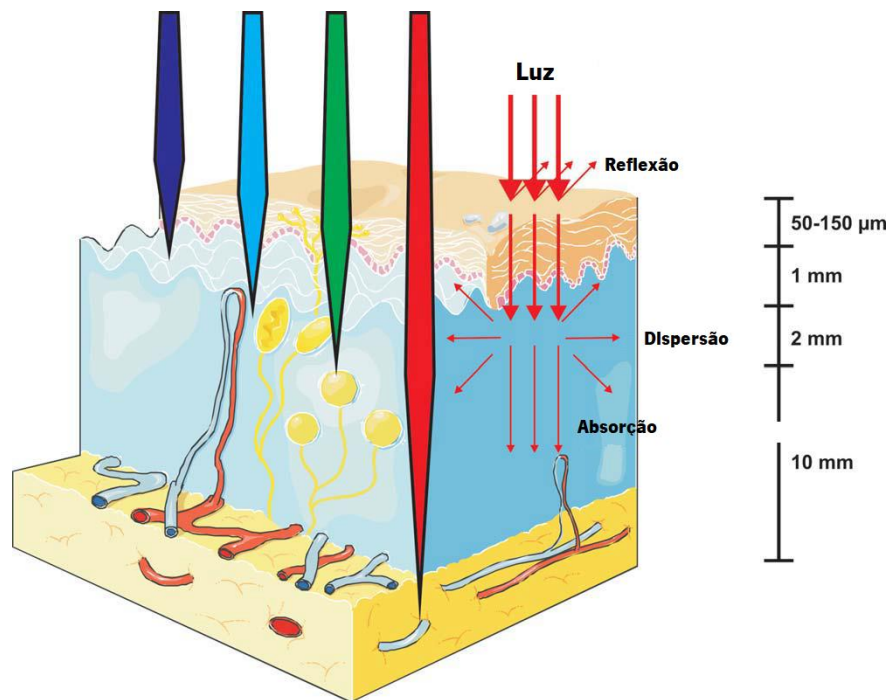
**Figura 2.3** – Mecanismos de ação no tumor da TFD. O PS absorve luz e passa ao estado excitado singleto e ao estado excitado tripleto. Este tripleto é capaz de transferir energia para o oxigênio molecular e formar o oxigênio singleto. Esta espécie pode interagir diretamente com as células tumorais, levando à sua morte por apoptose e/ou necrose, destruir a vasculatura tumoral e induzir uma resposta inflamatória que atrai leucócitos, como os neutrófilos e as células dendríticas. Adaptado de [15].

## 2.3 Luz, agente fotossensível e oxigênio

### 2.3.1 Luz

A luz é um importante componente da TFD. A penetração da luz nos tecidos tumorais é muito complexa, uma vez que pode ser refletida, dispersada ou absorvida. A extensão destes processos depende do tipo de tecido e do comprimento de onda da luz (Figura 2.4). A absorção deve-se principalmente a cromóforos endógenos existentes nos tecidos, como a hemoglobina, a mioglobina e os citocromos, que podem diminuir o processo fotodinâmico por competição com o PS no processo de absorção. A absorção de luz pelos tecidos diminui com o aumento do comprimento de onda, portanto os comprimentos de onda de luz maiores (luz vermelha) penetram mais eficientemente através do tecido. A região entre os 600 e 1200 nm é muitas vezes chamada de janela ótica do tecido [10], [16], [17]. Na TFD, comprimentos de onda menores (< 600 nm) têm menor penetração no tecido e são mais absorvidos, resultando numa elevada fotossensibilidade da pele. Por outro lado, comprimentos de onda maiores (> 850 nm) não têm

energia suficiente para gerar oxigênio singlete. Portanto, a maior permeabilidade do tecido ocorre entre os 600 e 850 nm. Esta faixa, chamada de janela fototerapêutica, é predominantemente utilizada na TDF [16]. A luz azul, na ordem dos 400 nm, pode também ser utilizada no tratamento de lesões cutâneas superficiais, de modo a minimizar lesões nos tecidos subjacentes.



**Figura 2.4** – Penetração da luz nos tecidos. O esquema representa um corte das camadas da pele (epiderme e derme). As setas representam o poder de penetração da luz com diferentes comprimentos de onda nos tecidos. A luz azul penetra menos eficientemente nos tecidos, enquanto a luz vermelha pode penetrar até 1 cm. Adaptado de [10].

Na TFD podem ser utilizadas três tipos de fontes luminosas: as lâmpadas de largo espectro, os lasers ou os díodos [6], [10], [18]–[20]. A escolha da fonte de luz deve basear-se no espectro de absorção do PS, nas características da patologia (localização, tamanho da lesão, acessibilidade e características do tecido) e no custo [6], [10], [20]. As lâmpadas de largo espectro são de custo acessível, exigem pouca manutenção e fornecem uma ampla saída espectral. Este facto exige a utilização de filtros de banda estreita, que permitem a seleção de um intervalo de comprimentos de onda que corresponde à máxima absorção do PS. A perda de energia sob a forma de calor, a baixa intensidade da luz e a restrição da irradiação a locais de fácil acesso (e.g. pele) são outras desvantagens deste tipo de fonte luminosa [6], [20]. O desenvolvimento do *laser* foi um grande marco na TFD, sendo atualmente a fonte de luz mais utilizada. Os *lasers* produzem luz monocromática coerente de alta intensidade. Podem ser acoplados a fibras óticas para alcançar locais inacessíveis (e.g. pulmão e bexiga) e diminuir a perda de luz devido à

dispersão. A irradiação através de *lasers* com comprimento de onda definido facilita o cálculo preciso da dose de luz. Os sistemas *laser* complexos, volumosos e caros usados no passado foram substituídos por díodos *laser* de fácil utilização, fiáveis e económicos [6], [10], [19], [20]. Os LEDs são uma boa alternativa devido ao baixo custo e tamanho reduzido. Além disso, os LEDs são caracterizados por emissão de banda estreita fixa, eliminando a necessidade de filtros óticos, e podem ser montados de forma a cobrir grandes áreas de irradiação ou formas anatómicas complexas [6], [10], [18], [20].

Sendo a luz uma componente essencial da TFD, a eficácia clínica é altamente dependente da precisão da sua entrega ao tecido alvo e da sua dose, que se traduz na fluência de luz, na taxa de fluência de luz, no tempo de exposição à luz e no modo de irradiação da luz (única ou fracionada) [10], [19]. A taxa de fluência de luz é o fluxo de energia radiante, denominada de potência ótica ( $P_0$ ), por unidade de área irradiada ( $A$ ), sendo expressa em  $W/cm^2$ . A fluência de luz, comumente referida como dose de luz, é a energia total da luz por unidade de área irradiada, sendo expressa em  $J/cm^2$  [1], [19]. O tempo de tratamento da TFD ( $\Delta t$ ) é calculado dividindo a fluência de luz pela taxa de fluência de luz. As equações 2.1, 2.2 e 2.3 descrevem a taxa de fluência de luz, fluência de luz e tempo de tratamento, respetivamente.

$$\text{Taxa de fluência de luz (W/cm}^2\text{)} = \frac{P_0}{A} \quad (2.1)$$

$$\text{Fluência de luz (J/cm}^2\text{)} = \frac{P_0}{A} \times \Delta t \quad (2.2)$$

$$\text{Tempo de tratamento (s)} = \frac{\text{Fluência de luz}}{\text{Taxa de fluência de luz}} \quad (2.3)$$

Vários estudos relatam que baixas taxas de fluência de luz são benéficas para a TFD [21]–[23]. A principal razão da menor eficácia da TFD para altas taxas de fluência de luz é a depleção de oxigénio nos tecidos, que leva a uma baixa foto-degradação do PS. A taxa de fluência de luz também tem impacto sobre o mecanismo dominante de morte celular na TFD. O uso de baixas taxas de fluência de luz aumenta a apoptose seletiva das células tumorais, que é mais desejável do que a inflamação ou edema que normalmente ocorre com a rutura descontrolada do conteúdo celular na necrose [24].

### 2.3.2 Agentes fotossensíveis

Um PS ideal deve possuir determinadas características, tais como, pureza e estabilidade química, acumulação e retenção preferencialmente nos tecidos tumorais, ausência de toxicidade no escuro, rápida excreção do corpo, induzindo assim uma baixa toxicidade sistêmica, e forte absorção para comprimentos de onda de luz entre os 600 e 850 nm, uma vez que a absorção de fótons com comprimento de onda superiores a 850 nm não fornecem energia suficiente para excitar o oxigênio para o seu estado singleto e inferiores a 600 nm não penetram suficientemente no tecido. Outro requisito importante na escolha de um PS é a elevada produtividade de ROS, nomeadamente de oxigênio singleto, ou seja, deve possuir um elevado rendimento quântico de oxigênio singleto. Uma forte absorção com um elevado coeficiente de extinção molar para comprimentos de onda de luz maiores é outra característica importante de um PS ideal. Por fim, outros fatores importantes de um PS ideal são o preço, que deve ser acessível, e a disponibilidade comercial do PS de forma a promover a utilização extensiva da TFD [5], [7], [10], [12], [13], [25].

Tendo em conta a evolução dos PSs, estes podem ser divididos em PSs de primeira geração, segunda geração e terceira geração. O primeiro composto a demonstrar potencial terapêutico para a TFD do cancro foi o HpD, do qual a versão purificada e comercialmente aprovada, *porfimer sodium (Photofrin®)*, representa a primeira geração de PSs para a TFD. O *porfimer sodium* é uma mistura de moléculas foto-ativas e possui um espectro com várias bandas de absorção que diminuem de intensidade para comprimentos de onda de luz superiores a 630 nm. Para maximizar a penetração da luz no tecido, a excitação do *porfimer sodium* é realizada a 630 nm, o que requer a aplicação de altas doses de luz (100 – 200 J/cm<sup>2</sup>) para compensar a sua baixa absorção de luz. Apesar de ainda ser utilizado clinicamente, tornou-se rapidamente evidente que o *porfimer sodium* apresenta várias limitações, e.g. baixa eficiência devido à reduzida absorção de luz, reduzida penetração da luz a 630 nm e um longo período de fotossensibilidade da pele [8], [10], [13].

Os PSs de segunda geração têm sido desenvolvidos desde os finais dos anos 80, de forma a ultrapassar as desvantagens apresentadas pelos PSs de primeira geração. Os PSs de segunda geração são caracterizados por possuírem comprimentos de onda de absorção maiores que 630 nm, maior eficiência na produção de ROS e por reduzir a fotossensibilidade da pele [16], [17], [26]. A aprovação do ácido 5-aminolevulínico (*Levulan®*), seguido pelo seu aminolevulinato de metilo (*Metvix®*), para queratoses actínicas e cancros da pele não-melanomas, foram marcos importante na história da TFD. Ambas as moléculas são pró-drogas que, uma vez no interior da

célula, são metabolizadas para formar o verdadeiro PS, a protoporfirina IX (PpIX), um PS endógeno. O espectro de absorção da PpIX é muito semelhante ao do *porfimer sodium*, sendo geralmente ativada por luz a 635 nm [13], [17]. Como resultado dos esforços contínuos para desenvolver PSs de segunda geração mais eficazes, em 2001 a temoporfina ou mTHPC (*Foscan®*) foi aprovada na Europa. A temoporfina, da família das clorinas, é um composto puro com maior absorção de luz a um maior comprimento de onda (652 nm) em comparação com as porfirinas. Assim, requer doses de luz dez vezes mais baixas (10 – 20 J/cm<sup>2</sup>) e permite profundidades de tratamento superiores. Além disso, o período de fotossensibilidade da pele após o tratamento foi significativamente reduzido de 4 a 12 semanas com o *porfimer sodium* para 2 a 4 semanas com a temoporfina [13].

Ao longo da última década, a investigação tem decorrido no desenvolvimento de PSs de terceira geração, que devem ser ativados por luz com comprimentos de onda maiores, minimizar ou eliminar a ocorrência de reações de fotossensibilidade da pele e ter maior seletividade para o tecido tumoral [8], [13], [19]. Para aumentar a seletividade do PS, podem ser utilizadas as seguintes modificações da TFD:

- combinação de PSs de segunda geração com moléculas focadas no recetor alvo;
- combinação de PSs com lipoproteínas LDL (Low Density Lipoprotein), devido ao facto das células tumorais que proliferam necessitarem de mais colesterol para a síntese das paredes celulares;
- conjugação de um PS com um anticorpo monoclonal dirigido ao antígeno específico da célula cancerígena;
- utilização de marcadores de superfície tumoral, como recetores do fator de crescimento, de recetores da transferrina ou de hormonas (e.g. insulina).

Em suma, os PSs de terceira geração são uma melhoria dos PSs atuais de segunda geração em termos de seletividade para os tecidos tumorais [8], [12], [19]. A Tabela 2.1 lista os PSs aprovados para a TFD do cancro. A Tabela 2.2 lista os PSs atualmente em desenvolvimento clínico para a TFD do cancro.

**Tabela 2.1** – PSs aprovados para a TFD [8], [19], [25], [27]

Agente fotossensível	Nome comercial	Indicações	Aprovação	$\lambda$ (nm)
<i>Porfimer sodium</i>	<i>Photofrin®</i>	Cancro esofágico, cancro endobronquial, cancro da bexiga, cancro gástrico e cancro cervical	Canadá (1993), EUA (1995) e em mais 40 países	630
Ácido 5-aminolevulinico	<i>Levulan®</i>	Queratose actínica, carcinoma basocelular, cancro da cabeça e do pescoço, cancro ginecológico, diagnóstico dos cancros do cérebro, cabeça e pescoço e bexiga	EUA (1999), Europa (2001)	635
Aminolevulinato de metilo	<i>Metevix®</i>	Queratose actínica, doença de Bowen e carcinoma basocelular	EUA (2004), União Europeia (2001), Nova Zelândia (2002), Austrália (2003)	635
Hexaminolevulinato	<i>Hexvix®</i>	Cancro da bexiga	EUA (2010)	635
Temoporfina	<i>Foscan®</i>	Cancro da cabeça e do pescoço, cancro da próstata e cancro do pâncreas	União Europeia (2001)	652
Verteoporfina	<i>Visudyne®</i>	Tratamento da degeneração muscular relacionada com a idade, miopia patológica e histoplasmose	EUA (2000), Europa (2000), Canadá (2000)	689-693
Talaporfina	<i>Laserphyrin®</i>	Cancro do pulmão	Japão (2003)	664

**Tabela 2.2** – PSs em desenvolvimento clínico para a TFD [6], [8], [20], [27]

Agente fotossensível	Nome comercial	Indicações	Fase clínica	$\lambda$ (nm)
Ftalocianinas de silício	<i>Pc4</i>	Queratose actínica, doença de Bowen, cancro da pele, linfoma não Hodgkin das células T	I (EUA)	670
Ftalocianinas de zinco	<i>CGP55847</i>	Queratose actínica, doença de Bowen, cancro da pele, carcinoma de células escamosas do trato aerodigestivo superior	I (EUA)	675
Lutexafrina	<i>Antrin®</i>	Cancro da próstata e fotoangioplastia	II (EUA)	732
2-[1-hexiloxietil]-2-devinilpirofeoforbideo-a (HPPH)	<i>Photochlor®</i>	Cancro esofágico inicial, cancro do pulmão de não pequenas células	II (Mundial)	665



Padoporfina	<i>Tookad®</i> ( <i>WST09</i> )	Cancro da próstata recorrente	III (Europa)	763
Rostaporfina	<i>Photrex®</i>	Metástases cutâneas do cancro da mama, carcinoma basocelular, sarcoma de Kaposi e cancro da próstata	II (EUA)	660

### 2.3.3 Oxigénio

O terceiro componente essencial no mecanismo da TFD é o oxigénio molecular. A sua importância para a eficácia da TFD pode ser negligenciada se assumirmos que a sua presença nos tecidos é constante. De fato, a concentração de oxigénio pode variar significativamente entre os diferentes tumores e até mesmo entre diferentes regiões do mesmo tumor, dependendo da densidade da vasculatura. Especialmente nos tumores sólidos mais profundos, muitas vezes caracterizados pelo seu microambiente anóxico, a falta de oxigénio pode ser um fator limitante. Como referido anteriormente, a irradiação do tumor com uma alta taxa de fluência de luz pode levar à temporária depleção local de oxigénio. Isto leva à interrupção da produção de ROS e à redução da eficácia do tratamento. A depleção de oxigénio ocorre quando a taxa de consumo de oxigénio pela reação fotodinâmica é superior à taxa de difusão de oxigénio na área irradiada. Além disso, a TFD pode causar a oclusão da vasculatura tumoral, reduzindo o fluxo sanguíneo para o tecido tumoral, aumentando ainda mais a hipoxia [6], [8], [28].

Através de técnicas para monitorizar a quantidade de oxigénio nos tecidos é possível ajustar a taxa de fluência da luz (compensada com o aumento do tempo de irradiação para manter a dose total de luz) até que a taxa de consumo de oxigénio coincida com a sua taxa de difusão no tecido alvo. Este equilíbrio também pode ser conseguido através do uso da dose de luz fracionada, ou seja, através da irradiação intermitente do tumor. Estas estratégias para aumentar a perfusão de oxigénio no tumor mostram uma melhoria limitada na resposta do tumor, uma vez que não conseguem afetar as células hipoxias. Além disso, aumentam a duração do tratamento, uma vez que é necessário mais tempo para administrar a dose de luz necessária [6].

## 2.4 Vantagens e limitações

A TFD tem várias vantagens relativamente às abordagens convencionais no tratamento do cancro. Os PSs de primeira geração causam maior fotossensibilidade da pele, contudo a TFD não tem efeitos adversos a longo prazo quando usada corretamente. É menos invasiva que os procedimentos cirúrgicos e pode ser realizada em ambulatório. A TFD, para além do próprio tumor,

pode também destruir a vasculatura a ele associado, contribuindo muito para a morte do tumor. A TFD pode ser direcionada para o tecido alvo com muita precisão devido à sua dupla seletividade. Os dois principais fatores que contribuem para a seletividade da TFD são a capacidade intrínseca de alguns PSs se acumularem no tecido tumoral e a irradiação de luz exclusivamente no tecido alvo. A acumulação seletiva do PS no tumor é facilitada no caso da aplicação tópica, uma vez que o PS é aplicado diretamente e apenas nas lesões a serem tratadas. Quando o PS é administrado intravenosamente, é necessário que permaneça em circulação tempo suficiente para que alcance e se acumule no tumor. Além disso, a TFD pode ser repetida várias vezes no mesmo local, ao contrário da radiação. Há pouca ou nenhuma cicatriz após a cicatrização. Por fim, geralmente custa menos do que as outras modalidades terapêuticas no tratamento do cancro [6], [29].

Como todas as modalidades terapêuticas, a TFD tem algumas limitações. O efeito fotodinâmico ocorre seletivamente no local irradiado, o que torna muito difícil a sua utilização em metástases disseminadas com a tecnologia atualmente disponível. A oxigenação do tecido é crucial para que o efeito fotodinâmico ocorra, portanto tumores rodeados por tecido necrótico ou densas massas tumorais levam a uma ineficaz TFD. Finalmente, a precisão da irradiação dos tecidos alvo é o ponto mais importante quando se considera a TFD como opção de tratamento. Portanto, tumores profundos (não facilmente acessíveis sem intervenção cirúrgica) são difíceis de tratar devido à baixa penetração da luz visível no tecido [6], [29]. As vantagens e limitações da TFD estão sintetizadas na Tabela 2.3.

**Tabela 2.3** – Vantagens e limitações da TFD

Vantagens	Limitações
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Menos efeitos adversos</li> <li>• Pouco invasiva</li> <li>• Curto tempo de tratamento</li> <li>• Utilizável em ambulatório</li> <li>• Dupla seletividade</li> <li>• Pode ser aplicada no mesmo local várias vezes</li> <li>• Pouca ou nenhuma cicatriz após a cicatrização</li> <li>• Custos mais baixos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fotossensibilidade após o tratamento</li> <li>• Eficácia do tratamento dependente da precisão da irradiação de luz do tumor</li> <li>• A oxigenação do tecido é crucial para o efeito fotodinâmico</li> <li>• Muito difícil tratar cancros metastáticos com a tecnologia atual</li> </ul>

## Referências Bibliográficas

- [1] D. E. J. G. J. Dolmans, D. Fukumura, and R. K. Jain, "Photodynamic therapy for cancer," *Nat. Rev. Cancer* 3 (5), 380–387(2003).
- [2] D. Mitton and R. Ackroyd, "A brief overview of photodynamic therapy in Europe," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 5 (2), 103–111(2008).
- [3] X. Li, S. Lee, and J. Yoon, "Supramolecular photosensitizers rejuvenate photodynamic therapy," *Chem. Soc. Rev.* 47 (4), 1174–1188(2018).
- [4] R. Ackroyd, C. Kelty, N. Brown, and M. Reed, "The History of Photodetection and Photodynamic Therapy," *Photochem. Photobiol.* 74 (5), 656(2001).
- [5] S. Yano *et al.*, "Current states and future views in photodynamic therapy," *J. Photochem. Photobiol. C Photochem. Rev.* 12 (1), 46–67(2011).
- [6] L. Rocha, "Development of a novel photosensitizer for Photodynamic Therapy of cancer," Universidade de Coimbra, 2015.
- [7] H. Abrahamse and M. R. Hamblin, "New photosensitizers for photodynamic therapy," *Biochem. J.* 473 (4), 347–364(2016).
- [8] S. S. Lucky, K. C. Soo, and Y. Zhang, "Nanoparticles in Photodynamic Therapy," *Chem. Rev.* 115 (4), 1990–2042(2015).
- [9] R. F. Donnelly, P. A. McCarron, and M. M. Tunney, "Antifungal photodynamic therapy," *Microbiol. Res.* 163 (1), 1–12(2008).
- [10] P. Agostinis *et al.*, "Photodynamic therapy of cancer: An update," *CA. Cancer J. Clin.* 61 (4), 250–281(2011).
- [11] E. Spyratou, M. Makropoulou, E. A. Mourelatou, and C. Demetzos, "Biophotonic techniques for manipulation and characterization of drug delivery nanosystems in cancer therapy," *Cancer Lett.* 327 (1–2), 111–122(2012).
- [12] S. Kwiatkowski *et al.*, "Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations," *Biomed. Pharmacother.* 106 (July), 1098–1107(2018).
- [13] M. Triesscheijn, P. Baas, J. H. M. Schellens, and F. A. Stewart, "Photodynamic Therapy in Oncology," *Oncologist* 11 (9), 1034–1044(2006).
- [14] R. R. Allison and K. Moghissi, "Photodynamic Therapy (PDT): PDT Mechanisms," *Clin. Endosc.* 46 (1), 24(2013).
- [15] A. P. Castano, P. Mroz, and M. R. Hamblin, "Photodynamic therapy and anti-tumour immunity," *Nat. Rev. Cancer* 6 (7), 535–545(2006).

- 
- [16] I. Yoon, J. Z. Li, and Y. K. Shim, "Advance in Photosensitizers and Light Delivery for Photodynamic Therapy," *Clin. Endosc.* 46 (1), 7(2013).
- [17] R. R. Allison and C. H. Sibata, "Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review," *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 7 (2), 61–75(2010).
- [18] P. Calzavara-Pinton, M. Venturini, and R. Sala, "Photodynamic therapy: update 2006 Part 1: Photochemistry and photobiology," *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* 21 (3), 293–302(2007).
- [19] U. Chilakamarthi and L. Giribabu, "Photodynamic Therapy: Past, Present and Future," *Chem. Rec.* 17 (8), 775–802(2017).
- [20] N. Almeida, "Terapia Fotodinâmica em combinação com Ácido Acetilsalicílico," Universidade de Coimbra, 2016.
- [21] H. Rezzoug, L. Bezdetsnaya, O. A'amar, J. L. Merlin, and F. Guillemin, "Parameters Affecting Photodynamic Activity of Foscan ® or Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (mTHPC) In Vitro and In Vivo," *Lasers Med. Sci.* 13 (2), 119–125(1998).
- [22] S. A. Blant, A. Woodtli, G. Wagnières, C. Fontollet, H. van den Bergh, and P. Monnier, "In Vivo Fluence Rate Effect in Photodynamic Therapy of Early Cancers with Tetra( m - hydroxyphenyl)chlorin," *Photochem. Photobiol.* 64 (6), 963–968(1996).
- [23] S. Coutier *et al.*, "Effects of Fluence Rate on Cell Survival and Photobleaching in Meta-Tetra( hydroxyphenyl)chlorin-photosensitized Colo 26 Multicell Tumor Spheroids¶," *Photochem. Photobiol.* 73 (3), 297–303(2007).
- [24] B. A. Hartl, H. Hirschberg, L. Marcu, and S. R. Cherry, "Characterizing low fluence thresholds for in vitro photodynamic therapy," *Biomed. Opt. Express* 6 (3), 770(2015).
- [25] A. E. O'Connor, W. M. Gallagher, and A. T. Byrne, "Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy," *Photochem. Photobiol.* 85 (5), 1053–1074(2009).
- [26] B. Bae and K. Na, "Development of Polymeric Cargo for Delivery of Photosensitizer in Photodynamic Therapy," *Int. J. Photoenergy* 2012, 1–14(2012).
- [27] A. Ormond and H. Freeman, "Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy," *Materials (Basel)*. 6 (3), 817–840(2013).
- [28] T. J. Kinsella, V. C. Colussi, N. L. Oleinick, and C. H. Sibata, "Photodynamic therapy in oncology," *Expert Opin. Pharmacother.* 2 (6), 917–927(2001).
- [29] G. Calixto, J. Bernegossi, L. de Freitas, C. Fontana, and M. Chorilli, "Nanotechnology-Based

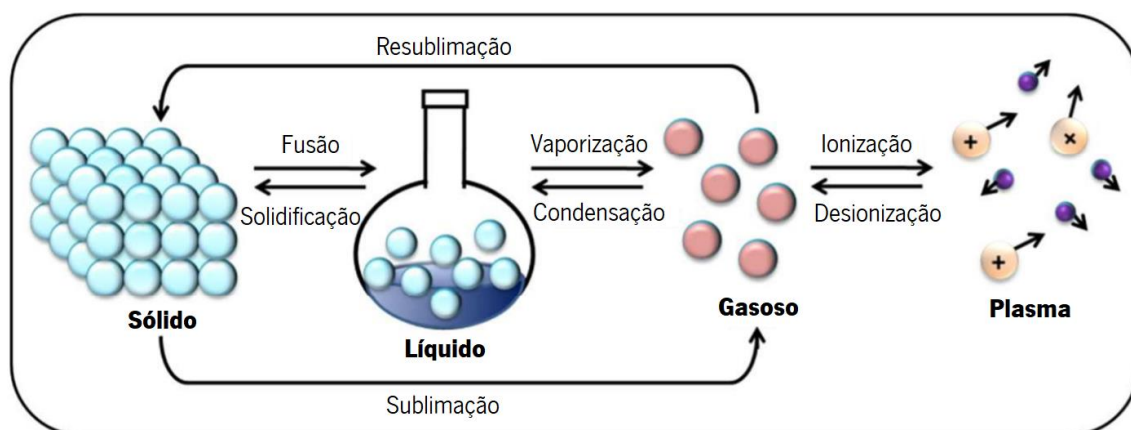
Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review," *Molecules* 21 (3), 342(2016).

### 3 Plasma de árgon e microfundição

Neste capítulo serão descritas duas técnicas terapêuticas com plasma de árgon, a coagulação com plasma de árgon e o plasma de árgon neutro. Serão abordados diversos processos de fabrico de dispositivos médicos, com especial destaque para o processo de microfundição.

#### 3.1 Plasma

Na física, o plasma é descrito como o quarto estado da matéria, além do sólido, líquido e gasoso (Figura 3.1). Quando mencionado pela primeira vez em 1879 pelo físico e químico britânico William Crookes, este estado foi descrito como “matéria radiante”. Irving Langmuir introduziu o termo plasma em 1928, porque a composição do gás fortemente ionizado lembrava-lhe o plasma sanguíneo [1]–[3].



**Figura 3.1** – Esquemático dos diferentes estados da matéria. Adaptado de [3].

O plasma consiste num gás ionizado que contém partículas eletricamente carregadas que se movem livremente, ou seja iões e eletrões que não estão ligados nem a átomos ou moléculas nem a radicais ativos, moléculas excitadas ou moléculas de átomos neutros. O plasma é gerado se for aplicada energia suficiente para separar os eletrões de átomos e moléculas. A capacidade das cargas positivas e negativas se moverem livremente é a responsável pela alta condutividade elétrica e, conseqüentemente, pela forte resposta a campos eletromagnéticos [1], [3].

Estima-se que os plasmas naturais representem mais de 99 % do universo visível, incluindo o sol e as estrelas, a coroa solar, os ventos estelares, a ionosfera terrestre, bem como os fenómenos bem conhecidos na Terra, como os relâmpagos e as auroras boreais [1].

O plasma pode também ser produzido artificialmente para ser usado, por exemplo, em *displays* e lâmpadas fluorescentes, no tratamento de superfícies de materiais sólidos e na área médica [1].

A diferenciação entre plasma térmico e não térmico é baseada nas temperaturas relativas dos eletrões, iões e partículas neutras. No plasma térmico a temperatura dos eletrões, iões e partículas neutras é a mesma, sendo que a temperatura do gás é normalmente muito alta. No plasma não térmico apenas os eletrões menores são aquecidos e conseqüentemente estão a um nível de temperatura mais alto do que os iões e as moléculas não carregadas. A diferença de massa é enorme, sendo que os eletrões podem estar a vários milhares de graus Celsius, enquanto todo o plasma permanece à temperatura ambiente [1].

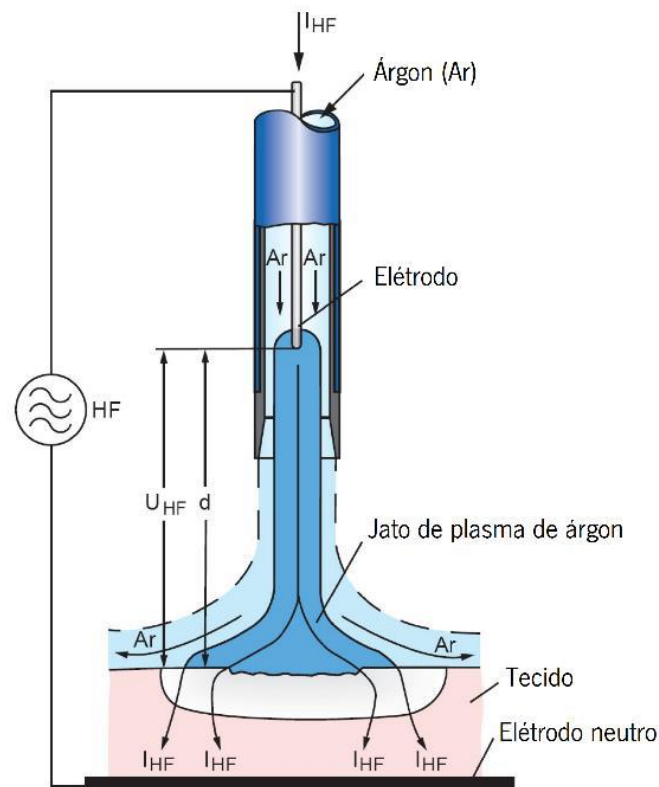
### **3.2 Coagulação com plasma de árgon**

A hemostasia e a destruição da mucosa são de grande importância na remoção de tecido anormal durante a endoscopia terapêutica.

O bisturi de plasma foi introduzido na medicina ocidental há mais de 30 anos atrás. A coagulação com plasma de árgon (CPA) tem sido amplamente utilizado na cirurgia geral. Introduzida pela primeira vez na cirurgia aberta no final dos anos 70, foi adaptada para o uso em endoscopia em 1991, tornando-se na técnica de coagulação endoscópica mais comumente utilizada [4].

A eletrocirurgia consiste na aplicação de corrente alternada ao tecido biológico para induzir um efeito térmico, através do efeito de Joule, que é usado para destruir seletivamente o tecido. A CPA é um procedimento de eletrocirurgia monopolar que utiliza um feixe de árgon ionizado para transferir, sem contacto físico, a corrente elétrica ao tecido. O feixe de plasma segue o caminho de menor resistência elétrica, independentemente do posicionamento do tecido e da direção do fluxo do árgon. Este facto oferece vantagens, particularmente nas aplicações endoscópicas, uma vez que permite a aplicação do plasma na direção em frente e tangencial ao tecido em regiões de difícil acesso. É utilizado o árgon porque é bioquimicamente inerte, tem uma baixa tensão de rutura (ou seja, ioniza facilmente), é não inflamável, não tóxico, não tem cor, odor e sabor, e é relativamente barato [4]–[6].

As *probes* de CPA são conectadas a um gerador de eletrocirurgia monopolar de alta frequência com uma gama de saída entre os 4000 e 9000 V. O fluxo de gás e a gama de potência são ajustados entre 4 – 7 L/min e 0 – 155 W, respetivamente. As *probes* são compostas por um punho, um tubo de teflon e um fio de tungsténio (elétrodo) no interior do tubo. A distância entre a *probe* e o tecido é tipicamente 2 – 10 mm. É geralmente utilizada uma tensão alternada com uma amplitude de 4 kV e uma frequência de 350 kHz para ionizar o árgon e iniciar a descarga (Figura 3.2) [4], [5]. São necessárias três condições para a utilização do plasma de árgon: tensão suficiente para ionizar o árgon, proximidade ao tecido alvo e tecido condutor (superfícies húmidas, vasos). Em regiões do trato gastrointestinal de parede fina, como o duodeno, é normalmente suficiente uma potência de 20 W, minimizando o risco de danos termais em toda a espessura do tecido. No estômago e no reto podem ser utilizadas potências maiores, entre os 40 e 60 W [6].



**Figura 3.2** – Representação esquemática de um dispositivo de CPA. O árgon flui através de um tubo que rodeia o elétrodo em forma de fio. A descarga é iniciada por uma tensão de alta frequência (HF)  $U_{HF}$  entre o elétrodo e o tecido. A corrente de alta frequência  $I_{HF}$  flui no tecido, provocando o efeito de coagulação, e retorna ao gerador HF através do elétrodo neutro. Adaptado de [4].

A CPA é uma técnica particularmente eficaz para tratamentos superficiais, uma vez que a profundidade de penetração da coagulação é limitada a poucos milímetros [4], [6]. Esta técnica é utilizada em quase todas as áreas cirúrgicas, como por exemplo na cirurgia geral e visceral,



urologia, ginecologia, gastroenterologia e endoscopia bronquial. Na gastroenterologia, tem sido utilizada no tratamento da proctite, esôfago de Barrett, ectasia vascular do antro gástrico (GAVE) e no tratamento de malformações arteriovenosas em todo o trato GI. Os principais campos de aplicação são a hemostasia e a desvitalização de tecido, com foco nas aplicações endoscópicas (Figura 3.3) [4].



**Figura 3.3** – Aplicação endoscópica da CPA. Adaptado de [4].

A CPA é mais eficaz do que o eletrocautério padrão, uma vez que distribui o arco elétrico num padrão mais uniforme, resultando numa penetração uniforme no tecido alvo. A profundidade da lesão tecidual varia entre os 3 e 10 mm. A profundidade de coagulação dos tecidos depende da duração da aplicação, da potência de saída do gerador e da distância ao tecido alvo. Ao contrário da eletrocirurgia e do laser, a temperatura do tecido cauterizado nunca excede os 110 °C, minimizando a destruição do tecido e a necrose [5]. O aquecimento do tecido biológico pode induzir diferentes efeitos que dependem não só da temperatura atingida, mas também da taxa e duração do aquecimento (Tabela 3.1) [4], [6].

**Tabela 3.1** – Efeitos da temperatura no tecido biológico

Temperatura do tecido	Efeitos
<40 °C	Nenhum
40 – 50 °C	Hipertermia: alterações na membrana celular e na estrutura molecular, edema Necrose e desvitalização
60 – 80 °C	Desnaturação das proteínas internas (coagulação) Destruição da membrana celular Coagulação do colagénio extracelular Desvitalização
100 °C	Evaporação do líquido celular Dessecação/vaporização
>100 °C	Carbonização

A CPA apresenta algumas vantagens relativamente à eletrocirurgia monopolar: o eléctrodo não está em contacto com o tecido; à medida que o tecido alvo se vai tornando coagulado, a corrente procura automaticamente um novo tecido condutivo, resultando numa hemostasia mais uniforme; redução do fumo; profundidade de penetração limitada.

### 3.3 Plasma de árgon neutro

O plasma de árgon neutro (PAN) permite a coagulação com o mínimo dano nos tecidos, através de um fluxo eletricamente neutro de gás ionizado, assemelhando-se à eletrocirurgia bipolar. Nesta técnica é gerado um plasma de árgon pela concentração de um pequeno fluxo de árgon no interior de um ambiente isolado que contém eléctrodos bipolares. Uma tensão de aproximadamente 30 a 60 V ioniza o árgon, produzindo um plasma de alta energia eletricamente neutro que é emitido, como um jato preciso, a partir da ponta do instrumento médico. Este jato de plasma possui energia térmica, cinética e luminosa que permite a dissecação de tecido, coagulação de pequenos vasos e evaporação de tecidos, dependendo da distância ao tecido, do tempo de aplicação e da potência utilizada. Posteriormente, sobre o ponto de aplicação do plasma, é formado um pequeno coágulo que sela a superfície do tecido. A profundidade de penetração no tecido varia entre os 0.5 e 2 mm, dependendo da duração da aplicação do jato de plasma no tecido (1 a 3 segundos). Na eletrocirurgia monopolar e na CPA, a corrente é aplicada ao tecido levando à coagulação através de efeitos combinados de aquecimento e geração de arco entre o eléctrodo ativo e o tecido alvo, resultando numa destruição mais profunda dos tecidos à medida que a corrente flui ao longo da trajetória de menor resistência do tecido. Em contraste, o dispositivo

de PAN emite um jato de plasma eletricamente neutro, sem fluxo de corrente através do paciente, mantendo mínima a penetração no tecido. Esta técnica utiliza aproximadamente 10 % do fluxo de gás utilizado na CPA. Tipicamente, o fluxo de gás é inferior a 0.4 L/min, reduzindo teoricamente o risco de embolia de ar e de sobrepresão intraperitoneal [7]–[10]. A Tabela 3.2 apresenta as principais diferenças entre as técnicas terapêuticas de PAN e CPA [9].

**Tabela 3.2** – Principais diferenças entre o PAN e a CPA

	CPA	PAN
<b>Fluxo de árgon</b>	4 – 7 L/min	<0.4 L/min
<b>Riscos</b>	Embolia, sobrepresão	Minimizados
<b>Profundidade de penetração</b>	3 – 10 mm	0.5 – 2 mm
<b>Tensão</b>	4000 – 9000 V	30 – 60 V
<b>Fluxo de corrente</b>	Eléctrodo ativo; necessita de eléctrodo neutro; similar à electrocirurgia monopolar	Eletricamente neutro, não existe passagem de corrente no paciente; similar à electrocirurgia bipolar
<b>Aplicação</b>	Coagulação	Vaporização, corte e coagulação de pequenos vasos
<b>Uso cirúrgico</b>	Sem contacto direto com o tecido	Sem contacto direto com o tecido

O *PlasmaJet*, desenvolvido pela *Plasma Surgical Limited* e aprovado pela FDA como um dispositivo de coagulação em 2004, é um dispositivo que usa um jato de plasma de árgon eletricamente neutro de alta energia para causar efeitos diretos nos tecidos. Desde a sua introdução, o *PlasmaJet* tem sido utilizado com segurança em casos de cirurgia aberta e de endoscopia na ortopedia, oncologia, gastroenterologia, cirurgia hepática, cirurgia plástica da face e de abdómen e cirurgia torácica. O sistema *PlasmaJet* possui um controlador que permite controlar com precisão o fluxo de árgon, garantindo um fluxo de gás apropriado para gerar o plasma. O controlador do fluxo de árgon, também permite que o fluxo tenha um nível preciso para determinados efeitos cirúrgico, como o corte, vaporização e coagulação. Neste sistema não é utilizada energia RF. Em vez disso, a fonte de alimentação é mantida nos 30 V DC. A peça manual, de onde sai o plasma, foi desenvolvida para que o plasma seja capaz de cortar tecido. O *PlasmaJet* difere das técnicas de electrocirurgia e CPA pela não existência de um fluxo de corrente pelo paciente [11], [12].

### 3.4 Processos de fabrico de dispositivos médicos

A produção de plasma por um DIMIM autónomo com aplicação na área da gastroenterologia (e.g. CE) requer, entre outros componentes, o fabrico de um pequeno reservatório metálico para armazenamento do árgon.

O *design* e o fabrico de dispositivos médicos são essenciais para melhorar a qualidade de vida dos pacientes e a eficácia do tratamento, reduzindo os custos da assistência médica [13]. A tendência do *design* e fabrico de dispositivos médicos é em direção a produtos mais pequenos e portáteis, que exigem componentes e tecnologias de fabrico mais avançadas. A maioria dos dispositivos médicos requerem recursos precisos com tolerâncias apertadas. As superfícies dos dispositivos médicos em contacto com o corpo humano geralmente requerem uma superfície extremamente lisa ou texturas especializadas para promover as interações entre o tecido saudável e o biomaterial [14]. Devido à sua natureza, os requisitos para desenvolver um dispositivo médico deve incluir biocompatibilidade, confiabilidade e resistência à corrosão. Atualmente são usadas tecnologias convencionais de fabrico para obter produtos comercializáveis, no entanto são necessárias tecnologias avançadas de fabrico para obter dispositivos médicos inovadores [13].

A contribuição da tecnologia para os dispositivos médicos baseia-se na combinação da compreensão e disponibilidade dos materiais e dos processos de fabrico. De acordo com a forma como os componentes/produtos são feito, os processos gerais de fabrico podem ser classificados em três categorias principais: subtrativos, aditivos e forçados (Tabela 3.3) [15], [16].

**Tabela 3.3** – Classificação dos processos de fabrico [15]–[17]

Processos de fabrico		
Subtrativos	Aditivos	Forçados
Maquinagem tradicional (furação, fresagem e torneamento)	Prototipagem rápida ...	Fundição por modelo perdido
Maquinagem por descarga elétrica		Fundição por molde permanente
Maquinagem por laser		Moldação por injeção
Maquinagem eletroquímica		Conformação
Maquinagem por feixe de elétrões		...
Maquinagem por ultrassons		
Maquinagem por jato abrasivo		
...		

### 3.4.1 Processos de fabrico subtrativos

O princípio dos processos de fabrico subtrativos consiste na remoção de material de um componente inicial para obter uma peça final. A desvantagem dos processos de fabrico subtrativos é que apenas podem realizar formas com características acessíveis pelas ferramentas subtrativas. Por exemplo, a fresagem CNC (*Computer Numerical Control*) não consegue criar aberturas. Por outras palavras, um processo de fabrico subtrativo não pode ser um processo de forma livre [16], [17].

Os processos de maquinagem podem ser classificados em três categorias principais de acordo com o tipo de energia usada no processo: maquinagem baseada em energia mecânica, maquinagem baseada em energia térmica e maquinagem baseada em energia química/eletroquímica (Tabela 3.4) [17].

**Tabela 3.4** – Classificação dos processos de maquinagem baseada no tipo de energia usada [17]

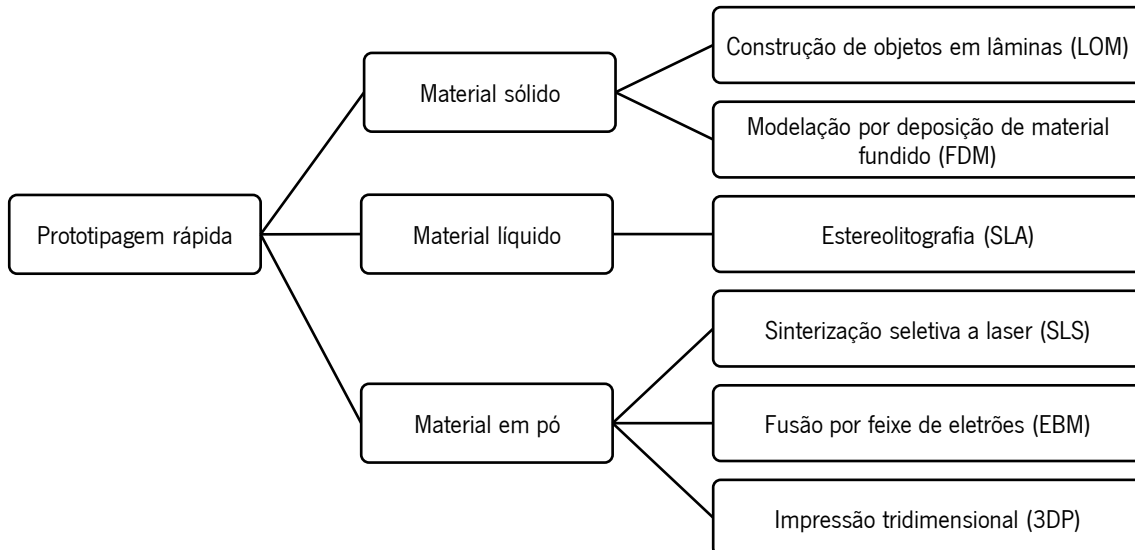
Maquinagem			
Mecânica		Térmica	Química/eletroquímica
<u>Tradicional</u>	<u>Avançada</u>	- Maquinagem por descarga elétrica	- Maquinagem eletroquímica
- Furação	- Maquinagem por jato abrasivo	- Maquinagem por laser	- Maquinagem fotoquímica
- Fresagem	- Maquinagem por ultrassons	- Maquinagem por feixe de eletrões	
- Torneamento	- Maquinagem por jato de água		

Atualmente, a maquinagem CNC, a maquinagem por descarga elétrica, a maquinagem por laser, etc. têm sido utilizadas no fabrico de alguns dispositivos médicos. Em particular, a micro-maquinagem por laser tem sido amplamente utilizada no fabrico de *stents* vasculares. Um *stent* consiste numa rede de arame expansível ou num tubo oco perfurado que é inserido numa estrutura oca do corpo humano (e.g. artéria coronária bloqueada) com o objetivo de a manter aberta [13], [14]. Na maquinagem por laser o fabrico do dispositivo é realizado pela remoção de material através de um laser. Contudo, a remoção de material é impossível em locais onde o caminho do laser está obstruído. Esta restrição limita as geometrias que podem ser fabricadas por esta técnica, como por exemplo, geometrias internas [13]. O principal problema no processo de maquinagem a laser é o controlo da tolerância e precisão de formas com altas exigências [18], [19].

### 3.4.2 Processos de fabrico aditivos

O aparecimento da prototipagem rápida, no final da década de 80, introduziu um novo paradigma de fabrico que adicionava ou empilhava material para obter a forma desejada [16].

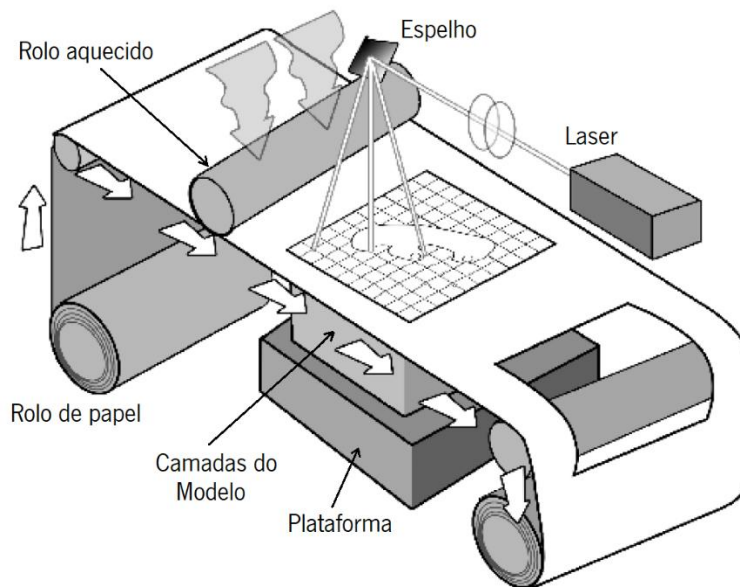
Os processos de prototipagem rápida têm vindo a ser utilizados na produção de dispositivos médicos a partir de modelos CAD (*Computer Aided Design*) 3D baseados na TC, RM e outras técnicas de imagem médica. De facto, o número de aplicações desta tecnologia na área médica tem estado a aumentar. O conceito básico da prototipagem rápida é o fabrico de um modelo 3D pela adição de camadas consecutivas. A principal vantagem desta técnica é a capacidade de produzir rapidamente modelos 3D muito complexos e de usar vários materiais. A utilização desta tecnologia permite obter dispositivos personalizados com geometria, tamanho e função específicas para um determinado paciente e contexto médico. Esta tecnologia pode também ser usada por cirurgiões no planeamento de cirurgias através do fabrico de réplicas anatómicas baseadas na informação digitalizada da TC e RM [13]. Na Figura 3.4 estão esquematizados os principais processos de fabrico de prototipagem rápida em função do estado do material usado no processo [20], [21].



**Figura 3.4** – Esquemático dos principais processos de fabrico de prototipagem rápida em função do estado do material de processamento.

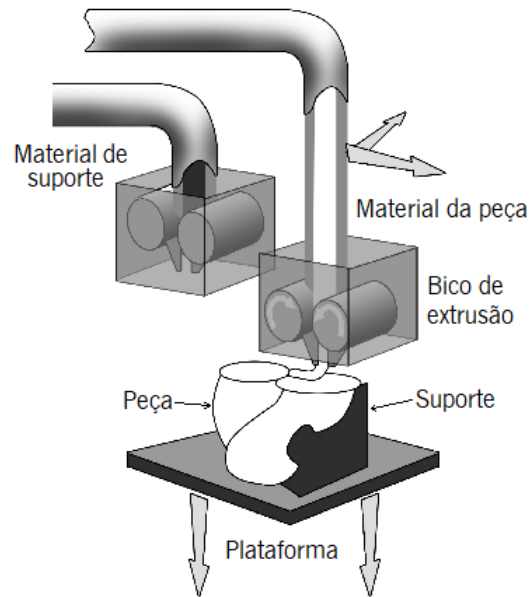
O processo de fabrico de construção de objetos em lâminas (LOM) consiste no corte de camadas de material, unidas por um agente de ligação, de forma a criar o objeto pretendido (Figura 3.5). A matéria-prima é geralmente papel laminado, proveniente de uma rolo, e o agente

de ligação é ativado por calor. O corte das camadas é realizado por um feixe laser de alta precisão. Após o corte da primeira camada, a plataforma baixa e uma nova tira de papel é colocada sobre as anteriores. Um rolo aquecido realiza a cura do agente de ligação. Este processo repete-se até todas as camadas de papel terem sido adicionadas. Os modelos de papel devem ser selados e revestidos por tinta ou verniz de forma a evitar danos provocados pela humidade [16], [20]–[22].



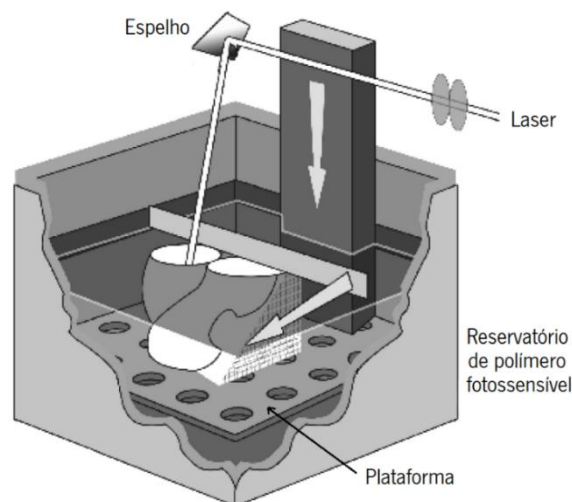
**Figura 3.5** – Ilustração do processo de construção de objetos em lâminas. Adaptado de [21].

A modelação por deposição de material fundido (FDM) é um dos processos de prototipagem rápida mais conhecidos. O filamento de material, geralmente plástico, é direcionado para um bico de extrusão, que se encontra à temperatura de fusão do material, que possui um mecanismo que permite controlar o fluxo de plástico derretido. O material é depositado enquanto o bico de extrusão e a plataforma se movimentam segundo coordenadas cartesianas de forma a criar as camadas da peça. O plástico endurece imediatamente após a extrusão, ligando-se à camada anterior. Pode ser criado material de suporte caso haja necessidade de apoio vertical à peça (Figura 3.6). A FDM é atualmente a tecnologia de prototipagem rápida mais utilizada, uma vez que não tem uma tecnologia tão complexa como as demais e apresenta um mecanismo de produção mais económico. A precisão deste processo depende da precisão dos motores que controlam a máquina, podendo atualmente obter-se uma precisão na ordem dos 20  $\mu\text{m}$  de espessura de cada camada [20]–[22].



**Figura 3.6** – Ilustração do processo de modelação por deposição de material fundido. Adaptado de [21].

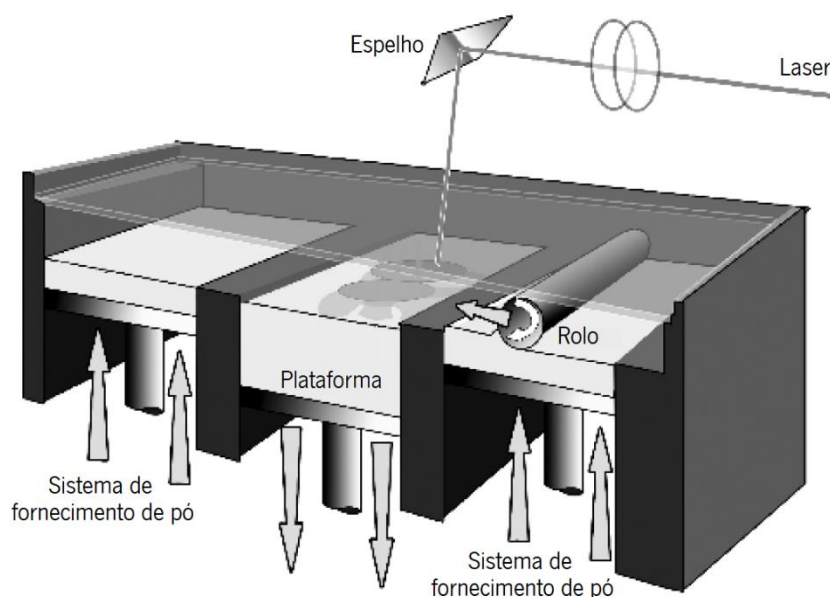
A estereolitografia (SLA) é considerada, não só o processo de fundação, como também o mais complexo da prototipagem rápida. Este processo permite fazer construções de modelos 3D a partir de um polímero líquido sensível à luz, que solidifica quando exposto à radiação ultravioleta. O modelo é construído sobre uma plataforma situada abaixo da superfície do polímero fotossensível, enquanto o laser ultravioleta faz o mapeamento das camadas que constituem a peça. Após a solidificação de uma camada, a plataforma de construção, incluindo a peça parcialmente acabada, baixa a distância equivalente à espessura de uma camada e é aplicada uma nova camada de polímero fotossensível. O processo continua até que a peça esteja terminada (Figura 3.7) [20]–[22].



**Figura 3.7** – Ilustração do processo de estereolitografia. Adaptado de [21].



A sinterização seletiva a laser (SLS) é um processo de prototipagem rápida que permite o fabrico de peças tridimensionais complexas através da consolidação de camadas sucessivas de material em pó (Figura 3.8). Utiliza um feixe laser para, de forma seletiva, sinterizar ou fundir pó metálico ou polimérico numa plataforma de construção de acordo com as geometrias predeterminadas. A sequência de deposição de pó e mapeamento laser é repetida até que a peça esteja concluída. A utilização de um laser de alta potência torna este processo caro. Além disso, os produtos necessitam de ser acabados ou polidos para obter a precisão e o acabamento superficial pretendidos [18], [21]–[24].

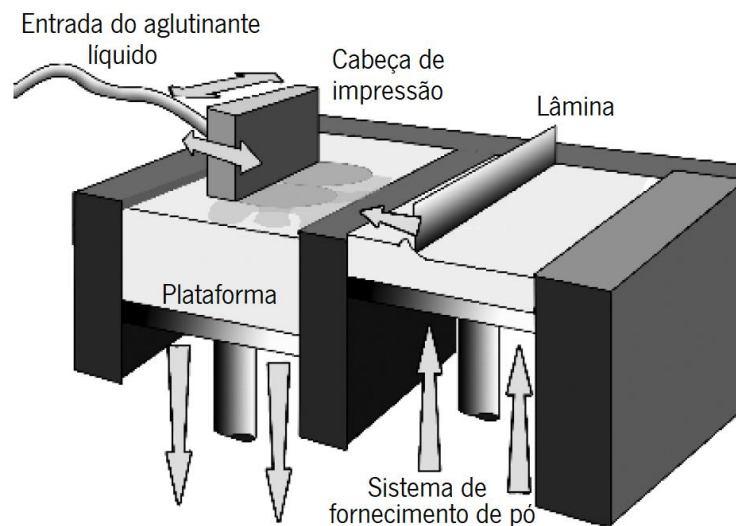


**Figura 3.8** – Ilustração do processo de sinterização seletiva a laser. Adaptado de [21].

A fusão por feixe de eletrões (EBM) usa uma abordagem similar à SLS. Este processo utiliza um feixe de eletrões, obtido pelo aquecimento de um filamento de tungsténio a altas temperaturas, como fonte energética responsável pela fusão total dos pós metálicos. A potência desenvolvida pelo feixe de eletrões é muito alta, permitindo que o processo derreta completamente uma vasta gama de metais, incluindo a liga de titânio [21].

O processo de impressão tridimensional (3DP) é semelhante ao processo de SLS, no entanto, em vez de utilizar um laser para sinterizar o material em pó (inclui metálicos e cerâmicos), usa uma cabeça de impressão para depositar um aglutinante líquido que une as partículas de pó do material de acordo com a geometria da secção transversal da peça (Figura 3.9). Após a conclusão de uma camada é aplicada a próxima camada de pó. O ciclo de produção envolve a combinação de camadas sucessivas até que toda a peça esteja terminada. O pó sem aglutinante

serve de suporte à construção da peça. A 3DP apresenta uma velocidade de construção rápida, no entanto a precisão, o acabamento superficial e a resistência das peças não são tão bons quanto os outros processos [16], [21].

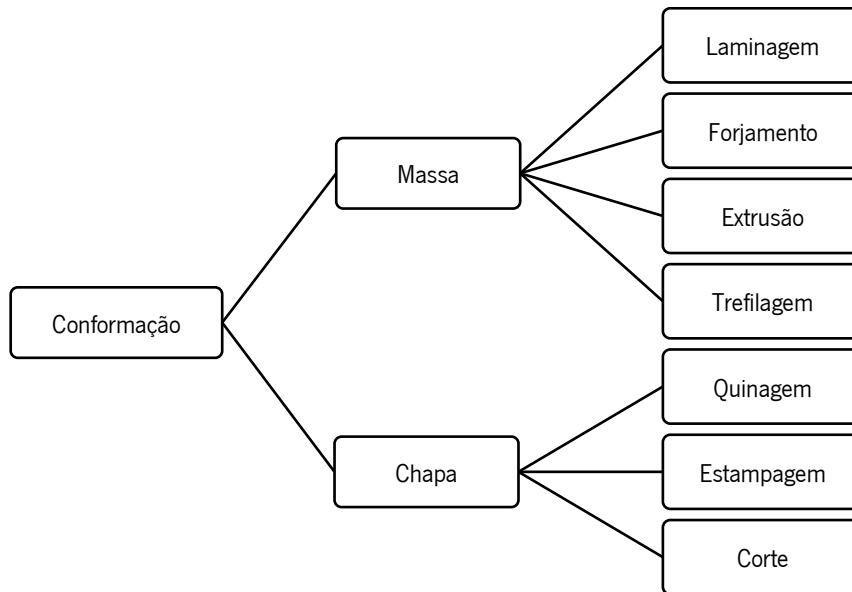


**Figura 3.9** – Ilustração do processo de impressão tridimensional. Adaptado de [21].

### 3.4.3 Processos de fabrico forçados

Os processos de fabrico forçados exploram a capacidade de deformação dos materiais sólidos e líquidos. A necessidade de moldes, matrizes e de outras ferramentas, constitui a principal desvantagem deste tipo de processos de fabrico [16].

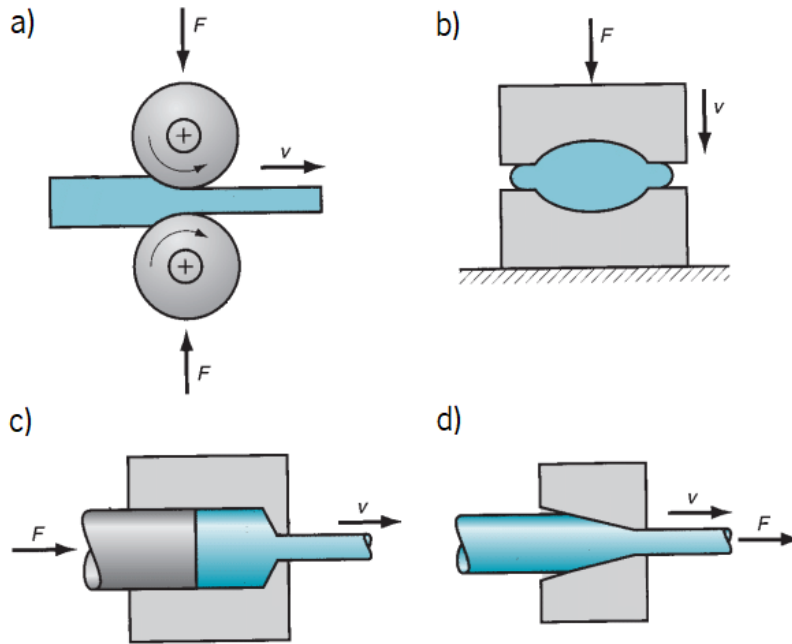
A conformação de metais inclui um grande grupo de processos de fabrico, nos quais é usada a deformação plástica da matéria-prima para mudar a forma das peças de metal. A deformação resulta do uso de ferramentas, geralmente moldes, onde são aplicadas tensões que excedem a tensão de cedência do metal. Portanto, o metal deforma-se para adquirir a forma da geometria do molde. As tensões aplicadas são geralmente compressivas, contudo alguns processos utilizam forças de tração, enquanto outros dobram o metal ou aplicam tensões de cisalhamento para cortar o metal. Estes processos podem ou não ser executados com o aquecimento do metal para facilitar o processo ou para modificar as características mecânicas da peça final. Para a peça ser formada com sucesso, o metal deve possuir certas propriedades: baixa tensão de cedência e alta ductilidade. Estas propriedades são afetadas pela temperatura. A ductilidade aumenta e a tensão de cedência diminui quando a temperatura de trabalho aumenta. Os processos de conformação podem ser classificados em duas categorias principais: processos de conformação de massa e processos de conformação de chapa (Figura 3.10) [25]–[27].



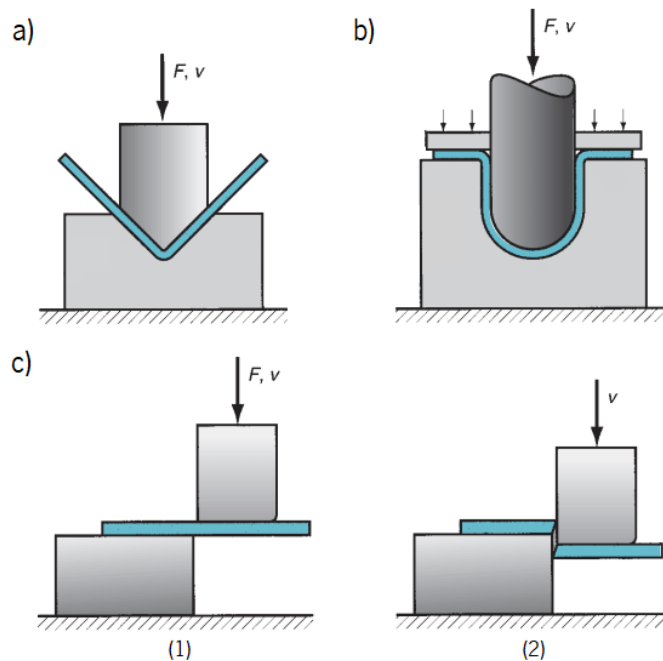
**Figura 3.10** – Classificação dos processos de conformação.

Os processos de conformação de massa são geralmente caracterizados pelas deformações significativas e pelas mudanças massivas de forma, e pela relação de área de superfície para volume de trabalho relativamente pequena. O termo “massa” descreve as peças de trabalho que possuem essa baixa relação de área/volume. As peças iniciais de trabalho incluem tarugos cilíndricos e barras retangulares. A Figura 3.11 ilustra os processos básicos de conformação de massa [26].

Os processos de conformação de chapa são operações de deformação e corte executadas em chapas, tiras e bobinas de metal. A relação de área de superfície para volume de trabalho é alta. As operações de chapa metálica são geralmente executadas sem aquecimento e através do uso de uma punção (parte positiva) e de um molde (parte negativa). A Figura 3.12 ilustra os processos básicos de conformação de chapa [26].



**Figura 3.11** – Processos básicos de conformação de massa: a) laminagem; b) forjamento; c) extrusão; d) trefilagem. Adaptado de [26].



**Figura 3.12** – Processos básicos de conformação de chapa: a) quinagem; b) estampagem; c) corte. Adaptado de [26].

A curva de tensão–deformação permite compreender o comportamento dos metais durante a conformação. A curva típica de tensão–deformação para a maioria dos metais é dividida em duas regiões: região elástica e região plástica (Figura 3.13). Nos processos de conformação de metais, a região plástica é de interesse fundamental, uma vez que o material é plasticamente

e permanentemente deformado nesses processos. Na região elástica, a relação entre tensão e deformação é linear, e o material exibe um comportamento elástico, retomando ao seu comprimento inicial quando a carga (tensão) é removida. A relação é definida pela lei de Hooke [26]:

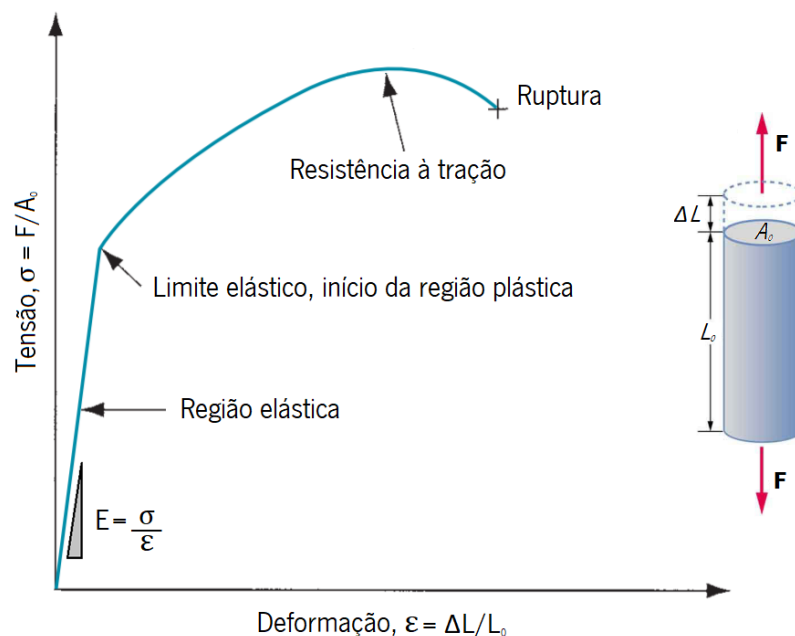
$$\sigma = E \cdot \varepsilon \quad (3.1)$$

onde  $\sigma$  é a tensão (MPa),  $E$  é o módulo de elasticidade ou módulo de Young (MPa) e  $\varepsilon$  é a deformação.

Na região plástica, a relação entre tensão e deformação pode ser aproximada por [26]:

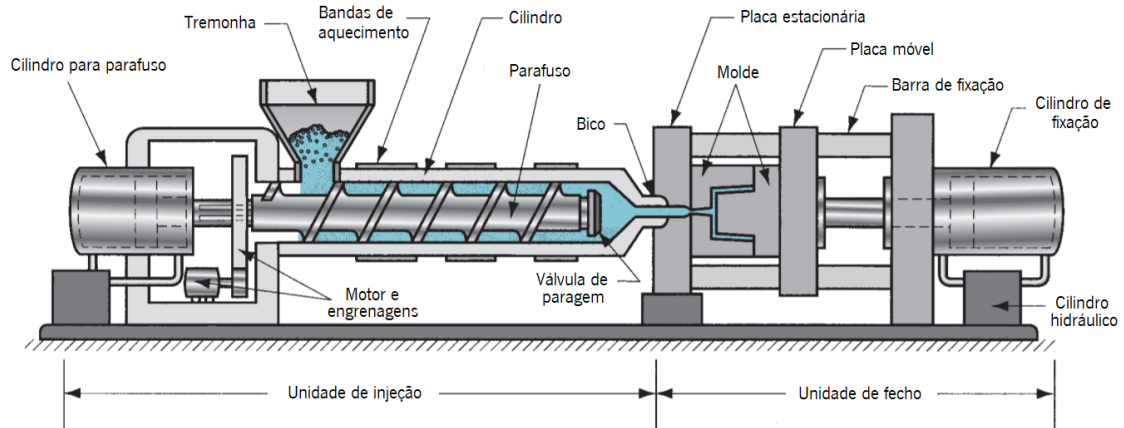
$$\sigma = K \cdot \varepsilon^e \quad (3.2)$$

A constante  $K$  é chamada de coeficiente de força (MPa) e o parâmetro  $e$  é chamado de expoente de endurecimento. Esta equação é geralmente válida para comportamentos plásticos de metais em trabalho frio.

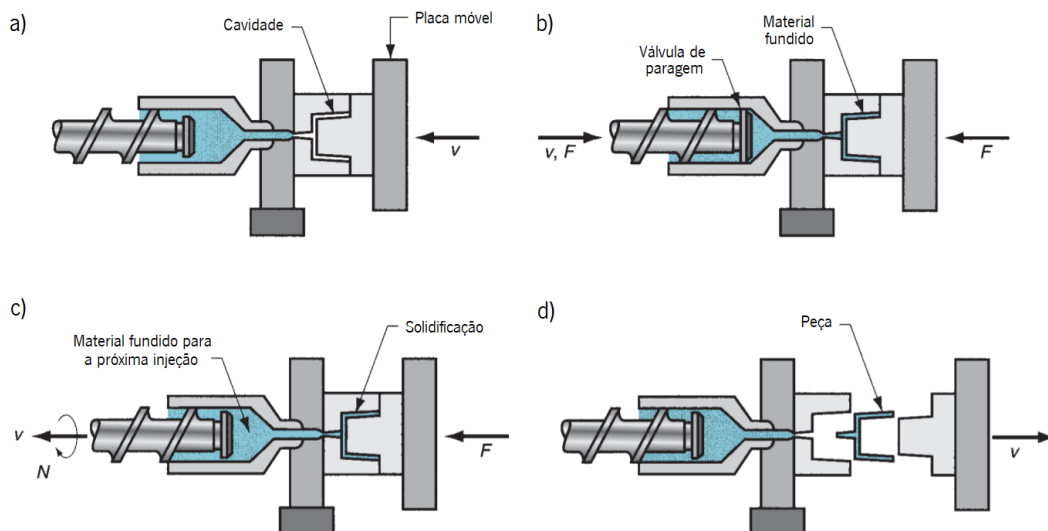


**Figura 3.13** – Curva típica de tensão–deformação dos metais num ensaio de tração. Adaptado de [26].

A moldação por injeção é o processo de fabrico de polímeros mais utilizado. Este processo de fabrico permite a produção de peças através da injeção de material num molde fechado. A máquina de moldação de polímeros por injeção é composta por duas unidades principais, a unidade de injeção e a unidade de fecho (Figura 3.14). A unidade de injeção aquece, funde e injeta o material no molde, funcionando como uma extrusora. A unidade de fecho realiza o fecho e a abertura do molde em cada ciclo de injeção (Figura 3.15). A unidade de injeção é constituída principalmente pelo cilindro para parafuso, tremonha, bandas de aquecimento, cilindro, parafuso, bico, válvula de paragem, motor e engrenagens. A unidade de fecho é constituída principalmente pela placa estacionária, placa móvel, barra de fixação, cilindro de fixação e cilindro hidráulico [26].



**Figura 3.14** – Esquémico de uma máquina de moldação de polímeros por injeção. Adaptado de [26].



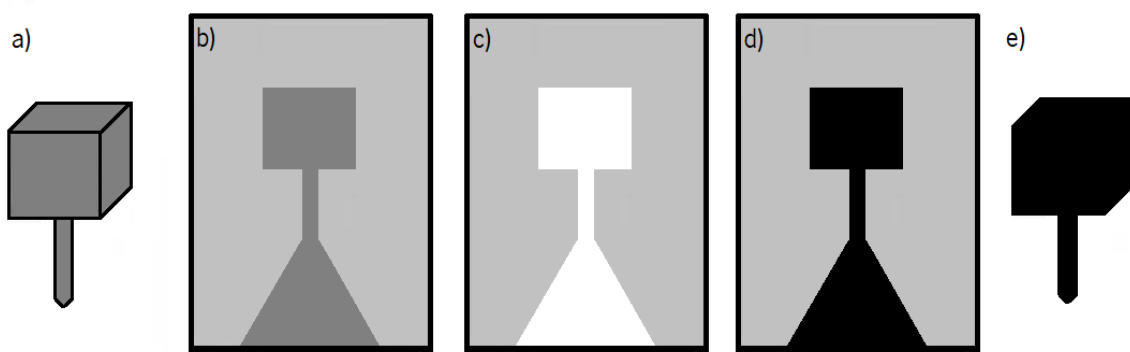
**Figura 3.15** – Ciclo de injeção: a) fecho do molde; b) injeção do material fundido na cavidade; c) retração do parafuso; d) abertura do molde e remoção da peça. Adaptado de [26].

As peças a serem moldadas por injeção devem ser cuidadosamente projetadas para facilitar o processo de moldação. O material, a forma e as características da peça, o material e o *design* do molde, e as propriedades da máquina de moldação devem ser todos levados em conta. É essencial ter em consideração a quantidade de peças a fabricar, uma vez que este processo utiliza um sistema de fabrico complexo e caro, não sendo rentável para pequenos lotes de fabrico [18], [28].

A microfundição é um processo de fundição por modelo perdido que utiliza metal fundido, vazado num molde microestruturado, para a produção de peças pequenas a uma escala muito reduzida. O processo é capaz de fabricar estruturas complexas, é economicamente eficiente para produção em massa e requer maquinagem subsequente mínima [25], [29].

### 3.5 Microfundição

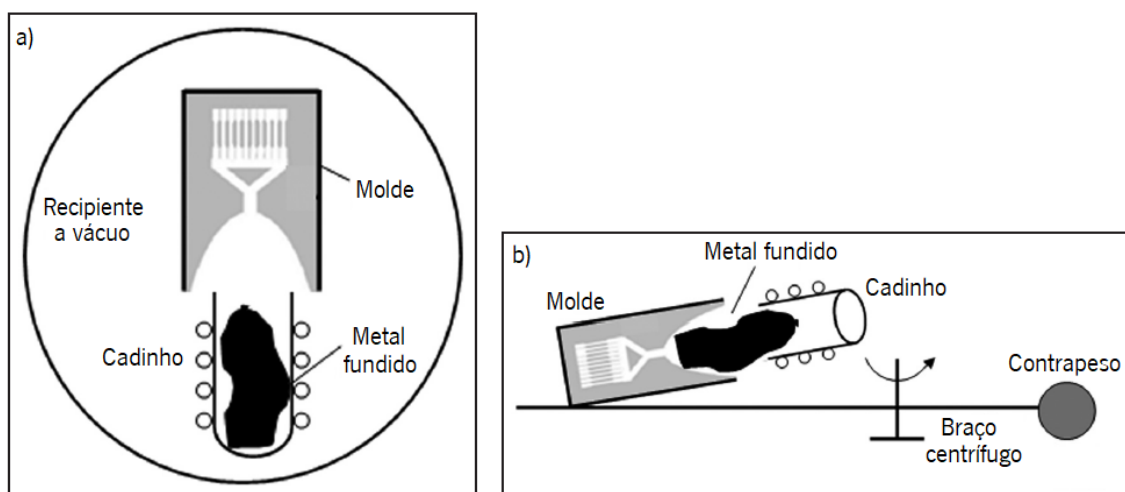
A técnica de fabrico de microfundição pode ser considerada um processo de fundição de precisão, onde os modelos de cera/plástico são convertidos em peças sólidas de metal de dimensões reduzidas. A microfundição tem sido aplicada com sucesso no fabrico de instrumentos cirúrgicos, de dispositivos odontológicos, instrumentos para a biotecnologia e dispositivos miniaturizados para a engenharia mecânica. A Figura 3.16 mostra as etapas do processo de microfundição [25], [29].



**Figura 3.16** – Etapas do processo de microfundição: a) fabrico do modelo; b) modelo incorporado no molde cerâmico; c) molde cerâmico (cavidade vazia); d) molde cerâmico preenchido por metal fundido; e) peça fundida [29].

O molde cerâmico começa com o fabrico do modelo. O modelo original pode ser feito em diversos materiais, como cera, argila, plástico, etc. Os modelos geralmente de plástico, fabricados por moldação por injeção, são depois incorporados num bloco de gesso. Podem ser criadas “árvores”, onde os modelos são montados num canal central para aumentar a taxa de produção.

Após a secagem, o molde cerâmico é sujeito a um ciclo térmico para remover o teor de água e promover a resistência mecânica. Durante esta fase, o modelo é perdido, devido à fusão e pirólise, criando uma cavidade vazia que corresponde ao modelo final que se destina à produção. Por fim, o molde cerâmico pré-aquecido é preenchido com metal fundido por pressão a vácuo ou por força centrífuga. Após a solidificação, o molde cerâmico é removido mecanicamente sem destruir ou danificar a superfície da peça fundida. Após remover o molde, a estrutura fundida é limpa e as peças fundidas são separadas do sistema de enchimento. Dependendo da liga metálica utilizada e do material do molde cerâmico podem ser necessários processos adicionais de limpeza química [25], [29]. Esta técnica tem a vantagem de ser um processo simples, oferecendo uma alta taxa de utilização de material com a possibilidade de moldar formas complexas em grandes quantidades a um custo relativamente baixo. Existem algumas diferenças importante entre a microfundição e o processo bem conhecido de modelo perdido para peças em macro escala. Na microfundição são usados modelos complexos, em vez dos modelos em casca mais comuns para as peças maiores. O enchimento dos moldes microestruturados é melhorado pelo pré-aquecimento do molde e pela aplicação de uma força externa ao metal fundido, para obter um enchimento completo do molde. Para tal, o vazamento pode ser realizado pelo processo de microfundição a vácuo ou pelo processo de microfundição centrífuga. A primeira técnica usa a combinação de três etapas: remoção do ar das cavidades do molde (pressão a vácuo); vazamento do metal fundido no molde; aplicação de uma pressão ao metal fundido para preencher todas as cavidades finas, típicas dos moldes de microfundição. Na segunda técnica é utilizada a força centrífuga para o enchimento do molde (Figura 3.17) [25], [30].



**Figura 3.17** – Esquemático do processo de microfundição: a) a vácuo; b) centrífuga. Adaptado de [25].



A técnica de fabrico dos modelos influencia diretamente a rugosidade superficial e a precisão dimensional dos modelos, que se refletem na qualidade da superfície e na precisão dimensional da peça final fundida. A abordagem mais comum no fabrico de modelos para microfundição é a micromoldação por injeção. Para reduzir o tempo de desenvolvimento do produto e reduzir o custo de fabrico, as técnicas de prototipagem rápida vieram revolucionar completamente o processo de fabrico dos modelos para a microfundição. Nos últimos anos, com o surgimento e disseminação da técnica de FDM, tornou-se popular o uso dos filamentos padrão de PLA (ácido polilático) para produzir de forma rápida e barata os modelos para a microfundição [29].

### Referências bibliográficas 3

- [1] J. Heinlin *et al.*, “Plasma applications in medicine with a special focus on dermatology,” *J. Eur. Acad. Dermatology Venereol.* 25 (1), 1–11(2011).
- [2] G. Fridman, G. Friedman, A. Gutsol, A. B. Shekhter, V. N. Vasilets, and A. Fridman, “Applied Plasma Medicine,” *Plasma Process. Polym.* 5 (6), 503–533(2008).
- [3] P. Attri, B. Arora, and E. H. Choi, “Retracted Article: Utility of plasma: a new road from physics to chemistry,” *RSC Adv.* 3 (31), 12540–12567(2013).
- [4] M. Zenker, “Argon plasma coagulation,” *GMS Krankenhhyg. Interdiszip.* 3 (1), 1–5(2008).
- [5] J. Canady, K. Wiley, and B. Ravo, “Argon plasma coagulation and the future applications for dual-mode endoscopic probes,” *Rev. Gastroenterol. Disord.* 6 (1), 1–12(2006).
- [6] L. S. Feldman, P. R. Fuchshuber, and D. B. J. Editors, *The SAGES Manual on the Fundamental Use of Surgical Energy (FUSE)*. New York, NY: Springer New York, 2012, (2012).
- [7] P. F. Gibson and N. Suslov, “The Effects of the PlasmaJet® System on Tissue. A review of tissue studies performed using the PlasmaJet® System and comparisons with electrosurgery techniques.”
- [8] T. K. Madhuri, D. Papatheodorou, A. Taylor, C. Sutton, and S. Butler-Manuel, “First clinical experience of argon neutral plasma energy in gynaecological surgery in the UK,” *Gynecol. Surg.* 7 (4), 423–425(2010).
- [9] C. Nezhat, K. A. Kho, and V. Morozov, “Use of Neutral Argon Plasma in the Laparoscopic Treatment of Endometriosis,” *JSL S J. Soc. Laparoendosc. Surg.* 13 (4), 479–483(2009).
- [10] Y. Sonoda, N. Olvera, D. S. Chi, C. L. Brown, N. R. Abu-Rustum, and D. A. Levine,

- “Pathologic analysis of ex vivo plasma energy tumor destruction in patients with ovarian or peritoneal cancer,” *Int. J. Gynecol. Cancer* 20 (8), 1326–1330(2010).
- [11] Plasma Surgical Limited, “An introduction to Plasma Surgery and the PlasmaJet® – a new surgical technology White Paper - Plasma Technology and its Clinical Application Introduction.”
- [12] S. Deb, S. Deen, K. S. Ashford, A. Harwood, C. Newman, and M. C. Powell, “Histological quantification of the tissue damage caused by PlasmaJet™ coagulator,” *Gynecol. Surg.* 7 (4), 441–446(2010).
- [13] T. Özel, P. Bártolo, E. Ceretti, J. D. C. Gay, C. A. Rodriguez, and J. V. L. Da Silva, *Biomedical devices : design, prototyping, and manufacturing*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2016, (2016).
- [14] A. J. Shih, “Biomedical Manufacturing: A New Frontier of Manufacturing Research,” *J. Manuf. Sci. Eng.* 130 (2), 021009(2008).
- [15] Y. Qin, *Micromanufacturing Engineering and Technology*. Elsevier Inc., 2010, (2010).
- [16] P. K. Venuvinod and W. Ma, *Rapid Prototyping*. Boston, MA: Springer US, 2004, (2004).
- [17] V. Jain, A. Sidpara, R. Balasubramaniam, G. Lodha, V. Dhamgaye, and R. Shukla, “Micromanufacturing: A review—Part I,” *Proc. Inst. Mech. Eng. Part B J. Eng. Manuf.* 228 (9), 973–994(2014).
- [18] J. Ciurana, “Designing, prototyping and manufacturing medical devices: An overview,” *Int. J. Comput. Integr. Manuf.* 27 (10), 901–918(2014).
- [19] L. Giorleo, E. Ceretti, and C. Giardini, “Optimization of laser micromachining process for biomedical device fabrication,” *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* 82 (5–8), 901–907(2016).
- [20] M. Cordeiro, “Análise e optimização dos parâmetros processuais e dos sistemas funcionais de uma impressora 3D, que se baseia na técnica Deposição de Plástico Fundido (FDM),” Instituto Superior Técnico de Lisboa, 2014.
- [21] N. Hopkinson and P. M. Dickens, “Emerging Rapid Manufacturing Processes,” *Rapid Manuf. An Ind. Revolut. Digit. Age*, 55–80(2006).
- [22] P. Dudek and A. Rapacz-Kmita, “Rapid Prototyping: Technologies, Materials and Advances,” *Arch. Metall. Mater.* 61 (2), 891–896(2016).
- [23] M. Vaezi, H. Seitz, and S. Yang, “A review on 3D micro-additive manufacturing technologies,” *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* 67 (5–8), 1721–1754(2013).
- [24] M. H. Elahinia, M. Hashemi, M. Tabesh, and S. B. Bhaduri, “Manufacturing and processing

- of NiTi implants: A review,” *Prog. Mater. Sci.* 57 (5), 911–946(2012).
- [25] V. Jain, U. Dixit, C. Paul, and A. Kumar, “Micromanufacturing: A review—part II,” *Proc. Inst. Mech. Eng. Part B J. Eng. Manuf.* 228 (9), 995–1014(2014).
- [26] M. P. Groover, *Fundamentals of Modern Manufacturing: Materials, Processes, and Systems*. John Wiley & Sons, Inc., 2010, (2010).
- [27] A. Teyfour, M. Ahmadi, E. S. Lori, and S. Sorooshian, “A Review on Micro Formings,” *Mod. Appl. Sci.* 9 (9), 230–239(2015).
- [28] Y. Qin *et al.*, “Micro-manufacturing: research, technology outcomes and development issues,” *Int. J. Adv. Manuf. Technol.* 47 (9–12), 821–837(2010).
- [29] M. M. Mohammadi, “A Review on Micro Fabrication Methods to Produce Investment Patterns of Microcasting,” *J. Nat. Sci. Res.* 1 (2), 1–10(2011).
- [30] S. Rath, G. Baumeister, and J. Hausselt, “Investments for casting micro parts with base alloys,” *Microsyst. Technol.* 12 (3), 258–266(2006).

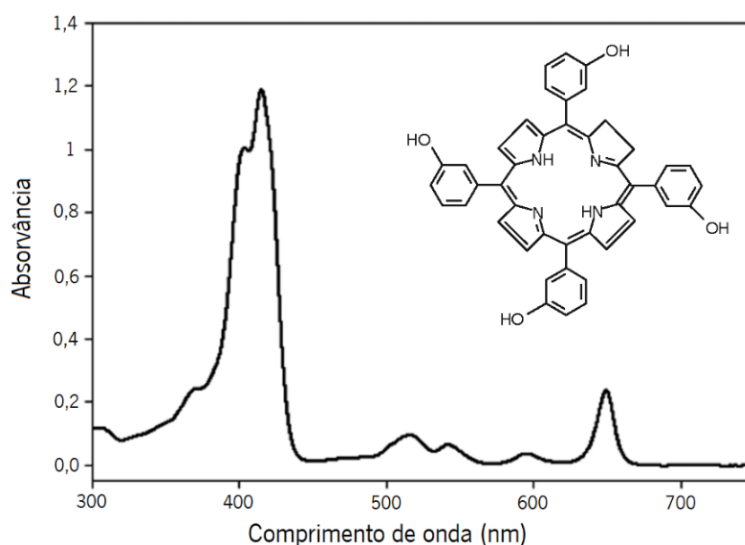
## 4 Trabalho experimental e resultados

Neste capítulo serão apresentados o trabalho experimental e a discussão dos resultados obtidos nos ensaios de terapêutica fotodinâmica e no processo de fabrico de um pequeno reservatório de paredes finas por microfundição.

### 4.1 Terapêutica Fotodinâmica

#### 4.1.1 Agente fotossensível

A temoporfina ou mTHPC (*Foscan®*), PS utilizado nos ensaios laboratoriais, é um dos mais potentes PSs de segunda geração atualmente disponíveis. Este PS necessita de uma pequena dose (0.15 mg/kg) e de uma pequena fluência de luz (5 – 20 J/cm<sup>2</sup>) para obter uma resposta robusta [1]. Uma reduzida fluência de luz constitui uma grande vantagem para a realização da TFD utilizando uma fonte de luz presente num DIMIM autónomo com limitações energéticas (como é o caso da CE), uma vez que reduz o tempo de tratamento para poucos minutos. É normalmente utilizada uma taxa de fluência de 100 mW/cm<sup>2</sup>. O seu mecanismo de ação é baseado na morte celular direta e na destruição da vasculatura. Tem uma estrutura química bem definida e está disponível com 98 % de pureza. Além disso, apresenta também um grande coeficiente de extinção molar na região do vermelho, a 652 nm, garantindo uma boa penetração no tecido, e um alto rendimento quântico de oxigénio singleto [2]. A Figura 4.1 apresenta a estrutura química e o espectro de absorção do mTHPC.



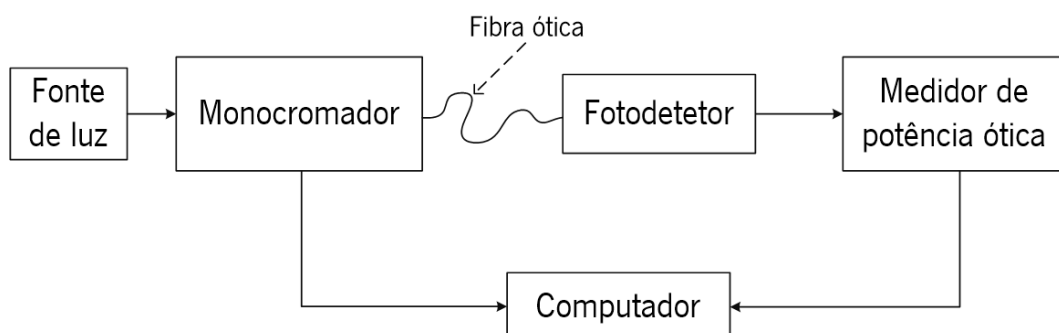
**Figura 4.1** – Estrutura química e espectro de absorção do mTHPC com dois picos principais a 420 e 652 nm. Adaptado de [3].

O mTHPC foi gentilmente cedido pela *Biolitec research GmbH* (Jena, Alemanha). Para os testes experimentais em culturas de células, foram preparadas quatro soluções de *stock* (0.5, 1, 5 e 10 mg/ml) dissolvendo o pó de mTHPC em metanol. Posteriormente foi realizada uma diluição 1:1000 em meio completo de cada uma das soluções de *stock*, obtendo-se as concentrações finais de 0.5, 1, 5 e 10 µg/ml.

#### 4.1.2 Fonte de luz

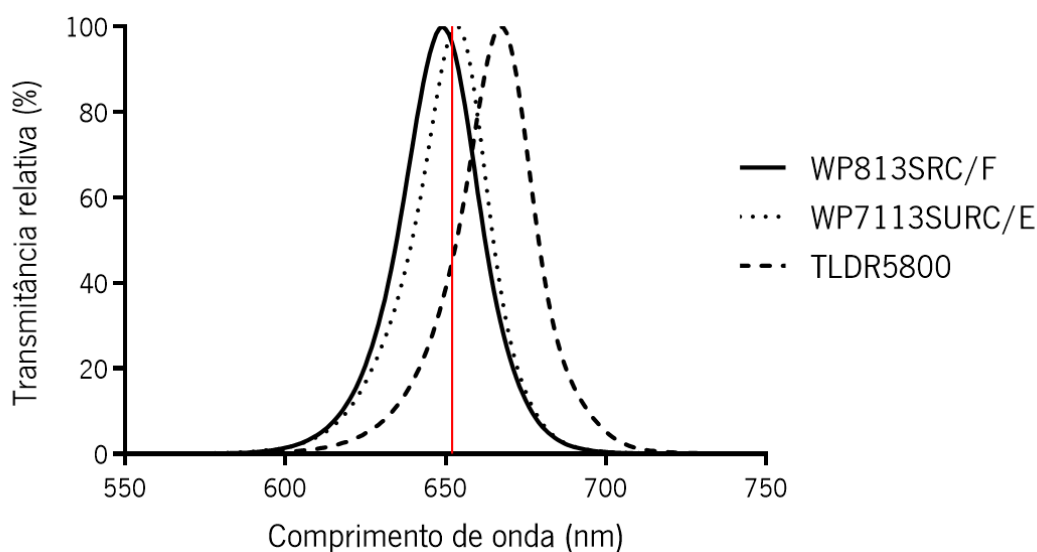
A fonte de luz ideal para os ensaios experimentais deve emitir luz vermelha com um comprimento de onda central próximo do comprimento de onda de máxima absorção do mTHPC na região vermelha do espectro, ou seja 652 nm. Para tal, foi medido o espectro de emissão de três LEDs de alto brilho comerciais cuja folha técnica indicava valores próximos dos 652 nm de comprimento de onda central: WP813SRC/F e WP7113SURC/E da *Kingbright Electronic Co. Ltd.* e TLDR5800 da *Vishay Intertechnology Inc.*

O espectro de emissão dos LEDs vermelhos foi obtido recorrendo a um sistema ótico para a caracterização de LEDs. Este sistema era constituído por: um monocromador (*Oriel Cornerstone™ 260 1/4 m, Newport*), uma fibra ótica (*77533, Newport*), um detetor fotodiodo (*71675, Newport*), um medidor de potência ótica (*1918-R, Newport*) e um sistema de aquisição de dados. A fonte de luz foi colocada na entrada do monocromador. A fibra ótica conduziu o feixe de luz da saída do monocromador até ao fotodiodo, que estava conectado ao medidor de potência ótica. O monocromador e o medidor de potência ótica estavam ligados a um computador que permitiu a recolha dos dados, através do programa de aquisição. A Figura 4.2 mostra o diagrama de blocos do sistema ótico usado para caracterizar os LEDs.



**Figura 4.2** – Diagrama de blocos do sistema ótico para a caraterização dos LEDs.

A Figura 4.3 mostra os espectros de emissão relativos dos LEDs WP813SRC/F, WP7113SURC/E e TLDR5800.



**Figura 4.3** – Espectros de emissão relativos dos LEDs WP813SRC/F, WP7113SURC/E e TLDR5800. A linha vermelha representa o comprimento de onda de máxima absorção do mTHPC na região do vermelho (652 nm).

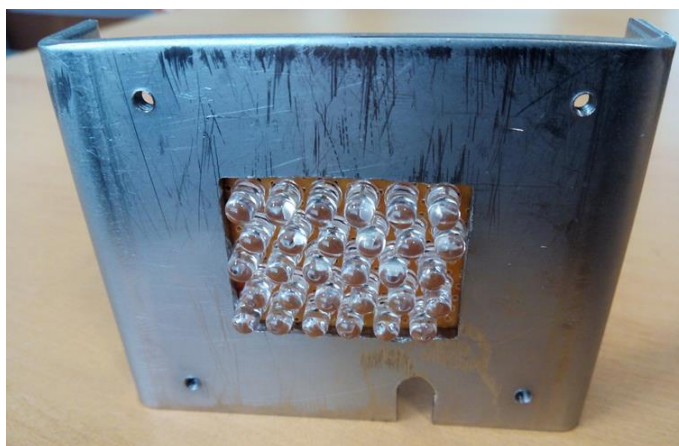
O comprimento de onda central, a transmitância relativa a 652 nm e o FWHM (*Full Width at Half Maximum*) dos espectros de emissão dos LEDs caracterizados são apresentados na Tabela 4.1. Como os LEDs não são monocromáticos, i.e. não emitem luz com um único comprimento de onda, a radiação emitida tem uma largura espectral. O FWHM é a largura de banda para a qual o valor de potência ótica decresce para metade do seu valor máximo. Para uma melhor ativação do mTHPC durante a TFD, a fonte de luz vermelha deve maximizar a emissão de luz nos 652 nm. Assim, e como os LEDs não são monocromáticos, um pequeno FWHM garante uma maior emissão de luz nos comprimentos de onda próximos do comprimento de onda central.

**Tabela 4.1** – Comprimento de onda central, transmitância relativa a 652 nm e FWHM dos LEDs WP813SRC/F, WP7113SURC/E e TLDR5800

	Comprimento de onda central (nm)	Transmitância relativa a 652 nm	FWHM (nm)
WP813SRC/F	649	96 %	28
WP7113SURC/E	653	99 %	25
TLDR5800	667	45 %	25

Dos LEDs caracterizados, aquele que apresenta um comprimento de onda central mais próximo dos 652 nm (e consequentemente maior transmitância relativa a 652 nm) e uma menor largura espectral é o WP7113SURC/E. Este foi o LED escolhido para ser usado nos ensaios *in vitro* de TFD em cultura de células tumorais.

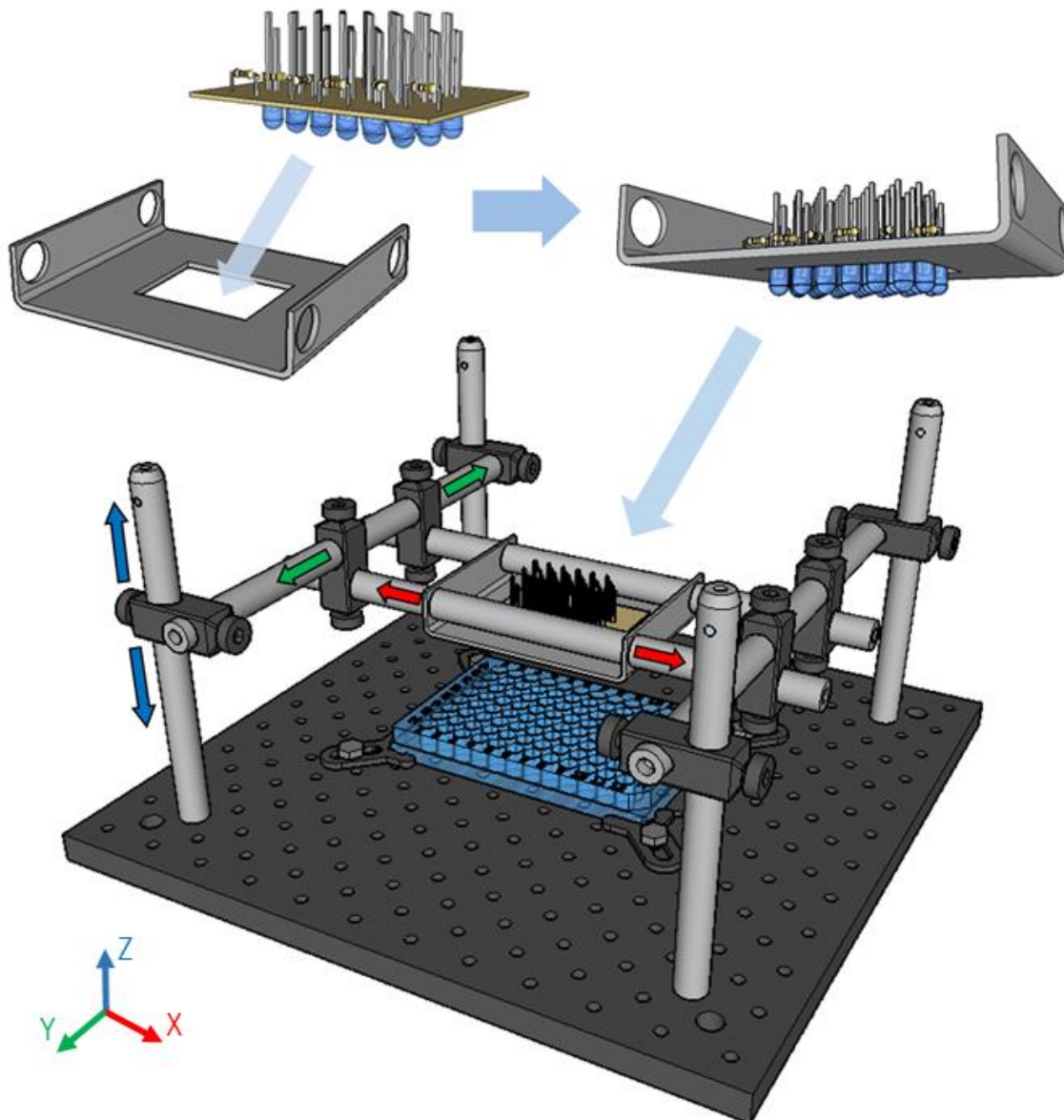
Para maximizar a área irradiada, i.e. para irradiar o maior número de poços das placas de cultura de células de 96 poços, foi montada uma fonte de luz planar com 30 LEDs vermelhos WP7113SURC/E (Figura 4.4).



**Figura 4.4** – Fonte de luz vermelha utilizada nos ensaios experimentais de cultura de células tumorais.

A potência de luz por área ou taxa de fluência desta fonte de luz foi medida com um medidor de potência ótica a aproximadamente 15 mm do detetor. Esta é a distância mínima entre as células e a fonte de luz nos ensaios *in vitro*, definida pelo contacto físico da fonte de luz com as placas de cultura. A taxa de fluência de luz a 653 nm foi de 11 mW/cm<sup>2</sup>. Os ensaios de TFD recorrendo ao mTHPC utilizam normalmente taxas de fluência de luz mais elevadas, próximas dos 100 mW/cm<sup>2</sup>. Contudo, como referido no Capítulo 2, existem vários estudos que relatam que a utilização de baixas taxas de fluência de luz é benéfica para a eficácia da TFD. Sabendo que quanto maior a corrente elétrica nos LEDs, maior é a sua intensidade luminosa, a taxa de fluência de luz foi determinada com os LEDs na sua máxima intensidade de luz, i.e. com o valor máximo de corrente elétrica (de acordo com a folha técnica), respeitando o valor de tensão máxima aos seus terminais.

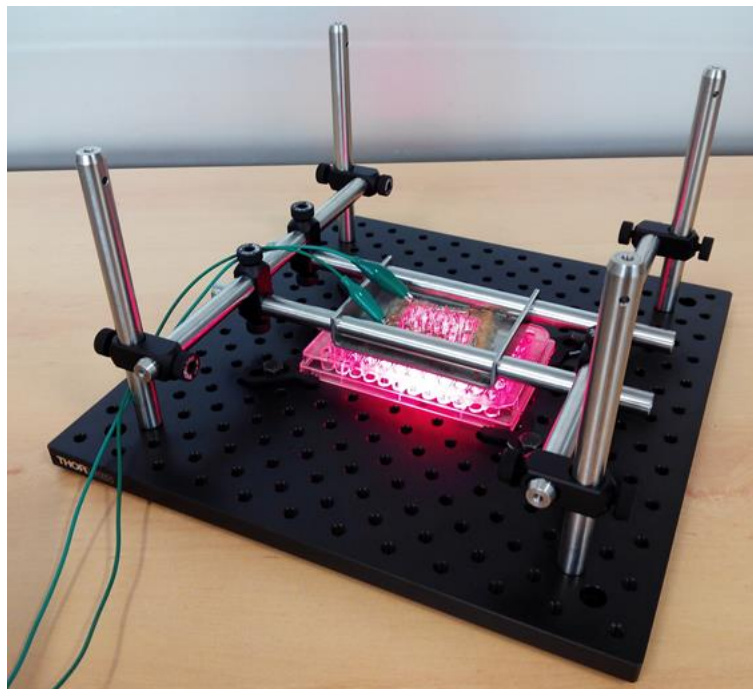
Foi construída uma estrutura de suporte em alumínio para posicionar a fonte de luz sobre a placa de cultura de 96 poços (Figura 4.5).



**Figura 4.5** – Ilustração da estrutura de suporte para posicionar a fonte de luz sobre a placa de cultura de 96 poços durante os ensaios *in vitro*.

Esta estrutura é composta por parafusos, fixadores e suportes, que permitem o deslocamento e posicionamento da fonte de luz nos três eixos coordenados, e por quatro retentores de posição que fixam a placa de cultura à base da estrutura. Uma placa preta de alumínio atua como base da estrutura e impede a reflexão da luz de volta para os poços. A Figura 4.6 mostra a imagem real da estrutura com a fonte de luz usada nos ensaios experimentais.





**Figura 4.6** – Imagem real da estrutura com a fonte de luz usada nos ensaios experimentais.

A fonte de luz foi posicionada por cima dos 5 x 3 poços centrais (coluna x linha) para assegurar uma homogeneidade da taxa de fluência de luz. A taxa de fluência de luz de cada poço iluminado foi medida com o medidor de potência ótica. Os 5 x 3 poços centrais considerados nos ensaios experimentais mostraram valores de taxa de fluência de luz semelhantes.

#### **4.1.3 Cultura de células**

Para estudar a influência da fluência de luz e da concentração de mTHPC na viabilidade celular nos ensaios fotodinâmicos mediados pelo mTHPC a uma taxa de fluência de luz baixa, foram utilizadas duas linhas celulares tumorais humanas, a RKO (carcinoma do cólon humano) e a HCT-15 (adenocarcinoma do cólon humano).

De um modo geral, as células requerem um ambiente estéril, componentes nutricionais e um pH e temperatura estáveis. O meio de cultura é um fator importante, uma vez que permite o acesso a nutrientes e a fatores de crescimento e a regulação do pH e da pressão osmótica. Os nutrientes permitem que as células produzam proteínas e outros elementos essenciais ao seu crescimento e funcionamento, e energia necessária para o seu metabolismo. Atualmente existem várias formulações de meios de cultura disponíveis, de acordo com o tipo de cultura com que se está a trabalhar. A temperatura do meio deve ser o mais próxima possível do dador, entre 36 e 37 °C para os mamíferos.

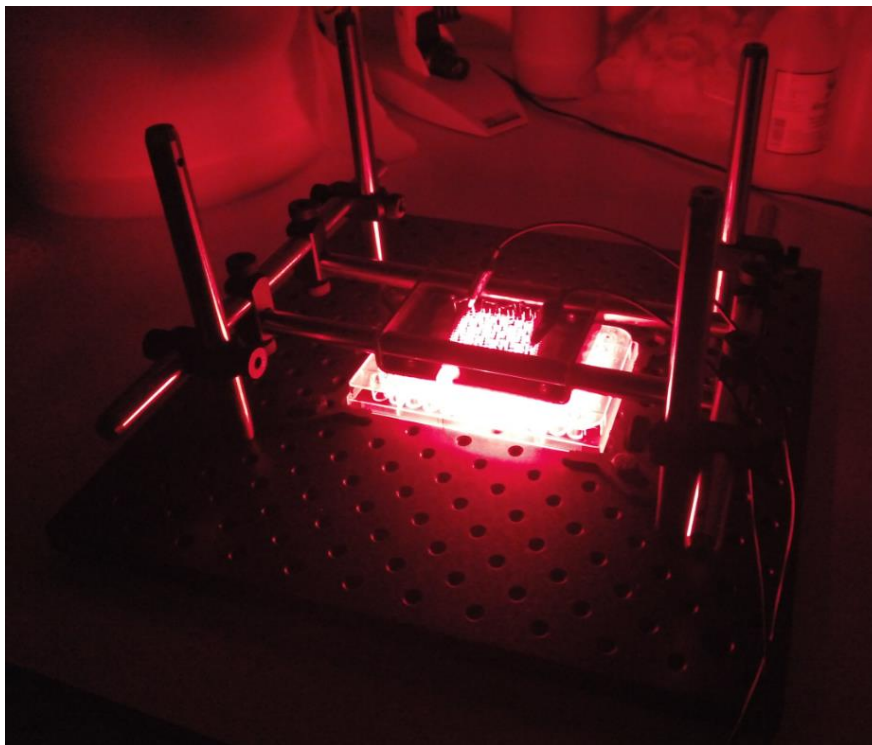
Todas as experiências foram realizadas em ambiente assético numa câmara de fluxo laminar vertical.

As linhas celulares RKO e HCT-15 foram mantidas em cultura de células aderentes em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) (Gibco, Invitrogen, EUA) e RPMI-1640 (*Roswell Park Memorial Institute*) (Gibco, Invitrogen, EUA), respetivamente, com indicador vermelho de fenol e suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal de bovino (FBS) (Gibco, Invitrogen, EUA) e 1 % (v/v) de penicilina/estreptomicina (Invitrogen, EUA), na incubadora a 37 °C, numa atmosfera húmida com 5 % de CO<sub>2</sub> até atingirem o seu tamanho exponencial.

#### 4.1.4 Ensaios *in vitro*

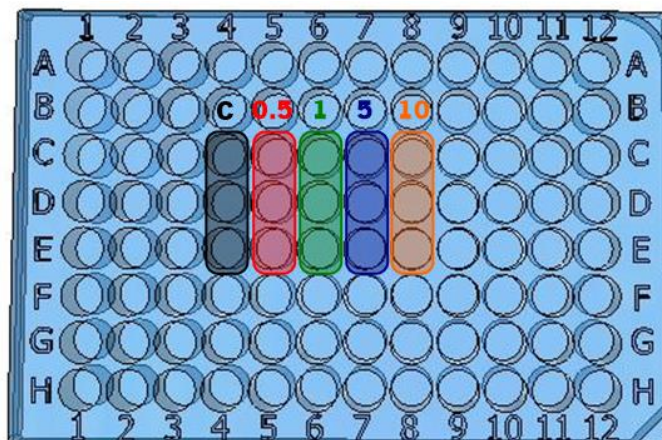
Depois das células atingirem o seu tamanho exponencial, aspirou-se o meio de cultura de cada caixa de cultura. Adicionou-se o meio de lavagem (PBS, *Phosphate Buffered Saline*, 1 ml) e após a sua remoção adicionou-se tripsina (500 µl). A caixa de cultura foi incubada a 37 °C durante 10 minutos para desagregação das células. Adicionou-se 1 ml de meio de cultura para inativar a tripsina. Pipetou-se a suspensão celular para um tubo de *falcon* estéril para centrifugar (900 rpm, 5 minutos). Retiraram-se 10 µl de suspensão e adicionaram-se 10 µl de solução de azul tripano para contagem do número de células viáveis numa câmara de Neubauer. Cada linha celular foi plaqueada numa densidade apropriada (6x10<sup>3</sup> células RKO/100 µl/poço; 7.5x10<sup>3</sup> células HCT-15/100 µl/poço) numa placa de 96 poços e incubada a 37 °C numa atmosfera com 5 % de CO<sub>2</sub> durante 72 horas. O meio de cultura foi depois aspirado e as células foram incubadas com 100 µl de mTHPC (0.5, 1, 5 e 10 µg/ml) durante 24 horas. Depois, as células foram lavadas duas vezes com PBS e foi adicionado 100 µl de meio de cultura fresco. As placas de cultura foram irradiadas, em ambiente escuro, com luz vermelha a 653 nm com uma fluência de luz de 2.5, 5 ou 10 J/cm<sup>2</sup> e uma taxa de fluência de luz de 11 mW/cm<sup>2</sup>. O tempo de irradiação de cada placa de cultura é dado pela divisão da fluência de luz pela taxa de fluência de luz (equação 2.3). Portanto, os tempos de irradiação foram aproximadamente 3 minutos e 47 segundos, 7 minutos e 35 segundos e 15 minutos e 9 segundos para as fluências de luz de 2.5, 5 e 10 J/cm<sup>2</sup>, respetivamente.

A Figura 4.7 mostra os ensaios fotodinâmicos realizados nas placas de cultura de 96 poços com a fonte de luz e a estrutura desenvolvidas para os ensaios *in vitro*.



**Figura 4.7** – Irradiação das placas de cultura de 96 poços, no escuro, com a fonte de luz e a estrutura apresentadas na Figura 4.6.

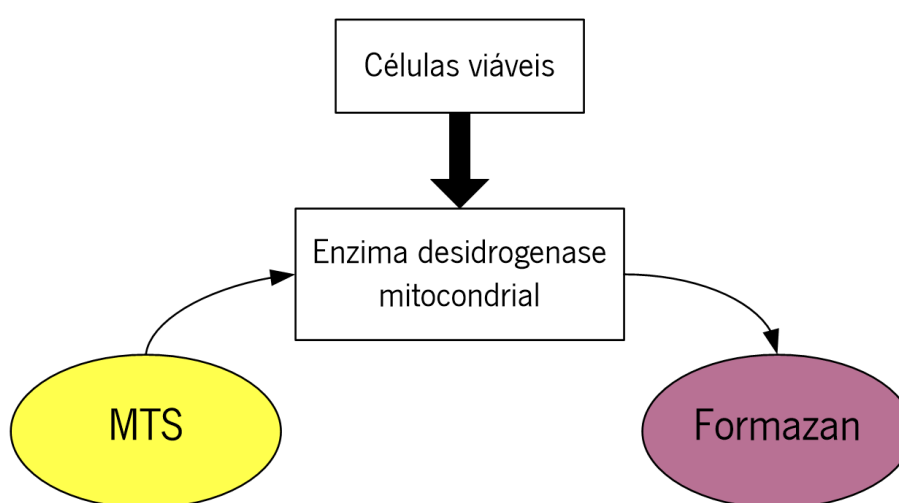
Foram usadas 4 placas de cultura, uma para cada fluência de luz (2.5, 5 e 10 J/cm<sup>2</sup>) e uma sem irradiação de luz (0 J/cm<sup>2</sup>, para ser usada como controlo). Cada placa de cultura tem o controlo sem mTHPC (concentração de 0 µg/ml) e as concentrações de mTHPC de 0.5, 1, 5 e 10 µg/ml, em triplicado. A Figura 4.8 mostra a disposição dos poços de controlo e das concentrações de mTHPC na placa de cultura de 96 poços.



**Figura 4.8** – Disposição dos poços de controlo (C, 0 µg/ml) e das concentrações de mTHPC (0.5, 1, 5 e 10 µg/ml) na placa de cultura de 96 poços.

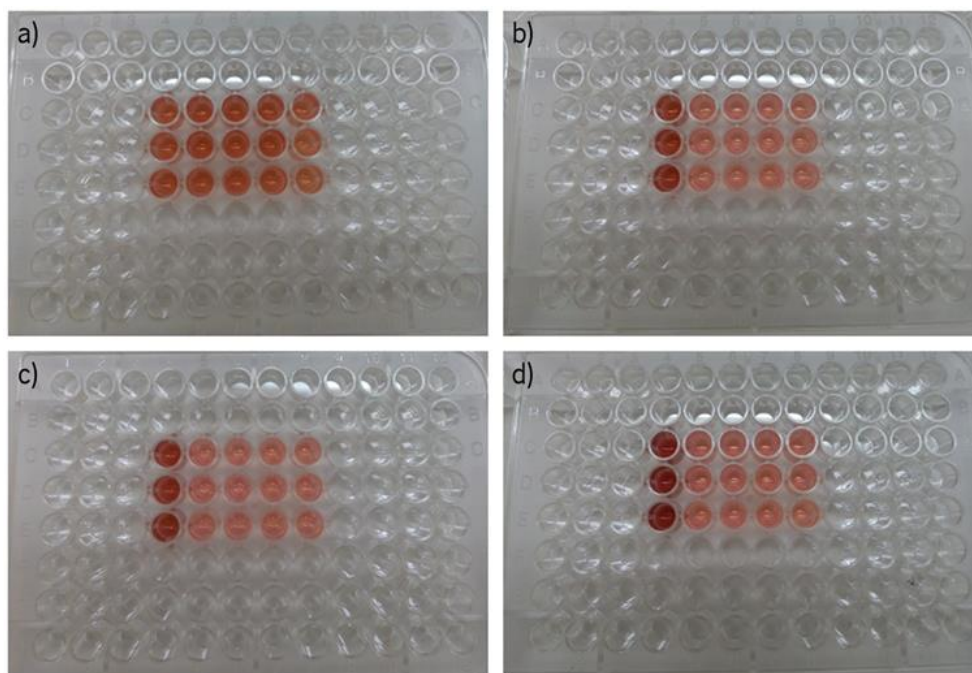
#### 4.1.5 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade das células foi avaliada pelo ensaio colorimétrico MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolium). Este ensaio utiliza o composto MTS que é reduzido a um composto colorido, o *formazan*, pela ação da enzima desidrogenase mitocondrial das células viáveis (Figura 4.9). A quantidade de produto produzido (refletida na mudança de cor) é diretamente proporcional ao número de células viváveis, podendo ser medida em termos de absorvância em torno dos 490 nm, comprimento de onda para o qual a absorção do *formazan* é máxima.

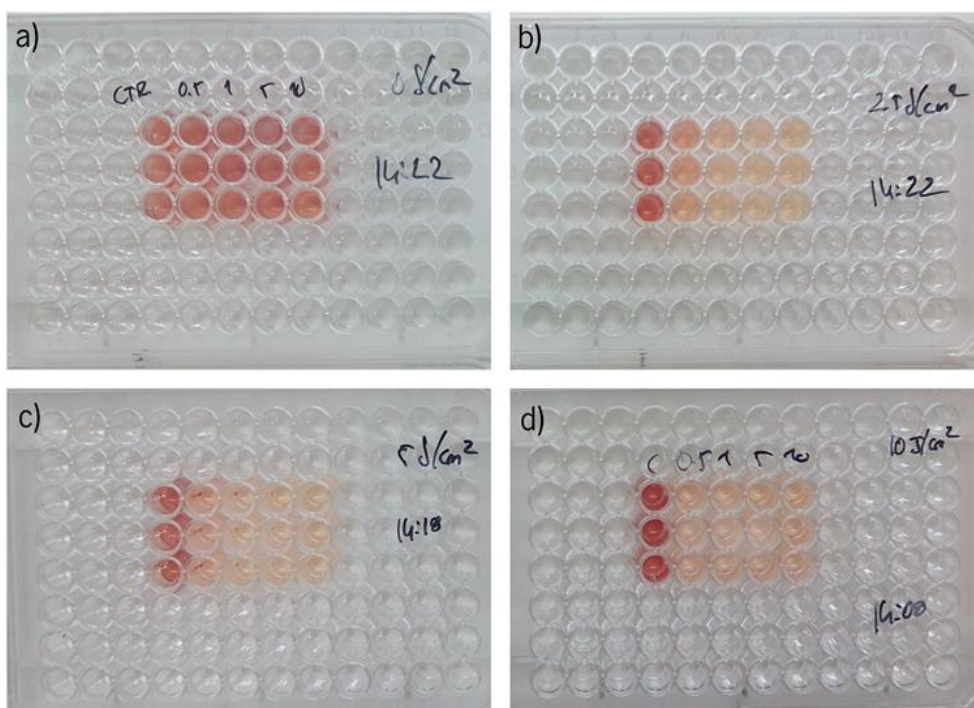


**Figura 4.9** – Ensaio colorimétrico MTS.

A quantidade de células adicionadas a cada poço foi baseada nas curvas anteriores de calibração de absorvância das duas linhas celulares. Após a irradiação das placas com luz vermelha a 653 nm, foi adicionado a cada poço 10  $\mu$ l de MTS. As placas foram incubadas a 37 °C durante 1 hora para permitir a metabolização do MTS. Terminado o tempo de incubação, foi medida a absorvância dos poços a 490 nm usando um *Varioskan™ Flash Multimode Reader (Thermo Scientific™)*. A absorvância de fundo foi também medida e subtraída aos valores de absorvância do ensaio MTS. A Figura 4.10 e Figura 4.11 mostram, respectivamente, as placas de cultura das células RKO e HCT-15 após a incubação do MTS.



**Figura 4.10** – Placas de cultura das células RKO após incubação do MTS para uma fluência de luz de: a) 0 J/cm<sup>2</sup>; b) 2.5 J/cm<sup>2</sup>; c) 5 J/cm<sup>2</sup>; d) 10 J/cm<sup>2</sup>.

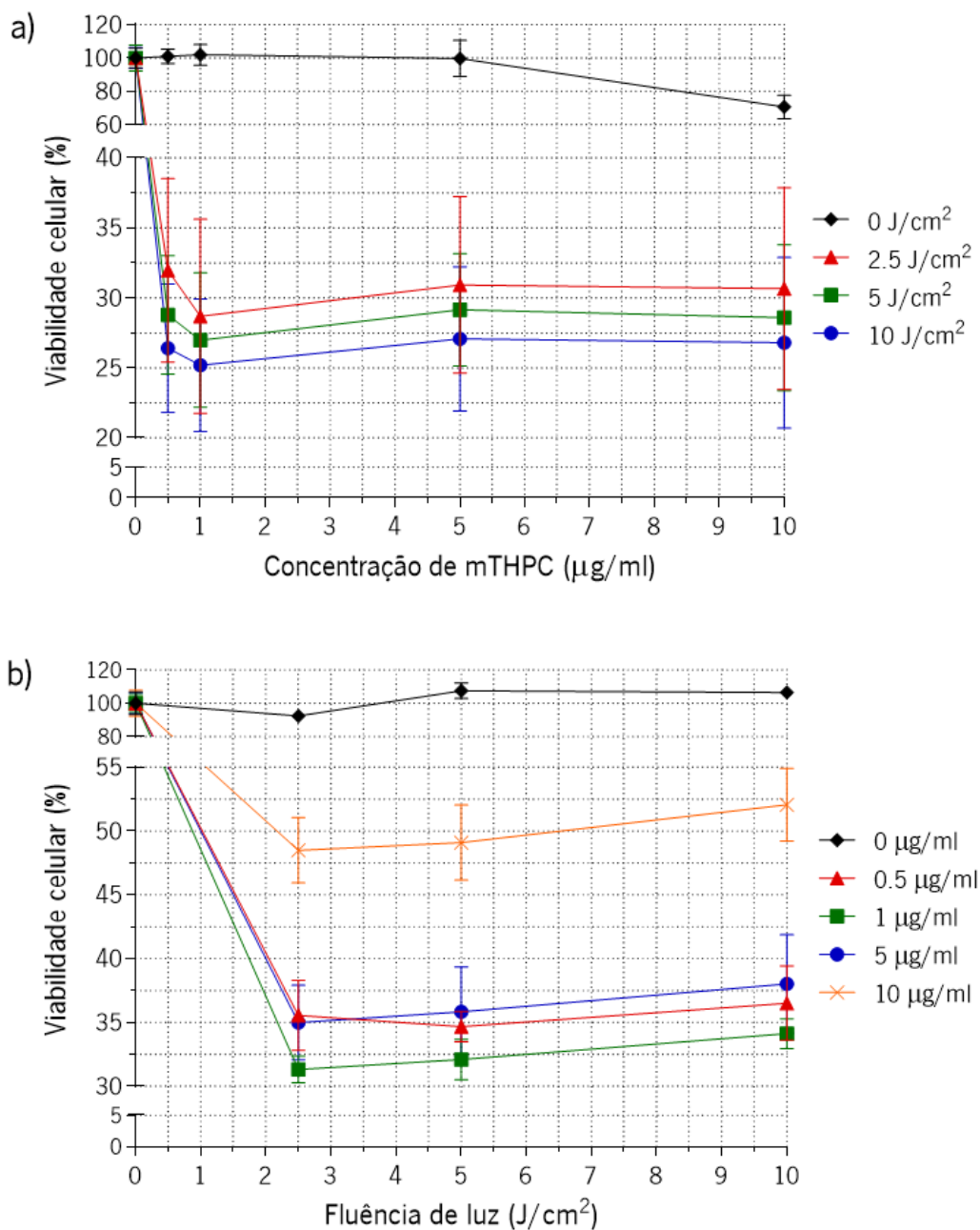


**Figura 4.11** - Placas de cultura das células HCT-15 após incubação do MTS para uma fluência de luz de: a) 0 J/cm<sup>2</sup>; b) 2.5 J/cm<sup>2</sup>; c) 5 J/cm<sup>2</sup>; d) 10 J/cm<sup>2</sup>.

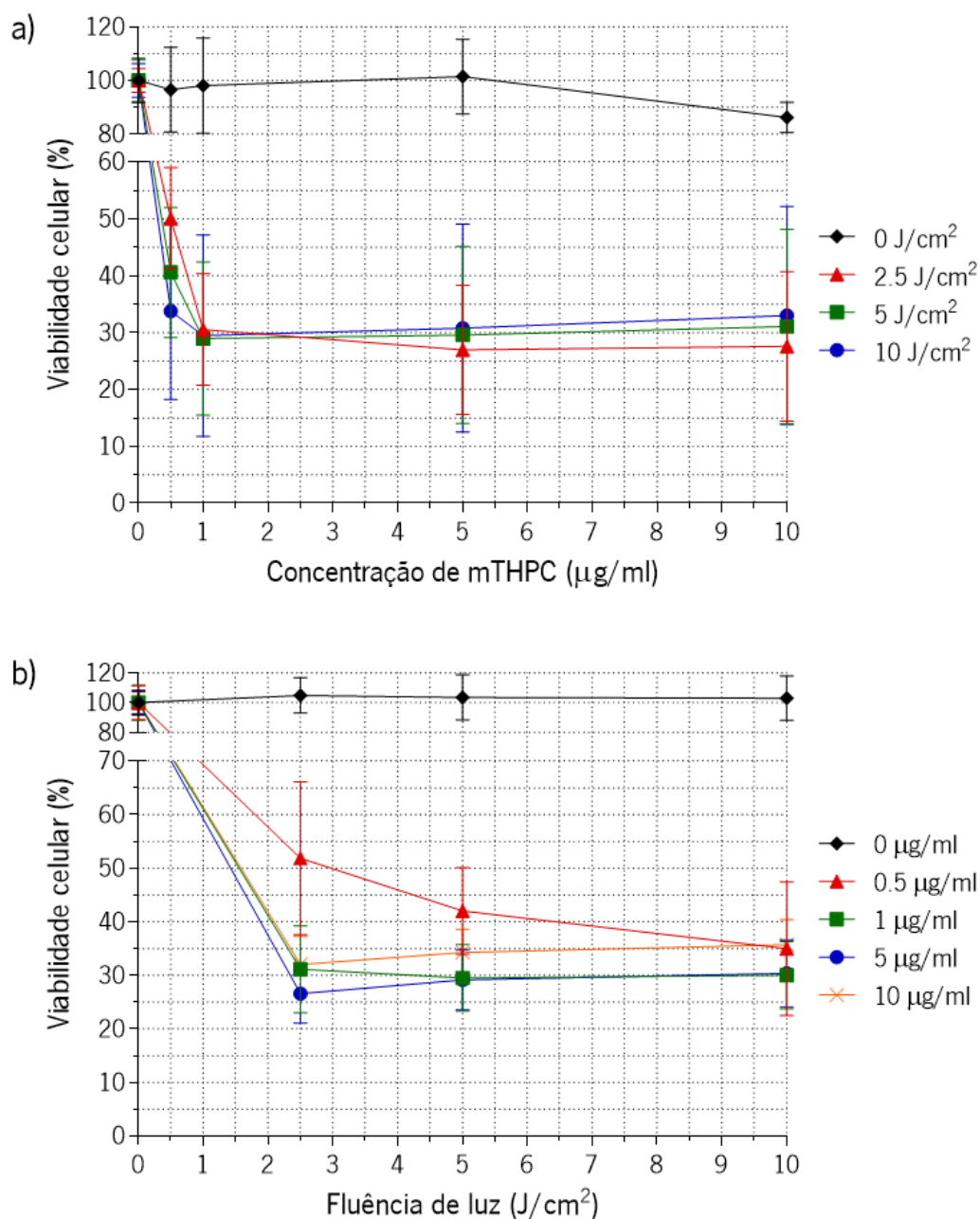
Os resultados experimentais são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão para três ensaios independentes. A viabilidade celular foi normalizada ao controle.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \frac{\text{absorv\~{a}ncia da amostra}}{\text{absorv\~{a}ncia do controle}} \times 100 \quad (4.1)$$

A Figura 4.12 e Figura 4.13 mostram, respectivamente, a viabilidade celular das linhas celulares RKO e HCT-15 resultante dos ensaios de TFD usando diferentes concentrações de mTHPC e diferentes fluências de luz, a uma taxa de fluência de luz constante de 11 mW/cm<sup>2</sup>.



**Figura 4.12** – Viabilidade das células RKO: a) normalizada ao controle sem mTHPC (0 µg/ml) para cada fluência de luz; b) normalizada ao controle sem irradiação (0 J/cm<sup>2</sup>) para cada concentração de mTHPC.



**Figura 4.13** - Viabilidade das células HCT-15: a) normalizada ao controle sem mTHPC (0 µg/ml) para cada fluência de luz; b) normalizada ao controle sem irradiação (0 J/cm<sup>2</sup>) para cada concentração de mTHPC.

Como os dados da Figura 4.12a e Figura 4.13a foram normalizados ao controle da concentração de mTHPC, estes gráficos permitiram avaliar a influência da concentração de mTHPC nos valores da viabilidade celular. Por outro lado, quando os dados foram normalizados para o controle da fluência de luz (Figura 4.12b e Figura 4.13b), os gráficos permitiram avaliar a influência da fluência de luz nos valores da viabilidade celular.

Na ausência de luz, ou seja sem irradiação de luz (0 J/cm<sup>2</sup>), verificou-se que a exposição ao mTHPC levou a aproximadamente 30 % de toxicidade nas células RKO incubadas com

10 µg/ml de concentração de mTHPC (Figura 4.12a). As outras concentrações de mTHPC não revelaram toxicidade no escuro nas células RKO. Quando expostas à luz, as diferentes concentrações de mTHPC levaram a valores similares de viabilidade celular. No entanto, a concentração de mTHPC de 1 µg/ml levou aos menores valores médios de viabilidade celular.

A Figura 4.12b revelou que a luz por si só não tem atividade citotóxica nas células RKO, uma vez que os valores de viabilidade celular para a condição sem mTHPC permaneceram em torno dos 100 %. Para as outras concentrações de mTHPC, as diferentes fluências de luz levaram a valores semelhantes de viabilidade celular. No entanto, a fluência de luz de 2.5 J/cm<sup>2</sup> levou aos menores valores médios de viabilidade celular para as concentrações de 1, 5 e 10 µg/ml de mTHPC.

A Figura 4.13a mostrou toxicidade no escuro para a maior concentração de mTHPC (cerca de 15 %) nas células HCT-15. As outras concentrações de mTHPC mostraram uma viabilidade celular muito próxima de 100 % na ausência de luz, revelando que o mTHPC a baixas concentrações, não ativado pela luz, não é citotóxico. Para as outras fluências de luz, a menor concentração de mTHPC (0.5 µg/ml) apresentou os maiores valores de viabilidade celular, enquanto as demais concentrações de mTHPC apresentaram valores similares de viabilidade celular.

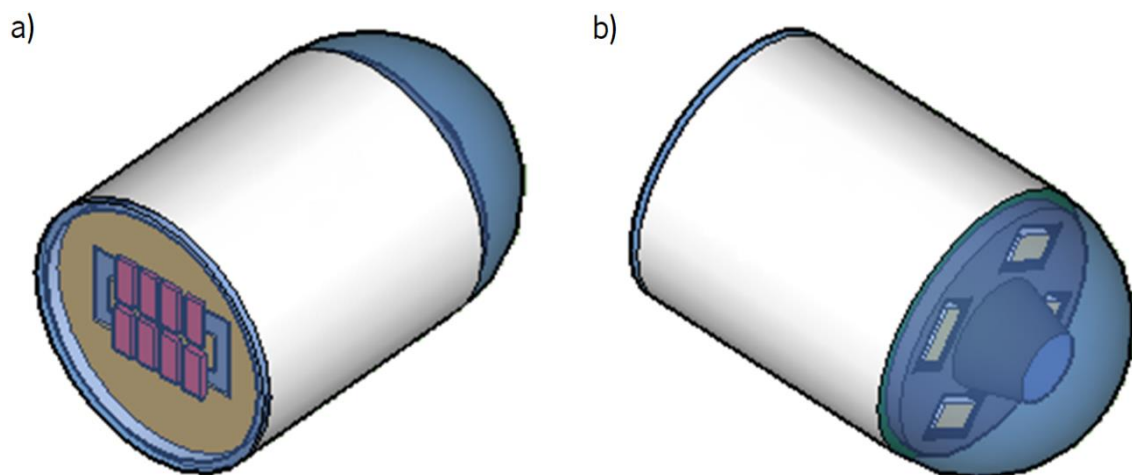
Similarmente ao que aconteceu com as células RKO, a viabilidade das células HCT-15 na ausência de mTHPC (0 µg/ml) é de aproximadamente 100 % (Figura 4.13b). Para a menor concentração de mTHPC (0.5 µg/ml), um aumento da fluência de luz resultou numa diminuição da viabilidade das células HCT-15. Para as outras concentrações de mTHPC, as diferentes fluências de luz levaram a valores semelhantes de viabilidade celular.

Para além dos testes *in vitro*, foram também realizados testes preliminares na membrana corioalantóica do embrião de galinha (CAM, do inglês *Chorioallantoic Membrane*) para avaliar a TFD mediada pelo mTHPC num modelo animal (ver Anexos). A composição do tecido e a acessibilidade da CAM para manipulação experimental, torna-a um atraente modelo pré-clínico *in vivo* para triagem de drogas e/ou para estudos de crescimento vascular. Este modelo permite o crescimento de células tumorais, aplicadas como uma suspensão na superfície da membrana, que se tornam tumores que desenvolvem o seu próprio suprimento de sangue através do processo de angiogénese (semelhante aos tumores reais em ratos). Quando comparado com os estudos em ratos de laboratório, os estudos na CAM são mais rápidos, mais baratos e não tem controlos regulatórios (sem problemas éticos).



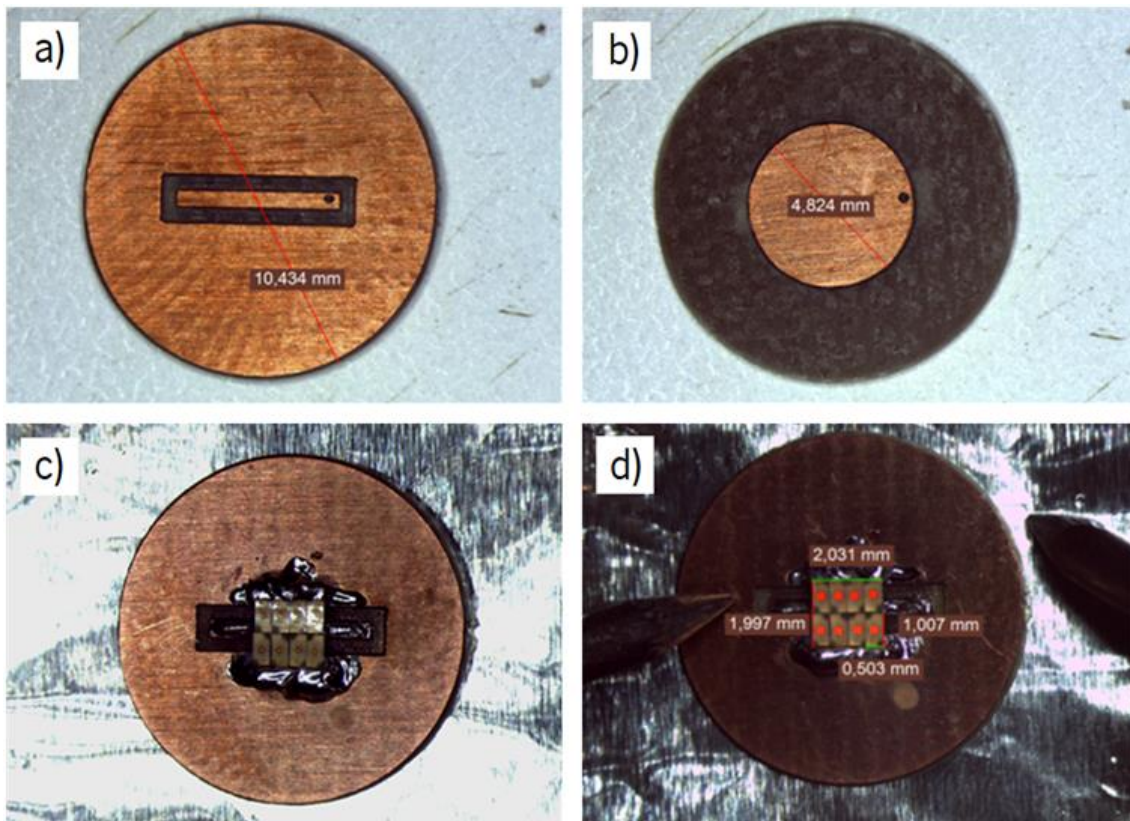
#### 4.1.6 Protótipo da CE para a TFD

A cápsula terapêutica para a realização da TFD foi projetada tendo dois lados funcionais (Figura 4.14). O lado redondo é constituído pelo sistema ótico da CE convencional, composto pelo sensor de imagem CMOS, por quatro LEDs brancos e por lentes focais. O lado planar (oposto ao redondo) constitui o módulo terapêutico, composto por um fonte de luz vermelha. Esta fonte de luz vermelha deve ser de pequenas dimensões, com elevada intensidade luminosa e de baixo consumo. A extremidade planar permite diminuir a distância entre a fonte de luz vermelha e o tecido alvo a ser tratado, diminuindo assim a potência luminosa necessária. Durante a administração da luz ao tecido alvo é utilizado o controlo magnético da locomoção da CE para que a CE permaneça imobilizada [4].

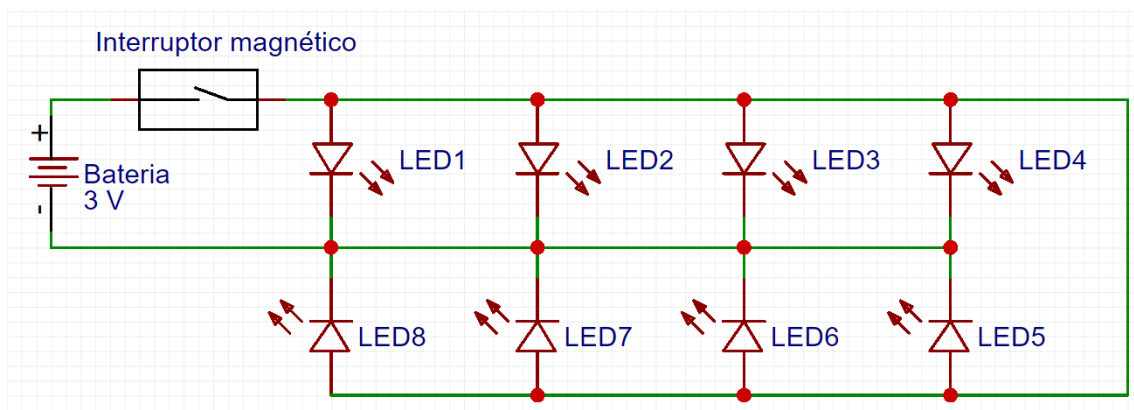


**Figura 4.14** – Idealização da cápsula com dois lados funcionais para a realização da TFD: a) lado planar; b) lado redondo.

A fonte de luz a ser integrada na cápsula é constituída por uma matriz de 8 LEDs vermelhos SMD (*Surface Mount Device*) 0402 hiper brilhantes com a referência LR QH9F da *OSRAM Opto Semiconductors*. Estes LEDs foram escolhidos pelas reduzidas dimensões e pelo reduzido consumo de corrente (15 mA). As dimensões destes LEDs são semelhantes às dos LEDs brancos da CE: 1mm de comprimento, 0.5 mm de largura e 0.4 mm de altura. A matriz de LEDs foi montada num suporte de dupla face com aproximadamente 10.5 mm de diâmetro e 1 mm de espessura (Figura 4.15), segundo o esquemático apresentado na Figura 4.16.

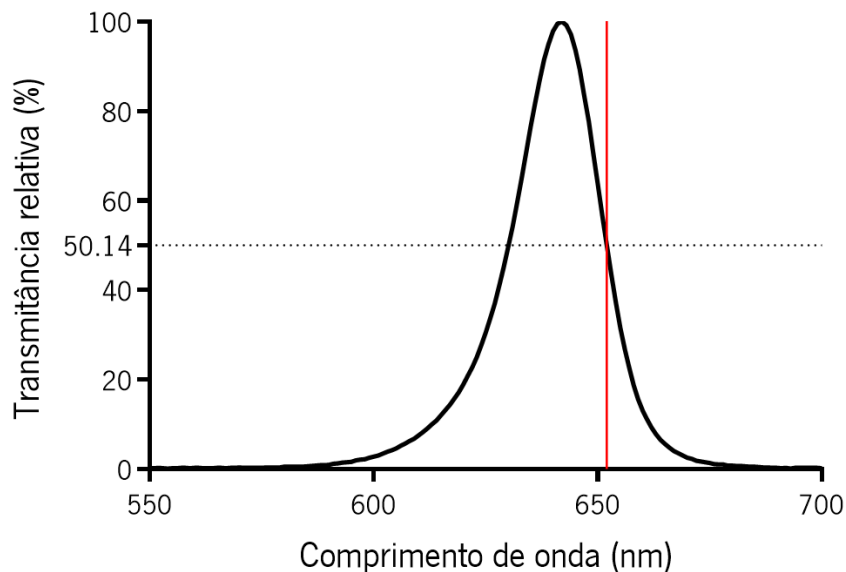


**Figura 4.15** – Suporte para a montagem da matriz de LEDs: a) vista superior sem LEDs; b) vista inferior (conexão da bateria); c) vista superior com os LEDs montados; d) matriz de LEDs ligados.



**Figura 4.16** – Esquemático geral da fonte de luz.

O espectro de emissão do LED LR QH9F (Figura 4.17) foi obtido recorrendo ao sistema ótico apresentado na Figura 4.2.



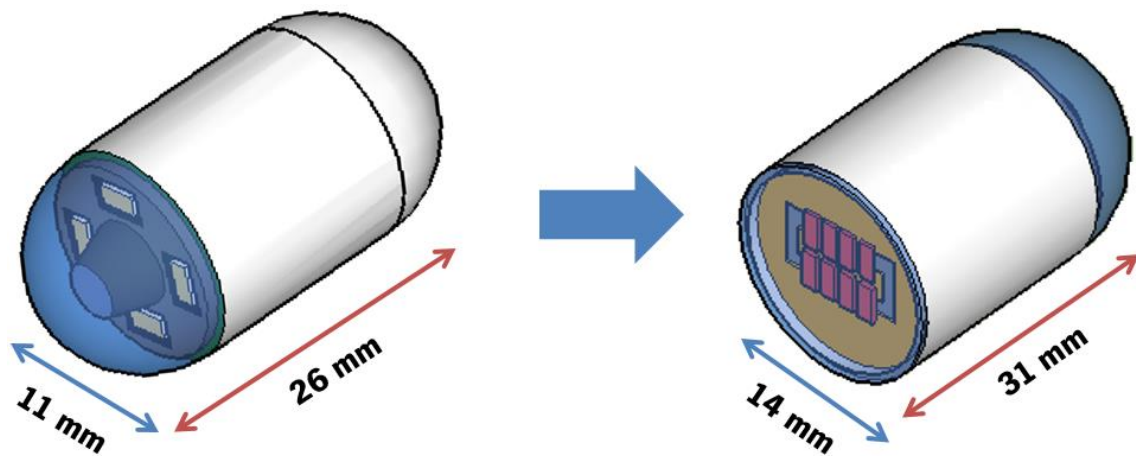
**Figura 4.17** - Espectro de emissão relativo do LED LR QH9F. A linha vermelha representa o comprimento de onda de máxima absorção do mTHPC na região vermelha (652 nm). O comprimento de onda central é de 642 nm, a transmitância relativa a 652 nm é de 50.14 % e o FWHM é de 23 nm.

A taxa de fluência da fonte de luz (8 LEDs LR QH9F) foi medida com um medidor de potência ótica. A taxa de fluência de luz a 642 nm é de 14 mW/cm<sup>2</sup>. O comprimento de onda central do espectro de emissão do LED LR QH9F encontra-se nos 642 nm, ou seja, 10 nm abaixo do comprimento de onda de máxima absorção do mTHPC na região do vermelho. É possível deslocar o valor central do espectro de emissão do LED LR QH9F para o comprimento de onda de máxima absorção do mTHPC, através da utilização de filtros óticos (e.g. filtros óticos baseados em filmes finos) sobre a matriz de LEDs. Estes filtros refletem determinados comprimentos de onda e transmitem outros, permitindo assim a transmissão de comprimentos de onda numa faixa estreita, em torno de um comprimento de onda específico. Contudo, a utilização de filtros óticos resulta numa diminuição dos valores transmitidos, i.e. a transmitância com o filtro ótico a 652 nm seria inferior a 50.14 % (transmitância relativa sem filtro ótico). Observando o espectro de absorção do mTHPC (Figura 4.1) verifica-se que a absorvância não é nula para os comprimentos de onda próximos do pico de absorção a 652 nm. Portanto, optou-se pela não utilização de filtros óticos, uma vez que a sua utilização, apesar de centrar o comprimento de onda nos 652 nm, diminuiria a taxa de fluência da fonte de luz. Contudo, a utilização de uma fonte de luz com um comprimento de onda central diferente dos 652 nm torna difícil administrar uma fluência de luz exata na ativação do mTHPC.

Com vista a aumentar a capacidade energética da nova cápsula, devido à necessidade de alimentar os novos LEDs vermelhos, as baterias da CE convencional foram substituídas por uma

*Duracell DL1/3N*. A CE convencional possui duas baterias *Energizer 399* de óxido de prata. As duas baterias em série têm uma tensão de 3.1 V e uma capacidade de 54 mAh. A nova bateria tem uma tensão de 3 V e uma capacidade de 160 mAh (aproximadamente três vezes mais que as baterias anteriores). Esta alteração de baterias refletiu-se num aumento das dimensões da nova cápsula (Figura 4.18).

A Figura 4.19 mostra a imagem real do protótipo da nova cápsula para a realização da TFD.



**Figura 4.18** – Dimensões da CE convencional (esquerda) e da nova cápsula para a realização da TFD (direita).



**Figura 4.19** – Imagem real do protótipo da nova cápsula para a realização da TFD. Fonte de luz vermelha ativada na presença de campo magnético.

Giuseppe Tortora *et al.* [5] apresentou um dispositivo para o tratamento da bactéria *Helicobacter pylori*. Este dispositivo consiste numa cápsula ingerível com uma fonte de luz para realizar a TFD pela excitação dos agentes fotossensíveis naturais que a *Helicobacter pylori* naturalmente possui. Neste estudo, os autores realizaram a TFD com uma fluência de luz de 9 – 16 J/cm<sup>2</sup> e uma taxa de fluência de luz de 5 – 8.9 mW/cm<sup>2</sup>, correspondendo a um tempo de tratamento de 30 minutos. A fluência de luz pretendida (16 J/cm<sup>2</sup>) só é atingida usando 3 – 17 cápsulas.

A TFD mediada pelo mTHPC, utilizando uma fluência de luz de 2.5 J/cm<sup>2</sup> e uma taxa de fluência de 14 mW/cm<sup>2</sup>, reduz o tempo de tratamento da TFD para aproximadamente 3 minutos. Um tratamento mais rápido requer menos capacidade da bateria e, conseqüentemente, um menor número de cápsulas. Estima-se que uma capacidade de carga de aproximadamente 10 mAh, com uma corrente de 120 mA, seja necessária para realizar a TFD mediada pelo mTHPC com pequenos LEDs vermelhos a 14 mW/cm<sup>2</sup> de taxa de fluência de luz e 2.5 J/cm<sup>2</sup> de fluência de luz.

## 4.2 Fabrico do reservatório de árgon

### 4.2.1 Design do reservatório

Como referido anteriormente, a realização do PAN pela CE requer o fabrico de um reservatório de gás (árgon), para ser integrado na CE. A CE é um dispositivo médico de reduzidas dimensões, no qual a gestão do espaço interno é uma questão crítica. Para evitar comprometer as dimensões da CE, é necessário um reservatório de árgon de pequeno volume.

O volume é uma das três variáveis de estado dos gases, as outras são a pressão e a temperatura. A lei dos gases ideais relaciona a pressão, o volume e a temperatura com o número de moles do gás:

$$P.V = n.R.T, \tag{4.2}$$

onde P é a pressão do gás (atm), V é o volume do gás (L), n é o número de moles do gás, R é a constante universal dos gases (0.08206 L.atm.mol<sup>-1</sup>.K<sup>-1</sup>) e T é a temperatura absoluta do gás (K). Esta lei declara que, se o volume e a temperatura de uma quantidade fixa de gás não se alteram, a pressão também permanece constante [6].

De acordo com a lei de Boyle, se a temperatura é mantida constante, o volume de uma determinada quantidade de gás é inversamente proporcional à pressão, i.e. o produto da pressão

e do volume é uma constante [6]. Para comparar a mesma substância em dois conjuntos diferentes de condições, a lei é expressa por:

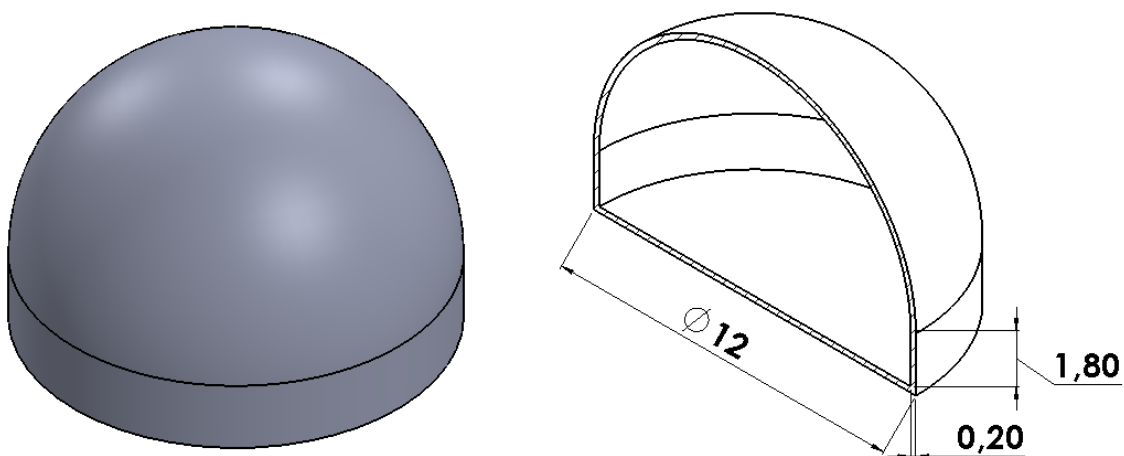
$$P_1.V_1 = P_2.V_2, \quad (4.3)$$

onde  $P_1$  e  $V_1$  representam a pressão e o volume originais do gás, respetivamente, e  $P_2$  e  $V_2$  representam a pressão e o volume do gás para a segunda condição, respetivamente.

O fluxo de gás utilizado na técnica de PAN é inferior a 0.4 L/min (6.67 mL/s). Assumindo um fluxo de argon de 3.3(3) mL/s (0.2 L/min) durante 1 segundo, o volume de argon utilizado no tratamento seria de 3.3(3) ml ou 3333 mm<sup>3</sup> (1 atm, 37 °C). Para os cálculos do volume do reservatório de argon, foi utilizada uma pressão de 7 atm e uma temperatura de 37 °C no interior do reservatório de argon. À mesma temperatura, e sabendo que a quantidade de matéria ( $n$ ) é a mesma, o volume do reservatório de argon é dado por:

$$P_1.V_1 = P_2.V_2 \Leftrightarrow 1 \times 3333 = 7 \times V_2 \Leftrightarrow V_2 = 476.1 \text{ mm}^3 \quad (4.4)$$

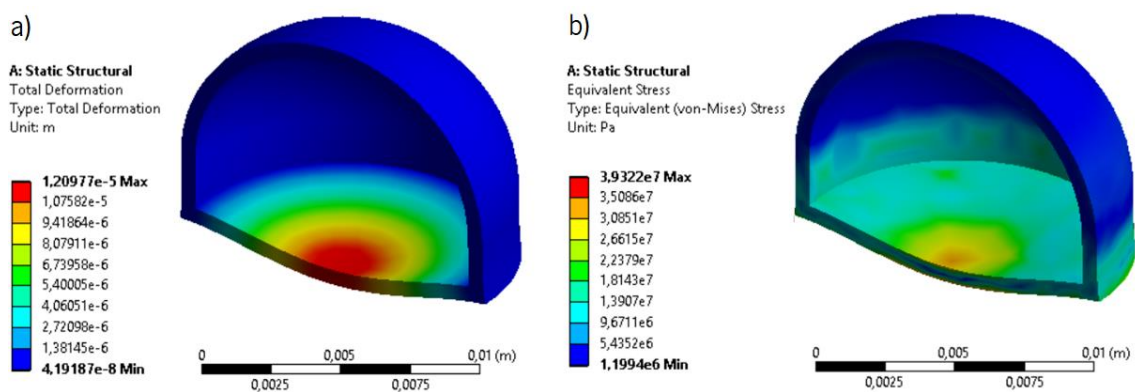
Portanto, o volume do reservatório de argon a uma pressão de 7 atm para realizar o PAN com um fluxo de 0.2 L/min durante 1 segundo é aproximadamente 476 mm<sup>3</sup>. A Figura 4.20 apresenta a geometria e as dimensões do reservatório de argon para implementar no interior da CE. A geometria do reservatório de argon corresponde à forma das CEs convencionais.



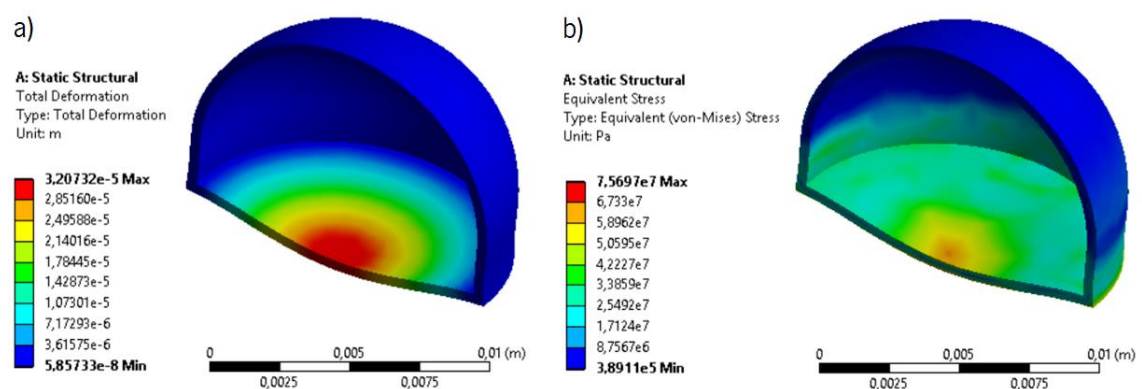
**Figura 4.20** – Geometria e dimensões (em mm) do reservatório de argon proposto.

### 4.2.2 Simulações FEM

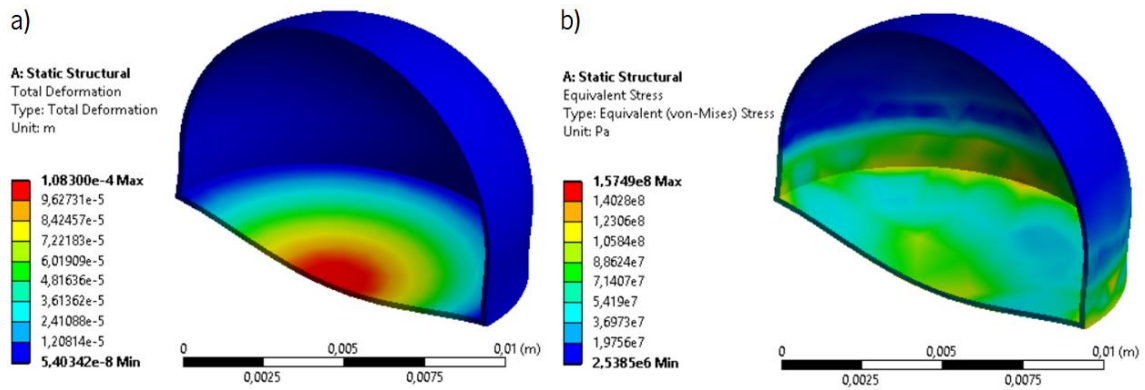
Foram realizadas simulações numéricas FEM (*Finite Element Methods*) para estudar o comportamento estrutural do reservatório e para prever a espessura mínima da cavidade do reservatório para suportar a pressão pretendida. Foram simulados reservatório com três espessuras diferentes: 0.2, 0.4 e 0.6 mm. Os reservatórios de argon simulados eram compostos por uma liga de alumínio. Foi gerada uma malha tridimensional com 2951 elementos e 5898 nós. Foi considerada uma pressão no interior do reservatório de 7 atm (709.275 Pa) e uma temperatura externa de 37 °C (temperatura do corpo humano). A Figura 4.21, Figura 4.22 e Figura 4.23 mostram os resultados das simulações FEM para a deformação total e a tensão equivalente do reservatório de alumínio com 0.6, 0.4 e 0.2 mm de espessura, respetivamente.



**Figura 4.21** – Simulação do reservatório de alumínio com 0.6 mm de espessura a uma pressão de 7 atm: a) deformação total; b) tensão equivalente.



**Figura 4.22** – Simulação do reservatório de alumínio com 0.4 mm de espessura a uma pressão de 7 atm: a) deformação total; b) tensão equivalente.



**Figura 4.23** – Simulação do reservatório de alumínio com 0.2 mm de espessura a uma pressão de 7 atm: a) deformação total; b) tensão equivalente.

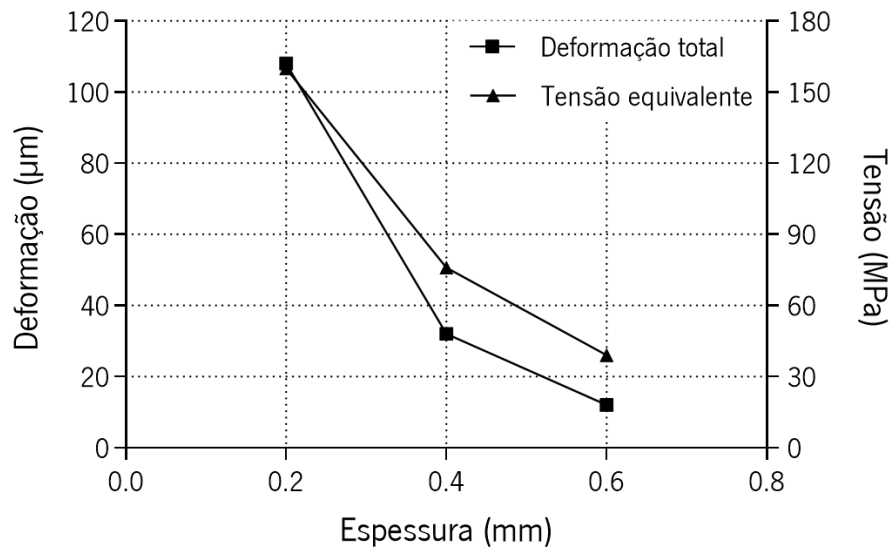
A Tabela 4.2 apresenta os valores máximos de tensão equivalente, de deformação total e o fator de segurança para os reservatórios de alumínio com 0.6, 0.4 e 0.2 mm de espessura.

**Tabela 4.2** – Valores máximos de tensão equivalente, deformação total e fator de segurança para os reservatórios de alumínio com 0.6, 0.4 e 0.2 mm de espessura

Espessura (mm)	Tensão (MPa)	Deformação ( $\mu\text{m}$ )	Fator de segurança
0.6	39	12	7.2
0.4	76	32	3.7
0.2	160	108	1.8
Máximo admissível	280	200	1.5

A Figura 4.24 mostra a variação da deformação total e da tensão equivalente do reservatório de argon em relação à espessura da sua parede.



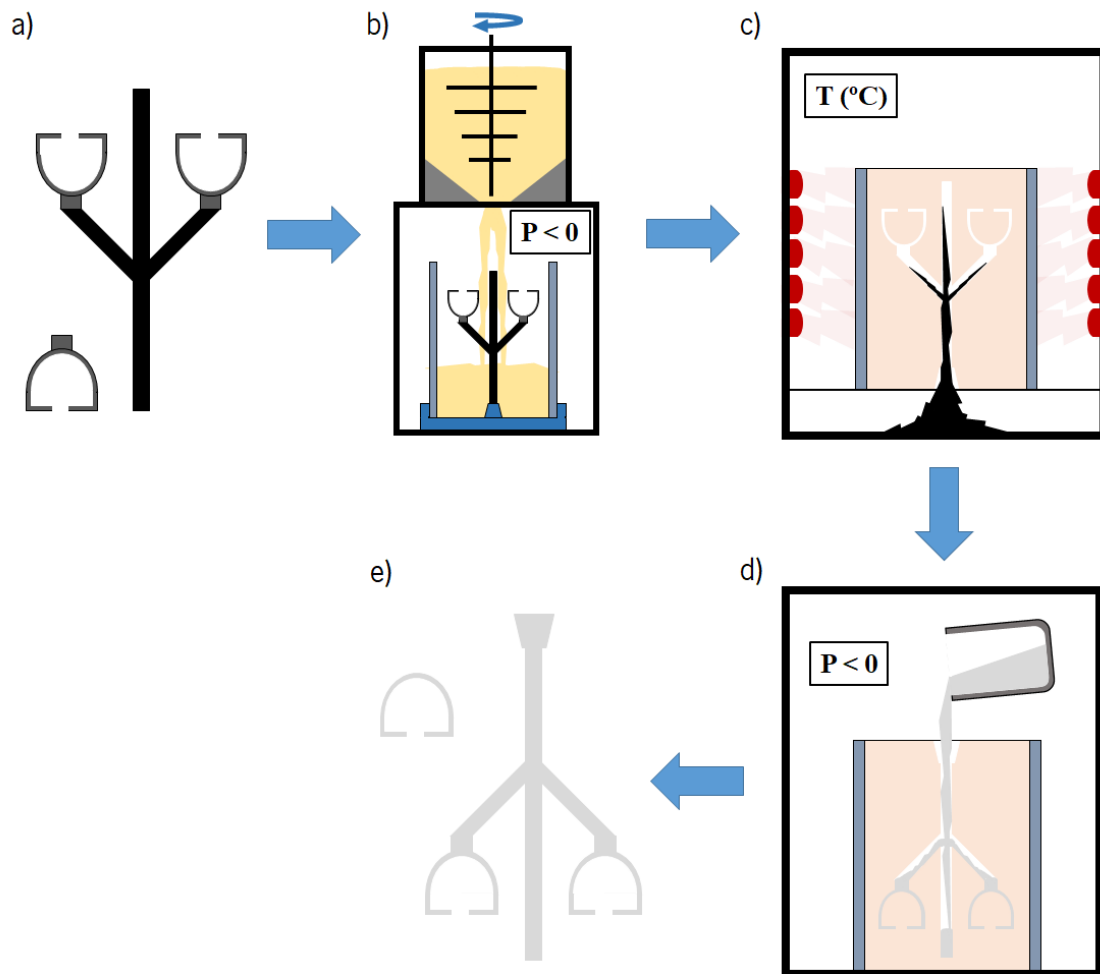


**Figura 4.24** – Variação da deformação total e da tensão equivalente em relação à espessura da parede do reservatório.

Os resultados das simulações numéricas revelaram que os pontos críticos, onde a deformação do reservatório foi mais elevada, estavam no centro da base do reservatório. O valor máximo da tensão equivalente do reservatório de argon com a menor espessura (160 MPa) foi inferior ao valor de tensão de limite elástico da liga de alumínio (280 MPa). A tensão de limite elástico determina os limites de desempenho do material, uma vez que representa a tensão máxima que pode ser aplicada sem deformação permanente. Assim, a deformação total reduzida e a ausência de deformação permanente, à tensão equivalente máxima, mostram que o reservatório de argon projetado com 0.2 mm de espessura consegue suportar uma pressão de 7 atm a 37 °C.

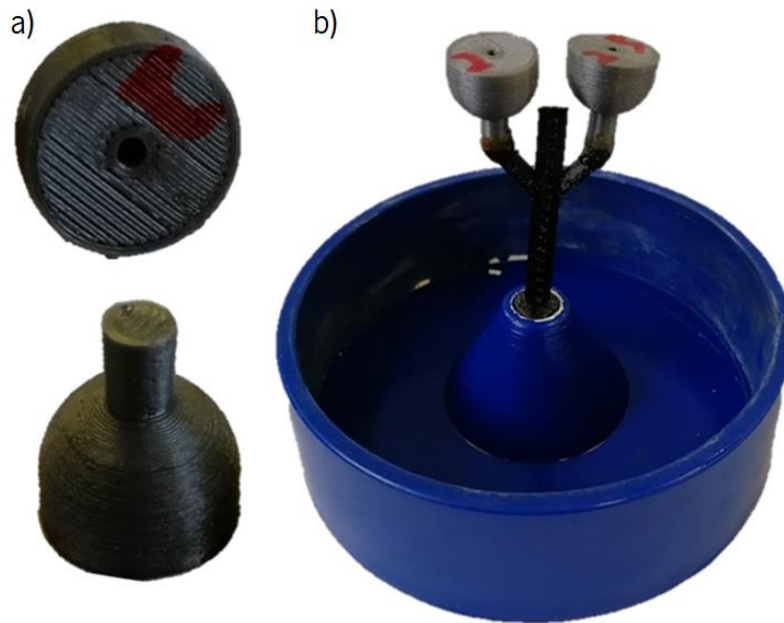
### 4.2.3 Fabrico do reservatório por microfundição

O reservatório de argon foi fabricado pelo processo de microfundição. Este processo de fabrico é capaz de produzir, de forma precisa, estruturas pequenas e complexas na gama dos micrômetros, como é o caso do reservatório de paredes finas. O processo de microfundição pode ser considerado um processo de fundição de precisão, através do qual os modelos de PLA são convertidos em peças solidas de metal de paredes finas, seguindo um processo de várias etapas. Na Figura 4.25 estão esquematizadas as principais etapas do processo de microfundição para o fabrico do reservatório de argon.



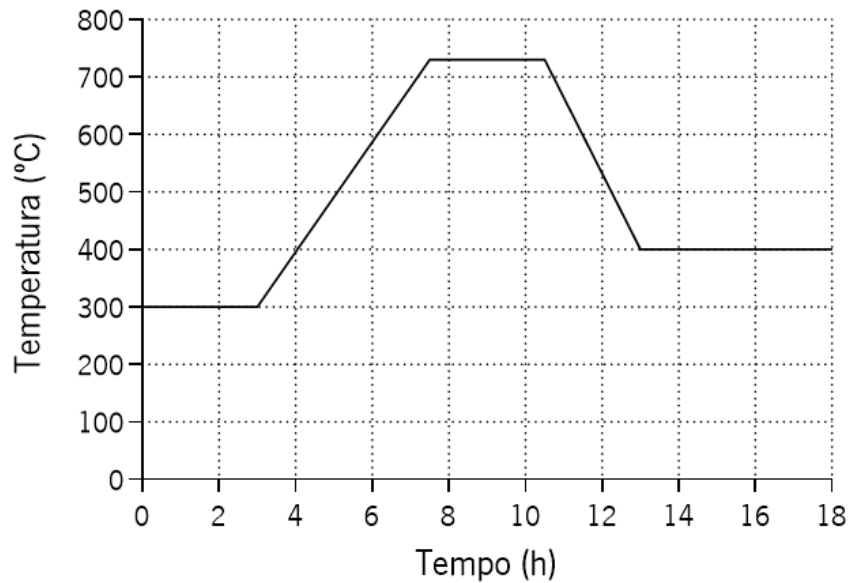
**Figura 4.25** – Processo de microfundição: a) fabrico do modelo em PLA e montagem da árvore; b) produção do molde cerâmico; c) ciclo térmico; d) enchimento do molde cerâmico assistido a vácuo (microfundição a vácuo); e) peça fundida.

O processo para a obtenção do molde cerâmico começou pela produção do modelo em PLA. Os modelos 3D do reservatório foram produzidos através do processo de fabrico aditivo de FDM de PLA, utilizando uma impressora *BCN3D Sigma* (Figura 4.26a). Foram criados múltiplos modelos de PLA (árvore), montados num canal central, para aumentar a taxa de produção (Figura 4.26b).



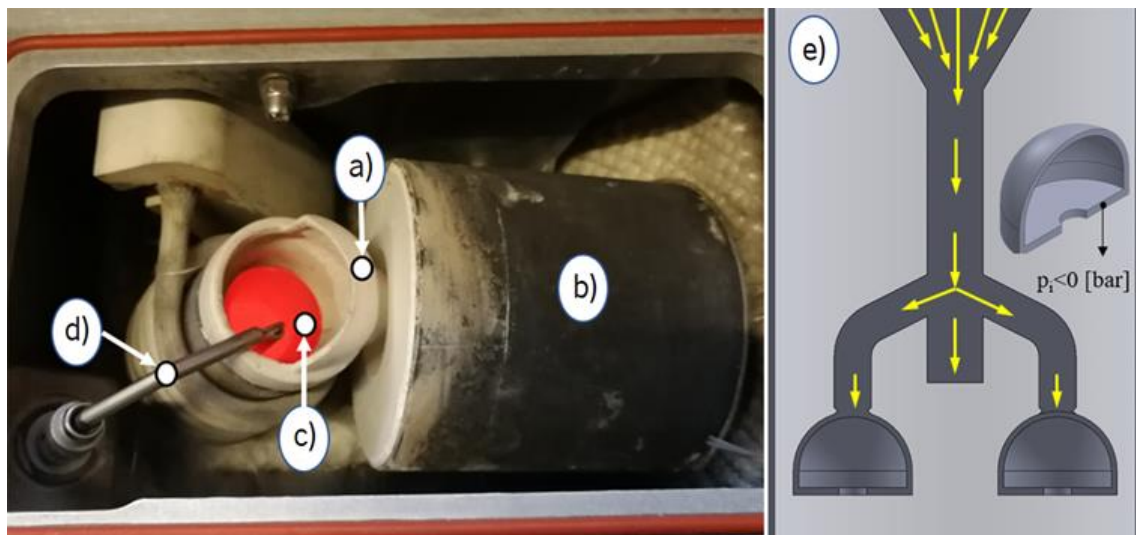
**Figura 4.26** – a) Modelo do reservatório em PLA com o canal de entrada no topo e o furo na base; b) múltiplos modelos de PLA (árvore).

Um frasco com o modelo em PLA foi preenchido com uma mistura de água e gesso em pó (*Ultra-Vest, Ranson & Randolph, Maumee, Ohio, EUA*) (proporção 40:100), para produzir o molde cerâmico. Este processo foi realizado sob pressão a vácuo e vibrações para melhorar a entrada da mistura de água e pó na cavidade no interior do modelo, usando um equipamento *Indu Mix 2 (Indutherm GmbH)*. As vibrações asseguraram uma mistura sem bolhas, impedindo a formação de câmaras-de-ar. Posteriormente, o molde cerâmico foi submetido a um ciclo térmico (Figura 4.27) num forno, para reduzir o teor de água e aumentar a resistência mecânica. Este tratamento térmico consistiu num aquecimento a 300 °C durante 3 horas, seguido por um aquecimento a 1.6 °C/min até aos 730 °C. Seguiu-se a este período uma fase isotérmica com duração de 3 horas, para aumentar a resistência mecânica do gesso e eliminar o PLA do modelo inserido no molde cerâmico. Após estes passos, a temperatura foi reduzida para a temperatura do molde de fundição (400 °C). A remoção do modelo em PLA do molde cerâmico permitiu a criação de uma forma vazia no seu interior, correspondendo ao modelo final destinado à produção do reservatório.



**Figura 4.27** – Ciclo térmico do molde cerâmico.

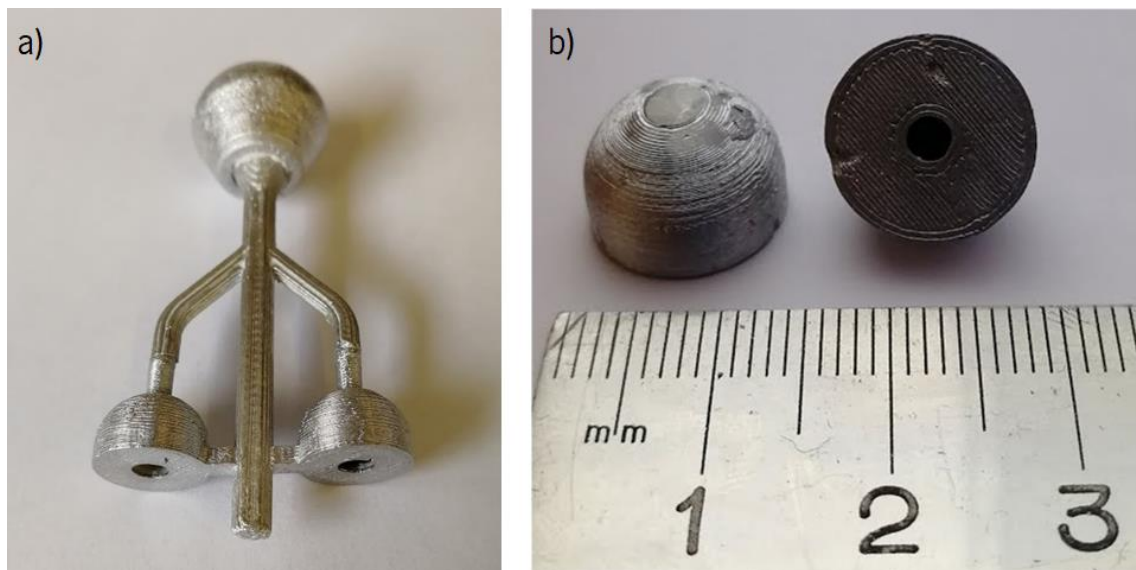
Para a fundição e vazamento do metal no processo de microfundição a vácuo foi utilizado um forno de indução *MC 15+ (Indutherm GmbH)* equipado com um cadinho de carbetto de silício (SiC) com uma capacidade de 20 g de Al (Figura 4.28).



**Figura 4.28** – Forno de indução para fundição e vazamento do metal no processo de microfundição a vácuo: a) cadinho de SiC; b) molde cerâmico; c) Al fundido; d) termopar; e) cavidade no interior do molde cerâmico.

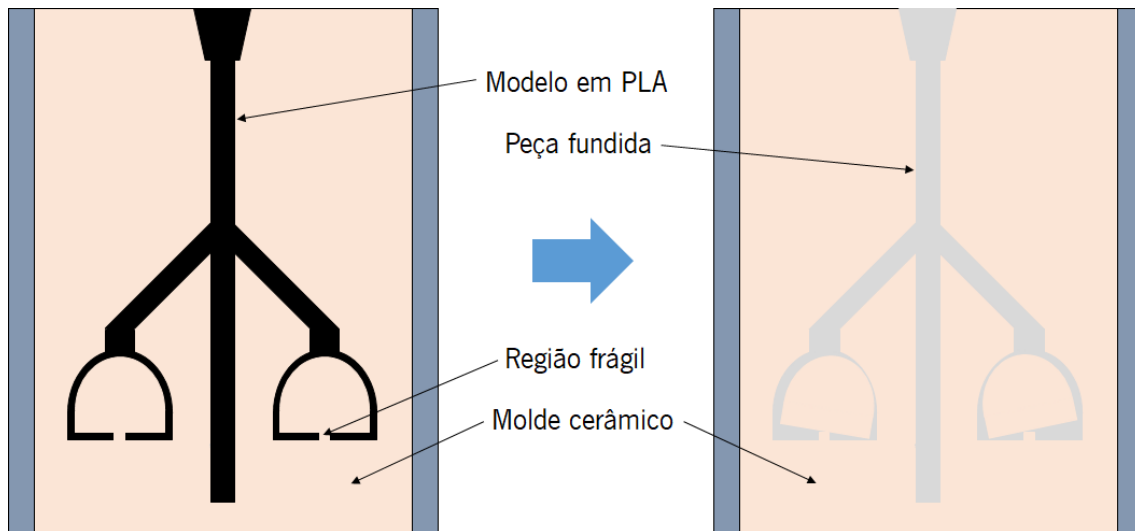
A liga Al7SiMg (15 g) com 0.3 % de Al10Sr (modificador) e 0.2 % de Al5Ti1B (afinador de grão) foi fundida e mantida no interior do cadinho a 720 °C durante 1 minuto para homogeneização. Foram adicionadas as ligas-mãe para modificação do silício eutético e afinação

do grão  $\alpha$ -Al para melhorar as propriedades mecânicas e a fluidez. Durante o processo de fusão, foi usada uma atmosfera de argon para evitar reações entre o fundido e o meio. Após o processo de fusão, foi realizado o vazamento das amostras com uma pressão a vácuo, para remoção do ar das cavidades do molde cerâmico. Imediatamente após o vazamento foi aplicada uma pressão de 2 bar para garantir um enchimento completo do molde. Depois de 10 minutos de arrefecimento, removeu-se o molde e a peça fundida foi limpa para extrair as partículas cerâmicas (Figura 4.29a). Removeu-se o sistema de enchimento, obtendo-se o reservatório pretendido (Figura 4.29b).



**Figura 4.29** – a) Peça fundida resultante do processo de microfusão; b) reservatório final.

A utilização do processo de microfusão no fabrico do reservatório de argon exigiu uma pequena alteração da geometria do reservatório apresentada na Figura 4.20. Foi necessário introduzir um pequeno furo na base e um canal de entrada no topo do reservatório (Figura 4.26a). O canal de entrada facilitou a união do modelo do reservatório ao sistema de enchimento. O furo permitiu a entrada da mistura de água e gesso no interior do modelo durante o processo de fabrico do molde, formando assim a cavidade interna do reservatório. A localização e o diâmetro do furo foram essenciais para a obtenção de reservatório sem anomalias. Furos descentrados e de diâmetros muito pequenos resultaram em reservatórios defeituosos (Figura 4.30). A Figura 4.31 mostra alguns exemplos de reservatórios com defeitos resultantes da utilização de um furo de diâmetro reduzido. Verificou-se que os modelos do reservatório com furos de diâmetro inferior a 2.5 mm reproduziam reservatórios finais defeituosos.



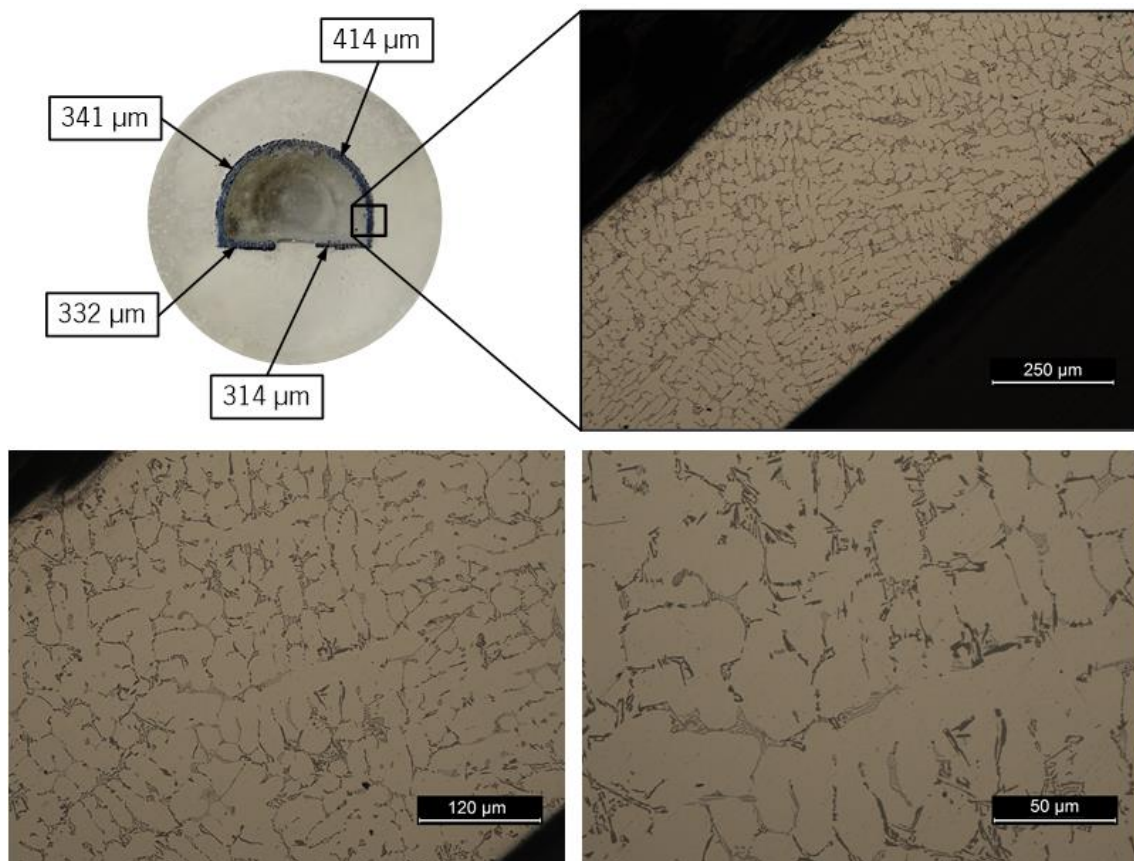
**Figura 4.30** – Ilustração da utilização de um furo de diâmetro reduzido no processo de fabrico do reservatório por microfundição. O modelo de PLA é convertido em peças fundidas com defeito, uma vez que o furo de diâmetro reduzido resulta num suporte de gesso da cavidade interna frágil.



**Figura 4.31** – Exemplos de reservatórios com defeitos resultantes da utilização de um furo de diâmetro reduzido.

A caracterização da microestrutura do material que constitui o reservatório final exigiu a realização de 4 etapas principais: montagem das amostras, preparação da superfície, ataque químico e observação ao microscópico ótico. Para a montagem das amostras, o reservatório final (Figura 4.29b) foi seccionado transversalmente, ao longo do seu eixo central, e mergulhado em resina num pequeno reservatório de plástico. Após a cura da resina foi realizada a preparação da superfície. Foram utilizadas lixas 300, 600, 1200 e 2400 de SiC. De seguida, foi realizado o polimento das amostras com duas suspensões de diamante de 6  $\mu\text{m}$  e 1  $\mu\text{m}$  e terminou-se com uma suspensão de sílica. O polimento tem como objetivo alcançar uma superfície espelhada e

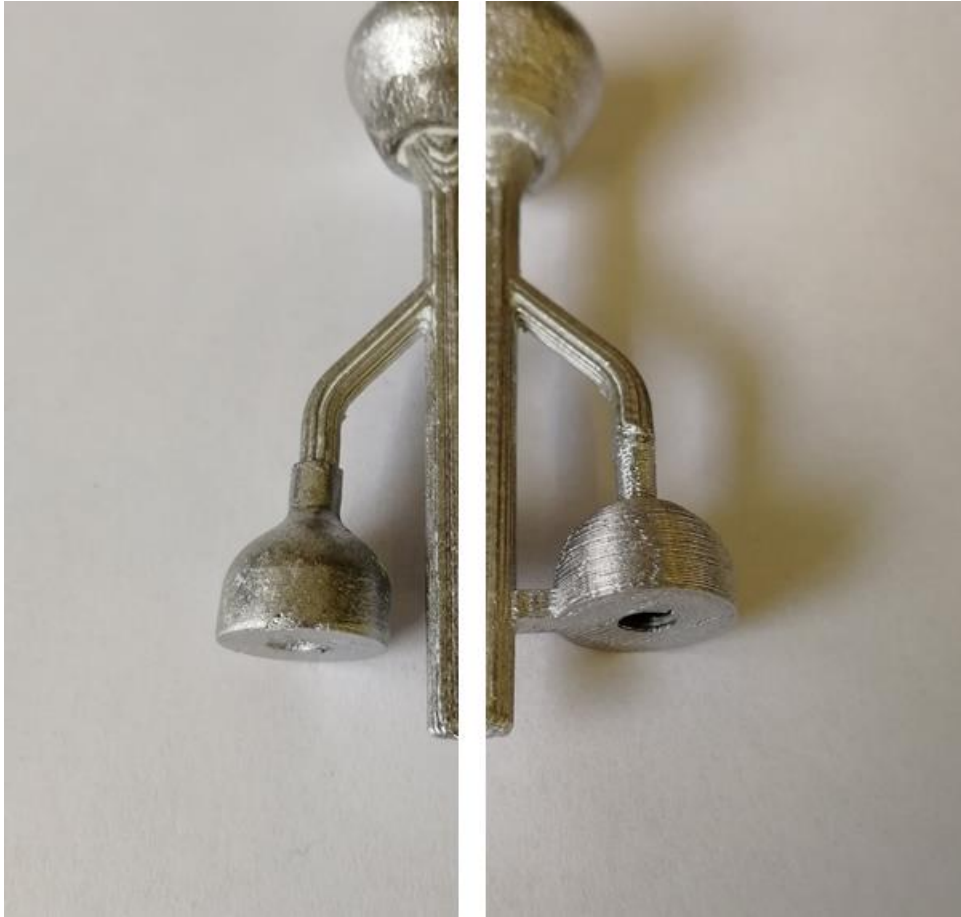
isenta de marcas e risco. Após a última etapa do polimento da superfície, as amostras foram sujeitas a um ataque químico com o reagente de Keller, para revelar a sua microestrutura, e lavadas em água. Por fim, foi observada a microestrutura ao microscópio ótico e medida a espessura das paredes do reservatório. A Figura 4.32 mostra a secção polida do reservatório final e a microestrutura da liga Al7SiMg a diferentes escalas.



**Figura 4.32** – Espessura das paredes do reservatório e microestrutura da liga Al7SiMg a diferentes escalas.

A espessura das paredes do reservatório final difere da espessura esperada (200  $\mu\text{m}$ ). Esta diferença deve-se às tolerâncias do processo de fabrico dos modelos em PLA. A observação ótica da microestrutura revelou homogeneidade e sanidade microestrutural, com estrutura bem definida e sem porosidades, estando de acordo com o esperado.

A qualidade do acabamento superficial do reservatório final não foi o ideal, devido às camadas do modelo em PLA resultantes do processo de fabrico aditivo de FDM. A utilização de uma resina *epoxy (XTC-3D)* de revestimento no modelo em PLA permite alcançar um acabamento melhor da superfície externa do reservatório (Figura 4.33). Contudo, a sua utilização resulta numa alteração das dimensões originais definida no modelo sem revestimento.

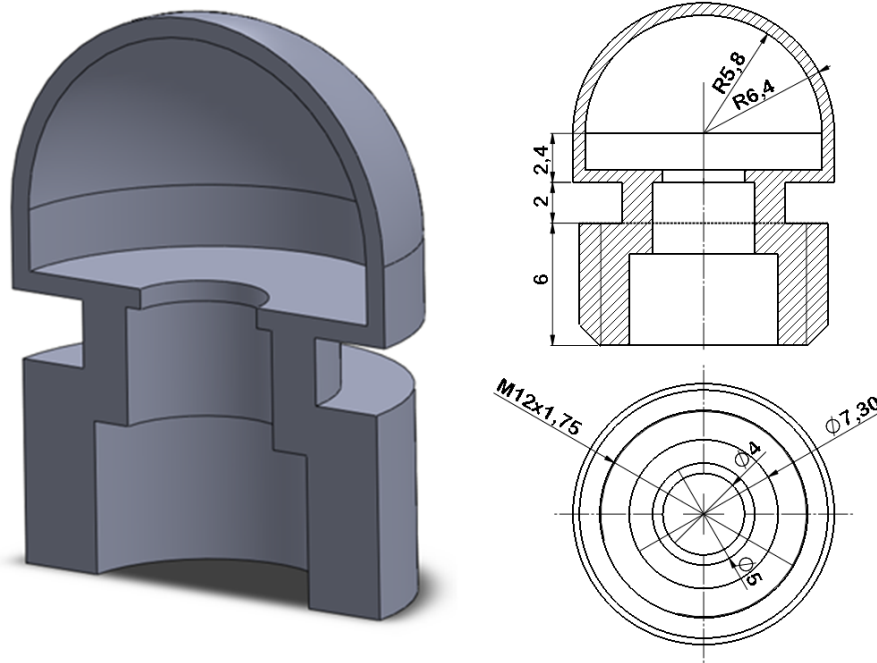


**Figura 4.33** – Acabamento da superfície externa do reservatório obtido a partir do modelo com revestimento (esquerda) e sem revestimento (direita).

#### **4.2.4 Ensaios experimentais de pressão**

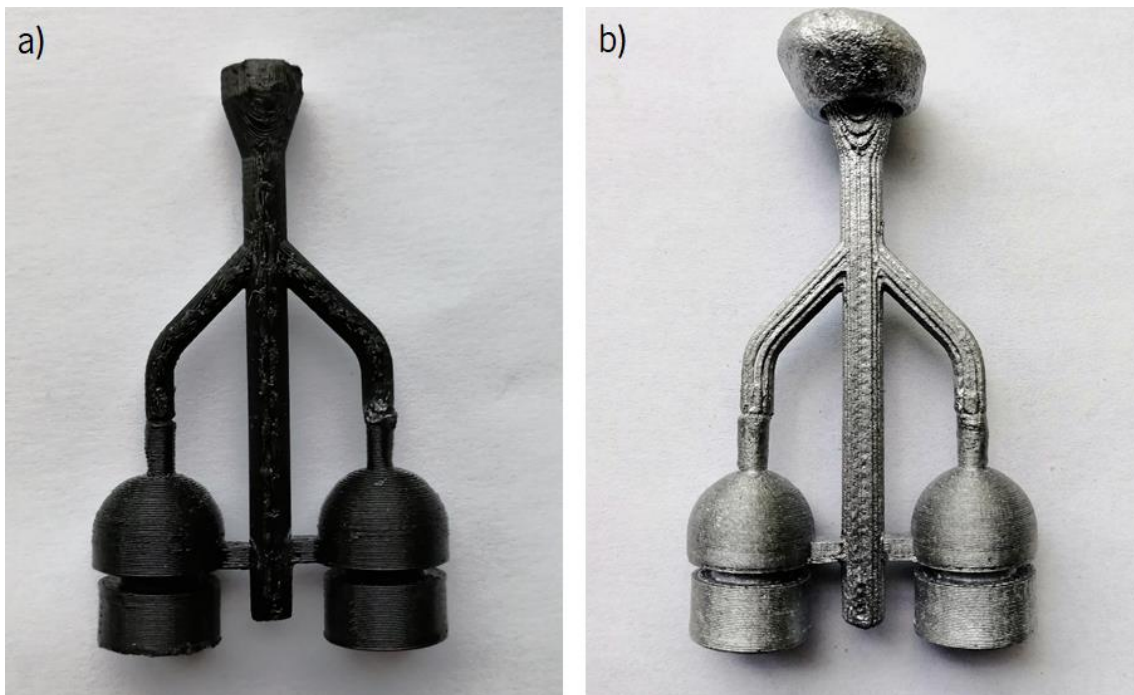
Devido ao aparato experimental utilizado nos ensaios de pressão houve a necessidade de alterar a geometria do modelo apresentado na Figura 4.20. A este modelo foi incluída uma nova estrutura na base do reservatório. Esta nova estrutura, posteriormente roscada, permitiu a conexão do reservatório ao aparato experimental. A Figura 4.34 mostra a nova geometria e as dimensões do reservatório utilizado nos ensaios experimentais de pressão, que permite a sua conexão ao aparato experimental.





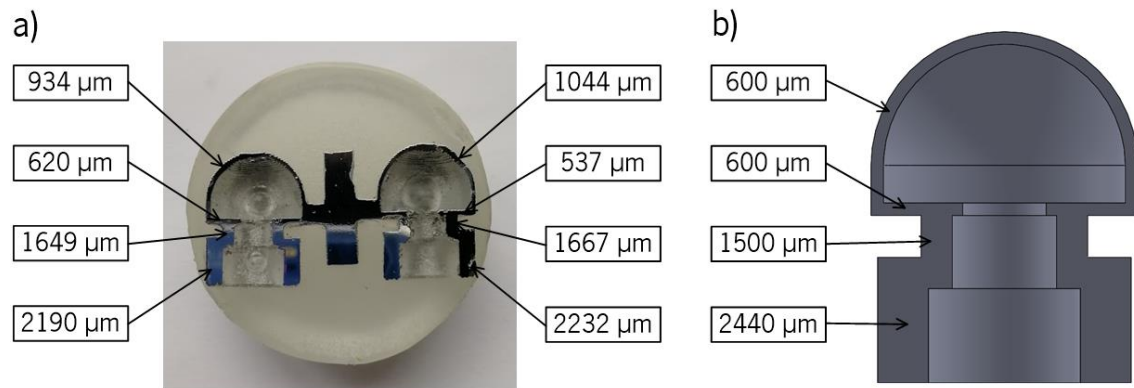
**Figura 4.34** – Geometria e dimensões (em mm) do reservatório utilizado nos ensaios experimentais de pressão.

Os novos reservatório foram fabricados pelo mesmo processo de microfusão dos reservatórios anteriores, descrito na Figura 4.25. A Figura 4.35 mostra o modelo em PLA do novo reservatório e a peça final resultante do processo de microfusão.



**Figura 4.35** – a) Modelo em PLA (árvore); b) peça resultante do processo de microfusão.

Tal como os reservatórios anteriores, também estes foram seccionados transversalmente, ao longo do seu eixo central, e observados ao microscópio para avaliação da microestrutura. Foi medida a espessura das paredes do reservatório (Figura 4.36a) e comparada com as do modelo CAD (Figura 4.36b).



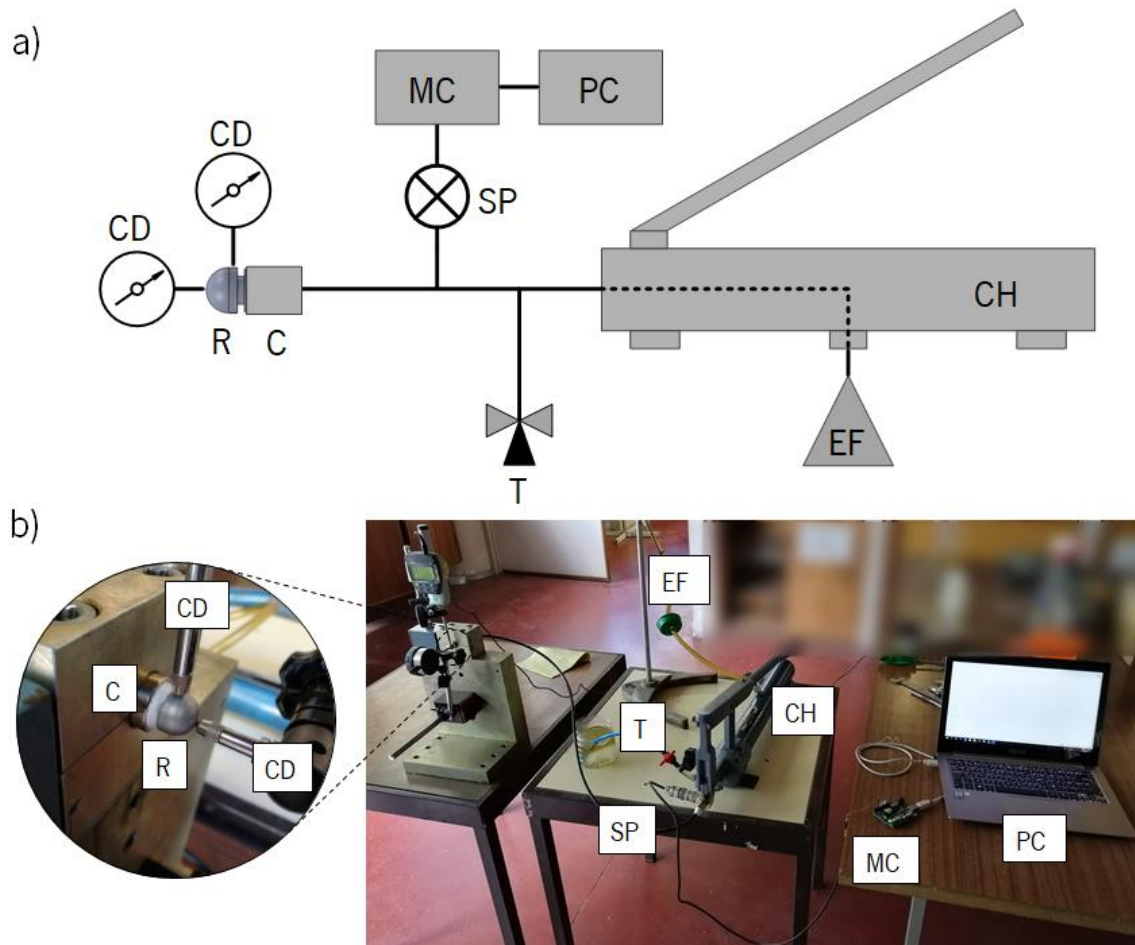
**Figura 4.36** – Espessura das paredes do reservatório: a) do processo de microfundição; b) do modelo CAD.

O reservatório final para os ensaios de pressão foi obtido pela remoção do sistema de enchimento da peça resultante do processo de microfundição e pela realização de uma rosca (por maquinagem CNC) na nova base do reservatório (Figura 4.37).



**Figura 4.37** – Reservatório final utilizado nos ensaios de pressão (direita) e conector do aparato experimental (esquerda).

A representação esquemática e a imagem real do aparato experimental responsável pela indução de pressão no interior do reservatório são apresentados na Figura 4.38.



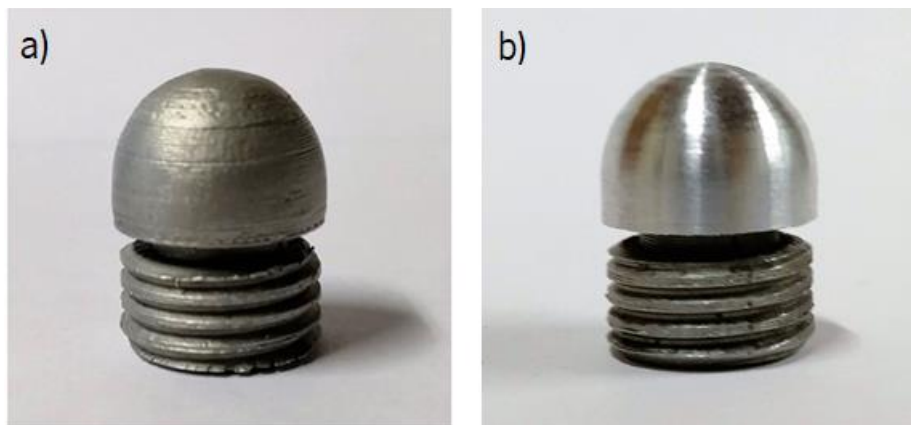
**Figura 4.38** – Representação esquemática (a) e imagem real (b) do aparato experimental utilizado nos ensaios de pressão do reservatório. O aparato experimental é composto por: PC – computador pessoal; MC – microcontrolador (*Arduino*); SP – sensor de pressão; CH – cilindro hidráulico (com uma bomba manual); EF – entrada do fluido; T – torneira; CD – comparador digital; C – conector; R – reservatório.

Nesta configuração, a pressão foi inserida no interior do reservatório através do uso exclusivo de um cilindro hidráulico. A alavanca acoplada ao cilindro hidráulico permitiu controlar a pressão do sistema. Foi incorporado um sensor eletrônico de pressão (*SEN0257*) para avaliar a pressão do sistema. O sensor de pressão foi conectado ao *Arduino* e este ao computador pessoal. Foi desenvolvido e compilado um programa para o *Arduino* para ler e registar a pressão do sistema no computador pessoal. A deformação do reservatório foi avaliada recorrendo a dois comparadores digitais, de acordo com um sistema de coordenadas XY (Figura 4.38b). Os comparadores digitais possuíam uma sensibilidade micrométrica. O seu posicionamento estático foi garantido pelo uso de dois suportes magnéticos.

Todo o sistema foi preenchido com um fluido não compressível, que foi inserido no sistema pela pressão resultante do movimento da alavanca do cilindro hidráulico. Para garantir que os valores de pressão medidos não sejam afetados pelas bolhas de ar nos tubos, todo o sistema deve

ser preenchido com o fluido. Para tal, foi incluído um *bypass* de “sangramento” na saída do cilindro hidráulico. Após a colocação de todos os elementos do aparato experimental, foi realizado o “sangramento” para a remoção de todas as bolhas de ar do sistema. Primeiro, a torneira foi aberta e o efeito de sucção promovido pelo movimento da alavanca do cilindro hidráulico forçou o fluido a entrar no sistema. Depois, o fluido do sistema foi derramado pela torneira até que o sistema não tivesse bolhas de ar. Por fim, a torneira foi fechada e o sistema estava pronto a ser utilizado.

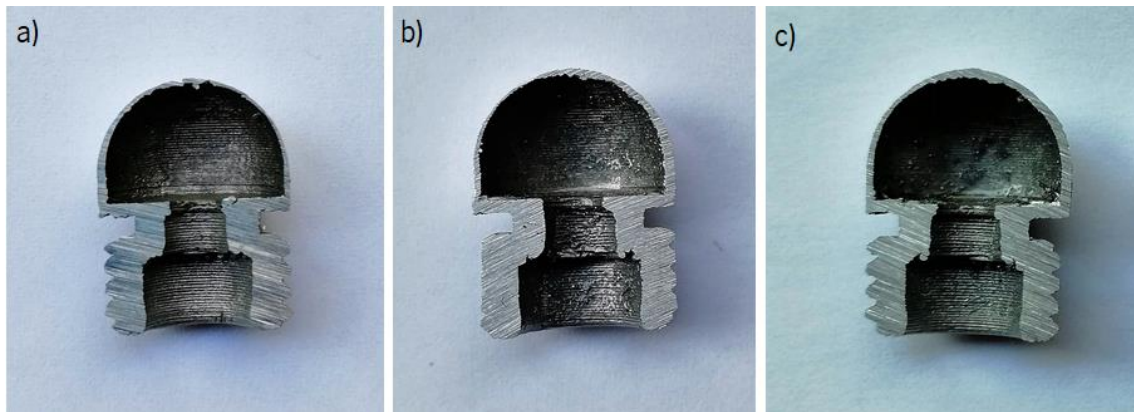
Foram testados três reservatórios diferentes. Um deles foi o reservatório em bruto resultante do processo de microfundição (Figura 4.39a). Os outros foram obtidos por meio da redução da espessura das paredes do reservatório em bruto, através de maquinagem CNC (Figura 4.39b).



**Figura 4.39** – a) Reservatório em bruto resultante do processo de microfundição; b) reservatório de paredes mais finas resultante da redução da espessura das paredes do reservatório a).

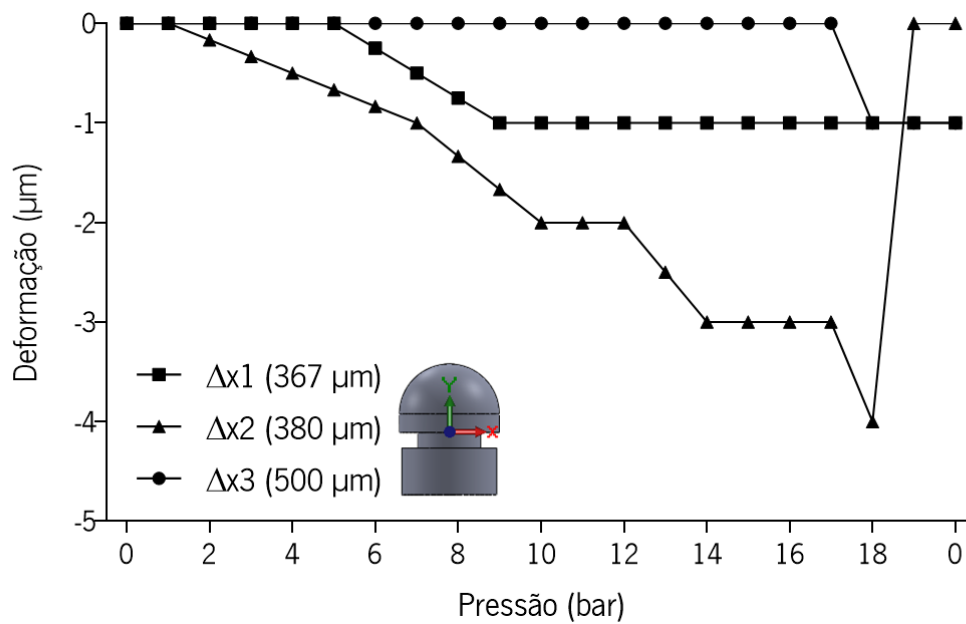
Os ensaios foram iniciados com um primeiro movimento descendente da alavanca do cilindro hidráulico. A pressão foi monitorizada e as deformações registadas. A pressão foi aumentada até 18 bar em passos de 1 bar. Por fim, a torneira foi aberta para libertar a pressão do sistema.

Após os ensaios, os reservatórios foram seccionados transversalmente, ao longo do seu eixo central, a fim de avaliar a sua espessura real. Os reservatórios foram observados ao microscópio ótico e as suas espessuras foram medidas usando o programa de processamento de imagem *ImageJ*. A média de 15 medidas de espessura foi considerada a espessura global de cada reservatório. A espessura global dos reservatórios foi de 367  $\mu\text{m}$ , 380  $\mu\text{m}$  e 500  $\mu\text{m}$  (Figura 4.40).

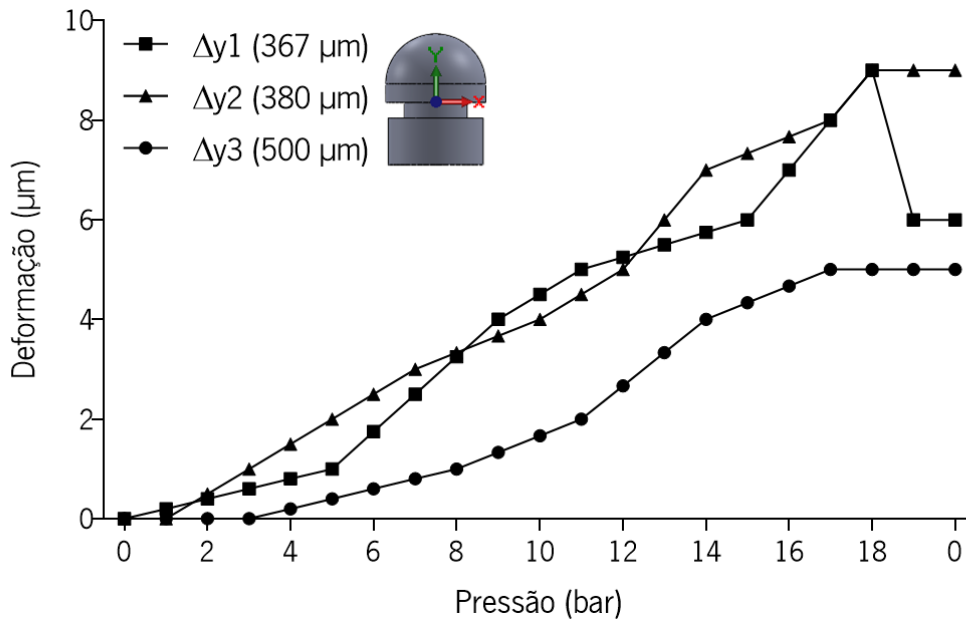


**Figura 4.40** – Vista seccionada dos reservatórios experimentais com diferentes espessuras globais: a) 367  $\mu\text{m}$ ; b) 380  $\mu\text{m}$ ; c) 500  $\mu\text{m}$ .

Com os dados adquiridos foram traçadas as curvas de deformação do reservatório em função da pressão do sistema. As curvas de pressão vs. deformação  $xx$  e pressão vs. deformação  $yy$  para o reservatório de alumínio com diferentes espessuras são mostradas nas Figura 4.41 e Figura 4.42, respectivamente.



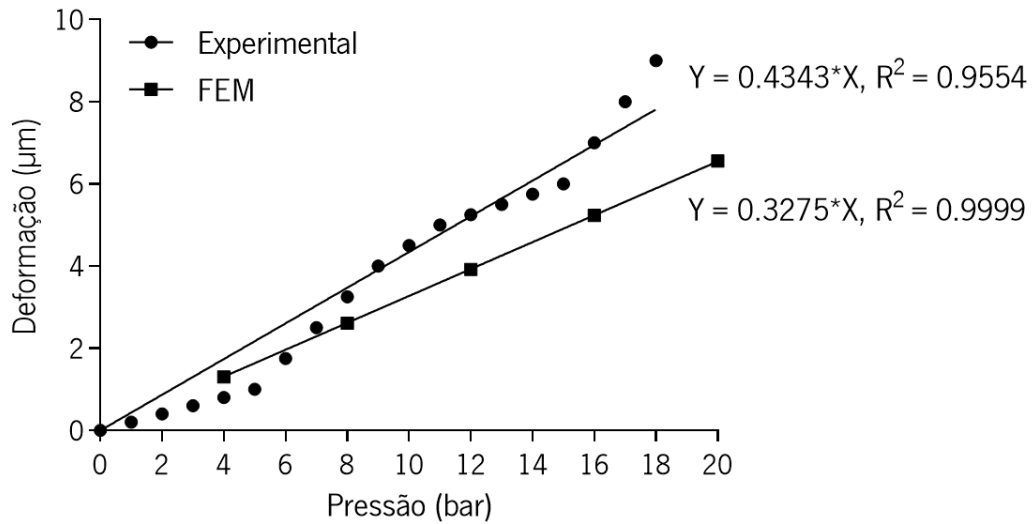
**Figura 4.41** – Gráfico de pressão vs. deformação  $xx$  do reservatório de alumínio com diferentes espessuras.



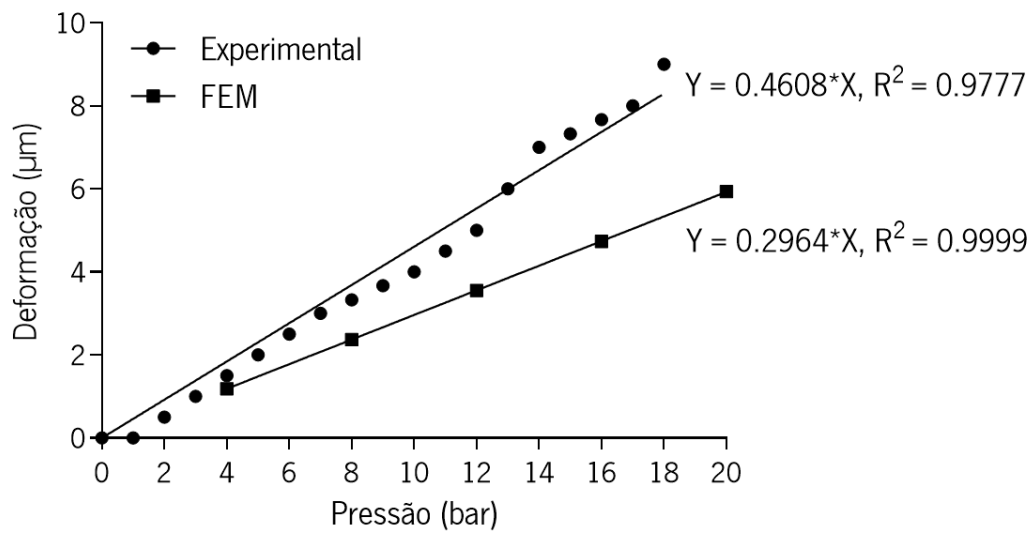
**Figura 4.42** – Gráfico de pressão vs. deformação yy do reservatório de alumínio com diferentes espessuras.

Os ensaios experimentais de pressão demonstraram a estanquidade dos reservatórios testados. Como era expectável, a pressão no interior do reservatório gerou uma deformação positiva no eixo dos yy e uma deformação negativa no eixo dos xx (resultando numa diminuição do diâmetro do reservatório). À pressão de interesse (7 bar), a deformação do reservatório é bastante reduzida, não ultrapassando os 3 μm no eixo dos yy e -1 μm no eixo dos xx. Após a abertura da torneira, para libertar a pressão do sistema, verificou-se uma recuperação da deformação do reservatório, no entanto não foi total. A pressão de 18 bar revelou-se excessiva, provocando deformações permanentes no reservatório.

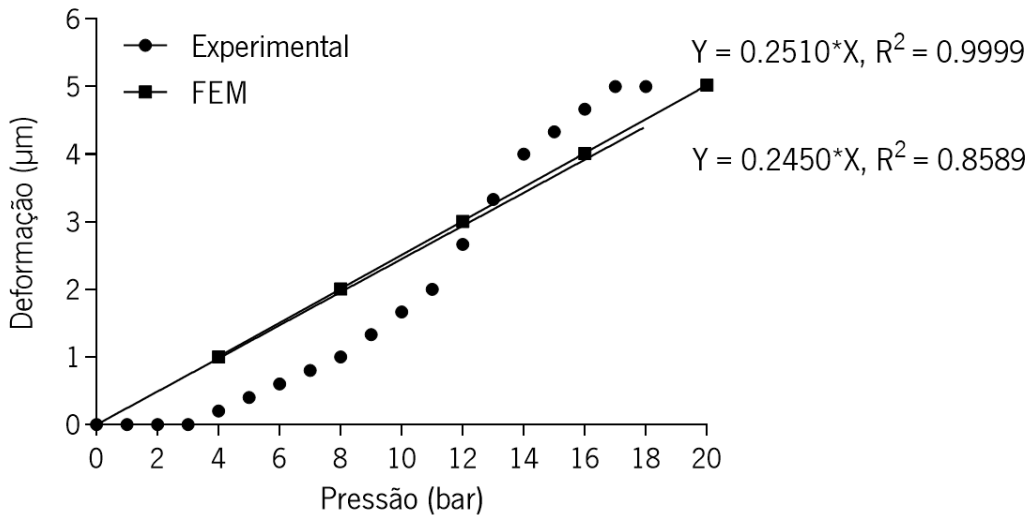
As deformações experimentais foram comparadas com as deformações teóricas obtidas nas simulações FEM para o reservatório com a nova geometria experimental. As simulações FEM foram realizadas para os reservatórios com as espessuras determinadas experimentalmente e com as propriedades da liga de alumínio utilizada no seu fabrico. Os gráficos das Figura 4.43, Figura 4.44 e Figura 4.45 apresentam a deformação experimental e simulada dos reservatório de alumínio com 367 μm, 380 μm e 500 μm de espessura, respetivamente.



**Figura 4.43** – Deformação experimental e deformação simulada do reservatório de alumínio com 367 µm de espessura.



**Figura 4.44** – Deformação experimental e deformação simulada do reservatório de alumínio com 380 µm de espessura.



**Figura 4.45** – Deformação experimental e deformação simulada do reservatório de alumínio com 500 µm de espessura.

As linhas de regressão linear presentes nos gráficos anteriores apresentam um elevado coeficiente de determinação ( $R^2$ ), revelando um bom ajuste da linha aos dados obtidos. A Tabela 4.3 sumariza a deformação simulada e a deformação experimental, determinadas pela equação das linhas de regressão linear respectivas, do reservatório com diferentes espessuras a 7 bar de pressão interna.

**Tabela 4.3** – Deformação simulada e deformação experimental do reservatório com diferentes espessuras a 7 bar de pressão interna

Espessura (µm)	Deformação simulada	Deformação experimental
367	2.293	3.040
380	2.075	3.226
500	1.757	1.715

Os valores semelhantes da tabela anterior revelam uma concordância entre os resultados da deformação simulada e experimental para as diversas espessuras do reservatório estudadas.

## Referências bibliográficas 4

- [1] D. E. J. G. J. Dolmans, D. Fukumura, and R. K. Jain, "Photodynamic therapy for cancer," *Nat. Rev. Cancer* 3, 380–387(2003).
- [2] S. A. Blant, A. Woodtli, G. Wagnières, C. Fontolliet, H. van den Bergh, and P. Monnier, "In Vivo Fluence Rate Effect in Photodynamic Therapy of Early Cancers with Tetra( m -



- hydroxyphenyl)chlorin,” *Photochem. Photobiol.* 64 (6), 963–968(1996).
- [3] W. Peng, D. F. Samplonius, S. de Visscher, J. L. N. Roodenburg, W. Helfrich, and M. J. H. Witjes, “Photochemical internalization (PCI)-mediated enhancement of bleomycin cytotoxicity by liposomal mTHPC formulations in human head and neck cancer cells,” *Lasers Surg. Med.* 46 (8), 650–658(2014).
- [4] J. Keller *et al.*, “Inspection of the human stomach using remote-controlled capsule endoscopy: a feasibility study in healthy volunteers (with videos),” *Gastrointest. Endosc.* 73 (1), 22–28(2011).
- [5] G. Tortora, B. Orsini, P. Pecile, A. Menciassi, F. Fusi, and G. Romano, “An Ingestible Capsule for the Photodynamic Therapy of *Helicobacter pylori* infection,” *IEEE/ASME Trans. Mechatronics* 21 (4), 1935–1942(2016).
- [6] H. C. Ohanian and J. T. Markert, “The Ideal Gas,” in *Physics for Engineers and Scientists*, L. Wiegman, Ed. W.W. Norton & Company, Inc., 2007, 602–608(2007).

## 5 Conclusões e trabalhos futuros

---

Neste último capítulo serão apresentadas as conclusões dos trabalhos realizados no âmbito desta tese de doutoramento. Por fim, serão propostos trabalhos futuros.

### 5.1 Conclusões

Na primeira componente da tese, procedeu-se ao desenvolvimento de um módulo de TFD para integrar na CE. Foram realizados ensaios experimentais *in vitro* em duas linhas celulares do carcinoma colorretal humano, RKO e HCT-15, para avaliar o efeito fotodinâmico da terapia mediada pelo mTHPC. Nestes ensaios foram utilizadas concentrações de mTHPC de 0.5, 1, 5 e 10  $\mu\text{g/ml}$  e fluências de luz de 2.5, 5 e 10  $\text{J/cm}^2$ , a uma taxa de fluência de luz de 11  $\text{mW/cm}^2$ . Construiu-se uma fonte de luz vermelha e uma estrutura para suporte e posicionamento da fonte de luz sobre as placas de cultura de células. O espectro de emissão da fonte de luz possuía um comprimento de onda central de 653 nm, muito próximo do comprimento de onda de máxima absorção do mTHPC na região do vermelho (652 nm). Isto permitiu uma maior penetração da luz e melhor ativação do mTHPC nos ensaios realizados. Os resultados mostraram que, em ambas as linhas celulares, o mTHPC apresentou toxicidade no escuro à maior concentração em estudo (10  $\mu\text{g/ml}$ ), contudo as concentrações mais baixas de mTHPC não apresentaram toxicidade na ausência de luz. As concentrações de mTHPC estudadas levaram a valores similares de viabilidade das células RKO. Nas células HCT-15, a concentração de 0.5  $\mu\text{g/ml}$  conduziu aos valores mais altos de viabilidade celular. A luz vermelha usada na ativação do mTHPC não introduz qualquer atividade citotóxica nas células RKO e HCT-15. As fluências de luz estudadas levaram a valores semelhantes de viabilidade celular das células RKO. Nas células HCT-15, um aumento da fluência de luz resulta numa diminuição da viabilidade celular para a concentração de mTHPC de 0.5  $\mu\text{g/ml}$ . Para as outras concentrações de mTHPC as diferentes fluências de luz levaram a valores similares de viabilidade celular das células HCT-15. Considerando a taxa de fluência de luz normalmente utilizada nos ensaio TFD mediada pelo mTHPC (100  $\text{mW/cm}^2$ ), a reduzida taxa de fluência de luz (11  $\text{mW/cm}^2$ ) utilizada nestes ensaios revelou boa atividade fotodinâmica. Para 11  $\text{mW/cm}^2$  de taxa de fluência de luz, concluiu-se que a concentração de mTHPC e a fluência de luz que conduziram aos melhores resultados foi 1-5  $\mu\text{g/ml}$  e 2.5  $\text{J/cm}^2$ , respetivamente. A concentração de mTHPC mais elevada (10  $\mu\text{g/ml}$ ) revelou-se excessiva, uma vez que apresentou elevada toxicidade no escuro. Demonstrou-se que a iluminação a baixa fluência de luz e taxa de

fluência de luz leva a uma boa resposta fotodinâmica. Portanto, a TFD usando uma intensidade de luz mínima e um tempo de iluminação reduzido permite realizar esta terapia recorrendo a DIMIMs autónomos (que possuem limitações energéticas), como as CEs, que até janeiro de 2019 não possuem função terapêutica.

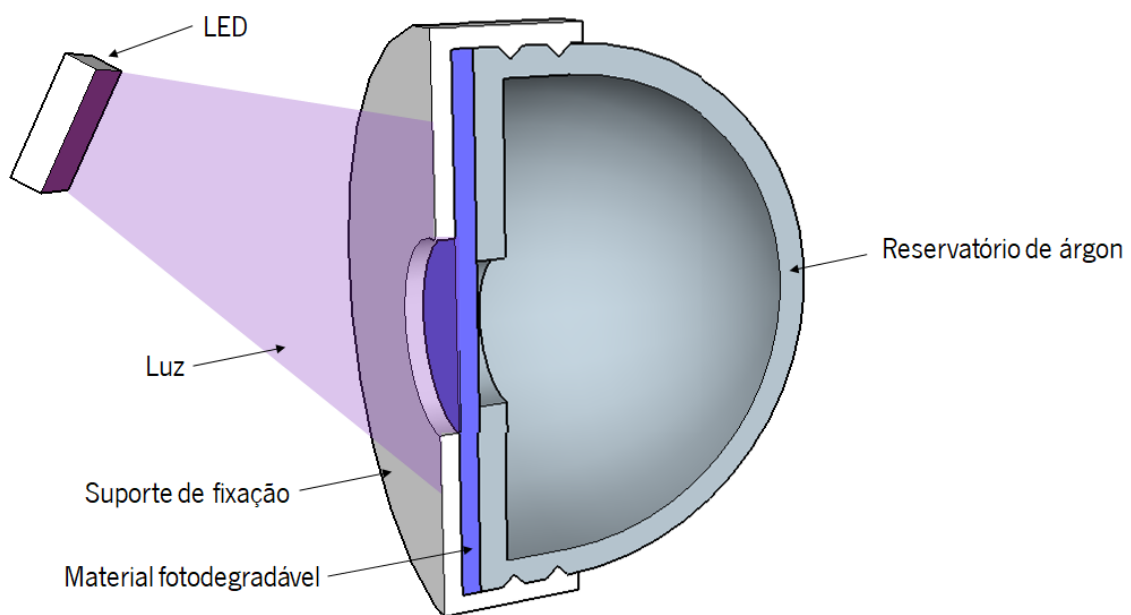
Na segunda componente da tese, procedeu-se à projeção, simulação e fabrico por microfundição assistida a vácuo de um pequeno reservatório de parede finas para integração na CE. Este reservatório foi projetado para fornecer o fluxo de argon necessário para a realização da técnica de PAN durante um curto tempo de tratamento (1-3 segundos). Foram realizadas simulações numéricas para estudar o comportamento estrutural do reservatório e prever a sua espessura mínima para suportar a pressão interna de 7 bar. Os resultados das simulações permitiram concluir que o reservatório projetado com 0.2 mm de espessura consegue suportar a pressão determinada. A microfundição assistida a vácuo demonstrou ser um processo de manufatura eficiente no fabrico de um pequeno reservatório de paredes finas. A FDM revelou ser capaz de fabricar modelos em PLA para a microfundição, uma vez que permitiu a produção rápida e barata de modelos com boa qualidade geral, apesar do acabamento superficial não ter sido perfeito. Mostrou-se que esta limitação pode ser ultrapassada pela utilização de uma resina de revestimento. Foi montado um aparato experimental para a introdução de pressão no interior dos reservatórios fabricados. Foram realizados testes experimentais de pressão em três reservatórios de diferentes espessuras até ao máximo de 18 bar, demonstrando-se a estanquidade dos reservatórios testados. A pressão de 18 bar revelou-se excessiva, provocando deformações permanentes no reservatório, contudo à pressão de interesse (7 bar) a deformação do reservatório foi mínima. Os resultados experimentais mostraram-se em conformidade com os simulados, permitindo concluir que um reservatório de alumínio com uma espessura de 367  $\mu\text{m}$  é capaz de suportar 7 bar de pressão interna.

## 5.2 Trabalhos futuros

A fonte de luz utilizada nos ensaios *in vitro* é constituída por LEDs com um comprimento de onda central de 653 nm, próximo do comprimento de onda da máxima absorção do mTHPC na região do vermelho (652 nm). Contudo estes LEDs possuem dimensões demasiado grandes para serem introduzidos numa CE. Para tal foram seleccionadas outros LEDs de menores dimensões. No entanto, estes novos LEDs possuem um espectro de emissão com um

comprimento de onda central diferente dos anteriores. Para avaliar a eficácia da fonte de luz vermelha da CE na ativação do mTHPC era interessante realizar ensaios *in vitro* de TFD utilizando os novos LEDs.

Também como trabalho futuro, o desenvolvimento de um sistema de controlo da abertura do reservatório de árgon, através da utilização de uma pequena electroválvula ou de um material que fosse degradável com a exposição à luz. A Figura 5.1 ilustra um possível sistema de controlo da abertura do reservatório de árgon pela ativação com luz (favorável às CEs) que conduz à degradação de um material fotodegradável pela exposição à luz vinda de LEDs.



**Figura 5.1** – Ilustração de um sistema de controlo da abertura do reservatório de árgon utilizando um material degradável pela exposição à luz.



## Anexos

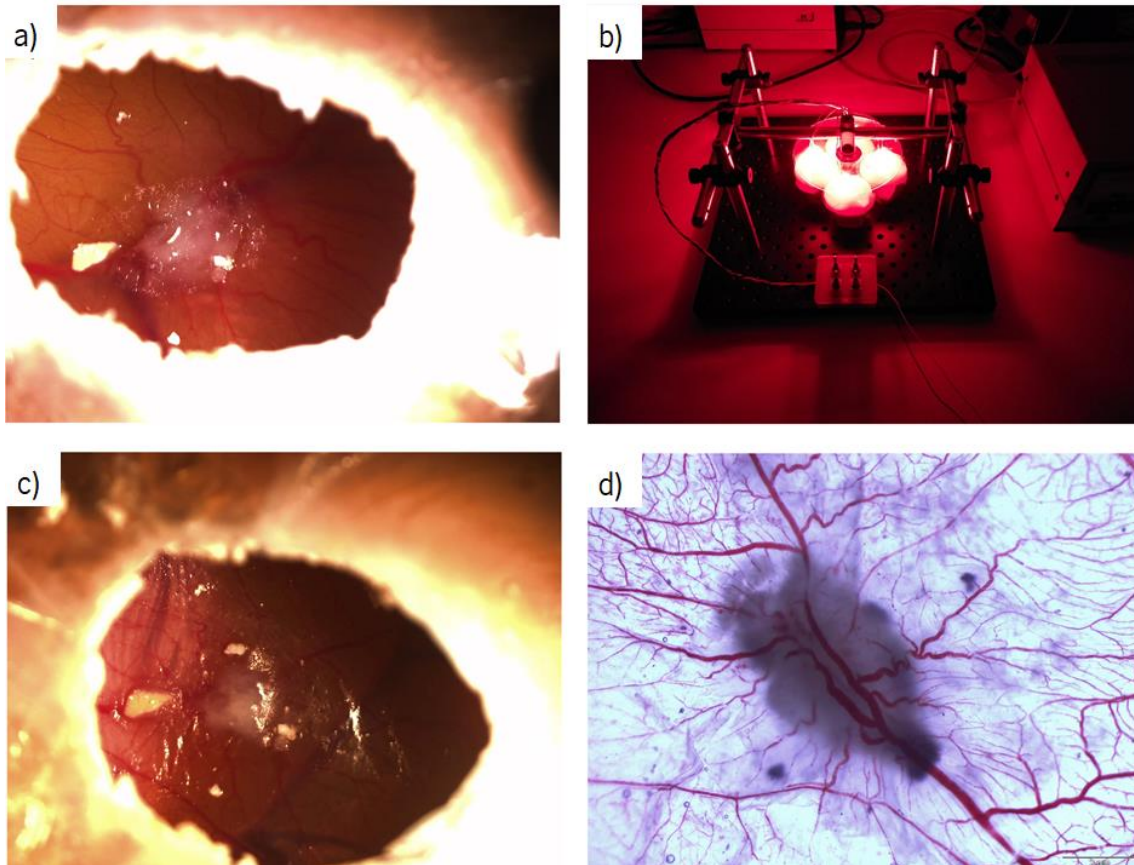
---

### Ensaio *in ovo*

A composição do tecido e a acessibilidade da membrana corioalantóica do embrião de galinha (CAM) para manipulação experimental, torna-a um atraente modelo pré-clínico *in vivo* para triagem de drogas e/ou para estudos de crescimento vascular. Este modelo permite o crescimento de células tumorais, aplicadas como uma suspensão na superfície da membrana, que se tornam tumores que desenvolvem o seu próprio suprimento de sangue através do processo de angiogênese (semelhante aos tumores reais em ratos). Quando comparado com os estudos em ratos de laboratório, os estudos na CAM são mais rápidos, mais baratos e não tem controles regulatórios (sem problemas éticos).

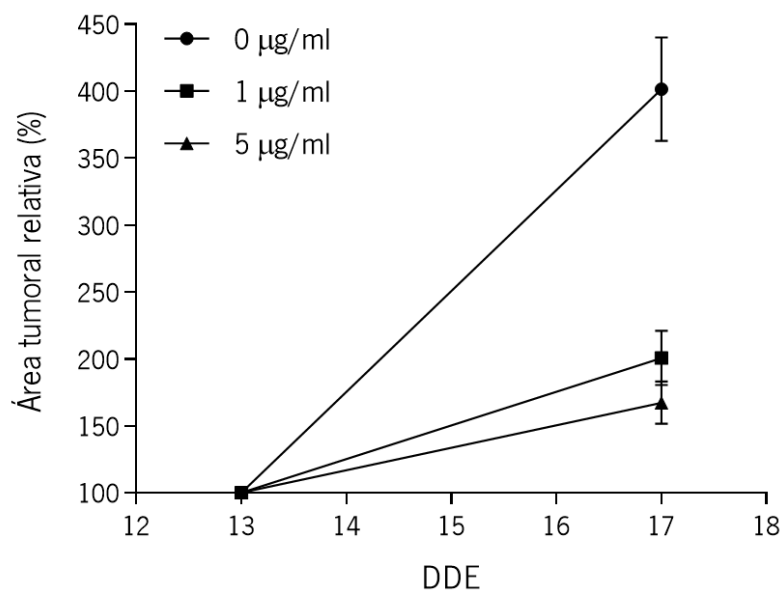
Foram realizados alguns testes na CAM para avaliar a TFD mediada pelo mTHPC. Resumidamente, os ovos de galinha fertilizados foram limpos com água estéril e transferidos para uma incubadora a 37 °C e 60 % de humidade durante três dias. No dia de desenvolvimento embrionário (DDE) 3, foi perfurado em cada extremidade do ovo um orifício de 2 mm de diâmetro, permitindo o descolamento do embrião da casca do ovo. Abriu-se uma janela de 10 mm de diâmetro na casca dos ovos, selou-se com fita cirúrgica para evitar a desidratação e contaminações, e incubaram-se novamente os ovos numa posição estática. Os embriões não fertilizados, anormais ou mortos foram descartados. No DDE 9 foi depositada na superfície da CAM 40 µl de meio de cultura com 1x10<sup>6</sup> células da linha HT29 (adenocarcinoma colorretal humano). No DDE 13 (Figura A.1a), o mTHPC foi administrado topicamente aos tumores desenvolvidos na CAM. Os ovos foram incubados novamente no escuro a 36 °C durante um dia. No DDE 14 (Figura A.1b), os ovos foram irradiados com luz vermelha a 653 nm durante 3 minutos e 47 segundos (2.5 J/cm<sup>2</sup> de fluência de luz e 11 mW/cm<sup>2</sup> de taxa de fluência de luz). Nos DDE 13, 14 e 17 foram tiradas fotografias para avaliação da área tumoral. Foi calculada a média das áreas tumorais (AT). A área tumoral relativa (ATr) foi calculada em relação ao DDE 13:

$$ATr(t) = \frac{AT(t)}{AT(t_{DDE13})} \quad (A.1)$$

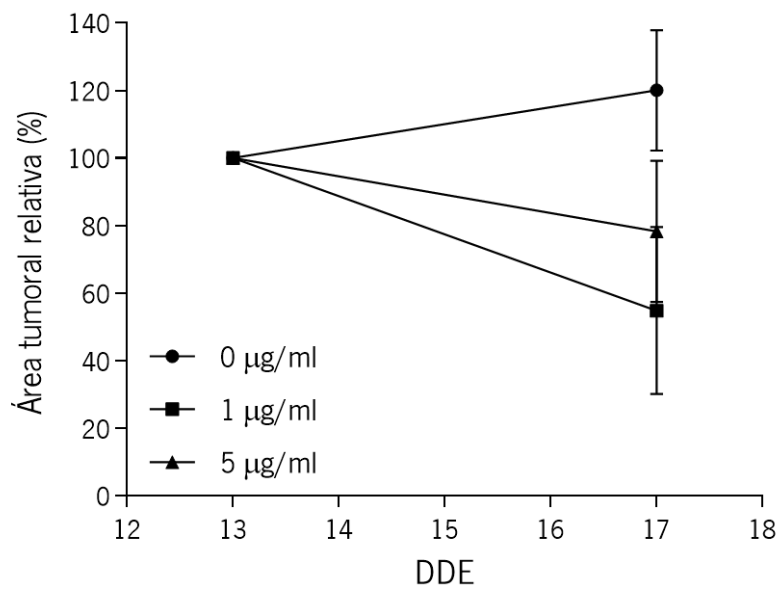


**Figura A.1** – a) Tumor sobre a CAM no DDE 13; b) irradiação dos ovos com luz vermelha (DDE 14); c) tumor sobre a CAM no DDE 15; d) ex ovo da CAM (DDE 17).

A Figura A.2 e Figura A.3 mostram a área tumoral relativa no DDE 13 e 17 sem irradiação dos ovos e com uma fluência de luz de  $2.5 \text{ J/cm}^2$ , respectivamente.



**Figura A.2** – Área tumoral relativa no DDE 13 e 17 sem irradiação ( $0 \text{ J/cm}^2$ ).



**Figura A.3** – Área tumoral relativa no DDE 13 e 17 para uma fluência de luz de 2.5 J/cm<sup>2</sup>.

Os resultados mostraram que na ausência de luz, ou seja sem ativação do mTHPC, ocorreu um aumento da área tumoral relativa. Esse aumento foi menor na presença de mTHPC. Por outro lado, com uma fluência de luz de 2.5 J/cm<sup>2</sup>, verificou-se uma diminuição da área tumoral na presença de mTHPC e um aumento de área tumoral na sua ausência. A concentração de mTHPC de 5 µg/ml conduziu a uma maior redução da área tumoral.