UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA ELÉTRICA

Rodrigo Henrique Gounella

Módulo Fotônico para Terapia Fotodinâmica (PDT) em Cápsulas Endoscópicas

São Carlos

2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA DE ENGENHARIA DE SÃO CARLOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA ELÉTRICA

Rodrigo Henrique Gounella

Módulo Fotônico para Terapia Fotodinâmica (PDT) em Cápsulas Endoscópicas

Dissertação apresentada à Escola de Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Pós-graduação da Engenharia Elétrica.

Área de concentração: Processamento de Sinais e Instrumentação.

Orientador: Prof. Dr. João Paulo Pereira do Carmo

São Carlos

2018

Trata-se da versão corrigida da dissertação. A versão original se encontra disponível na EESC/USP que aloja o Programa de Pós-Graduação da Engenharia Elétrica.

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

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Dr. Sérgio Rodrigues Fontes da
EESC/USP com os dados inseridos pelo(a) autor(a).

G711m Gounella, Rodrigo Henrique
Módulo Fotônico para Terapia Fotodinâmica (PDT) em
Cápsulas Endoscópicas / Rodrigo Henrique Gounella;
orientadora João Paulo Pereira do Carmo. São Carlos,
2018.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Elétrica e Área de Concentração em
Processamento de Sinais e Instrumentação -- Escola de
Engenharia de São Carlos da Universidade de São Paulo,
2018.

1. Terapia Fotodinâmica. 2. Cápsulas Endoscópicas.
3. Medicamento Fotossensibilizante . 4. Ácido
5-aminolevulínico (ALA). 5. Complementary
Metal-Oxide-Semiconductor (CMOS). 6. Pulse Width
Modulation (PWM). I. Título.

Eduardo Graziosi Silva - CRB - 8/8907

FOLHA DE JULGAMENTO

Candidato: Bacharel **RODRIGO HENRIQUE GOUNELLA**.

Título da dissertação: "Módulo fotônico para terapia fotodinâmica (PDT) em cápsulas endoscópicas".

Data da defesa: 28/06/2018.

Comissão Julgadora:

Resultado:

Prof. Doutor **João Paulo Pereira do Carmo**
(Orientador)
(Escola de Engenharia de São Carlos/EESC)

APROVADO

Profa. Dra. **Sara Filomena Ribeiro Pimenta**
(Universidade do Minho/Portugal)

APROVADO

Prof. Dr. **Manoel Fernando Ribeiro da Silva**
(Universidade do Minho/Portugal)

APROVADO

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica:
Prof. Associado **Luís Fernando Costa Alberto**

Presidente da Comissão de Pós-Graduação:
Prof. Associado **Luís Fernando Costa Alberto**

Resumo

GOUNELLA, Rodrigo Henrique. **Módulo Fotônico para Terapia Fotodinâmica (PDT) em Cápsulas Endoscópicas**. 2018. 90p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

A cápsula endoscópica é um instrumento revolucionário, que permite a realização de um exame livre de desconfortos para o paciente e possibilitou a técnica de endoscopia chegar a partes do sistema gastrointestinal que antes não era possível, como grande parte do intestino delgado.

Este trabalho apresenta um módulo fotônico para realizar Terapia Fotodinâmica (PDT, *Photodynamic Therapy*) em cápsulas endoscópicas. A PDT é uma forma de tratamento para lesões que envolve a administração prévia de um medicamento fotossensível (PS, *Photosensitizer*) e posterior ativação com irradiação de luz em um comprimento de onda (λ) específico. Geralmente para a ativação do PS utiliza-se λ na região vermelha do espectro visível, pois a penetração nos tecidos é elevada.

Células de adenocarcinoma gástrico humano (AGS, *Adenocarcinoma Gastric of Stomach*) foram preparadas com ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) que é um Pró-fármaco precursor do agente fotossensível Protoporfirina IX (PpIX) com máximo de absorção nos 635 nm. Para realizar a irradiação com luz vermelha nas células, 16 LEDs do modelo LRQ396-P1Q2-1 da Osram Opto Semiconductors com dimensões muito reduzidas foram selecionados, caracterizados, montados em uma PCB (*Printed Circuit Board*) e alimentados por um Arduino Mega 2560. Este sistema de iluminação foi eficaz em seu propósito e causou morte celular nas células submetidas ao tratamento com o ALA em uma concentração de 2 milimol por litro e dose de luz em 5 Joules por centímetro quadrado que resulta em uma exposição de 49 minutos.

Com o objetivo de se construir um módulo para controle de iluminação em cápsulas endoscópicas, foi desenvolvido em tecnologia CMOS 0.7 μm da ON Semiconductor um dispositivo capaz de controlar a intensidade dos LEDs utilizando PWM (*Pulse Width Modulation*). Unindo este componente com os LEDs selecionados é perfeitamente possível construir o módulo e inseri-lo CEs para realizar PDT em locais do trato gastrointestinal (GI) não acessíveis pela endoscopia convencional.

Abstract

GOUNELLA, Rodrigo Henrique. **Módulo Fotônico para Terapia Fotodinâmica (PDT) em Cápsulas Endoscópicas**. 2018. 90p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Elétrica) – Escola de Engenharia de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2018.

The endoscopic capsule is a revolutionary instrument that gives a free examination of discomforts for patient and allows the endoscopic technique to reach parts of the gastrointestinal system that were previously not possible, such as a large part of the small intestine.

This work presents a photonic module to perform Photodynamic Therapy (PDT) in endoscopic capsules. PDT is a form of treatment for injuries involving prior administration of a photosensitive drug (PS, Photosensitizer) and subsequent activation with light irradiation at a specific wavelength (λ). Usually for PS activation, λ is used in the red region of the visible spectrum, because the tissue penetration is high.

Human gastric adenocarcinoma cells (AGS) were prepared with 5-aminolevulinic Acid (5-ALA) which is a Pro-drug precursor of the photosensitive agent Protoporphyrin IX (PpIX) with maximum absorption at 635 nm. To perform red light irradiation on the cells, 16 LEDs, model LRQ396-P1Q2-1 of the Osram Opto Semiconductors with very small dimensions were selected, characterized, mounted on a PCB (Printed Circuit Board) and powered by an Arduino Mega 2560. This system was effective in its purpose and caused cell death in cells treated with ALA at a concentration of 2 mMol/L and dose of light at 5 J/cm² resulting in a 49 minutes exposure.

With the objective of build a module for control of lighting in endoscopic capsules, a device able to controlling the intensity of the LEDs using PWM (Pulse Width Modulation) was developed in CMOS technology 0.7 μ m of the ON Semiconductor. Combining this component with the selected LEDs, it is perfectly possible to construct the module and insert in CEs to perform PDT at sites of the gastrointestinal tract (GI) not accessible by conventional endoscopy.

Lista de Figuras

Figura 1 - Endoscópio flexível de fibra óptica desenvolvido por Curtiss e Hirschowitz [5].	3
Figura 2 - Alcance da endoscopia convencional [12]. (a) EDA. (b) Colonoscopia.	7
Figura 3 - Áreas de alcance da cápsula endoscópica.	7
Figura 4 - Componentes que constituem uma CE [14], [15]: 1) Redoma óptica; 2) Suporte da lente; 3) Lente; 4) LEDs de luz branca; 5) Sensor de imagem; 6) Baterias; 7) Transmissor por radiofrequência; 8) antena.	8
Figura 5 - Ilustração da CE no interior do intestino, dos sensores no abdômen do paciente e do cinto com o dispositivo de armazenamento portátil na cintura do paciente [16].	8
Figura 6 - Visão do presidente da companhia Olympus com as perspectivas de evolução (<i>roadmap</i>) das funções suportadas pelas cápsulas endoscópicas do futuro [14].	10
Figura 7 - Mecanismos de locomoção interna propostos por: (a) Valdastrì et al. [24]; (b) Kim et al. [25]; (c) Kim et al. [26].	11
Figura 8 - Protótipo da cápsula desenvolvida por Glass et al. com os adesivos de elastômero [27].	11
Figura 9 - Cápsula similar ao submarino desenvolvida por Tortora et al. [28].	12
Figura 10 - (a) Cápsula endoscópica modificada com a inclusão de pequenos magnetos permanentes. (b) Interruptor de radiofrequência usado na ativação da cápsula [29].	13
Figura 11 - Infraestrutura magnética ativa para a locomoção de CEs [32].	16
Figura 12 - Princípios básicos de funcionamento da PDT, com administração intravenosa do PS [49].	17
Figura 13 - Linha do tempo com os principais acontecimentos na história da PDT [21].	20
Figura 14 - Geração de estados excitados e espécies reativas de oxigênio (ROS) [49].	22
Figura 15 - Biossíntese do Heme [64].	26
Figura 16 - Profundidade de Penetração da luz na pele, em vários comprimentos de onda [75].	31
Figura 17 - Fotografia do LED Osram LRQ396-P1Q2-1 [76].	33
Figura 18 - Espectrômetro USB4000 da Ocean Optics [77].	34
Figura 19 - Ilustração do funcionamento do espectrômetro USB4000 [77].	34
Figura 20 - Assinatura Espectral do LED LRQ396-P1Q2-1.	35
Figura 21 - Placas com os 16 LEDs da Osram.	36

Figura 22 - Sistema de iluminação para a realização de PDT. (a) Componentes do sistema. (b) Sistema montado sem a placa de 96 poços. (c) Sistema montado com a placa de 96 poços.	37
Figura 23 - Fotografia do sistema de iluminação. (a) Sem a placa de 96 poços. (b) Com a placa de 96 poços.	38
Figura 24 - AGS aumentada em 10x (BCRJ, código 0311) [78].	38
Figura 25 - Câmara de Neubauer com todas as possíveis áreas de contagem. Devido ao tamanho das células, apenas os quadrantes 1 foram utilizados.	39
Figura 26 - Imagens obtidas por meio de microscopia de fluorescência mostrando a produção de PpIX.	41
Figura 27 - histogramas de citometria de fluxo no canal FL-3. Grupos I) controle, II) ALA 0.5 mM, III) ALA 1 mM e IV) ALA 2 mM. Células exibindo apenas autofluorescência (PpIX-) estão marcadas em preto, e células apresentando elevada fluorescência de PpIX (PpIX+) estão marcadas em vermelho.	42
Figura 28 - Preparo da placa de 96 poços para determinação da concentração de ALA e dose de luz.	42
Figura 29 - Fonte de luz desenvolvida no LAT do IFSC na USP [79].	43
Figura 30 - Protocolo experimental para os ensaios de PDT.	44
Figura 31 - Resultados obtidos dos ensaios de PDT com o sistema de iluminação do LAT.	44
Figura 32 - Configuração da placa de 96 poços utilizada no experimento de avaliação da PDT.	45
Figura 33 - Resultados obtidos dos ensaios de PDT com o sistema de iluminação desenvolvido neste trabalho.	46
Figura 34 - Sinal PWM para vários ciclos de trabalho [80]. (a) 10%. (b) 50%. (c) 90%.	48
Figura 35 - Símbolo utilizado para o Inversor.	49
Figura 36 - Inversor em CMOS.	49
Figura 37 - Símbolo da porta lógica NOR.	50
Figura 38 - Porta NOR em CMOS.	50
Figura 39 - Símbolo da porta lógica NAND.	51
Figura 40 - Porta NAND em CMOS.	52
Figura 41 - Símbolo da porta NAND com 3 entradas.	53
Figura 42 - Porta NAND de três entradas em CMOS.	53
Figura 43 - Símbolo da porta XOR.	54

Figura 44 - Porta XOR construída em CMOS utilizando portas lógicas NAND.	55
Figura 45 - <i>Latch</i> implementado com portas NAND.	55
Figura 46 - Flip-flop D <i>edge-triggered</i>	56
Figura 47 - Diagrama de blocos do controlador eletrônico para o módulo PDT.	57
Figura 48 - Resultados obtidos a partir de simulação.	58
Figura 49 - CNT 1.	59
Figura 50 - CNT 2.	59
Figura 51 - <i>Flip-flop</i> projetado para CNT 2.	60
Figura 52 - Bloco 1 do sistema de controle de iluminação.	60
Figura 53 - Comparador de 4 bits.	61
Figura 54 - PCB fabricada para testar o módulo PWM.	62
Figura 55 - Resultados obtidos experimentalmente.	63
Figura 56 - (a) O <i>layout</i> do microdispositivo completo contendo o controlador (preenchido por uma sombra amarela). (b) Fotografia do microdispositivo completo contendo o controlador (preenchido por uma sombra amarela). (c) <i>Zoom</i> na região do controlador (preenchido por uma sombra amarela).	64
Figura 57 - Modelo de cápsula com microdispositivo integrado.	66
Figura 58 - Ilustração do modelo de sistema de iluminação com as lentes de PDMS.	67

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Destaques da era dourada da endoscopia gastrointestinal [6].....	4
Tabela 2 - Tabela com as principais características de algumas cápsulas endoscópicas sem fio comercialmente disponíveis [9].	6
Tabela 3 - Principais características de alguns PSs disponíveis comercialmente ou em testes clínicos [49], [60], [62].	25
Tabela 4 - Tabela verdade para o Inversor.....	50
Tabela 5 - Tabela verdade para função lógica NOR.	51
Tabela 6 - Tabela verdade para função lógica NAND.....	52
Tabela 7 - Tabela verdade para função lógica NAND de 3 entradas.....	54
Tabela 8 - Tabela verdade para função lógica XOR.....	54
Tabela 9 - Tabela verdade para a Latch SR com portas NAND.	56

Abreviaturas

5-ALA	Ácido 5-aminolevulínico
ABS	Acrilonitrila butadieno estireno
AGS	<i>Adenocarcinoma Gastric of Stomach</i>
ALAD	<i>ALA dehydratase</i>
ALAS	<i>ALA synthase</i>
ASIC	<i>Application-Specific Integrated Circuit</i>
CAD	<i>Computer Aided Design</i>
CCD	<i>Charge-Coupled Device</i>
CE	Cápsula Endoscópica
CLE	<i>Confocal Laser Endomicroscopy</i>
CLK	<i>Clock</i>
CMOS	<i>Complementary Metal-Oxide-Semiconductor</i>
CPO	<i>coproporphyrinogen oxidase</i>
DC	<i>Direct Current</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EDA	Endoscopia Digestiva Alta
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
EPM	<i>External Permanent Magnet</i>
EUA	Estados Unidos da América
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FECH	<i>ferrochelataze</i>
Fps	<i>Frames per Second</i>
FWHM	<i>Full Width Half Maximum</i>
GI	Gastrointestinal
HMB	<i>hydroxymethylbilane</i>
HpD	<i>Hematoporphyrin Derivative</i>
HOMO	<i>Highest Occupied Molecular Orbital</i>
IPM	<i>Internal Permanent Magnet</i>

ISC	<i>Intersystem Crossing</i>
LASER	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
LED	Light-Emitting Diode
LUMO	<i>Lowest Unoccupied Molecular Orbital</i>
M2A	<i>Mouth to Anus</i>
MATLAB	<i>Matrix Laboratory</i>
MOSFET	<i>Metal-Oxide-Semiconductor Field-Effect Transistor</i>
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NAND	<i>Not And</i>
NBI	<i>Narrow Band Imaging</i>
Nd:YAG	<i>Neodymium-Doped Yttrium Aluminium Garnet</i>
NMOS	<i>N-type Metal-Oxide-Semiconductor</i>
NOR	<i>Not Or</i>
PBG	<i>porphobilinogen</i>
PBGD	<i>porphobilinogen deaminase</i>
PBGS	<i>porphobilinogen synthase</i>
PBR	<i>peripheral-type benzodiazepine receptors</i>
PCB	<i>Printed Circuit Board</i>
PDT	<i>Photodynamic Therapy</i>
PDMS	Polidimetilsiloxano
PpIX	protoporfirina IX
PPO	<i>protoporphyrinogen oxidase</i>
PWM	<i>Pulse Width Modulation</i>
PS	<i>Photosensitizer</i>
PMOS	<i>P-type Metal-Oxide-Semiconductor</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
S0	Estado Fundamental Singleto
S1	Estado Excitado Singleto
SB	<i>Small Bowel</i>
SFB	Soro Fetal Bovino

SMT	<i>Surface-Mount Technology</i>
T1	Estado Excitado Tripleteo
TL	Tecido Lesionado
URO3S	<i>uroporphyrinogen III synthase</i>
UROD	<i>uroporphyrinogen decarboxylase</i>
USB	<i>Universal Serial Bus</i>
UV	Ultravioleta
WCE	<i>Wireless Capsule Endoscopy</i>
XOR	<i>Exclusive Or</i>

Sumário

Resumo.....	I
Abstract	II
Lista de Figuras	III
Lista de Tabelas	VI
Abreviaturas	VII
Capítulo 1	1
1. Introdução	1
2. Técnicas Endoscópicas.....	1
3. Procedimentos	6
4. Novas Funções	9
4.1 Controle de mobilidade e posição.....	10
4.2 NBI	14
4.3 CLE.....	14
4.4 PDT.....	15
5. Motivação.....	15
Capítulo 2	17
1. Terapia Fotodinâmica (PDT)	17
2. Estado da Arte	18
3. Técnica	21
4. Medicamentos fotossensibilizantes	23
4.1 Metabolismo do ALA	26
5. Dosimetria	28
6. Adenocarcinoma gástrico humano	30
Capítulo 3	31

1.	Interação da luz com os tecidos biológicos	31
2.	Fontes de luz	32
3.	Caracterização da Fonte Luminosa.....	33
4.	Sistema de iluminação para avaliação da capacidade de realizar PDT	36
5.	Preparo das células para realização de PDT	38
Capítulo 4		47
1.	<i>Pulse Width Modulation</i> (PWM).....	47
2.	Blocos digitais básicos.....	48
2.1	Inversor (NOT).....	49
2.2	Porta OU Negado (NOR)	50
2.3	Porta E Negado (NAND)	51
2.4	Porta OU Exclusivo (XOR).....	54
2.5	<i>Latch</i>	55
2.6	<i>Flip-flop</i> tipo D (<i>Data</i>).....	56
3.	Sistema de controle de iluminação	57
3.1	Contador de 4 <i>bits</i>	59
3.2	Bloco 1	60
3.3	Comparador de 4 bits	61
4.	Validação do sistema de controle de iluminação por PWM.....	62
Capítulo 5		65
1.	Conclusões.....	65
2.	Trabalhos Futuros	66
Referências		68

Capítulo 1

1. Introdução

O reconhecimento de doenças que comprometem o sistema gastrointestinal (GI) como, por exemplo, hemorragias, úlceras e tumores em suas etapas iniciais é crucial, porém, de nenhuma forma é simples. Quando detectadas precocemente, aumentam as chances de serem controladas e até mesmo curadas, caso contrário, tornam-se disfunções gravíssimas e muitas vezes laterais [1].

Para realizar a observação, o diagnóstico e, em alguns casos, o tratamento de tais patologias mencionadas, o método escolhido, na grande maioria das vezes, é a chamada endoscopia convencional, mas este tipo de procedimento, mesmo com todo o avanço da tecnologia, ainda é agressivo, causa dor aos pacientes, necessita de anestesia e aumenta as chances de perfuração do intestino. Além destes problemas, o método não é capaz de visualizar por completo o sistema gastrointestinal, deixando regiões como zonas por visualizar e grande parte do intestino delgado estão nestas zonas [1]. Por este motivo, é preciso então, procurar por outro tipo de procedimento, que consiga visualizar o intestino delgado e também melhorar a análise do cólon [2]. Neste contexto, a cápsula endoscópica (CE ou EC, *Endoscopic Capsule*) introduzida em 2000 revolucionou a gastroenterologia, promovendo uma nova perspectiva do interior do trato gastrointestinal que anteriormente só poderia ser acessado através de procedimentos cirúrgicos (é o caso de certas partes do intestino delgado) [3]. Analisando os limites da endoscopia convencional, a cápsula endoscópica (CE) passa a ser um método de primeira linha para analisar todo o trato GI.

Este capítulo introduz as técnicas endoscópicas descrevendo o aperfeiçoamento da endoscopia, formas para o controle de posicionamento da cápsula endoscópica e novas funcionalidades que podem ser incorporadas na mesma com foco na Terapia Fotodinâmica (PDT, *Photodynamic Therapy*). Posteriormente é descrita a motivação e os objetivos.

2. Técnicas Endoscópicas

Os indícios dos primeiros procedimentos endoscópicos datam 2500 anos, no período clássico da Grécia antiga foram desenvolvidos os primeiros instrumentos para a visualização do reto e da vagina [4].

Durante muito tempo as técnicas endoscópicas não evoluíram, até que no início de século XIX, o obstetra alemão Phillip Bozzini foi o responsável pelo maior avanço relacionado às técnicas endoscópicas. Em 1806, Bozzini construiu um funil fino alongado, com uma fonte de luz oriunda de uma vela de cera de abelha e um espelho de prata que possibilitava a reflexão da luz e protegia os olhos do utilizador. Este instrumento foi batizado com o nome de “*Lichtleiter*”, que significa condutor de luz, e foi apresentado na Faculdade de Medicina de Viena. Na ocasião, Bozzini foi ridicularizado, pois seu equipamento era perigoso e não possuía iluminação suficiente [5].

Embora o desenvolvimento do “*Lichtleiter*” de Bozzini tenha sido inibido, ele havia lançado as bases para que outros pudessem continuar e construir equipamentos mais sofisticados. Pierre Ségalas e John D. Fisher criaram instrumentos baseados no “*Lichtleiter*”, mas também não alcançaram resultados satisfatórios. Só em 1853 que Antonin J. Desormeaux, considerado o “pai da citoscopia”, construiu um “*Lichtleiter*” aperfeiçoado e foi o primeiro a introduzi-lo dentro de um paciente. Desormeaux foi quem inventou o termo endoscopia [5].

O próximo grande marco na história da endoscopia veio com Maximilian Nitze. Ele começou a trabalhar com Wilhelm Deicke e Louis Beneche, técnicos de óptica da Universidade de Berlim. Eles produziram um cistoscópio, que funcionava como uma miniatura de um telescópio ampliando a imagem da bexiga e continha um sistema de iluminação inventado por Julius Bruck em 1867. Nitze se mudou para Viena em 1878 e junto com Joseph Leiter construiu o citoscópio que foi apresentado em 1879 [5].

Em 1880, Thomas Edison inventou a lâmpada incandescente, tal feito resolveu o problema de iluminação do citoscópio de Nitze e Leiter e também não causava danos no interior da bexiga por queimaduras [5].

A contribuição mais importante para a endoscopia desde Nitze aconteceu em 1889 quando Boisseau du Rocher separou o citoscópio em dois componentes. Este endoscópio era grande o suficiente para ter canais dentro do involucro, de modo que os cateteres poderiam ser introduzidos na bexiga ou a bexiga poderia ser irrigada [5].

Até o presente momento, apenas equipamentos rígidos foram apresentados, mas enquanto o desenvolvimento da endoscopia continuava, os pesquisadores começaram a pensar em maneiras

Tabela 1 - Destaques da era dourada da endoscopia gastrointestinal [6].

1968	Pancreatografia retrógrada endoscópica
1969	Polipectomia colonoscópica
1970	Colangiografia retrógrada endoscópica
1974	Esfincterotomia endoscópica (com extração de pedras de dutos biliares)
1979	Gastrostomia endoscópica percutânea
1980	Escleroterapia endoscópica por injeção
1980	Ultrassonografia endoscópica
1983	Endoscópio eletrônico CCD
1985	Controle endoscópico de hemorragia digestiva alta
1990	Ligadura elástica endoscópica

A evolução da instrumentação endoscópica acompanhou o desenvolvimento da tecnologia, o que possibilitou a criação de novas técnicas e a sofisticação das já existentes. Hoje, os endoscópios utilizados para examinar o trato GI são constituídos de três partes: o manete de controle, o tubo de inserção e o conector. Com o manete de controle é possível controlar a ponta do instrumento, o tubo de inserção consiste em um tubo flexível anexado à seção de controle, em sua ponta está um sensor CCD ou CMOS (*Complementary Metal-Oxide-Semiconductor*) para geração de imagens, um sistema de iluminação, canais de saída de água ou ar e um jato de água para limpar a lente do tubo. Por fim, o conector proporciona a ligação entre o endoscópio e a torre endoscópica que é normalmente composta por um processador de imagem e fontes de luz branca, de ar ou dióxido de carbono (CO₂) e de água [7].

Em 1981, a primeira cápsula endoscópica que conseguia captar imagens de todo o sistema GI foi desenvolvida por Gavriel Iddan, mas devido ao seu tamanho, ela não era possível de ser engolida, pois havia muitas limitações tecnológicas para se conseguir criar um equipamento menor [3].

A disponibilidade de sensores de imagem miniaturizados de baixa potência e temperatura baseados em tecnologia CMOS, ASIC (*Application-Specific Integrated Circuits*) e LEDs (*Light-Emitting Diodes*) minimizados permitiram a criação de uma pílula sem fio que continha uma câmera e um tamanho que permitia ser engolida. De fato, em 2000 a Given Imaging Inc. (Yoqneam, Israel), graças às patentes de G. Iddan, introduziu a endoscopia por cápsula sem fio (WCE, *Wireless Capsule Endoscopy*). A WCE permite a inspeção do sistema digestivo sem

desconforto ou necessidade de sedação, prevenindo assim os riscos da endoscopia convencional [3].

Em 2001, a primeira cápsula batizada de M2A (*Mouth to Anus*) e desenvolvida pela Given Imaging Inc., foi aprovada pela FDA (*Food and Drug Administration*) como uma ferramenta complementar para imagens de intestino delgado. Em 2003 foi aprovada para imagens de primeira linha e seu nome foi alterado para PillCam SB (*Small Bowel*) [3], [8]. A M2A media 11 milímetros de diâmetro e 26 milímetros de comprimento, incluía quatro LEDs, câmera colorida, duas baterias, um transmissor de rádio frequência em 434.09 MHz e uma antena em CMOS [8].

Sua sucessora mais recente, a PillCam SB2 também criada pela Given Imaging Inc. coleta mais de 50 mil imagens digitais durante a vida útil da bateria, que é de aproximadamente 8 horas, a 2 quadros por segundo (fps, *frames per second*) e pode visualizar objetos menores que 0,1 mm com um campo de visão de 156° [8].

Inicialmente projetada para a investigação do intestino delgado, a CE se espalhou para outros distritos do sistema GI. A Given Imaging Inc. produziu cápsulas de cabeça dupla, ou seja, com câmeras nas duas extremidades para a inspeção do esôfago (PillCam ESO) e do cólon (PillCam COLON). Com o avanço desta tecnologia, até 2009 mais de 750 mil pacientes já tinham sido submetidos à CE em ensaios clínicos e várias outras empresas entraram neste mercado, como a Olympus Medical Systems Corp. (Tóquio, Japão) com a cápsula EndoCapsule, Chongqing Jinshan Science and Technology (Chongqing, China) com a cápsula OMOM e Intromedic Co. (Seul, Coreia do Sul) com a cápsula MiRo [3]. As principais características de algumas cápsulas disponíveis comercialmente estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 - Tabela com as principais características de algumas cápsulas endoscópicas sem fio comercialmente disponíveis [9].

Nome	PillCam SB2	EndoCapsule	Miro Cam	OMOM	PillCam Colon 2	PillCam ESO2
Foto
Diâmetro (mm)	11	11	11	13	11,6	11
Comprimento (mm)	26	26	24	27,9	31,5	26
Peso (g)	3,4	3,8	3,4	6	2,9	3,4
Quadros por Segundo (fps)	2	2	3	0,5 - 2	4 - 35	18
Sensor de Imagem	CMOS	CCD	CCD	CCD	CMOS	CMOS
Ângulo de Visão	156°	145°	150°	140°	2 x 172°	2 x 156°
Iluminação (LEDs Brancos)	6	6	6	6	2 x 6	2 x 6
Antenas	8	8	9	14	8	8
Visualização em Tempo Real	RT viewer	VE -1 viewer	Microviewer	RT monitoring	Não	Não
Tempo de gravação (h)	8	9	11	7 - 9	10	0,5
Aprovação pela FDA	Sim (2005)	Sim (2007)	Não	Não	Não	Sim (2007)

3. Procedimentos

A técnica de endoscopia do sistema GI divide-se em endoscopia digestiva alta (EDA) e endoscopia digestiva baixa, comumente chamada de colonoscopia. A EDA permite a visualização da parte superior do sistema GI, incluindo esôfago, estômago e duodeno (primeira porção do intestino delgado) e a Colonoscopia é responsável pela visualização de todo o cólon [10], [11].

Na Figura 2 está apresentada uma ilustração da endoscopia digestiva alta e da endoscopia digestiva baixa.

Figura 2 - Alcance da endoscopia convencional [12]. (a) EDA. (b) Colonoscopia.

Pode-se notar na Figura 2 (a) e (b) que há uma grande região inacessível ao procedimento endoscópico. Esta restrição limita a possibilidade de detectar as anomalias mais comuns como sangramentos, úlceras e tumores, enquanto estão nas fases iniciais. Dessa maneira perde-se a oportunidade de controlar ou até curar doenças antes que haja a necessidade de recorrer-se a tratamentos complexos [1].

As limitações relacionadas a este exame incluem o uso de anestesia, a ocorrência de hemorragias, perfurações e as biópsias são realizadas exteriormente, o que faz com que, junto com o resultado da biópsia, seja necessária a realização de uma nova endoscopia para terapia da patologia [9].

Neste contexto, buscando explorar as partes do intestino delgado que não são visíveis na endoscopia convencional e minimizar as limitações antes descritas, na Figura 3 está apresentada uma ilustração do alcance da CE no intestino delgado.

Figura 3 - Áreas de alcance da cápsula endoscópica.

Conforme ilustrado na Figura 4, a CE é um dispositivo biomédico de reduzidas dimensões (26 mm de comprimento por 11 mm de diâmetro) semelhante a um comprimido. Ela incorpora uma câmara, sistema de iluminação e transmissão sem fios. A CE é um ótimo instrumento para observação e avaliação do sistema GI, principalmente indicada para o intestino delgado no caso de hemorragia GI oculta e no caso da doença de Crohn (associada à doença inflamatória do intestino) [8], [13].

Figura 4 - Componentes que constituem uma CE [14], [15]: 1) Redoma óptica; 2) Suporte da lente; 3) Lente; 4) LEDs de luz branca; 5) Sensor de imagem; 6) Baterias; 7) Transmissor por radiofrequência; 8) antena.

O equipamento que permite realizar o exame com cápsulas endoscópicas é constituído pela própria CE, sensores, dispositivo de armazenamento portátil energizado por baterias e uma estação de trabalho onde está o computador com o software específico. Os sensores são posicionados no tórax e abdômen do paciente e o dispositivo de armazenamento é inserido em um cinto preso à cintura do paciente (Figura 5) [9], [16], [17].

Figura 5 - Ilustração da CE no interior do intestino, dos sensores no abdômen do paciente e do cinto com o dispositivo de armazenamento portátil na cintura do paciente [16].

A CE é engolida com água e se movimenta no interior do sistema GI através dos movimentos peristálticos a uma taxa entre 1 e 2 centímetros por minuto [9]. Depois de começado o exame, o paciente pode retornar para as suas atividades normais, mas evitando exercício físico intenso. Após 2 horas da ingestão da CE o paciente pode ingerir líquidos e após 4 horas, pode ingerir comida ou medicamentos [18]. O tempo que a CE demora a percorrer o sistema GI é de aproximadamente 8 a 10 horas e é durante sua jornada que as imagens vão sendo coletadas (por exemplo, via Rádio Frequência) pelos sensores colocados no paciente [9]. Após esse período, o paciente retorna para entregar os sensores e o dispositivo de armazenamento para que as imagens sejam armazenadas em um computador e analisadas através de um software específico [16], [17]. A CE é excretada naturalmente após um período de aproximadamente 10 a 48 horas [2].

4. Novas Funções

A locomoção da CE no interior do sistema GI é passiva, ou seja, ocorre de acordo com a mobilidade natural condicionada pelo organismo do paciente [1]. Entretanto, têm sido publicadas abordagens para o controle da sua locomoção utilizando uma plataforma que controla a posição da CE através do campo magnético, essa solução não altera as dimensões da cápsula e é composta por um magneto superior segurado por um braço articulado controlado pelo médico ou pelo técnico responsável. Assim, é possível obter uma maior quantidade de imagens com a CE em locais patológicos do trato gastrointestinal [19]. O controle dos movimentos da CE permite que novas funcionalidades sejam incorporadas na cápsula, como, por exemplo, a tecnologia NBI (*Narrow-Band Imaging*) [20], a terapia fotodinâmica (PDT) [21] e endomicroscopia confocal (CLE, *Confocal Laser Endomicroscopy*) [22]. De acordo com a Figura 6, a integração destas técnicas vai justamente de encontro à visão pessoal do presidente da companhia Olympus (Mr. I. Shimoyama) com as perspectivas de evolução (*roadmap*) das funções suportadas pelas cápsulas endoscópicas do futuro, visão esta partilhada com o público pela primeira vez, no *11th World MicroMachine Summit* [23]. De fato, a Figura 6 ilustra o rápido crescimento do uso de cápsulas endoscópicas, comparativamente com a endoscopia convencional. É interessante observar que a taxa de crescimento está diretamente relacionada com o número de funções possíveis de serem integradas na cápsula endoscópica. Portanto, é fato inegável que hoje em dia, a capacidade de diagnóstico na endoscopia convencional pode ser melhorada através de novas aplicações.

Figura 6 - Visão do presidente da companhia Olympus com as perspectivas de evolução (*roadmap*) das funções suportadas pelas cápsulas endoscópicas do futuro [14].

4.1 Controle de mobilidade e posição.

Grande parte das pesquisas relacionadas com cápsulas endoscópicas estão focadas na locomoção ativa da cápsula, com o objetivo de proporcionar o controle da posição e locomoção da CE ao médico gastroenterologista. A locomoção ativa possibilita o controle remoto da condução do dispositivo em direção a áreas suspeitas. Com isso, viabiliza que os procedimentos terapêuticos e cirúrgicos possam ser executados por cápsulas.

Duas abordagens podem ser utilizadas para a locomoção da CE: locomoção interna, ou seja, todos os componentes que permitem a locomoção estão localizados no interior da cápsula; e locomoção externa, onde as forças e torques são transmitidos para a cápsula externamente, geralmente por campo magnético.

Os primeiros trabalhos que propunham mecanismos de locomoção para a CE foram introduzidos por Valdastrì et al. [24], Kim et al. [25], e Kim et al. [26]. Eles apresentaram sistemas que utilizam micromotores, engrenagens e roscas que concediam movimento para a CE (Figura 7). No entanto, como são difíceis de miniaturizar e consomem muita energia, estes mecanismos não foram aplicados às cápsulas atuais.

Figura 7 - Mecanismos de locomoção interna propostos por: (a) Valdastrì et al. [24]; (b) Kim et al. [25]; (c) Kim et al. [26].

Em 2008, Glass et al. [27] apresentou um dispositivo que possibilita a fixação da cápsula à parede intestinal. Este dispositivo é formado por três hastes, que funcionam como atuadores, revestidas com adesivos de elastômeros inspirados nas patas das lagartixas (Figura 8). São projetados para aguentar as forças axiais peristálticas, permitindo que a cápsula fique parada em um local. Estes adesivos permitem uma nova perspectiva para fixação da cápsula que, até então, era baseada em ganchos metálicos afiados.

Figura 8 - Protótipo da cápsula desenvolvida por Glass et al. com os adesivos de elastômero [27].

Diferentemente do intestino e do esôfago, o estômago é uma cavidade grande e colapsada que exige uma locomoção em 3D. Esta condição fez com que se desenvolvesse uma cápsula com funcionamento similar ao de um submarino que é engolida pelo paciente depois de ingerir 1 litro de água que permanece no estômago por aproximadamente 30 minutos. Projetada por Tortora et al. [28] esta cápsula funciona com quatro hélices independentes comandadas por motores DC

(*Direct Current*) anexados no equipamento, sendo que a velocidade e direção da cápsula são controlados externamente por um manete (Figura 9).

Figura 9 - Cápsula similar ao submarino desenvolvida por Tortora et al. [28].

Mesmo que a locomoção interna contenha vantagens consideráveis, como a distensão local de tecido a partir da cápsula e a ausência de interferências devido às forças do campo magnético, esta abordagem apresenta desvantagens associadas com a presença de atuadores, mecanismos de transmissão e módulos de potência que levam a um excessivo número de componentes internos, tornando difícil a redução do tamanho da cápsula [3].

A locomoção por propulsão externa tem sido a abordagem mais promissora para locomoção da CE, pois promete diminuir o número de componentes internos. Então, pode ter um caminho mais rápido para a aplicação clínica, visto que não requer o desenvolvimento de atuadores e mecanismos de tamanhos reduzidos. Para se atingir tal propulsão externa, comumente são aplicados campos magnéticos externos que interagem com componentes magnéticos no interior da CE. Para isso, cria-se um grande campo magnético externo ao paciente por meio de eletromagnetos ou magnetos permanentes e um pequeno campo magnético no interior da CE. A interação entre o pequeno campo magnético interno e o grande campo magnético externo produz forças e torques que atuam diretamente na cápsula. Esta abordagem substitui atuadores internos, mecanismos e baterias, por um pequeno magneto interno [3], [9]. A aplicação de eletromagnetos como geradores de campo magnético externo proporciona um melhor controle do campo, mas exigem equipamentos maiores em comparação com os magnetos permanentes externos. Um dos problemas relacionados à locomoção magnética é estimar as dimensões das fontes de campo

magnético necessárias para alcançar as forças e os torques suficientes, permitindo o controle eficiente e confiável da CE no interior do trato GI [3].

A Given Imaging utilizou uma versão modificada da PillCam Colon para testar a viabilidade de um magneto externo portátil no controle de orientação da cápsula no interior do trato GI. Metade da cápsula era preenchida com pequenos magnetos permanentes (Figura 10). Este trabalho demonstrou a possibilidade e se aplicar a locomoção magnética, contudo também revelou a necessidade de se realizar mais investigação para aumentar a confiabilidade e precisão do controle magnético [29].

Figura 10 - (a) Cápsula endoscópica modificada com a inclusão de pequenos magnetos permanentes. (b) Interruptor de radiofrequência usado na ativação da cápsula [29].

A Olympus Inc. em cooperação com a Siemens Healthcare criou uma nova tecnologia de locomoção magnética da CE. O sistema é formado por uma cápsula da Olympus Inc. e um mecanismo de guia magnético da Siemens constituído por equipamentos de ressonância magnética e tomografia computadorizada. O controle da CE é feito pelo médico através de dois manetes e pode ser movida no estômago com cinco graus de liberdade [30].

Silva et al. [31], [32] apresentaram uma infraestrutura magnética para locomoção ativa da CE que tem como base a incorporação de um pequeno magneto interno (IPM, *Internal Permanent Magnet*) na cápsula e o controle dos movimentos por campo magnético através de um magneto externo (EPM, *External Permanent Magnet*) instalado em um braço articulado que facilita seu manuseio.

Ciuti et al. [33] e Capri et al. [34], [35] também apresentaram um sistema de controle magnético da CE incorporada com pequenos magnetos permanentes e utilizando um braço

robótico ou de um equipamento convencional de estereotaxia. No mecanismo proposto, os magnetos externos são anexados ao braço robótico ou ao equipamento de estereotaxia.

4.2 NBI

A tecnologia NBI surge da necessidade de detecção de lesões indetectáveis pela luz branca. O NBI utiliza duas bandas espectrais específicas de iluminação centradas no azul (415 nm) e no verde (540 nm) [36]. A aplicação de bandas espectrais específicas e fortemente absorvidas pela hemoglobina permite realçar os vasos subjacentes na mucosa, que apresentam diferentes padrões na presença de patologia. A luz azul (415 nm) penetra na mucosa superficialmente e é principalmente absorvida pela hemoglobina, realçando assim os vasos capilares (veias). A luz verde (540 nm) penetra mais profundamente na mucosa, e os vasos subepiteliais ficam expostos. Combinando as duas imagens com estas iluminações, obtém-se uma imagem de alto contraste da superfície da mucosa. Com o NBI é possível obter diagnósticos precisos, evitando assim, o recurso à tradicional biópsia. Além disso, o NBI evita o uso de corantes para realçar as estruturas vasculares superficiais da mucosa [37]. Foi já comprovado que o NBI aumenta a capacidade de diagnóstico de diversas patologias, permite a classificação de padrões característicos do esôfago de Barrett [38], colite ulcerosa [39] e caracterização em tempo real da histologia de pólipos [40], [41].

4.3 CLE

A endomicroscopia confocal é uma técnica de aquisição de imagens que permite seccionar de forma óptica o tecido biológico para obter imagens *in-vivo*, em tempo real com elevada resolução e grande ampliação. Este método permite assinalar características morfológicas dos tecidos e células, assim como, detectar alterações bioquímicas e moleculares, permitindo quase um exame histológico da camada superficial do tubo digestivo [42]. Na endomicroscopia é possível este tipo de análise pormenorizada da mucosa sem necessidade de lesão dos tecidos, além de permitir uma visualização com profundidade, abaixo da superfície dos tecidos, pois tira partido da penetração da luz em profundidade e aplicação da luz incidente e luz refletida no mesmo plano focal. Tipicamente os casos de cancro no sistema gastrointestinal têm origem em células anormais na camada epitelial. Este método de aquisição de imagens permite a detecção destas células antes de penetrarem na camada basal, permitindo um diagnóstico precoce [43]. Para melhor observação das estruturas é essencial a administração de agentes de fluorescência

externos aos pacientes. A fluoresceína sódica é a substância mais usada e é aplicada via injeção intravenosa, distribuindo-se posteriormente pelo sistema sanguíneo para se fixar nas estruturas celulares [44]. Com a aplicação desta técnica, bons resultados na caracterização histológica de diversas patologias foram obtidos, como é o cancro colorretal [45] esôfago de Barrett [46], [47] e doença inflamatória do intestino [42], [47].

4.4 PDT

A terapia fotodinâmica é uma técnica óptica de tratamento que tem sido aplicada ao trato gastrointestinal. O seu funcionamento baseia-se na aplicação de um fármaco fotossensível ao paciente, que após determinado tempo de atuação é absorvido pelas células cancerígenas (CCs). A aplicação de luz com potência e comprimentos de onda (λ) específicos no local a tratar permite a ativação deste fármaco [48]. Normalmente é utilizada luz na gama do vermelho ($\lambda > 600$ nm), pois na região referida, a penetração no tecido é maior, mas diferentes fármacos reagem a diferentes comprimentos de onda. A ativação do fármaco induz a formação de radicais livres de oxigênio, que provocam danos a nível celular nos tecidos tumorais [21]. Este tipo de tratamento tem sido aplicado com sucesso em diferentes patologias gastrointestinais, por exemplo, cancro esofágico [48], [49]; esôfago de Barret [49], [50], pólipos colorretais [51], entre outras. É uma terapia pouco invasiva, pois a irradiação é limitada ao local do tumor, apresenta baixa toxicidade sistêmica e destruição seletiva de tumores, devido à localização preferencial do fármaco fotossensível no tumor.

5. Motivação

O avanço da endoscopia por cápsulas endoscópicas mudou significativamente a técnica endoscópica de modo geral, pois possibilitou o desenvolvimento de um exame que é muito mais confortável para os pacientes, não causando dor, sem necessidade de administração de anestesia e abrindo novos horizontes como a visualização de partes do intestino que antes não era possível.

Normalmente, a CE se movimenta dentro do sistema GI influenciada apenas pelos movimentos peristálticos, mas, como apresentado anteriormente, o desenvolvimento de um módulo de locomoção magnética, permitindo o controle de posição da CE, mostrado na Figura 11, permite a incorporação de novas funcionalidades neste dispositivo, e dentre estas funcionalidades está o módulo fotônico para terapia fotodinâmica (PDT).

Figura 11 - Infraestrutura magnética ativa para a locomoção de CEs [32].

Outro fator que acrescenta na construção de cápsulas cada vez mais completas é a tecnologia CMOS, possibilitando a fabricação de um microdispositivo integrado com sistema de controle de iluminação, transmissor e receptor de rádio frequência ou óptico, sensor de imagem e drivers de potência.

Neste contexto, pretende-se construir um módulo fotônico capaz de realizar terapia fotodinâmica (PDT) e posteriormente miniaturizado utilizando as tecnologias SMD (*Surface Mounting Device*) e CMOS, sendo possível sua inserção em cápsulas endoscópicas. Para isso serão realizados os seguintes passos:

- Selecionar fontes de luz e medicamento fotossensível para posterior avaliação da capacidade em realizar PDT;
- Projetar e construir um sistema de controle de iluminação em CMOS,
- Avaliar a possibilidade de incorporar todo o sistema em uma CE.

Capítulo 2

1. Terapia Fotodinâmica (PDT)

A PDT é uma das técnicas que podem ser aplicadas no trato GI, é um tratamento ablativo para tecidos que proliferam rapidamente, incluindo lesões displásicas e malignas. Emprega a administração de um medicamento fotossensibilizante (PS, *Photosensitizer*) seguido de exposição à luz branca ou com um comprimento de onda (λ) específico, normalmente localizado na região vermelha do espectro visível. Após um determinado intervalo de tempo o fármaco acumula-se nos tecidos lesionados (TLs) e a aplicação de uma luz com intensidade e λ específicos nestes tecidos leva à fotoexcitação e lesão intracelular. A base para PDT é a administração de alguns produtos químicos para a fotoexcitação quando expostos a luz. Após a exposição à luz, a produção de oxigênio singlete e outros radicais químicos reativos causam dano celular, trombose vascular e necrose, que evoluem ao longo de horas [48], [52]. Na Figura 12 apresenta-se uma ilustração dos princípios básicos de funcionamento da PDT.

Figura 12 - Princípios básicos de funcionamento da PDT, com administração intravenosa do PS [49].

Este capítulo introduz os pontos mais importantes na história da PDT, a exposição detalhada e os procedimentos desta forma de terapia.

Esta terapia necessita da utilização de fármacos fotossensíveis, que também serão introduzidos neste capítulo e, como a PDT consiste em um tipo de terapia óptica que utiliza comprimentos específicos de luz, será explanada como é feita a medida de dose de luz. Também neste capítulo será feita uma introdução sobre o Adenocarcinoma Gástrico Humano.

2. Estado da Arte

O conceito de morte celular induzida pela interação da luz juntamente com produtos químicos foi reconhecido há 110 anos e relatado pela primeira vez por Oscar Raab, um estudante de medicina que trabalhava com o professor Herman Von Tappeiner em Munique. Ao longo de seu estudo sobre os efeitos da acridina sobre os protozoários causadores de malária, ele descobriu que a combinação de acridina vermelha e luz teve efeito letal nos protozoários. Raab, portanto, encontrou a propriedade óptica da fluorescência e concluiu que não era a luz, mas sim algum produto da fluorescência que induziu toxicidade *in-vitro*. Ele postulou que esse efeito foi causado pela transferência de energia da luz para a química, semelhante à observada nas plantas após a absorção de luz pela clorofila. Em uma segunda publicação pouco depois, Von Tappeiner concluiu com uma previsão da futura aplicação de substâncias fluorescentes em medicina [21], [53], [54].

Junto com as observações de Raab, o neurologista francês J. Prime relatou reações fotossensíveis que ocorreram em áreas expostas ao sol em um paciente em que foi administrado eosina. Consequentemente, Von Tappeiner e o dermatologista Albert Jesionek reportaram a primeira aplicação médica de luz branca interagindo com eosina aplicada topicamente para tratar tumores de pele. Em 1904, Von Tappeiner e Albert Jodlbauer identificaram que oxigênio era o componente primordial nas reações de fotossensibilização e criaram a expressão “ação fotodinâmica” em 1907 [21], [53], [54].

Os fotossensibilizadores mais extensamente estudados até agora são as porfirinas, que foram identificadas em meados do século XIX. Estes compostos contêm uma estrutura de porfina (*porphin structure*), ou seja, quatro anéis de pirrol conectados por pontes de metino em uma configuração cíclica, juntamente com uma cadeia lateral que geralmente é metálica [21]. A Hematoporfirina foi produzida pela primeira vez por Scherer em 1841 enquanto realizava experimentos investigando a natureza do sangue, mas as propriedades de fluorescência da hematoporfirina foram descobertas em 1867 e essa substância somente foi nomeada hematoporfirina em 1871 [53], [54].

Em 1911, na cidade de Viena, W. Hausmann foi o primeiro a reportar sobre os efeitos biológicos da hematoporfirina [53]. Ele relatou o efeito da hematoporfirina e da luz em um

paramecium (protozoários ciliados) e glóbulos vermelhos descrevendo reações cutâneas em camundongos expostos à luz após administração de hematoporfirina [21], [53].

O primeiro relato sobre a fotossensibilização humana por parte de porfirinas foi em 1913, feito pelo alemão Friedrich Meyer-Betz. Para determinar se os mesmos efeitos poderiam ser induzidos em humanos e ratos, ele injetou em si mesmo 200 miligramas de hematoporfirina e posteriormente percebeu dor prolongada e inchaço em áreas expostas à luz [21], [53], [54].

A localização da porfirina fluorescente em tumor maligno foi descrita, pela primeira vez, pelo francês Policard enquanto trabalhava na cidade de Lyon em 1924. Ele observou a típica fluorescência vermelha de hematoporfirina em sarcomas de ratos experimentais expostos à luz Ultravioleta (UV) gerada a partir de uma lâmpada de Wood [53], [54].

Na década de 1960, Richard Lipson e colegas iniciaram a era moderna da PDT na clínica Mayo. Esses estudos envolveram um composto que foi desenvolvido por Samuel Schwartz em 1955, chamado “derivado da hematoporfirina” (HpD, *Hematoporphyrin Derivative*). Para preparar este derivado, a hemoproteína bruta foi tratada com ácidos acético e sulfúrico, filtrada e depois neutralizada com acetato de sódio. O precipitado foi então dissolvido em solução salina para produzir HpD. Lipson e outro cientista chamado E. J. Baldes então mostraram que HpD se localizava em tumores, onde emitia fluorescência [21], [53].

Em 1972, I. Diamond e colegas postularam que as propriedades de localização e fototoxicidade de tumores das porfirinas podem ser exploradas para matar células cancerígenas. Estudos *in-vivo* revelaram que a PDT atrasou o crescimento de gliomas que foram implantados em ratos. O crescimento tumoral foi suprimido por poucas dezenas de dias, mas regiões mais profundas dos tumores começaram a crescer novamente. Um avanço significativo ocorreu em 1975, quando Thomas Dougherty e colegas de trabalho relataram que a administração de HpD e a luz vermelha erradicaram completamente o crescimento do tumor mamário em camundongos. No mesmo ano, J. F. Kelly relatou que a ativação da HpD por luz também eliminou o carcinoma da bexiga de camundongos [21], [53].

Em 1976, Kelly e colegas iniciaram os primeiros ensaios em humanos com HpD em pacientes com câncer de bexiga. Um paciente com carcinoma de bexiga recorrente que não respondia positivamente aos tratamentos de ressecções transuretrais, radioterapia e quimioterapia

foi submetido à PDT com HpD e foram observadas diminuição do crescimento e necrose tumoral nas áreas que receberam o tratamento [21], [53].

Em 1978, Dougherty relatou a primeira grande série de pacientes tratados com sucesso via PDT. Vinte e cinco pacientes com 113 tumores de pele primários ou secundários, todos refratários ao tratamento convencional, foram tratados com HpD seguido de exposição à luz vermelha de uma lâmpada de xenônio. Este experimento teve como resultado 98 lesões totalmente regredidas, 13 apresentaram resposta parcial e apenas duas foram resistentes ao tratamento [21], [53].

O desenvolvimento da PDT continuou e foram efetuadas várias experiências no tratamento de outras afecções, como por exemplo, tumores cutâneos, tumores do pulmão, cancro esofágico, cancro gástrico, tumores ginecológicos recorrentes, lesões intraoculares, tumores cerebrais, lesões na cabeça, lesões no pescoço e cancro retal [21], [53], [54].

Um resumo, com os principais eventos na história da PDT estão na linha do tempo apresentada na Figura 13.

Figura 13 - Linha do tempo com os principais acontecimentos na história da PDT [21].

O uso desta técnica no tratamento de patologias no trato gastrointestinal foi experimentado pela primeira vez em 1984, por J. S. McCaughan e colegas que usaram PDT para tratar pacientes com câncer de esôfago. Um ano depois, Y. Hayata e colegas usaram PDT para tratar pacientes com carcinoma gástrico [21], [53].

A PDT foi aprovada como terapia paliativa para o câncer superficial de esôfago em 1994 no Japão e, em 1995, foi aprovada pela FDA como terapia paliativa para câncer avançado de esôfago [55].

3. Técnica

O princípio da terapia fotodinâmica (PDT) envolve a ativação de um PS por luz com comprimento de onda específico [52].

Há três elementos principais necessários: luz, PS e oxigênio. Quando o PS é exposto a um comprimento de onda específico de luz, ele é ativado de um estado fundamental para um estado excitado. No estado fundamental (S_0), diz-se que um PS está no estado de singleto, pelo qual todos os seus elétrons tem *spins* pareados em orbitais de baixa energia. Após a aplicação de luz com λ correspondente ao pico de absorção do PS, o elétron no orbital molecular ocupado mais alto (HOMO, *highest occupied molecular orbital*) é excitado para o orbital molecular desocupado mais baixo (LUMO, *lowest unoccupied molecular orbital*), fazendo com que o PS atinja o instável estado excitado de singleto (S_1) com o tempo de vida na faixa de nanossegundos, portanto, é de se esperar pouco dano oriundo do efeito fotodinâmico a partir de S_1 . Por referir-se a uma configuração instável, vários processos podem ocorrer rapidamente e o PS retorna ao seu estado original S_0 de maneiras distintas, por exemplo, pela geração de calor, um processo não-radioativo que resulta da dissipação da energia absorvida para as moléculas da vizinhança ou por fluorescência, que é a emissão de um fóton cujo comprimento de onda corresponda à diferença energética entre os dois estados [21], [49], [56], [57].

Outro processo possível é a reversão do *spin* do elétron excitado, conhecido como Cruzamento Intersistema (ISC, *Intersystem crossing*) fazendo com que o PS passe para um estado excitado de menor energia, porém relativamente mais estável do que o singleto, chamado tripleto (T_1). T_1 tem vida com duração na faixa de micro a milissegundos que é substancialmente maior do que as das espécies S_1 e, com isso, é mais propenso a participar de reações fotodinâmicas, sendo assim o processo mais crítico para PDT. Neste ponto a molécula pode passar por outra reversão de *spin* do elétron excitado e retornar ao estado fundamental pelo processo de fosforescência, ou pode interagir com moléculas do meio. Nas transições eletrônicas, interações tripleto-tripletto são permitidas pelas regras de seleção relacionadas à multiplicidade de *spins*, o

que permite que o PS interaja com o oxigênio molecular, uma vez que este se apresenta na forma tripleto em seu estado fundamental (O_2) [21], [49], [56], [57].

A discussão das características oxidantes da PDT é centrada no oxigênio molecular (O_2) e, conforme mencionado anteriormente, o estado fundamental do oxigênio é um estado de tripleto. Quando o PS está no estado de tripleto de longa duração, ele pode interagir com O_2 de duas maneiras diferentes. O processo de Tipo I ocorre quando o PS transfere diretamente um elétron para O_2 , produzindo ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), que pode continuar a formar outras espécies de oxigênio reativas (ROS, *Reactive Oxygen Species*) incluindo o radical hidroxila ($\cdot OH$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Alternativamente, o processo de Tipo II acontece quando há transferência de energia do PS no estado T1 para O_2 , assim, ocorre à inversão do *spin* de um elétron externo e deslocando-o para o orbital que contém o outro elétron, portanto cria-se um orbital completamente desocupado (uma violação da regra de Hund). Denominado oxigênio singleto (1O_2), esta forma de oxigênio tem vida curta e é extremamente reativa devido à instabilidade de sua configuração eletrônica. Portanto, oxida eficazmente muitos tipos de biomoléculas (por exemplo, lipídios, ácidos nucleicos, etc.) o que pode levar à destruição de tecido e morte celular [21], [49], [56], [57]. Na Figura 14 está apresentado um esquemático da “ação fotodinâmica”, conhecido como diagrama de Jablonski.

Figura 14 - Geração de estados excitados e espécies reativas de oxigênio (ROS) [49].

4. Medicamentos fotossensibilizantes

Há muitos tipos de medicamentos fotossensibilizantes que estão disponíveis para serem utilizados na PDT. Dependendo do tipo de agente, eles podem ser injetados intravenosamente, ingeridos oralmente ou aplicados topicamente [58].

Os PSs são geralmente classificados em primeira, segunda e terceira gerações [59], [60], [61]. Os PSs de primeira geração são baseados em porfirina e incluem hematoporfirina e seus derivados (HpD). Estes PSs têm máximos de absorção na porção vermelha do espectro e são geradores eficientes de oxigênio singleto. Os máximos de absorção na região do vermelho permitem que a luz de ativação penetre mais profundamente no tecido. No entanto, esses PSs se acumulam rapidamente e permanecem nos tecidos por um longo período de tempo, levando a queimaduras solares severas e fotorreação. Seus efeitos colaterais são inibidos evitando a luz diurna e de alta energia, ou usando roupas protetoras e óculos de sol por aproximadamente 6 semanas após o tratamento, o que constitui uma grande limitação nos ensaios clínicos [60], [61].

Os PSs de segunda geração foram desenvolvidos com base nas supostas deficiências dos medicamentos de primeira geração. Estes PSs têm várias estruturas, incluindo porfirinas, porfirinas expandidas, derivados de clorofila e corantes que melhoraram as propriedades físicas, como a alta solubilidade em água e o coeficiente de fotoadsorção. Curiosamente, os PSs de segunda geração incluem corantes que, na realidade, foram os primeiros PSs clinicamente empregados. Os máximos de absorção desta geração estão em comprimentos de onda superiores a 630 nm e eles mostram uma depuração rápida na pele, assim podem reduzir a fototoxicidade na mesma. No entanto, o paciente deve permanecer em uma sala escura por pelo menos 2 semanas e é necessária uma alta eficiência de acumulação de agentes fotossensíveis no local do tumor [60], [61].

PS de terceira geração contém PS de 1ª e 2ª geração e foram desenvolvidos em conjugação química com polímeros biocompatíveis e anticorpos, depois, encapsulados em nanopartículas para reduzir a toxicidade aos tecidos normais e maximizar a seletividade do tumor [60], [61].

A tendência é que as novas gerações de PSs sejam melhores do que as mais velhas. Na realidade clínica, nenhuma comparação direta já foi realizada para provar ou refutar esse ponto.

Além disso, vários PSs de segunda e terceira geração não estão comercialmente disponíveis, mesmo que ofereçam aprimoramento [60].

Na busca de PSs novos e melhores, as seguintes características foram aceitas como critérios ideais [49], [59]:

- Deve ser quimicamente puro e de composição específica conhecida que seja estável a temperatura ambiente e com uma síntese direta;
- Sem citotoxicidade no escuro e apenas ser citotóxico na presença de luz com comprimento de onda específico;
- Deve ter retenção preferencial nos tecidos alvo (células tumorais) e deve ser rapidamente excretado do corpo, induzindo assim uma baixa toxicidade sistêmica;
- Deve ter uma forte absorção com alto coeficiente de extinção molar (ϵ) em comprimentos de onda selecionados previamente para o tratamento, geralmente entre 600 a 800 nm, onde a dispersão da luz é mínima e a penetração no tecido é máxima;
- Deve ter uma excelente reatividade fotoquímica, com alta produção do estado de tripleto com tempos de vida elevados para produzir efetivamente oxigênio singlete e outros ROS, ou seja, ter um elevado rendimento quântico (ϕ_{Δ}) de $^1\text{O}_2$;
- Deve ter custos acessíveis e estar comercialmente disponível, a fim de promover a utilização extensiva do tratamento;
- Deve ser fácil de dissolver nos fluidos do corpo.

Depois de descritas os atributos mais importantes que um PS deve possuir, estão apresentados na Tabela 3 as principais características de alguns PSs que estão disponíveis comercialmente ou em fase de testes clínicos.

Tabela 3 - Principais características de alguns PSs disponíveis comercialmente ou em testes clínicos [49], [60], [62].

Nome Comercial	λ (nm)	Φ_{Δ}	ϵ ($M^{-1} cm^{-1}$)	Classe	Composto
Photofrin	632	0.89	3000	Porfirinas	<i>Porfimer sodium</i>
Levulan	635	0.56	5000	Porfirinas	<i>5-Aminolevulinic acid (ALA)</i>
Foscan	652	0.87	35000	Clorinas	<i>Meta-tetra(hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC)</i>
Photochlor	665	0.48	47000	Feoforbidos	<i>2-(1-Hexyloxyethyl)-2-devinyl pyropheophorbide (HPPH)</i>
Laserphyrin	664	0.77	40000	Clorinas	<i>N-aspartyl chlorin e6 (NPe6)</i>
Visudyne	689	0.84	34000	Porfirinas	<i>Benzoporphyrin derivative monoacid ring A (BPD-MA)</i>
Purlytin	664	0.7	30000	Clorinas	<i>Tin ethyl etiopurpurin</i>
Lutrin	732	0.11	42000	Texafirinas	<i>Motexafin lutetium (Lu-TeX)</i>
Tookad	763	0.5	88000	Feoforbidos	<i>Palladium bacteriopheophorbide (WST09)</i>
Photosens	676	0.38	200000	Ftalocianinas	<i>Aluminum phthalocyanine tetrasulfonate (AlPcS4)</i>

Apenas três dos medicamentos fotossensibilizantes apresentados na Tabela 3 foram aprovados pela FDA, nomeadamente, Photofrin, Levulan e o Visudyne. O Levulan, cujo composto principal é o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) foi aprovado pela FDA para o tratamento da queratose actínica via PDT em 1999 [62]. O ALA pode ser formulado para aplicação tópica, oral ou intravenosa [60].

O ácido ALA (ácido δ - ou 5-aminolevulínico) é um fotossensibilizador da segunda geração e um precursor da protoporfirina IX (PpIX) [63], [64]. Em contraste com PSs administrados exógenamente, como o Photofrin, o composto fotodinamicamente inativo, não seletivo e não tóxico, ALA, é metabolizado intracelularmente à PpIX, que é fotodinamicamente ativo. A iluminação subsequente no local do tumor com luz vermelha ativa o PpIX que desencadeia o dano oxidativo e induz a citotoxicidade [49], [64].

Após um estudo preliminar bem-sucedido no tratamento de tumores de pele, o uso deste PS alcançou sucesso mundial. Praticamente todas as queratoses actínicas e lesões basocelulares superficiais podem ser eliminadas via PDT com ALA. Em vários trabalhos desenvolvidos, o tratamento fotodinâmico com ALA tem se mostrado altamente eficaz em comparação com outros

procedimentos dermatológicos para eliminar tumores cutâneos não-melanoma na região superficial e em fases iniciais [60]. O ALA também foi usado com sucesso para tumores de cabeça e pescoço, esôfago de Barrett, bexiga urinária, útero e até mesmo câncer de próstata [49], [60], [64].

4.1 Metabolismo do ALA

A bioativação do ALA utiliza a maquinaria enzimática da via de biossíntese do heme (Figura 15). Embora quase todos os tipos de células humanas contenham as enzimas envolvidas na síntese do heme, uma atividade distinta das enzimas nos tumores em comparação com tecidos não afetados leva a um maior acúmulo de PpIX dentro das células tumorais [64].

Figura 15 - Biossíntese do Heme [64].

Em mamíferos e bactérias fotossintéticas, o ALA é sintetizado na mitocôndria e formado a partir de glicina e Succinilcoenzima A (succinil-CoA) pela enzima ALA sintase (ALAS, *ALA synthase*). Após ser sintetizado, o ALA atinge o citosol, onde sofre uma reação de condensação. A ação ocorre entre duas moléculas de ALA com o auxílio da enzima ALA desidratase (ALAD, *ALA dehydratase*) e leva à formação de porfobilinogênio (PBG, *porphobilinogen*). A ALAD,

também conhecida como porfobilinogênio sintase (PBGs, *porphobilinogen synthase*), compreende quatro homodímeros, cada um deles com um sítio ativo. Duas moléculas de ALA ligam-se não simetricamente ao sítio ativo, levando finalmente à síntese de PBG [64], [65].

O próximo passo na biossíntese do heme envolve quatro moléculas combinadas de PBG para formar um tetrapirrol instável, chamado hidroximetilbilano (HMB, *hydroxymethylbilane*). A reação é catalisada por porfobilinogênio desaminase (PBGD, *porphobilinogen deaminase*), uma enzima contendo dipirrometano em seu sítio ativo. Dipirrometano é um cofator covalentemente ligado à enzima e consiste em duas moléculas de PBG. Quatro moléculas adicionais de PBG se ligam ao dipirrometano e, com isso, há a formação de hexapirrol. Posteriormente, na reação hidrolítica, ocorre a clivagem do tetrapirrol distal, resultando na liberação de HMB. O hidroximetilbilano pode então entrar em duas vias. O primeiro usa a uroporfirinogênio III sintase (URO3S, *uroporphyrinogen III synthase*) para fechar o macrociclo do HMB, levando à conversão do tetrapirrol em uroporfirinogênio III. Alternativamente, o HMB pode sofrer ciclização espontânea, o que leva à formação do uroporfirinogênio I. A uroporfirinogênio descarboxilase (UROD, *uroporphyrinogen decarboxylase*) catalisa a descarboxilação de todas as quatro cadeias laterais de acetato de uroporfirinogênio III em grupos metila. O produto dessa reação, que é coproporfirinogênio III é transportado para o espaço intermembrana das mitocôndrias provavelmente por receptores benzodiazepínicos do tipo periférico (PBR, *peripheral-type benzodiazepine receptors*). A coproporfirinogênio oxidase (CPO, *coproporphyrinogen oxidase*) catalisa, então, a conversão do coproporfirinogênio III em protoporfirinogênio IX com a liberação de H_2O_2 e CO_2 . A reação envolve grupos vinílicos por descarboxilação oxidativa de grupos propionato nos anéis pirrólicos A e B. Existem duas formas de CPO: dependentes de oxigênio encontrados em organismos aeróbicos e independentes de oxigênio em bactérias anaeróbicas facultativas. Em mamíferos, a CPO dependente de oxigênio originalmente sintetizado no citosol com uma sequência amino-terminal (N-terminal) longa incomum direcionada para a mitocôndria. Finalmente, a CPO está situada no espaço intermembranar mitocondrial com uma fração fracamente ligada à membrana interna [64], [65].

O próximo intermediário na biossíntese do heme, a protoporfirina IX, é sintetizada nas mitocôndrias e requer protoporfirinogênio oxidase (PPO, *protoporphyrinogen oxidase*). A PPO catalisa a conversão do protoporfirinogênio IX em PpIX na oxidação de seis elétrons. A reação

requer oxigênio como um receptor de elétrons e leva à remoção de seis hidrogênios do protoporfirinogênio IX. A ferroquelatase (FECH, *ferrochelata*se), outra enzima reguladora, é responsável pela inserção de Fe^{2+} na PpIX. A reação ocorre na superfície de dentro da membrana mitocondrial interna. Esta etapa leva à formação do produto final, o heme, e completa a via biossintética do heme [64], [65].

Em tecidos lesionados, a diminuição da atividade da ferroquelatase e a disponibilidade limitada de ferro causam um acúmulo de PpIX, explicando a seletividade de células tumorais em resposta à administração de ALA [64].

5. Dosimetria

Como já referido anteriormente, a PDT clínica envolve a aplicação de um PS seguido de iluminação com comprimento de onda e intensidade apropriados para ativa-lo. Idealmente, isso resultará em uma reação fotodinâmica ablativa que elimina a lesão, mas poupa o tecido normal [66].

Para quantificar a dose de luz (DL) necessária para ativar um PS, primeiro deve-se mensurar a taxa de fluência (TF), que representa a potência óptica (P_0), medida em Watts, em cada unidade de área correspondente ao tecido lesionado (A_{TL}), medido em metros quadrados, conforme descrito na equação (1) [21].

$$TF = \frac{P_0}{A_{TL}} \quad (1)$$

Determinando o intervalo de tempo (Δt) em que a taxa de fluência é aplicada, naturalmente encontra-se a dose de luz desejada, conforme descrito na equação (2) [21].

$$DL = \frac{P_0}{A_{TL}} \times \Delta t \quad (2)$$

A dose de luz é um parâmetro muito importante, levando em consideração que é um fator crucial para a ativação do PS que, por conseguinte, resultará na eliminação do tecido lesionado, mas, infelizmente, nenhum sistema de dosimetria em tempo real existe, pois é muito difícil prever o comportamento de um feixe de luz que interage com um determinado tecido. Isso acontece, devido ao fato de que os tecidos biológicos são considerados como meios túrbidos, ou seja, apresentam altas taxas de absorção e dispersão da luz, então quando um feixe incide em um

tecido, este tem sua intensidade deteriorada conforme vai penetrando, devido à forte absorção e dispersão existente. Deste modo a definição das doses de luz necessárias para o tratamento de diversas patologias é determinada com base em resultados de testes clínicos e na literatura médica [67], [68].

Mathews et al. [69], em 2009, publicou um estudo utilizando o 5-ALA para tratamentos de gliomas esferoides humanos. Na ocasião, foi utilizada uma fonte de luz LASER (*light amplification by stimulated emission of radiation*) com λ de 635 nm e foram realizadas aplicações de doses de luz com 1.5, 3 e 6 J/cm² durante um intervalo de tempo (Δt) de 1 hora com uma taxa de fluência de 0.42, 0.83 e 1.7 mW/cm², respectivamente, ou durante um Δt de 24 horas com uma taxa de fluência de 17, 35, 70 μ W/cm², respectivamente. Os resultados obtidos foram satisfatórios, impedindo a expansão do tumor com uma taxa de fluência menor. Porém, pode ser observado que quanto menor a taxa de fluência, maior deve ser o Δt , tal como se comprova através da relação presente na equação (2).

Em 2008, Pelloi et al. [70] demonstrou que os diodos emissores de luz, nomeadamente os LEDs, são uma boa fonte de luz para PDT, produzindo resultados satisfatórios na presença de um PS cujo o nome é corante azul de metileno. LEDs de cor vermelha, com seu máximo de emissão espectral nos 663 nm produziram um efeito fotodinâmico eficaz, capaz de inibir o crescimento de bactérias (*Staphylococcus Aureus* e *Escherichia Coll*), leveduras (*Candida albicans*) e de microcrustáceos (*Artemia salina*), com doses de luz de 2, 4, 6 e 12 J/cm², durante 10, 20, 30 e 60 minutos, respectivamente, o que corresponde a uma taxa de fluência de aproximadamente 3.3 mW/cm². Esse resultado é possível, pois esse PS tem um elevado ϵ na zona vermelha do espectro visível, apresentando o seu pico máximo de ϵ aproximadamente nos 665 nm. Neste caso específico, a taxa de fluência é constante e o intervalo de tempo que é modificado e quanto maior o Δt , melhor é o resultado.

Trabalhos publicados como Allison et al. [60], em 2010, e Wang et al. [71], em 2007, mostram um outro questionamento que é combinar taxas de fluência reduzidas com altas doses de fármaco e taxas de fluência elevadas com baixas doses de fármaco, mantendo um Δt constante. Segundo esses estudos, as duas abordagens têm resultados satisfatórios, porém quando utilizadas reduzidas taxas de fluência combinadas com altas doses de fármaco, embora seja obtida uma resposta positiva nos TLs, os tecidos normais são mais afetados. Taxas de fluência elevadas

combinadas com baixas doses de fármaco produzem uma resposta eficaz nos TLs, sem toxicidade significativa para o tecido normal, provocando a redução da fotossensibilidade cutânea e um menor tempo de tratamento.

6. Adenocarcinoma gástrico humano

O câncer gástrico é uma das neoplasias malignas mais comuns e apresenta alto índice de mortalidade, ficando na segunda posição no ranking de mortes por câncer ao redor do mundo. Anualmente nos Estados unidos, aproximadamente 22220 pacientes são diagnosticados com este tipo de patologia e o adenocarcinoma representa 95% de todos os cânceres gástricos, dentre os 5% restantes, estão incluídos os linfomas e os sarcomas estromais gastrointestinais [72]. No Brasil, o adenocarcinoma está entre as três primeiras causas de morte por câncer no sexo masculino e entre as cinco primeiras nas mulheres. Sua incidência é maior entre homens, na proporção de 2:1, sendo mais frequente entre 50 e 70 anos, com pico por volta dos 70 anos em ambos os sexos [72], [73]. Uma das principais classificações de adenocarcinoma gástrico é a histológica de Lauren, que subdivide os tumores em dois tipos: o intestinal, que é o mais comum em populações de alto risco para o câncer gástrico e está associado a fatores ambientais, e o difuso, que não guarda relação com a atrofia da mucosa gástrica e acomete com maior frequência mulheres e indivíduos mais jovens [72], [74].

Em relação ao quadro clínico, o adenocarcinoma gástrico geralmente não possui sintomatologia importante em um estágio precoce e muitas vezes, no diagnóstico, a doença se encontra em estágio avançado. Os sintomas mais comuns incluem perda de peso, vômitos e dor abdominal (geralmente epigástrica). Náusea, hiporexia e dispepsia também podem ocorrer. A importância do diagnóstico de tumores na fase precoce está na alta possibilidade de cura com procedimentos minimamente invasivos, através de abordagem endoscópica [72].

Capítulo 3

1. Interação da luz com os tecidos biológicos

Quando a luz atinge os tecidos, ela pode ser absorvida, refletida, transmitida ou ainda sofrer dispersão. Como há uma mudança de índice de refração, pois a luz geralmente parte do ar e incide no tecido biológico, uma pequena parte dela é refletida e o mínimo de reflexão ocorre quando o ângulo de incidência é 90° [75].

Dentro dos tecidos biológicos existem várias estruturas e cada uma com propriedades ópticas diferentes, então a dispersão acontece quando há mudança de direção de propagação dos fótons provocando um espalhamento da luz limitando a profundidade de penetração [67], [75].

Ainda há uma pequena quantidade de luz que é transmitida, geralmente, isso acontece em λ s maiores e conseqüentemente há uma penetração mais profunda [75].

A absorção é o fenômeno majoritário responsável por diversos efeitos nos tecidos, como fluorescência, efeitos fototérmicos, fotoquímicos, e de ablação [67], [75]. Os agentes responsáveis pela absorção de fótons encontrados nos tecidos biológicos são a melanina, a água e a hemoglobina e os seus derivados [75].

O comprimento de onda da luz é o que determina a profundidade de penetração. Considerando a região do visível, pode-se observar na Figura 16, que é limitada a poucos milímetros [75].

Figura 16 - Profundidade de Penetração da luz na pele, em vários comprimentos de onda [75].

Os mecanismos de penetração da luz nos tecidos são muito complexos, tendo em conta que são considerados meios túrbidos, a luz sofre dispersão ou absorção e a extensão de ambos os processos depende do tipo de tecido e do λ . Em λ s maiores a absorção diminui consideravelmente, o que explica a maior penetração, no entanto, acima dos 1300 nm existe uma alta taxa de absorção proveniente da água. Todos esses fatores retratados foram responsáveis pela criação do conceito de “janela óptica” [59], [66].

A penetração de luz nos tecidos é razoavelmente boa no intervalo entre os 600 nm e os 1300 nm e este é conhecido como “janela terapêutica” [67]. O máximo acontece entre 650 nm e os 850 nm, nomeadamente “janela fototerapêutica”, é o intervalo comumente utilizado na PDT. A determinação deste intervalo é explicada pelo fato de que para λ menor que 650 nm a penetração é reduzida por causa da elevada absorção e para λ maior que 850 nm a absorção se torna reduzida e com isso não ocorre transferência de energia suficiente para excitar o PS [59].

Este capítulo introduz as fontes de luz utilizadas para realizar PDT e considerando as limitações de uma cápsula endoscópica, as fontes de luz escolhidas para serem estudadas são LEDs, com isso, este capítulo apresenta os LEDs que foram selecionados para a construção do módulo fotônico e como se realizará a caracterização destes componentes. Este capítulo também apresenta os procedimentos para preparar as células cancerígenas do estômago, adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, Brasil) e como foi feita a exposição das mesmas à luz.

2. Fontes de luz

As fontes de luz são separadas em dois tipos, sendo eles, Laser e não Laser. As do tipo Laser englobam os Lasers de Argônio (Ar), Lasers de Corante, Lasers de Vapor metálico, Lasers de Diodo e Lasers de neodímio dopado com granada de ítrio e alumínio (Nd:YAG, *neodymium-doped yttrium aluminium garnet*). As do tipo não Laser englobam os LEDs, lâmpadas halogênicas de quartzo com filamento de tungstênio, lâmpadas de xenônio, lâmpadas de haletos metálicos, lâmpadas de sódio revestidas com fósforo e lâmpadas fluorescentes [58], [59].

As fontes do tipo Laser são largamente utilizadas na PDT, elas conseguem produzir um feixe com elevada potência óptica e largura espectral muito reduzida, mas apresentam um custo elevado e são impossíveis de implementar em cápsulas endoscópicas, pois necessitam de equipamentos com grandes dimensões e consomem muita energia. Os LEDs, ao contrário dos

LASERs, produzem potência óptica menor e maior largura espectral, mas, considerando as dimensões necessárias para a construção de uma CE possível de ser administrada em pacientes humanos, naturalmente nota-se que o sistema de iluminação deve ser construído com esses componentes baseados em tecnologia de montagem superficial (SMT, *Surface-Mount Technology*), pois, na maioria dos casos, são componentes de baixo custo, têm dimensões bastante reduzidas e consomem pouca energia. Nas cápsulas convencionais utiliza-se LEDs de luz branca, os quais são responsáveis pela iluminação da mucosa [9].

Para escolher as fontes de luz foram considerados todos esses parâmetros e o espectro de emissão, o qual deve se encontrar na região vermelha do espectro visível com λ de máxima emissão em torno dos 635 nm, pois o medicamento fotossensível selecionado para os experimentos foi o ALA e, como mencionado anteriormente, ele possui um máximo de absorção neste λ .

A fonte de luz selecionada foi o LED de luz vermelha com dimensões bastante reduzidas, nomeadamente o modelo LRQ396-P1Q2-1 [76] da Osram Opto Semiconductors (Munique, Alemanha). Este LED atende ao padrão de encapsulamento de componentes SMT 1608 em unidades métricas (0603 em unidades imperiais) com comprimento de 1.6 mm e largura de 0.8 mm, especificamente este modelo tem altura de 0.4 mm. Uma fotografia ampliada do LED pode ser vista na Figura 17.

Figura 17 - Fotografia do LED Osram LRQ396-P1Q2-1 [76].

3. Caracterização da Fonte Luminosa

Com o auxílio do espectrômetro USB4000 (Figura 18) da Ocean Optics (Largo, Flórida, EUA) foi analisada a assinatura espectral do LED. O resultado de uma assinatura espectral é um

gráfico no qual o eixo das abscissas mostra o comprimento de onda (geralmente dado em nanômetros) e o eixo das ordenadas mostra a intensidade de luz emitida (no caso deste espectrômetro, é normalizada).

Figura 18 - Espectrômetro USB4000 da Ocean Optics [77].

O primeiro passo deste processo constitui em direcionar a luz através da fenda de abertura da fibra óptica até o espectrômetro. Esta fenda faz com que ocorra o efeito vinheta da luz captada, no qual algumas áreas são escurecidas e a luz divergente é colimada por um espelho côncavo e dirigida então para uma rede de difração que, por sua vez, faz a dispersão dos comprimentos de onda da luz em ângulos ligeiramente diferentes. Depois é direcionada em um segundo espelho que encaminha cada comprimento de onda para a localização correta no detector CCD. Todo esse processo pode ser visto na Figura 19.

Figura 19 - Ilustração do funcionamento do espectrômetro USB4000 [77].

Quando os feixes são projetados no detector, os fótons são convertidos em sinais elétricos que são digitalizados e lidos através da porta USB (*Universal Serial Bus*) pelo software SpectraSuite da própria Ocean Optics instalado no computador.

O espectrômetro tem uma faixa de detecção de comprimento de onda de 200 a 1100 nm, resolução óptica de 0.1 nm (FWHM, *full width at half maximum*), sensibilidade de 130 fótons por contagem em 400 nm e 60 fótons por contagem em 600 nm, tempo de integração de 3.8 ms a 10 s e conversor analógico digital com velocidade de 3 MHz e resolução de 16 *bits* [77].

Os dados coletados com o auxílio do software SpectraSuite da Ocean Optics foram posteriormente carregados e processados em outro software, nomeadamente MATLAB (Matrix Laboratory) da MathWorks Inc. (Natick, Massachusetts, EUA), com isso foi possível construir um gráfico com a assinatura espectral do LED selecionado (Figura 20).

Figura 20 - Assinatura Espectral do LED LRQ396-P1Q2-1.

É possível notar na Figura 20 que o pico de emissão espectral está localizado em aproximadamente 634 nm e também a largura à meia altura (FWHM) de 16.29 nm, mostrando que este LED é adequado para realizar PDT em conjunto com o ALA.

4. Sistema de iluminação para avaliação da capacidade de realizar PDT

Para avaliar a capacidade de realizar a PDT com o LED LRQ396-P1Q2-1 da Osram, uma placa em circuito impresso (PCB, *Printed Circuit Board*) com 16 LEDs foi projetada utilizando um software baseado em tecnologia CAD (*computer aided design*) nomeado EAGLE da Autodesk Inc. (São Rafael, Califórnia, Estados Unidos) e posteriormente fabricada contendo os componentes adequados. A Figura 21 apresenta uma fotografia da placa produzida.

Figura 21 - Placas com os 16 LEDs da Osram.

Como mencionado anteriormente, na seção Dosimetria do capítulo 2, uma grandeza importante e essencial para a realização da PDT é a potência óptica fornecida por cada LED. Essa grandeza também foi medida com o auxílio do espectrômetro USB4000 (Figura 18) da Ocean Optics.

De modo que se conseguisse potência máxima sem deteriorar os LEDs, foi verificado no datasheet [76] qual a máxima tensão suportada por esses componentes e a corrente utilizada para esta medida, os valores constatados foram de 2.3 V de tensão e 10 mA de corrente. Considerando que o controle de iluminação foi feito por um Arduino Mega 2560 e cada LED foi ligado em uma saída digital que fornece aproximadamente 5 V a PCB foi construída contendo resistores de precisão com 270Ω e tolerância 1%.

Então, com o auxílio do espectrômetro USB4000 foram medidos os valores de potência óptica de cada LED e a média foi de 1.7 mW/cm^2 com um desvio padrão de 0.06 mW/cm^2 que demonstra pouca variação nos valores medidos.

A distância entre cada um dos LEDs foi baseada nas medidas padrão de placas de 96 poços para cultura de células de modo que cada um ilumine um único poço. Na Figura 22 está apresentado o modelo 3D construído no software Inventor da Autodesk Inc. com todos os componentes do sistema de iluminação.

Figura 22 - Sistema de iluminação para a realização de PDT. (a) Componentes do sistema. (b) Sistema montado sem a placa de 96 poços. (c) Sistema montado com a placa de 96 poços.

Para fabricar as peças de ABS (Acrilonitrila butadieno estireno), que estão em preto na Figura 22, foi utilizada uma impressora 3D, modelo Pro - GTMax3D Core A1 da GTMax Tecnologia em Eletrônica (Americana, São Paulo, Brasil) e uma fotografia do sistema de iluminação montado pode ser vista na Figura 23.

Figura 23 - Fotografia do sistema de iluminação. (a) Sem a placa de 96 poços. (b) Com a placa de 96 poços.

5. Preparo das células para realização de PDT

A linhagem de células adquiridas foi de Adenocarcinoma Gástrico Humano (AGS, *Adenocarcinoma Gastric of Stomach*), coletadas do estômago de uma paciente do sexo feminino com 54 anos de idade. Elas foram compradas do Banco de Células do Rio de Janeiro, cujo código é BCRJ 0311. Na Figura 24 pode-se observar uma fotografia das células aumentadas em 10 vezes obtidas por meio de microscopia óptica de contraste de fase [78].

Figura 24 - AGS aumentada em 10x (BCRJ, código 0311) [78].

O meio de cultura utilizado foi o Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) da Cultilab (Campinas, São Paulo, Brasil) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), também da Cultilab, e com glicose adquirida da Labsynth (Diadema, São Paulo, Brasil) de modo que a concentração final fosse 4.5 gramas por litro (g/L).

As células foram cultivadas em frascos de cultura celular de 75 cm² da Greiner Bio One (Kremsmünster, Áustria) e mantidas em estufa incubadora umidificada a 37°C e atmosfera com 5% de CO₂, modelo MCO-17AC da Sanyo Electric Co. Ltd. (Osaka, Japão). Ao atingirem 80% de confluência nos frascos, as células foram dissociadas da superfície com solução de tripsina 0.25% e EDTA (*Ethylenediamine Tetraacetic Acid*) 0.2%, ambos da Cultilab, sendo utilizada a razão de subcultivo de 1:3. A renovação do meio de cultura foi realizada a cada 2 dias.

24 horas antes da realização dos experimentos, as células foram dissociadas dos frascos de cultivo com tripsina (confluência mínima necessária: 80%), centrifugadas a 800 rpm (rotações por minuto) por 5 minutos e ressuspendidas em meio de cultura. Em seguida, as células foram quantificadas através da técnica de exclusão por azul de tripan onde 10 µL de suspensão celular foram dissolvidos em 90 µL de azul de tripan da Sigma Aldrich (Saint Louis, Missouri, EUA), gerando uma diluição da solução de 1:10. Após sua homogeneização, 10µL dessa nova solução foram dissolvidos em 90 µL contendo somente azul de tripan, realizando-se uma diluição seriada de 1:100.

Por fim, 10 µL de cada suspensão com azul de tripan foram inseridas em uma câmara de Neubauer com resolução de 0.0025 mm² e fator de correção de 10⁴ da Kasvi (São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) e, com isso, foi possível fazer a contagem de células viáveis, ou seja, aquelas que permaneciam sem coloração, uma vez que o corante só marca células cuja membrana foi danificada. As células foram contadas nos quadrantes externos (quadrantes 1), conforme mostra a Figura 25, com o auxílio de um microscópio óptico Axio Observer Z1 da Zeiss (Oberkochen, Alemanha).

Figura 25 - Câmara de Neubauer com todas as possíveis áreas de contagem. Devido ao tamanho das células, apenas os quadrantes 1 foram utilizados.

Depois de contadas as células viáveis nos quadrantes utilizados, a quantidade de células por unidade de volume da suspensão original foi quantificado através da equação (3).

$$\frac{N^{\circ} \text{ de células}}{\text{mL}} = \frac{n^{\circ} \text{ de células contadas}}{n^{\circ} \text{ de quadrantes contados}} \times 10^4 \times \text{Diluição} \quad (3)$$

Em placas transparentes de 96 poços Costar da Corning Inc. (Corning, Nova Iorque, EUA) foram contadas 5×10^3 células por poço semeadas em meios de cultivo. Essas placas foram armazenadas na estufa por 24 horas.

Após as 24 horas em estufa, foi preparada uma solução estoque de 10 mM com Cloridrato do Ácido 5-aminolevulínico (ALA) da PDT Pharma (Cravinhos, São Paulo, Brasil) em solução tampão salino fosfato (PBS, *phosphate buffered saline*), depois filtrada em filtro de seringa estéril com membrana de acetato de celulose e poros de 0.2 μm da Corning.

Para observar a produção de PpIX endógena pelas células de AGS, a avaliação da fluorescência deste composto foi feita utilizando-se microscopia de fluorescência. As imagens de microscopia foram obtidas incubando-se uma solução de ALA 2 mM diluída em DMEM sem fenol vermelho suplementado com 10% de SFB após tempos de incubação de 1, 3, 8 e 24 horas. Após a incubação, os poços foram lavados com PBS e foi adicionado um meio de cultura novo com 10% de SFB e sem fenol vermelho.

Como pode ser observado pela Figura 26, nos tempos de 1 e 3 horas, poucas diferenças são observadas entre o grupo controle (não exposto ao precursor da PpIX) e o grupo ALA 2 mM nas imagens de fluorescência. No entanto, com 8 horas de incubação, torna-se possível observar mais claramente a presença de regiões fluorescentes no grupo incubado com ALA, que se tornam mais evidentes ainda após 24 horas de incubação. O contraste observado entre o grupo controle e o incubado com a solução 2 mM sugere a presença de PpIX em concentrações mais elevadas nas amostras incubadas com ALA, indicando a produção mais intensa do fotossensibilizador após o intervalo de 24 horas.

Figura 26 - Imagens obtidas por meio de microscopia de fluorescência mostrando a produção de PpIX.

Para confirmar que o sinal detectado nas imagens corresponde à conversão de ALA em PpIX, células incubadas com ALA por um intervalo de 24 horas foram avaliadas por citometria de fluxo, uma técnica que avalia características de células individuais dentro de uma população.

Então, para analisar a influência de diferentes concentrações de ALA na produção de PpIX, foram incubadas soluções de 0.5; 1 e 2 mM do precursor. O histograma do grupo controle (Figura 27-I) evidencia a autofluorescência das amostras, permitindo a delimitação de duas regiões fixas, uma denominada PpIX⁻, que compreende a área do gráfico com a autofluorescência das amostras, contendo a intensidade de fluorescência dos níveis basais de PpIX endógena e de outros compostos com fluorescência no canal FL-3 na população de células; e outra denominada PpIX⁺, que contém a região com maiores intensidades de fluorescência do fotossensibilizador, contendo, portanto, células com maiores concentrações da PpIX endógena.

A incubação das células com a solução de ALA 0.5 mM (Figura 27-II) resultou em uma migração da população para a região de maior intensidade de fluorescência, fazendo com que 40% das células produzissem PpIX. Maiores concentrações de ALA resultaram na migração de quase a totalidade da população para a região de maior intensidade de fluorescência, indicando que aproximadamente 90% das células produziram níveis mais elevados do fotossensibilizador. No entanto, não foi observada grande diferença entre grupos incubados com soluções de ALA 1 mM (Figura 27-III) e 2 mM (Figura 27-IV), sugerindo que as células atingiram sua máxima eficácia de conversão de ALA em PpIX quando incubadas, por 24 horas, com ALA 1 mM.

Figura 27 - histogramas de citometria de fluxo no canal FL-3. Grupos I) controle, II) ALA 0.5 mM, III) ALA 1 mM e IV) ALA 2 mM. Células exibindo apenas autofluorescência (PpIX-) estão marcadas em preto, e células apresentando elevada fluorescência de PpIX (PpIX+) estão marcadas em vermelho.

Com o intuito de avaliar a eficácia da PDT mediada por PpIX endógena, produzida a partir da incubação de células com ALA foram preparadas três placas onde as diferentes concentrações de ALA foram testadas de acordo com a Figura 28 e cada placa recebeu uma dose de luz diferente, uma delas não recebeu dose de luz, outra recebeu 1 J/cm^2 e, a última, recebeu 5 J/cm^2 .

Figura 28 - Preparo da placa de 96 poços para determinação da concentração de ALA e dose de luz.

A irradiação destas amostras foi realizada utilizando uma fonte de luz (Figura 29) desenvolvida pelo Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT) do Instituto de Física de São Carlos na Universidade de São Paulo, cujas especificações são 24 LEDs com máximo de emissão espectral nos 630 nm e intensidade 30 mW/cm^2 capaz de irradiar homogeneamente placas de 96 poços e excitar baixas concentrações de PpIX [79]. Então, para obter as doses de luz mencionadas, a placa que recebeu 1 J/cm^2 foi exposta por 30 segundos e a placa que recebeu 5 J/cm^2 foi exposta por 2 minutos e 47 segundos.

Figura 29 - Fonte de luz desenvolvida no LAT do IFSC na USP [79].

Depois de irradiadas as amostras, as placas foram transferidas novamente para estufa e permaneceram em repouso por 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi substituído por outro meio sem SFB e com 10% de MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio) e voltaram para a estufa por mais 3 horas.

Em seguida, o meio de cultura com MTT foi substituído por DMSO (Dimetilsulfóxido) e foram feitas as medidas de absorbância em um espectrofotômetro Multiskan GO da Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, EUA).

O valor de viabilidade foi calculado fazendo-se a proporção de cada valor de absorbância dos grupos tratados com a média do valor de absorbância do grupo controle (*Abs*) que não recebeu tratamento, como descrito nas equações (4) e (5): Os valores absorbância e de viabilidade são expressos como a média $\pm$ desvio padrão.

$$Abs_{amostra} = (Abs_{570} - Abs_{690}) - Abs_{Média\ do\ branco} \quad (4)$$

$$Viabilidade_{amostra} = \left(\frac{Abs_{amostra}}{Abs_{Média\ do\ Controle}} \right) \times 100 \quad (5)$$

O protocolo experimental utilizado para os ensaios de PDT pode ser visto na Figura 30.

Figura 30 - Protocolo experimental para os ensaios de PDT.

Os resultados obtidos seguindo este protocolo (Figura 30) e irradiando as amostras com o sistema de iluminação desenvolvido pelo LAT podem ser observados na Figura 31.

Ensaio com sistema de iluminação do LAT

Figura 31 - Resultados obtidos dos ensaios de PDT com o sistema de iluminação do LAT.

É importante notar na Figura 31 que nos grupos de controle, ou seja, as células que receberam doses de luz, mas não foram cultivadas com ALA e as células que foram cultivadas com ALA, mas não receberam doses de luz, não houve morte celular. Só houve morte celular nos grupos que receberam irradiação e ALA em conjunto, sendo muito mais acentuada em doses de

luz de 5 J/cm^2 , o que prova a produção de PpIX nas células de AGS quando tratadas com o ALA e que as concentrações escolhidas não se apresentaram tóxicas.

Todo o protocolo experimental da Figura 30 de preparo das amostras de células de AGS foi repetido para se avaliar a capacidade do sistema de iluminação desenvolvido neste trabalho e apresentado na seção 4 deste capítulo, mas foram utilizadas placas pretas de 96 poços Falcon da Corning Inc de modo que se isolassem os poços e a luz emitida por um LED em um poço não interferisse no adjacente.

Foram preparadas 3 placas seguindo a configuração mostrada na Figura 32, uma delas não recebeu dose de luz, outra recebeu 3 J/cm^2 e a ultima recebeu 5 J/cm^2 . Para conseguir esses valores de dose de luz com os LEDs utilizados no sistema de iluminação, cuja potência óptica média é 1.7 mW/cm^2 , foram necessários tempos de exposição iguais à 29 minutos e 25 segundos para 3 J/cm^2 e 49 minutos para 5 J/cm^2 .

Figura 32 - Configuração da placa de 96 poços utilizada no experimento de avaliação da PDT.

Os resultados obtidos depois de realizar a irradiação com luz vermelha proveniente do sistema de iluminação desenvolvido neste trabalho nas células submetidas ao tratamento com ALA podem ser vistos nos gráficos apresentados na Figura 33.

Figura 33 - Resultados obtidos dos ensaios de PDT com o sistema de iluminação desenvolvido neste trabalho.

Pode-se notar na Figura 33 uma semelhança com os resultados apresentados na Figura 31 para a dose de luz igual a 5 J/cm². Nos dois casos 5 J/cm² foram capazes de ocasionar morte celular em aproximadamente quase todas as células submetidas ao tratamento com ALA. A outra dose de luz testada, igual à 3 J/cm², foi capaz de causar uma diminuição na quantidade de células de AGS vivas, sendo mais eficiente em concentrações de ALA mais elevadas, como 2 mM, causando pouco mais de 40 % de morte celular neste caso. Enfim, mais uma vez é importante observar que não ocorreu morte celular em nenhum dos grupos de controle. Com tais resultados, é possível constatar que os LEDs selecionados para incorporar as cápsulas endoscópicas são capazes de realizar PDT em conjunto com a administração do ácido 5-aminolevulínico.

Capítulo 4

1. *Pulse Width Modulation (PWM)*

As tensões e correntes analógicas podem ser usadas para controlar as coisas diretamente, como o volume de um rádio de carro. Em um rádio analógico simples, um botão está conectado a um resistor variável e à medida que você gira o botão, a resistência aumenta ou diminui e, com isso, a corrente que flui através do resistor varia de forma inversa. Isso altera a quantidade de corrente que conduz os alto-falantes, aumentando ou diminuindo o volume. Por mais intuitivo e simples que pareça o controle analógico, nem sempre é economicamente atraente ou prático. Os circuitos analógicos podem ser muito difíceis de sintonizar e para se ter precisão devem ser muito grandes, pesados e caros (basta pensar em equipamentos estéreo de casa mais antigos). Podem aquecer demais, pois a potência dissipada é proporcional à tensão em todos os elementos ativos multiplicados pela corrente aplicada neles e também podem ser sensíveis ao ruído devido à sua resolução infinita, ou seja, qualquer perturbação ou ruído em um sinal analógico necessariamente muda o valor atual [80].

Em poucas palavras, o PWM é uma maneira de codificar digitalmente os níveis de sinal analógico. Através do uso de contadores de alta resolução, o ciclo de trabalho de uma onda quadrada é modulado para codificar um nível de sinal analógico específico. O sinal PWM ainda é digital porque, em qualquer instante dado, a fonte de tensão ou corrente é fornecida à carga analógica por meio de uma série repetitiva de pulsos de ligar e desligar. O *on-time* é o tempo durante o qual o fornecimento de corrente contínua é aplicado à carga e o *off-time* é o período durante o qual o fornecimento está desligado. Dada uma largura de banda suficiente, qualquer valor analógico pode ser codificado com o PWM. A Figura 34 mostra três sinais PWM diferentes. A Figura 34(a) mostra uma saída de PWM em um ciclo de trabalho de 10%, ou seja, o sinal está ligado para 10% do período e desligado os outros 90%. As Figura 34(b) e Figura 34(c) mostram as saídas PWM em ciclos de trabalho de 50% e 90%, respectivamente. Essas três saídas PWM codificam três valores de sinal analógico diferentes, com 10%, 50% e 90% da potência total. Se, por exemplo, o fornecimento for 9 V e o ciclo de trabalho seja de 10%, resulta um sinal analógico de 0.9V [80].

Figura 34 - Sinal PWM para vários ciclos de trabalho [80]. (a) 10%. (b) 50%. (c) 90%.

Para se ter o efeito desejado, a frequência de modulação deve ser suficientemente elevada, caso contrário, para exemplificar, uma lâmpada que se mantém ligada durante 5 segundos e desligada pelos mesmos 5 segundos tem o ciclo de trabalho em 50% também, mas ela fica acesa com intensidade máxima por 5 segundos e apagada por 5 segundos, então para essa frequência o PWM não funciona. Comumente se usam frequências moduladoras que variam entre 1 kHz e 200 kHz [80].

Este capítulo apresenta o sistema de controle de iluminação desenvolvido em CMOS.

2. Blocos digitais básicos

Todos os componentes do microdispositivo integrado foram projetados utilizando o processo CMOS de 0.7 μm da On Semiconductor (Phoenix, Arizona, EUA) [81] para controlar simultaneamente a intensidade e acionar um ou mais LEDs ao mesmo tempo. Portanto, todos os blocos digitais foram implementados com MOSFETs (*Metal-Oxide-Semiconductor Field-Effect Transistor*) nas mínimas dimensões possíveis nesta tecnologia. Para o NMOS (*N-type Metal-Oxide-Semiconductor*) o comprimento de *gate* é 0.7 μm e a largura de canal são 2.2 μm , já o

PMOS (*P-type Metal-Oxide-Semiconductor*) possui o mesmo comprimento de *gate*, mas a largura de canal é três vezes maior, ou seja, 6.6 μm . Isso se deve ao fato de que a mobilidade de lacunas é duas a três vezes menor que a de elétrons e o PMOS conduz lacunas, o que resulta em uma transcondutância do PMOS três vezes menor que a do NMOS [82].

2.1 Inversor (NOT)

O inversor é o componente mais básico nos blocos digitais, sua função é inverter o valor lógico aplicado na entrada. A Figura 35 apresenta o símbolo utilizado para a função inversora [82].

Figura 35 - Símbolo utilizado para o Inversor.

Para projetar um inversor em CMOS, utilizou-se dois MOSFETs, um PMOS e um NMOS com drenos e *gates* ligados [82], [83], como mostra a Figura 36.

Figura 36 - Inversor em CMOS.

Desta forma, quando a entrada tem nível lógico 0 condiciona o PMOS a conduzir e a saída tem nível lógico 1, pois é igual a V_{dd} . Quando a entrada tem nível lógico 1, a saída assume nível lógico 0, neste caso o NMOS torna a conduzir e a saída é igual a G_{nd} [83]. A Tabela 4 apresenta a tabela verdade desta função lógica.

Tabela 4 - Tabela verdade para o Inversor.

Entrada	Saída
0	1
1	0

2.2 Porta OU Negado (NOR)

O símbolo da porta lógica OU negado pode ser visto na Figura 37.

Figura 37 - Símbolo da porta lógica NOR.

Como o próprio nome já diz, a função lógica OU negado é o inverso da função lógica OU (OR), ou seja, C assume nível lógico 1 quando as duas entradas estão em nível lógico 0, caso contrario C é sempre 0 [83].

Em CMOS, o NOR pode ser projetado expandindo a porta inversora apresentada anteriormente fazendo-se uso de mais dois transistores, um NMOS ligado em paralelo com o NMOS da porta NOT e outro PMOS ligado em série com o PMOS da NOT. A Figura 38 mostra como foi construída a porta NOR em CMOS [82], [83].

Figura 38 - Porta NOR em CMOS.

Pode-se observar na Figura 38 que a saída só terá nível lógico 1, quando ambas as entradas também estarem em nível lógico 0, pois dessa forma ambos os PMOS estão a conduzir e fazem com que a saída seja Vdd. Caso contrário, em todas as outras possibilidades de entrada, sempre um dos PMOS não conduz, impossibilitando a saída ser igual à Vdd, mas analisando os transistores do tipo NMOS, é possível notar que sempre um deles ou os dois estão a conduzir, isso condiciona a saída a assumir valor de Gnd [83]. A Tabela 5 apresenta a tabela verdade desta porta lógica.

Tabela 5 - Tabela verdade para função lógica NOR.

Entrada 1	Entrada 2	Saída
0	0	1
0	1	0
1	0	0
1	1	0

2.3 Porta E Negado (NAND)

O símbolo da porta lógica E negado pode ser visto na Figura 39.

Figura 39 - Símbolo da porta lógica NAND.

A porta lógica NAND, ao contrário da porta NOR, assume nível lógico 1 na saída para todas as combinações na entrada, exceto quando as duas entradas tem nível lógico 1. Ela é exatamente o inverso da porta lógica E (AND) [83].

A NAND também é projetada em CMOS expandindo a porta inversora. Neste caso liga-se um NMOS em série com o NMOS da NOT e um PMOS em paralelo com o PMOS da NOT. A Figura 40 apresenta a configuração da NAND com os MOSFETs [82], [83].

Figura 40 - Porta NAND em CMOS.

Nota-se na Figura 40 que quando as duas entradas estiverem em nível lógico 1, os dois PMOS não conduzem e os dois NMOS estão a conduzir, então a saída assume nível lógico 0 e é igual a Gnd. Em todas as outras possibilidades de entrada, sempre há um PMOS conduzindo e um NMOS em corte, o que condiciona à saída nível lógico 1, pois sempre será igual a Vdd [83]. A Tabela 6 apresenta a tabela verdade desta porta lógica.

Tabela 6 - Tabela verdade para função lógica NAND.

Entrada 1	Entrada 2	Saída
0	0	1
0	1	1
1	0	1
1	1	0

É possível construir portas lógicas NAND e NOR com três ou mais entradas, o símbolo da porta lógica NAND de três entradas é semelhante ao da NAND apresentado anteriormente, mas, como mencionado, possui três entradas [83]. A Figura 41 - Símbolo da porta NAND com 3 entradas. apresenta o símbolo da porta NAND de três entradas.

Figura 41 - Símbolo da porta NAND com 3 entradas.

Esta porta NAND de três entradas é semelhante à NAND com duas entradas, ela assume nível lógico 0 na saída quando todas as entradas estão em nível lógico 1, caso contrário, tem nível lógico 1 na saída para todas as combinações impostas nas entradas [83].

Para projetar a NAND com três entradas em CMOS utiliza-se a NAND com duas entradas e acrescentam-se mais dois MOSFETs, um NMOS em série com os outros dois já existentes e um PMOS em paralelo com outros dois PMOS. A Figura 42 mostra a porta NAND com três entradas projetada em CMOS [82].

Figura 42 - Porta NAND de três entradas em CMOS.

Nota-se na Figura 42 a semelhança com a NAND de duas entradas descrita anteriormente. Neste caso, quando todas as entradas tem nível lógico 1, os três NMOS conduzem e os três PMOS estão em corte, então a saída assume o valor de Gnd. Para as outras possibilidades de entrada, sempre há um ou mais PMOS em condução e um ou mais NMOS em corte, condicionando a saída ser igual à Vdd [83]. A Tabela 7 apresenta a tabela verdade desta porta lógica.

Tabela 7 - Tabela verdade para função lógica NAND de 3 entradas.

Entrada 1	Entrada 2	Entrada 3	Saída
0	0	0	1
0	0	1	1
0	1	0	1
0	1	1	1
1	0	0	1
1	0	1	1
1	1	0	1
1	1	1	0

2.4 Porta OU Exclusivo (XOR)

O símbolo da porta lógica OU exclusivo pode ser visto na Figura 43.

Figura 43 - Símbolo da porta XOR.

A função OU exclusivo assume nível lógico 1 na saída quando as duas entradas tem níveis lógicos diferentes e assume nível lógico 0 quando as entradas são iguais [83]. A Tabela 8 apresenta a tabela verdade desta porta lógica.

Tabela 8 - Tabela verdade para função lógica XOR.

Entrada 1	Entrada 2	Saída
0	0	0
0	1	1
1	0	1
1	1	0

Em CMOS, a porta XOR é construída utilizando portas NAND já projetadas anteriormente. A Figura 44 apresenta o modo como a XOR foi construída em CMOS.

Figura 44 - Porta XOR construída em CMOS utilizando portas lógicas NAND.

Analisando a Figura 44 e fazendo uso da Tabela 6 para as portas NAND é possível perceber que esta porta XOR construída a partir de portas NAND obedece à tabela verdade apresentada na Tabela 8.

2.5 Latch

A *latch* é o elemento de memória mais simples, seu nome, que está em inglês, significa trancar, ou seja, ela é capaz de armazenar um valor lógico determinado anteriormente. Um circuito utilizado para se construir uma *latch* utiliza portas lógicas NAND e está representado na Figura 45 [83].

Figura 45 - Latch implementado com portas NAND.

Pode-se verificar na Figura 45 que o circuito possui duas entradas, R e S, que representam *Reset* e *Set*. *Reset* tem a função de reiniciar, colocar a saída da *latch* em nível lógico 0 e *Set* tem a função de ativar, elevar a saída à nível lógico 1. A Tabela 9 apresenta a tabela verdade para a latch implementada com portas NAND [83].

Tabela 9 - Tabela verdade para a Latch SR com portas NAND.

$\overline{S}$	$\overline{R}$	Q^{n+1}
0	0	Não usado
0	1	1
1	0	0
1	1	Q^n

É possível notar na Tabela 9 todas as possibilidades de entrada na *latch* e também vale observar que para este dispositivo *Set* e *Reset* estão negados, então impor valor lógico 0 para ambos não é permitido, tratando-se de uma situação contraditória onde se força simultaneamente que a saída assuma valores lógicos 0 e 1. Quando ambas as entradas são colocadas em nível lógico 1, a *latch* mantém o que foi imposto anteriormente e isso se deve ao fato de *Set* e *Reset* não serem acionados não alterando seu estado [83].

2.6 Flip-flop tipo D (Data)

Os *Flip-flops* são construídos a partir de *latches* e resolvem o problema de mau funcionamento dos elementos de memória com relação a atrasos na transmissão de informação entre os componentes acionados simultaneamente por pulsos de relógio [83].

A Figura 46 apresenta um *flip-flop* tipo D *edge-triggered* construído com portas NAND e NOT.

Figura 46 - Flip-flop D *edge-triggered*.

Nota-se na Figura 46 que o *flip-flop* contém três *latches*, estando duas na entrada, com uma ligação entre elas impondo estados opostos e permitindo que o valor de entrada seja guardado na *latch* de saída, imediatamente a seguir da borda de subida do sinal de relógio, e que seja desabilitado o acesso às entradas dessa mesma *latch*, quase de imediato. Portanto, este circuito funciona como um *flip-flop edge-triggered* ativo na borda ascendente [83].

3. Sistema de controle de iluminação

A Figura 47 mostra o diagrama de blocos do controlador projetado em CMOS. Todos os componentes foram construídos fazendo-se uso dos blocos digitais apresentados na seção anterior.

Figura 47 - Diagrama de blocos do controlador eletrônico para o módulo PDT.

Conforme ilustrado no diagrama de blocos (Figura 47), uma palavra digital com quatro *bits* define a intensidade e um esquema de modelagem de pulso é implementado para fornecer um sinal PWM na saída.

Como os contadores utilizados na construção do sistema de controle são capazes de contar apenas até 4 *bits*, ou seja, de 0 até 15, o sinal na saída do controlador está em estado de nível alto durante $X + 0.5$ pulsos de relógio (CLK, *clock*) e permanece no estado de nível baixo durante o restante $15.5 - X$ pulsos de relógio de acordo com a programação implementada no dispositivo. Isso foi projetado de modo que se aproveitasse o máximo de ciclo de trabalho (*duty cycle*) que este sistema pode fornecer sendo o mínimo *duty cycle* 1.5 pulsos de *clock*, resultando em 6.45% e máximo *duty cycle* com 15.5 pulsos de *clock*, resultando em 96.8%.

Resultados obtidos a partir de simulação realizada pela ferramenta T-Spice contida no software Tanner EDA Tools da Mentor Graphics (Wilsonville, Oregon, EUA) foram coletados e analisados mostrando o funcionamento do sistema de controle de iluminação por PWM. A Figura 48 apresenta esses resultados.

Figura 48 - Resultados obtidos a partir de simulação.

3.1 Contador de 4 bits

Os contadores são conjuntos de elementos de memória que mudam de estado respondendo a um evento que acontece exteriormente [83]. Os contadores do sistema de controle de iluminação foram projetados utilizando *flip-flops* tipo D. A Figura 49 apresenta o primeiro contador (CNT 1) apresentado no diagrama de blocos (Figura 47) e a Figura 50 apresenta o segundo contador (CNT 2).

Figura 49 - CNT 1.

Figura 50 - CNT 2.

Pode-se observar na Figura 49 e Figura 50 que há uma diferença entre os contadores de 4 bits projetados, os *flip-flops* do CNT 2 tem duas entradas a mais que os *flip-flops* do CNT 1. A entrada *clear* não causa nenhuma alteração no funcionamento de CNT 2, pois sempre está desativada ligada a Vdd e, como é possível notar, esta entrada está negada. Já a entrada *preset* tem uma função muito importante que impacta no sistema de iluminação, ela é ativada pelo sinal

RESET 2 proveniente do Bloco 1 e este sinal é responsável pelo *preset* deste contador, ou seja, ele limpa a saída dos elementos de memória.

Os *flip-flops* tipo D com *preset* e *clear* foram projetados em CMOS de uma maneira diferente dos mencionados anteriormente. Eles também são compostos por três *latches*, mas foram utilizadas portas NAND com três entradas conforme pode ser visto na Figura 51.

Figura 51 - *Flip-flop* projetado para CNT 2.

3.2 Bloco 1

O bloco 1 é o responsável por criar os sinais de *clock* e *preset* que chegam até o CNT 2, ele foi projetado com portas NAND, NOR e NOT e pode ser visualizado na Figura 52.

Figura 52 - Bloco 1 do sistema de controle de iluminação.

O CNT 1 fornece os *bits* de entrada no bloco 1 e como resultado da combinação desses *bits* nas portas lógicas NOR e NAND se tem na saída o sinal RESET. A partir de RESET e CLK negado combinados em uma porta NOR se tem o sinal RESET 2 que tem nível lógico 1 em exatamente meio período de *clock* e é responsável por sempre condicionar a saída com $X + 0.5$ períodos de CLK dependendo da programação dos *bits* de entrada.

3.3 Comparador de 4 bits

A função de comparação é uma das funções elementares normalmente realizadas por circuitos combinatórios [83]. O comparador de 4 *bits* utilizado no sistema de controle de iluminação foi projetado utilizando portas lógicas XOR, NOR e NAND e pode ser visto na Figura 53.

O comparador faz uma comparação *bit a bit* dos sinais colocados em programação com os sinais obtidos no CNT 2, desde o *bit* menos significativo até o mais significativo. Analisando a Figura 53, verifica-se que a saída do comparador na porta lógica NAND será 0 somente quando a dois sinais colocados nas entradas das portas do tipo XOR atingirem nível lógico equivalente. Portanto é possível determinar o *duty cycle* do sistema de controle de iluminação por meio de uma programação prévia com uma palavra de 4 *bits*.

Figura 53 - Comparador de 4 bits.

4. Validação do sistema de controle de iluminação por PWM

Para testar o sistema de controle de iluminação por PWM construído em CMOS foi projetada e fabricada uma placa de circuito impresso de forma que os sinais de programação e *clock* sejam fornecidos por um Arduino mega 2560 igual ao utilizado no sistema de iluminação apresentado no capítulo 3, seção 4. Uma fotografia da PCB já com o microdispositivo integrado e conectada no Arduino pode ser vista na Figura 54.

Figura 54 - PCB fabricada para testar o módulo PWM.

Utilizando o software livre Arduino IDE disponibilizado no site da própria fabricante (www.arduino.cc) foi possível criar um algoritmo onde o Arduino enviasse pulsos de *clock* pelo pino 34 e selecionasse o *duty cycle* através da combinação dos *bits* PWM 0 ligado ao pino 42, PWM 1 ligado ao pino 40, PWM 2 ligado ao pino 38 e PWM 3 ligado ao pino 36.

Desta maneira, com o auxílio de um osciloscópio portátil DSO Nano v3 da Seed Studio (Shenzhen, Guangdong, China), foi possível coletar os dados pelo pino Saída PWM na PCB e os resultados para os mesmos *duty cycles* selecionados nas simulações da Figura 48 estão apresentados na Figura 55.

É possível observar nos resultados obtidos experimentalmente (Figura 55) que o sistema de controle de iluminação está funcionando de acordo com o esperado, devido à semelhança entre os dados coletados via simulação e medidos por instrumentação.

Figura 55 - Resultados obtidos experimentalmente.

A Figura 56 mostra o *layout* e duas fotografias aumentadas do microdispositivo, onde é possível identificar e localizar o sistema de controle de iluminação preenchido por uma sombra amarela.

Figura 56 - (a) O *layout* do microdispositivo completo contendo o controlador (preenchido por uma sombra amarela). (b) Fotografia do microdispositivo completo contendo o controlador (preenchido por uma sombra amarela). (c) *Zoom* na região do controlador (preenchido por uma sombra amarela).

Capítulo 5

1. Conclusões

A endoscopia por cápsulas endoscópicas tem se mostrado uma técnica bastante promissora na visualização de todo o sistema gastrointestinal, permitindo a realização de um exame indolor, não invasivo e sem a administração de anestésias.

As cápsulas presentes no mercado ainda não são capazes de realizar terapias ou biópsias, mas os sistemas de controle de movimento por campos magnéticos propostos por Silva et al. [31], [32], Ciuti et al. [33] e Capri et al. [34], [35] colocam a CE em outro patamar e possibilitam que sejam anexados nestes dispositivos outros instrumentos que permitem a realização de biópsias e terapia, como é o caso da terapia fotodinâmica que foi detalhada e estudada neste trabalho.

A PDT necessita da incorporação de um sistema de iluminação na CE que emite em um comprimento de onda específico casado com a administração de um fármaco fotossensível que tenha absorção máxima neste λ . Com isso, este trabalho teve como principal objetivo construir um sistema de iluminação capaz de realizar PDT em cápsulas endoscópicas em conjunto com o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) que é um pró-fármaco, precursor natural do agente fotossensível protoporfirina IX (PpIX). Foram selecionados e caracterizados LEDs do modelo LRQ396-P1Q2-1 da Osram Semiconductors com máximo de emissão espectral próximo dos 635 nm que é a região onde a PpIX tem seu máximo de absorção.

Depois, para realizar PDT com esses LEDs, foi construído um sistema de iluminação contendo suportes impressos em impressora 3D e PCB com 16 LEDs alimentados por um Arduino Mega 2560 capaz de irradiar células de AGS preparadas em placas de 96 poços com o ALA. O sistema se mostrou eficaz, causando morte celular nas células que receberam tratamento com ALA em uma concentração de 2 mM e dose de luz em 5 J/cm^2 , o que corresponde à 49 minutos de exposição.

Por fim, foi desenvolvido em tecnologia CMOS $0.7 \text{ }\mu\text{m}$ da On Semiconductor um dispositivo que se mostrou capaz de controlar intensidade de iluminação utilizando PWM.

Unindo este componente com os LEDs apresentados pode-se concluir que é possível construir um módulo fotônico para PDT em cápsulas endoscópicas.

2. Trabalhos Futuros

Neste trabalho foi apresentado um módulo capaz de realizar terapia fotodinâmica e capacitado para ser incorporado em cápsulas endoscópicas devido ao tamanho físico dos componentes e ser adaptável para trabalhar com 3 Volts fornecidos pela soma de duas baterias já utilizadas em CEs comerciais. Como continuação dos estudos para se construir cápsulas cada vez mais completas pode-se utilizar a tecnologia CMOS e integrar todos os componentes necessários deste dispositivo, conforme a Figura 57.

Figura 57 - Modelo de cápsula com microdispositivo integrado.

Desta maneira, será possível transformar a endoscopia por CE em um método completo contendo outras formas de tratamento e biópsias adaptando os componentes para o que se deseja realizar.

Uma forma de melhorar a capacidade de uma CE realizar PDT é a utilização de lentes de polímero, especificamente o PDMS (Polidimetilsiloxano) que tem baixos custos de material e fabricação, excelentes propriedades ópticas, moldagem flexível e alta resistência mecânica, [84], [85]. Unindo lentes de PDMS com o sistema de iluminação proposto neste trabalho será possível melhorar a eficácia na terapia, pois a lente focará o feixe de luz concentrando sua intensidade em locais específicos. Um modelo que poderá ser construído futuramente está ilustrado na Figura 58.

Figura 58 - Ilustração do modelo de sistema de iluminação com as lentes de PDMS.

Por fim, para completar os estudos seria necessário realizar ensaios em seres vivos, por exemplo, suínos submetidos ao tratamento via PDT. Seriam administradas doses de ácido 5-aminolevulínico (ALA) e posteriormente expostos à irradiação com luz vermelha oriunda do sistema de iluminação desenvolvido neste trabalho.

Referências

- [1] G. Pan, L. Wang, “Swallowable Wireless Capsule Endoscopy: Progress and Technical Challenges”, *Gastroenterology Research and Practice*, vol. 2012, p. 9, 2011.
- [2] G. Iddan, G. Meron, A. Glukhovsky, P. Swain, “Wireless capsule endoscopy”, *Nature*, vol. 405, pp. 417-418, 2000.
- [3] G. Ciuti, A. Mencias, P. Dario, “Capsule Endoscopy: From Current Achievements to Open Challenges”, *IEEE Reviews in Biomedical Engineering*, vol. 4, pp. 59-72, 2011.
- [4] S. A. Antoniou, G. A. Antoniou, C. Koutras, A. I. Antoniou, “Endoscopy and laparoscopy: a historical aspect of medical terminology”, *Surgical Endoscopy*, vol. 26, n 12, pp. 3650-3654, 2012.
- [5] J. Shah, “Endoscopy through the ages”, *BJU International*, vol. 89, n 7, pp. 645-652, 2002
- [6] M. V. Sivak, “Gastrointestinal endoscopy: past and future”, *Gut*, vol. 55, n 8, pp. 1061-1064, 2006.
- [7] S. Varadarajulu, S. Banerjee, B. A. Barth, D. J. Desilets, V. Kaul, S. R. Kethu, M. C. Pedrosa, P. R. Pfau, J. L. Tokar, A. Wang, L. M. Wong Kee Song, S. A. Rodriguez, “GI endoscopes”, *Gastrointestinal Endoscopy*, vol. 74, n 1, p. 12, 2011.
- [8] L. R. Fisher, W. L. Hasler, “New vision in video capsule endoscopy: current status and future directions”, *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, vol. 9, n 7, pp. 392-405, 2012.
- [9] P. Valdastrì, M. Simi, R. J. Webster III, “Advanced Technologies for Gastrointestinal Endoscopy”, *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 14, pp. 397-429, 2012.
- [10] P. W. Y. Chiu, “Second look endoscopy in acute non-variceal upper gastrointestinal bleeding”, *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, vol. 27, n. 6, pp. 905-911, 2013.
- [11] C. J. Kahi, L. J. Myers, J. E. Slaven, D. Haggstrom, H. Pohl, D. J. Robertson, T. F. Imperiale, “Lower endoscopy reduces colorectal cancer incidence in older individuals”, *Gastroenterology*, vol. 146, n. 3, pp. 718-725, 2014.
- [12] R. A. Dias, J. H. Correia, G. Minas, “CMOS Optical Sensors for being incorporated in Endoscopic Capsule for Cancer Cells Detection”, *IEEE International Symposium on Industrial Electronics*, pp. 2747-2751, 2007

- [13] K. Schulmann, S. Hollerbach, W. Schmiegell, "Diagnosing small bowel crohn's disease with wireless capsule endoscopy," *Gut*, vol. 52, n. 10, pp. 1531-1532, 2003.
- [14] O. A. Casanovas, "Enabling Active Locomotion and Advanced Features in Capsule Endoscopy", Doctoral dissertation, Universitat de Barcelona, Barcelona, pp. 16-17. 2012.
- [15] W. A. Qureshi, "Current and future applications of the capsule camera", *Nature Reviews*, vol. 3, pp. 447-450, 2004.
- [16] A. K. Hara, J. A. Leighton, V. K. Sharma, R. I. Heigh, D. E. Fleischer, "Imaging of Small Bowel Disease: Comparison of Capsule Endoscopy, Standard Endoscopy, Barium Examination, and CT", *RadioGraphics*, vol. 25, n 3, pp. 697-711, 2005.
- [17] M. Mackiewicz, "Capsule Endoscopy - State of the Technology and Computer Vision Tools After the First Decade", *New Techniques in Gastrointestinal Endoscopy*, Oliviu Pascu (Ed) InTech, 2011, pp. 103-124.
- [18] B. A. Whitmer, M. Raphael, B. Warren, "Video Capsule Endoscopy : The Past, Present, and Future", *Journal of Gastrointestinal and Digestive System*, p 6, 2011.
- [19] F. Carpi, S. Galbiati, A. Carpi, "Controlled navigation of endoscopic capsules: concept and preliminary experimental investigations", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 54, n. 11, pp. 2028-2036, 2007.
- [20] A. Rastogi, A. Bansal, S. Wani, P. Callahan, D. H. McGregor, R. Cherian, P. Sharma, "Narrow-band imaging colonoscopy - a pilot feasibility study for the detection of polyps and correlation of surface patterns with polyp histologic diagnosis", *Gastrointestinal Endoscopy*, vol. 67, n. 2, pp. 280-286, 2008.
- [21] D. E. Dolmans, D. Fukumura, R. K. Jain, "Photodynamic therapy for cancer", *Nature Reviews Cancer*, vol. 3, n. 5, pp. 380-387, 2003.
- [22] R. Kiesslich, L. Gossner, M. Goetz, A. Dahlmann, M. Vieth, M. Stolte, A. Hoffman, M. Jung, B. Nafe, P. R. Galle, M. F. Neurath, "In-vivo histology of barrett's esophagus and associated neoplasia by confocal laser endomicroscopy", *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, vol. 4, n. 8, pp. 979-987, 2006.
- [23] I. Shimoyama, MEMS market trends in Japan, in the 11th World MicroMachine Summit, Richardson, TX, USA, 1-4 May 2005.

- [24] P. Valdastrì, R. J. Webster, C. Quaglia, M. Quirini, A. Menciassi, P. Dario, "A New Mechanism for Mesoscale Legged Locomotion in Compliant Tubular Environments", *IEEE Transactions on Robotics*, vol. 25, pp. 1047-1057, 2009.
- [25] B. Kim, S. Lee, J. H. Park, J.-O. Park, "Design and Fabrication of a Locomotive Mechanism for Capsule-Type Endoscopes Using Shape Memory Alloys (SMAs)", *IEEE/ASME Transactions on Mechatronics*, vol. 10, pp. 77-86, 2005.
- [26] H. M. Kim, S. Yang, J. Kim, S. Park, J. H. Cho, J. Y. Park, T. S. Kim, E.-S. Yoon, S. Y. Song, S. Bang, "Active locomotion of a paddling-based capsule endoscope in an in-vitro and in-vivo experiment", *Gastrointestinal Endoscopy*, vol. 72, pp. 381-387, 2010.
- [27] P. Glass, E. Cheung, M. Sitti, "A Legged Anchoring Mechanism for Capsule Endoscopes Using Micropatterned Adhesives", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 55, pp. 2759-2767, 2008.
- [28] G. Tortora, P. Valdastrì, E. Susilo, A. Menciassi, P. Dario, F. Rieber, M. O. Schurr, "Propeller-based wireless device for active cápsular endoscopy in the gastric district", *Minimally Invasive Therapy & Allied Technologies*, vol. 18, pp. 280-290, 2009.
- [29] J. Keller, C. Fibbe, F. Volke, J. Gerber, A. C. Mosse, M. Reimann-Zawadzki, E. Rabinovitz, P. Layer, D. Schmitt, V. Andresen, U. Rosien, P. Swain, "Inspection of the human stomach using remote-controlled capsule endoscopy: a feasibility study in healthy volunteers", *Gastrointestinal Endoscopy*, vol. 73, pp. 22-28, 2011.
- [30] J. F. Rey, H. Ogata, N. Hosoe, K. Ohtsuka, N. Ogata, K. Ikeda, H. Aihara, I. Pangtay, T. Hibi, S. Kudo, H. Tajiri, "Feasibility of stomach exploration with a guided capsule endoscope", *Endoscopy*, vol. 42, pp. 541-545, 2010.
- [31] M. F. Silva, C. G. Costa, J. F. Ribeiro, J. P. Carmo, L. M. Goncalves, J. H. Correia, "Plataforma de Navegação Magnética Remota para Cápsulas Endoscópicas", *Annual Seminar of Automation, Industrial Electronics and Instrumentation*, pp. 563-565, 2012.
- [32] M. F. Silva, J. F. Ribeiro, L. M. Goncalves, J. P. Carmo, J. H. Correia, "Infra-estrutura magnética activa para a locomoção de cápsulas endoscópicas", *Sem. Dig. 2011 - XXXI Congresso Nacional de Gastroenterologia, Endoscopia Digestiva e Hepatologia*, 2011.
- [33] G. Ciuti, R. Donlin, P. Valdastrì, A. Arezzo, A. Menciassi, M. Morino P. Dario, "Robotic versus manual control in magnetic steering of an endoscopic capsule", *Endoscopy*, vol. 42, p. 148-152, 2010.

- [34] F. Carpi, C. Pappone, "Magnetic Maneuvering of Endoscopic Capsules by Means of a Robotic Navigation System", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 56, pp. 1482-1490, 2009.
- [35] F. Carpi, N. Kastelein, M. Talcott C. Pappone, "Magnetically Controllable Gastrointestinal Steering of Video Capsules", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 58, pp. 231-234, 2011.
- [36] F. Van Den Broek, P. Fockens, E. Dekker, "Review article: new developments in colonic imaging", *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, vol. 26, n. s2, pp. 91-99, 2007.
- [37] C. Gheorghe, "Narrow-Band Imaging Endoscopy for Diagnosis of Malignant and Premalignant Gastrointestinal Lesions", *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases* vol. 15, n. 1, pp.77-82, 2006
- [38] M. Kara, J. Bergman, "Autofluorescence imaging and narrow-band imaging for the detection of early neoplasia in patients with barrett's esophagus", *Endoscopy*, vol. 38, n. 6, pp. 627-631, 2006.
- [39] T. Matsumoto, T. Kudo, Y. Jo, M. Esaki, T. Yao, M. Iida, "Magnifying colonoscopy with narrow band imaging system for the diagnosis of dysplasia in ulcerative colitis a pilot study", *Gastrointestinal Endoscopy*, vol. 66, n. 5, pp. 957-965, 2007.
- [40] Kyung-Sun Ok, G. H. Kim, Y. Park, H. J. Lee, H. K. Jeon, D. H. Baek, B. E. Lee, G. A. Song, "Magnifying endoscopy with narrow band imaging for diagnosis of colorectal tumors", *Gastrointestinal Endoscopy*, vol. 65, n. 7, pp. 989-995, 2007.
- [41] A. Rastogi, J. Keighley, V. Singh, P. Callahan, A. Bansal, S. Wani, P. Sharma, "High Accuracy of Narrow Band Imaging Without Magnification for the Real-Time Characterization of Polyp Histology and Its Comparison", *The American Journal of Gastroenterology*, vol. 104, n. 10, pp. 2422-2430, 2009.
- [42] J. M. Jabbour, M. A. Saldua, J. N. Bixler, K. C. Maitland, "Confocal Endomicroscopy Instrumentation and Medical Applications", *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 40, n. 2, pp. 378-397, 2012.
- [43] T. D. Wang, "Confocal microscopy from the bench to the bedside", *Gastrointestinal Endoscopy*, vol. 62, n. 5, pp. 696-697, 2005.

- [44] H. Neumann, R. Kiesslich, M. B. Wallace, M. F. Neurath, "Confocal Laser Endomicroscopy: Technical Advances and Clinical Applications", *Gastroenterology*, vol. 139, n. 2, pp. 388-392, 2010.
- [45] V. M. Ussui, M. B. Wallace, "Confocal Endomicroscopy of Colorectal Polyps", *Gastroenterology Research and Practice*, vol. 2012, p. 6, 2011.
- [46] K. B. Dunbar, M. I. Canto, MD, "Confocal endomicroscopy", *Techniques in Gastrointestinal Endoscopy*, vol. 12, pp. 90-99, 2010.
- [47] R. Kiesslich, M. Goetz, M. F. Neurath, "Confocal Laser Endomicroscopy for Gastrointestinal Diseases", *Gastrointestinal Endoscopy Clinics of North America*, vol. 18, n. 3, pp. 451-466, 2008.
- [48] B. T. Petersen, R. Chuttani, J. Croffie, J. DiSario, J. Liu, D. Mishkin, R. Shah, L. Somogyi, W. Tierney, L. M. Wong Kee Song, "Photodynamic therapy for gastrointestinal disease", *Gastrointestinal Endoscopy*, vol. 63, n 7, pp. 927-932, 2006.
- [49] S. Yano, S. Hirohara, M. Obata, Y. Hagiya, S. Ogura, A. Ikeda, H. Kataoka, M. Tanaka, T. Joh, "Current states and future views in photodynamic therapy", *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews*, vol. 12, n 1, pp. 46-67, 2011.
- [50] M. Panjehpour, B. F. Overholt, "Photodynamic Therapy for Barrett's Esophagus", *Frontiers of Gastrointestinal Research*, vol. 27, pp. 128-139, 2010.
- [51] P. Mlkvy, H. Messmann, H. Debinski, J. Regula, M. Conio, A. MacRobert, A. Spigelman, R. Phillips and S. G. Bown, "Photodynamic therapy for polyps in familial adenomatous polyposis - a pilot study", *European Journal of Cancer*, vol. 31A, n. 7 e 8, pp. 1160-1165, 1995.
- [52] S. V. Kantsevov, D. G. Adler, J. D. Conway, D. L. Diehl, F. A. Farraye, R. Kwon, P. Mamula, S. Rodriguez, R. J. Shah, L. M. Wong Kee Song, W. M. Tierney, "Endoscopic mucosal resection and endoscopic submucosal dissection", *Gastrointestinal Endoscopy*, vol. 68, n 1, pp. 11-18, 2008.
- [53] R. Ackroyd, C. Kelty, N. Brown, M. Reed, "The History of Photodetection and Photodynamic Therapy", *Photochemistry and Photobiology*, vol. 74, n 5, pp. 656-669, 2001.

- [54] D. Mitton, R. Ackroyd, "A brief overview of photodynamic therapy in Europe", *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 5, n 2, pp. 103-111, 2008.
- [55] H. H. Lee, M. G. Choi, T. Hasan, "Application of photodynamic therapy in gastrointestinal disorders an outdated or re-emerging technique?", *The Korean Journal of Internal Medicine* vol. 32, n. 1, 2017.
- [56] M. Scholz e R. Dedic, "New Trends in Photodynamic Therapy Research", *WDS'12 Proceedings of Contributed Papers*, pp. 46-51, 2012.
- [57] T. G. St. Denis, T. Dai, L. Izikson, C. Astrakas, R. R. Anderson, M. R. Hamblin, G. P. Tegos, "All you need is light: Antimicrobial photoinactivation as an evolving and emerging discovery strategy against infectious disease", *Virulence*, vol. 2, n. 6, pp. 509-520, 2011.
- [58] D. Dave, U. Desai, N. Despande, "Photodynamic Therapy: A View through Light", *Journal of Orofacial Research*, vol. 2, n. 2, pp. 82-86, 2012.
- [59] I. Yoon, J. Z. Li, Y. K. Shim, "Advance in Photosensitizers and Light Delivery for Photodynamic Therapy", *Clinical Endoscopy*, vol. 46, pp. 7-23, 2013.
- [60] R. R. Allison, C. H. Sibata, "Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review", *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 7, n. 2, pp. 61-75, 2010.
- [61] B. Bae, K. Na, "Development of Polymeric Cargo for Delivery of Photosensitizer in Photodynamic Therapy", *International Journal of Photoenergy*, vol. 2012, p 14, 2011.
- [62] A. B. Ormond, H. S. Freeman, "Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy", *Materials (Basel)*, vol. 6, n. 3, pp. 817-840, 2013.
- [63] C. M. N. Yow, C. K. Wong, Z. Huang, R. J. Ho, "Study of the efficacy and mechanism of ALA-mediated photodynamic therapy on human hepatocellular carcinoma cell", *Liver International*, n. 2, pp. 201-208, 2007.
- [64] M. Wachowska, A. Muchowicz, M. Firczuk, M. Gabrysiak, M. Winiarska, M. Wańczyk, K. Bojarczuk, J. Golab, "Aminolevulinic Acid (ALA) as a Prodrug in Photodynamic Therapy of Cancer", *Molecules*, vol. 16, pp. 4140-4164, 2011.
- [65] Q. Peng, T. Warloe, K. Berg, J. Moan, M. Kongshaug, K. E. Giercksky, J. M. Nesland, "5-Aminolevulinic acid-based photodynamic therapy. Clinical research and future challenges", *American Cancer Society*, vol. 79, n. 12, pp. 2282-2308, 1997.

- [66] R. R. Allison, K. Moghissi, "Oncologic photodynamic therapy: Clinical strategies that modulate mechanisms of action", *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, p 11, 2013.
- [67] F. Fanjul-Vélez, J. L. Arce-Diego, "Light Propagation in Turbid Media: Application to Biológicoal Tissues", *Proceedings of 21st International Conference Radioelektronika 2011*, pp. 7-10, 2011.
- [68] R. R. Allison, G. H. Downie, R. Cuenca, X.-H. Hu, C. J. H. Childs, C. H. Sibata, "Photosensitizers in clinical PDT", *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 1, n. 1, pp. 27-42, 2004.
- [69] M. S. Mathews, E. Angell-Petersen, R. Sanchez, C.-H. Sun, V. Vo, H. Hirschberg, S. J. Madsen, "The Effects of Ultra Low Fluence Rate Single and Repetitive Photodynamic Therapy on Glioma Spheroids", *Lasers in Surgery and Medicine*, vol. 41, n. 8, pp. 578-584, 2009.
- [70] L. S. Peloi, R. R. S. Soares, C. E. G. Biondo, V. R. Souza, N. Hioka, E. Kimura, "Photodynamic effect of light-emitting diode light on cell growth inhibition induced by methylene blue", *Journal of Biosciences*, vol. 33, n 2, pp. 231-237, 2008
- [71] H.-W. Wang, E. Rickter, M. Yuan, E. P. Wileyto, E. Glatstein, A. Yodh, T. M. Busch, "Effect of Photosensitizer Dose on Fluence Rate Responses to Photodynamic Therapy", *Photochemistry and Photobiology*, vol. 83, n 5, pp. 1040-1048, 2007.
- [72] A. S. Santos, L. C. Burchianti, N. A. Netto, V. A. P. Mazon, C. A. Malheiros, "Adenocarcinoma gástrico", *Arquivos Médicos dos Hospitais e da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo*, vol. 60, pp. 156-159, 2015.
- [73] A. M. A. A. Mader, F. R. S. Patrício, M. P. Rigueiro, L. G. Lourenço, "Estudo clínico-patológico, da proliferação celular e da apoptose no adenocarcinoma gástrico da cárdia", *Arquivos de Gastroenterologia*, vol. 43, n. 3, pp. 184-190, 2006.
- [74] C. T. F. Oshima, N. M. Forones, "AgNOR em Câncer Gástrico", *Arquivos de Gastroenterologia*, vol. 38, n. 2, pp. 89-93, 2001.
- [75] L. Fodor, M. Elman, Y. Ullman, "Light Tissue Interactions", *Aesthetic Applications of Intense Pulsed Light*, Springer-Verlag London Limited, pp 11-21, 2011.
- [76] Osram Opto Semiconductors, Datasheet, LR Q396-P1Q2-1.
- [77] Ocean Optics, Datasheet, USB4000.
- [78] Banco de Células do Rio de Janeiro, Datasheet, AGS (code 0311).

- [79] I. S. Leite, J. L. Vivero-Escoto, Z. Lyles, V. S. Bagnato, N. M. Inada, “In vitro evaluation of photodynamic therapy using redox-responsive nanoparticles carrying PpIX”, In Optical Methods for Tumor Treatment and Detection: Mechanisms and Techniques in Photodynamic Therapy XXVII. International Society for Optics and Photonics, vol. 10476, p. 104760W, 2018.
- [80] M. Barr, “Pulse Width Modulation”, Embedded Systems Programming, pp. 103-104, 2001
- [81] Europractice IC Service: low cost ASIC prototyping (MPW) and small-medium volume production, 0.7 μ m CMOS on-semiconductor (formerly AMI Semiconductor) 2-metals/1-poly process (C07-D0.7 μ m).
- [82] R. J. Barker, “CMOS Circuit Design, Layout, and Simulation”, IEEE Press Series on Microelectronic Systems, 3rd ed., 2010.
- [83] M. Dias, “Sistemas Digitais Princípios e Prática”, FCA - Editora de Informática Limitada, 3^a ed., 2012.
- [84] W. M. Lee, A. Upadhyay, P. J. Reece, T. G. Phan, “Fabricating Low Cost and High Performance Elastomer Lenses Using Hanging Droplets”, Biomedical Optics Express, vol. 5, n. 5, pp. 1626-1635, 2014.
- [85] R. Sun, H. Yang, D. M. Rock, R. Danaei, R. Panat, M. R. Kessler, L. Li, “Manufacturing PDMS micro lens array using spin coating under a multiphase system”, Journal of Micromechanics and Microengineering, vol. 27, p. 10, 2017.