



UDESC

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC

CENTRO DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS – CCT

CURSO DE MESTRADO EM ENGENHARIA ELÉTRICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO EXPERIMENTAL E
COMPUTACIONAL DE
ELETROPERMEABILIZAÇÃO DE TECIDOS
BIOLÓGICOS**

RODOLFO LAURO WEINERT

JOINVILLE, 2017

RODOLFO LAURO WEINERT

**ESTUDO EXPERIMENTAL E COMPUTACIONAL DE
ELETROPERMEABILIZAÇÃO DE TECIDOS BIOLÓGICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Elétrica.

Orientador: Airton Ramos

JOINVILLE – SC
2017

Ficha catalográfica elaborada pelo(a) autor(a), com
auxílio do programa de geração automática da
Biblioteca Setorial do CCT/UDESC

Weinert, Rodolfo Lauro
Estudo Experimental e Computacional de
Eletropermeabilização de Tecidos Biológicos / Rodolfo
Lauro Weinert. - Joinville , 2017.
131 p.

Orientador: Airton Ramos
Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado de
Santa Catarina, Centro de Ciências Tecnológicas,
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica,
Joinville, 2017.

1. Eletropermeabilização biológica. 2. método do
circuito equivalente. 3. simulação computacional. 4.
fígado de rato. 5. dinâmica da eletropermeabilização.
I. Ramos, Airton. II. Universidade do Estado de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação. III.
Título.

Estudo Experimental e Computacional de Eletropermeabilização de Tecidos

Biológicos

por

Rodolfo Lauro Weinert

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do título de

MESTRE EM ENGENHARIA ELÉTRICA

Área de concentração em “Sistemas Eletroeletrônicos”
e aprovada em sua forma final pelo

CURSO DE MESTRADO ACADÊMICO EM ENGENHARIA ELÉTRICA
CENTRO DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS DA
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA.

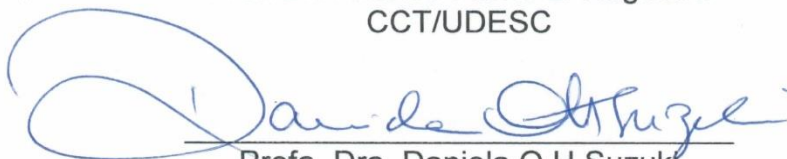
Banca Examinadora:



Prof. Dr. Airton Ramos
CCT/UDESC (Orientador/Presidente)



Prof. Dr. Antônio Flávio L. Nogueira
CCT/UDESC



Profa. Dra. Daniela O.H. Suzuki
UFSC

Joinville, SC, 27 de junho de 2017.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida.

Ao professor Airton Ramos, pela orientação e ensinamentos.

A professora Daniela Suzuki, pela infraestrutura disponibilizada na UFSC.

Ao Guilherme Pintarelli, pelos auxílios nos experimentos realizados na UFSC.

Ao Laboratório de Hormônios e Transdução de Sinais da UFSC, pela doação de material biológico.

Ao meu amigo Gustavo Knabben, pelas pernoites em Florianópolis.

Ao Professor Eduardo Manuel, pelo auxílio na elaboração do documento para o comitê de ética em uso animal e pelo fornecimento do material biológico.

Ao Biotério da Universidade da Região de Joinville – Univille, pela doação do material biológico.

Aos colegas de laboratório, pelas amizades.

Ao Laboratório de Eletromagnetismo, pela infraestrutura laboratorial.

À FAPESC, pela manutenção da bolsa de mestrado.

Ao MEC/SESu e FNDE.

À UDESC.

À minha família, em especial meus pais, Rubens e Roseli, meu irmão Rogério e a minha futura esposa Maria Eloize, por tudo.

“Duas coisas são infinitas: o universo e a estupidez humana. Mas, em relação ao universo, ainda não tenho certeza absoluta...” (Albert Einstein)

RESUMO

A eletropermeabilização biológica é um fenômeno muito estudado nas últimas décadas e ainda não existem modelos matemáticos que descrevam de maneira geral o comportamento dos tecidos biológicos submetidos a campos elétricos muito intensos.

O objetivo principal deste trabalho foi a avaliação preliminar por métodos computacionais e experimentais de um modelo de eletropermeabilização proposto. Para isso, um sistema eletrônico foi projetado e construído a fim de obter pulsos de alta tensão com forma de onda arbitrária e medir a tensão e corrente na amostra durante o tempo de estimulação. Este equipamento foi utilizado em experimentos com fígado de rato, nos quais foram adquiridas curvas de resposta da corrente elétrica para dois tipos de forma de onda da tensão aplicada: 1) pulsos retangulares com amplitude de 390 volts, duração de 5×10^{-4} segundos e razão cíclica de 50%; 2) rampas nas quais a tensão aplicada na amostra varia de zero a 400 volts com cinco diferentes tempos de subida: 1×10^{-4} , 2×10^{-4} , $3,5 \times 10^{-4}$, 5×10^{-4} e 1×10^{-3} segundos.

Um método computacional foi desenvolvido para obter a corrente de eletroporação a partir da corrente total, usando a compensação da corrente dispersiva a partir da medição da impedância elétrica do tecido antes do ensaio.

Um modelo de eletropermeabilização em tecidos biológicos foi proposto e uma avaliação preliminar foi realizada através do método do circuito equivalente, cujo programa de simulação foi desenvolvido em paralelo com as atividades práticas. As curvas de resposta obtidas por simulação foram confrontadas com os resultados experimentais e a minimização do erro quadrático médio foi parcialmente obtida através de diversas simulações nas quais os parâmetros do modelo foram sucessivamente ajustados.

Obtiveram-se ajustes considerados adequados nos quais o erro quadrático médio no período de variação da corrente foi menor que 5%. Conclui-se que o modelo proposto de eletropermeabilização de tecidos biológicos apresenta características que permitem a correta simulação computacional do fenômeno em fígado de rato e por isso justifica-se a continuidade dos estudos visando determinar sua validade para outros tipos de tecidos biológicos bem como o desenvolvimento de métodos otimizados para determinação de valores mais adequados para os parâmetros do modelo.

Palavras-chave: Eletropermeabilização biológica, método do circuito equivalente, simulação computacional, fígado de rato, dinâmica da eletropermeabilização, limiar de eletropermeabilização.

ABSTRACT

Biological electroporation is a phenomenon studied in the last decades and there are still no mathematical models that describe in general the behavior of biological tissues submitted to very intense electric fields.

The main objective this work was the preliminary evaluation by computational and experimental methods of a proposed electroporation model. For this, an electronic system was designed and constructed in order to obtain high voltage pulses with arbitrary waveform and to measure the voltage and current in the sample during the time of stimulation. This equipment was used in experiments with rat liver, in which electric current response curves were acquired for two types of applied voltage waveform: 1) rectangular pulses with amplitude of 390 volts, duration of 5×10^{-4} seconds and duty cycle 50%; 2) ramps in which the applied voltage in the sample ranges from zero to 400 volts with five different rise times: 1×10^{-4} , 2×10^{-4} , $3,5 \times 10^{-4}$, 5×10^{-4} and 1×10^{-3} seconds.

A computational method was developed to obtain the electroporation current from the total current, using the compensation of the dispersive current from the measurement of the electrical impedance of the tissue before the test.

A model of electroporation in biological tissues was proposed and a preliminary evaluation was performed through the equivalent circuit method, whose simulation program was developed in parallel with the practical activities. The response curves obtained by simulation were compared with the experimental results and the mean square error minimization was partially obtained through several simulations in which the parameters of the model were successively adjusted. Adequate adjustments were obtained in which the mean square error in the period of current variation was less than 5%. It is concluded that the proposed model of electroporation of biological tissues presents characteristics that allow the correct computational simulation of the phenomenon in rat liver and for that reason it is justified the continuity of the studies aiming to determine its validity for other types of biological tissues as well as the development of optimized methods for determining the most adequate values for the model parameters.

Key-words: Biological electroporation, equivalent circuit method, computational simulation, rat liver, electroporation dynamics, electroporation threshold.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Constante Dielétrica e Condutividade de fígado humano.....	32
Figura 2 – Representação de um modelo simplificado de célula com raio a , espessura da membrana h , E_0 é o campo aplicado e θ é o ângulo entre a direção do campo elétrico e o vetor normal à superfície da membrana.....	34
Figura 3 – Consequências da exposição de célula a campos elétricos.....	35
Figura 4 – (a) Poro hidrofóbico. (b) Poro hidrofílico.....	37
Figura 5 – Volumes retangulares adjacentes em um meio. Modelo geométrico para obtenção do circuito equivalente do material. V_n e V_m são os potenciais nos centros dos elementos n e m , respectivamente e i_{nm} é a corrente elétrica entre os volumes diferenciais.....	41
Figura 6 – Circuito equivalente para um meio linear, homogêneo e sem dispersão.....	42
Figura 7 – Circuito equivalente para uma dispersão de primeira ordem.....	43
Figura 8 – Circuito equivalente de um material biológico incluindo dispersões de primeira ordem.....	44
Figura 9 – Esquema de discretização espacial para aplicação da modelagem pelo circuito equivalente.....	45
Figura 10 – Esquema da metade do amplificador. (a) amplificador de tensão e (b) amplificador de potência.....	55
Figura 11 – Curva de transferência do amplificador.....	56
Figura 12 – Módulo do Amplificador (V/V).....	57
Figura 13 – Fase do Amplificador.....	57
Figura 14 – Filtro de EMI.....	58
Figura 15 – Transdutor de tensão.....	59
Figura 16 – Comparação entre resultados na medição de uma resistência com analisador de impedância e sonda A622.....	60
Figura 17 – Defasagem entre tensão e corrente.....	61
Figura 18 – Plataforma de desenvolvimento FRDM-KL25Z.....	62
Figura 19 – Interface Gráfica desenvolvida.....	63
Figura 20 – (a) Circuito para a eliminação do nível DC da saída do conversor DA; (b) Filtro passa baixa de estrutura Salley Key.....	65
Figura 21 – Sistema de condicionamento de sinais.....	65
Figura 22 – Detalhe para apresentação das formas de ondas adquiridas.....	67
Figura 23 – Fluxograma do algoritmo implementado no: (a) microcontrolador que gera sinais, (b) microcontrolador que digitaliza os sinais de tensão e corrente, (c) programa na interface gráfica do MATLAB®.....	69
Figura 24 – Sistema simplificado do projeto do eletroporador.....	71
Figura 25 – Curva de calibração da tensão aplicada.....	72
Figura 26 – Eletrodo utilizado para a aplicação de campo elétrico na amostra de fígado.....	73
Figura 27 – Resistência e reatância de uma amostra de fígado de rato medida com o sistema de eletrodos mostrado na Figura 26 e analisador Agilent® 4294A.....	74
Figura 28 – Sistema para acondicionamento e conservação da temperatura da amostra.....	76
Figura 29 – Condutância de uma amostra de fígado de rato.....	77
Figura 30 – Susceptância de uma amostra de fígado de rato.....	78
Figura 31 – Coeficientes do espectro da corrente I_{Dis}	79
Figura 32 – Forma de onda em função do tempo de I_{Dis}	79
Figura 33 – Formas de onda das correntes : I_{Tot} , I_{Ele} e I_{Dis}	80
Figura 34 – Variação da Condutância da amostra devido à eletroporabilização.....	81
Figura 35 – Forma de onda de I_{Tot} , I_{Ele} , I_{Dis} e V_{Ele} , para uma rampa com duração de 500 μs	82
Figura 36 – Ampliação do início da Figura 35.....	82

Figura 37 – Espectros de condutividade e constante dielétrica de fígado de rato.	89
Figura 38 – Comparação entre resultado experimental e resultado obtido com parâmetros do modelo Cole-Cole ajustados com algoritmo genético em 37 °C.....	90
Figura 39 – Forma de onda de tensão utilizada para obter os resultados da dinâmica da eletropermeabilização.	91
Figura 40 – Forma de onda da corrente de uma amostra de fígado de rato para estimulação com trem de pulsos de 390 V.....	93
Figura 41 – Condutância medida na temperatura de 22 °C. Os números indicam a sequência de pulsos.....	93
Figura 42 – Condutância medida na temperatura de 30 °C. Os números indicam a sequência de pulsos.....	94
Figura 43 – Condutância medida na temperatura de 37 °C. Os números indicam a sequência de pulsos.....	94
Figura 44 – Comportamento da condutância para o primeiro pulso.....	95
Figura 45 – Comportamento da condutância para o quinto pulso.	96
Figura 46 – Comportamento da condutância para o nono pulso.....	96
Figura 47 – Campo limiar de eletropermeabilização.....	98
Figura 48 – Correntes I_{Tot} e I_{Dis} para a rampa 400 V/100 μ s.	98
Figura 49 – Geometria utilizada para a simulação numérica com o método do circuito equivalente.....	101
Figura 50 – Comparação entre resultado experimental e numérico para a corrente na amostra a 22 °C.....	102
Figura 51 – Comparação entre resultado experimental e numérico para a corrente na amostra a 30 °C.....	103
Figura 52 – Comparação entre resultado experimental e numérico para a corrente na amostra a 37 °C.....	103
Figura 53 – Condutividade de eletropermeabilização média e condutividade integrada com ajuste dinâmico baseado nas equações (4.6) a (4.9).	106
Figura 54 – Comparação entre o resultado experimental e o numérico com ajuste dinâmico de parâmetros na temperatura de 22 °C.	106
Figura 55 – Comparação entre o resultado experimental e o numérico com ajuste dinâmico de parâmetros na temperatura de 30 °C.	107
Figura 56 – Comparação entre o resultado experimental e o numérico com ajuste dinâmico de parâmetros na temperatura de 37 °C.	107
Figura 57 – Corrente elétrica na amostra obtida numericamente para diversos valores do coeficiente c	109
Figura 58 – Corrente elétrica na amostra obtida numericamente para diversos valores do coeficiente d	110
Figura 59 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 100 μ s na temperatura de 22 °C.	111
Figura 60 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 100 μ s na temperatura de 30 °C.	111
Figura 61 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 100 μ s na temperatura de 37 °C.	112
Figura 62 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 200 μ s na temperatura de 22 °C.	113
Figura 63 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 200 μ s na temperatura de 30 °C.	113
Figura 64 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 200 μ s na temperatura de 37 °C.	114

Figura 65 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 350 μ s na temperatura de 22 °C.....	115
Figura 66 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 350 μ s na temperatura de 30 °C.....	115
Figura 67 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 350 μ s na temperatura de 37 °C.....	116
Figura 68 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 500 μ s na temperatura de 22 °C.....	117
Figura 69 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 500 μ s na temperatura de 30 °C.....	117
Figura 70 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 500 μ s na temperatura de 37 °C.....	118
Figura 71 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 1000 μ s na temperatura de 22 °C.....	119
Figura 72 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 1000 μ s na temperatura de 30 °C.....	119
Figura 73 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 1000 μ s na temperatura de 37 °C.....	120
Figura 74 – Comparação entre os valores ajustados de σ_{\max} nos diversos experimentos de eletropermeabilização.....	122
Figura 75 – Comparação entre os valores ajustados de τ_o nos diversos experimentos de eletropermeabilização.....	123
Figura 76 – Comparação entre os valores ajustados de τ_{\max} nos diversos experimentos de eletropermeabilização.....	123
Figura 77 – Comparação entre os valores ajustados de E_1 nos diversos experimentos de eletropermeabilização.....	124
Figura 78 – Comparação entre os valores ajustados de E_2 nos diversos experimentos de eletropermeabilização.....	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características dos transistores.	54
Tabela 2 – Valores dos resistores.	59
Tabela 3 – Valores de resistores utilizados no sistema de condicionamento.	66
Tabela 4 – Médias e desvios padrão de oito medidas de condutividade e constante dielétrica em 10 kHz.	88
Tabela 5 – Parâmetros do modelo Cole-Cole para a dispersão dielétrica em fígado de rato na faixa de frequências de 1 kHz a 1 MHz.	91
Tabela 6 – Médias e desvios padrões máximos dos valores de condutância (em Siemens). ...	97
Tabela 7 – Médias e desvios padrões máximos das correntes I_{Tot} , I_{Dis} e I_{Ele}	99
Tabela 8 – Parâmetros de simulação.	101
Tabela 9 – Parâmetros do modelo da eletropermeabilização ajustados para o primeiro pulso.	104
Tabela 10 – Parâmetros utilizados para a obtenção dos resultados mostrados nas Figuras 54, 55 e 56.	108
Tabela 11 – Erro quadrático médio relativo entre resultados numéricos e experimentais nas séries de simulações I (Figuras 50, 51, e 52) e II (Figuras 54, 55 e 56).	108
Tabela 12 – Parâmetros do modelo de eletropermeabilização para a rampa de tensão de 400 V/ 100 μ s.	112
Tabela 13 – Parâmetros do modelo de eletropermeabilização para a rampa de tensão de 400 V/ 200 μ s.	114
Tabela 14 – Parâmetros do modelo de eletropermeabilização para a rampa de tensão de 400 V/ 350 μ s.	116
Tabela 15 – Parâmetros do modelo de eletropermeabilização para a rampa de tensão de 400 V/ 500 μ s.	118
Tabela 16 – Parâmetros do modelo de eletropermeabilização para a rampa de tensão de 400 V/ 1000 μ s.	120
Tabela 17 – Erro quadrático médio relativo (em relação ao valor eficaz da corrente experimental) entre resultados numéricos e experimentais para estimulação com rampa de tensão com diferentes inclinações.	121

LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS

γ_m	Condutividade complexa promediada do composto
γ_p	Condutividade complexa da partícula
γ_d	Condutividade complexa do meio dispersor
p	Fração volumétrica
σ_m	Condutividade do composto
ϵ_m	Constante dielétrica do composto
σ_s	Condutividade em baixa frequência
ϵ_s	Permissividade em baixa frequência
σ_∞	Condutividade em alta frequência
ϵ_∞	Permissividade em alta frequência
τ	Constante de tempo de relaxação
ω	Frequência angular
K_B	Constante de Boltzmann
p_o	Momento de dipolo molecular permanente
n_i	Número de dipolos por unidade de volume
ϵ_o	Permissividade do espaço livre
σ_i	Condutividade estática
$\Delta\epsilon$	Magnitude da dispersão
h	Espessura da membrana plasmática
θ	Ângulo entre a direção do campo elétrico e o vetor normal à superfície da membrana
V_m	Potencial transmembrana
V_i	Potencial interno da membrana celular
V_o	Potencial externo da membrana celular
σ_{in}	Condutividades intracelular média
σ_{ex}	Condutividade extracelular média
τ_{car}	Tempo de carregamento da membrana
C_m	Capacitância da membrana por unidade de área
G_m	Condutância da membrana por unidade de área
	Raio do poro
γ	Tensão linear no poro
Γ	Tensão superficial
ϵ_w	Permissividade da água

ϵ_i	Permissividade dos lipídios do interior da membrana
D_p	Constante de difusão do raio do poro
ΔW_p	Energia de poro
N_o	Densidade de poros na membrana em regime permanente sem polarização
G_p	Condutância de um poro simples
λ	Mobilidade relativa da membrana
μ_m	mobilidade iônica na membrana
μ_a	mobilidade iônica da água
SA	Seção transversal
L	comprimento
σ	Condutividade elétrica
V	Tensão elétrica
i	Corrente elétrica
ϵ_r	Constante dielétrica
G_o	Condutância intacta por unidade de área
G_e	Condutância de eletropermeabilização
G_{eo}	Média volumétrica da condutância da membrana para o tecido intacto.
G_{max}	Condutância máxima
τ_{max}	Tempo de relaxação máximo.
k_t	Condutividade térmica do material
c_p	Calor específico
ρ	densidade do material
p_{diss}	Potência elétrica por unidade de volume dissipada no meio
P_{diss}	Potência total dissipada no volume
G_t	Condutância térmica
C_t	Capacitância térmica
Re	Operador de parte Real
Im	Operador de parte Imaginária
TBJ	Transistor Bipolar de Junção
P_{ori}	Polarização Orientacional
g_n	Coefficientes que indicam a importância relativa de cada termo com determinada constante de tempo
$n(r,t)$	Função de distribuição de densidade superficial de poros

$N(t)$	Função que descreve a dinâmica da densidade de poros
I_{Tot}	Corrente total
I_{Dis}	Corrente de dispersão
I_{Ele}	Corrente de eletropermeabilização
V_{Ele}	Tensão de eletropermeabilização
C_{dis}	Coefficientes de Fourier da corrente I_{Dis}
T_{ele}	Coefficientes de Fourier da tensão V_{Ele}
Y_{dis}	Admitância do tecido
G_{dis}	Condutância do tecido
B_{dis}	Susceptância do tecido
N_a	Número de harmônicas
G_a	Condutância experimental
Z	Impedância da amostra
D/A	Digital/Analógico
A/D	Analógico/Digital
f_s	Frequência fundamental
f_a	Frequência de amostragem
DC	Nível constante
bps	Bits por segundos
T	Temperatura
S	Superfície das faces desse bloco
f	frequência
d	Distância
A	Área
$\delta\sigma$	condutividade integrada

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	7
RESUMO.....	9
ABSTRACT	11
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	13
LISTA DE TABELAS	17
LISTA DE SÍMBOLOS E SIGLAS	19
1 INTRODUÇÃO	25
1.1 OBJETIVO GERAL	25
1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO.....	26
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	27
2.1 DISPERSÃO DIELÉTRICA EM TECIDOS BIOLÓGICOS.....	27
2.1.1 Mecanismos de dispersão dielétrica em tecidos biológicos	27
2.1.2 MODELOS DE DISPERSÃO DIELÉTRICA EM TECIDOS BIOLÓGICOS	30
2.2 CONCEITOS DA ELETROPERMEABILIZAÇÃO.....	32
2.2.1 A membrana celular	33
2.2.2 Potencial transmembrana	34
2.2.3 Modelos da eletropermeabilização.....	36
2.2.4 Técnicas numéricas usadas na modelagem da eletropermeabilização de células e tecidos.....	40
2.2.5 Técnicas experimentais de caracterização da eletropermeabilização em células e tecidos.....	46
2.2.6 Terapias baseadas na eletropermeabilização biológica	49
2.2.7 Equipamentos e métodos usados na eletroquimioterapia de tumores	51
3 MATERIAIS E MÉTODOS	53
3.1 PROJETO DO SISTEMA ELETRÔNICO.....	53
3.1.1 O amplificador	53
3.1.2 Fontes de alimentação	58
3.1.3 Transdutor de tensão	58
3.1.4 Transdutor de corrente	60
3.1.5 Sistema de aquisição de dados	62
3.1.6 Geração de sinais.....	63
3.1.7 Aquisição de sinais.....	65
3.1.8 Programação e software	67
3.1.9 Concepção do projeto.....	70
3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	72
3.2.1 Amostras biológicas	72
3.2.2 Eletrodos	73

3.2.3	Polarização de eletrodo	73
3.2.4	Protocolos de eletropermeabilização	75
3.2.5	Coleta de dados	75
3.2.6	Modelo matemático para a dinâmica e limiar de eletropermeabilização	76
3.2.7	Simulação numérica da eletropermeabilização	83
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
4.1	PROPRIEDADES DIELÉTRICAS DO FÍGADO DE RATO	88
4.2	DINÂMICA DA ELETROPERMEABILIZAÇÃO	91
4.3	LIMIAR DE ELETROPERMEABILIZAÇÃO	97
4.4	SIMULAÇÃO.....	100
4.4.1	Simulação da dinâmica da eletropermeabilização	100
4.4.2	Simulação da resposta à rampa de tensão	110
5	CONCLUSÕES.....	125
	REFERÊNCIAS	128

1 INTRODUÇÃO

A eletroporação é o processo de abertura de poros na membrana plasmática de células biológicas expostas a campos elétricos intensos (CHEN, SMYE, *et al.*, 2006). Quando tecidos biológicos ou células em suspensão são expostas a campos elétricos intensos ocorre a movimentação de íons presentes no meio intracelular e extracelular para as proximidades da membrana plasmática, aumentando assim o potencial transmembrana (V_m). Para que a eletroporação ocorra, é necessário que V_m atinja entre 200 mV e 1 V (CHEN, SMYE, *et al.*, 2006).

A intensa experimentação que houve em torno desse fenômeno nas últimas décadas concentrou-se em grande parte na caracterização elétrica da amostra eletroporada (TEISSEI e ROLS, 1993), (KOTNIK, MIR, *et al.*, 2001), transferência de marcadores iônicos e macromoléculas através da membrana (LEBAR e MIKLAVCIC, 2001), (MIR, BANOUN e PAOLETTI, 1988) e desenvolvimento de protocolos específicos para aplicações clínicas (CHANG, CHASSY, *et al.*, 1992), (GEHL, 2003). Também houve experimentos que mostraram certos aspectos fundamentais do processo como a visualização da distribuição de potencial elétrico na membrana durante a eletroporação com o uso de marcadores fluorescentes em ovos de ouriço do mar (KINOSITA JR, ASHIKAWA, *et al.*, 1988) e a visualização por microscopia de transmissão eletrônica em membranas de eritrócitos humanos congeladas rapidamente após a estimulação elétrica (CHANG, 1992). Em ambos os experimentos houve evidências muito claras da ocorrência de eletroporação em certas regiões da membrana celular.

Contudo, a dinâmica da eletroporação ainda não é completamente compreendida. Um dos motivos é a utilização de métodos indiretos para a avaliação do fenômeno, como a medição da variação da condutividade do tecido ao invés da condutância da membrana celular. Outro aspecto é a ordem das grandezas envolvidas, pois os poros possuem diâmetros de nanômetros e o tempo de surgimento é de nano a microssegundos (RAMOS, SCHNEIDER, *et al.*, 2012). Outro fato que dificulta o entendimento do fenômeno é a intensa dispersão dielétrica presente nos tecidos biológicos na faixa de frequências na qual os experimentos de eletroporação geralmente são realizados.

1.1 OBJETIVO GERAL

Realizar uma avaliação da qualidade na simulação computacional da eletropermeabilização em fígado de rato por meio de um modelo de eletropermeabilização

desenvolvido no âmbito do método do circuito equivalente e obter os parâmetros do modelo que minimizam o erro quadrático médio dos resultados numéricos quando comparados com resultados experimentais em condições idênticas de estimulação.

Objetivos específicos

- Desenvolver circuitos eletrônicos para estimular tecidos biológicos com pulsos de alta tensão e medir a corrente de resposta.
- Realizar experimentos com fígado de rato e obter a condutância de eletropermeabilização para duas formas de onda: pulsos retangulares e rampas.
- Realizar simulações computacionais com o método do circuito equivalente e ajustar os parâmetros do modelo de eletropermeabilização para minimizar o erro quadrático médio entre as respostas numérica e experimental da corrente elétrica na amostra.

1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO

Esse trabalho está dividido em quatro capítulos, descritos brevemente a seguir.

O Capítulo 2 apresenta a fundamentação teórica sobre a dispersão dielétrica e a eletropermeabilização biológica. O Capítulo 3 apresenta o projeto do circuito eletrônico e as características do amplificador. São também descritos os procedimentos experimentais e a metodologia utilizada para a análise e obtenção dos resultados. O Capítulo 4 apresenta as curvas de impedância de fígado de rato, a variação da condutância das amostras durante os experimentos de eletropermeabilização com pulsos retangulares, o limiar de eletropermeabilização obtido com rampas de tensão e os resultados numéricos. O Capítulo 5 apresenta as considerações finais e as propostas para trabalhos futuros.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 DISPERSÃO DIELÉTRICA EM TECIDOS BIOLÓGICOS

Tecidos biológicos são caracterizados por possuir alta constante dielétrica e baixa condutividade em uma ampla faixa de frequência que se estende de zero a centenas de megahertz devido à intensa interação de íons alcalinos e halógenos hidratados, moléculas de água e proteínas com as membranas lipídicas que revestem as células e suas organelas (FOSTER e SCHWAN, 1995). Esses mecanismos de interação causam intensa polarização elétrica e dispersão dielétrica, fatos que serão discutidos a seguir.

2.1.1 Mecanismos de dispersão dielétrica em tecidos biológicos

Os principais mecanismos de dispersão dielétrica em tecidos biológicos são: polarização interfacial, relaxação dipolar e polarização de dupla camada iônica.

a) Polarização interfacial;

A polarização interfacial ocorre devido ao acúmulo de cargas elétricas nas interfaces entre dois meios com diferentes condutividades e permissividades (RAMOS, 2016).

Considerando um sistema formado por partículas esféricas em uma solução com propriedades dielétricas diferentes da partícula, a relação entre a condutividade complexa promediada do composto (γ_m) e as condutividades complexas da partícula (γ_p) e do meio dispersor (γ_d) é dado pela equação (2.1) (RAMOS, 2016).

$$\frac{\gamma_m - \gamma_d}{\gamma_m + 2\gamma_d} = p \frac{\gamma_p - \gamma_d}{\gamma_p + 2\gamma_d} \quad (2.1)$$

A equação (2.1) é conhecida como modelo de Maxwell-Wagner onde p é a fração volumétrica das partículas suspensas. A contribuição de Maxwell para a equação (2.1) consiste em dois processos. Primeiro, ele resolveu a equação de Laplace para determinar o campo elétrico ao redor de uma única partícula. Segundo, ele calculou a condutividade para uma esfera grande que continha muitas partículas no seu interior. Maxwell considerou campos estáticos em sua análise. Wagner estendeu essa análise para correntes alternadas e transformou a equação

(2.1) em um conjunto de equações de dispersão. Isso pode ser feito considerando condutividades complexas ao invés de condutividades reais (FOSTER e SCHWAN, 1995).

Isolando a condutividade complexa do composto (γ_m) na equação (2.1) e substituindo as equações (2.2) e (2.3) e ao separar em parte real e imaginária é possível obter a condutividade e a constante dielétrica do composto como é apresentado nas equações (2.4) e (2.5) (RAMOS, 2016).

$$\gamma_p = \sigma_p + j\omega\varepsilon_p \quad (2.2)$$

$$\gamma_d = \sigma_d + j\omega\varepsilon_d \quad (2.3)$$

$$\sigma_m = \sigma_s + \frac{(\sigma_\infty - \sigma_s)\omega^2\tau_{int}^2}{1 + \omega^2\tau_{int}^2} \quad (2.4)$$

$$\varepsilon_m = \varepsilon_\infty + \frac{(\sigma_s - \sigma_\infty)}{1 + \omega^2\tau_{int}^2} \quad (2.5)$$

Onde σ_s e ε_s , σ_∞ e ε_∞ são a condutividade e a permissividade em baixa e alta frequência, respectivamente, e τ_{int} é a constante de tempo de relaxação para a polarização interfacial. As equações (2.4) e (2.5) apresentam dispersões de primeira ordem, conhecidas como dispersões de Debye.

b) Relaxação Dipolar;

A relaxação dipolar é devido a uma orientação parcial dos dipolos permanentes. A relaxação dipolar da água é o efeito dominante em tecidos biológicos na frequência de micro-ondas, também se faz presente em moléculas de proteínas (FOSTER e SCHWAN, 1995).

Quando é aplicado um campo elétrico sobre dipolos, os mesmos tendem a se alinhar com o campo aplicado de modo a reduzir a energia potencial. Entretanto, devido à agitação térmica e interações com as moléculas vizinhas ocasiona um espalhamento dos dipolos moleculares de forma aleatória (RAMOS, 2016).

Para o cálculo do momento dipolo molecular médio que é dado pela equação (2.6), considera-se que os dipolos moleculares estão em equilíbrio termodinâmico com o meio ambiente e com o campo elétrico. Aplica-se então a distribuição de probabilidade de Boltzmann no cálculo do valor médio do dipolo elétrico na direção do campo aplicado (RAMOS, 2016).

$$\langle \vec{p} \rangle = \frac{p_o^2}{3K_B T} \vec{E}_d \quad (2.6)$$

Onde K_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura em grau Kelvin, p_o é o momento de dipolo molecular permanente e \vec{E}_d é o campo diretor. A partir desse resultado, é possível calcular a polarização orientacional em regime permanente para um campo constante como é mostrada na equação (2.7), sendo n_i o número de dipolos por unidade de volume (RAMOS, 2016),

$$\vec{P}_{ori} = \sum_{i=1}^N \frac{n_i p_{oi}^2}{3K_B T} \vec{E}_d. \quad (2.7)$$

Quando o campo elétrico é cancelado, dipolos moleculares voltam para o estado de espalhamento aleatório e a polarização propende a zero. Esse processo é chamado de relaxação dielétrica e a equação (2.8) apresenta a sua relação dinâmica (RAMOS, 2016).

$$\frac{d\vec{P}_{ori}(t)}{dt} = \frac{\vec{P}_{ori}(\infty) - \vec{P}_{ori}(t)}{\tau_{ori}} \quad (2.8)$$

Onde $\vec{P}_{ori}(\infty)$ é o valor obtido na equação (2.7) e τ_{ori} é a constante de tempo de relaxação. Esse modelo é aplicável somente em substâncias puras e homogêneas. Em misturas com vários tipos diferentes de moléculas pode-se aplicar a equação (2.8), entretanto, deve ser levado em consideração os vários tempos de relaxação.

c) Polarização de Dupla Camada Iônica.

A interface entre uma superfície eletricamente carregada e uma nuvem de cargas livres é uma região de carga espacial chamada de dupla camada elétrica. A força eletrostática de interação com a carga superficial atrai íons de sinal contrário e repele íons de mesmo sinal (RAMOS, 2016).

Pesquisadores relataram o fenômeno de polarização de dupla camada iônica em sistemas que contêm superfícies carregadas como: emulsões, micro-organismos, e macromoléculas de cadeia longa como o DNA. A polarização de dupla camada iônica contribui para a banda de dispersão α que é presente em tecidos biológicos em baixas frequências (FOSTER e SCHWAN, 1995).

O cálculo da dispersão dielétrica macroscópica no meio é apresentada na equação (2.9). Refere-se à variação da constante dielétrica complexa de uma suspensão de partículas esféricas

dielétricas com raio R e fração volumétrica p em um meio no qual a densidade de íons contrários é n_o . (RAMOS, 2016).

$$\Delta\hat{\epsilon} = \frac{9p}{4\left(1 + \frac{p}{2}\right)^2} \frac{3e^2 R n_o}{2\epsilon_o K_B T} \frac{1}{1 + j\omega\tau_{\text{dif}}} \quad (2.9)$$

Onde e é a carga elétrica do próton, K_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, ω é a frequência angular do campo elétrico aplicado e τ_{dif} é a constante de tempo de relaxação. Pode-se concluir que a difusão iônica na dupla camada se manifesta como uma dispersão dielétrica de primeira ordem no meio.

2.1.2 MODELOS DE DISPERSÃO DIELETRICA EM TECIDOS BIOLÓGICOS

No espectro de condutividade e permissividade de tecidos biológicos é possível observar três bandas de dispersão, α , β e γ para baixa, média e altas frequências e outras dispersões menores representados pela banda δ (GABRIEL, LAU e GABRIEL, 1996). O modelo de dispersão dielétrica apresentado na equação (2.5), é conhecido como modelo de Debye e modela dispersões de primeira ordem com uma única constante de tempo. Entretanto devido às bandas de dispersões presentes nos tecidos biológicos a modelagem do processo dispersivo por apenas uma constante de tempo de relaxação não é adequada. Uma solução é o uso de uma distribuição discreta de tempos de relaxação como é apresentado na equação (2.10), onde os coeficientes g_n indicam a importância relativa de cada termo com constante de tempo τ_n , ϵ_s é a permissividade com $\omega\tau_n \ll 1$ e n é o índice da banda de dispersão (RAMOS, 2016).

$$\hat{\epsilon}(\omega) = \epsilon_\infty + (\epsilon_s - \epsilon_\infty) \sum_n \frac{g_n}{1 + j\omega\tau_n} \quad (2.10)$$

Outra solução é o uso de uma distribuição contínua de tempos de relaxação conforme é apresentado na equação (2.11).

$$\hat{\epsilon}(\omega) = \epsilon_\infty + (\epsilon_s - \epsilon_\infty) \int_0^\infty \frac{g(\tau) d\tau}{1 + j\omega\tau} \quad (2.11)$$

No entanto, devido à heterogeneidade das estruturas e composição dos materiais biológicos o uso de apenas um tempo de relaxação não representará adequadamente o comportamento médio macroscópico da dispersão dielétrica. Assim é necessário aumentar o número de tempos de relaxação para cada banda de dispersão. Um dos modelos mais utilizados

para a representação de espectros em materiais biológicos é a função empírica Cole-Cole apresentada na equação (2.12) (GABRIEL, LAU e GABRIEL, 1996).

$$\hat{\varepsilon}(\omega) = \varepsilon_{\infty} + \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_{\infty})}{1 + (j\omega\tau_0)^{1-\alpha}} \quad (2.12)$$

Onde α é um parâmetro que deve ser ajustado empiricamente e possui valor menor que a unidade ($\alpha < 1$), e τ_0 é o tempo de relaxação central da distribuição.

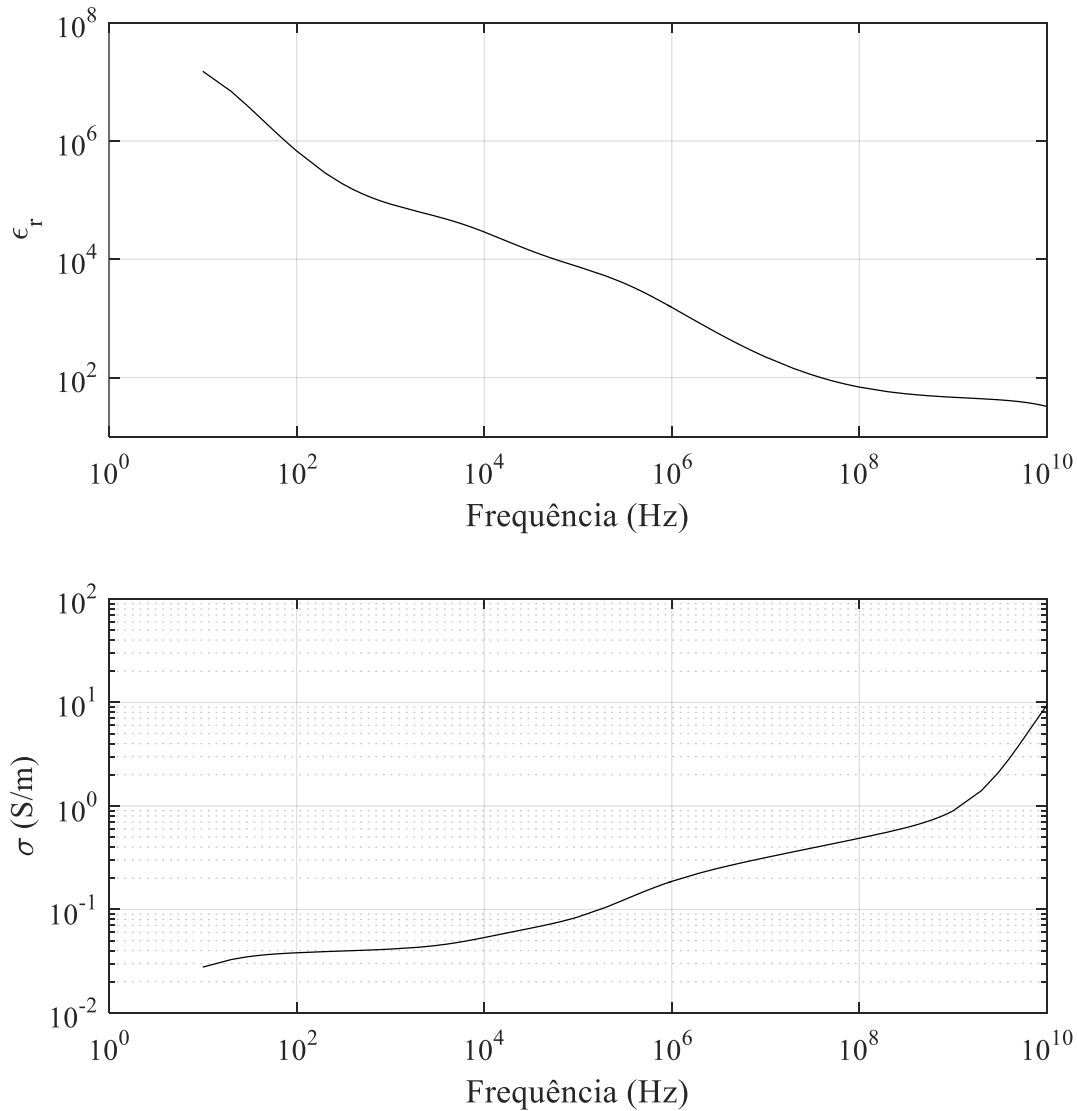
O espectro de dispersão dos tecidos biológicos pode ser representado com múltiplos termos de dispersão na equação de Cole-Cole, como é apresentado na equação (2.13), onde σ_i é a condutividade estática e ε_0 é a permissividade do espaço livre, $\Delta\varepsilon$ é a magnitude da dispersão e n é o índice referente à banda de dispersão (GABRIEL, LAU e GABRIEL, 1996).

$$\hat{\varepsilon}(\omega) = \varepsilon_{\infty} + \sum_n \frac{\Delta\varepsilon_n}{1 + (j\omega\tau_n)^{(1-a_n)}} + \frac{\sigma_i}{j\omega\varepsilon_0} \quad (2.13)$$

Na Figura 1 é apresentado o espectro de dispersão dielétrica de fígado humano reproduzido a partir dos parâmetros dados por Gabriel *et al.* (GABRIEL, LAU e GABRIEL, 1996) inseridos na equação (2.13). Os autores ajustaram os parâmetros do modelo de Cole-Cole para as curvas experimentais com frequências de 10 Hz até 100 GHz.

Na Figura 1 é possível observar a intensa dispersão dielétrica presente em tecidos biológicos, nesse caso o fígado humano. É possível observar quatro bandas de dispersão. Entretanto, ao levar em consideração os protocolos utilizados em eletropermeabilização, com pulsos de tensão de duração entre 100 μ s a 1 ms (MIKLAVCIC, MALI, *et al.*, 2014), podemos desconsiderar as frequências acima de 1 MHz porque 99% da energia dos sinais envolvidos está contida em componentes espectrais abaixo dessa frequência.

Figura 1 – Constante Dielétrica e Condutividade de fígado humano.



Fonte: (GABRIEL, LAU e GABRIEL, 1996).

2.2 CONCEITOS DA ELETROPERMEABILIZAÇÃO

A eletropermeabilização ou eletroporação é um processo de abertura de poros na membrana plasmática de células expostas a campos elétricos intensos (CHEN, SMYE, *et al.*, 2006). O fenômeno da eletropermeabilização celular é conhecido há várias décadas e tem aplicação em biologia, biotecnologia e medicina (WEAVER e CHIZMADZHEV, 1996).

Um dos primeiros trabalhos sobre a ruptura reversível da membrana plasmática é atribuído a Stämpfli em 1958. No final da década de 1960, foi relatada a morte de microrganismos por pulsos elétricos por Sale e Hamilton. Nos anos de 1970 a

eletropermeabilização foi observada em vesículas por Neumann e Rosenheck e o conceito de formação de poros na membrana plasmática é introduzido por Kinosita e Tsong (SUZUKI, 2009). Após esses trabalhos, houve uma grande exploração e foram obtidos vários resultados numéricos e experimentais, por exemplo, o transporte molecular eletricamente estimulado em glóbulos vermelhos por Kinosita e Tsong, e o aumento da condutância de membrana por Zimmermann, Beckers e Benz (FARIAS, 2015).

Quando o tecido biológico ou células são expostas a campos elétricos intensos ocorre a movimentação dos íons presentes no meio intracelular e extracelular para as proximidades da membrana plasmática, aumentando assim o potencial transmembrana – V_m . O fenômeno da eletropermeabilização ocorre quando V_m excede em muito seu valor fisiológico, ou seja, para que a eletropermeabilização ocorra, é necessário que V_m atinja entre 200 mV e 1 V (CHEN, SMYE, *et al.*, 2006). Se o V_m ultrapassar 1 V, a membrana celular não se recupera levando à morte celular. Esse processo é chamado de eletropermeabilização irreversível (WEAVER e CHIZMADZHEV, 1996).

A eletropermeabilização possui aplicações em: introdução de plasmídeos ou moléculas de DNA para o interior da célula pela transferência genética; inserção de proteínas na membrana celular; fusão de células para a ocorrência de heterocariose, hidridoma, embriões híbridos entre outros; aumento da transferência de drogas para o interior da célula e conseqüentemente eficácia na eletroquimioterapia; alteração da expressão genética em células vivas (TSONG, 1991).

2.2.1 A membrana celular

A membrana celular possui diversas funções para a célula. Controla as trocas de substâncias entre os meios intracelular e extracelular, fornece estrutura, força mecânica e controle do volume celular. A membrana plasmática é composta por duas camadas de fosfolipídios intercaladas com proteínas e colesterol. Os fosfolipídios são constituídos por cabeças polares de fosfato e por ácidos graxos hidrofóbicos como ilustrado mais adiante na Figura 4 (a). A organização da dupla camada de fosfolipídios intercalada com os canais de proteínas controla a troca de substâncias entre os meios intracelular e extracelular, enquanto que, as moléculas de colesterol ajudam na estabilidade da membrana evitando movimentos laterais intensos (ENDERLE, BLANCHARD e BRO, 1999).

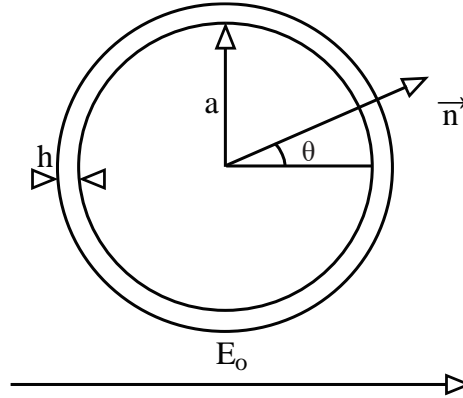
Moléculas de água, oxigênio e dióxido de carbono facilmente atravessam a membrana celular, enquanto outras substâncias como íons ou grandes moléculas precisam se mover pelos canais de proteínas (ENDERLE, BLANCHARD e BRO, 1999).

2.2.2 Potencial transmembrana

Quando uma célula está em repouso, V_m possui valor aproximado entre -70 mV e -80 mV. Essa diferença de potencial é devido à presença de íons principalmente de sódio, potássio e cloretos presentes nos meios intracelular e extracelular. A membrana celular tem espessura de cerca de 4 nanômetros, assim o campo elétrico através da membrana devido ao potencial de repouso é muito intenso, da ordem de 20 MV/m (DAVIES, BLAKELEY e KIDD, 2001).

Quando a célula é exposta a um campo elétrico externo, ocorre um deslocamento de íons que se acumulam em ambos os lados da membrana celular (SUZUKI, 2009). Na ilustração da Figura 2 observa-se o esboço da seção transversal de uma única célula esférica, com raio a e espessura h imersa em um líquido condutor iônico sob um campo elétrico uniforme E_o . O potencial V_m é dado pela equação (2.14) (RAMOS, SUZUKI e MARQUES, 2006), (KINOSITA JR, HIBINO, *et al.*, 1992).

Figura 2 – Representação de um modelo simplificado de célula com raio a , espessura da membrana h , E_o é o campo aplicado e θ é o ângulo entre a direção do campo elétrico e o vetor normal à superfície da membrana.



Fonte: próprio autor.

$$V_m = -1,5faE_o \cos \theta \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau_{car}}} \right) \quad (2.14)$$

$$\tau_{car} = faC_m \left(\frac{1}{\sigma_{in}} + \frac{1}{2\sigma_{ex}} \right) \quad (2.15)$$

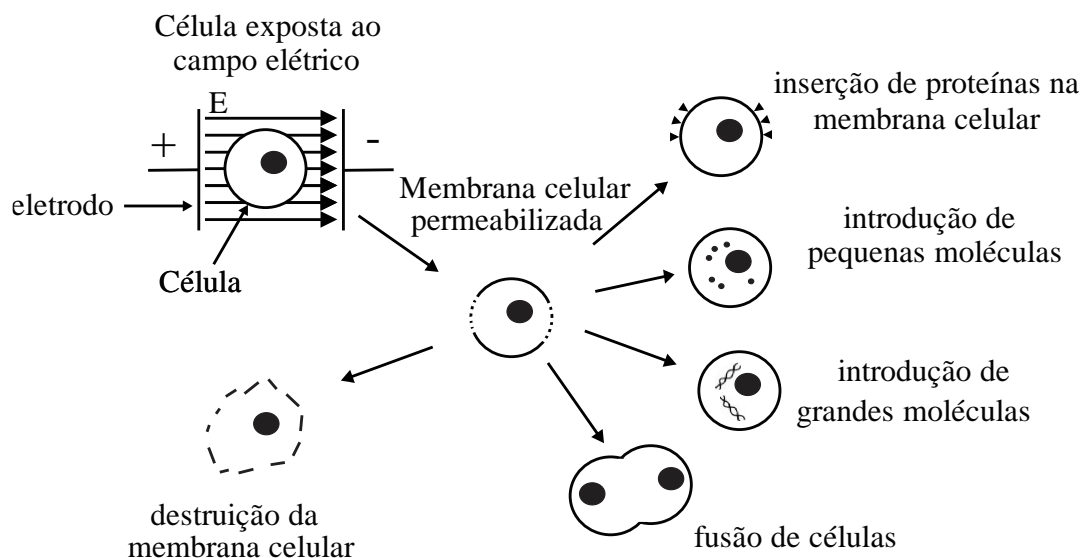
$$f = \frac{1}{\left[1 + aG_m \left(\frac{1}{\sigma_{in}} + \frac{1}{\sigma_{ex}} \right) \right]} \quad (2.16)$$

Onde, o potencial V_m também pode ser expresso pela diferença $V_m = V_i - V_o$, V_i e V_o são os potenciais internos e externos da membrana celular, respectivamente. θ é o ângulo entre a direção do campo e o vetor normal à superfície da membrana relativo ao centro da célula. τ_{car} é o tempo de carregamento da membrana. C_m é a capacitância da membrana por unidade de área, σ_{in} e σ_{ex} são as condutividades intracelular e extracelular média, e G_m é a condutância da membrana por unidade de área. Para células intactas (não eletropermeabilizadas), G_m é muito pequeno, sendo $f=1$ (KINOSITA JR, HIBINO, *et al.*, 1992).

O modelo matemático para V_m apresentado na equação (2.14) foi desenvolvido para uma célula no formato esférico, dessa forma, ao utilizar esse modelo deve-se ter cautela, uma vez que em geral as células não possuem essa forma geométrica.

A Figura 3 ilustra uma série de aplicações da eletropermeabilização dependendo do valor de V_m tais como: fusão de células, introdução de grandes moléculas, introdução de pequenas moléculas, inserção de proteínas na membrana celular e destruição da membrana celular (PUC, COROVIC, *et al.*, 2004), (SUZUKI, 2009).

Figura 3 – Consequências da exposição de célula a campos elétricos.



Fonte: Adaptado de (PUC, COROVIC, *et al.*, 2004), (SUZUKI, 2009).

2.2.3 Modelos da eletropermeabilização

a) Modelo de Poro

Conforme os trabalhos de revisão apresentados por Chen *et al.* (CHEN, SMYE, *et al.*, 2006) e Weaver e Chizmadzhev (WEAVER e CHIZMADZHEV, 1996), o modelo de poro considera a bicamada lipídica como um sistema metaestável (fenômeno em que o sistema permanece em uma configuração diferente da de menor energia), devido à tensão superficial resultante da interação das moléculas lipídicas com a água. Quando um poro circular é criado há um ganho de energia devido ao alargamento das distâncias intermoleculares no perímetro do poro e uma redução devido à eliminação de uma área da membrana em contato com a água. A equação (2.17) apresenta a formulação matemática para a contribuição mecânica (ΔW_p) da energia de poro, onde r é o raio do poro, γ é a tensão linear no poro e Γ é a tensão superficial.

$$\Delta W_p(r) = 2\pi r\gamma - \Gamma\pi r^2 \quad (2.17)$$

Este modelo não inclui a contribuição da energia elétrica associada à polarização da membrana. Esta contribuição pode ser facilmente incluída como sendo a variação da energia armazenada em um capacitor polarizado com potencial V_m no qual a capacitância varia devido à abertura do poro e conseqüente aumento na permissividade de $\epsilon_r \approx 2$ da bicamada lipídica para $\epsilon_r \approx 81$ da água.

Dessa forma, a variação da energia associada à formação de poros em (2.17), deve ser reescrita como:

$$\Delta W_p(r, V_m) = 2\pi r\gamma - \Gamma\pi r^2 - 0,5C_{LW}V_m^2\pi r^2 \quad (2.18)$$

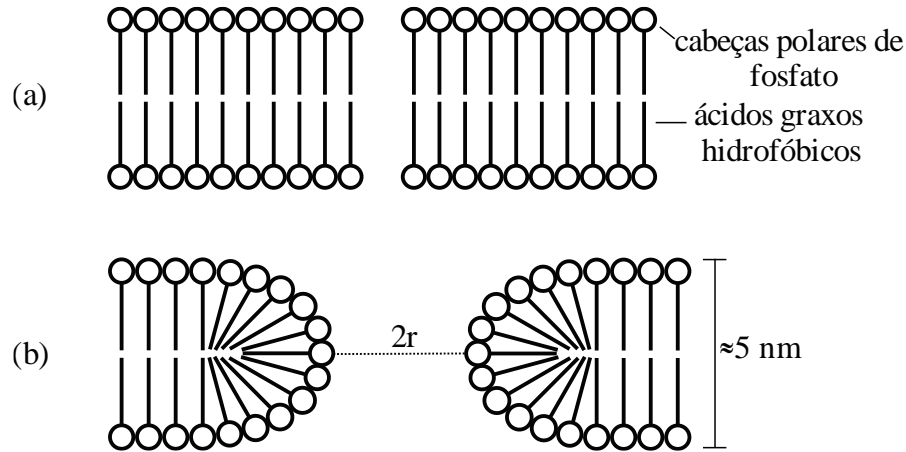
$$C_{LW} = \left(\frac{\epsilon_w}{\epsilon_i} - 1 \right) C_m \quad (2.19)$$

sendo V_m a média espacial da tensão transmembrana, $\epsilon_w = K_w\epsilon_0$ é a permissividade da água pura e $\epsilon_i = K_i\epsilon_0$ é a permissividade dos lipídios do interior da membrana. A constante C_m é a capacitância por unidade de área da membrana. Dessa forma, com o aumento de V_m há uma redução na energia de poro.

De acordo com (SUZUKI, 2009), poros hidrofílicos como os mostrados na Figura 4 (b) surgem da expansão de defeitos estruturais na bicamada lipídica que ocorrem devido a agitação térmica. Esses defeitos são chamados de poros hidrofóbicos Figura 4 (a). Poros hidrofílicos são

estruturas mais estáveis preenchidas com moléculas de água e que permitem a circulação iônica através da membrana.

Figura 4 – (a) Poro hidrofóbico. (b) Poro hidrofílico.



Fonte: Adaptado de (SUZUKI, 2009).

b) Dinâmica dos Poros

O comportamento dinâmico de uma população de poros hidrofílicos na membrana plasmática tem sido modelado por uma função de distribuição de densidade superficial de poros $n(r,t)$, de modo que $n(r,t) dr$ seja o número de poros por unidade de área da membrana com raios entre r e $r+dr$ no instante t . A função de distribuição de densidade de poros pode ser obtida como solução da equação de Smoluchowsky apresentada na equação (2.20) (WEAVER e CHIZMADZHEV, 1996).

$$\frac{\partial n}{\partial t} = D_p \left(\frac{\partial^2 n}{\partial r^2} + \frac{\partial}{\partial r} \left(\frac{n}{K_B T} \frac{\partial \Delta W_p}{\partial r} \right) \right) \quad (2.20)$$

Onde, D_p é a constante de difusão do raio do poro, K_B é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta e ΔW_p é a energia de poro. O termo $\partial \Delta W_p / \partial r$ é equivalente a uma força de expansão do poro. Uma vez que, devido à polarização da membrana conforme indica a equação (2.18), a energia de poro diminui com o aumento do raio, essa força tende a aumentar o raio do poro.

O modelo matemático apresentado na equação (2.20), descreve as principais características da eletropermeabilização como: a criação de poros, o valor do potencial transmembrana para a ocorrência da eletropermeabilização reversível e a ruptura reversível da

membrana. Entretanto, a obtenção de valores experimentais da constante de difusão e energia de poro proporcionam limitações para uso desse modelo.

Uma solução para equação (2.20), foi proposta por Krassowska *et al.* (NEU e KRASSOWSKA, 1999) (DEBRUIN e KRASSOWSKA, 1998), onde eles transformam a equação diferencial parcial em uma equação diferencial ordinária. Essa equação descreve a dinâmica da densidade de poros $N(t)$, que é relacionado com a função de distribuição de poros $n(r,t)$ pela equação (2.21).

$$N(t) = \int_0^{\infty} n(r,t) dr \quad (2.21)$$

Assim os autores resolvem a equação (2.21) e propõe a equação (2.22) como a taxa de variação no tempo da densidade superficial de poros.

$$\frac{dN(t)}{dt} = \alpha e^{\left(\frac{V_m}{V_{ep}}\right)^2} \left(1 - \frac{N(t)}{N_o} e^{-q\left(\frac{V_m}{V_{ep}}\right)^2} \right) \quad (2.22)$$

Onde, N_o é a densidade de poros na membrana em regime permanente sem polarização. V_{ep} , α e q são constantes empiricamente especificadas. A equação (2.22) descreve a taxa de variação da densidade de poros como sendo dependente da diferença entre seu valor instantâneo e seu valor em regime permanente (KRASSOWSKA e FILEV, 2007).

A fim de aplicar o modelo descrito pela equação (2.22), Krassowska *et al.* propõe a seguinte formulação para a condutância de membrana eletropermeabilizada utilizando a hipótese que todos os poros têm o mesmo diâmetro:

$$G_m = N G_p, \quad (2.23)$$

onde G_p é a condutância em um poro simples, a condutância G_p assume que os poros fornecem vias para o movimento de cargas (NEU e KRASSOWSKA, 1999), (DEBRUIN e KRASSOWSKA, 1998), (DEBRUIN e KRASSOWSKA, 1999). A equação da condutância de um poro simples é baseada na equação de Nernst-Planck e nos trabalhos de Glaser *et al.* (GLASER, LEIKIN, *et al.*, 1988) e de Barnett (BARNETT, 1990) e é função do potencial transmembrana:

$$G_p = \left(\frac{\pi r_p^2 \sigma_p}{h} \right) \frac{e^{\frac{V_m}{V_k}} - 1}{\left[\frac{W_o e^{\xi} - \zeta V_m}{W_o - \zeta V_m} \right] e^{\frac{V_m}{V_k}} - \left[\frac{W_o e^{\xi} + \zeta V_m}{W_o + \zeta V_m} \right]} \quad (2.24)$$

onde $\xi = \frac{W_0 - \zeta V_m}{V_k}$, $V_k = \frac{kT}{e}$, ζ é o comprimento relativo da entrada do poro, $T=300$ K, e é a carga elementar. r_p é o raio do poro, W_0 é a barreira de energia dentro do poro. A condutância de poro simples calculada pela equação (2.24) apresenta algumas suposições para o cálculo analítico: energia de Born tem uma distribuição trapezoidal; distribuição uniforme de corrente na área do poro; e a variação linear do potencial elétrico entre as faces da membrana (DEBRUIN e KRASSOWSKA, 1999), (SUZUKI, 2009).

c) Mobilidade Iônica

Glaser et al. (GLASER, LEIKIN, *et al.*, 1988) realizaram experimentos com membranas planares e encontraram a dependência de $\ln(\Delta I/\Delta t)$ por V_m^2 com pulsos de 0,65 a 1,9 V. A equação (2.25) apresenta esse modelo matemático.

$$\ln\left(\frac{\Delta I}{\Delta t}\right) = A + BVt^2 \quad (2.25)$$

Onde, as constantes A e B dependem da altura da barreira de energia para poros hidrofóbicos, da frequência de flutuação lateral das moléculas da membrana, da permissividade da membrana plasmática, do raio do poro e da temperatura.

Ramos *et al.* (RAMOS, SUZUKI e MARQUES, 2004), utilizaram o modelo matemático proposto por Glaser *et al.* e assumiram que o aumento da mobilidade iônica está associada com a criação de poros na membrana celular. Dessa forma, eles definiram que a mobilidade relativa da membrana (λ) como a relação entre a mobilidade iônica na membrana (μ_m) e na água (μ_a) conforme a equação (2.26.)

$$\lambda = \frac{\mu_m}{\mu_a} \quad (2.26)$$

Dessa forma, a taxa de variação da mobilidade relativa no tempo vai ser função do V_m^2 da seguinte maneira:

$$\frac{d\lambda}{dt} = \alpha e \left(\frac{V_m}{V_p}\right)^2 \quad (2.27)$$

onde α e V_p são constantes. Os resultados obtidos com esse modelo se mostraram coerente com trabalhos experimentais realizados por outros pesquisadores, e permite que várias previsões

sobre a distribuição do potencial e permeabilidade na membrana, assim como a ruptura da mesma (RAMOS, SUZUKI e MARQUES, 2004).

2.2.4 Técnicas numéricas usadas na modelagem da eletropermeabilização de células e tecidos

A utilização de abordagens computacionais para resolver problemas eletromagnéticos com geometrias complexas e diferentes materiais tornou-se uma prática comum nas últimas décadas. Em materiais biológicos o uso de técnicas numéricas e de programas de simulação são indispensáveis devido às dificuldades na obtenção de soluções analíticas.

Atualmente existe no mercado uma gama de programas de simulação que utilizam basicamente dois métodos de cálculos: o método dos elementos finitos (MEF) e o método das diferenças finitas (MDF).

O método dos elementos finitos é amplamente utilizado para a simulação da distribuição de campo elétrico durante a ocorrência do fenômeno da eletropermeabilização em tecidos biológicos. É utilizada a equação da continuidade, supondo que a densidade de corrente no tecido possui divergente nulo (COROVIC, LACKOVIC, *et al.*), (SUZUKI, ANSELMO, *et al.*, 2015), (COROVIC, ZUPANIC e MIKLAVCIC, 2008).

O método das diferenças finitas é comum em trabalhos de eletropermeabilização com variação temporal e no uso de simulações com poucas células. Barnett e Weaver (BARNETT e WEAVER, 1991) utilizaram o MDF para a resolução da equação de Smoluchowski apresentada na equação (2.20). Assim eles apresentam resultados em função do tempo como: número de poros na membrana, potencial transmembrana e condutância da membrana. Os autores relatam que a equação de Smoluchowski descreve corretamente as características essenciais da eletropermeabilização e enfatiza a necessidade de obter concordância quantitativa com resultados experimentais.

Krassowska e Filev (KRASSOWSKA e FILEV, 2007) também utilizaram o método das diferenças finitas para obter resultados numéricos no modelo da eletropermeabilização de uma única célula. Eles utilizaram a equação (2.22) que foi proposta como uma solução da equação de Smoluchowski. Apresentam os resultados com dependência temporal como: número de poros na membrana, potencial transmembrana, raio do poro. Entretanto os autores comentam que os resultados obtidos não podem reproduzir quantitativamente resultados experimentais, e isso se deve à falta de valores de alguns parâmetros do modelo.

O presente trabalho utiliza o Método do Circuito Equivalente discutido no próximo tópico.

a) *Método do Circuito Equivalente*

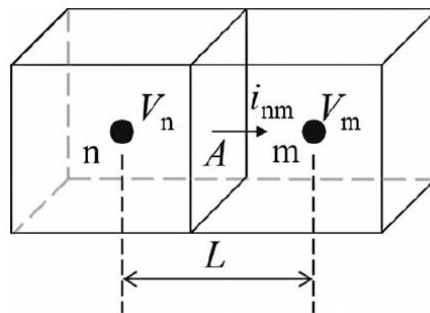
O Método do Circuito Equivalente (MCE), foi proposto por Ramos *et al.* (RAMOS, RAIZER e MARQUES, 2003) como uma ferramenta otimizada para a análise computacional no domínio do tempo da distribuição de corrente elétrica e campo elétrico em um meio com alta constante dielétrica e baixa condutividade.

O MCE baseia-se no uso de elementos de circuito, como: condutâncias e capacitâncias que modelam os processos de condução e polarização elétrica nos materiais envolvidos. Considere uma pequena porção de um material dividida em duas metades regulares, como é apresentado na Figura 5 (RAMOS e SUZUKI, 2016). Se a porção de material envolvida no modelo é homogêneo e linear a corrente entre os elementos pode ser obtida conforme a equação (2.28).

$$i_{nm} = \sigma_s \frac{A}{L} (V_n - V_m) + \epsilon_\infty \epsilon_0 \frac{A}{L} \frac{d}{dt} (V_n - V_m) \quad (2.28)$$

Onde i_{nm} é a corrente elétrica, V_n e V_m são os potenciais elétricos no centro dos elementos n e m , respectivamente, A é a área de contato, L é a distância entre os elementos, σ_s é a condutividade estática, ϵ_∞ é a constante dielétrica em alta frequência e ϵ_0 é a permissividade do vácuo.

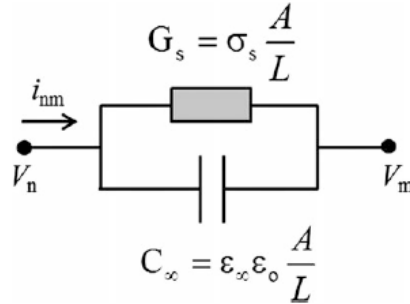
Figura 5 – Volumes retangulares adjacentes em um meio. Modelo geométrico para obtenção do circuito equivalente do material. V_n e V_m são os potenciais nos centros dos elementos n e m , respectivamente e i_{nm} é a corrente elétrica entre os volumes diferenciais.



Fonte: (RAMOS e SUZUKI, 2016).

O sistema apresentado na Figura 5 pode ser representado pelo circuito equivalente mostrado na Figura 6. Os coeficientes que multiplicam a diferença de potencial elétrico e sua derivada no tempo na equação (2.28), são a condutância e a capacitância.

Figura 6 – Circuito equivalente para um meio linear, homogêneo e sem dispersão.



Fonte: (RAMOS e SUZUKI, 2016).

Em um meio dispersivo a resposta transitória da corrente elétrica depende da intensidade da dispersão e dos tempos de relaxação dos processos envolvidos. Dessa forma, a polarização do meio resulta em um campo de reação ao campo elétrico aplicado, alterando a densidade de corrente: (RAMOS e SUZUKI, 2016).

$$\mathbf{j}_d = \sigma_d \left(\mathbf{E} - \mathbf{E}_r \right) \quad (2.29)$$

onde \mathbf{j}_d e σ_d são incrementos na densidade de corrente e condutividade devido os processos dispersivos em relação aos valores considerados na equação (2.28). \mathbf{E} é o campo elétrico aplicado e \mathbf{E}_r é o campo de reação devido à polarização do meio. A equação (2.29) refere-se a valores médios macroscópicos no volume da amostra analisada, assim podemos relacionar o campo elétrico com a diferença de potencial entre os elementos adjacentes da seguinte maneira (RAMOS e SUZUKI, 2016):

$$i_d = \sigma_d \frac{A}{L} (\Delta V - \Delta V_r), \quad (2.30)$$

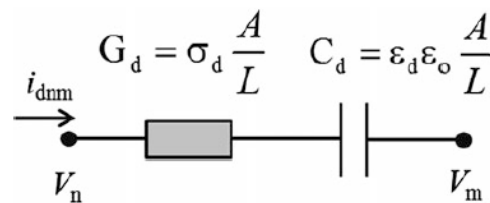
onde, i_d é a corrente de dispersão.

Considerando a linearidade do processo de polarização, podemos escrever o potencial de reação como sendo proporcional ao acúmulo de carga, que por sua vez, varia no tempo com uma taxa igual à intensidade da corrente dispersiva.

$$i_{\text{dnm}} = G_d \left(\Delta V - \frac{1}{C_d} \int_0^t i_d dt' \right) \quad (2.31)$$

Onde G_d e C_d são a condutância e a capacitância relacionadas com o processo de dispersão. O circuito equivalente que representa o processo de dispersão de primeira ordem é apresentado na Figura 7.

Figura 7 – Circuito equivalente para uma dispersão de primeira ordem.



Fonte: (RAMOS e SUZUKI, 2016).

Para obter a corrente dispersiva no domínio do tempo para uma forma de onda arbitrária, é utilizado o cálculo iterativo com passos de tempo “ Δt ” pequenos quando comparado com o tempo de relaxação do circuito $\tau = C_d/G_d$. A diferença de potencial no capacitor pode ser calculada a partir da seguinte equação (RAMOS e SUZUKI, 2016):

$$G_d (V_n - V_m - V_c) = C_d \frac{V_c - V'_c}{\Delta t}, \quad (2.32)$$

onde V'_c é o valor do potencial no capacitor no passo de tempo anterior, ou seja, o potencial no tempo $t' = t - \Delta t$. V_c é obtido resolvendo a equação (2.32):

$$V_c = \frac{(\Delta t/\tau)(V_n - V_m) + V'_c}{(1 + \Delta t/\tau)}. \quad (2.33)$$

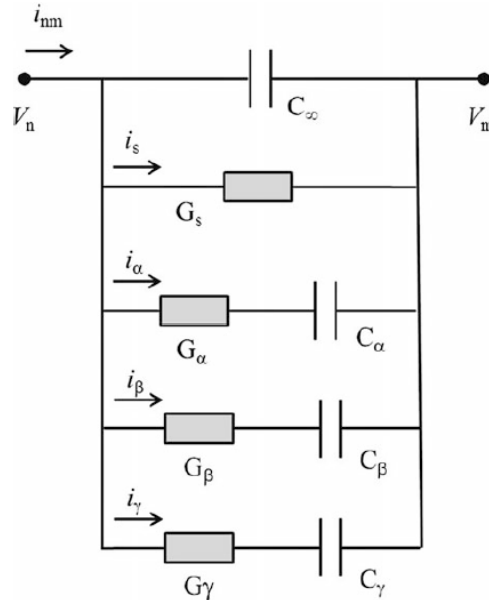
A corrente dispersiva é então obtida da seguinte maneira (RAMOS e SUZUKI, 2016):

$$i_{\text{dnm}} = G_d (V_n - V_m - V_c) = G_d \left[\frac{(V_n - V_m) - V'_c}{(1 + \Delta t/\tau)} \right]. \quad (2.34)$$

O circuito equivalente apresentado na Figura 8 modela os processos de condução e polarização. São apresentadas três bandas de dispersão: α , β e γ . A capacitância C_∞ representa

os processos de polarização com tempos de resposta menores que os tempos de relaxação e a condutância G_s representa a condução em baixas frequências (RAMOS e SUZUKI, 2016).

Figura 8 – Circuito equivalente de um material biológico incluindo dispersões de primeira ordem.

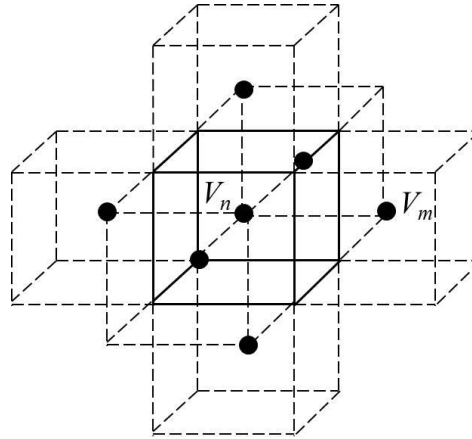


Fonte: (RAMOS e SUZUKI, 2016).

A análise computacional da distribuição de campo elétrico e corrente elétrica em tecidos biológicos estimulados por potenciais elétricos aplicados a partir de eletrodos pode ser realizada usando-se a modelagem com circuito equivalente aplicada a uma matriz tridimensional de elementos de volume que discretizam o domínio de análise. A Figura 9 apresenta o esquema de discretização com blocos cúbicos. No centro de cada bloco define-se um nó do circuito equivalente do material. Existem seis blocos vizinhos para cada bloco no interior da malha. Na periferia da malha, algumas conexões são substituídas segundo as condições de contorno. A análise numérica usando o circuito equivalente no domínio do tempo baseia-se na solução do conjunto de equações de potencial elétrico obtido com a aplicação da primeira lei de Kirchhoff em todos os nós da malha de discretização. A equação de nós para o nó central na Figura 9 pode ser escrita na seguinte forma (RAMOS e SUZUKI, 2016):

$$\sum_{m=1}^6 \left[C_{nm} \frac{d}{dt} (V_n - V_m) + (i_s + i_\alpha + i_\beta + i_\gamma)_{nm} \right] = 0 \quad (2.35)$$

Figura 9 – Esquema de discretização espacial para aplicação da modelagem pelo circuito equivalente.



Fonte: (RAMOS e SUZUKI, 2016).

Segundo a equação da continuidade, podemos substituir o somatório de correntes na equação (2.35) pela taxa de variação da carga elétrica acumulada no nó central (RAMOS e SUZUKI, 2016).

$$\sum_{m=1}^6 (I_s + I_\alpha + I_\beta)_{nm} = -\frac{dQ_n}{dt} \quad (2.36)$$

Substituindo a equação (2.36) na equação (2.35) e integrando ambas, obtemos as equações básicas para solução numérica pelo método do circuito equivalente:

$$V_n = \frac{1}{\sum_{m=1}^6 C_{\infty nm}} \left[Q_n + \sum_{m=1}^6 C_{\infty nm} V_m \right] \quad (2.37)$$

$$Q_n = Q_n' - \Delta t \int_0^t \sum_{m=1}^6 (i_s + i_\alpha + i_\beta + i_\gamma)_{nm} \quad (2.38)$$

onde Q_n' é o valor da carga no tempo $t' = t - \Delta t$.

Em cada iteração, correspondente a um passo de tempo “ Δt ”, a carga elétrica em cada nó é calculada por integração numérica de acordo com a equação (2.38), onde as correntes no integrando são obtidas a partir dos valores anteriores de potencial elétrico na malha de discretização espacial. A seguir os potenciais são atualizados por meio da solução do sistema de equações representado pela equação (2.37) usando o método de Gauss-Seidel. Para se obter a convergência correta nesse processo iterativo o passo de tempo “ Δt ” deve ser bem menor

(10% ou menos) que o menor tempo de relaxação no circuito equivalente do meio (RAMOS e SUZUKI, 2016).

As condições de contorno utilizadas são de dois tipos: potencial elétrico definido na fronteira com um eletrodo metálico e campo elétrico perpendicular nulo nas demais fronteiras do domínio de análise. Nas interfaces internas entre dois meios com condutividades e permissividades diferentes, as condições exigidas de continuidade de potencial e densidade de corrente elétrica são atendidas naturalmente com a modelagem por circuito elétrico (RAMOS e SUZUKI, 2016).

b) Aplicação do Método do Circuito Equivalente na Eletropermeabilização

Ramos *et al.* (RAMOS, SUZUKI e MARQUES, 2004) utilizaram o MCE para o cálculo da mobilidade iônica no nível celular cuja formulação matemática já foi apresentado na seção 2.2.3. Os autores concluíram que os resultados da simulação numérica com o MCE se mostraram compatíveis com resultados experimentais apresentados por outros autores, apresentando uma validação para o uso do MCE.

Ramos (RAMOS, 2005), propõe uma análise macroscópica para as equações apresentadas na seção 2.2.3. Na equação (2.27) assume os seguintes valores para as constantes $\alpha=10^{-11}$ e $V_p=0,46$ V. Ramos verificou a distribuição de campo elétrico em tecido, com e sem eletropermeabilização e constatou que o fenômeno da eletropermeabilização não pode ser desconsiderado no cálculo de campos em tecidos.

2.2.5 Técnicas experimentais de caracterização da eletropermeabilização em células e tecidos

As técnicas experimentais de caracterização da eletropermeabilização encontrada na literatura são: microscopia eletrônica de rápido congelamento, microscopia de fluorescência e medidas elétricas.

a) Microscopia Eletrônica de Rápido Congelamento

Chang (CHANG, 1992) realizou experimentos de aplicação de pulsos elétricos e o rápido congelamento da amostra, a fim de revelar as microestruturas da membrana permeabilizada. Até a obtenção dos resultados de Chang, o conceito da criação de poros na membrana pelo campo elétrico era uma hipótese teórica e não havia comprovação experimental.

Para a realização dos ensaios, foram utilizadas células vermelhas de sangue humano, devido à homogeneidade da estrutura da membrana. Como resultados, Chang observou que os poros variam de 20 nm a 120 nm, sendo que a maioria dos poros possuem diâmetros entre 40 nm e 60 nm. Outro resultado importante apresentado por Chang é a dinâmica da formação do poro e o seu fechamento. Devido à técnica do rápido congelamento, os autores controlam o tempo entre a aplicação do pulso e o congelamento da amostra. Dessa forma, é possível observar a dinâmica das estruturas da célula após aplicação do pulso. Segundo os autores 10 segundos após a aplicação do pulso, as estruturas dos poros quase todas desapareceram e foram substituídas por pequenas depressões na membrana, representando assim a recuperação da membrana celular.

b) *Microscopia de Fluorescência*

Kinosita *et al.* (KINOSITA JR, ASHIKAWA, *et al.*, 1988) utilizaram ovos de ouriço do mar imersos em corante fluorescente sensível à tensão, combinados com a microscopia de vídeo. Assim, foi possível obter o valor do potencial transmembrana, a partir da intensidade de luz emitida pelo corante fluorescente. Dessa forma, foi possível obter resultados experimentais do valor do V_m em função do ângulo entre a posição da amostra e o campo elétrico aplicado. Kinosita *et al.* utilizaram dois protocolos: subcrítico (100 V/cm) e supercrítico (400 V/cm) com duração de 25 μ s.

Baseados nas equações (2.14), (2.15) e (2.16) é possível determinar os valores teóricos para o potencial transmembrana. Entretanto, devido à não uniformidade da condutância de membrana (G_m), o potencial transmembrana não pode ser obtido de forma analítica. Assim, para se obter uma comparação com os resultados experimentais os autores utilizaram uma solução numérica, propondo a seguinte equação para $G_m(\theta)$:

$$G_m(\theta) = \begin{cases} \frac{G_o (|\cos \theta| - \cos \theta_c)}{(1 - \cos \theta_c)} & (\theta \leq \theta_c, 180^\circ - \theta_c \leq \theta) \\ 0 & (\theta_c < \theta < 180^\circ - \theta_c) \end{cases} \quad (2.39)$$

onde G_o é a condutância máxima e θ_c é o ângulo cujo valor do V_m é insuficiente para formar poros.

Outro fato importante observado pelos autores foi a saturação do V_m para o campo de 400 V/cm. Esse fenômeno ocorre devido à grande quantidade de poros na membrana, onde os

íons não conseguem se acumular na parede da membrana dificultando a elevação do potencial transmembrana.

c) *Medidas Elétricas*

As análises descritas nos tópicos anteriores, apresentam técnicas utilizadas em células isoladas. Entretanto, em análises de tecidos, onde a densidade celular é muito elevada, tais técnicas tornam-se impraticáveis. Dessa forma, é utilizada a condutividade da amostra como parâmetro de avaliação da ocorrência da eletropermeabilização.

Na literatura está bem definido que a condutividade da membrana plasmática aumenta na ocorrência da eletropermeabilização (WEAVER e CHIZMADZHEV, 1996). Entretanto não existe uma maneira de medir diretamente a condutividade da membrana plasmática durante a aplicação do campo elétrico, sendo necessário utilizar grandezas elétricas macroscópicas como a tensão aplicada e a corrente que circula na amostra, além disso, deve ser levado em consideração a geometria dos eletrodos utilizados na aplicação da diferença de potencial elétrico.

Neal II *et al.* (NEAL II, GARCIA, *et al.*, 2012) utilizaram rim de porco e eletrodos na forma de discos paralelos para a aplicação de campo elétrico, com a forma de onda de um pulso retangular. Para o cálculo da condutividade experimental, os autores utilizaram a equação (2.40), baseada em um condutor com seção transversal SA uniforme ao longo do comprimento L e campo elétrico uniforme nesse volume,

$$\frac{1}{\sigma(t)} = \frac{V(t)SA}{i(t)L}, \quad (2.40)$$

onde $\sigma(t)$ é a condutividade elétrica, $V(t)$ é a tensão e $i(t)$ a corrente elétrica. A equação (2.40) é estritamente correta para um meio não dispersivo. Contudo, tecidos biológicos apresentam intensa dispersão dielétrica na faixa de frequência na qual os experimentos de eletropermeabilização são geralmente realizados. Para minimizar os erros decorrentes da dispersão, Ramos *et al.* (RAMOS, SCHNEIDER, *et al.*, 2012) realizaram medições de condutividade em suspensões de células biológicas utilizando a combinação de pulsos retangulares e sinais senoidais em uma frequência na qual os efeitos dispersivos e reativos da amostra eram mínimos.

Ivorra *et al.* (IVORRA, AL-SAKERE, *et al.*, 2009), realizaram experimentos semelhantes a Neal II *et al.*, entretanto, após a aplicação do pulso, a impedância do tecido foi

medida com um sistema de eletrodos tetrapolar. A partir do resultado experimental, os autores propuseram o seguinte modelo matemático para a condutividade:

$$\sigma(t) = A - B \ln(t - t_0), \quad (2.41)$$

onde A e B são constantes e $t - t_0$ é o tempo após a aplicação do pulso. Apesar dos autores utilizarem o analisador de impedância após a aplicação do pulso, para a obtenção da condutividade durante o pulso eles utilizaram a equação (2.40)

2.2.6 Terapias baseadas na eletropermeabilização biológica

Dependendo do potencial transmembrana é possível obter diferentes aplicações para a eletroporação como já foi apresentado na Figura 3. Nessa seção serão apresentadas as principais terapias baseadas no fenômeno da eletropermeabilização, com foco principal na eletroquimioterapia.

a) Eletroquimioterapia

A maioria das drogas utilizadas nos tratamentos de quimioterapia possuem uma semi-vida biológica curta em circulação no corpo, sendo necessárias altas doses para serem terapeuticamente eficazes. Dessa forma, a droga introduzida em grande quantidade no corpo do paciente destrói não apenas células cancerígenas, mas também células sadias causando diversos efeitos colaterais (HOFMANN, DEV e NANDA, 1996). Assim a eletroquimioterapia pode ser utilizada para aumentar a eficiência das drogas quimioterápicas reduzindo os efeitos colaterais.

A eletroquimioterapia é um tratamento local do câncer que combina o uso de medicamentos quimioterápicos juntamente com a eletropermeabilização, permitindo assim, a introdução dessas drogas para o interior da célula (MIKLAVCIC, MALI, *et al.*, 2014). As drogas utilizadas na eletroquimioterapia são: bleomicina e a cisplatina, outras drogas já foram estudadas, entretanto não houve valores significantes de citotoxicidade. A bleomicina é um hidrófilo e tem capacidade limitada de atravessar a membrana celular, entretanto, a sua taxa de citotoxicidade pode ser potencializada mais de 1000 vezes pela eletropermeabilização. Para a cisplatina, contudo, somente metade da droga atravessa a membrana por difusão passiva. Assim, o uso da eletropermeabilização permite um maior fluxo e acumulação da droga nas

células, aumentando assim a citotoxicidade da cisplatina em até 80 vezes (SERSA, CEMAZAR e SNOJ, 2011).

O uso da eletroquimioterapia vem crescendo nos últimos anos, o seu uso em tratamento de câncer de pele já está bem estabelecida principalmente em países do leste europeu. Isso se deve à facilidade do tratamento em comparação com outras técnicas de tratamento do câncer devido à menor quantidade de drogas com menores efeitos colaterais e não necessidade de cirurgia que leva a deformações do corpo (MIKLAVCIC, MALI, *et al.*, 2014).

A eletroquimioterapia é considerada uma opção relativamente segura para o tratamento de tumores, alguns efeitos colaterais surgem devido a efeitos secundários causados pela: (a) inserção de eletrodos, (b) aplicação de energia elétrica, ou (c) agentes citotóxicos. Um dos efeitos colaterais mais comuns é a contração muscular involuntária devido à aplicação do pulso de tensão, o que pode ser desagradável. A sensação de queimadura da pele também pode ser observada. A bleomicina, quando utilizada por via intravenosa pode induzir toxicidade pulmonar. No caso de pacientes com problemas pulmonares é preferível a administração do medicamento via intratumoral (CAMPANA, GALUPPO, *et al.*, 2016), (MIKLAVCIC, MALI, *et al.*, 2014).

Alguns trabalhos sobre a aplicação da eletroquimioterapia em tratamento de tumores em determinados órgãos podem ser encontrados em: câncer de mama (CAMPANA, GALUPPO, *et al.*, 2016), câncer de cabeça e pescoço (BENZAZZO, BERTINO e GROSELJ, 2016), câncer de pâncreas (GRANATA, LEONGITO, *et al.*, 2016), além de trabalhos aplicados na oncologia veterinária (TOZON, TAMZALI e CEMAZAR, 2016), (SUZUKI, ANSELMO, *et al.*, 2015).

b) Transferência Genética

A eletrotransferência ou transferência genética consiste num processo não viral de transferência genética, e está em expansão. O trabalho de Mir *et al.* (MIR, BUREAU, *et al.*, 1999), no qual realizaram experimentos *in vivo* de transferência genética, os autores relatam a transferência de genes para músculo esquelético.

c) Eletroinserção

A eletropermeabilização ocorre apenas se o potencial V_m superar um valor crítico. Ao aplicar um campo elétrico e gerar um V_m ligeiramente menor que o crítico é possível a inserção de proteínas na membrana celular. A partir dessa técnica foi possível a obtenção de enxertos de eritrócitos como receptores para atrair o vírus da AIDS e diminuir a carga viral (ZEIRA, TOSI, *et al.*, 1991).

d) Administração de Medicamentos via camada Transdérmica

A administração de medicamentos via camada transdérmica oferece vantagens como: evita o metabolismo de primeira passagem pelo sistema digestivo e controla a liberação da droga. Além desses fatos é um método não invasivo sem risco de infecção. A eletropermeabilização surgiu como uma nova técnica para a entrega de medicamentos via transdérmica, ganhando espaço entre os antigos procedimentos de iontoforese e ultrassom (DENET, VANBEVER e PRÉAT, 2004).

e) Eletrofusão

Os processos descritos anteriormente são utilizados para inserir moléculas para o interior da célula. Entretanto como resultado na eletropermeabilização é possível fundir células. O processo de eletrofusão possui aplicação na produção de vacinas e anticorpos (SCOTT-TAYLOR, PETTENGELL, *et al.*, 2000).

f) Eletroesterilização

A eletroesterilização utiliza o processo irreversível da eletropermeabilização, ou seja, neste caso é desejável a morte celular. Para isso é necessário a aplicação de um campo elétrico intenso para a destruição da membrana celular. Como aplicações dessa técnica podem ser citadas a conservação de alimentos e tratamento da água (TEISSIÉ, EYNARD, *et al.*, 2002).

2.2.7 Equipamentos e métodos usados na eletroquimioterapia de tumores

O equipamento responsável pela geração do campo elétrico é denominado de eletroporador. O eletroporador deve ser capaz de fornecer em um curto intervalo de tempo um alto valor de tensão para a geração de campo suficiente para permeabilizar as células ou tecidos. Um eletroporador comercial utilizado na eletroquimioterapia é o Cliniporator®. Possui tensão de saída ajustada entre 100 V e 1000 V, números de impulsos de 1 a 20, largura de pulsos de 50 µs a 200 ms frequência de repetição de 1 a 5000 Hz (IGEAMEDICAL).

Em 2006 durante a ESOPE (*European Standart Operating Procedures of Electrochemotherapy*), foi elaborado o procedimento operacional padrão (SOP – *Standart Operating Procedures*) para a eletroquimioterapia. Os responsáveis pela elaboração da SOP foram os principais centros de tratamento de câncer da Europa, com o objetivo de definir diretrizes para a segurança e a eficácia do tratamento. Em (MIR, GEHL, *et al.*, 2006) são apresentadas as principais drogas utilizadas no tratamento de câncer bem como a quantidade

necessária dependendo do tamanho do tumor. Recomenda também o campo elétrico necessário assim como o tipo de eletrodos a serem utilizados, além de outras recomendações para a segurança do paciente e eficácia do tratamento.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 PROJETO DO SISTEMA ELETRÔNICO

O sistema eletrônico desenvolvido é responsável pela aplicação da forma de onda de tensão na amostra de tecido biológico, além de, realizar a leitura da tensão e corrente que estimularam a amostra e apresentar essas formas de onda para o usuário.

O projeto do sistema eletrônico é composto pelas seguintes seções: O amplificador, Fontes de alimentação, Transdutor de tensão, Transdutor de corrente, Sistema de aquisição de dados, Geração de sinais, Aquisição de sinais, Programação e software de comando e Concepção do projeto.

3.1.1 O amplificador

O amplificador consiste em um sistema eletrônico que amplifica a forma de onda de entrada tanto em nível de tensão como de potência. O sistema é constituído por dois amplificadores idênticos, entretanto, o sinal de entrada do segundo amplificador é invertido em relação ao primeiro. Assim, com essa topologia é possível aplicar o dobro de tensão na carga. Um diagrama esquemático que mostra a composição da metade do amplificador construído é apresentado na Figura 10, sendo composto por um estágio de ganho de tensão (Figura 10 (a)), e um estágio de ganho de potência (Figura 10 (b)).

O circuito de ganho de tensão é composto por TBJ: MJE340 e MJE350, além de resistores para a polarização dos transistores. É composto por um estágio de base comum, seguido com uma estrutura cascode.

O amplificador de potência é composto por TBJ: MJE 340, MJE350, MJW3281A e MJW1302A todos fabricados pela ON Semiconductor®. O amplificador é de classe B, com configuração *push-pull*, onde cada semiciclo do sinal é amplificado por um braço do amplificador. Os transistores são ligados na configuração darlington para aumentar o ganho de corrente. A associação em série dos transistores é utilizada para reduzir a tensão coletor-emissor. Devido às diferenças construtivas e de polarização dos transistores existe a possibilidade de uma distribuição irregular da tensão entre os mesmos, podendo assim, levar a sua ruptura e por consequência danificar todo o braço de transistores, dessa forma, foram utilizados resistores em paralelo com os transistores para garantir a distribuição aproximadamente igual de tensão entre os dispositivos. A Tabela 1 apresenta as características dos transistores utilizados no projeto.

Tabela 1 – Características dos transistores.

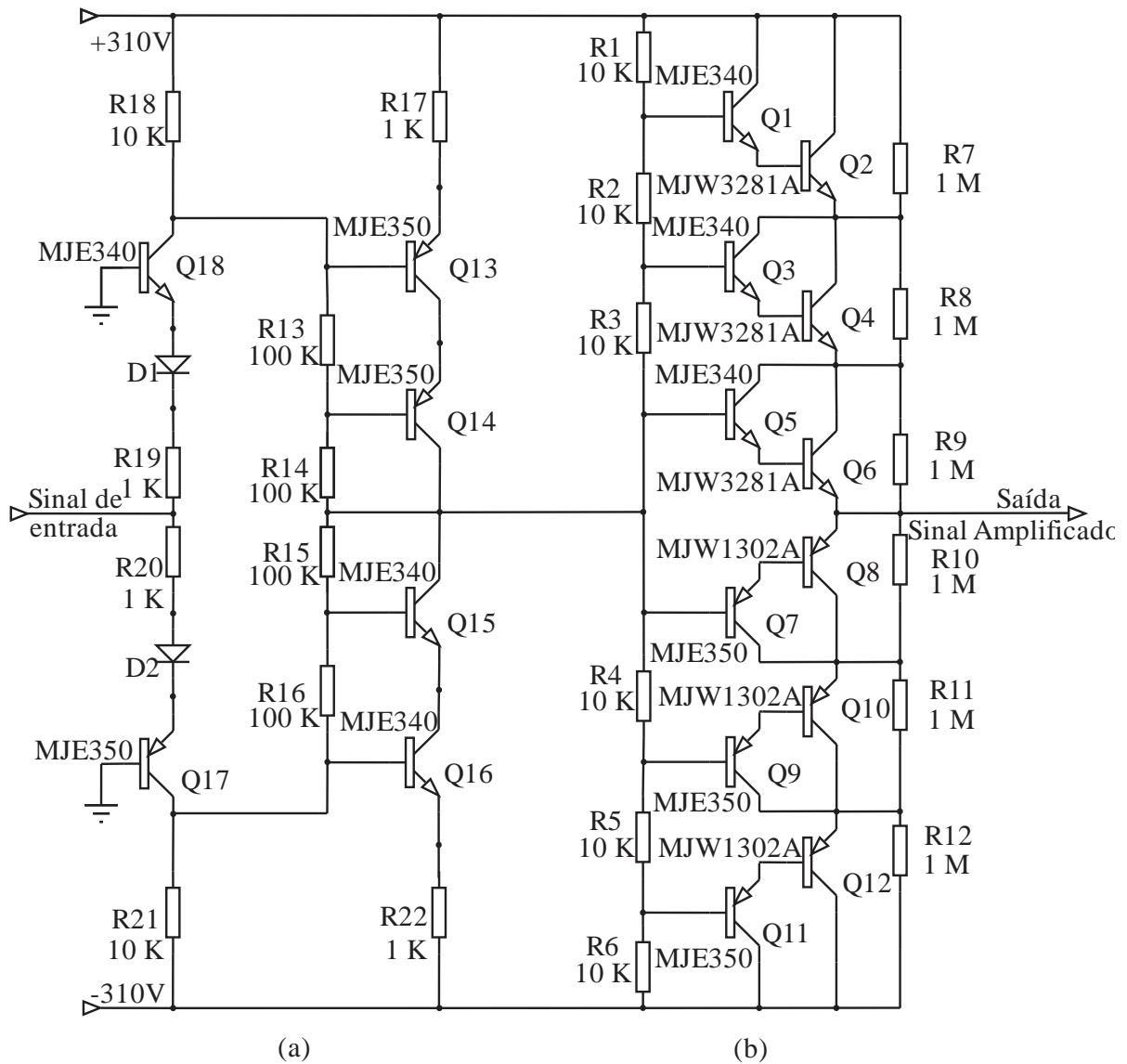
Componente	Corrente (A)	Tensão Reversa (V)	Potência (W)
MJE340	0,5	300	20
MJE350	0,5	300	20
MJW3281A	15	230	200
MJW1302A	15	230	200

Fonte: (ON SEMICONDUCTOR).

a) Ganho do amplificador;

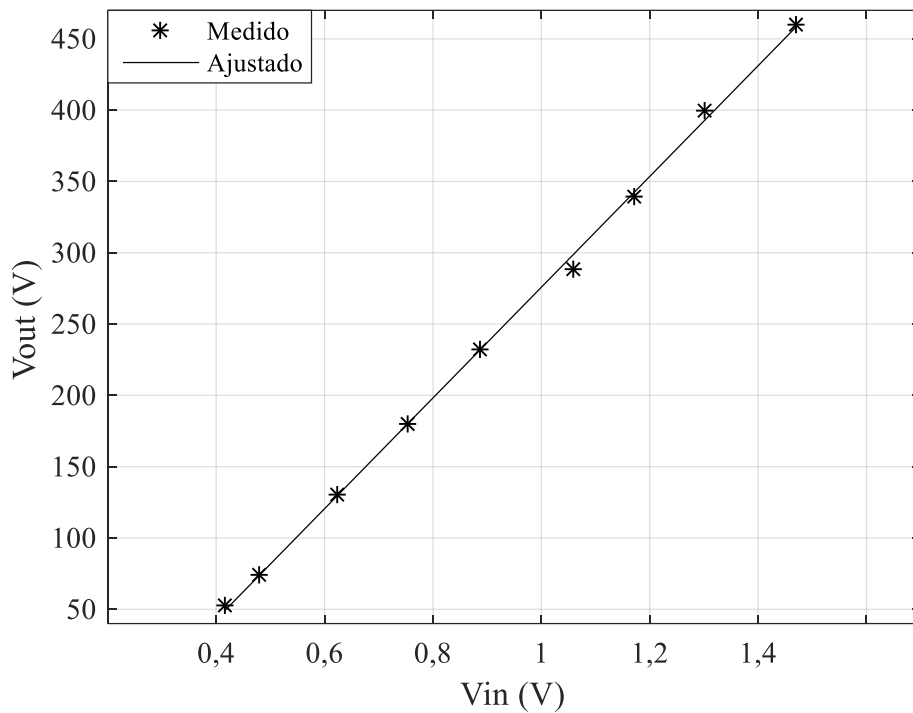
Para obter a resposta do ganho do amplificador foi realizado um experimento variando a tensão de entrada e medindo tanto a tensão de entrada como a tensão de saída. As medidas foram realizadas utilizando as ponteiras de tensão P2220 da Tektronix® e o osciloscópio TDS 2024B da Tektronix®. A carga utilizada foi um resistor com uma resistência de $346,8 \Omega$ e uma indutância de $8,43 \mu\text{H}$ medidos no analisador de impedância da Agilent® modelo 4294A. A curva de ganho do amplificador é mostrada na Figura 11. O amplificador não possui ganho constante, o ganho varia linearmente com a tensão de entrada aplicada no amplificador.

Figura 10 – Esquema da metade do amplificador. (a) amplificador de tensão e (b) amplificador de potência.



Fonte: próprio autor.

Figura 11 – Curva de transferência do amplificador.



Fonte: próprio autor.

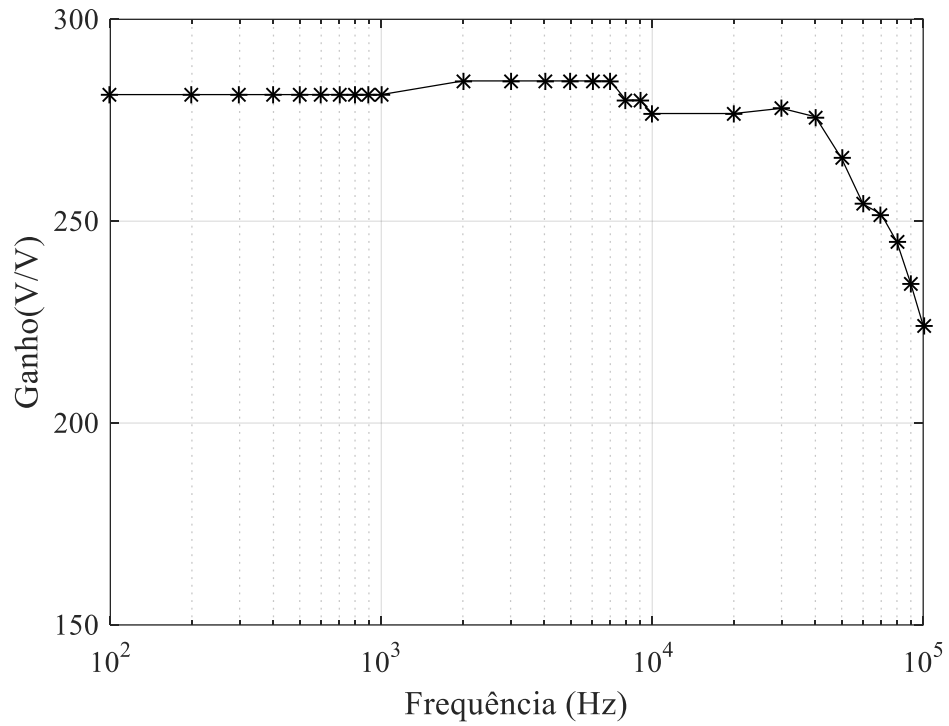
Na Figura 11 é possível observar o gráfico dos valores medidos e da reta obtida com a função *polyfit* do MATLAB®. A equação (3.1) apresenta a relação entre a tensão de entrada (V_{in}) e tensão de saída (V_{out}).

$$V_{out} = 338,2595V_{in} - 112,422 \quad (3.1)$$

a) *Resposta em frequência do amplificador;*

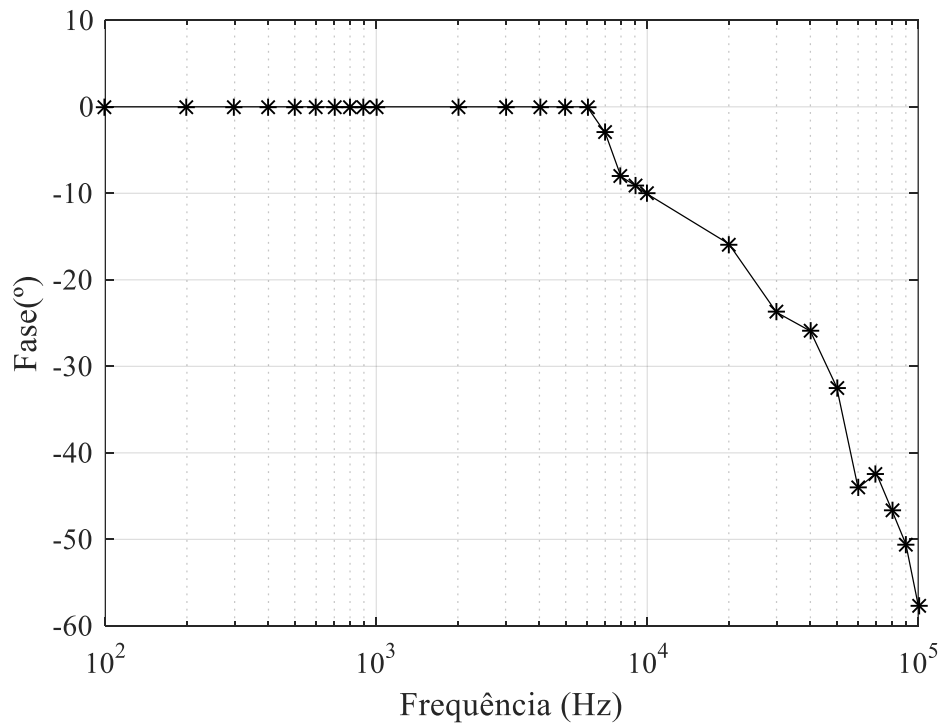
A resposta em frequência do amplificador foi obtida variando a frequência do sinal de entrada através do gerador de sinais e medindo a amplitude e fase entre os sinais de entrada e de saída. O sinal de entrada é proveniente de um gerador de sinais modelo AFG 3251 da Tektronics®. As ponteiros, osciloscópio e carga foram os mesmos descritos no item a). A Figura 12 e a Figura 13 apresentam a resposta de módulo e fase respectivamente. É possível observar que o amplificador possui uma resposta com pouca variação de módulo e fase até 30 kHz.

Figura 12 – Módulo do Amplificador (V/V).



Fonte: próprio autor.

Figura 13 – Fase do Amplificador.



Fonte: próprio autor.

b) Tempo de subida e descida do amplificador

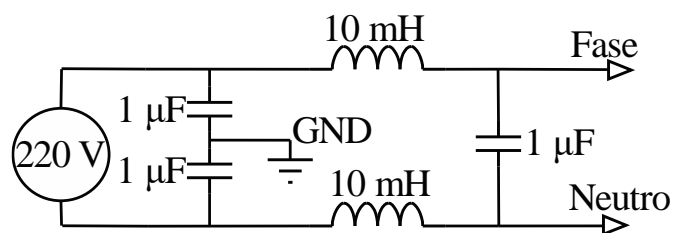
Para a medição dos tempos de subida e descida foi utilizada uma onda com a máxima amplitude que o amplificador pode fornecer. Dessa forma, foi gerada uma onda quadrada de 460 V.

O tempo de subida foi medido considerando o tempo necessário para a tensão aumentar de 10% até 90% de seu valor final. Para obter o tempo de descida considerou-se a redução da tensão de 90% até 10% da tensão máxima. O tempo de subida foi de 41 μs e o tempo de descida foi de 25 μs .

3.1.2 Fontes de alimentação

Para a alimentação do eletroporador são necessários dois níveis de tensão diferentes. Para a alimentação do sistema de amplificação de tensão e potência é utilizada uma fonte na configuração de meia ponte que gera ± 310 V. Já para o sistema de medição e condicionamento de sinais são utilizados potenciais de ± 15 V provenientes de uma fonte na configuração de ponte completa. Para reduzir a entrada de ruído proveniente da rede de alimentação, foi projetado um filtro passa-baixa localizado na conexão do cabo de alimentação com a fonte. A Figura 14 apresenta a topologia utilizada na concepção do filtro.

Figura 14 – Filtro de EMI.



Fonte: próprio autor.

3.1.3 Transdutor de tensão

Para a medição da tensão aplicada à carga, foi utilizado um divisor resistivo e um amplificador de instrumentação INA163 da Texas Instruments® como é apresentado na Figura 15. O divisor resistivo atenua de forma linear a tensão para ser possível o acoplamento com as entradas do amplificador de instrumentação.

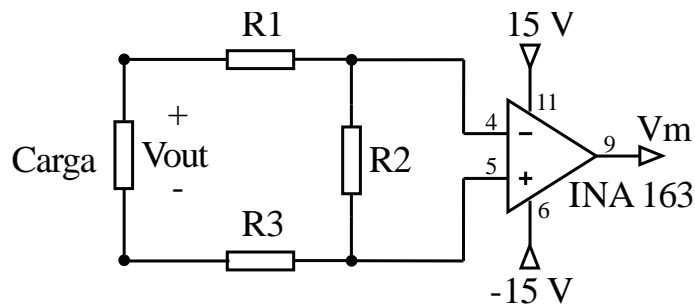
A relação de transferência entre a tensão aplicada à carga (V_{out}) e a tensão medida na saída do amplificador de tensão (V_m) é dada pela equação (3.2), onde G é o ganho do amplificador. Foi utilizado ganho unitário.

O INA163 possui banda passante de 800 kHz com ganho de 100 V/V, alta rejeição de modo comum CMRR maior que 100 dB, ganho externo ajustável com resistor e baixa densidade de ruído de 2 nV/ $\sqrt{\text{Hz}}$ em 10 Hz e 1 nV/ $\sqrt{\text{Hz}}$ em 1 kHz (TEXAS INSTRUMENTS).

Os valores das resistências apresentadas na Figura 15 são anotados na Tabela 2. Foram medidos utilizando o multímetro da Rigol® modelo DM3062 que possui 6,5 dígitos de precisão.

$$V_m = \frac{R_2 G}{R_1 + R_2 + R_3} V_{out} \quad (3.2)$$

Figura 15 – Transdutor de tensão.



Fonte: próprio autor.

Tabela 2 – Valores dos resistores.

Resistor	Valor (Ω)
R1	148670
R2	6755,02
R3	149245

Fonte: próprio autor.

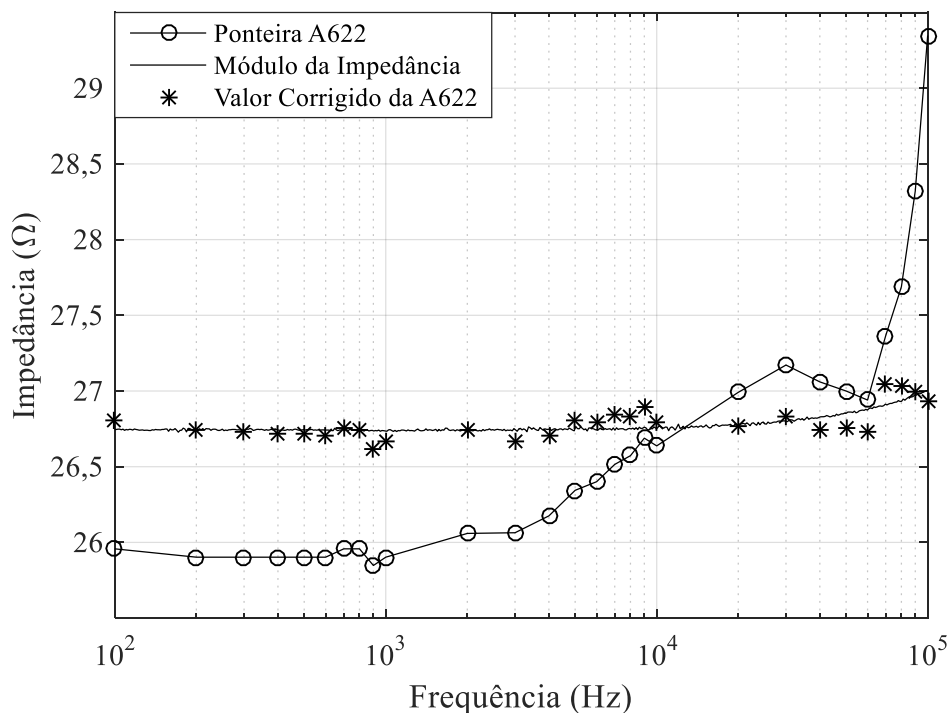
3.1.4 Transdutor de corrente

Para a medição da corrente foi utilizada a ponteira de corrente da Tektronix® modelo A622. Essa sonda utiliza um sensor de efeito Hall, opera em uma faixa de frequência de 0 até 100 kHz e pode medir correntes de 0 a 70 A (rms) (TEKTRONIX).

Devido à resposta em frequência da ponteira A622, foi necessário utilizar um procedimento de compensação. Um resistor com resistência nominal 27Ω foi usado como carga. Sua resistência foi medida com o analisador 4294A da Agilent® sendo seu valor na faixa de 100 Hz a 100 kHz usado como referência. Usando tensão senoidal de um gerador Tektronix® modelo AFG 3251 a tensão em torno de 12,25 V e a corrente elétrica de aproximadamente 470 mA na carga foram medidas em um osciloscópio Tektronix® modelo TDS 2024B. Para a tensão foi usada a sonda Tektronix® modelo P2220. A medição da corrente foi realizada com a sonda Tektronix® A622.

A Figura 16 apresenta a resposta do módulo da impedância medido com as sondas e osciloscópio e analisador de impedância. Também é apresentada a curva corrigida do módulo da impedância com erro máximo de 0,521% na frequência de 60 kHz.

Figura 16 – Comparação entre resultados na medição de uma resistência com analisador de impedância e sonda A622.



Fonte: próprio autor.

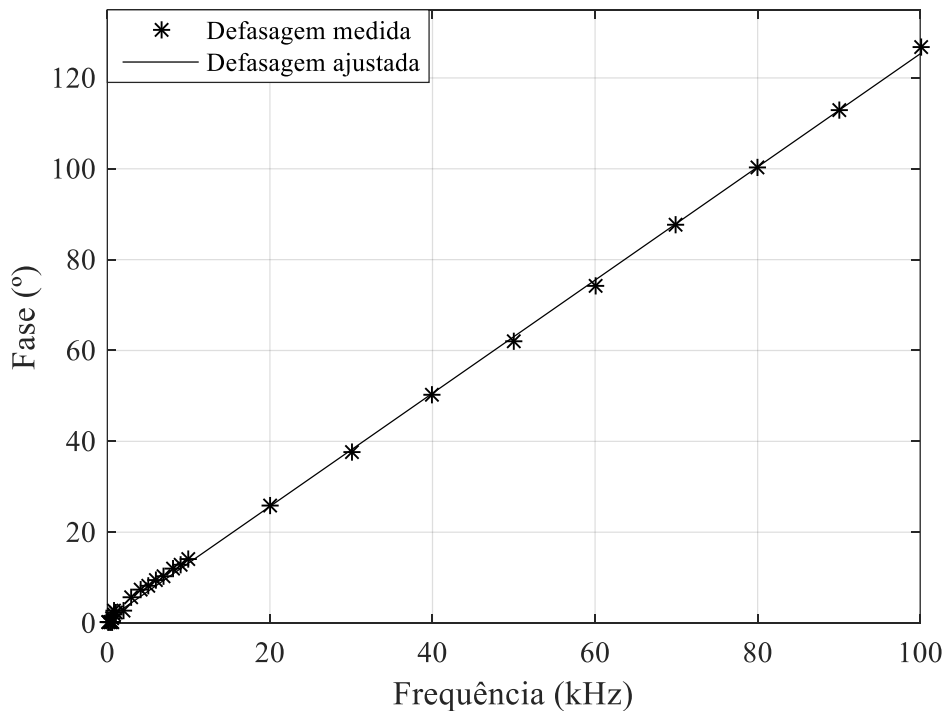
Para a compensação da sonda de corrente foi obtida uma função da frequência que relaciona o módulo da impedância medido com as sondas e osciloscópio pelo módulo da impedância medido com o analisador de impedância. A partir dos resultados numéricos obteve-se a equação de ajuste utilizando a função *polyfit* do MATLAB®. O resultado é apresentado na equação (3.3).

$$\text{correção} = 1 * 10^{-15} * f^3 - 8,132 * 10^{-11} * f^2 + 3,401 * 10^{-6} * f + 0,968 \quad (3.3)$$

Dessa forma, para a compensação da resposta em frequência da sonda A622 é necessário obter a série de Fourier da corrente medida com a sonda, dividir cada componente espectral da corrente pelo coeficiente de correção dado na equação (3.3) e depois reconstruir a forma de onda no domínio do tempo.

A variação de fase da carga utilizada neste procedimento não foi observada na medição realizada no analisador de impedância no intervalo de 100 Hz à 100 kHz. Contudo, a medição com a ponteira de corrente A622 apresenta um atraso de 3,5 μs . A Figura 17 apresenta a curva de defasagem introduzida na medição da corrente na carga resistiva.

Figura 17 – Defasagem entre tensão e corrente.



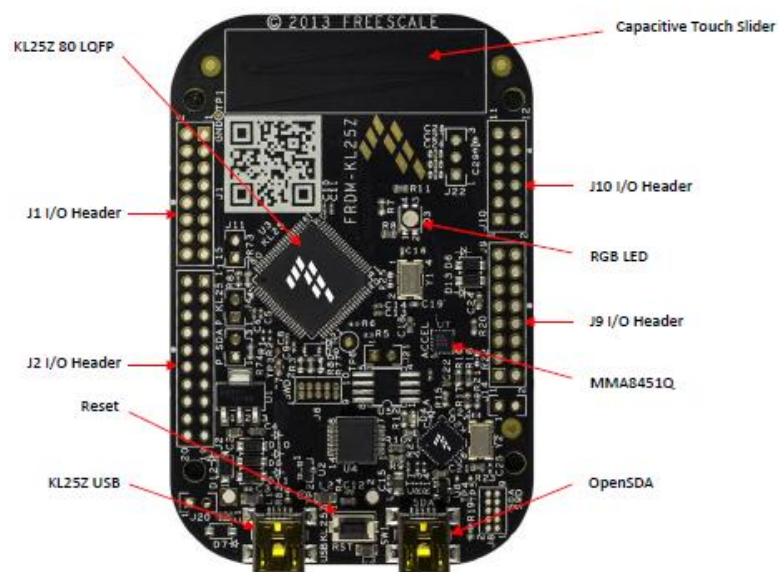
Fonte: próprio autor.

3.1.5 Sistema de aquisição de dados

O sistema de aquisição de dados foi desenvolvido utilizando a plataforma de desenvolvimento FRDM-KL25Z da Freescale®. Essa plataforma é um conjunto de ferramentas de hardware e software. A Figura 18 apresenta essa plataforma. As principais características da plataforma são:

- Processador ARM Cortex-M0+core de 32bits, com frequência máxima de operação de 48 MHz.
- Controlador USB *full-speed* para periféricos analógicos e digitais.
- Memórias: *flash* de 128 kB, SRAM de 16 kB;
- Interfaces dispostas na plataforma: acelerômetro digital de três eixos, LED (*light emitter diode*) RGB (*red, green, blue*) e ainda um sistema de *touch* capacitivo.
- Periféricos analógicos: O microcontrolador KL25Z é equipado com 14 canais de conversão A/D – (analógico/digital) com até 16 bits de resolução, podendo chegar a uma taxa de 461 ksps. Além disso, o microcontrolador possui 6 canais de comparadores analógicos e um canal de conversão D/A –(digital-analógico) de 12 bits.
- Temporizadores: O sistema de temporizadores é composto por um módulo de 6 canais de Timer/PWM. Conta ainda com relógio de tempo real (RTC) – *Real Time Clock* e dois canais de interrupção periódica de tempo (PIT) – *Periodic Interrupt Timer*.

Figura 18 – Plataforma de desenvolvimento FRDM-KL25Z.



3.1.6 Geração de sinais

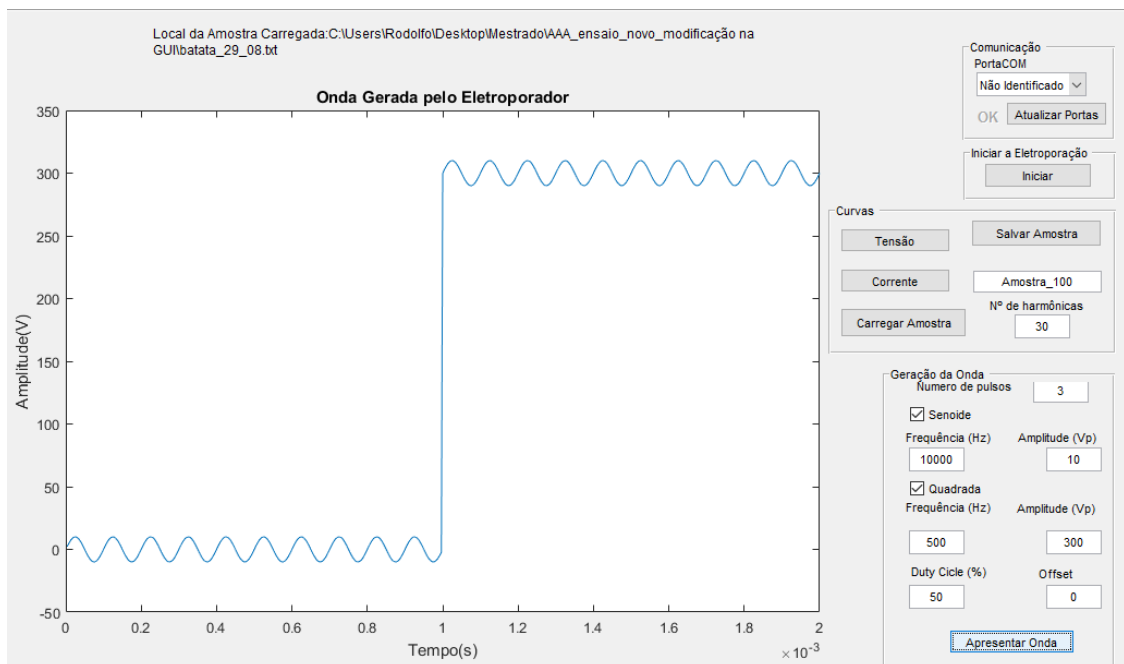
Para a geração dos sinais pode-se dividir esse tópico em:

1. Geração do sinal no programa MATLAB® e envio do vetor de onda para o microcontrolador.
2. Reprodução do sinal pelo microcontrolador KL25Z da Freescale®.

a) *Geração do sinal no software MATLAB®;*

Para a geração da forma de onda de tensão a ser utilizada no eletropermeabilizador foi desenvolvida uma interface gráfica utilizando a ferramenta *Graphical User Interfaces (GUI)* do programa MATLAB®. A Figura 19 apresenta a interface desenvolvida.

Figura 19 – Interface Gráfica desenvolvida.



Fonte: próprio autor.

Essa interface gráfica permite o usuário compor formas de onda do tipo quadrada e senoidal. É possível variar a frequência, amplitude, razão cíclica, inserir nível DC, além disso, variar o número de pulsos.

Para a construção da onda é necessário considerar a frequência de amostragem do conversor D/A do microcontrolador (278 kHz) e o tamanho do vetor para a reprodução do sinal

(2000 bytes). O programa calcula os pontos de acordo com as escolhas do usuário e envia esse vetor de números inteiros e sem sinal para o microcontrolador.

Para determinar o número de pontos necessários para compor uma onda, basta utilizar a frequência fundamental (f_s) dessa onda e a frequência de amostragem (f_a) do conversor, essa relação é mostrada na equação (3.4).

$$N^\circ \text{ pontos} = \frac{f_a}{f_s} \quad (3.4)$$

Assim, para compor um sinal com frequência de 500 Hz são necessários 556 pontos.

A comunicação entre os dispositivos é feita via comunicação serial. Para a comunicação entre o transmissor e receptor é necessário utilizar um protocolo pré-definido. Dessa forma, o sistema foi configurado com 8 bits de dados, sem paridade, um bit de parada e com velocidade de 9600 bps.

Para o envio do vetor de onda é utilizada a função *fopen* que abre o canal de comunicação, na sequência é utilizada a função *fwrite* que escreve as informações na serial, ambas as funções são do *software* MATLAB®.

b) Reprodução do sinal pelo microcontrolador KL25Z da Freescale®.

O microcontrolador realiza a leitura da porta serial, e salva os valores enviados pelo MATLAB® em uma variável do tipo *char*. Após a leitura, o microcontrolador escreve os valores do vetor em seu conversor D/A com a frequência de amostragem de 278 kHz.

A Figura 20 (a) apresenta o circuito para a eliminação do nível DC e a Figura 20 (b) mostra um filtro passa baixa de 4º ordem utilizado para diminuir o ruído de quantização do conversor.

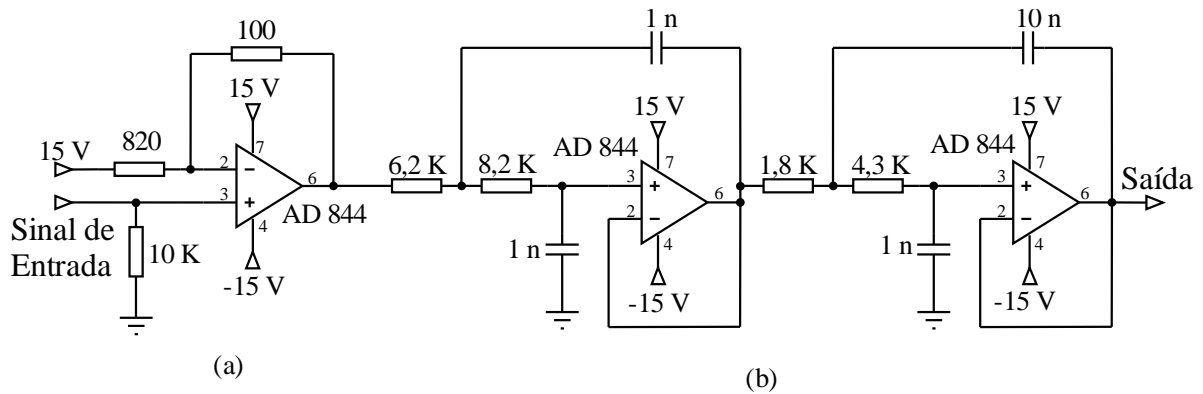
O circuito para a eliminação do nível DC é um *buffer* com a soma de um nível DC, dessa forma, é possível eliminar o valor médio presente na saída do microcontrolador. A utilização desse circuito é preferível em relação a filtros para eliminar nível DC, devido a distorções na forma de onda quadrada que serão utilizadas nesse projeto.

Para a eliminação do ruído de quantização foi utilizado um filtro passa baixa montado na estrutura de Salley Key, foi projetado utilizando o software FilterPro® com frequência de corte de 20 kHz.

Para a concepção do sistema mostrado na Figura 20 foi utilizado o ampop AD844. O AD844 possui banda passante de 66 MHz com ganho de 1V/V, máxima derivada de tensão –

(*slew rate*) de 2000 V/ μ s e baixa densidade de ruído 2 nV/ $\sqrt{\text{Hz}}$ para frequências maiores que 1 kHz (ANALOG DEVICES).

Figura 20 – (a) Circuito para a eliminação do nível DC da saída do conversor DA; (b) Filtro passa baixa de estrutura Salley Key.



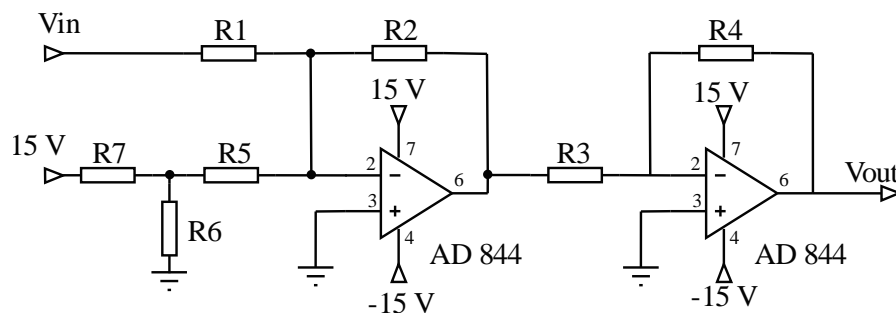
Fonte: próprio autor.

3.1.7 Aquisição de sinais

Para a digitalização dos sinais provenientes dos transdutores de tensão e corrente é necessário adequar os níveis de tensão às entradas dos conversores A/D do microcontrolador que trabalha com níveis de tensão de zero a 3,3 V. Para isso foi desenvolvido um circuito para o condicionamento de sinais, que é mostrado Figura 21.

A relação entre a tensão de entrada - (V_{in}) e a tensão de saída (V_{out}) do circuito de condicionamento é mostrada na equação (3.5).

Figura 21 – Sistema de condicionamento de sinais.



Fonte: próprio autor.

$$V_{out} = \frac{R4}{R3} \left(V_{in} \frac{R2}{R1} + \frac{R6R215}{R6R5 + R7R5 + R7R6} \right) \quad (3.5)$$

A topologia do circuito de condicionamento de sinais mostrado na Figura 21 é igual para o condicionamento dos sinais de tensão e corrente. O que difere são os resistores devido a diferenças de ganho necessários para adequar os sinais. A Tabela 3 apresenta os valores das resistências que foram utilizadas no projeto do sistema de condicionamento de sinais. Foi utilizado o Multímetro da Rigol® modelo DM3062 que possui 6,5 dígitos de precisão para a medição das resistências.

A digitalização dos sinais é realizada pelo microcontrolador KL25Z. São utilizados dois canais de conversão o PTB0 e o PTB1, ambos com 16 bits de resolução. Os sinais digitalizados são enviados ao *software* MATLAB® e são apresentados na interface gráfica desenvolvida como é mostrado na Figura 19, para isso basta clicar em botões adequados na interface como é mostrado na Figura 22.

Tabela 3 – Valores de resistores utilizados no sistema de condicionamento.

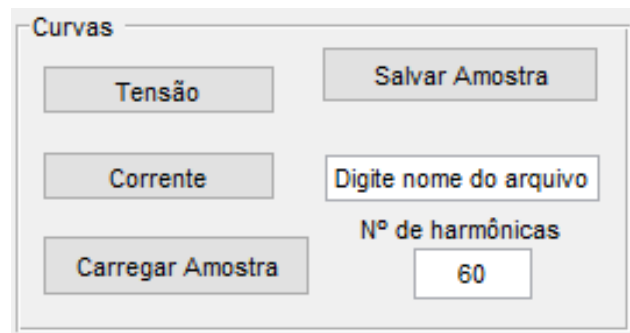
Resistor	Sinal do transdutor de tensão	Sinal do transdutor de corrente
R1	9824,0 Ω	1757,7 Ω
R2	1784,7 Ω	1751,9 Ω
R3	980,22 Ω	4651,0 Ω
R4	990,85 Ω	984,80 Ω
R5	978,50 Ω	982,60 Ω
R6	992,30 Ω	987,20 Ω
R7	7400,7 Ω	7393,5 Ω

Fonte: próprio autor.

Segundo a especificação do fabricante do microcontrolador é possível chegar a uma velocidade de 461 ksps. Entretanto, devido a utilização de dois canais e dos tempos necessários para o microcontrolador executar operações necessárias foi possível alcançar uma taxa de 170 ksps por canal.

Na interface gráfica foram desenvolvidos outros recursos como mostra a Figura 22: salvar as ondas de tensão e corrente que estimularam a amostra, carregar os resultados de um ensaio (Tensão/Corrente) e definir número de harmônicas para a compensação da forma de onda da corrente como já foi explicado no item 3.1.4.

Figura 22 – Detalhe para apresentação das formas de ondas adquiridas.



Fonte: próprio autor.

3.1.8 Programação e software

Nessa seção são apresentados com detalhe os algoritmos utilizados na programação dos microcontroladores e do MATLAB®. Devido a isso, dividimos essa seção em: a) Programação do microcontrolador e b) Programação do MATLAB®.

a) Programação do microcontrolador

Para obter maior velocidade na taxa de amostragem da digitalização dos sinais foram utilizados dois microcontroladores, um microcontrolador responsável por reproduzir o sinal em seu conversor D/A e outro microcontrolador responsável por digitalizar os sinais de tensão e corrente. Assim, foi necessário desenvolver dois programas, um para a geração do sinal e outro para a digitalização dos sinais.

A programação dos microcontroladores foi realizada em linguagem C, utilizando o software *CodeWarrior* versão 10,3 da Freescale®.

A Figura 23 apresenta os fluxogramas simplificados utilizados na programação dos microcontroladores e no software da interface gráfica do MATLAB®.

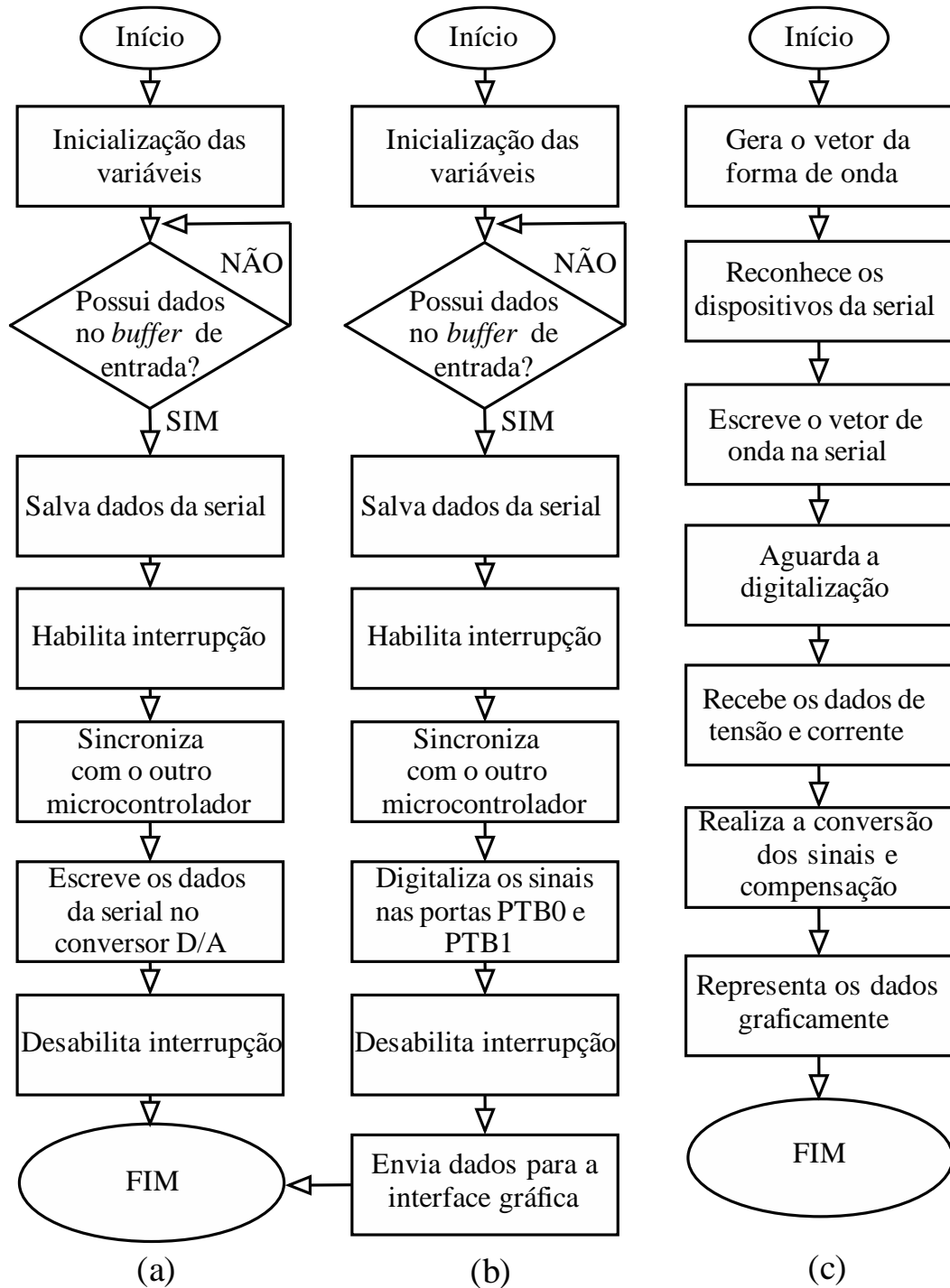
O microcontrolador que irá reproduzir a onda em seu conversor D/A, tem a inicialização das variáveis e em seguida o mesmo aguarda o vetor de onda que será enviado pelo MATLAB®. Em seguida, os dados recebidos na serial são armazenados e a interrupção é habilitada, o sincronismo com o microcontrolador da digitalização é realizado. Foi utilizada interrupção por *hardware*, sendo gerada pelo PWM – *Pulse Width Modulation*. A interrupção é gerada na passagem entre o nível baixo para o nível alto. A utilização da interrupção é necessária para garantir o mesmo período de amostragem para a conversão D/A como para a A/D.

Logo após o sincronismo entre os dispositivos os dados armazenados são reproduzidos no conversor D/A. Depois de todo o vetor reproduzido, a interrupção é desabilitada e as variáveis são inicializadas. O microcontrolador retorna a leitura da serial.

O microcontrolador que realiza a digitalização possui a lógica muito parecida com a descrita anteriormente, aqui serão comentadas algumas diferenças.

O microcontrolador realiza a leitura da serial, pois, o MATLAB® informa o tamanho do vetor necessário para a digitalização de todo o sinal configurado pelo usuário. Quando o sinal é gerado pelo conversor D/A é dado início a digitalização do sinal, nenhuma amostra é perdida devido ao sincronismo entre os microcontroladores. Após a digitalização, os dados são enviados via serial para o MATLAB® para o pós-processamento.

Figura 23 – Fluxograma do algoritmo implementado no: (a) microcontrolador que gera sinais, (b) microcontrolador que digitaliza os sinais de tensão e corrente, (c) programa na interface gráfica do MATLAB®.



Fonte: próprio autor.

b) Programação do MATLAB®

A Figura 23 (c) apresenta o fluxograma do algoritmo implementado na linguagem MATLAB®. O programa gera a forma de onda de acordo com a escolha do usuário. Em seguida, o *software* reconhece os dispositivos conectados ao computador. Reconhecidos os microcontroladores e após o usuário dar início, o *software* envia os dados aos microcontroladores, aguarda a digitalização e começa a receber os dados digitalizados. Na sequência, é realizado a conversão dos sinais digitalizados e a conversão dos sinais digitais para os valores reais e então os dados podem ser representados graficamente.

3.1.9 Concepção do projeto

Após a apresentação de todas as partes do sistema eletrônico é necessário apresentar a união dessas para o entendimento do sistema. A Figura 24 apresenta essa interligação.

Após a digitalização e envio dos dados ao MATLAB®, é necessário realizar a conversão das informações digitais nos valores de tensão e corrente que estimularam a amostra. Para isso, deve ser lembrando que o microcontrolador foi configurado com resolução do conversor de 16 bits e que a máxima tensão na entrada de seu conversor A/D é de 3,3 V. Dessa forma, a conversão de valores digitais em valores analógicos é obtida a partir da equação (3.6).

$$\text{Analógico} = \frac{\text{Digital} * 3,3}{2^{16}} \quad (3.6)$$

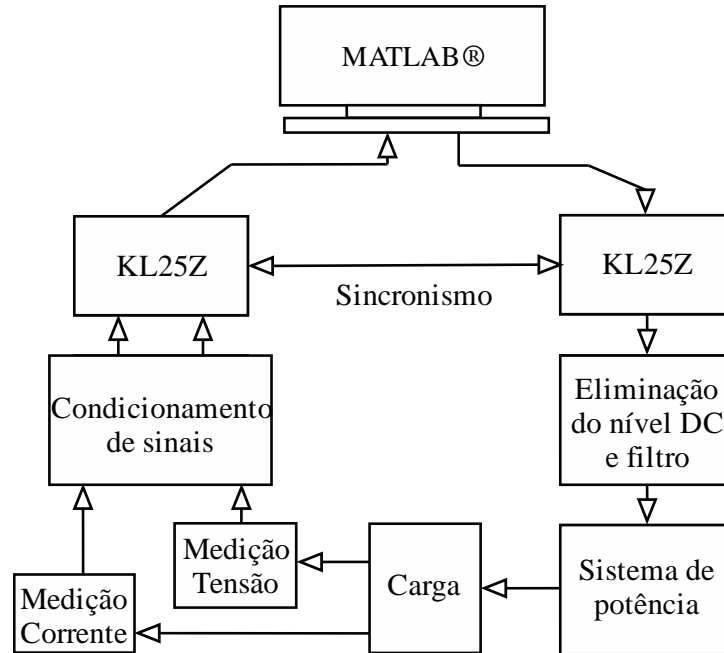
Utilizando as equações (3.2), (3.5) e (3.6) determina-se a tensão aplicada na carga.

$$V_c = \left(\frac{V_{\text{digital}} * 3,3}{2^{16}} - 1,73 \right) 347,77 \quad (3.7)$$

Para a determinação da corrente que circula pela amostra, são utilizadas as equações (3.5) e (3.6).

$$I_c = \left(\frac{I_{\text{digital}} * 3,3}{2^{16}} - 1,665 \right) 2,638 \quad (3.8)$$

Figura 24 – Sistema simplificado do projeto do eletroporador.



Fonte: próprio autor.

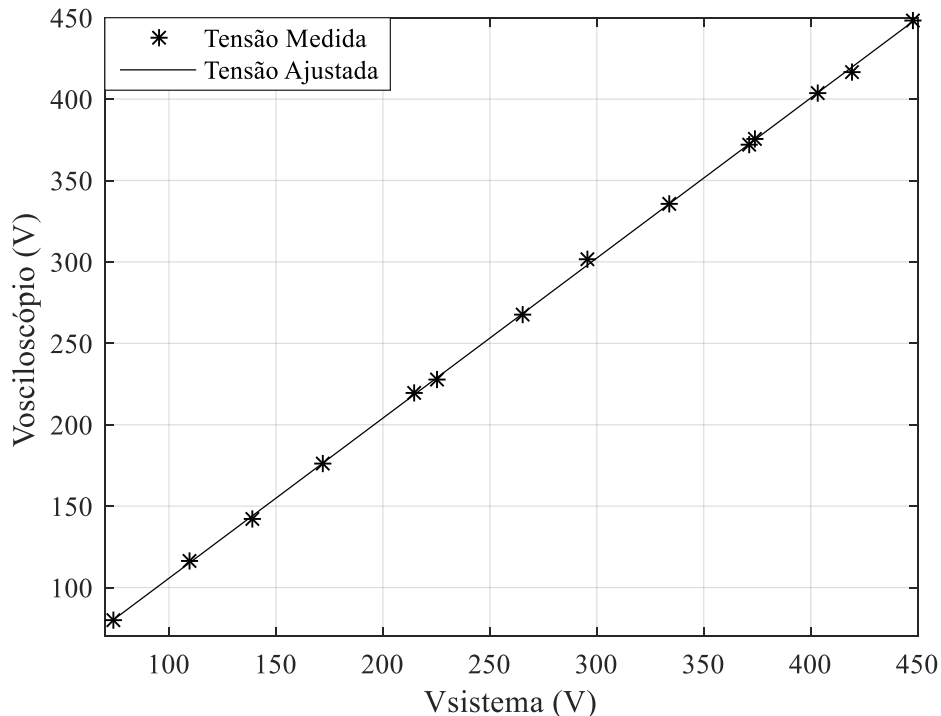
Para a calibração do sinal de tensão medida foi realizada a medição de tensão pelo sistema de aquisição de dados e pelo osciloscópio da Tektronix® modelo TDS 2024B, utilizando as ponteiros de tensão P2220 da Tektronix®.

A tensão aplicada na carga foi variada de 70 V até 450 V totalizando 14 medidas. A Figura 25 apresenta a curva da tensão medida pelo sistema – $V_{sistema}$ pela tensão medida pelo osciloscópio – $V_{osciloscópio}$. Para determinar a curva da tensão ajustada na foi utilizada a função *polyfit* do MATLAB®, e a equação (3.9) apresenta o ajuste dos valores de tensão.

$$V_{ajustado} = 0,9832 * V_c + 7,41 \quad (3.9)$$

A compensação do sistema de medição de corrente já foi descrito no item 3.1.4.

Figura 25 – Curva de calibração da tensão aplicada.



Fonte: próprio autor.

3.2 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Nesta seção serão apresentados os procedimentos para a obtenção dos resultados de eletropermeabilização de amostras de fígado de rato e a metodologia matemática para o cálculo do limiar de eletropermeabilização e condutância do tecido.

3.2.1 Amostras biológicas

Foram utilizadas amostras de fígado obtidas de rato da espécie isogênico de linhagem Wistar com idade entre 2 a 3 meses. Os experimentos foram aprovados pelo comitê de ética em uso animal da Universidade da Região de Joinville – UNIVILLE, com número do processo 007/0716, sendo que as amostras foram doadas pela mesma instituição.

Após a realização do experimento, as carcaças dos animais foram armazenadas em sacos de lixo infectante e mantidas sob refrigeração, para que a empresa Engepasa Ambiental realizasse a coleta e posteriormente a incineração dos resíduos.

As amostras foram cortadas de forma a obter o formato de um retângulo com arestas de 15 mm e altura de 3 mm e foi possível obter 3 amostras de cada animal. Assim, foi necessário

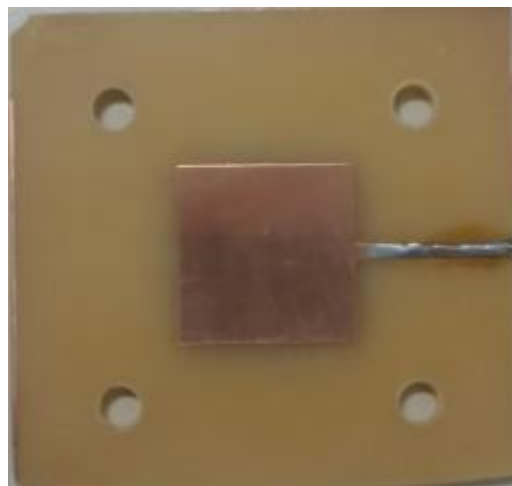
o uso de 20 animais para a obtenção dos resultados. O tempo máximo do uso da amostra após a morte do animal foi de 3 horas.

3.2.2 Eletrodos

Os eletrodos foram construídos com chapas de circuito impresso para formar um sistema de placas paralelas. Possuem uma geometria quadrada com aresta de 1,5 cm perfazendo uma área de 2,25 cm². A Figura 26 apresenta uma placa.

Os eletrodos possuem separação de 3 mm, podendo atingir um campo elétrico de 1500 V/cm, com a tensão de 450 V.

Figura 26 – Eletrodo utilizado para a aplicação de campo elétrico na amostra de fígado.



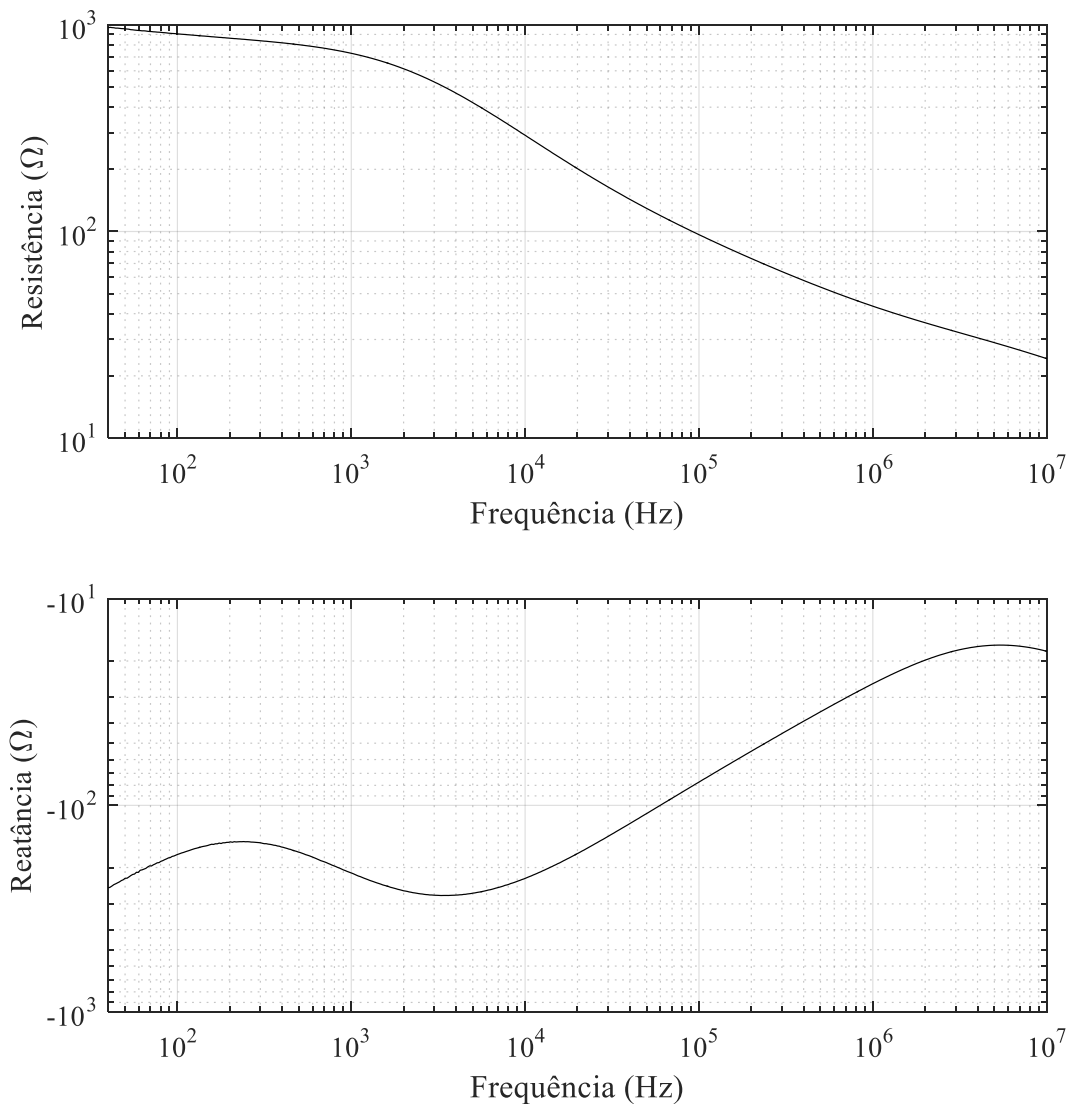
Fonte: próprio autor.

3.2.3 Polarização de eletrodo

Os eletrodos são utilizados para aplicar ou medir sinais elétricos. Na interface entre um eletrodo metálico e o eletrólito forma-se uma região de acúmulo de íons dominada de região de carga espacial. A carga elétrica transferida entre eletrodo e eletrólito e a carga elétrica acumulada na interface determinam efeitos dispersivos que afetam significativamente as medidas elétricas em baixas frequências (RAMOS, 2016).

Para medir as propriedades elétricas do fígado de rato e aplicar o campo elétrico é utilizado o mesmo sistema de eletrodos conforme apresentado na Figura 26. O espectro de impedância de uma amostra de fígado obtido com esse sistema de eletrodos e o analisador de impedância 4294A da Agilent® é apresentado na Figura 27.

Figura 27– Resistência e reatância de uma amostra de fígado de rato medida com o sistema de eletrodos mostrado na Figura 26 e analisador Agilent® 4294A.



Fonte: próprio autor.

Observa-se na Figura 27 o efeito da polarização dos eletrodos até aproximadamente 1 kHz. Desse modo, foi possível definir um protocolo de eletropermeabilização onde o efeito da polarização de eletrodo é desprezível e assim simplificar a análise matemática.

Schwan (SCHWAN, 1968) apresentou um estudo segundo o qual a variação da capacitância e da resistência de polarização depende da corrente que circula pelo sistema. Os resultados apresentados mostram que a resistência diminui e a capacitância aumenta com o aumento da corrente, diminuindo assim a impedância de polarização. Além disso, os níveis de corrente apresentados no trabalho de Schwan foram no máximo de 10 mA, enquanto a corrente

devido à eletropermeabilização apresenta valor muito maior. Assim, conclui-se que a impedância de eletrodo pode ser desprezada na avaliação dos resultados obtidos neste estudo.

3.2.4 Protocolos de eletropermeabilização

Neste estudo pretende-se obter resultados experimentais da dinâmica da eletropermeabilização, tais como: campo limiar e tempos de relaxação. Com esse fim são utilizados diferentes protocolos que serão apresentados nos tópicos a seguir:

a) Limiar de eletropermeabilização;

Para a determinação do limiar de eletropermeabilização, foram utilizadas rampas de tensão com diferentes derivadas, ou seja, o intervalo de tempo para a tensão aplicada aumentar de 0 V até 400 V foi ajustado em 100, 200, 350, 500 e 1000 μ s. Além disso, os experimentos foram realizados em temperaturas diferentes a saber: 22 °C, 30 °C e 37 °C. Dessa forma, foi possível avaliar a influência da temperatura e da derivada de tensão no limiar de eletropermeabilização.

b) Dinâmica da eletropermeabilização.

O protocolo utilizado para se estudar a dinâmica da eletropermeabilização, consiste de um trem de 10 pulsos com frequência de 1 kHz e razão cíclica de 50%. A amplitude em nível alto do pulso é aproximadamente 390 V e em nível baixo é 40 V.

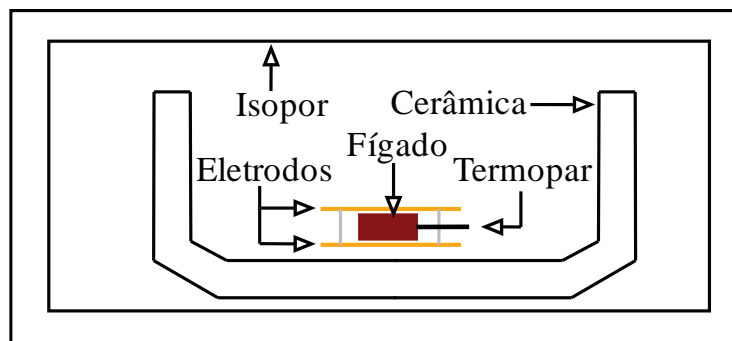
A frequência da tensão aplicada foi definida para reduzir a influência da polarização de eletrodo, podendo-se desse modo desprezar esse fenômeno. O valor não nulo da tensão no nível baixo da forma de onda foi escolhido para se determinar a condutância no intervalo de tempo entre os pulsos. De forma idêntica ao tópico anterior, foram realizados experimentos em diferentes temperaturas: 22 °C, 30 °C e 37 °C.

3.2.5 Coleta de dados

Com a finalidade de obter as características elétricas da amostra, é realizada a medição de sua impedância com o analisador 4294A da Agilent®. A impedância da amostra é medida no intervalo de frequência de 40 Hz a 10 MHz, com 500 pontos distribuídos de forma logarítmica entre as frequências citadas. Após a medição da impedância, é aplicado o protocolo de eletropermeabilização na amostra.

Devido às experiências em diferentes temperaturas é necessário o aquecimento das amostras utilizadas nos ensaios de 30 °C e 37 °C antes da medição da impedância e eletropermeabilização do material biológico. Nos ensaios realizados à temperatura de 22 °C não é necessário o aquecimento. Foi utilizado um forno doméstico adaptado para comportar um recipiente de cerâmica no qual as amostras são acondicionadas após a acomodação do tecido no espaço entre os eletrodos. O uso da peça de cerâmica diminui a perda de calor para o meio, mantendo a temperatura até o fim do ensaio. A temperatura foi medida utilizando um termopar do tipo “K” conectado ao multímetro da Icel® modelo MD-6111. Após o alcance da temperatura desejada o recipiente de cerâmica contendo a amostra biológica é transferido para uma caixa de isolamento térmica de isopor. Nesse local as medições são realizadas. A Figura 28 mostra um corte transversal desse sistema.

Figura 28 – Sistema para acondicionamento e conservação da temperatura da amostra.



Fonte: próprio autor.

3.2.6 Modelo matemático para a dinâmica e limiar de eletropermeabilização

Quando a amostra de tecido biológico é estimulada eletricamente, a corrente (I_{Tot}) resultante é composta de uma parcela devido aos mecanismos normais de condução e dispersão (I_{Dis}) enquanto outra parcela é devido à eletropermeabilização (I_{Ele}). A equação (3.10) apresenta essa relação.

$$I_{Tot}(t) = I_{Ele}(t) + I_{Dis}(t) \quad (3.10)$$

A corrente I_{Dis} depende da impedância da amostra e da tensão aplicada. Para a obtenção dessa parcela é necessário medir a impedância da amostra antes da aplicação do protocolo de eletropermeabilização. Isso é realizado com o analisador de impedância 4294A da Agilent®.

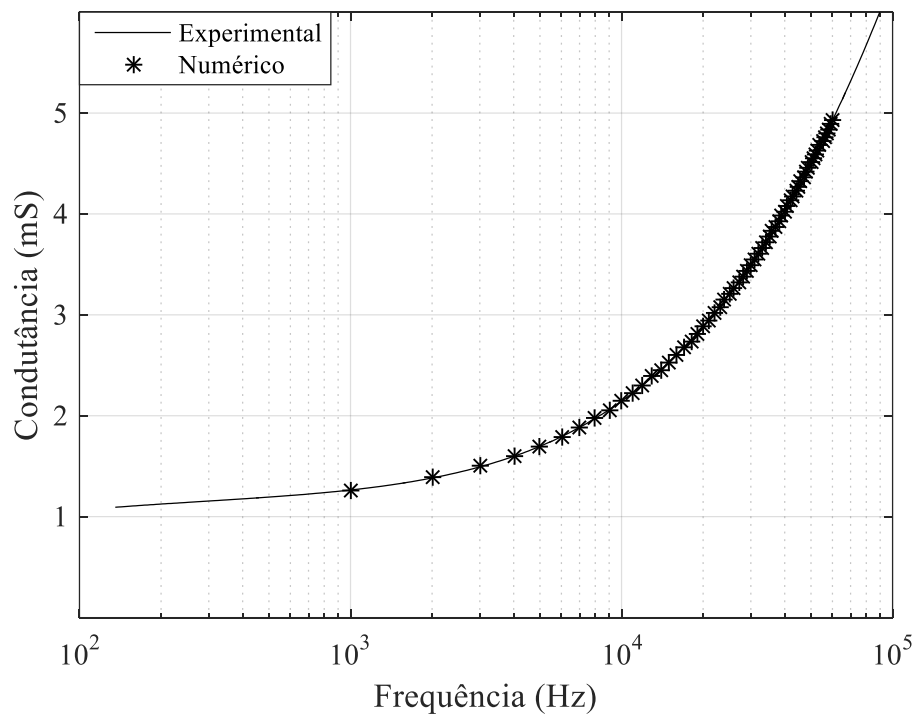
Com os dados de impedância facilmente pode-se obter a admitância da amostra. A parte real da admitância é chamada de condutância e é apresentada na Figura 29. A parte imaginária da admitância é chamada de susceptância e é apresentada na Figura 30. A fim de utilizar a impedância no cálculo numérico da corrente dispersiva, foi obtido um polinômio equivalente utilizando a função *polyfit* do MatLab® para as curvas de condutância e susceptância. Os pontos obtidos por essa interpolação polinomial para uma amostra são apresentados juntamente com os resultados experimentais nas Figura 29 e 30.

Por fim, são obtidos os coeficientes de Fourier da forma de onda de tensão utilizada na estimulação da amostra. Os coeficientes de Fourier da corrente I_{Dis} são obtidos multiplicando os coeficientes de Fourier da forma de onda da tensão pela admitância nas respectivas frequências, como é mostrado na equação (3.11).

$$C_{Dis}(i) = [G_{Dis}(i) + j * B_{Dis}(i)] T_{Ele}(i) \quad (3.11)$$

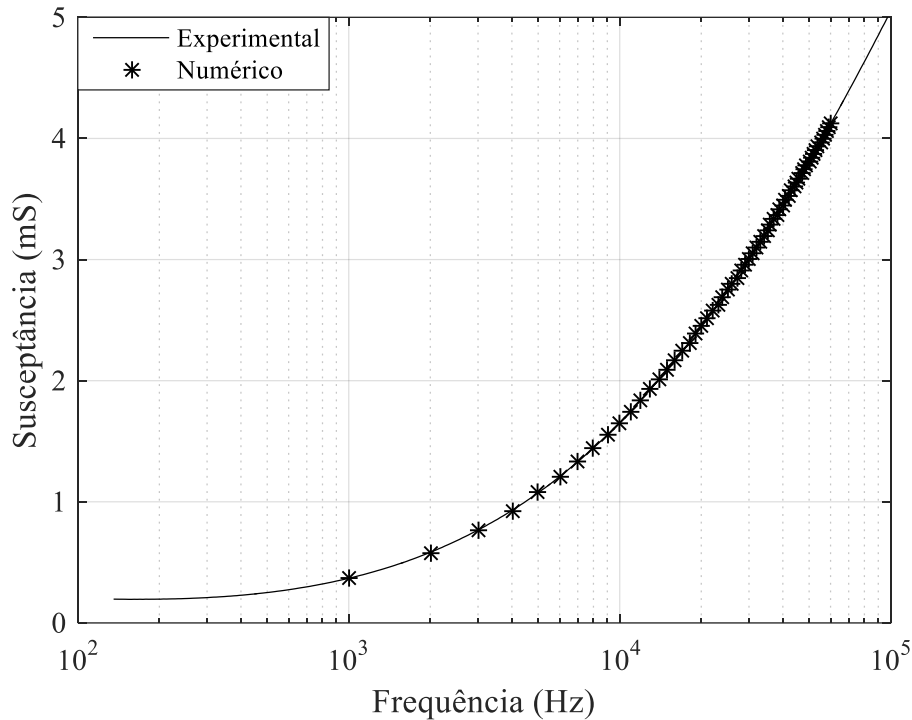
Onde C_{Dis} são os coeficientes de Fourier da corrente I_{Dis} , T_{Ele} são os coeficientes de Fourier da forma de onda da tensão utilizada na eletropermeabilização, G_{Dis} e B_{Dis} são a condutância e susceptância do tecido respectivamente, i indica a ordem da harmônica e $j = (-1)^{1/2}$.

Figura 29 – Condutância de uma amostra de fígado de rato.



Fonte: próprio autor.

Figura 30 – Susceptância de uma amostra de fígado de rato.

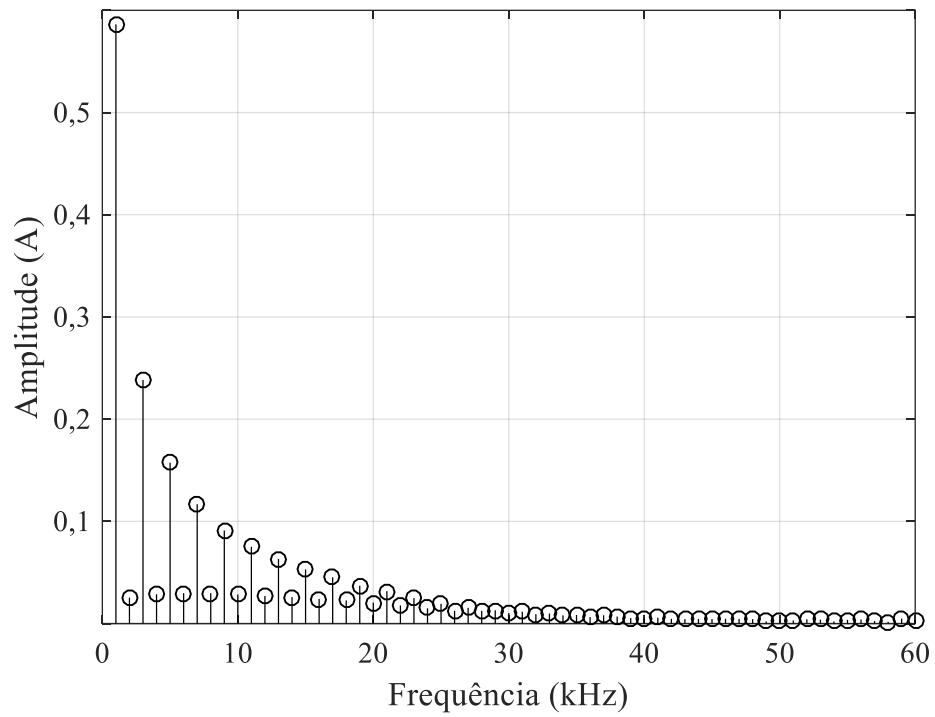


Fonte: próprio autor.

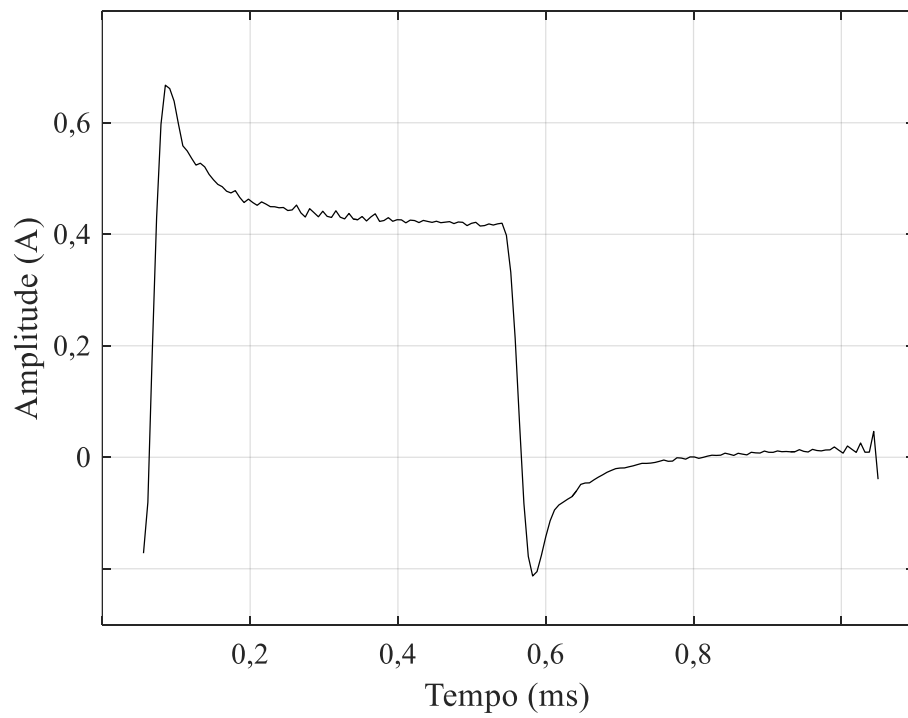
A Figura 31 apresenta os coeficientes C_{Dis} para uma amostra de fígado de rato. É possível observar que a partir de uma determinada harmônica de frequência a energia do sinal é muito baixa podendo dessa forma ter uma boa representação do sinal com a utilização de 60 harmônicas.

Para obter a forma de onda de I_{Dis} como função do tempo basta obter a série de Fourier com os coeficientes mostrados na Figura 31. A Figura 32 apresenta esse resultado. A forma da corrente dispersiva é devida aos mecanismos de dispersão que foram apresentados na seção 2.1.1. O valor médio da corrente é obtido com a divisão da componente em zero Hertz da tensão pela impedância da amostra na frequência de 40 Hz. Esse valor é adicionado à forma de onda da corrente dispersiva.

A partir da forma de onda da corrente total obtida durante o experimento de eletropermeabilização e da forma de onda da corrente dispersiva obtida com o procedimento apresentado anteriormente, pode-se obter a corrente de eletropermeabilização conforme equação (3.10). A Figura 33 apresenta as formas de onda das correntes I_{Tot} , I_{Dis} e I_{Ele} .

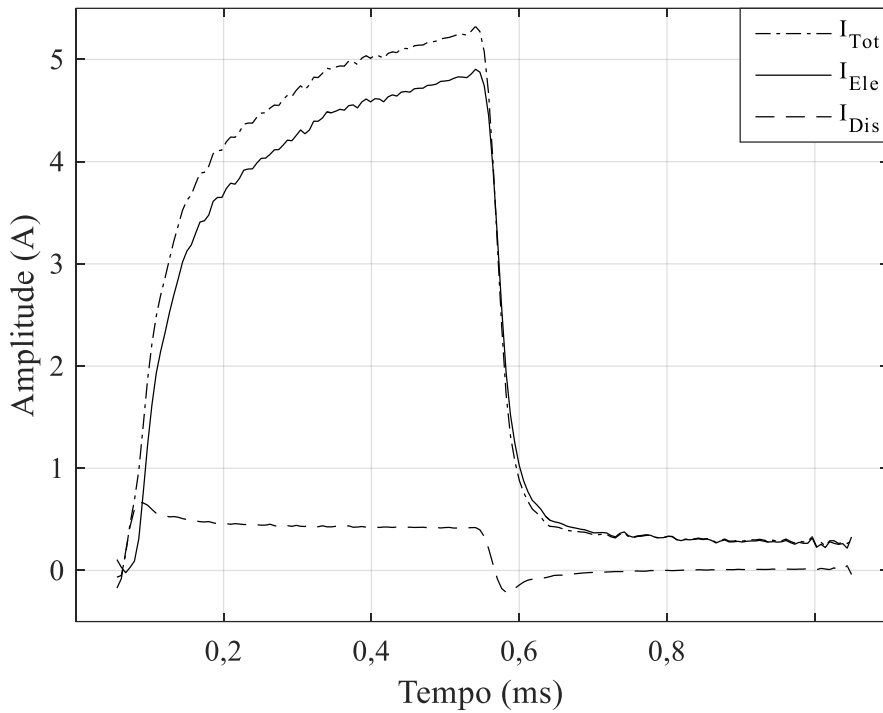
Figura 31 – Coeficientes do espectro da corrente I_{Dis} .

Fonte: próprio autor.

Figura 32 – Forma de onda em função do tempo de I_{Dis} .

Fonte: próprio autor.

Figura 33 – Formas de onda das correntes : I_{Tot} , I_{Ele} e I_{Dis} .



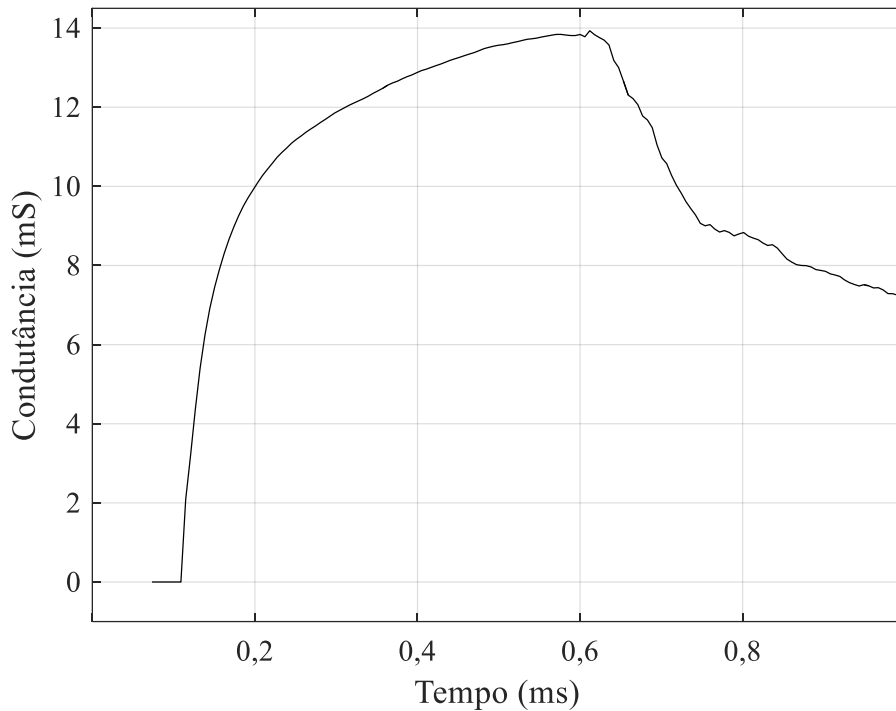
Fonte: próprio autor.

A partir do valor da I_{Ele} é possível calcular a variação da condutância durante o fenômeno da eletropermeabilização, uma vez que a dispersão presente em tecidos biológicos foi matematicamente compensada pela corrente I_{Dis} . Assim, a condutância da amostra é calculada como mostra a equação (3.12).

$$G_a(t) = \frac{I_{Ele}(t)}{V_{Ele}(t)} \quad (3.12)$$

V_{Ele} é a tensão de estimulação da amostra e t é o tempo. A Figura 34 apresenta a variação da condutância da amostra durante o primeiro pulso de tensão.

Figura 34 – Variação da Condutância da amostra devido à eletropermeabilização.



Fonte: próprio autor.

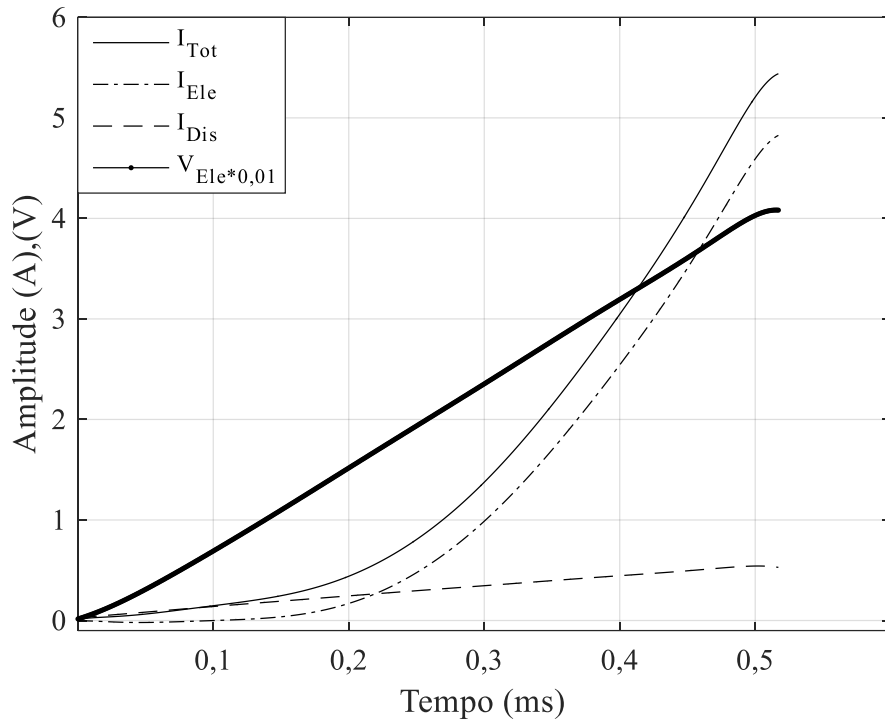
Para a determinação do limiar de eletropermeabilização é necessário utilizar o mesmo procedimento matemático descrito anteriormente para a obtenção da I_{Dis} e I_{Ele} . A Figura 35 apresenta a forma de onda das correntes: I_{Tot} , I_{Ele} e I_{Dis} , além da forma de onda de tensão de estimulação V_{Ele} .

Observa-se que no início da rampa as curvas de I_{Tot} e I_{Dis} são paralelas e possuem praticamente o mesmo valor, como mostra com mais detalhes a Figura 36. Porém com o passar do tempo e o aumento da tensão, as curvas da I_{Tot} e I_{Dis} passam a divergir, devido ao fenômeno de eletropermeabilização que aumenta a corrente I_{Tot} . A partir desses conceitos podemos definir o valor do limiar de eletropermeabilização como a intensidade do campo elétrico na qual o valor instantâneo da corrente total difere da corrente dispersiva por 10%. Isso é descrito na equação a seguir.

$$\text{Campo limiar} = \frac{V_{Ele}(I_{Tot} = 1,1I_{Dis})}{d} \quad (3.13)$$

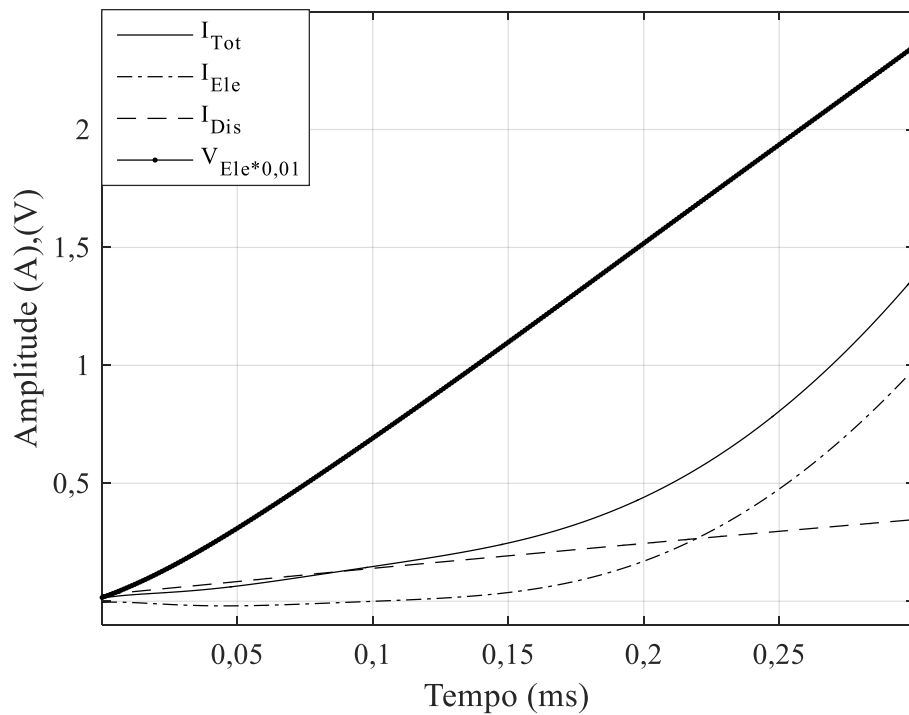
Onde d é a separação entre os eletrodos.

Figura 35 – Forma de onda de I_{Tot} , I_{Ele} , I_{Dis} e V_{Ele} , para uma rampa com duração de 500 μs .



Fonte: próprio autor.

Figura 36 – Ampliação do início da Figura 35.



Fonte: próprio autor.

3.2.7 Simulação numérica da eletropermeabilização

a) *Simulador baseado no Método do Circuito Equivalente (MCE);*

O programa de simulação identificado pelo acrônimo BEC (Biological Electric Circuit) foi desenvolvido no Grupo de Eletromagnetismo Aplicado da UDESC (GPEA) e encontra-se disponível para livre utilização no endereço eletrônico: <http://www2.joinville.udesc.br/~gpea>.

O programa BEC tem uma interface simples com menus e caixas de diálogos para a entrada de dados e seleção das ferramentas de análise. Os dados de entrada referem-se à forma de discretização espacial; tipos, dimensões e diferentes propriedades dos domínios que compõem o meio de análise; tipos, dimensões e materiais que compõe os eletrodos usados na estimulação elétrica do meio; formas de onda da tensão elétrica aplicada nos eletrodos; parâmetros do modelo de eletropermeabilização biológica; parâmetros do modelo de domínio térmico e condições de contorno térmico.

Para cada tipo de material é declarado um domínio diferente e as propriedades elétricas devem ser especificadas por valores de σ_s , ϵ_∞ e pelos parâmetros de dispersão de cada banda ($\Delta\epsilon$, τ , e α). Em um meio anisotrópico é possível declarar as propriedades elétricas em cada eixo do sistema de coordenadas. Os domínios podem ser retangulares (blocos), cilíndricos ou esferoidais e podem se sobrepor, sendo que o último domínio definido tem o privilégio de definir as propriedades do meio.

Os eixos de coordenadas utilizadas no posicionamento de cada bloco na malha podem ser divididos em vários segmentos com número diferente de divisões e parâmetros de malha, permitindo assim a construção de malhas irregulares com alta concentração de blocos em certas regiões onde se espera que os campos elétricos sejam mais intensos, especialmente em torno dos eletrodos e nas interfaces entre domínios diferentes.

Os eletrodos podem ser retangulares (blocos), cilíndricos, planares (circulares ou retangulares) ou podem simplesmente ser orientados em linhas nas direções dos eixos coordenados. O tipo de metal do eletrodo precisa ser especificado. O programa BEC internamente possui os dados térmicos dos metais disponíveis.

O modelo de eletropermeabilização requer especificações do valor de condutividades σ_0 e σ_{\max} , tempos de relaxação τ_0 and τ_{\max} e dos limiares E_1 e E_2 . Esses parâmetros do modelo são apresentados na próxima seção.

Os parâmetros do modelo térmico assim como os coeficientes de transferência de calor para materiais biológicos foram obtidos da literatura (DAVALOS, RUBINSKY e MIR, 2003).

Um programa foi construído na linguagem do MATLAB® com nome “bec.m” para verificar a entrada e saída de dados do simulador BEC. Esta interface fornece as seguintes ferramentas: a) relatório com todos os dados fornecidos pelo usuário; b) gráficos tridimensionais mostrando a distribuição espacial dos domínios e eletrodos; c) gráficos bidimensionais ou tridimensionais, gráficos de contornos e vetoriais mostrando a distribuição espacial do potencial elétrico, corrente elétrica, campo elétrico e temperatura em qualquer instante de tempo; d) formas de onda no tempo das fontes de tensão aplicadas nos eletrodos assim como o potencial elétrico, corrente elétrica, campo elétrico e temperatura em qualquer posição da malha discretizada ou valores médios em volumes definidos pelo usuário.

As simulações foram realizadas nos computadores do Laboratório de Eletromagnetismo do Departamento de Engenharia Elétrica da UDESC, os quais apresentam a seguinte configuração: processador Intel® core2 Duo (3 GHz), 4 GB de memória RAM, 297 GB de HD e sistema operacional Windows 7™.

b) Modelo de eletropermeabilização no simulador BEC;

Para a simulação numérica da eletropermeabilização é necessário definir um modelo matemático para a variação da condutância do tecido biológico durante o processo de eletropermeabilização. Dessa forma, utilizando como ponto de partida o modelo proposto por Neu e Krassowska (NEU e KRASSOWSKA, 1999) já apresentado na equação (2.22) e multiplicando ambos os lado da equação pela condutância de um poro (g_p), pois nesse modelo os poros possuem o mesmo diâmetro, então, têm também a mesma condutância, obtém-se:

$$\frac{dg_m(t)}{dt} = \frac{g_o e^{(V_m/V_1)^2} - g_m(t)}{\tau_o e^{(V_m/V_2)^2}} \quad (3.14)$$

onde g_m é a condutância por unidade de área da membrana, $g_o = N_o g_p$, $\tau_o = N_o / \alpha$, $V_1 = q^{-0.5} V_{ep}$ e $V_2 = (q-1)^{-0.5} V_{ep}$.

A equação (3.14), a princípio, descreve a dinâmica da eletropermeabilização em membranas a partir de valores da condutância intacta por unidade de área g_o , do tempo de relaxação inicial τ_o e dos limiares V_1 e V_2 . Para ser aplicada em tecidos biológicos, deve-se considerar o efeito macroscópico da variação da condutância de membrana a partir de um processo de promediação espacial. Definindo a condutância de eletropermeabilização G_p como a média volumétrica de g_m no volume ocupado por uma célula no tecido, verificaremos que o potencial transmembrana tanto quanto os limiares V_1 e V_2 serão obtidos a partir do campo

elétrico médio no volume da célula multiplicado por uma distância característica da ordem do diâmetro celular. Assim, a equação (3.14) pode ser reescrita na seguinte forma:

$$\frac{dG_p(t)}{dt} = \frac{G_o e^{(E/E_1)^2} - G_p(t)}{\tau_o e^{(E/E_2)^2}} \quad (3.15)$$

onde E é o campo elétrico aplicado no tecido, E_1 e E_2 são os limiares de eletropermeabilização e G_o é a média volumétrica da condutância da membrana para o tecido intacto. Entretanto, a extensa experimentação da eletropermeabilização em tecidos biológicos revela duas características do modelo representado pela equação (3.15) que não se adequam ao comportamento observado. A condutância não aumenta sem limites mesmo quando estão envolvidos campos elétricos muito intensos. Isso significa que deve ser estabelecido um limite superior para o termo $G_o \exp(E/E_1)^2$. Isso pode ser obtido substituindo-se esse termo pela expressão a seguir.

$$\frac{G_o e^{(E/E_1)^2} G_t}{G_o e^{(E/E_1)^2} + G_t} = \frac{G_o G_t}{G_o + G_t e^{-(E/E_1)^2}} \quad (3.16)$$

Onde G_t é o valor da máxima condutância que o tecido pode alcançar com a eletropermeabilização. Naturalmente, a condutância máxima depende não somente da densidade e tamanho dos poros na membrana, mas da condutividade dos eletrólitos que envolvem as membranas, bem como da geometria das células e espaços intersticiais.

Além disso, a relaxação observada quando se usa campos aplicados com a forma de onda de pulsos apresenta uma fase inicial rápida, com tempos de subida da corrente elétrica da ordem de microssegundos. Contudo, na medida em que a corrente aumenta, ocorre uma redução significativa na taxa de crescimento da condutância, ocorrendo pouco depois uma fase nitidamente mais lenta. Quando o pulso de campo elétrico termina, a condutância diminui variando muito mais lentamente do que na subida do pulso. Essas observações sugerem que o tempo de relaxação varia entre um valor mínimo e um valor máximo durante o processo de eletropermeabilização. Assim, o termo $\tau_o \exp(E/E_2)^2$ no denominador da equação (3.15) deve ser modificado. Também nesse caso, propomos substituir esse termo pela seguinte expressão que apresenta um tempo de relaxação máximo τ_{max} .

$$\tau = \tau_o + \tau_{max} e^{-(E/E_2)^2} \quad (3.17)$$

Segundo esta equação o tempo de relaxação é pequeno (da ordem de τ_o) no início da estimulação com campo elétrico intenso. Quando o campo elétrico é anulado no fim da estimulação, o tempo de relaxação torna-se maior (da ordem de τ_{max}). Com essas modificações, o modelo dinâmico da condutância de um tecido biológico durante a ocorrência de eletropermeabilização pode ser assim escrito:

$$\frac{dG_p(t)}{dt} = \frac{\frac{G_o G_t}{G_o + G_t e^{-(E/E_1)^2 [G_t/(G_t+G_p)]^2}} - G_p(t)}{\tau_o + \tau_{max} e^{-(E/E_2)^2 [G_t/(G_t+G_p)]^2}} \quad (3.18)$$

onde G_t possui dois importantes efeitos para o modelo: ele limita o valor final da condutância de eletropermeabilização e produz a divisão de tensão com a condutância de membrana resultando na redução do potencial transmembrana quando a eletropermeabilização torna-se mais intensa. Isso é modelado pelo termo $G_t/(G_t+G_p)$.

c) Modelo de cálculo térmico no simulador BEC.

O cálculo da temperatura em tecidos biológicos durante a aplicação de campos elétricos intensos para obter eletropermeabilização é uma parte muito importante do processo de análise computacional uma vez que diversas propriedades do tecido, como condutividade e taxa de eletropermeabilização, dependem da temperatura da amostra.

O cálculo térmico vinculado ao Método do Circuito Equivalente - MCE é baseado na equação clássica do fluxo de calor (DAVALOS, RUBINSKY e MIR, 2003).

$$\nabla \cdot (k_t \nabla T) + p_{diss} = \rho c_p \frac{\partial T}{\partial t} \quad (3.19)$$

Onde T é a temperatura absoluta, k_t é a condutividade térmica do material, c_p é o calor específico sob pressão constante do material, ρ é a densidade do material e p_{diss} é a potência elétrica por unidade de volume dissipada no meio.

O cálculo térmico é realizado na mesma malha de discretização espacial usada no cálculo de potencial e corrente elétrica. Assim, cada bloco no interior da malha é circundado por seis blocos vizinhos. Desse modo, pode-se utilizar um método de resolução computacional da equação (3.19) similar ao utilizado no cálculo de potencial elétrico. Inicialmente, utilizando o Teorema de Gauss, converte-se a equação (3.19) em uma equação integral.

$$\oint_S k_t \nabla T \cdot d\mathbf{S} + P_{\text{diss}} = \rho c_p \Delta V \frac{dT}{dt} \quad (3.20)$$

Onde P_{diss} é a potência total dissipada no volume ΔV de um bloco e S é a superfície das faces desse bloco. A integral de fluxo pode ser convertida em um somatório efetuado nas faces desse bloco. O gradiente de temperatura pode ser substituído pela derivada direcional em cada conexão com os blocos vizinhos e a derivada no tempo pode ser calculada como uma razão de diferenças finitas no tempo. Desse modo, a equação (3.20) pode ser reescrita na seguinte forma.

$$-\sum_{n=1}^6 k_n \Delta S_n \frac{[T_o(t) - T_n(t)]}{\Delta L_n} + P_{\text{diss}} = \rho c_p \Delta V \frac{[T_o(t) - T(t - \Delta t)]}{\Delta t} \quad (3.21)$$

Onde ΔS_n e ΔL_n são a área e a distância centro a centro entre o bloco central com temperatura T_o e o bloco vizinho com temperatura T_n .

Definindo a condutância e a capacitância térmicas da seguinte forma:

$$G_t = \frac{k_n \Delta S_n}{\Delta L_n} \quad (3.22)$$

$$C_t = \rho c_p \Delta V_n \quad (3.23)$$

pode-se organizar a equação (3.21) de modo a aplicar um método iterativo para cálculo da temperatura. Isolando a temperatura T_o , obtém-se:

$$T_o(t) = \frac{C_{to} T(t - \Delta t) + \left[P_{\text{diss}} + \sum_{n=1}^6 G_{tn} T_n(t) \right] \Delta t}{C_{to} + \Delta t \sum_{n=1}^6 G_{tn}} \quad (3.24)$$

No cálculo térmico acoplado ao MCE, a temperatura é obtida resolvendo-se a equação (3.24) em cada bloco da malha de discretização espacial utilizando-se o método iterativo de Gauss-Seidel. As condições de contorno que devem ser especificadas são a temperatura nas paredes adjacentes ao domínio de análise e o fluxo de calor para fora do domínio de análise calculado com base na temperatura ambiente e no coeficiente de transferência de calor (esse coeficiente indica a potência que flui através das paredes por unidade de área devido à convecção e irradiação). O passo de tempo é o mesmo utilizado no cálculo do potencial elétrico, o que garante a convergência do cálculo iterativo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 PROPRIEDADES DIELÉTRICAS DO FÍGADO DE RATO

Os espectros de impedância de fígado de rato obtidos conforme descrito no Capítulo 3 foram convertidos para condutividade e constante dielétrica usando as seguintes relações:

$$\sigma = \operatorname{Re}\left(\frac{1}{Z}\right) \frac{d}{A}, \quad (4.1)$$

$$\varepsilon_r = \operatorname{Im}\left(\frac{1}{Z}\right) \frac{d}{2\pi f \varepsilon_0 A}, \quad (4.2)$$

onde Z é a impedância medida, Re e Im são os operadores de parte real e imaginária, f é a frequência, d é a distância entre os eletrodos, A é a área dos eletrodos, σ é a condutividade, ε_r é a constante dielétrica e ε_0 é a permissividade do vácuo.

Foram realizadas medições nas temperaturas de 22 °C, 30 °C e 37 °C. A Figura 37 apresenta os valores médios da condutividade e constante dielétrica de oito amostras para cada temperatura. Observa-se forte dispersão dielétrica nesses espectros, com a condutividade e a constante dielétrica variando cerca de 0,4 S/m e 2×10^6 , respectivamente, entre as frequências de 40 Hz e 10 MHz para todas as temperaturas de leitura.

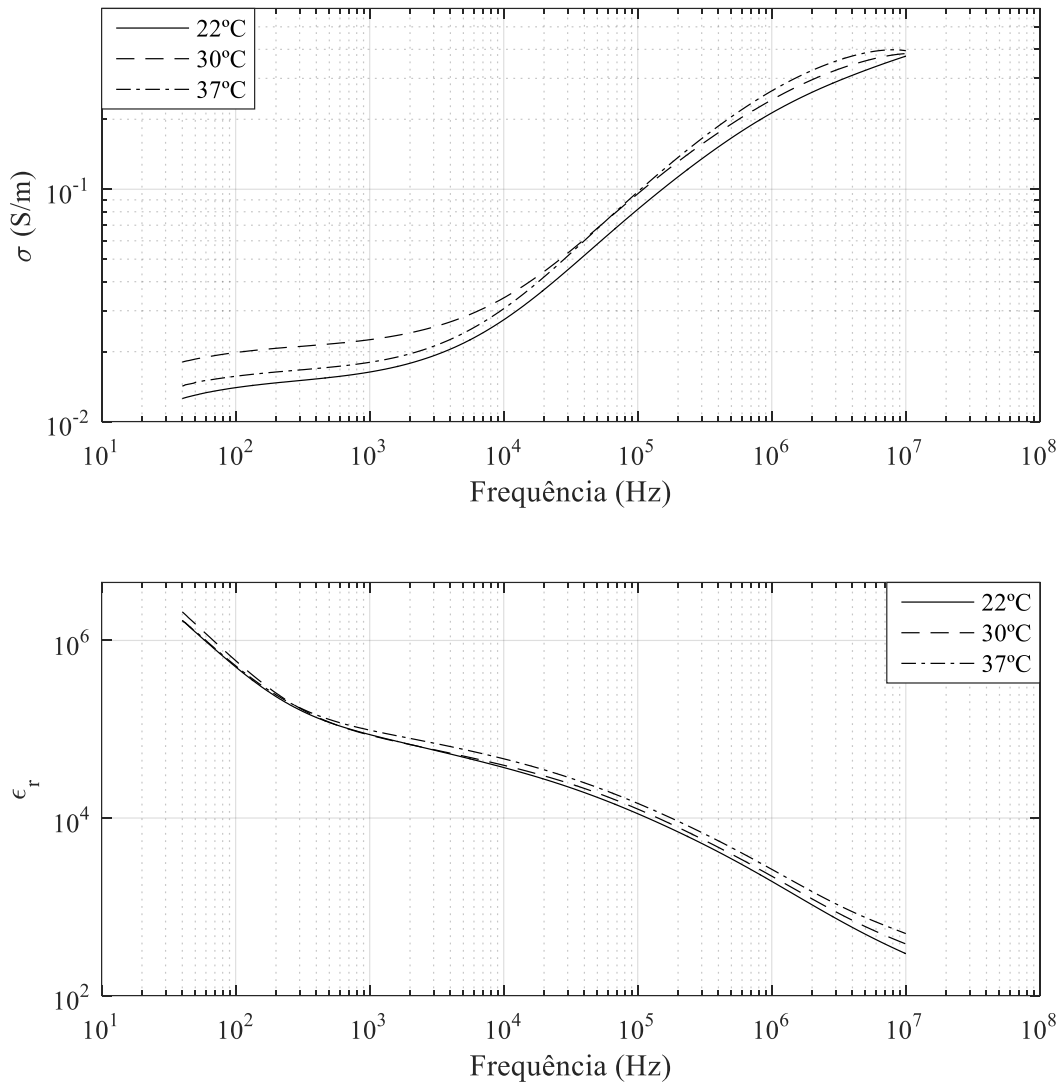
Os valores médios e os desvios padrão em 10 kHz são apresentadas na Tabela 4. Pode-se observar que os valores dos desvios padrão são menores que a média mostrando assim coerências nos dados.

Tabela 4 – Médias e desvios padrão de oito medidas de condutividade e constante dielétrica em 10 kHz.

Temperatura (°C)	σ (S/m)	ε_r
	Média \pm Desvio	Média \pm Desvio
22	0,0275 \pm 0,0040	36919 \pm 6798
30	0,0342 \pm 0,0058	39165 \pm 8439
37	0,0307 \pm 0,0050	46312 \pm 5661

Fonte: próprio autor.

Figura 37 – Espectros de condutividade e constante dielétrica de fígado de rato.

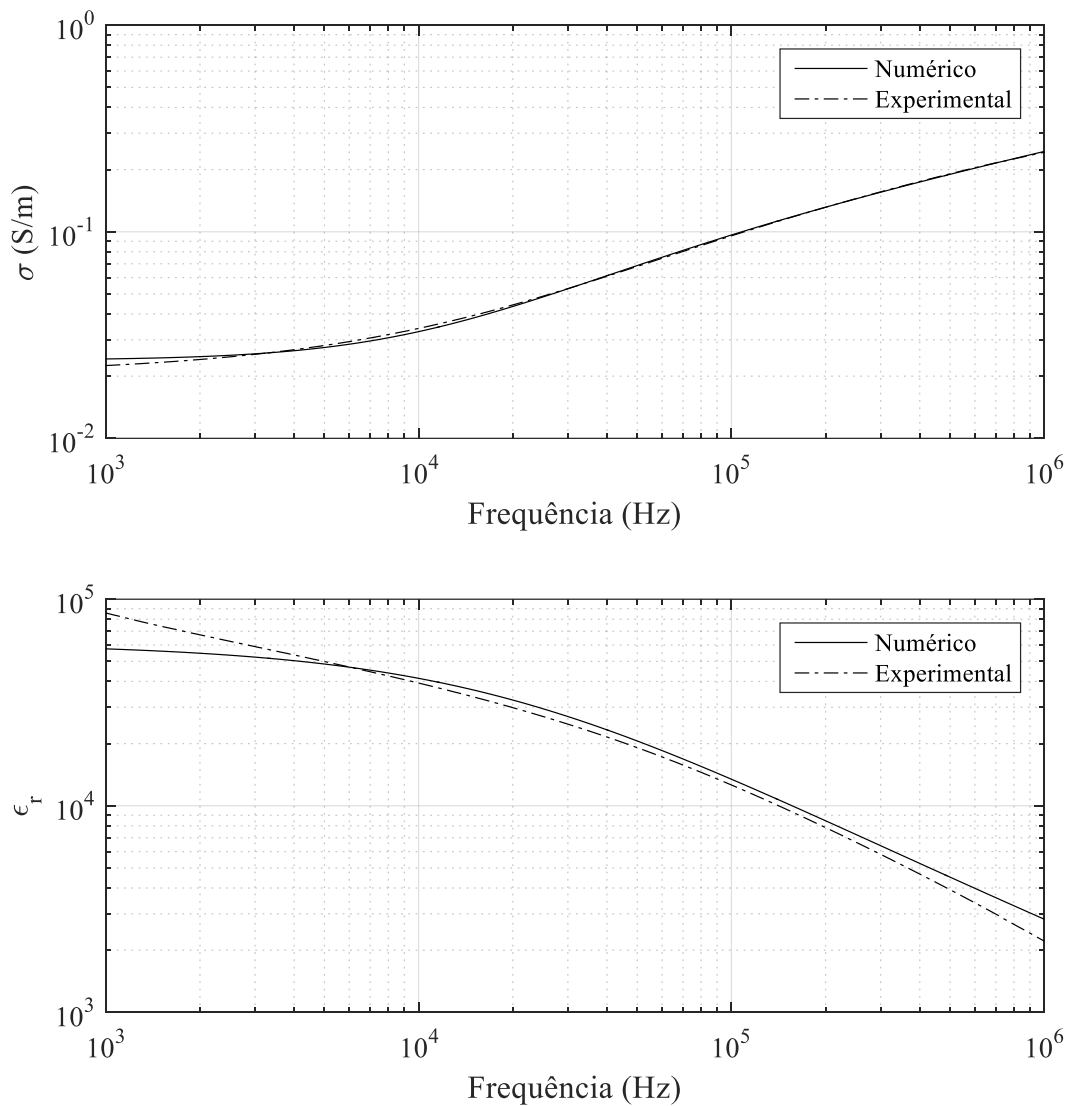


Fonte: próprio autor.

Foi utilizado o módulo de algoritmo genético do programa MATLAB® para determinar os parâmetros da equação (2.13) referentes ao modelo Cole-Cole que melhor se ajustam aos espectros de dispersão medidos. Nesta análise foi considerada apenas a banda β já que os demais mecanismos de dispersão não são evidentes nas curvas experimentais de condutividade e constante dielétrica. A análise dos espectros foi realizada na faixa de frequências de 1 kHz a 1 MHz. A Figura 38 apresenta o resultado obtido com o modelo Cole-Cole com parâmetros ajustados com o algoritmo genético (tamanho da população = 100, crossover = 0,85, gerações = 100) em comparação com o resultado experimental para a temperatura de 37 °C. Os parâmetros das curvas para as diferentes temperaturas são apresentados na Tabela 5.

É possível observar na Figura 38 que a condutividade teve uma boa representação com os parâmetros obtidos através do algoritmo genético. Entretanto, a representação da constante dielétrica em baixa frequência foi prejudicada pela polarização de eletrodo presente nessa faixa do espectro, fenômeno esse que não é modelado pela equação (2.13). Apesar desse fato, o programa MCE utiliza como entrada de dados os parâmetros de condutividade como é apresentado na Tabela 5.

Figura 38 – Comparação entre resultado experimental e resultado obtido com parâmetros do modelo Cole-Cole ajustados com algoritmo genético em 37 °C.



Fonte: próprio autor

Tabela 5 – Parâmetros do modelo Cole-Cole para a dispersão dielétrica em fígado de rato na faixa de frequências de 1 kHz a 1 MHz.

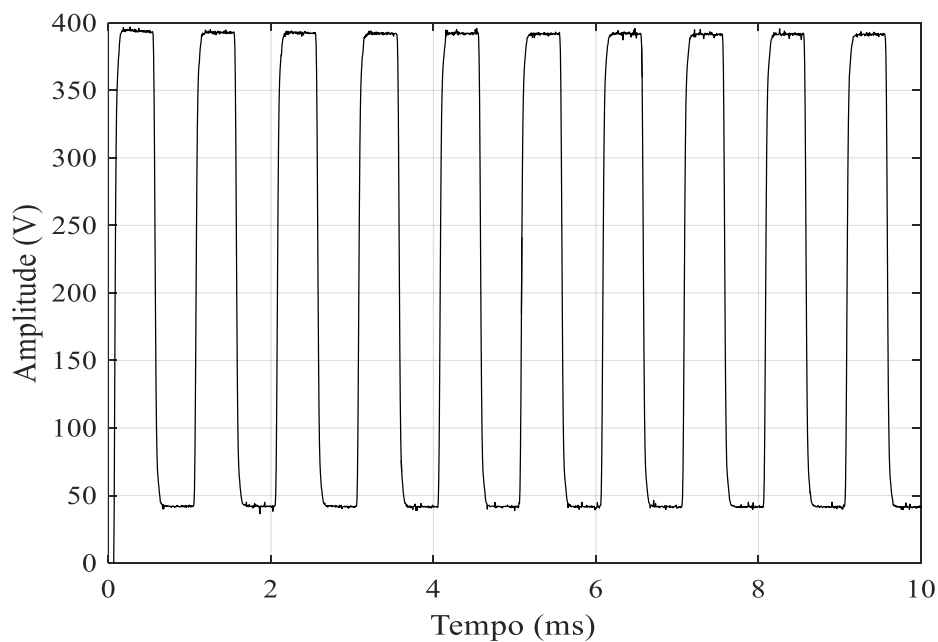
Parâmetros	22 °C	30 °C	37 °C
Condutividade estática (S/m)	0,016	0,022	0,018
Constante dielétrica em alta frequência	118	44	84
Amplitude da dispersão β da condutividade (S/m)	0,067	0,075	0,075
Tempo de relaxação β ($\times 10^{-6}$ s)	8,37	7,95	8,81
Constante α	0,32	0,33	0,36

Fonte: próprio autor.

4.2 DINÂMICA DA ELETROPERMEABILIZAÇÃO

Para a determinação experimental do processo dinâmico da eletropermeabilização foi utilizado o protocolo de eletropermeabilização descrito na seção 3.2.4. A forma de onda de tensão é apresentada na Figura 39. Os experimentos foram realizados nas seguintes temperaturas 22 °C, 30 °C e 37 °C, sendo utilizadas cinco amostras para cada temperatura. As amplitudes da tensão aplicada são 390 V no nível alto e 40 V no nível baixo e os tempos de subida e descida da tensão são 41 μ s e 25 μ s, respectivamente.

Figura 39 – Forma de onda de tensão utilizada para obter os resultados da dinâmica da eletropermeabilização.



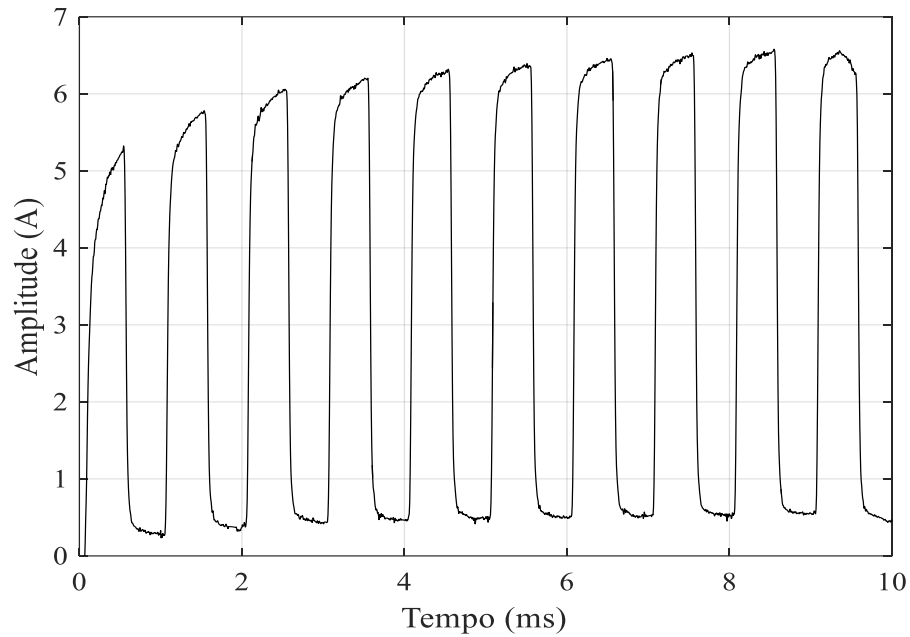
Fonte: próprio autor.

A Figura 40 mostra a corrente elétrica na amostra medida neste experimento. Observa-se nitidamente o aumento da corrente durante os pulsos. Entretanto, o incremento de corrente diminui com o tempo em cada pulso. Utilizando o procedimento matemático descrito na seção 3.2.6, obtiveram-se as condutâncias para cada temperatura. As Figuras 41, 42 e 43 apresentam os valores médios (5 amostras) de condutância para as temperaturas de 22 °C, 30 °C e 37 °C respectivamente. São apresentados nove pulsos com a mesma escala de tempo de modo a destacar as diferenças entre eles.

Pode-se observar a ocorrência do fenômeno de eletropermeabilização, devido ao aumento da condutância da amostra. Quando é aplicado o potencial de 390 V a condutância aumenta rapidamente nos primeiros microssegundos do pulso, logo após ela continua a aumentar, mas com uma taxa de crescimento menor se comparado com o início do processo. Quando é aplicado o potencial de 40 V observa-se que a condutância diminui devido ao limiar de eletropermeabilização não ser atingido com essa tensão. No entanto, no próximo pulso a condutância é maior que no pulso anterior e isso se repete para os demais pulsos, mostrando que os poros continuam abertos e as membranas celulares não conseguem se recuperar durante o tempo de aplicação do potencial de 40 V. Esses resultados concordam com o trabalho de revisão de Teissie *et al.* (TEISSIE, GOLZIO e ROLS, 2005), onde os autores mostram que o início da criação de poros na membrana plasmática é um processo muito rápido com tempo de resposta na ordem de grandeza de microssegundos. Após isso, ocorre o crescimento dos poros com tempo de resposta maior e quando o campo é desligado o fechamento de poros na membrana é um processo muito lento que pode levar vários segundos para ser concluído. Chang (CHANG, 1992) apresenta em seu trabalho experimental conforme já descrito na seção 2.2.5, que o fechamento dos poros na membrana plasmática de células vermelhas de sangue humano leva cerca de 10 segundos após o fim da estimulação elétrica.

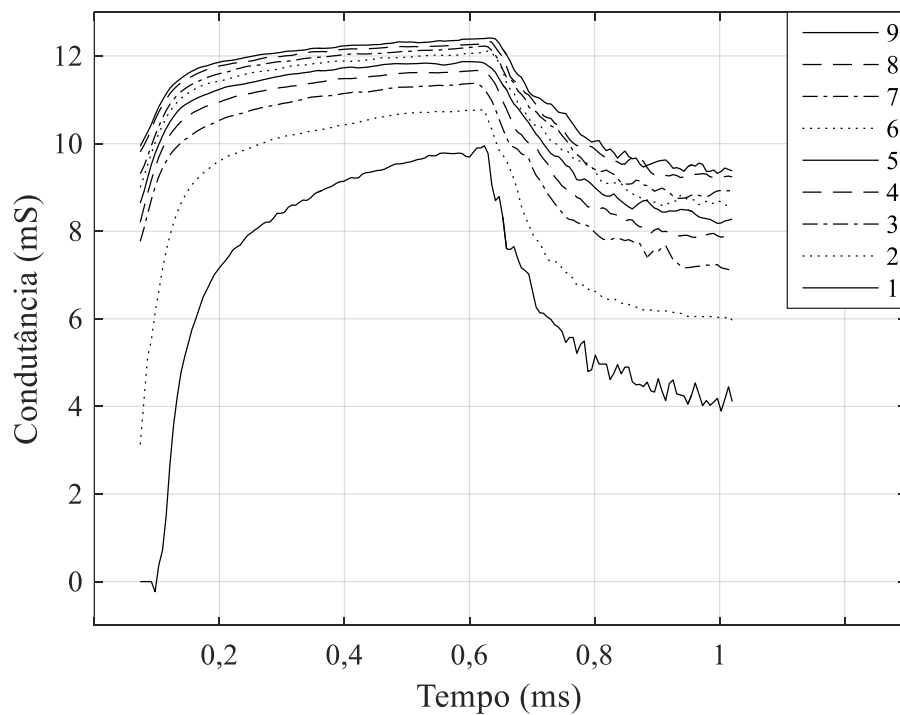
Outro fato importante que pode ser observado nessas curvas de condutância é a saturação do processo. Observa-se que, a partir do terceiro pulso, a variação da condutância durante a aplicação do campo elétrico mais intenso é baixa. Esse fato se deve à grande quantidade de poros presentes na membrana plasmática, impedindo a elevação do potencial transmembrana e dificultando a abertura de novos poros. A saturação do processo de eletropermeabilização também foi observada nos experimentos de Kinoshita *et al.* (KINOSHITA JR, ASHIKAWA, *et al.*, 1988) como descrito na seção 2.2.5.

Figura 40 – Forma de onda da corrente de uma amostra de fígado de rato para estimulação com trem de pulsos de 390 V.



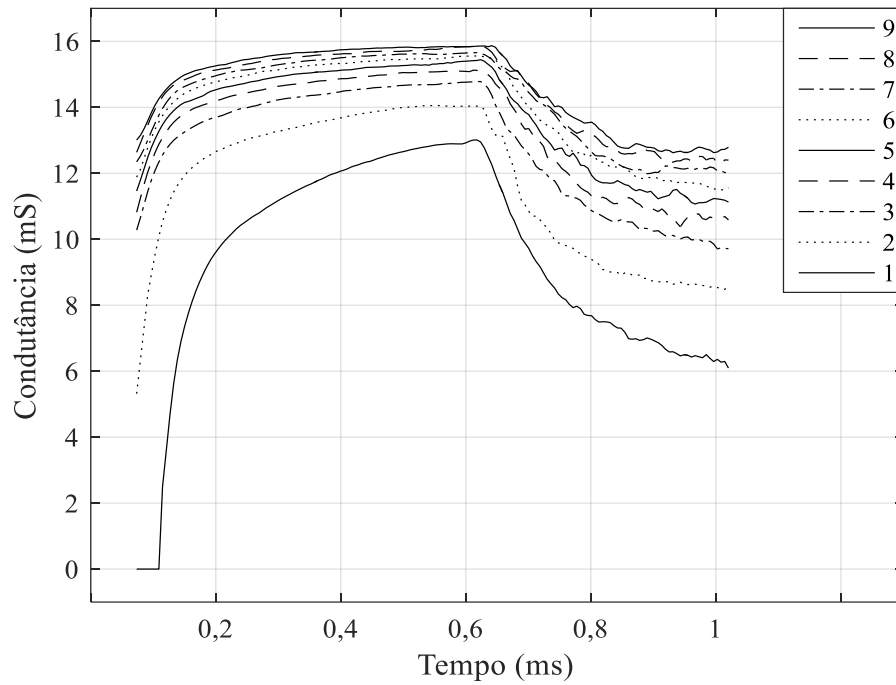
Fonte: próprio autor.

Figura 41 – Condutância medida na temperatura de 22 °C. Os números indicam a sequência de pulsos.



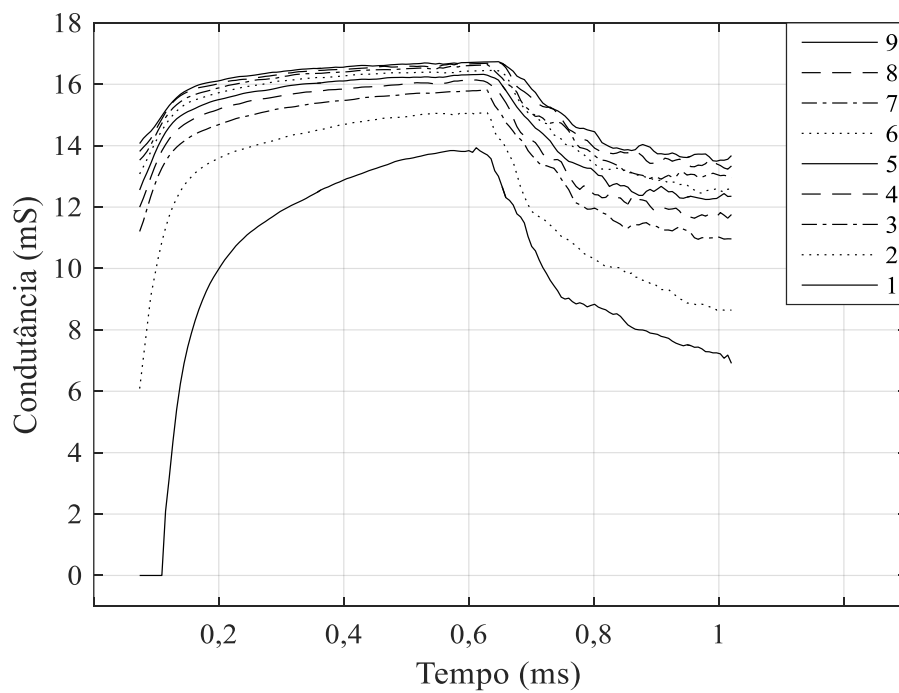
Fonte: próprio autor.

Figura 42 – Condutância medida na temperatura de 30 °C. Os números indicam a sequência de pulsos.



Fonte: próprio autor.

Figura 43 – Condutância medida na temperatura de 37 °C. Os números indicam a sequência de pulsos.

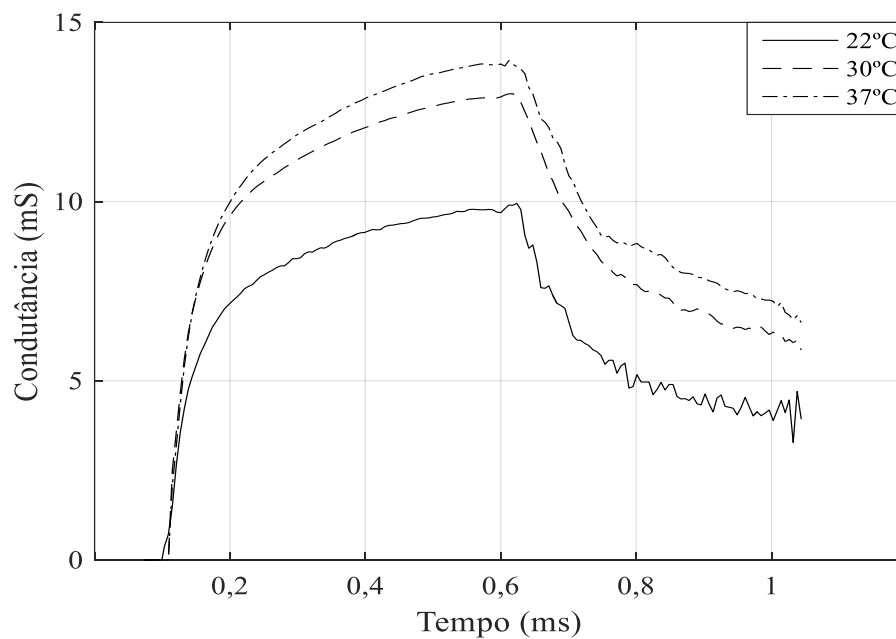


Fonte: próprio autor.

Comparando-se as Figuras 41, 42 e 43 verifica-se que as formas de variação das condutâncias em diferentes temperaturas são semelhantes. As diferenças consistem na amplitude e na taxa de variação da condutância. Para facilitar essa verificação, as Figuras 44, 45 e 46 apresentam as curvas de condutância em diferentes temperaturas para o primeiro, quinto e nono pulsos respectivamente.

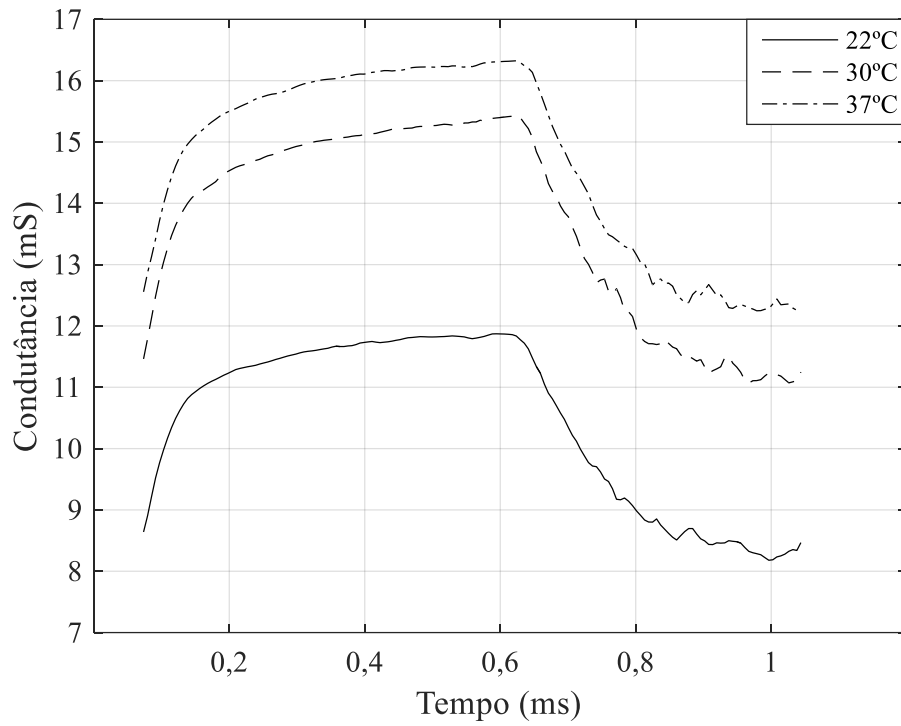
Constata-se um aumento da condutância em função da temperatura, isso pode ser explicado por dois motivos. O primeiro é que a condutividade elétrica do tecido aumenta com a temperatura; o segundo é que a vibração térmica aumentada das moléculas lipídicas aumenta a taxa de criação de poros hidrofóbicos na membrana plasmática das células. Uma vez que parte dos poros hidrofóbicos torna-se hidrofílicos, resulta no aumento da condutância do tecido.

Figura 44 – Comportamento da condutância para o primeiro pulso.



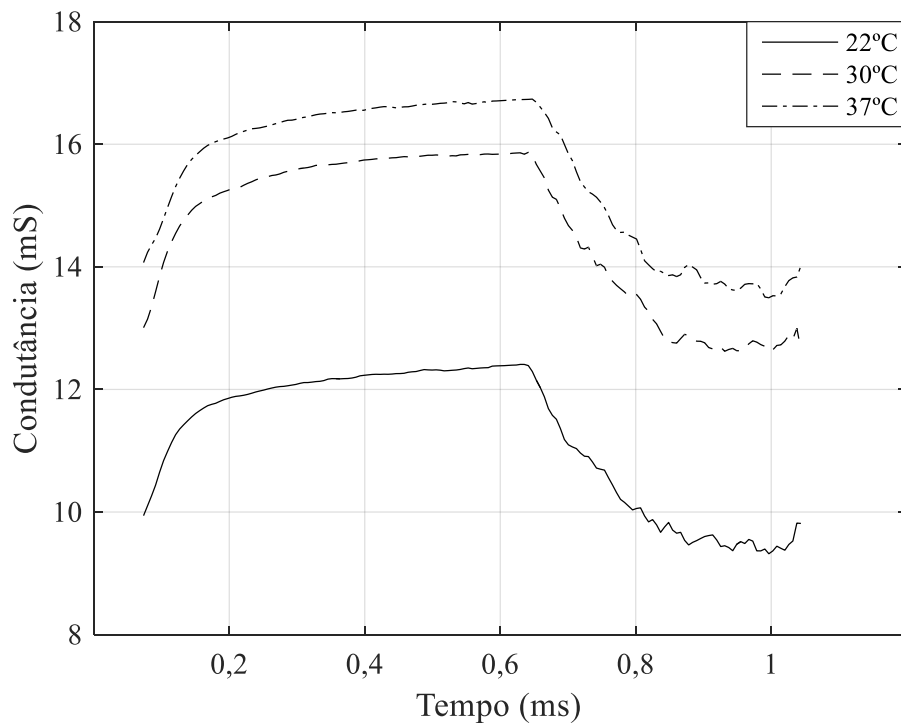
Fonte: próprio autor.

Figura 45 – Comportamento da condutância para o quinto pulso.



Fonte: próprio autor.

Figura 46 – Comportamento da condutância para o nono pulso.



Fonte: próprio autor.

A Tabela 6 apresenta os valores máximos dos desvios padrões das condutâncias apresentadas nas Figuras 41, 42 e 43 para cada pulso e seu respectivo valor médio (levando em conta as cinco amostras para cada temperatura). Nota-se que o valor do desvio é muito inferior à média, mostrando que os resultados são consistentes.

Tabela 6 – Médias e desvios padrões máximos dos valores de condutância (em Siemens).

Nº do pulso	22 °C	30 °C	37 °C
	Média ± Desvio	Média ± Desvio	Média ± Desvio
1	0,0088±0,0020	0,0131±0,0020	0,0136±0,0023
2	0,0094±0,0031	0,0118±0,0025	0,0127±0,0032
3	0,0125±0,0022	0,0155±0,0020	0,0171±0,0023
4	0,0090±0,0027	0,0155±0,0022	0,0177±0,0027
5	0,0131±0,0023	0,0165±0,0022	0,0182±0,0021
6	0,0130±0,0023	0,0169±0,0021	0,0183±0,0023
7	0,0134±0,0023	0,0162±0,0023	0,0170±0,0022
8	0,0121±0,0023	0,0128±0,0022	0,0136±0,0024
9	0,0135±0,0023	0,0173±0,0022	0,0143±0,0021

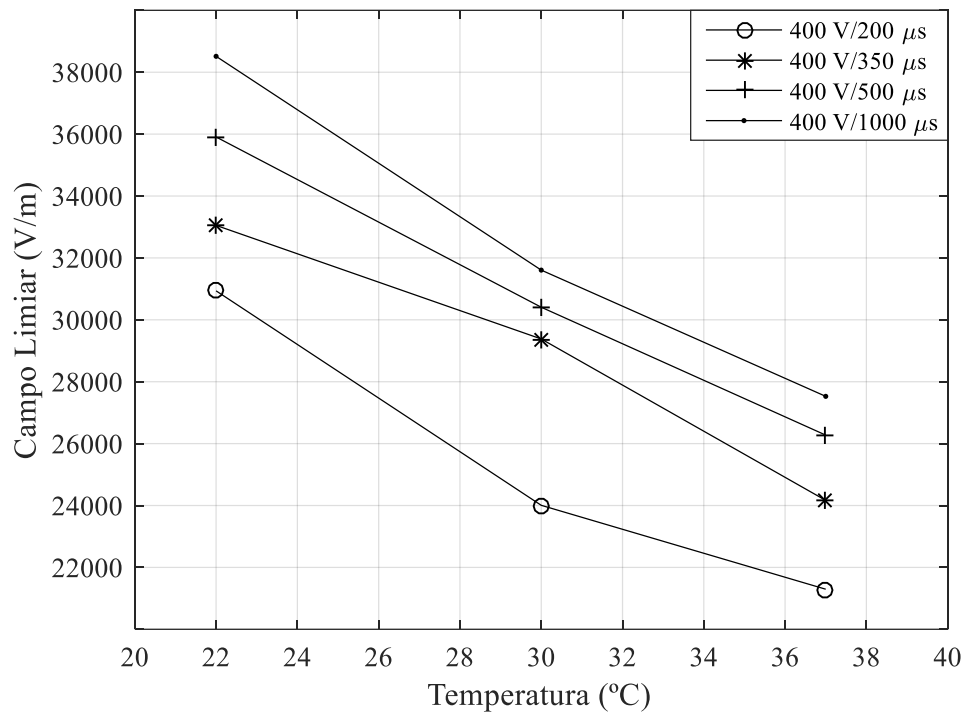
Fonte: próprio autor

4.3 LIMIAR DE ELETROPERMEABILIZAÇÃO

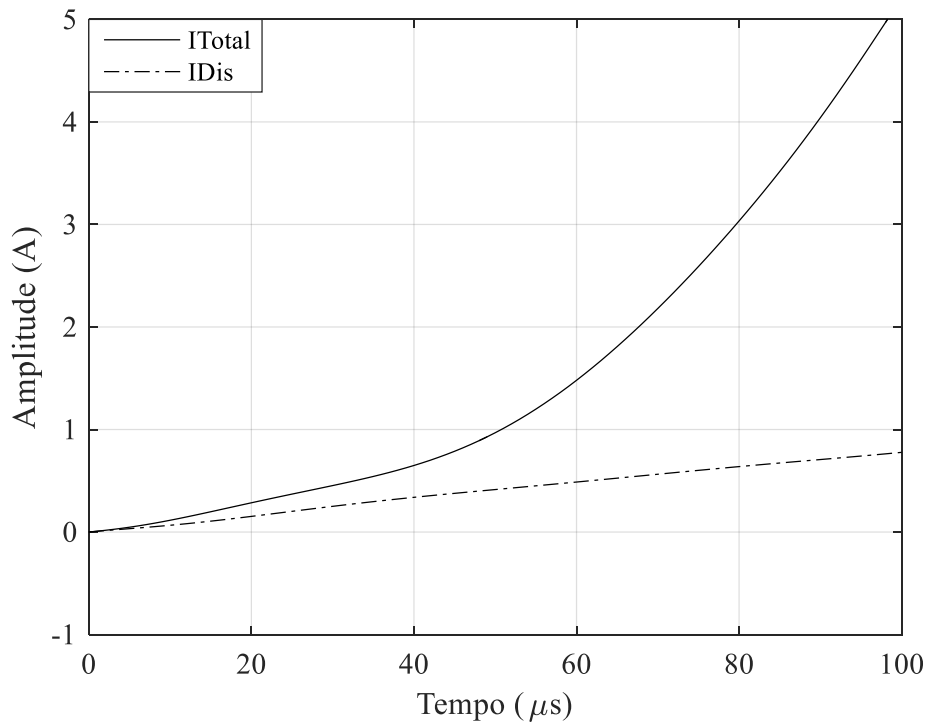
Também nos ensaios para determinação do limiar de eletropermeabilização foram utilizadas três temperaturas diferentes: 22 °C, 30 °C e 37 °C. Para cada temperatura foram usadas cinco derivadas de tensão e cada ensaio foi repetido três vezes. O resultado do limiar de eletropermeabilização foi obtido sobre a média das três curvas de resposta para cada temperatura e derivada de tensão.

O uso de diferentes derivadas de tensão e temperaturas permite avaliar a influência desses parâmetros no limiar de eletropermeabilização. A Figura 47 apresenta o limiar de eletropermeabilização em função da derivada de tensão e da temperatura. Não é apresentado o limiar de eletropermeabilização para a rampa de 400 V /100 μ s, pois, as inclinações de I_{Tot} e I_{Dis} são diferentes desde do início da rampa, impossibilitando a determinação do limiar. A Figura 48 apresenta I_{Tot} e I_{Dis} para a rampa de 400 V /100 μ s.

Figura 47 – Campo limiar de eletropermeabilização.



Fonte: próprio autor.

Figura 48 – Correntes I_{Tot} e I_{Dis} para a rampa 400 V/100 μs.

Fonte: próprio autor.

Observa-se na Figura 47 que o limiar de eletropermeabilização diminuiu com o aumento da temperatura e aumento da derivada da tensão aplicada.

A diminuição do limiar com o aumento da temperatura provavelmente se deve principalmente ao aumento na taxa de criação de poros hidrofóbicos. A redução com a derivada temporal do campo aplicado indica que quanto maior a taxa de variação do campo aplicado, tanto maior é a taxa de criação de poros hidrofílicos e maior é a taxa de crescimento dos poros criados. Devido à escala de tempo de subida da rampa utilizada neste experimento, supõe-se que o crescimento dos poros hidrofílicos seja o processo dominante neste caso.

Na Figura 48 é possível observar que com a diminuição do tempo de subida da tensão para 400 V/100 μ s as correntes I_{Tot} e I_{Dis} não são paralelas no início da rampa como nas outras rampas utilizadas, isso ocorreu para todas as temperaturas desse ensaio. Com esse resultado presume-se que desde o início da aplicação da rampa de tensão houve a criação de poros. Esse fato juntamente com o resultado apresentado na Figura 47 mostra que o limiar de eletropermeabilização depende não somente do valor instantâneo de campo elétrico, mas também de sua taxa de variação.

A Tabela 7 apresenta os valores de desvios padrão máximos para cada curva de corrente e o seu respectivo valor médio (considerando três amostras em cada temperatura). Observa-se que os valores dos desvios são menores que a média, mostrando que os resultados são consistentes.

Tabela 7 – Médias e desvios padrões máximos das correntes I_{Tot} , I_{Dis} e I_{Ele} .

Temperatura/Rampa	I_{Tot} (A)	I_{Dis} (A)	I_{Ele} (A)
22 °C – 400 V/100 μ s	4,58 \pm 1,01	0,75 \pm 0,23	4,09 \pm 0,82
30 °C – 400 V/100 μ s	4,84 \pm 1,26	0,83 \pm 0,08	4,29 \pm 1,23
37 °C – 400 V/100 μ s	6,23 \pm 1,56	0,77 \pm 0,20	5,46 \pm 1,37
22 °C – 400 V/200 μ s	3,22 \pm 0,90	0,51 \pm 0,13	2,67 \pm 0,79
30 °C – 400 V/200 μ s	4,86 \pm 0,26	0,77 \pm 0,06	4,08 \pm 0,31
37 °C – 400 V/200 μ s	3,54 \pm 0,74	0,51 \pm 0,08	3,21 \pm 0,66
22 °C – 400 V/350 μ s	3,49 \pm 0,98	0,54 \pm 0,11	2,95 \pm 0,88
30 °C – 400 V/350 μ s	4,15 \pm 1,02	0,53 \pm 0,21	3,61 \pm 0,87
37 °C – 400 V/350 μ s	4,08 \pm 0,52	0,57 \pm 0,11	3,56 \pm 0,42
22 °C – 400 V/500 μ s	3,82 \pm 0,35	0,65 \pm 0,07	3,19 \pm 0,38

30 °C – 400 V/500 μ s	4,96 \pm 1,23	0,72 \pm 0,16	4,27 \pm 1,08
37 °C – 400 V/500 μ s	4,37 \pm 0,98	0,53 \pm 0,14	4,05 \pm 0,84
22 °C – 400 V/1 ms	3,76 \pm 0,49	0,40 \pm 0,09	3,28 \pm 0,41
30 °C – 400 V/1 ms	4,91 \pm 1,47	0,50 \pm 0,09	4,41 \pm 1,38
37 °C – 400 V/1 ms	5,08 \pm 0,81	0,59 \pm 0,12	4,53 \pm 0,67

Fonte: próprio autor.

4.4 SIMULAÇÃO

Para a simulação do fenômeno de eletropermeabilização foi utilizado o Método do Circuito Equivalente - MCE descrito no item 2.2.4 e o modelo matemático descrito na seção 3.2.7.

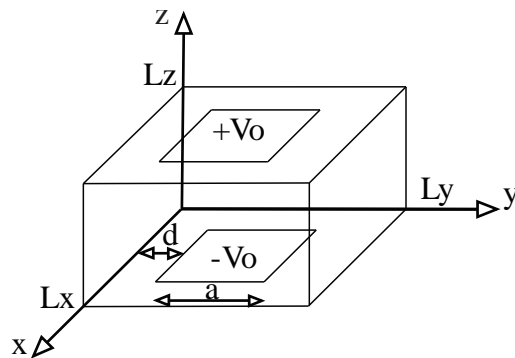
4.4.1 Simulação da dinâmica da eletropermeabilização

Para a simulação da dinâmica da eletropermeabilização, foram realizadas simulações conforme a geometria e o estímulo elétrico utilizado nos experimentos, foi utilizado o Método do Circuito Equivalente – MCE para o cálculo elétrico e térmico. A Figura 49 mostra esse esquema de estimulação e a Tabela 8 apresenta os valores numéricos utilizados para a simulação.

A malha de discretização espacial foi construída com 100 divisões no eixo x, 100 divisões no eixo y e 30 divisões no eixo z, perfazendo um total de 300000 elementos. Assim, as arestas de um elemento na direção x e y possuem um comprimento de $1,881 \times 10^{-4}$ metros e na direção z de $9,66 \times 10^{-5}$ metros. Os eletrodos são modelados como planos, um em $z = 0$ e o outro em $z = Lz$, formando assim um sistema de placas paralelas. O passo de tempo utilizado foi de 1×10^{-8} segundos, assim, para a simulação de 1 ms são necessárias 100,000 iterações. O estímulo elétrico foi configurado de acordo com as características do eletropermeabilizador, com os mesmos tempos de subida e descida além do valor da tensão aplicada.

Além da simulação elétrica, é realizada a simulação térmica, alterando assim o valor da condutividade estática à medida que a temperatura aumenta. Os valores dos parâmetros utilizados são apresentados na Tabela 8, e foram retirados no trabalho de Davalos *et al.* (DAVALOS, RUBINSKY e MIR, 2003). O cálculo térmico é realizado conforme é apresentado na seção 3.2.7.

Figura 49 – Geometria utilizada para a simulação numérica com o método do circuito equivalente.



Fonte: próprio autor.

Tabela 8 – Parâmetros de simulação.

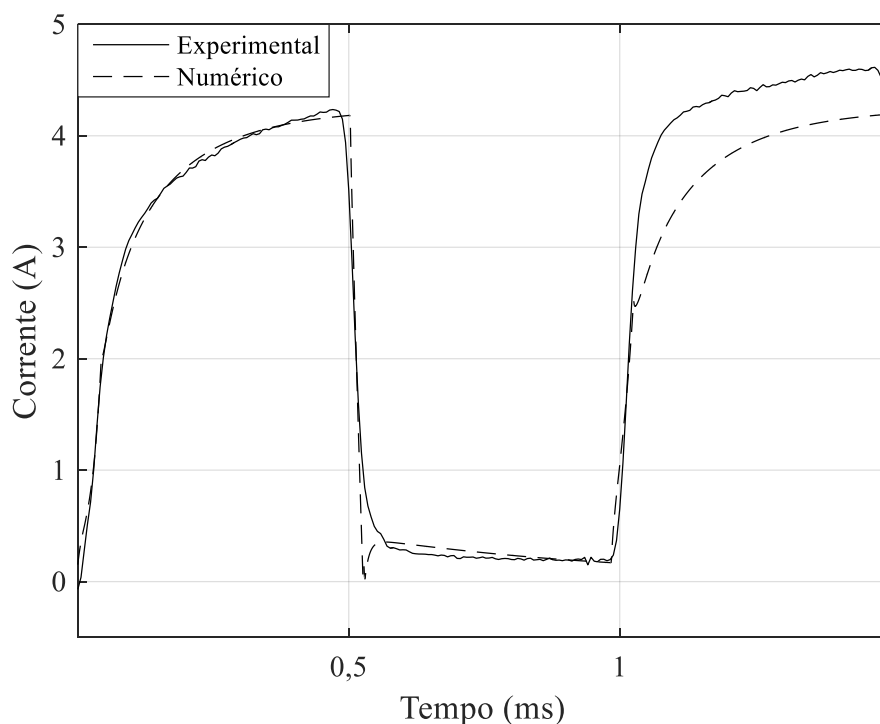
Parâmetro	Valor
Lx (m)	$18,81 \times 10^{-3}$
Ly (m)	$18,81 \times 10^{-3}$
Lz (m)	$2,9 \times 10^{-3}$
Δx (m)	$1,881 \times 10^{-4}$
Δy (m)	$1,881 \times 10^{-4}$
Δz (m)	$9,667 \times 10^{-5}$
Nx	100
Ny	100
Nz	30
Vo (V)	195
d (m)	2×10^{-3}
a (m)	15×10^{-3}
Δt (s)	1×10^{-8}
Condutividade térmica (W/m/K)	0,5
Capacidade térmica (J/kg/K)	3750
Densidade do tecido (kg/m ³)	1000
Coefficiente de temperatura (1/K)	$1,5 \times 10^{-2}$
Temperatura das paredes no contorno térmico (K)	310
Coefficiente de transferência de calor (W/m ² /K)	500
Temperatura ambiente (K)	300

Fonte: próprio autor.

As Figuras 50, 51 e 52 apresentam os resultados da simulação da corrente elétrica para os dois primeiros pulsos nas respectivas temperaturas de 22 °C, 30 °C e 37 °C. Os parâmetros do modelo de eletroporabilidade utilizados nas simulações são mostrados na Tabela 9. Esses parâmetros foram ajustados a partir de diversas simulações nas quais seus valores foram variados de modo a minimizar o erro quadrático médio dos resultados numéricos em relação aos resultados experimentais. É possível observar que os resultados simulados são muito semelhantes aos experimentais apenas no primeiro pulso. No segundo pulso observam-se discrepâncias significativas.

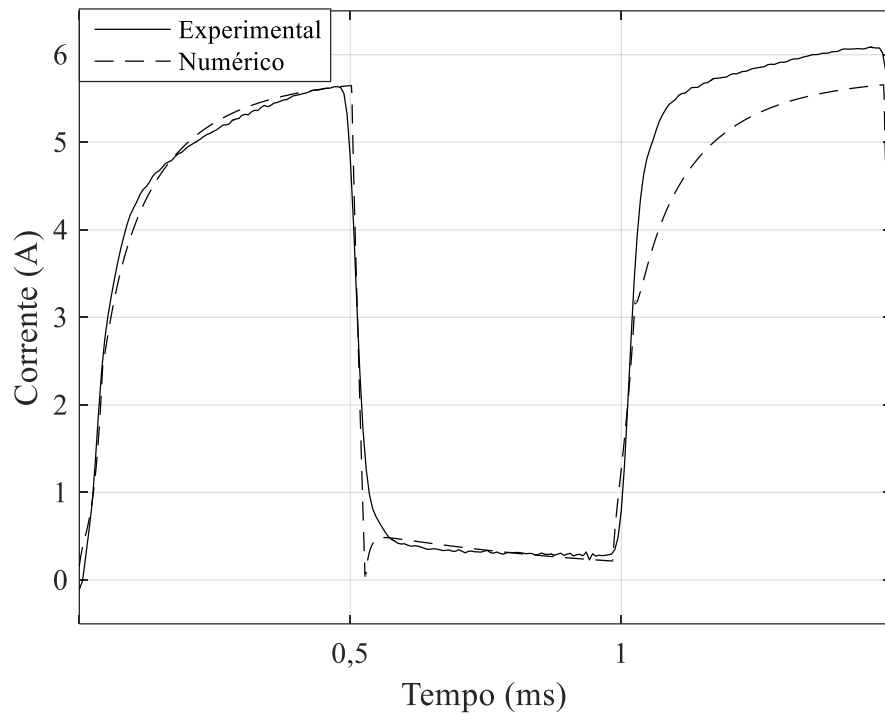
Verifica-se também que a resposta obtida por simulação apresenta uma transição mais abrupta no fim do primeiro pulso que a resposta experimental. A corrente medida apresenta uma transição muito mais lenta. A explicação para isso é o efeito muito intenso das capacitâncias de junção dos transistores de potência utilizados no estágio de saída do amplificador do eletroporador. Estas capacitâncias, intensamente carregadas durante o pulso descarregam-se através da amostra durante o nível baixo da tensão aplicada impedindo que a corrente diminua tão rapidamente quanto obtida na simulação. Os efeitos de impedância de fonte não foram modelados na simulação computacional.

Figura 50 – Comparação entre resultado experimental e numérico para a corrente na amostra a 22 °C.



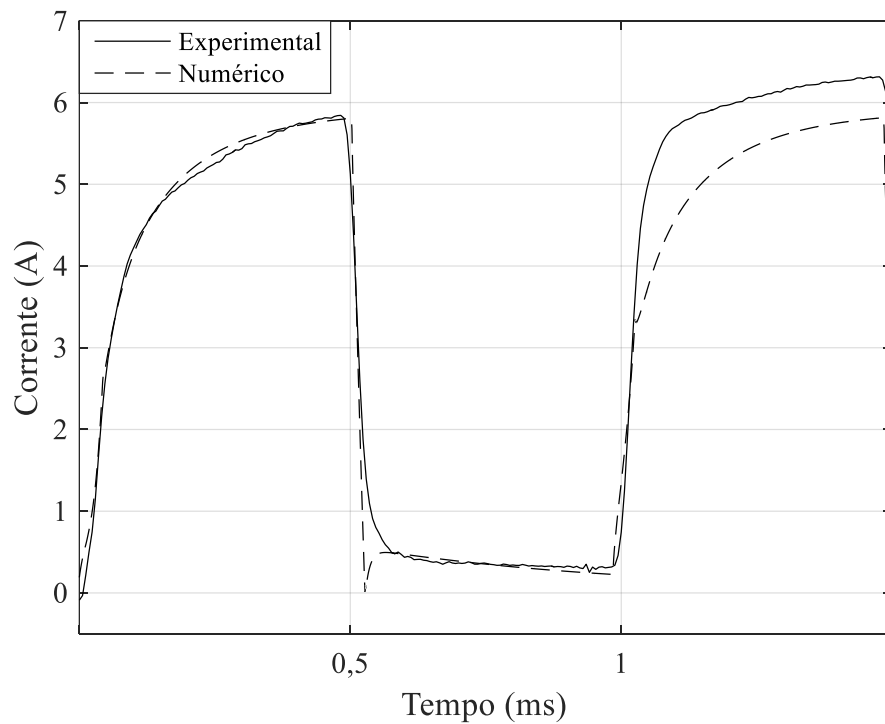
Fonte: próprio autor.

Figura 51 – Comparação entre resultado experimental e numérico para a corrente na amostra a 30 °C.



Fonte: próprio autor.

Figura 52 – Comparação entre resultado experimental e numérico para a corrente na amostra a 37 °C.



Fonte: próprio autor.

Tabela 9 – Parâmetros do modelo da eletropermeabilização ajustados para o primeiro pulso.

Parâmetro	22 °C	30 °C	37 °C
σ_o (S/m)	1×10^{-8}	1×10^{-8}	1×10^{-8}
σ_{\max} (S/m)	0,111	0,149	0,158
τ_o (s)	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$
τ_{\max} (s)	4×10^{-4}	4×10^{-4}	4×10^{-4}
E_1 (V/m)	10500	10500	10500
E_2 (V/m)	69000	69000	69000

Fonte: próprio autor.

Segundo o modelo de Neu e Krassowska (NEU e KRASSOWSKA, 1999) alguns parâmetros do modelo de eletroporação dependem da temperatura. Das relações matemáticas fornecidas pelos autores podem-se deduzir as relações a seguir pelas quais o campo limiar varia com a raiz quadrada da temperatura, o tempo de relaxação diminui e a condutividade inicial aumenta exponencialmente na medida em que a temperatura aumenta.

$$E_{1,2} \propto \sqrt{T} \quad (4.3)$$

$$\tau \propto e^{a/K_B T} \quad (4.4)$$

$$G_o \propto e^{-b/K_B T} \quad (4.5)$$

onde $a \approx 15 K_B T$ e $b \approx 25 K_B T$ e K_B é a constante de Boltzmann e T é a temperatura em Kelvin.

Contudo, segundo a Tabela 9, o único parâmetro do modelo que realmente variou significativamente foi a condutividade máxima e esse efeito pode ser explicado pelo aumento da condutividade dos eletrólitos que circundam as membranas, um efeito bem conhecido decorrente da diminuição da viscosidade da água.

O fato da corrente elétrica ser corretamente calculada no primeiro pulso mas não no segundo sugere que alguns parâmetros do modelo devem ser ajustados dinamicamente em função de grandezas que variam no tempo durante a estimulação elétrica, tais como a temperatura e a própria condutividade de eletropermeabilização. Entretanto, o simulador BEC já inclui métodos computacionais baseados nas relações (4.3), (4.4) e (4.5) para ajuste dos respectivos parâmetros do modelo. A variação da temperatura da amostra durante a estimulação

elétrica foi menor que 1 °C em todas as simulações e os resultados na Tabela 9 mostram que mesmo com variações de 15 °C os parâmetros do modelo não apresentam variações significativas, exceto σ_{\max} .

Assim, foi decidido estabelecer uma relação de ajuste dinâmico de parâmetros com a condutividade de eletropermeabilização. As relações matemáticas propostas e avaliadas são mostradas nas equações (4.6) a (4.9). Estas relações foram obtidas após ser verificado que para se conseguir um ajuste adequado da corrente no segundo pulso foi necessário dobrar o tempo de relaxação τ_{\max} e reduzir o limiar de campo E_2 para a metade de seu valor no primeiro pulso. Foi observado também ser necessário ajustar o parâmetro σ_{\max} em cerca de 10% acima do valor usado no primeiro pulso. Para isso foi definida a condutividade integrada ($\delta\sigma$) como a integral no tempo da condutividade de eletropermeabilização. Numericamente esta grandeza foi obtida como a soma da condutividade em cada passo de tempo de simulação. Baseados na variável $\delta\sigma$ os parâmetros foram ajustados de acordo com as equações (4.7), (4.8) e (4.9). As constantes c e d foram ajustadas para valores em torno de 5×10^{-5} (m/S) e 7×10^{-6} (m/S) como mostra a Tabela 10.

A Figura 53 mostra a variação da condutividade de eletropermeabilização e da condutividade integrada no intervalo de 1,5 ms obtida com ajuste dinâmico baseado nas equações (4.6) a (4.9). A média da condutividade foi calculada no volume definido pela área dos eletrodos e a espessura da amostra. As Figuras 54, 55 e 56 apresentam a comparação entre a corrente experimental e a estimativa numérica para as respectivas temperaturas de 22 °C, 30 °C e 37 °C com ajuste dinâmico dos parâmetros do modelo. A Tabela 10 apresenta os valores utilizados nas simulações. Exceto pela inclusão dos coeficientes c e d , os valores utilizados são os mesmos que os obtidos nas simulações anteriores e mostrados na Tabela 9.

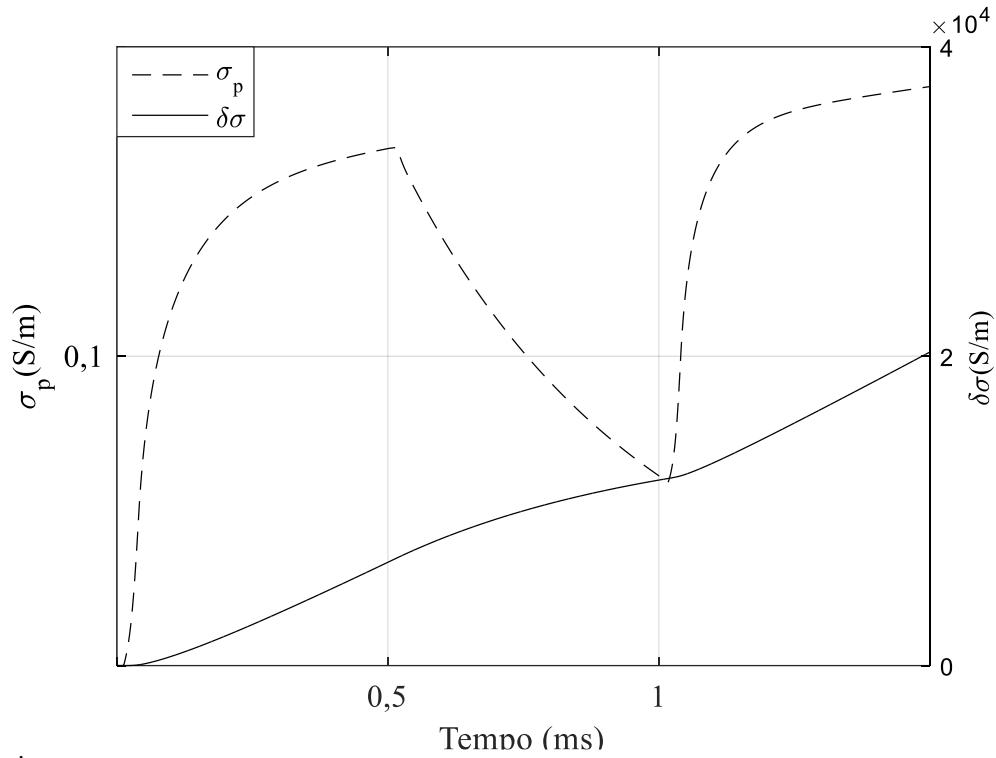
$$\delta\sigma = \sum_i \sigma_p(i) \quad (4.6)$$

$$\tau'_{\max} = \tau_{\max} (1 + c \delta\sigma) \quad (4.7)$$

$$E'_2 = \frac{E_2}{1 + c \delta\sigma} \quad (4.8)$$

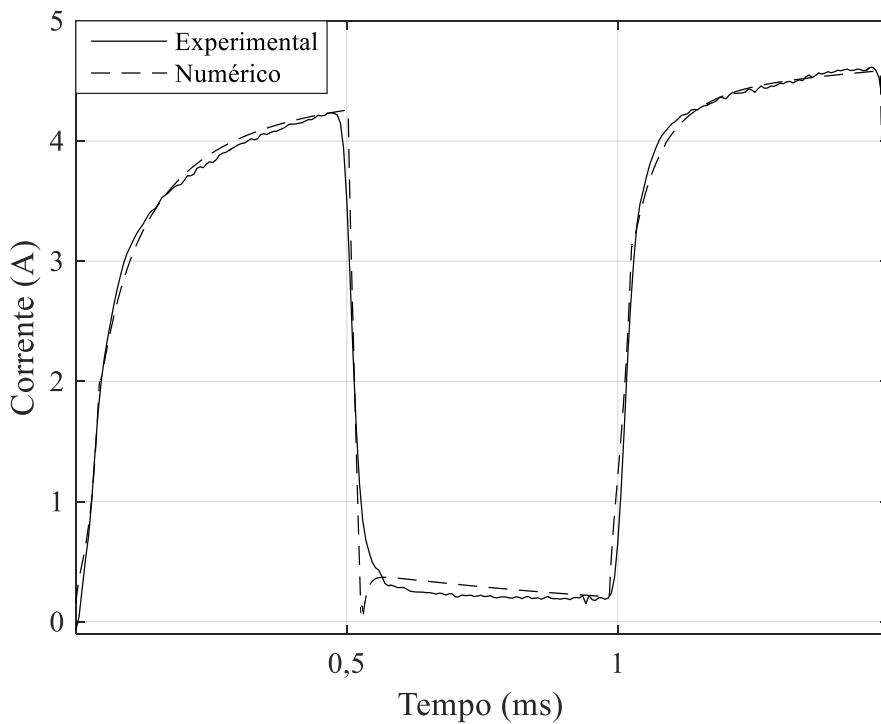
$$\sigma'_{\max} = \sigma_{\max} (1 + d \delta\sigma) \quad (4.9)$$

Figura 53 – Condutividade de eletropermeabilização média e condutividade integrada com ajuste dinâmico baseado nas equações (4.6) a (4.9).



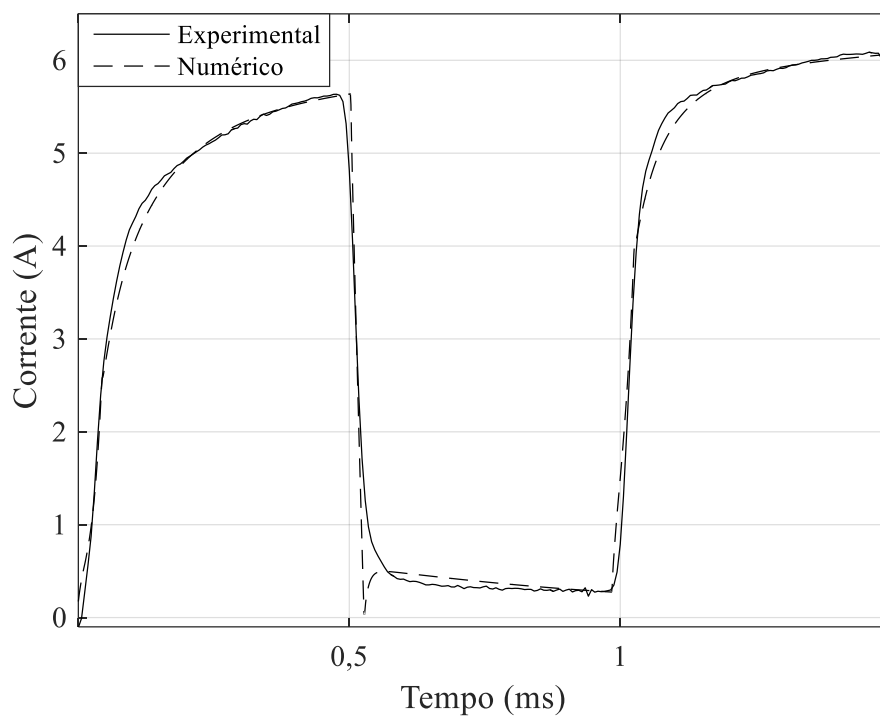
Fonte: próprio autor.

Figura 54 – Comparação entre o resultado experimental e o numérico com ajuste dinâmico de parâmetros na temperatura de 22 °C.



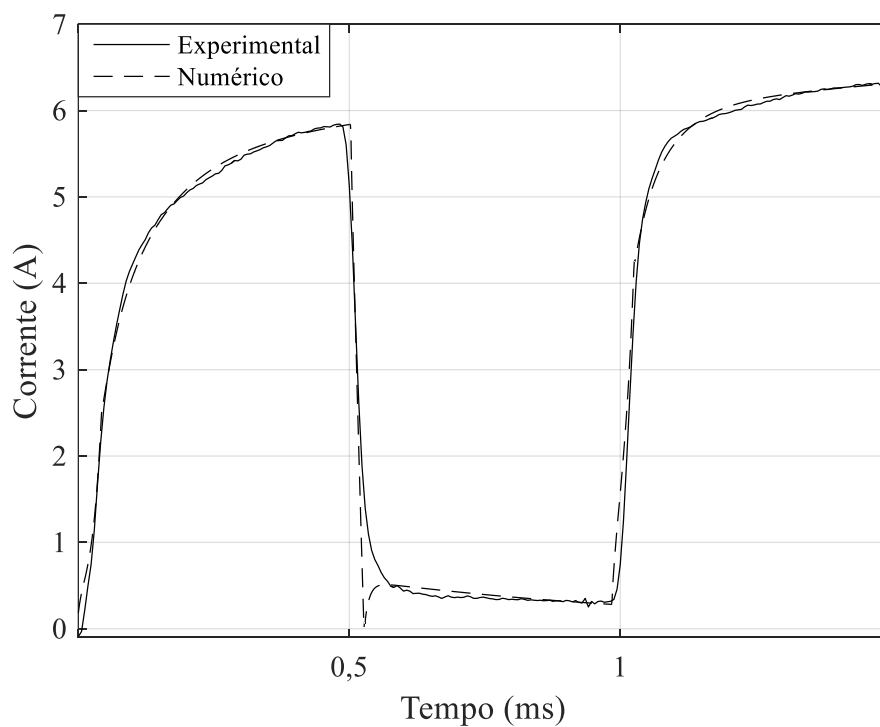
Fonte: próprio autor.

Figura 55 – Comparação entre o resultado experimental e o numérico com ajuste dinâmico de parâmetros na temperatura de 30 °C.



Fonte: próprio autor.

Figura 56 – Comparação entre o resultado experimental e o numérico com ajuste dinâmico de parâmetros na temperatura de 37 °C.



Fonte: próprio autor.

Tabela 10 – Parâmetros utilizados para a obtenção dos resultados mostrados nas Figuras 54, 55 e 56.

Parâmetro	22 °C	30 °C	37 °C
σ_o (S/m)	1×10^{-8}	1×10^{-8}	1×10^{-8}
σ_{\max} (S/m)	0,111	0,149	0,158
τ_o (s)	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$
τ_{\max} (s)	4×10^{-4}	4×10^{-4}	4×10^{-4}
E_1 (V/m)	10500	10500	10500
E_2 (V/m)	69000	69000	69000
c (m/S)	5×10^{-5}	$3,5 \times 10^{-5}$	4×10^{-5}
d (m/S)	8×10^{-6}	6×10^{-6}	6×10^{-6}

Fonte: próprio autor.

Para uma comparação quantitativa dos resultados apresentados anteriormente, foram calculados os erros quadráticos médios no intervalo de 1,5 ms entre os resultados numéricos e experimentais e o erro relativo tomando como referência o valor eficaz da corrente experimental. O erro relativo é apresentado na Tabela 11, onde série I refere-se às Figuras 50, 51 e 52 e a série II refere-se às Figuras 54, 55 e 56. Na série I o erro foi principalmente originado no segundo pulso. Observa-se que com o ajuste dinâmico de parâmetros, o erro cai para menos da metade na segunda série. Assim, conclui-se que com o ajuste adequado de parâmetros do modelo de eletropermeabilização é possível obter ajustes com erro menor que 5% da corrente eficaz na carga.

Tabela 11 – Erro quadrático médio relativo entre resultados numéricos e experimentais nas séries de simulações I (Figuras 50, 51, e 52) e II (Figuras 54, 55 e 56).

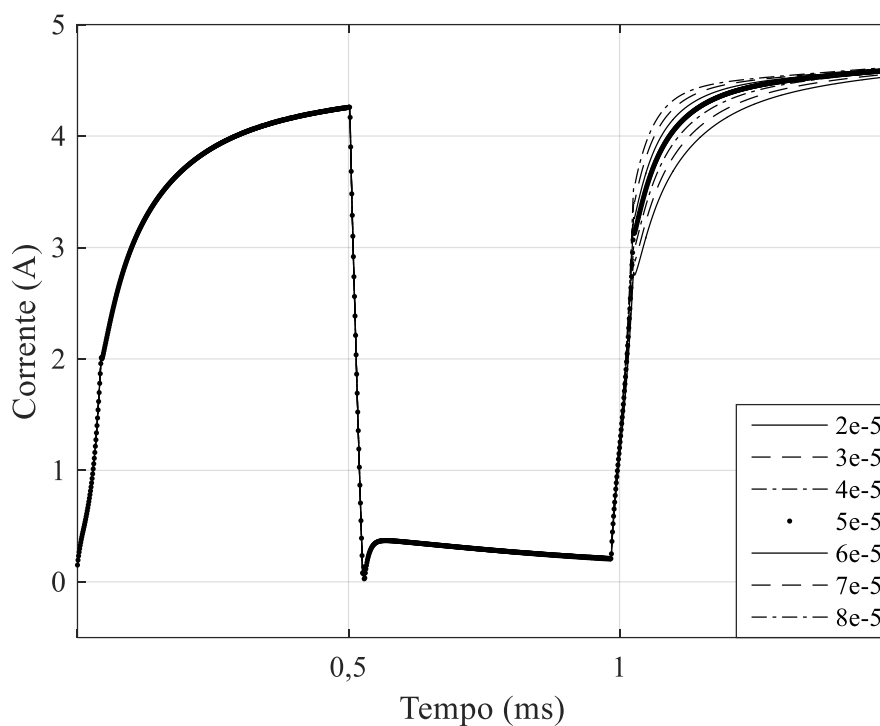
	22 °C	30 °C	37 °C
série I	0,0946	0,0912	0,146
série II	0,0442	0,0435	0,0459

Fonte: próprio autor.

Para ilustrar a influência de c e d na corrente numérica foram realizadas simulações com a variação desses coeficientes em torno dos valores apresentados na Tabela 10 para a temperatura de 22 °C. Os resultados para as outras temperaturas são semelhantes. Os resultados obtidos são apresentados nas Figuras 57 e 58. Nota-se que o parâmetro c afeta principalmente

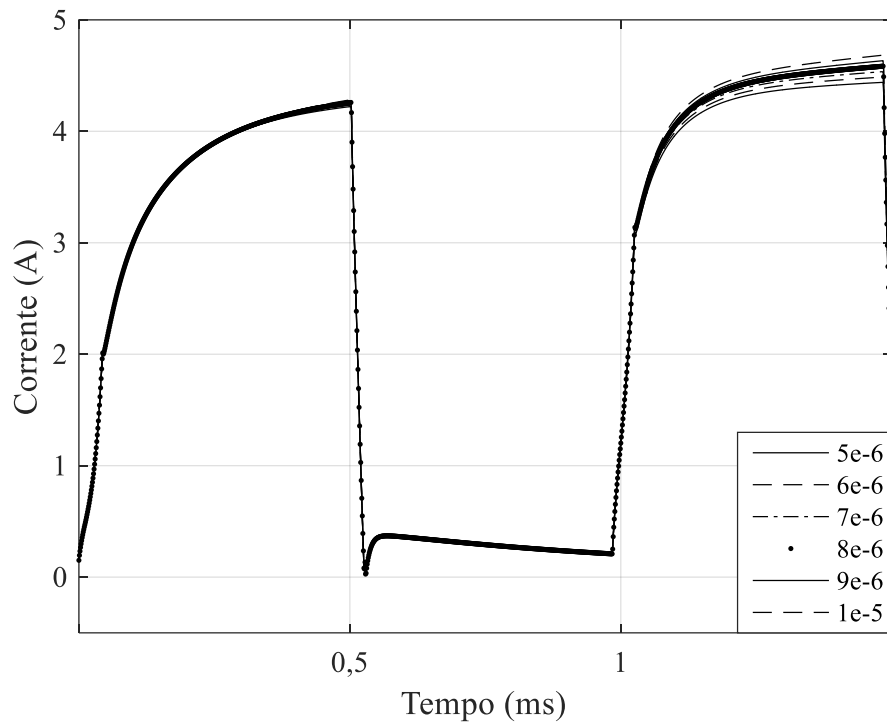
a taxa de crescimento da corrente no início do segundo pulso enquanto que o parâmetro d afeta principalmente o crescimento de corrente na segunda metade do segundo pulso. Como era de se esperar, o ajuste dinâmico apenas atua quando a condutividade integrada é bastante intensa para que as correções em τ_{\max} , E_2 e σ_{\max} tenham impacto importante na condutividade de eletropermeabilização.

Figura 57 – Corrente elétrica na amostra obtida numericamente para diversos valores do coeficiente c .



Fonte: próprio autor.

Figura 58 – Corrente elétrica na amostra obtida numericamente para diversos valores do coeficiente d .

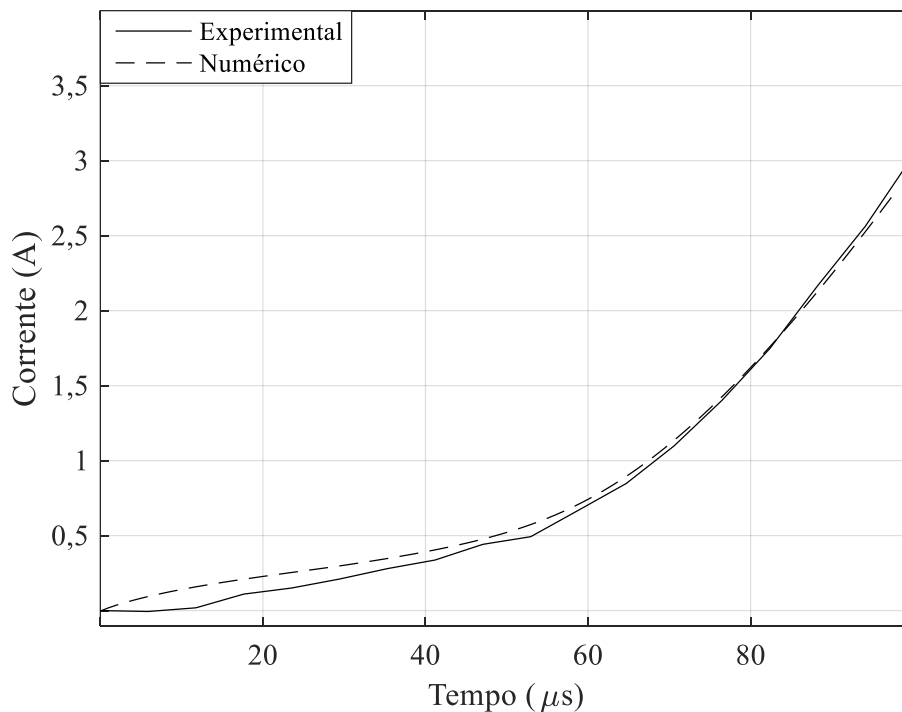


Fonte: próprio autor.

4.4.2 Simulação da resposta à rampa de tensão

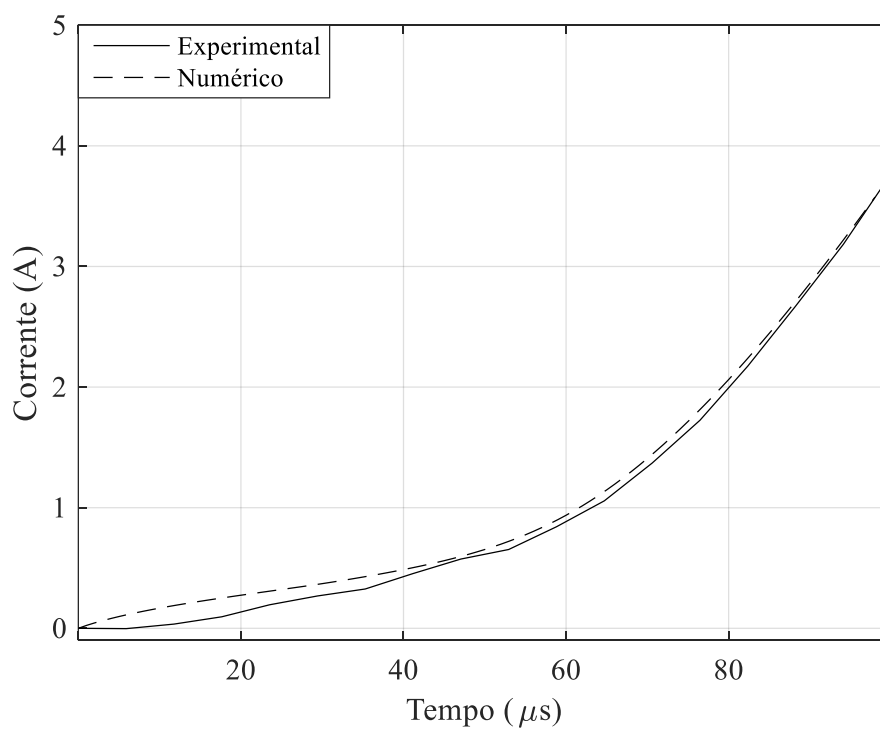
Para a simulação da resposta à rampa de tensão foi utilizada a mesma configuração geométrica da análise apresentada na seção anterior, a diferença consistindo na forma de onda da tensão aplicada e nos parâmetros do modelo de eletropermeabilização. As figuras e tabelas a seguir apresentam a comparação entre resultados numéricos e experimentais e os parâmetros utilizados no modelo de eletropermeabilização para a obtenção das curvas de corrente (I_{Tot}) para cada derivada de tensão utilizada.

Figura 59 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 100 μ s na temperatura de 22 °C.



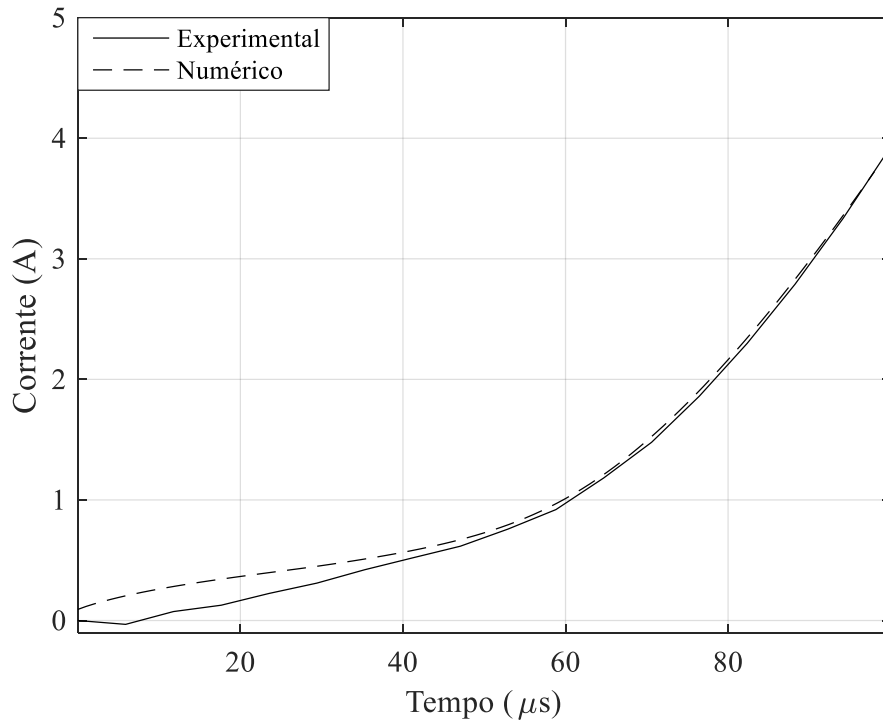
Fonte: próprio autor.

Figura 60 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 100 μ s na temperatura de 30 °C.



Fonte: próprio autor.

Figura 61 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 100 μ s na temperatura de 37 °C.



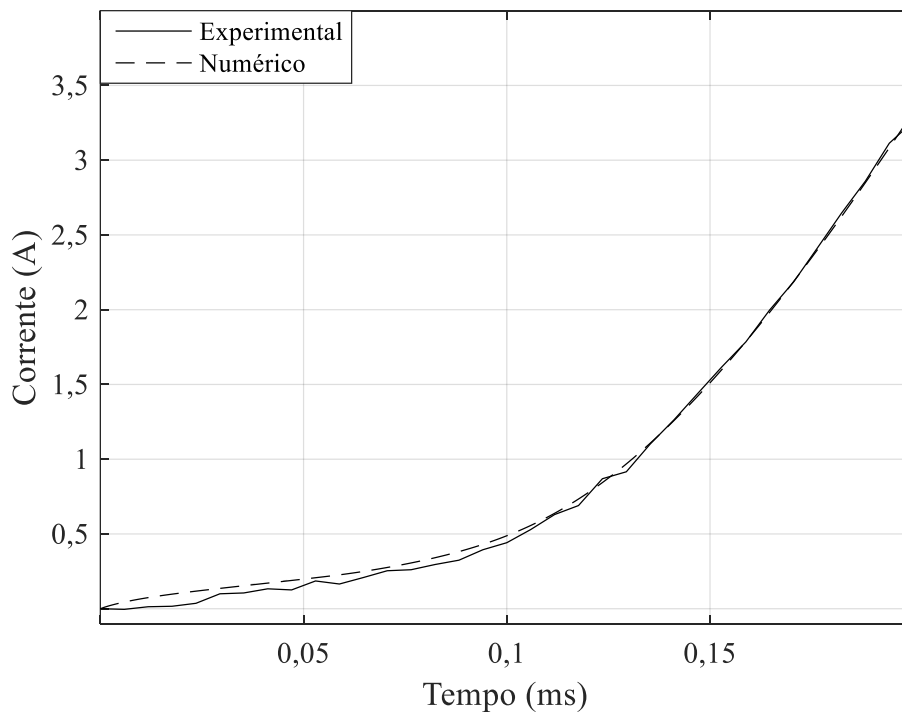
Fonte: próprio autor.

Tabela 12 – Parâmetros do modelo de eletropermeabilização para a rampa de tensão de 400 V/ 100 μ s.

Parâmetro	22 °C	30 °C	37 °C
σ_o (S/m)	1×10^{-8}	1×10^{-8}	1×10^{-8}
σ_{max} (S/m)	0,111	0,149	0,152
τ_o (s)	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$
τ_{max} (s)	4×10^{-3}	4×10^{-3}	4×10^{-3}
E_1 (V/m)	10500	10500	10500
E_2 (V/m)	40800	40800	40800

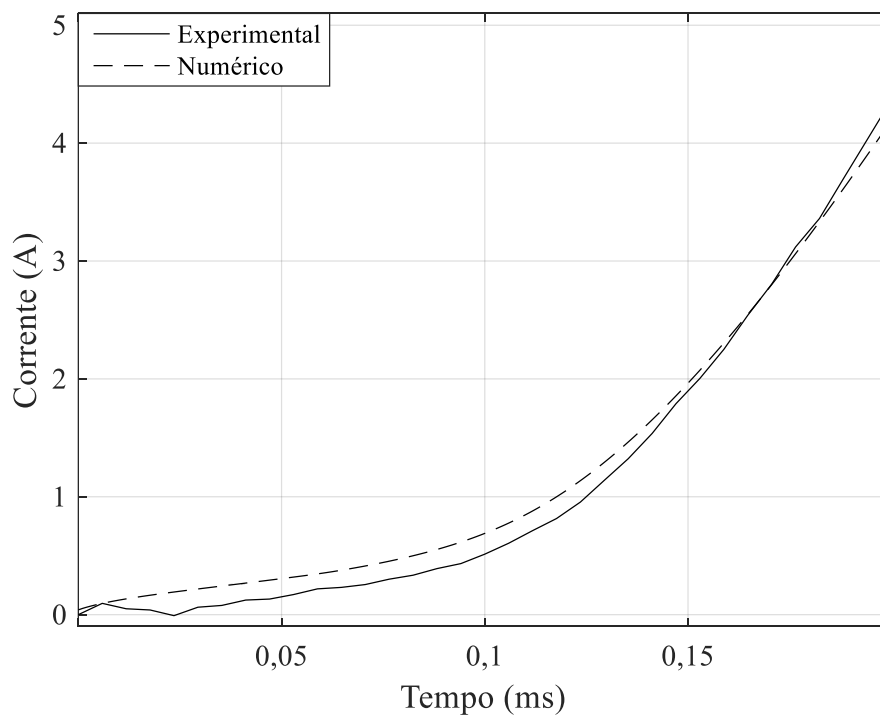
Fonte: próprio autor.

Figura 62 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 200 μ s na temperatura de 22 °C.



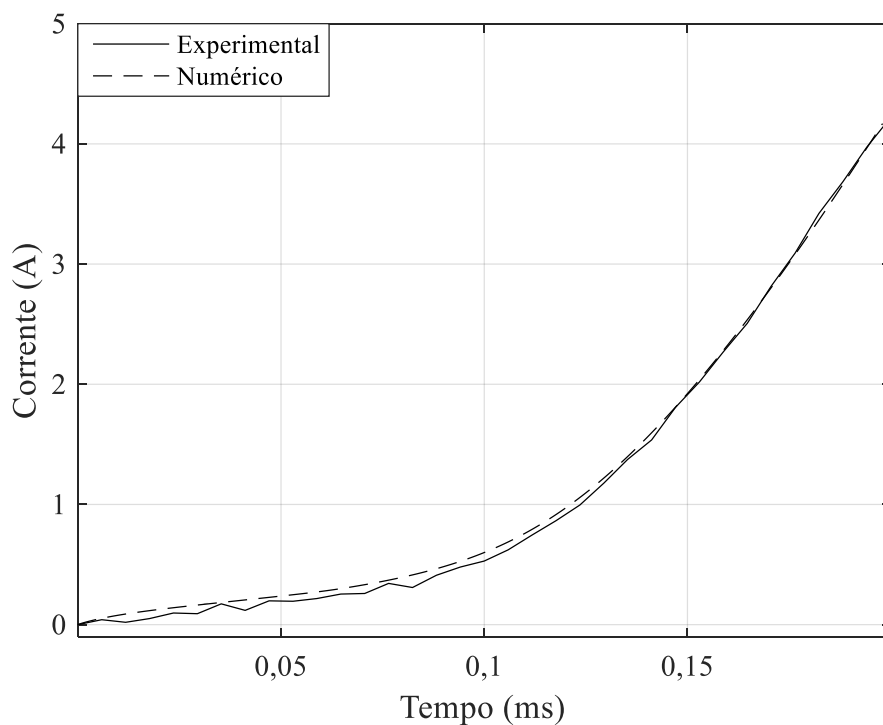
Fonte: próprio autor.

Figura 63 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 200 μ s na temperatura de 30 °C.



Fonte: próprio autor.

Figura 64 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 200 μ s na temperatura de 37 °C.



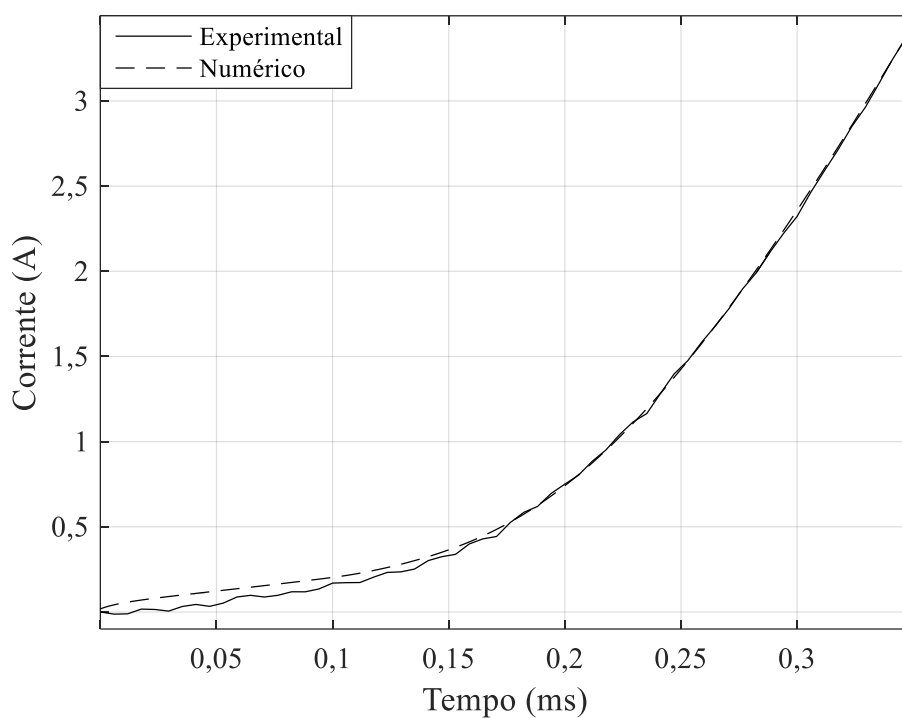
Fonte: próprio autor.

Tabela 13 – Parâmetros do modelo de eletropermeabilização para a rampa de tensão de 400 V/ 200 μ s.

Parâmetro	22 °C	30 °C	37 °C
σ_o (S/m)	1×10^{-8}	1×10^{-8}	1×10^{-8}
σ_{max} (S/m)	0,122	0,150	0,161
τ_o (s)	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$
τ_{max} (s)	4×10^{-3}	4×10^{-3}	4×10^{-3}
E_1 (V/m)	10500	10500	10500
E_2 (V/m)	40800	40800	40800

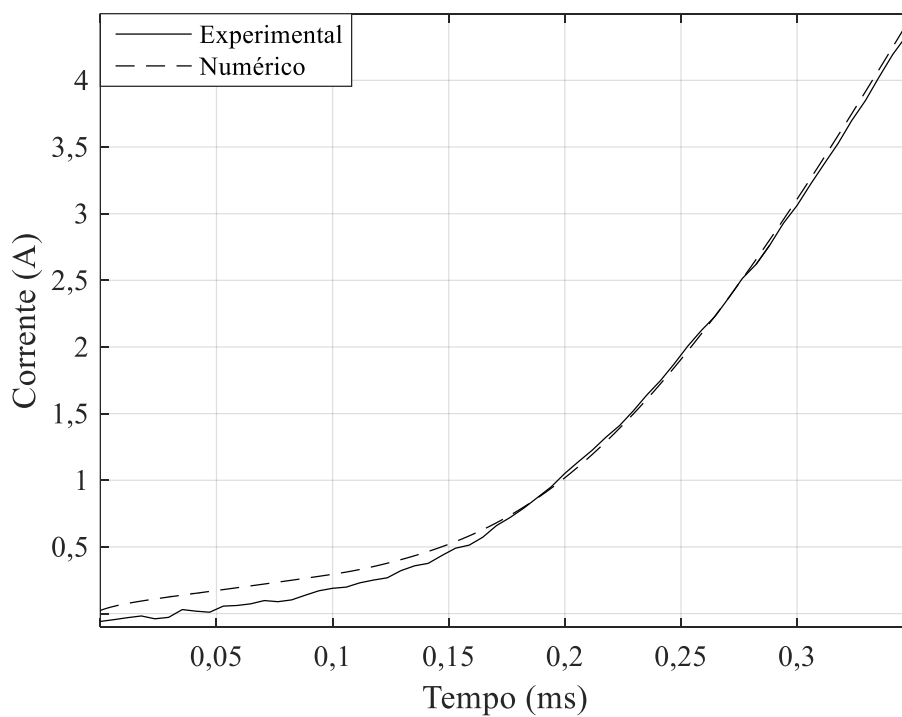
Fonte: próprio autor.

Figura 65 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 350 μ s na temperatura de 22 °C.



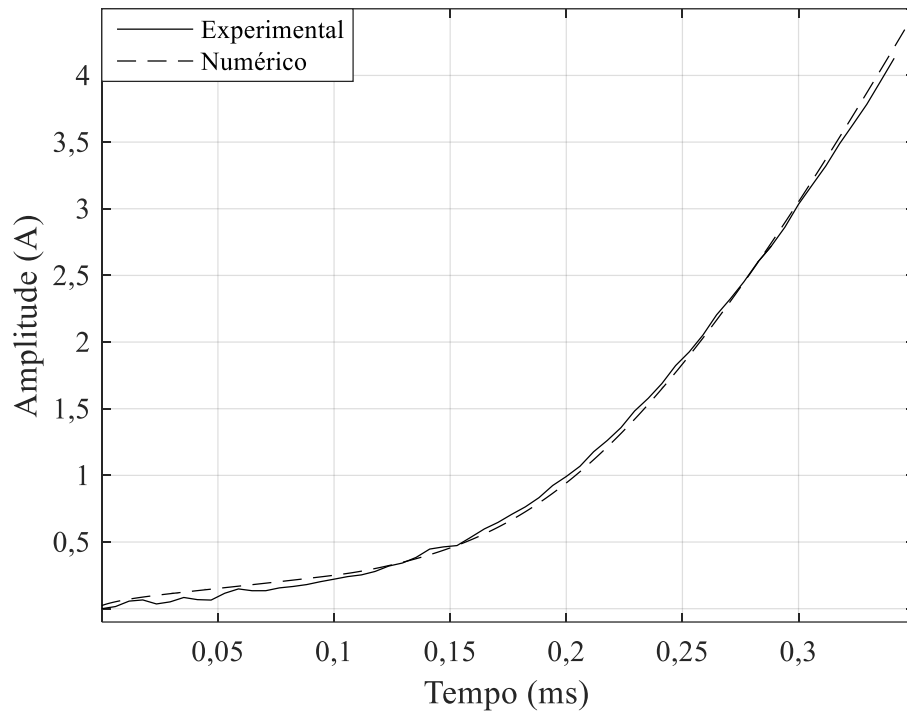
Fonte: próprio autor.

Figura 66 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 350 μ s na temperatura de 30 °C.



Fonte: próprio autor.

Figura 67 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 350 μ s na temperatura de 37 °C.



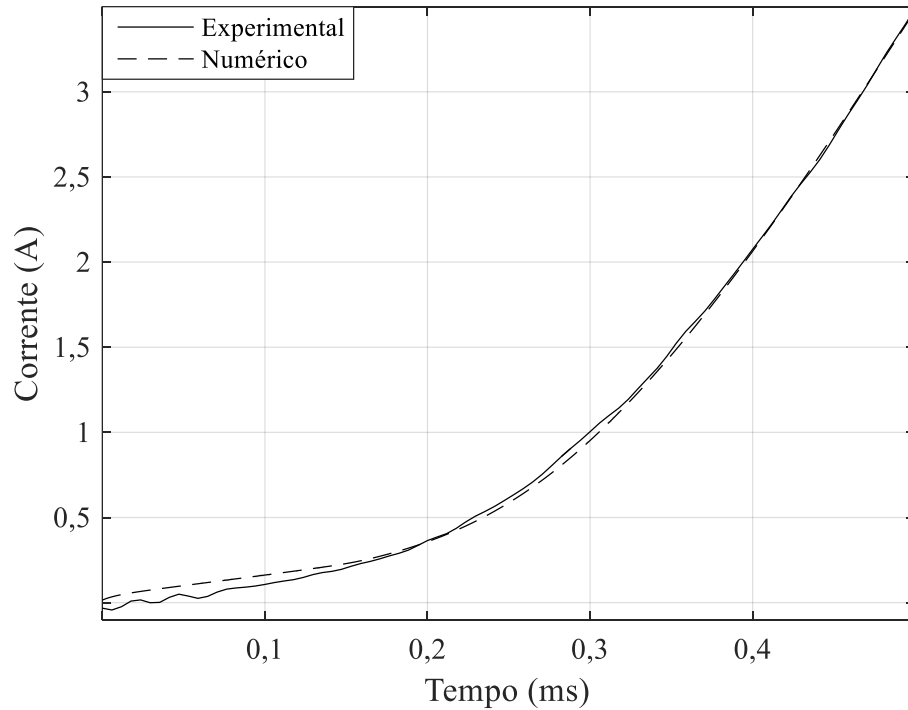
Fonte: próprio autor.

Tabela 14 – Parâmetros do modelo de eletropermeabilização para a rampa de tensão de 400 V/ 350 μ s.

Parâmetro	22 °C	30 °C	37 °C
σ_0 (S/m)	1×10^{-8}	1×10^{-8}	1×10^{-8}
σ_{\max} (S/m)	0,118	0,150	0,160
τ_0 (s)	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$
τ_{\max} (s)	4×10^{-3}	4×10^{-3}	4×10^{-3}
E_1 (V/m)	10500	10500	10500
E_2 (V/m)	40500	40500	40500

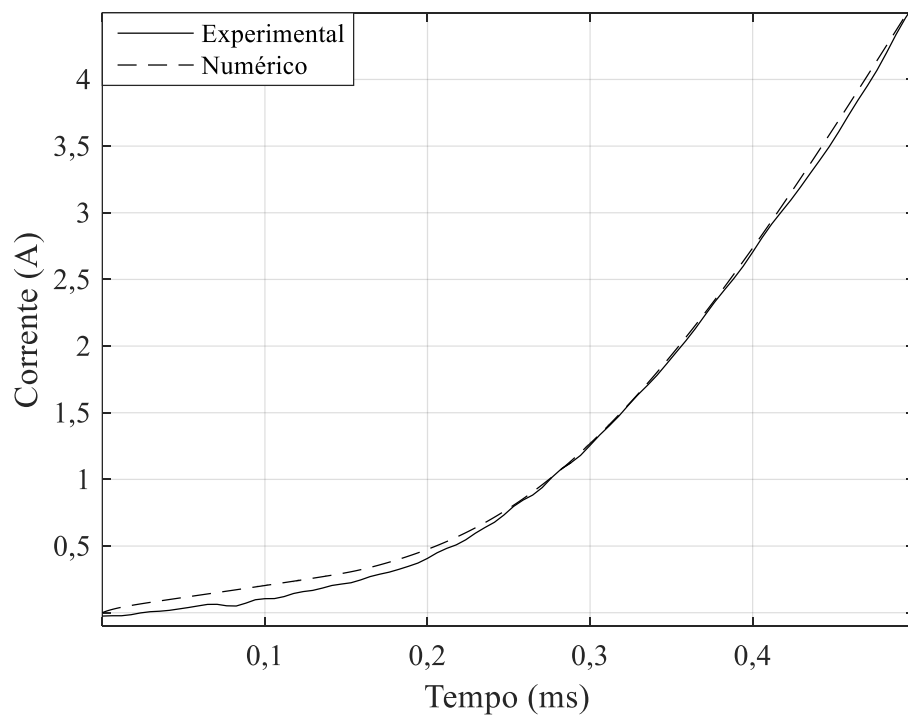
Fonte: próprio autor.

Figura 68 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 500 μ s na temperatura de 22 °C.



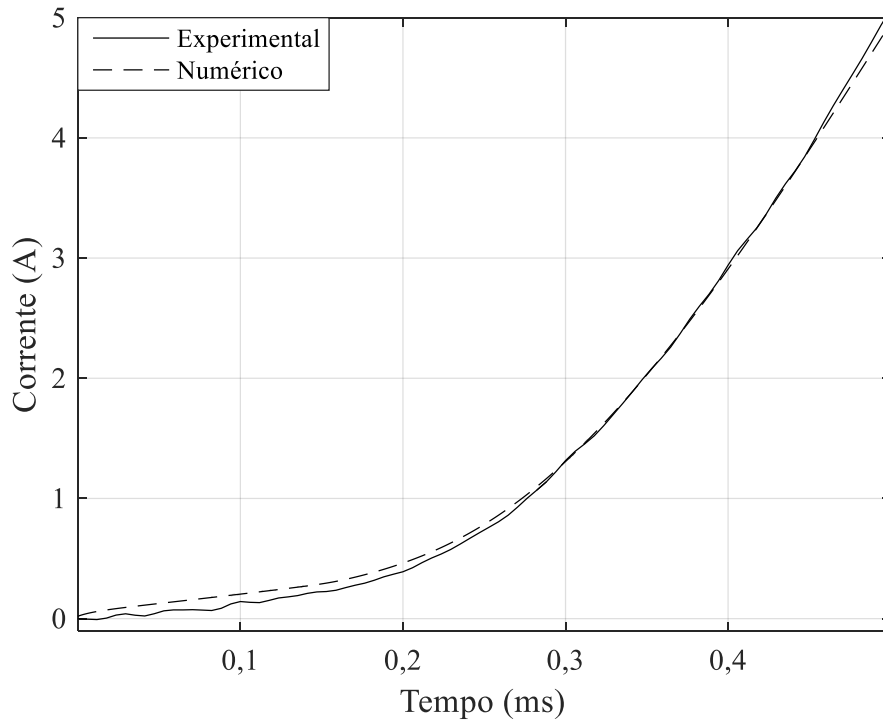
Fonte: próprio autor.

Figura 69 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 500 μ s na temperatura de 30 °C.



Fonte: próprio autor.

Figura 70 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 500 μ s na temperatura de 37 °C.



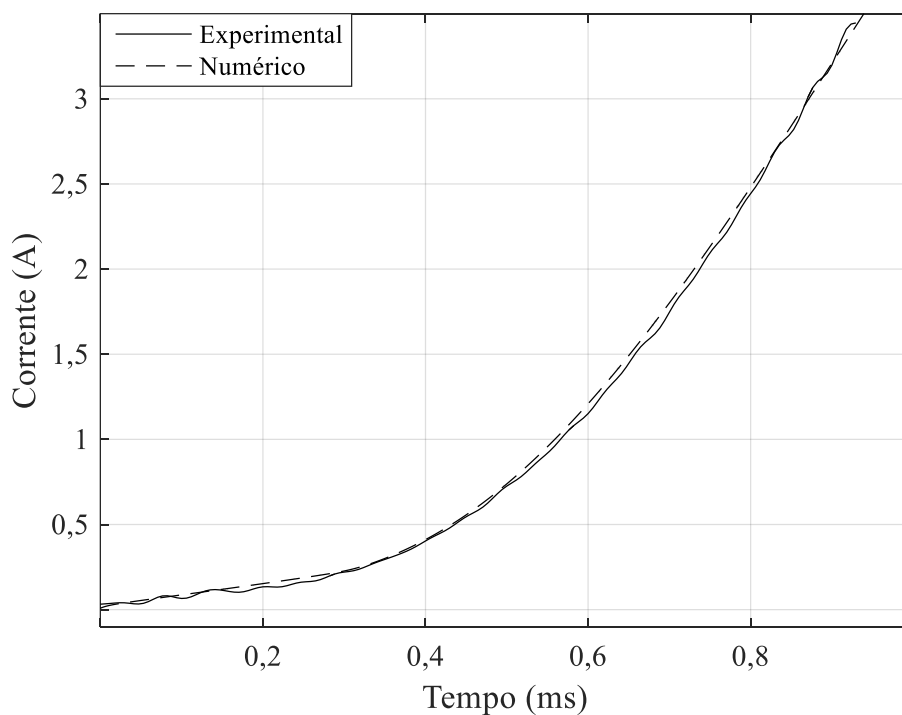
Fonte: próprio autor.

Tabela 15 – Parâmetros do modelo de eletropermeabilização para a rampa de tensão de 400 V/ 500 μ s.

Parâmetro	22 °C	30 °C	37 °C
σ_0 (S/m)	1×10^{-8}	1×10^{-8}	1×10^{-8}
σ_{\max} (S/m)	0,109	0,142	0,160
τ_0 (s)	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$
τ_{\max} (s)	4×10^{-3}	4×10^{-3}	4×10^{-3}
E_1 (V/m)	10500	10500	10500
E_2 (V/m)	40800	40800	40800

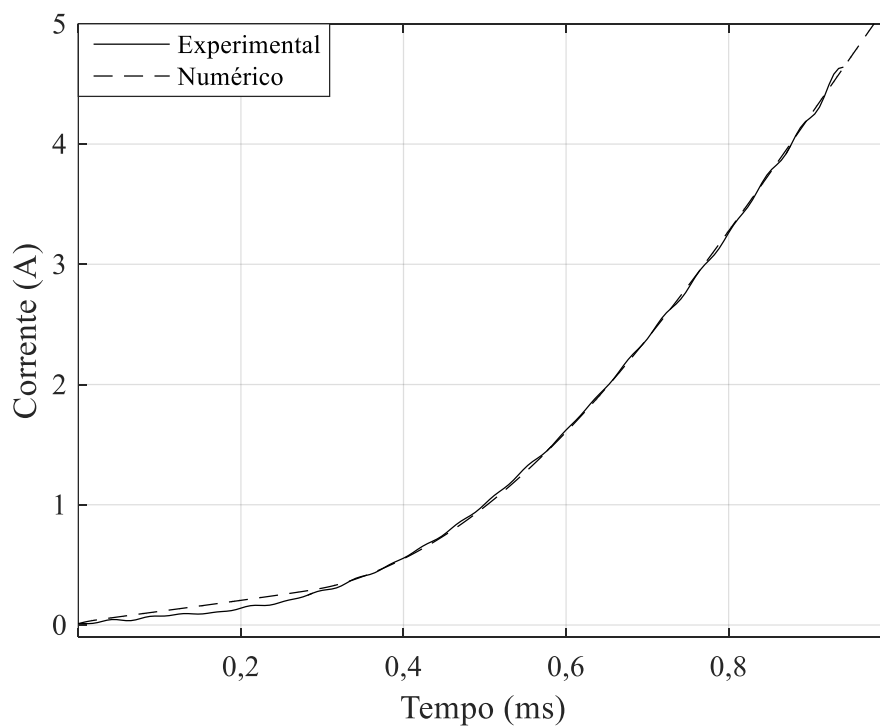
Fonte: próprio autor.

Figura 71 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 1000 μ s na temperatura de 22 °C.



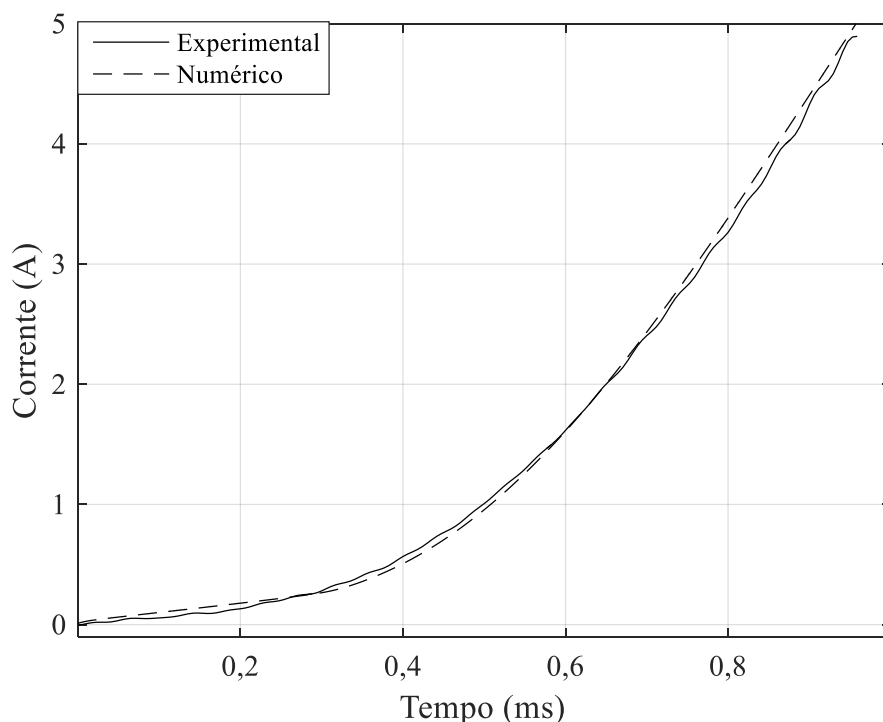
Fonte: próprio autor.

Figura 72 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 1000 μ s na temperatura de 30 °C.



Fonte: próprio autor.

Figura 73 – Corrente elétrica na amostra estimulada com rampa de tensão com inclinação de 400 V/ 1000 μ s na temperatura de 37 °C.



Fonte: próprio autor.

Tabela 16 – Parâmetros do modelo de eletropermeabilização para a rampa de tensão de 400 V/ 1000 μ s.

Parâmetro	22 °C	30 °C	37 °C
σ_0 (S/m)	1×10^{-8}	1×10^{-8}	1×10^{-8}
σ_{\max} (S/m)	0,112	0,147	0,160
τ_0 (s)	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$
τ_{\max} (s)	4×10^{-3}	4×10^{-3}	4×10^{-3}
E_1 (V/m)	10500	10500	10500
E_2 (V/m)	40800	40800	40800

Fonte: próprio autor.

Observa-se nas Figuras 59 a 63 grande semelhança entre as respostas numérica e experimental. A Tabela 17 apresenta o erro quadrático médio relativo calculado em relação ao valor eficaz da corrente experimental. A diferença entre resposta numérica e experimental situa-se entre aproximadamente 2% e 9%. Para obter esta semelhança na simulação foi necessário fazer pequenos ajustes em todos os parâmetros do modelo de eletropermeabilização (exceto σ_0)

para cada inclinação da rampa de tensão. As diferenças mais significativas na resposta numérica em relação à resposta experimental ocorrem no início do intervalo de análise, ou seja, antes de iniciar o processo de eletropermeabilização. Então, isso provavelmente não se deve a erro de modelagem da eletropermeabilização, mas talvez reflita uma não conformidade do modelo de dispersão dielétrica, uma vez que devido à influência da polarização de eletrodo, não foi possível modelar corretamente a banda alfa de dispersão do tecido biológico e por isso apenas a banda beta foi usada nas simulações.

Tabela 17 – Erro quadrático médio relativo (em relação ao valor eficaz da corrente experimental) entre resultados numéricos e experimentais para estimulação com rampa de tensão com diferentes inclinações.

	22 °C	30 °C	37 °C
400 V/ 100 μ s	0,0635	0,0667	0,0817
400 V/ 200 μ s	0,0678	0,0833	0,0643
400 V/ 350 μ s	0,0757	0,0835	0,0261
400 V/ 500 μ s	0,0372	0,0277	0,0334
400 V/ 1000 μ s	0,0215	0,0165	0,0282

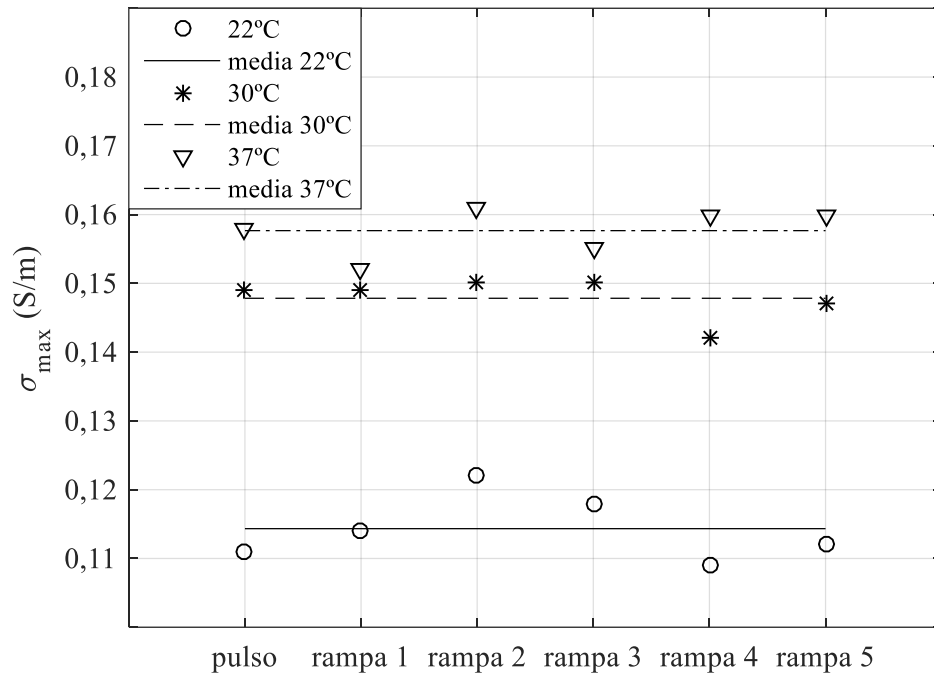
Fonte: próprio autor.

As Figuras 74 a 78 mostram uma comparação entre os valores ajustados dos parâmetros do modelo de eletropermeabilização nas diversas inclinações da rampa de tensão e nos pulsos. O eixo horizontal em cada figura descreve a forma de onda da tensão aplicada. Para as rampas, a sequência numérica 1, 2, 3, 4 e 5 equivale respectivamente a: 400 V/ 100 μ s, 400 V/ 200 μ s, 400 V/ 350 μ s, 400 V/ 500 μ s e 400 V/ 1000 μ s.

Observa-se na Figura 74 que os parâmetros da condutividade máxima apresentam uma pequena flutuação em torno de uma média. Nas Figuras 76 e 78 os valores para as rampas são idênticos, porém muito diferentes dos obtidos para o pulso. Entretanto, observa-se que as diferenças entre pulso e rampa para E_2 e τ_{\max} apresentam comportamentos opostos: enquanto τ_{\max} para pulso é cerca de 10% do valor para rampas, E_2 para pulso é quase o dobro do valor para rampas. No modelo de eletropermeabilização esses dois parâmetros atuam juntos para definir o tempo de relaxação da condutância como mostra a equação (3.17). Nessa equação percebe-se que aumentos em τ_{\max} podem ser compensados pela diminuição de E_2 e vice-versa. Isso sugere que novas possibilidades de ajuste de parâmetros além daquela realizada neste

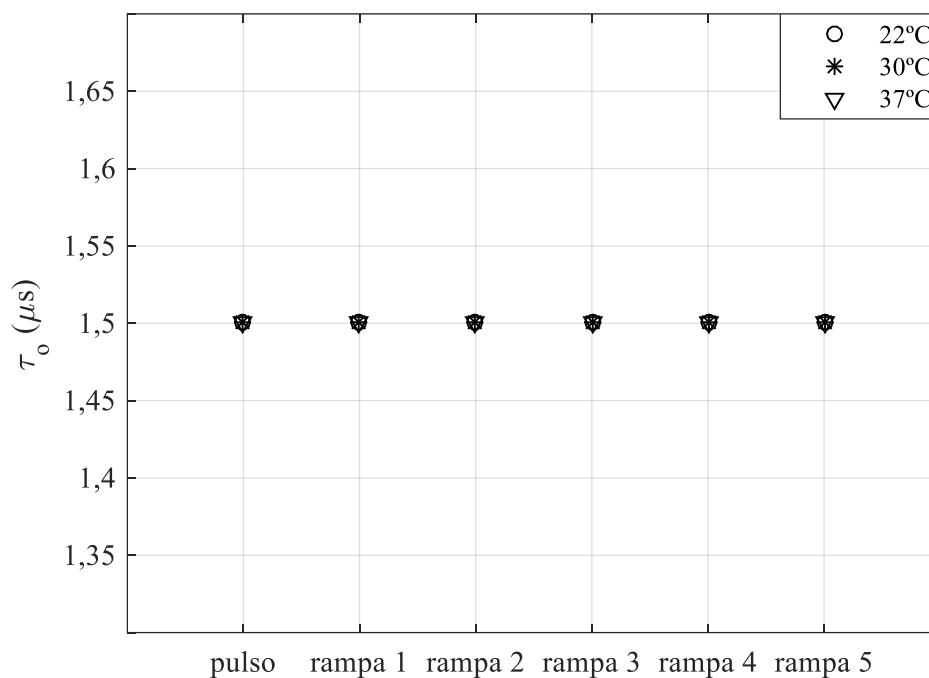
estudo preliminar podem resultar em combinações (E_2 , τ_{\max}) mais próximas dos valores obtidos para rampas de tensão.

Figura 74 – Comparação entre os valores ajustados de σ_{\max} nos diversos experimentos de eletropermeabilização.



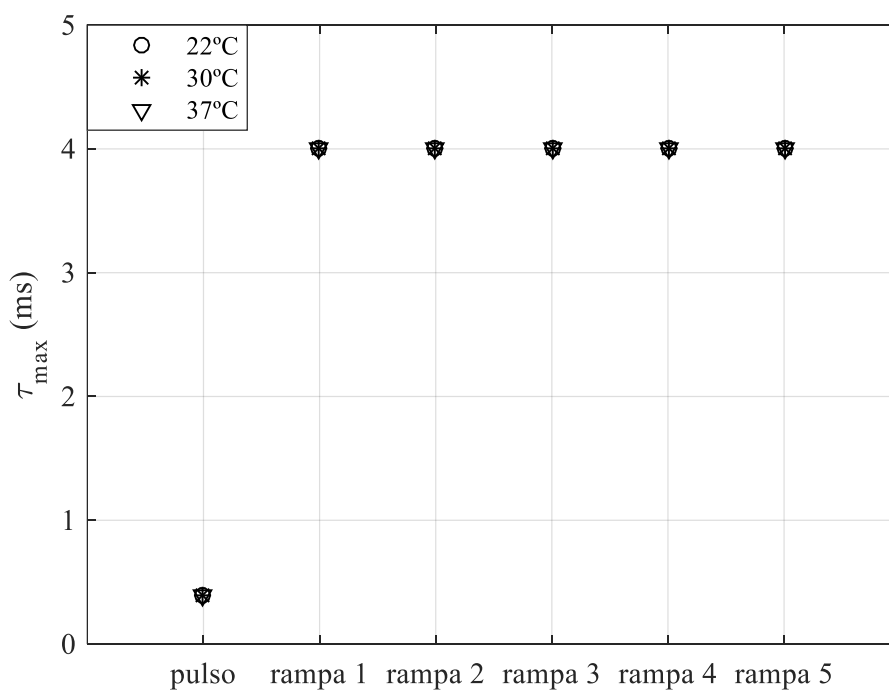
Fonte: próprio autor.

Figura 75 – Comparação entre os valores ajustados de τ_o nos diversos experimentos de eletropermeabilização.



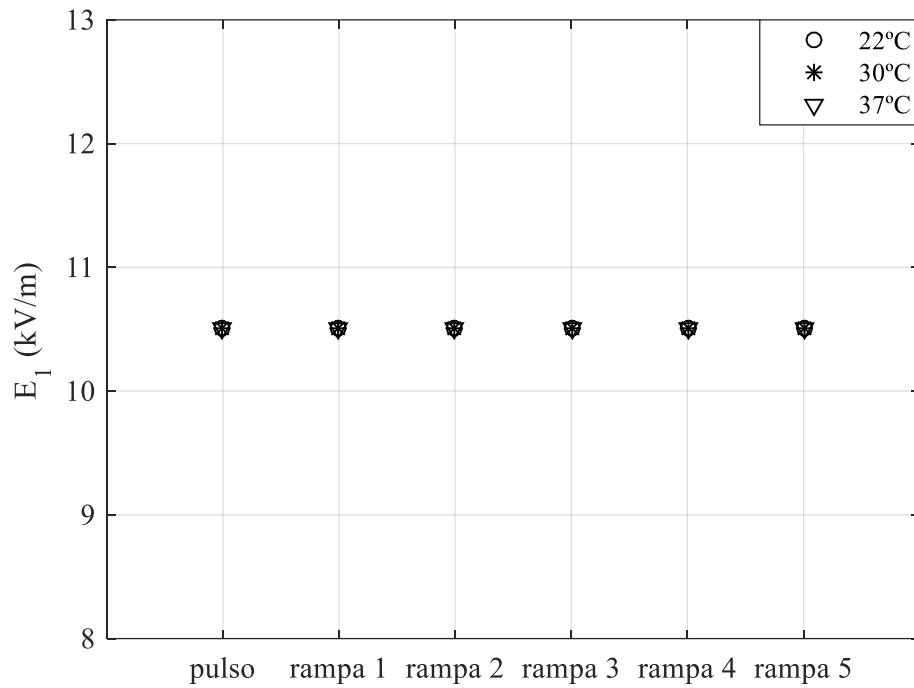
Fonte: próprio autor.

Figura 76 – Comparação entre os valores ajustados de τ_{max} nos diversos experimentos de eletropermeabilização.



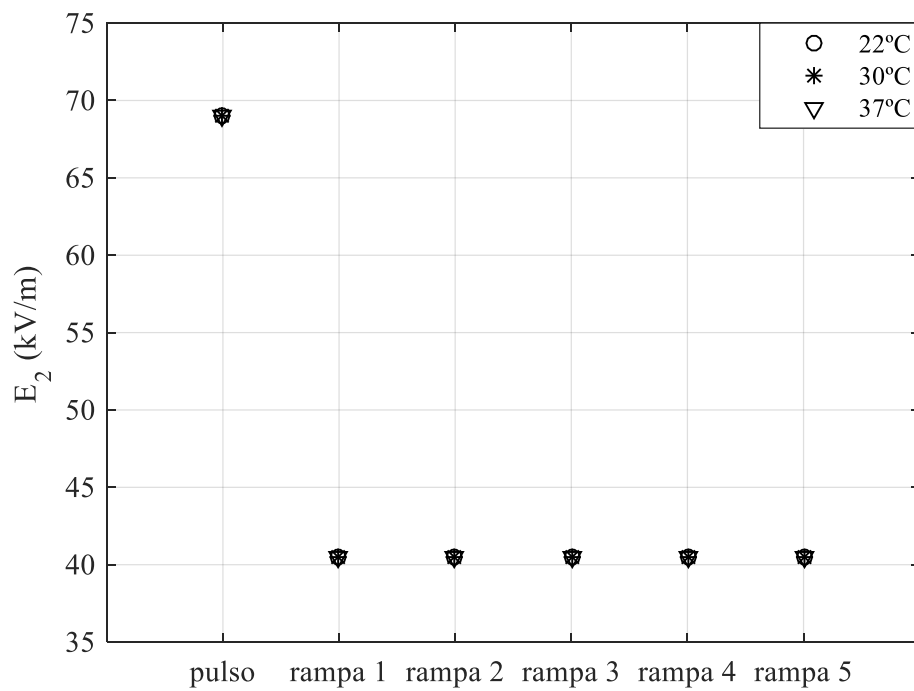
Fonte: próprio autor.

Figura 77 – Comparação entre os valores ajustados de E_1 nos diversos experimentos de eletropermeabilização.



Fonte: próprio autor.

Figura 78 – Comparação entre os valores ajustados de E_2 nos diversos experimentos de eletropermeabilização.



Fonte: próprio autor.

5 CONCLUSÕES

Esta dissertação apresentou algumas técnicas experimentais e computacionais para a análise da eletropermeabilização em tecidos biológicos e resultados obtidos na experimentação com fígado de rato. O propósito principal foi realizar uma investigação e avaliação preliminar de um modelo de eletropermeabilização que está em desenvolvimento no Grupo de Pesquisa em Eletromagnetismo Aplicado da UDESC.

Para isso foi desenvolvido um circuito eletrônico com capacidade para fornecer tensões pulsadas com forma de onda programada com amplitude máxima de 450 volts e corrente máxima de 10 amperes. Um circuito de amostragem e digitalização de tensão e corrente foi desenvolvido para medir a resposta transitória no tecido biológico e uma técnica inédita de compensação da resposta dispersiva baseada no espectro de impedância do tecido foi desenvolvida e aplicada para separar a parte da resposta total que efetivamente se deve ao processo de eletropermeabilização. Foram utilizadas tensões na forma de pulso retangular e rampas de tensão com diferentes inclinações.

Na parte computacional deste estudo foi utilizado o simulador BEC baseado no Método do Circuito Equivalente no qual o modelo de eletropermeabilização foi incorporado.

Os resultados experimentais mostraram um comportamento típico bem caracterizado na literatura em relação à estimulação por pulsos: a condutância aumenta durante os pulsos de tensão e diminui nos intervalos entre pulsos. Mas, o tecido não consegue se recuperar totalmente nos intervalos, de modo que a cada novo pulso a condutância apresenta valor gradualmente maior tendendo desse modo à saturação. O efeito do aumento na temperatura da amostra foi o de aumentar o valor final da condutância, o que foi atribuído ao aumento na taxa de criação e crescimento de poros nas membranas celulares bem como ao aumento na condutividade dos eletrólitos interno e externo às células no tecido.

Nos experimentos com rampa de tensão verificou-se que o limiar de eletropermeabilização diminui com o aumento da temperatura da amostra e com o aumento da derivada da tensão aplicada. O efeito da temperatura também pode ser explicado com base no aumento na taxa de criação e crescimento de poros. A escala de tempo do campo aplicado sugere que o efeito mais pronunciado da derivada de tensão ocorre no crescimento dos poros, uma vez que o tempo característico de criação de poros hidrofílicos é de poucos microssegundos.

A comparação entre resultados numéricos e experimentais pode ser resumida como segue:

- 1) Para pulsos de tensão o ajuste de parâmetros do modelo de eletropermeabilização proporcionou erro menor que 5% (do valor eficaz da corrente experimental) entre resposta numérica e experimental;
- 2) Para rampas de tensão o ajuste de parâmetros proporcionou erros entre aproximadamente 2% e 9% (do valor eficaz da corrente experimental) entre resposta numérica e experimental;
- 3) Para obter a menor diferença entre respostas numérica e experimental foi necessário fazer ajustes em todos os parâmetros, exceto σ_0 ;
- 4) A inclusão de ajuste dinâmico baseado no valor da integral da condutividade de eletropermeabilização nos seguintes parâmetros do modelo: tempo de relaxação máximo τ_{\max} , limiar de campo E_2 e condutividade máxima σ_{\max} ; permite obter a adaptação adequada do modelo para que a resposta numérica no segundo pulso apresente erro numérico semelhante ao primeiro pulso.
- 5) Observou-se diferenças apreciáveis nos parâmetros, τ_{\max} e E_2 ajustados para pulsos quando comparados com os valores ajustados para rampas. Sugere-se que novas estratégias de ajuste desses parâmetros sejam desenvolvidas para reduzir as diferenças observadas neste estudo.

Apesar das diferenças observadas nos parâmetros ajustados, as observações (1) a (5) relacionadas no parágrafo anterior sugerem a possibilidade de uso do modelo de eletropermeabilização com um único conjunto de parâmetros característicos de cada tecido biológico que permita a obtenção de estimativas da resposta elétrica durante o evento de eletropermeabilização biológica dentro de intervalos aceitáveis de confiabilidade. Como este estudo é inédito e preliminar, tal conjunto de parâmetros para cada tecido biológico de interesse é tarefa a ser cumprida em estudos posteriores.

Além disso, o método utilizado nesta pesquisa é demasiadamente demorado e não garante a obtenção do conjunto otimizado de parâmetros do modelo para um determinado conjunto de resultados experimentais. Uma vez que cada simulação envolvendo estímulos elétricos com vários milissegundos de duração requer diversas horas para ser realizada, torna-se imprescindível o desenvolvimento de estratégias otimizadas de parametrização e recursos computacionais avançados (bom número de computadores rápidos) para obter-se rápida e corretamente o conjunto de parâmetros do modelo que minimizam a diferença entre resultados numéricos e experimentais.

Salienta-se que outras grandezas além da corrente elétrica na amostra podem e devem ser utilizadas para garantir a coerência e robustez do modelo e conjunto de parâmetros obtidos. Uma possibilidade promissora é a temperatura na superfície da amostra de tecido biológico. A medição da temperatura durante a aplicação do estímulo elétrico e a comparação com resultados obtidos por simulação pode proporcionar um recurso adicional para se avaliar a qualidade da parametrização do modelo de eletropermeabilização. Outra possibilidade é a medição da condutividade local no tecido por método indireto como a indução magnética. Esta opção, porém, é mais difícil de ser realizada.

Adicionalmente, o desenvolvimento de um novo eletropermeabilizador com maiores tensões e tempos menores de chaveamento bem como a instrumentação com maior faixa de frequência de medição deve nortear os trabalhos futuros nessa área de pesquisa.

REFERÊNCIAS

ANALOG DEVICES. <http://www.analog.com/media/en/technical-documentation/data-sheets/AD844.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2016.

BARNETT, A. The current-voltage relation of an aqueous pore in a lipid bilayer membrane. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1025, p. 10-14, February 1990.

BARNETT, A.; WEAVER, J. C. Electroporation: a unified, quantitative theory of reversible electrical breakdown and mechanical rupture in artificial planar bilayer membranes. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 130, p. 163-182, 1991.

BENAZZO, M.; BERTINO, ; GROSELJ, A. Electrochemotherapy of Head and Neck Cancer. In: ELECTROPORATION, H. O. **Damijan Mklavcic**. [S.l.]: Springer, 2016. p. 1-14.

CAMPANA, L. G. et al. Electrochemotherapy for Breast Cancer. In: MIKLAVCIC, D. **Handbook of Electroporation**. [S.l.]: Springer, 2016. p. 1-19.

CHANG et al. **Guide to Electroporation and Electrofusion**. San Diego: Academic Press, 1992.

CHANG, D. C. Structure and Dynamics of Electric Field-Induced Membrane Pores as Revealed by Rapid-Freezing Electron Microscopy. In: DONALD C. CHANG, B. M. C. J. A. S. A. E. S. **Guide to Electroporation and Electrofusion**. San Diego: Academic Press, 1992. p. 9-27.

CHEN, C. et al. Membrane electroporation theories: a review. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v. 44, p. 5-14, February 2006.

COROVIC, S. et al. Modeling of Electric Field Distribution in Tissues During Electroporation. **BioMedical Engineering OnLine**, 2013.

COROVIC, S.; ZUPANIC, A.; MIKLAVCIC, D. Numerical Modeling and Optimization of Electric Field Distribution in Subcutaneous Tumor Treated With Electrochemotherapy Using Needle Electrodes. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 36, p. 1665-1672, August 2008.

DAVALOS, R. D.; RUBINSKY, B.; MIR, L. M. Theoretical analysis of the thermal effects during in vivo tissue electroporation. **Bioelectrochemistry**, n. 61, p. 99-107, 2003.

DAVIES, A.; BLAKELEY, ; KIDD,. **Fisiologia Humana**. Porto Alegre: Artmed, 2001.

DEBRUIN, A.; KRASSOWSKA, W. Electroporation and Shock-Induced Transmembrane Potential in a Cardiac Fiber During Defibrillation Strength Shocks. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 26, p. 584-596, 1998.

DEBRUIN, K. A.; KRASSOWSKA, W. Modeling electroporation in a single cell. I. Effects of field strength and rest potential. **Biophysical Journal**, v. 92, p. 1213-1224, September 1999.

DENET, A.-R.; VANBEVER, ; PRÉAT,. Skin electroporation for transdermal and topical delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, p. 659-674, 2004.

ENDERLE, D.; BLANCHARD, S. M.; BRO, D. **Introduction to Biomedical Engineering**. San Diego: Academic Press, 1999.

FARIAS, H. D. **Modelagem da impedância de suspensões de células biológicas na eletropermeabilização**. UDESC. Joinville, p. 92. 2015.

FOSTER, R.; SCHWAN, H. P. Dielectric properties of tissues. In: CHARLES POLK, E. P. **Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields**. [S.l.]: CRC Press, 1995. p. 25-102.

GABRIEL, S.; LAU, R. W.; GABRIEL, C. The Dielectric Properties of Biological Tissues: III. Parametric models for the Dielectric Spectrum of Tissues. **Physics in Medicine and Biology**, v. 41, p. 2271-2293, 1996.

GEHL, J. Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research. **Acta Physiologica Scandinavica**, v. 4, p. 437-447, 2003.

GLASER, W. et al. Reversible Electrical Breakdown of Lipid Bilayers: Formation and Evolution of Pores. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1988. 275-287.

GRANATA, V. et al. Electrochemotherapy of Locally Advanced Pancreatic Cancer. In: MIKLAVCIC, D. **Handbook of Electroporation**. [S.l.]: Springer, v. 1, 2016. p. 1-16.

HOFMANN, G. A.; DEV, S. B.; NANDA, G. S. Electrochemotherapy: Transition from Laboratory to the Clinic. **IEEE Engineering in Medicine and Biology**, v. 15, p. 124-132, 1996.

IGEAMEDICAL. IGEAMedical. Disponível em: <<http://www.igeamedical.com/oncology/cliniporator/synthesis-chemistry-and-physics-fight-cancer>>. Acesso em: 5 out. 2016.

IVORRA, A. et al. In vivo electrical conductivity measurements during and after tumor electroporation: conductivity changes reflect the treatment outcome. **Physics in Medicine and Biology**, v. 54, p. 5949-5963, 2009.

KINOSITA JR, K. et al. Electroporation of cell membrane visualized under a pulsed-laser fluorescence microscope. **Biophysical Journal**, v. 53, p. 1015-1019, June 1988.

KINOSITA JR, K. et al. Events of Membrane Electroporation Visualized on a Time Scale From Microsecond to Seconds. In: DONALD C. CHANG, B. M. C. J. A. S. A. E. S. **Guide to Electroporation and Electrofusion**. San Diego: Academic Press, v. 1, 1992. p. 29-46.

KOTNIK, T. et al. Cell membrane electropermeabilization by bipolar rectangular pulses. Part I. Increased efficiency of permeabilization. **Bioelectrochemistry**, v. 54, p. 83-90, 2001.

KRASSOWSKA, W.; FILEV, D. Modeling Electroporation in a Single Cell. **Biophysical Journal**, v. 92, p. 404-417, 2007.

LEBAR, A. M.; MIKLAVCIC, D. Cell electropermeabilization to small molecules in vitro: control by pulse parameters. **Radiology and Oncology**, v. 35, p. 193-202, 2001.

MIKLAVCIC, D. et al. Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice. **BioMedical Engineering OnLine**, 2014.

MIR, L. M. et al. High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, p. 4262-4267, 1999.

MIR, L. M. et al. Standard Operating Procedures of the Electrochemotherapy: Instructions for the Use of Bleomycin or Cisplatin Administered Either Systemically or Locally and Electric Pulses Delivered by the Cliniporator by Means of Invasive or Non-Invasive Electrodes. **EJC SUPPLEMENTS**, 2006. 14-25.

MIR, L. M.; BANOUN, H.; PAOLETTI, C. Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electropermeabilization: direct access to the cytosol. **Experimental Cell Research**, v. 175, p. 15-25, 1988.

NEAL II, R. E. et al. Experimental Characterization and Numerical Modeling of Tissue Electrical Conductivity during Pulsed Electric Fields for Irreversible Electroporation Treatment Planning. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 59, p. 1076-1085, 2012.

NEU, C.; KRASSOWSKA, W. Asymptotic model of electroporation. **Physical Review E**, v. 59, p. 3471-3482, March 1999.

NXP. <http://www.nxp.com/assets/documents/data/en/data-sheets/KL25P80M48SF0.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2016.

ON SEMICONDUCTOR. http://www.onsemi.com/pub_link/Collateral/MJE340-D.PDF. Acesso em: 29 nov. 2016.

PUC, M. et al. Techniques of generation required for electropermeabilization. Survey of electropermeabilization devices. **Bioelectrochemistry**, 2004. 113-124.

RAMOS, A. Effect of the Electroporation in the Field Calculation in Biological Tissues. **Artificial Organs**, v. 29, p. 510-513, 2005.

RAMOS, A. **Eletromagnetismo**. São Paulo: Blucher, 2016.

RAMOS, A. et al. Sinusoidal Signal Analysis of Electroporation in Biological Cells, v. 59, p. 2965-2973, October 2012. ISSN 10.

RAMOS, A.; RAIZER, ; MARQUES, L. B. A New Computational Approach for Electrical Analysis of Biological Tissues. **Bioelectrochemistry**, v. 59, p. 73-84, 2003.

RAMOS, A.; SUZUKI, D. O. H.; MARQUES, J. L. B. Numerical Simulation of Electroporation in Spherical Cells. **Artificial Organs**, 2004. 357-361.

RAMOS, A.; SUZUKI, D. O. H.; MARQUES, J. L. B. Numerical study of the electrical conductivity and polarization in a suspension of spherical cells. **Bioelectrochemistry**, v. 68, p. 213-217, 2006.

RAMOS, A.; SUZUKI, O. H. Computational Approach for Electrical Analysis of Biological Circuit Model. In: MIKLAVCIC, D. **Handbook**. [S.l.]: [s.n.], 2016.

SCHWAN, H. P. Electrode Polarization Impedance and Measurements in Biological Materials. **Annals of the New York Academic of Sciences**, v. 148, p. 191-209, 1968.

SCOTT-TAYLOR, T. H. et al. Human tumour and dendritic cell hybrids generated by electrofusion: potential for cancer vaccines. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1500, p. 265-279, 2000.

SERSA, G.; CEMAZAR, ; SNOJ, M. **Electrochemotherapy of Solid Tumors - Preclinical and Clinical Experience**. 33rd Annual International Conference of the IEEE EMBS. Boston: [s.n.]. 2011. p. 728-731.

SUZUKI, D. O. H. **Estudo da condutividade elétrica de suspensões de eritrócitos de ratos durante aplicação de campos elétricos intensos: teoria, modelagem e experimentação**. Florianópolis. 2009.

SUZUKI, D. O. H. et al. Numerical Model of Dog Mast Cell Tumor Treated by Electrochemotherapy. **Artificial Organs**, 2015. 192-197.

TEISSEI, J.; ROLS, M. P. An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electroporation. **Biophysical Journal**, v. 65, p. 409-413, 1993.

TEISSIÉ, J. et al. Recent biotechnological developments of electroporation. A prospective review. **Bioelectrochemistry**, v. 55, p. 107-112, 2002.

TEISSIE, J.; GOLZIO, M.; ROLS, M. P. Mechanisms of cell membrane electroporation: A minireview of our present (lack of?) knowledge. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1724, p. 270-280, 2005.

TEKTRONIX. <http://www.tek.com/sites/tek.com/files/media/media/resources/A621-A622-Current-Probes-Datasheet-60W150813.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2016.

TEXAS INSTRUMENTS. <http://www.ti.com/lit/ds/sbos177d/sbos177d.pdf>. Acesso em: 29 nov. 2016.

TOZON, ; TAMZALI, ; CEMAZAR, M. Electrochemotherapy in Veterinary Oncology. In: MIKLAVCIC, D. **Handbook of Electroporation**. [S.l.]: Springer, v. 1, 2016. p. 1-15.

TSONG, T. Y. Electroporation of cell membranes. **Biophysical Journal**, v. 60, p. 297-306, August 1991.

WEAVER, C.; CHIZMADZHEV, Y.. Theory of electroporation: A review. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 41, p. 135-160, March 1996.

ZEIRA, M. et al. Full-length CD4 Electroinserted in the Erythrocyte Membrane as a Long-lived Inhibitor of Infection by Human Immunodeficiency Virus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 88, p. 4409-4413, 1991.