

UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS – CCT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA – PPGEEL

RODOLFO LAURO WEINERT

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

JOINVILLE

2020

RODOLFO LAURO WEINERT

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

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica do Centro de Ciências Tecnológicas da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Elétrica.

Orientador: Ailton Ramos

Joinville

2020

Weinert, Rodolfo Lauro
Estudo Experimental e Computacional de
Eletropermeabilização de Tecidos Biológicos / Rodolfo
Lauro Weinert. - Joinville, 2020.
119 p.

Orientador: Airton Ramos

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Tecnológicas, Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, Joinville, 2020.

1. Eletropermeabilização biológica. 2. Modelo
dinâmico. 3. Simulação numérica. 4. Tecidos de coelho.
5. Fígado de rato. 6. Memória da eletropermeabilização
I. Ramos, Airton . II. Universidade do Estado de Santa
Catarina, Centro de Ciências Tecnológicas, Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Elétrica. III. Título

RODOLFO LAURO WEINERT

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

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica do Centro de Ciências Tecnológicas da Universidade do Estado de Santa Catarina, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Elétrica.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Airton Ramos, Dr.
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Membros:

Prof. Carlos Toshiyuki Matsumi, Dr.
Instituto Federal de Santa Catarina - IFSC

Prof. Celso José Faria de Araujo, Dr.
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Prof. Cíntia Aguiar, Dra.
Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC

Prof. Daniela Ota Hisayasu Suzuki, Dra.
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Prof. Raimes Moraes, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Joinville, 15 de setembro de 2020

*Este trabalho é dedicado a todas as pessoas que sofreram e sofrem pelo câncer,
em especial ao meu querido avô Douglas.*

AGRADECIMENTOS

Ao longo desses 10 anos, graduação, mestrado e doutorado, muitas pessoas passaram pela minha vida e contribuíram com meu desenvolvimento. A todas elas o meu muito obrigado.

A Deus pela Vida.

Ao professor Airton Ramos, pela orientação e ensinamentos.

Aos colegas Lucas Becker, Marcel Augusto Knabben e Luana Adamek pela ajuda nos experimentos e confecção do eletropermeabilizador.

Aos Professores Eduardo Manuel e Christian Evangelista Garcia pelo auxílio na elaboração do documento para o comitê de ética em uso animal e pelo fornecimento do material biológico.

Aos alunos do curso de Medicina da UNIVILLE, em especial ao Geraldo e João pela extração dos tecidos biológicos.

A Betinha funcionária do laboratório de técnica operatória, pela disposição em ajudar e amizade.

Ao pessoal da limpeza, em especial as minhas amigas Sandra e Edenir, pela amizade.

Ao Laboratório de Eletromagnetismo, pela infraestrutura laboratorial.

À CAPES, pela manutenção da bolsa de doutorado.

Ao MEC/SESu e FNDE.

À UDESC.

À minha família, em especial a minha esposa Maria Eloize, por tudo.

“A maior felicidade é aquela que o dinheiro não pode comprar.”

RESUMO

A eletropermeabilização biológica é um fenômeno de abertura de poros na membrana celular, quando exposta a campos elétricos intensos. Apesar de modelos matemáticos terem sido expostos desde as últimas décadas, ainda são necessários esforços para a obtenção de um modelo que represente do ponto de vista matemático e físico a intensa variação da condutividade do tecido durante a ocorrência desse fenômeno. Esta tese valida um modelo dinâmico para eletropermeabilização de tecidos biológicos, onde foram realizadas simulações computacionais comparadas com resultados experimentais. Para a simulação foram utilizados dois métodos de cálculos: Método do Circuito Equivalente -MCE e Método dos Elementos Finitos -MEF. No MCE foi incluído a dispersão dielétrica presente nos tecidos biológicos. Um eletropermeabilizador capaz de atingir 800 V foi desenvolvido e um sistema de aquisição de dados para salvar os dados de tensão e corrente que circulam pela amostra durante a aplicação de campo elétrico intenso. Para a obtenção dos dados experimentais foram utilizados os seguintes tecidos biológicos: coração, rim e fígado de coelho e o fígado de rato. Foram utilizados protocolos de pulsos de tensão e rampas de tensão. As propriedades do tecido intacto foram obtidos com o uso de um analisador de impedância da Agilent® modelo 4294A. Com o uso do algoritmo genético foram obtidos os parâmetros de dispersão da banda β do modelo de Cole-Cole. Houve boa concordância entre os resultados simulados e experimentais com erros médios abaixo de 15% para o MCE, com os resultados simulados dentro do desvio padrão experimental. Apenas para o protocolo com frequência fundamental de 50 kHz a simulação realizada pelo MEF sendo utilizado o *software* comercial COMSOL Multiphysics® não representou de maneira correta a corrente atingindo erros de 50%. A justificativa para o erro encontrado é devido a dispersão dielétrica que não foi incluída no cálculo da corrente nesse simulador. Experimentos para obter o tempo de recuperação dos poros da membrana foram realizados, sendo obtidos valores entre 1 s a 10 s. Conclui-se que o modelo dinâmico da eletropermeabilização para tecidos biológicos apresenta características que permitem a correta simulação computacional do fenômeno nos tecidos utilizados. Assim, o próximo passo é a utilização do presente modelo em aplicações clínicas.

Palavras-chave: Eletropermeabilização biológica. modelo dinâmico. simulação numérica. tecidos de coelho. fígado de rato. memória da eletropermeabilização.

ABSTRACT

Biological electroporation is a phenomenon of opening pores in the cell membrane when exposed to intense electric fields. Although mathematical models have been exposed since the last, they are still necessary to use a model that represents the mathematical and physical point of view, with intense variation in the conductivity of the tissue during the occurrence of this phenomenon. This thesis validates a dynamic model for electroporation of biological tissues, where computer simulations were performed compared to experimental results. For the simulation, two calculation methods were used: Equivalent Circuit Method -ECM and Finite Element Method -FEM. In the ECM, the dielectric dispersion present in biological tissues was included. An electroporation system capable of reaching 800 V was developed and a data acquisition system to save the voltage and current data that circulates through the sample during the application of an intense electric field. For obtaining the experimental data, the following biological tissues were used: heart, kidney and rabbit liver and rat liver. Voltage pulse protocols and voltage ramps were used. The properties of the intact tissue were obtained using an Agilent® model 4294A impedance analyzer. Using the genetic algorithm, the dispersion parameters of the β band of the Cole-Cole model were obtained. There was good agreement between the simulated and experimental results with mean errors below 15 % for the MCE, with the simulated results within the experimental standard deviation. Only for the protocol with fundamental frequency of 50 kHz, the simulation performed by the FEM using the commercial software COMSOL Multiphysics® did not correctly represent the current reaching errors of 50 %. The justification for the error found is due to the dielectric dispersion that was not included in the current calculation in this simulator. Experiments to obtain the recovery time of the membrane pores were performed, with values between 1 s and 10 s being obtained. It is concluded that the dynamic model of electroporation for biological tissues has characteristics that allow the correct computational simulation of the phenomenon in the tissues used. Thus, the next step is to use the present model in clinical applications.

Keywords: Biological electroporation. dynamic model. numerical simulation. rabbit tissues. rat liver. memory of electroporation .

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Constante dielétrica do coração, rim e fígado de origem bovina.	26
Figura 2 – Condutividade do coração, rim e fígado de origem bovina.	26
Figura 3 – Efeitos da eletropermeabilização na membrana celular.	27
Figura 4 – Modelo simplificado de uma célula com espessura da membrana h , raio a , θ é o ângulo entre a direção do campo elétrico e o vetor normal à superfície da membrana e E_o é o campo aplicado.	30
Figura 5 – a) Poro hidrofóbico. b) Poro hidrofílico.	31
Figura 6 – Modelo geométrico para obtenção do circuito equivalente do material. V_m e V_n são os potenciais nos centros dos elementos m e n , respectivamente e i_{nm} é a corrente elétrica entre os volumes diferenciais.	43
Figura 7 – Circuito equivalente para um meio linear, homogêneo e sem dispersão dielétrica.	44
Figura 8 – Circuito equivalente para uma dispersão de primeira ordem.	44
Figura 9 – Circuito equivalente para um material biológico com dispersões de primeira ordem.	45
Figura 10 – Esquema de discretização espacial para aplicação da modelagem pelo circuito equivalente.	46
Figura 11 – Esquemático do Eletropermeabilizador desenvolvido. A fonte de alimentação fornece energia tanto para o conversor quanto para conversor isolado que irá alimentar o <i>driver</i> de acionamento da chave IGBT. . .	54
Figura 12 – Protótipo do eletropermeabilizador construído. 1) Fonte de alimentação com retificação de ponte completa; 2) Conversor DC-DC (16 V-800 V); 3) <i>Driver</i> de acionamento do IGBT; 4) Chave IGBT; 5) Sistema de medição de tensão e corrente e condicionamento de sinais; 6) Filtros analógicos RL na alimentação DC; 7) Plataforma NUCLEO F303K8. .	55
Figura 13 – Esquemático dos sensores de tensão e corrente. Foram utilizados resistores de filme de carbono.	56
Figura 14 – Eletrodos utilizados na aplicação de campo elétrico.	58
Figura 15 – Circuito equivalente para um material biológico com dispersões de primeira ordem com inclusão da eletropermeabilização	63
Figura 16 – Condutividade e constante dielétrica do coração de coelho	67
Figura 17 – Condutividade e constante dielétrica do rim de coelho	67
Figura 18 – Condutividade e constante dielétrica do fígado de coelho	68
Figura 19 – Condutividade e constante dielétrica do fígado de rato	69

Figura 20 – Forma de onda das correntes experimentais e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para amostras de fígado de coelho estimuladas com o protocolo de 5 kHz (Protocolo A), e eletrodos de agulhas. Os índices a), b) e c) são os resultados para os campos elétricos de 370 V/cm, 926 V/cm e 1481 V/cm respectivamente	72
Figura 21 – Forma de onda das correntes experimentais e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para amostras de fígado de coelho estimuladas com o protocolo de 50 kHz (Protocolo B), e eletrodos de agulhas. Os índices a), b) e c) são os resultados para os campos elétricos de 370 V/cm, 926 V/cm e 1481 V/cm respectivamente	74
Figura 22 – Erros percentuais por pulso no cálculo da corrente obtida por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para amostras de fígado de coelho estimuladas pelo protocolo de 5 kHz (protocolo A) em a) e pelo protocolo de 50 kHz (protocolo B) em b)	76
Figura 23 – Médias das condutividades de eletropermeabilização de amostras de fígado de coelho como função do tempo na sequência de 10 pulsos para os campos elétricos de 370 V/cm, 926 V/cm e 1481 V/cm. Protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) apresentados em a) e b) respectivamente	77
Figura 24 – Região espacial para o cálculo da condutividade de eletropermeabilização média. Os eletrodos não fazem parte dessa região	78
Figura 25 – Curvas de nível de σ_p para amostras de fígado de coelho estimulada com 1481 V/cm com eletrodos de agulhas ao final do protocolo de 5 kHz (protocolo A). É destacado as posições do par de eletrodos de agulhas	79
Figura 26 – Distribuição de temperatura experimental e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® na superfície da amostra de fígado de coelho estimulada com 926 V/cm do protocolo de 5 kHz (protocolo A). Os índices a) e b) se referem aos <i>Eixos 1 e 2</i> respectivamente	80
Figura 27 – Distribuição de temperatura experimental e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® na superfície da amostra de fígado de coelho estimulada com 1481 V/cm do protocolo de 5 kHz (protocolo A). Os índices a) e b) se referem aos <i>Eixos 1 e 2</i> respectivamente	81
Figura 28 – Forma de onda das correntes experimentais e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para amostras de fígado de coelho estimuladas com o Protocolo C) com eletrodos de agulhas com os tempos de subida das rampas de 100 μ s a), 500 μ s b) e 800 μ s c)	83

Figura 29 – Forma de onda das correntes experimentais e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para amostras de fígado de coelho estimuladas com o Protocolo C) com eletrodos de placas circulares paralelas com os tempos de subida das rampas de 100 μs a), 500 μs b) e 800 μs c)	84
Figura 30 – Forma de onda das correntes simuladas no MCE versus campo elétrico para amostras de fígado de coelho estimuladas com o Protocolo C) com eletrodos de agulhas paralela em a) e placas paralelas circulares em b).	85
Figura 31 – Distribuição de campo elétrico ao final da rampa de 100 μs obtidas pelo programa MCE. a) eletrodos de agulhas e b) eletrodos de placas paralelas	86
Figura 32 – Forma de onda das correntes experimentais e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para amostras de coração de coelho estimuladas com o protocolo de 5 kHz (Protocolo A), e eletrodos de agulhas. Os índices a), b) e c) são os resultados para os campos elétricos de 370 V/cm, 926 V/cm e 1481 V/cm respectivamente	88
Figura 33 – Forma de onda das correntes experimentais e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para amostras de coração de coelho estimuladas com o protocolo de 50 kHz (Protocolo B), e eletrodos de agulhas. Os índices a), b) e c) são os resultados para os campos elétricos de 370 V/cm, 926 V/cm e 1481 V/cm respectivamente	89
Figura 34 – Erros percentuais por pulso no cálculo da corrente obtida por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para amostras de coração de coelho estimuladas pelo protocolo de 5 kHz (protocolo A) em a) e pelo protocolo de 50 kHz (protocolo B) em b)	90
Figura 35 – Médias das condutividades de eletropermeabilização de amostras de coração de coelho como função do tempo na sequência de 10 pulsos para os campos elétricos de 370 V/cm, 926 V/cm e 1481 V/cm. Protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) apresentados em a) e b) respectivamente	91
Figura 36 – Distribuição de temperatura experimental e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® na superfície da amostra de coração de coelho estimulada com 926 V/cm do protocolo de 5 kHz (protocolo A). Os índices a) e b) se referem aos <i>Eixos 1 e 2</i> respectivamente	92
Figura 37 – Distribuição de temperatura experimental e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® na superfície da amostra de coração de coelho estimulada com 1481 V/cm do protocolo de 5 kHz (protocolo A). Os índices a) e b) se referem aos <i>Eixos 1 e 2</i> respectivamente	92

Figura 38 – Forma de onda das correntes experimentais e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para amostras de rim de coelho estimuladas com o protocolo de 5 kHz (Protocolo A), e eletrodos de agulhas. Os índices a), b) e c) são os resultados para os campos elétricos de 370 V/cm, 926 V/cm e 1481 V/cm respectivamente	94
Figura 39 – Forma de onda das correntes experimentais e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para amostras de rim de coelho estimuladas com o protocolo de 50 kHz (Protocolo B), e eletrodos de agulhas. Os índices a), b) e c) são os resultados para os campos elétricos de 370 V/cm, 926 V/cm e 1481 V/cm respectivamente	95
Figura 40 – Erros percentuais por pulso no cálculo da corrente obtida por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para amostras de rim de coelho estimuladas pelo protocolo de 5 kHz (protocolo A) em a) e pelo protocolo de 50 kHz (protocolo B) em b. Em b) as curvas do COMSOL Multiphysics® devem ser multiplicada pelo fator 5 e 10	97
Figura 41 – Médias das condutividades de eletropermeabilização de amostras de rim de coelho como função do tempo na sequência de 10 pulsos para os campos de 370 V/cm, 926 V/cm e 1481 V/cm. Protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) apresentados em a) e b) respectivamente	98
Figura 42 – Distribuição de temperatura experimental e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® na superfície da amostra de rim de coelho estimulada com 926 V/cm do protocolo de 5 kHz (protocolo A). Os índices a) e b) se referem aos <i>Eixos 1 e 2</i> respectivamente	99
Figura 43 – Distribuição de temperatura experimental e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® na superfície da amostra de rim de coelho estimulada com 1481 V/cm do protocolo de 5 kHz (protocolo A). Os índices a) e b) se referem aos <i>Eixos 1 e 2</i> respectivamente	99
Figura 44 – Percentual de área dos tecidos de coelho cuja a condutividade de eletropermeabilização é superior ao dobro da condutividade estática na superfície da amostra e ao final do protocolo de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B). Área de simulação no programa MCE $98 \mu m^2$ (9,9mm x 9,9mm). Protocolo A) e B) apresentado nos índices a) e b) respectivamente.	100

Figura 45 – Forma de onda das correntes experimentais e obtidas por simulação com o programa MCE para amostras de fígado de rato estimuladas com o protocolo de 1 kHz (protocolo E). Os índices a), b) e c) são os resultados para os campos elétricos de 714 V/cm, 1071 V/cm e 1428 V/cm respectivamente	102
Figura 46 – Erros percentuais por pulso no cálculo da corrente obtida por simulação com o programa MCE para amostras de fígado de rato estimulada pelo protocolo de 1 kHz (protocolo E)	103
Figura 47 – Comportamento da forma de onda de corrente com a variação dos parâmetros: a) σ_t , b) τ_{min} , c) $\Delta\tau$, d) E_1 e e) E_2 . A Tabela 16 apresenta os valores dos parâmetros utilizados em cada simulação.	105
Figura 48 – Forma de onda da corrente para amostras de fígado de rato para o primeiro e segundo pulso com o tempo entre pulsos de: a) 1 ms b) 6s. Pulso com a largura de aproximadamente 500 μs	106
Figura 49 – Diferença percentual entre a média (3 amostras) da corrente de dois pulsos separados pelo intervalo de tempo indicado no gráfico. Campo elétrico de 1333 V/cm aplicado com eletrodos de placas paralelas circulares. As barras indicam o desvio padrão.	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Parâmetros do modelo de dispersão	25
Tabela 2 –	Parâmetros do modelo térmico	64
Tabela 3 –	Parâmetros do modelo de dispersão obtidos com o Algoritmo Genético para amostras de tecido de coelho. Os parâmetros são apresentados em Média \pm Desvio Padrão, os termos com * são referentes as amostras dos <i>Dados 2</i>	68
Tabela 4 –	Aumento percentual da corrente elétrica experimental, o termo P12 indica o aumento percentual da corrente ao final do segundo pulso em relação ao primeiro, a mesma lógica é aplicada aos demais termos. O termo Pa é o aumento percentual acumulado ao longo dos pulsos, obtido pela soma algébrica dos aumentos percentuais. Fíg é a abreviação de Fígado. Os índices a) e b) se referem as curvas dos protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) respectivamente	71
Tabela 5 –	Aumento percentual da corrente simulada com eletropermeabilização em relação a corrente simulada sem eletropermeabilização ao final do primeiro pulso para amostras de fígado de coelho. Os índices a) e b) se referem as curvas dos protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) respectivamente	71
Tabela 6 –	Parâmetros do modelo de eletropermeabilização para amostras fígado de coelho, que minimizam o erro entre as curvas numéricas e experimentais. Os índices a) e b) se referem aos protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) respectivamente	78
Tabela 7 –	Erro médio entre as curvas de correntes experimentais e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para o Protocolo C). Os índices (*) e (+) se referem aos experimentos com eletrodos de agulha e placas paralelas circulares respectivamente	82
Tabela 8 –	Parâmetros do modelo de eletropermeabilização para amostras de fígado de rato estimuladas com o Protocolo C). Os índices (*) e (+) se referem aos experimentos com eletrodos de agulha e placas paralelas circulares respectivamente	85
Tabela 9 –	Aumento percentual da corrente elétrica experimental, o termo P12 indica o aumento percentual da corrente ao final do segundo pulso em relação ao primeiro, a mesma lógica é aplicada aos demais termos. O termo Pa é o aumento percentual acumulado ao longo dos pulsos. Cor é a abreviação de Coração. Os índices a) e b) se referem as curvas dos protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) respectivamente	87

Tabela 10 – Aumento percentual da corrente simulada com eletropermeabilização em relação a corrente simulada sem eletropermeabilização ao final do primeiro pulso para amostras de coração de coelho. Os índices a) e b) se referem as curvas dos protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) respectivamente	87
Tabela 11 – Parâmetros do modelo de eletropermeabilização para amostras de coração de coelho. Os índices a) e b) se referem aos protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) respectivamente	88
Tabela 12 – Aumento percentual da corrente elétrica experimental para amostras de rim de coelho, o termo P12 indica o aumento percentual da corrente ao final do segundo pulso em relação ao primeiro, a mesma lógica é aplicada aos demais termos. O termo Pa é o aumento percentual acumulado ao longo dos pulsos. Os índices a) e b) se referem as curvas dos protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) respectivamente	93
Tabela 13 – Aumento percentual da corrente simulada com eletropermeabilização em relação a corrente simulada sem eletropermeabilização ao final do primeiro pulso para amostras de rim de coelho. Os índices a) e b) são relacionados aos protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) respectivamente	93
Tabela 14 – Parâmetros do modelo de eletropermeabilização para amostras de rim de coelho. Os índices a) e b) se referem aos protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) respectivamente.	96
Tabela 15 – Parâmetros do modelo de eletropermeabilização para amostras de fígado de Rato	101
Tabela 16 – Valores dos parâmetros do modelo utilizados para a análise de sensibilidade	104
Tabela 17 – Diferença percentual entre as correntes de dois pulsos consecutivos para tecidos de coelho	107

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
1.1	MOTIVAÇÃO	18
1.2	IDENTIFICAÇÃO DO PROBLEMA	18
1.3	OBJETIVOS	19
1.4	CONTRIBUIÇÕES PARA O TEMA	20
1.5	ESTRUTURA DO TRABALHO	20
1.6	ARTIGOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS	20
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	22
2.1	DISPERSÃO DIELÉTRICA EM TECIDOS BIOLÓGICOS	22
2.1.1	Polarização de dupla camada iônica	22
2.1.2	Polarização Interfacial	23
2.1.3	Relaxação Dipolar	23
2.1.4	Modelos de Dispersão Dielétrica em Tecidos Biológicos	24
2.2	ELETROPERMEABILIZAÇÃO BIOLÓGICA	27
2.2.1	Modelos da eletropermeabilização no nível celular	29
2.2.2	Modelos da Eletropermeabilização em Tecidos	35
2.2.3	Técnicas experimentais de caracterização da eletropermeabilização em células e tecidos	39
2.2.4	Limiar de eletropermeabilização biológica em tecidos	41
2.2.5	Métodos numéricos para a caracterização da eletropermeabilização em células e tecidos	42
3	MODELO DE ELETROPERMEABILIZAÇÃO	50
4	SISTEMA DESENVOLVIDO PARA TESTE DE ELETROPERMEABILIZAÇÃO	53
4.1	ELETROPERMEABILIZADOR	53
4.1.1	Eletropermeabilizador Desenvolvido	53
4.1.2	Sensores de Tensão e Corrente	53
4.1.3	Aquisição de dados	54
4.1.4	Leitura da temperatura	56
5	AMOSTRAS BIOLÓGICAS E PROTOCOLO DE ELETROPERMEABILIZAÇÃO	57
5.1	AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE COELHOS	57
5.2	AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE RATOS	59
5.3	MEMÓRIA DA ELETROPERMEABILIZAÇÃO	59

5.4	PROPRIEDADES DO TECIDO INTACTO	60
5.5	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS COM AS AMOSTRAS DE TECIDOS BIOLÓGICOS	61
6	SIMULAÇÃO	62
6.1	IMPLEMENTAÇÃO DO MODELO NO MCE	62
6.2	IMPLEMENTAÇÃO DO MODELO NO COMSOL MULTIPHYSICS®	64
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
7.1	ESPECTROS DE CONDUTIVIDADE E CONSTANTE DIELÉTRICA	66
7.1.1	Amostras de tecido de coelho	66
7.1.2	Amostras de fígado de rato	69
7.2	CURVAS EXPERIMENTAIS E SIMULADAS DA ELETROPERMEA- BILIZAÇÃO EM COELHOS E RATOS	69
7.2.1	Amostras de tecido de fígado de coelho	70
7.2.2	Amostras de tecido de coração de coelho	86
7.2.3	Amostras de tecido de rim de coelho	93
7.2.4	Comparação da eletropermeabilização biológica em tecidos de coelho .	100
7.2.5	Amostras de tecido de fígado de rato	101
7.2.6	Análise dos parâmetros do modelo de eletropermeabilização	103
7.2.7	Efeito da Memória de Eletropermeabilização	106
8	CONCLUSÃO	109
	REFERÊNCIAS	113

1 INTRODUÇÃO

Neste tópico são tratados os principais itens para o desenvolvimento do tema dessa tese. A motivação para a pesquisa, a identificação do problema a ser tratado, o objetivo que se pretende alcançar, as contribuições para o tema e a estrutura do trabalho são apresentadas a seguir.

1.1 MOTIVAÇÃO

A aplicação de campos elétricos intensos sobre tecidos biológicos ou em células em suspensão provoca a abertura de poros hidrofílicos na membrana celular, permitindo a troca de substâncias entre os meios intracelular e extracelular (GOLDBERG et al., 2018), esse fenômeno é chamado de eletropermeabilização ou eletroporação.

A eletropermeabilização biológica possui aplicações em diversas áreas como oncologia, biologia, medicina e bioquímica (KOTNIK et al., 2019). O uso de tal fenômeno possibilitou um grande avanço nessas áreas facilitando: a extração e transferências de DNA e proteínas (RAMAMOORTHY; NARVEKAR, 2015), (RAMOS; SCHNEIDER, 2012), a entrada de quimioterápicos para o interior da célula aumentando a eficiência das drogas (ESMAEILI; FRIEBE, 2019); desenvolvimento de vacinas (SCOTT-TAYLOR et al., 2000) e na destruição de microrganismos com a eletropermeabilização irreversível (ANDREOU et al., 2017).

Este trabalho tem como finalidade principal contribuir para a modelagem do comportamento elétrico de um tecido biológico durante o evento da eletropermeabilização, propondo modelos e métodos para se obter estimativas confiáveis da distribuição de campo elétrico, corrente elétrica e condutividade em tecidos eletropermeabilizados por meio de simulações computacionais.

1.2 IDENTIFICAÇÃO DO PROBLEMA

A eletropermeabilização biológica é conhecida há várias décadas, sendo que muitos aspectos experimentais para a caracterização da amostra foram explorados como: o uso da microscopia de rápido congelamento em eritrócitos humanos (CHANG; REESE, 1990), marcadores fluorescentes sensíveis a tensão (KINOSITA et al., 1988), transferência de marcadores iônicos e macromoléculas para o meio intracelular (MIR; BANOUN; PAOLETTI, 1988), (MAČEK-LEBAR; MIKLAVČIČ, 2001), protocolos para aplicações clínicas (MIKLAVČIČ et al., 2014). Apesar da obtenção de diversos resultados experimentais até o momento, a modelagem matemática e física dos fenômenos envolvidos ainda se mostra complexo. Tal fato deve-se ao tempo de abertura de poros serem da ordem de microssegundos e a dimensão dos poros de nanômetros (SUZUKI, 2009), além do fato de

que tecidos biológicos possuem intensa dispersão dielétrica (RAMOS; WEINERT, 2017).

O principal problema na eletropermeabilização biológica consiste na modelagem dinâmica do fenômeno. No trabalho de Ramos e Weinert (2017) (RAMOS; WEINERT, 2017) é apresentado um modelo dinâmico; contudo, os autores apresentam resultados para um único pulso. Weinert et al. (2019) (WEINERT; PEREIRA; RAMOS, 2019) propõe um ajuste dinâmico dos parâmetros do modelo proposto por Ramos e Weinert (2017) para obter boa concordância entre os resultados experimentais e computacionais para uma sequência de pulsos; contudo, tal ajuste gerou mais parâmetros e tornou o modelo complexo. O modelo proposto por Langus et al. (2016) (LANGUS et al., 2016) não possui nenhuma base teórica ou experimental pelo qual as equações foram escolhidas para modelar o fenômeno de eletropermeabilização. Já o modelo proposto por Voyer et al. (2018) (VOYER et al., 2018) também é válido para apenas um único pulso.

Outro aspecto secundário, é o aumento da temperatura durante a ocorrência do fenômeno de eletropermeabilização. Vários trabalhos utilizam a equação de transferência de calor para a simulação (DAVALOS; RUBINSKY; MIR, 2003), (GARCIA; DAVALOS; MIKLAVCIC, 2014). Contudo há pouca comparação com dados experimentais.

1.3 OBJETIVOS

O objetivo geral da tese é mostrar que o modelo dinâmico proposto por Ramos e Weinert (2017) representa o fenômeno da eletropermeabilização biológica com explicação física e matemática dos parâmetros obtidos. Os objetivos secundários corroboram para o êxito do objetivo geral:

- Desenvolver circuitos eletrônicos para estimular tecidos biológicos com pulsos de até 800 V e medir a impedância da amostra durante a eletropermeabilização.
- Avaliar a aplicação do modelo de eletropermeabilização em diversos tipos de tecidos biológicos.
- Realizar a medição experimental da temperatura na superfície da amostra do tecido biológico, a fim de comparar com os resultados simulados a partir da equação de transferência de calor.
- Realizar simulações tridimensionais utilizando o Método de Circuito Equivalente e o Método dos Elementos Finitos de modo a compatibilizar o modelo proposto com os resultados experimentais obtidos.
- Obter o conjunto de parâmetros que minimizam o erro entre as curvas de corrente experimentais e simuladas.

1.4 CONTRIBUIÇÕES PARA O TEMA

Na literatura, os modelos de eletropermeabilização presentes não representam de maneira realista os processos de eletropermeabilização biológica que possuem as seguintes características : a intensa variação da condutividade, o efeito de memória da eletropermeabilização, o aumento da temperatura e o efeito da intensa dispersão dielétrica presente nos tecidos biológicos. Com o auxílio de um modelo dinâmico da eletropermeabilização, será possível realizar uma predição da variação da condutividade do tecido, distribuição de campo elétrico, volume de tecido permeabilizado, bem como o aumento da temperatura na região, auxiliando na elaboração de protocolos para o tratamento do câncer, por exemplo. Assim, a contribuição para o tema consiste em demonstrar que o modelo proposto por Ramos e Weinert (2017) representa as características do fenômeno de eletropermeabilização biológica em tecidos. Assim o mesmo poderá ser utilizado na predição da região permeabilizada auxiliando médicos e veterinários na aplicação da eletroquimioterapia.

Outro aspecto pouco relatado na literatura é o tempo de fechamento dos poros na membrana celular, há trabalhos para células isoladas, mas não para tecidos. Esta tese apresenta uma metodologia para obter o tempo de recuperação dos poros em tecidos biológicos.

1.5 ESTRUTURA DO TRABALHO

O trabalho está dividido em 8 capítulos. Inicialmente, no capítulo 1, é apresentado a motivação para o trabalho, identificação do problema e os objetivos. No capítulo 2, é apresentado a fundamentação teórica com os principais conceitos sobre o assunto a ser estudado. No capítulo 3, é apresentado e discutido o modelo de eletropermeabilização proposto. O capítulo 4 mostra o eletropermeabilizador desenvolvido e o sistema de aquisição de dados. O capítulo 5 apresenta a preparação das amostras biológicas utilizadas, bem como os protocolos de estímulo dos tecidos biológicos. No capítulo 6 encontram-se as informações sobre as simulações computacionais. No capítulo 7 são apresentados os resultados obtidos e a discussão. Por fim, o capítulo 8 apresenta as considerações finais do trabalho.

1.6 ARTIGOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS

O estudo realizado durante o tempo da tese resultou nos seguintes trabalhos:

RAMOS A.; WEINERT R. Mathematical and computational method for electrical analysis of biological tissues. *Journal of Computational Electronics*, p. 1-10, set. 2017.

WEINERT, R.; PEREIRA, E.; RAMOS, A. Inclusion of memory effects in a dynamic model of electroporation in biological tissues. *Artificial Organs*, p. 1-6, dez. 2018.

Artigo aceito para publicação na revista Biomedical Signal Processing & Control
sob título Electroporation threshold, conductivity and memory effect in rat liver.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 DISPERSÃO DIELÉTRICA EM TECIDOS BIOLÓGICOS

A dispersão dielétrica em tecidos biológicos ocorre devido à intensa interação de íons alcalinos e halógenos hidratados, mas também devido a relaxação dipolar da água e macromoléculas polares nos fluidos dos tecidos (RAMOS; SUZUKI, 2017). Existem três principais fenômenos que dão origem à dispersão dielétrica em tecidos biológicos na faixa de frequência que se estende de zero a centenas de megahertz: a relaxação resultante da difusão iônica ao redor de células que dão origem à banda alfa com constante de tempo da ordem de milissegundos – Polarização de dupla camada iônica; relaxação devido ao acúmulo de íons na superfície das células que dá origem a banda beta com constante de tempo de microssegundos – Polarização interfacial; e a Relaxação Dipolar associada com macromoléculas que compõem o conteúdo citoplasmático ou extracelular no tecido que dá origem à banda gama com constante de tempo de nanossegundos (FOSTER; SCHWAN, 1995).

2.1.1 Polarização de dupla camada iônica

A dupla camada elétrica é uma região de carga espacial formada na interface entre uma superfície eletricamente carregada e uma nuvem de cargas livres. Nas proximidades da interface a força eletrostática exerce um fenômeno de repulsão para íons de mesmo sinal e atração para íons com sinal contrário (RAMOS, 2016).

A polarização de dupla camada iônica ocorre em baixas frequências influenciando a banda de dispersão α . Pesquisadores mencionaram o fenômeno em sistemas que contêm superfícies carregadas como: macromoléculas de cadeia longa de DNA, emulsões e micro-organismos (FOSTER; SCHWAN, 1995).

A Equação (2.1) apresenta o cálculo da variação da constante dielétrica complexa de uma suspensão de partículas esféricas dielétricas com raio R e fração volumétrica p em um meio com densidade de íons contrários n_o (RAMOS, 2016).

$$\Delta\hat{\epsilon} = \frac{9p}{4\left(1 + \frac{p}{2}\right)^2} \frac{3e^2 R n_o}{2\epsilon_o K_B T} \frac{1}{1 + j\omega\tau_{dif}} \quad (2.1)$$

Onde T é a temperatura absoluta em Kelvin, K_B é a constante de Boltzmann, τ_{dif} é a constante de tempo de relaxação, e é a carga elétrica do próton e ω é a frequência angular do campo elétrico aplicado. Observa-se que a difusão iônica na dupla camada apresenta uma dispersão dielétrica de primeira ordem.

2.1.2 Polarização Interfacial

A polarização interfacial ocorre devido ao acúmulo de cargas na interface entre dois meios com diferentes propriedades elétricas (RAMOS, 2016).

Um modelo bem conhecido da literatura é a suspensão de partículas esféricas diluídas onde a solução possui propriedades elétricas diferentes das partículas, proposto por Maxwell-Wagner. O elo entre a condutividade complexa promediada do composto γ_m e as condutividades complexas no meio dispersor γ_d e da partícula γ_p é dado pela Equação (2.2), onde p é a fração volumétrica das partículas suspensas (RAMOS, 2016).

$$\frac{\gamma_m - \gamma_d}{\gamma_m + 2\gamma_d} = p \frac{\gamma_p - \gamma_d}{\gamma_p + 2\gamma_d} \quad (2.2)$$

Maxwell propôs tal modelo para campos estáticos onde primeiro ele resolveu a equação de Laplace para determinar o campo elétrico ao redor de uma única partícula. Em seguida, calculou a condutividade de uma esfera grande que continha uma imensa quantidade de partículas. Wagner estendeu esta análise para campos variáveis com o tempo, transformando a Equação (2.2) em um conjunto de equações de dispersão. Essa mudança pode ser feita considerando condutividades complexas ao invés de condutividades reais (FOSTER; SCHWAN, 1995). Para obter a variação da condutividade e a constante dielétrica do composto, basta isolar a condutividade complexa γ_m e substituir: $\gamma_p = \sigma_p + j\omega\epsilon_p$ e $\gamma_d = \sigma_d + j\omega\epsilon_d$ (RAMOS, 2016).

$$\sigma_m = \sigma_s + \frac{(\sigma_\infty - \sigma_s)\omega^2\tau_{int}^2}{1 + \omega^2\tau_{int}^2} \quad (2.3)$$

$$\epsilon_m = \epsilon_s + \frac{(\epsilon_\infty - \epsilon_s)}{1 + \omega^2\tau_{int}^2} \quad (2.4)$$

Onde σ_∞ e ϵ_∞ , σ_s e ϵ_s são a condutividade e a permissividade em alta e baixa frequência, respectivamente, ω é a frequência angular e τ_{int} é a constante de tempo de relaxação para a polarização interfacial. As Equações (2.3) e (2.4) apresentam dispersões de Debye, ou seja, de primeira ordem com uma única constante de tempo.

2.1.3 Relaxação Dipolar

A relaxação dipolar ocorre devido a orientação parcial dos dipolos permanentes com o campo aplicado. Em tecidos biológicos o efeito dominante é a relaxação dipolar da água com frequência característica em torno de 20 GHz em 300 K (FOSTER; SCHWAN, 1995).

Ao aplicar campo elétrico sobre uma população de dipolos elétricos, para reduzir a energia potencial do sistema os dipolos tendem a se alinhar com o campo. Todavia, devido a interação com moléculas vizinhas e a agitação térmica, ocorre um espalhamento

dos dipolos moleculares de forma aleatória. Dessa forma, a Equação (2.5) apresenta o cálculo do momento dipolo molecular médio, supõe-se que os dipolos moleculares estão em equilíbrio termodinâmico com o meio ambiente e com o campo elétrico. Considera-se a distribuição de probabilidade de Boltzmann no cálculo do valor médio do dipolo elétrico na direção do campo aplicado (RAMOS, 2016).

$$\langle \vec{p} \rangle = \frac{p_o^2}{3K_B T} \vec{E}_d \quad (2.5)$$

Onde p_o é o momento de dipolo molecular permanente, T é a temperatura em Kelvin, K_B é a constante de Boltzmann e \vec{E}_d é o campo diretor. Com esse resultado, é possível obter a polarização orientacional em regime permanente para um campo constante apresentado na Equação (2.6), onde n_i é o número de dipolos por unidade de volume (RAMOS, 2016).

$$\vec{P}_{ori} = \sum_{i=1}^N \frac{n_i p_{oi}^2}{3K_B T} \vec{E}_d \quad (2.6)$$

Os dipolos moleculares retornam para o estado de espalhamento aleatório quando o campo elétrico é cancelado, levando a polarização a zero. Esse fenômeno é chamado de relaxação dielétrica, cuja relação dinâmica é apresentada na Equação (2.7) (RAMOS, 2016).

$$\frac{d\vec{P}_{ori}}{dt} = \frac{\vec{P}_{ori}(\infty) - \vec{P}_{ori}(t)}{\tau_{ori}} \quad (2.7)$$

Onde τ_{ori} é a constante de tempo de relaxação e $\vec{P}_{ori}(\infty)$ é o valor obtido da Equação (2.6). Esse modelo é aplicado somente em substâncias puras e homogêneas. Para misturas, é necessário considerar vários tempos de relaxação.

2.1.4 Modelos de Dispersão Dielétrica em Tecidos Biológicos

Os mecanismos de dispersão apresentados na seção anterior apresentam modelos matemáticos para calcular as propriedades elétricas do meio. Entretanto, cada mecanismo apresenta dispersão em uma faixa de frequências particular e o espectro de impedância resultante pode ser bastante complexo.

Tecidos biológicos possuem três bandas de dispersões, α , β e γ e outras dispersões de menor intensidade representados pela banda δ (GABRIEL; LAU; GABRIEL, 1996). Devido à heterogeneidade e a superposição de bandas de dispersão individuais, o modelo de Debye geralmente não é adequada para descrever a dispersão dielétrica de um tecido biológico em uma grande faixa de frequências, por exemplo, desde frequências de áudio até frequências das ondas de radio. O modelo empírico de Cole-Cole apresentado na Equação (2.8) é amplamente utilizado para a descrição das propriedades dielétricas de tecidos biológicos devido a utilização de uma distribuição contínua de tempos de relaxação para

representar cada banda de dispersão (GABRIEL; LAU; GABRIEL, 1996).

$$\hat{\varepsilon}(\omega) = \varepsilon_{\infty} + \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_{\infty})}{1 + (j\omega\tau_o)^{1-\alpha}} \quad (2.8)$$

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

A representação das diversas bandas de dispersão pode ser realizada com múltiplos termos da equação de Cole-Cole, conforme é apresentado na Equação (2.9), onde $\Delta\epsilon$ é a magnitude da dispersão da permissividade, ϵ_o é a permissividade do espaço livre, n é o índice referente à banda de dispersão, σ_s é a condutividade estática (GABRIEL; LAU; GABRIEL, 1996).

$$\hat{\varepsilon}(\omega) = \varepsilon_{\infty} + \sum_n \frac{\Delta\varepsilon_n}{1 + (j\omega\tau_n)^{1-\alpha_n}} + \frac{\sigma_s}{j\omega\epsilon_o} \quad (2.9)$$

A Tabela 1 apresenta os parâmetros da Equação (2.9) obtidos por Gabriel et al.(1996) para coração, fígado e rim de origem bovina. As Figuras 1 e 2 apresentam os espectros de constante dielétrica e condutividade construídos com o uso da Equação (2.9) e os dados da Tabela 3.

Tabela 1 – Parâmetros do modelo de dispersão

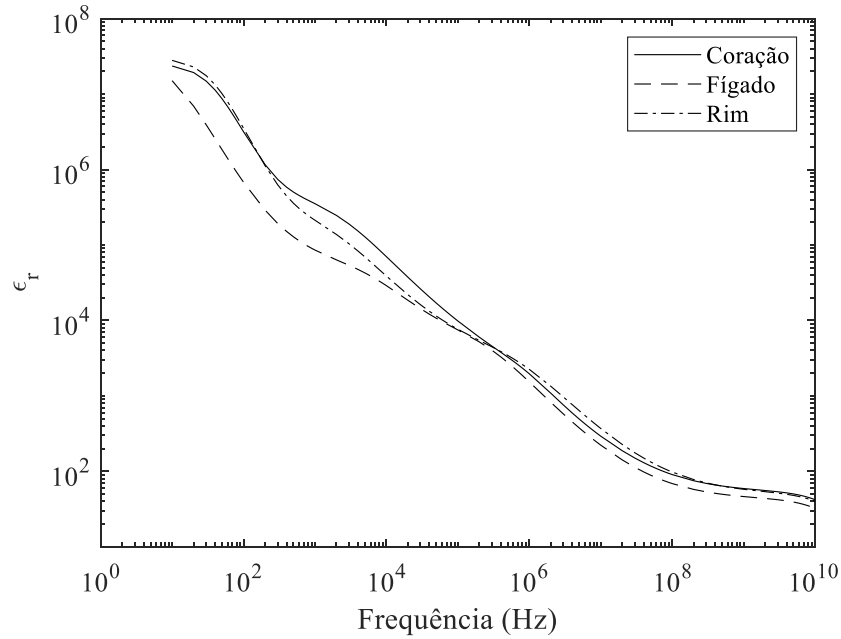
Parâmetros	Coração	Fígado	Rim
σ_s (S/m)	0,05	0,02	0,05
α_4	0	0,05	0
τ_4 (ms)	4,547	15,915	4,547
$\Delta\varepsilon_4$	2,5x10 ⁷	3,0x10 ⁷	3,0x10 ⁷
α_3	0,22	0,20	0,22
τ_3 (μ s)	72,34	22,74	79,58
$\Delta\varepsilon_3$	4,5x10 ⁵	5,0x10 ⁴	2,5x10 ⁵
α_2	0,05	0,20	0,22
τ_2 (ns)	159,15	530,52	198,94
$\Delta\varepsilon_2$	1200	6000	3500
α_1	0,1	0,1	0,1
τ_1 (ps)	7,96	8,84	7,96
$\Delta\varepsilon_1$	50	39	47
ε_{∞}	4	4	4

Fonte: Retirado de (GABRIEL; LAU; GABRIEL, 1996).

Na literatura, os principais trabalhos que apresentam os espectros de impedância de vários tecidos são do grupo de Gabriel do departamento de física do *College King's*, onde os autores apresentam uma série de 3 artigos: *The dielectric properties of biological tissues: I. Literature Survey*, *The dielectric properties of biological tissues: II. Measurements in frequency range 10 Hz to 20 GHz* e *The dielectric properties of biological tissues:*

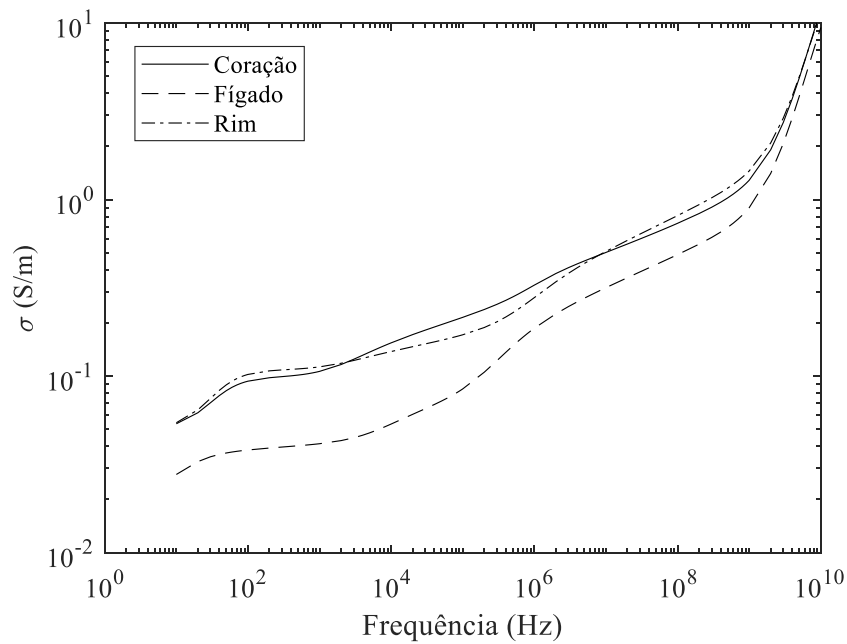
III. *Parameters models for the dielectric spectrum of tissues.* Além disso, há um site: <http://niremf.ifac.cnr.it/tissprop/htmlclie/htmlclie.php> sob propriedade de um grupo de pesquisa italiano que também disponibiliza as propriedades dos tecidos.

Figura 1 – Constante dielétrica do coração, rim e fígado de origem bovina.



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

Figura 2 – Condutividade do coração, rim e fígado de origem bovina.



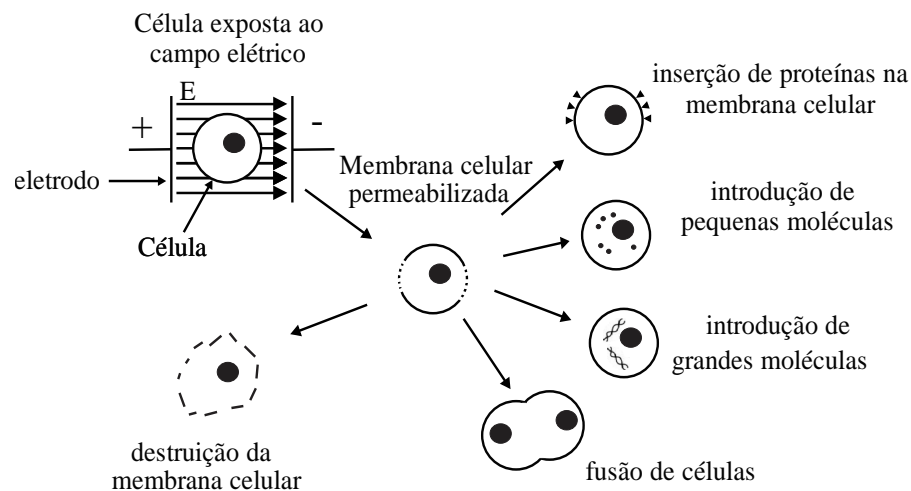
Fonte: (GABRIEL; LAU; GABRIEL, 1996).

2.2 ELETROPERMEABILIZAÇÃO BIOLÓGICA

A eletropermeabilização biológica é um fenômeno de abertura de poros na membrana celular, quando exposta a campos elétricos de alta intensidade. O campo elétrico aplicado sobre o tecido biológico provoca a movimentação dos íons para as proximidades da parede celular (membrana), elevando o potencial transmembrana (V_m). A eletropermeabilização biológica reversível ocorre quando V_m atinge valores entre 200 mV e 1 V. Caso V_m ultrapasse 1 V, a membrana celular não se recupera e o processo é irreversível, levando à morte celular (Yao et al., 2017). Para tecidos, é necessário um campo elétrico mínimo para a ocorrência da eletropermeabilização.

A eletropermeabilização biológica possui aplicações em diversas áreas, dentre elas: medicina, biologia, bioquímica, farmácia e processamento de alimentos (GOLDBERG et al., 2018). Dependendo do campo elétrico aplicado em células ou tecidos, diferentes efeitos da eletropermeabilização ocorrem na membrana celular. Assim, ao controlar a intensidade de campo elétrico surgem diversas possibilidades de aplicação como: inserção de proteínas na membrana celular, introdução de pequenas moléculas, introdução de grandes moléculas e a destruição da membrana celular. A Figura 3 ilustra esses efeitos (SUZUKI, 2009).

Figura 3 – Efeitos da eletropermeabilização na membrana celular.



Fonte: Adaptado de (SUZUKI, 2009).

As diversas aplicações da eletropermeabilização são apresentadas a seguir:

a) Eletroinserção

A eletroinserção ocorre quando o potencial transmembrana não atinge o valor crítico para a formação de poros na membrana celular e as proteínas são inseridas na membrana celular. O uso dessa técnica possibilitou a utilização de eritrócitos como receptores para atrair o vírus da AIDS e diminuir a carga viral (ZEIRA et al., 1991), e o desenvolvimento de biosensores capazes de detectar de forma rápida a aflatoxina M1 (LAROU et al., 2013).

b) Administração de Medicamentos via camada Transdérmica

A administração de medicamentos via camada transdérmica possibilita a entrega de medicamentos sem a passagem pelo sistema digestivo. Consiste de um método não invasivo e sem risco de infecção. É uma técnica que vem substituindo os procedimentos de ultrassom e iontoforese (ITA, 2016).

c) Transferência Genética

A transferência genética consiste em uma técnica de inserção de cadeias de DNA para o interior da célula. É uma técnica não viral e está em expansão (RAMAMOORTHY; NARVEKAR, 2015).

d) Eletrofusão

A aplicação de campo elétrico de dada intensidade a duas células próximas induz a fusão das mesmas. A produção de vacinas e anticorpos se utiliza dessa técnica (SCOTT-TAYLOR et al., 2000).

e) Eletroesterilização

Ao aplicar um campo elétrico muito intenso sobre as células, a membrana celular não consegue se recuperar após o processo levando a morte da célula. Este processo é chamado de eletropermeabilização irreversível. As aplicações dessa técnica podem ser utilizadas em processos de esterilização de alimentos e água (TEISSIÉ et al., 2002), (ANDREOU et al., 2017).

f) Eletroquimioterapia

A eletroquimioterapia consiste na aplicação de campo elétrico juntamente com quimioterápicos para o tratamento de câncer em humanos e animais, facilitando a entrada das drogas para o meio intracelular (MIKLAVČIČ et al., 2014). As drogas utilizadas nos tratamentos quimioterápicos possuem uma vida biológica curta dentro do corpo do paciente, necessitando de altas doses para a eficácia do tratamento. O excesso de drogas provoca efeitos colaterais intensos no paciente reduzindo a sua qualidade de vida (GARNER et al., 1996). O uso da eletroquimioterapia permite aumentar a permeabilidade da membrana a drogas, reduzindo a quantidade utilizada no tratamento e melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

Apesar de várias drogas terem sido utilizadas em eletroquimioterapia, apenas a bleomicina e a cisplatina mostraram ser eficazes, devido ao aumento da permeabilidade da membrana para essas drogas.

O uso da eletroquimioterapia cresceu muito nos últimos anos, sendo aplicada tanto em seres humanos (ESMAEILI; FRIEBE, 2019) quanto em animais (SPUGNINI; BALDI, 2019). O tratamento de câncer já está consolidado no leste europeu principalmente devido os trabalhos de Damijan Miklavcic, principal pesquisador da eletropermeabilização no mundo. Tal fato se deve à facilidade do tratamento quando comparado às demais técnicas utilizadas (MIKLAVČIČ et al., 2014). No Brasil, os tratamentos eletroquimioterapicos não são realizados em seres humanos. No entanto, são aplicados na oncologia veterinária (SUZUKI et al., 2017).

Alguns efeitos colaterais podem surgir devido ao tratamento com eletroquimioterapia. Dentre eles podemos citar: a dor por causa da inserção de eletrodos no local do tratamento; espasmos musculares pela circulação da corrente no tecido; sensação de queimadura na pele. Caso o paciente tenha problema pulmonar, a aplicação da droga deve ser intratumoral e não intravenosa (CAMPANA; MARCONATO; MATTHIESSEN, 2017), (MIKLAVČIČ et al., 2014)

O principal protocolo de eletropermeabilização utilizado em tratamento de eletroquimioterapia consiste na aplicação de 8 pulsos com duração de 100 μs com intervalo de 1 segundo entre cada pulso (MIKLAVČIČ et al., 2014). Alguns trabalhos clínicos de eletroquimioterapia são encontrados na seguintes referências: oncologia veterinária (TOZON; TAMZALI; CEMAZAR, 2017), (SUZUKI et al., 2017), (SUZUKI et al., 2014), (SILVEIRA et al., 2016), (CUNHA et al., 2017), (RANGEL et al., 2018); câncer de cabeça e pescoço (BENAZZO; BERTINO; GROSELJ, 2017); câncer de mama (CAMPANA; MARCONATO; MATTHIESSEN, 2017) e câncer de pâncreas (GRANATA et al., 2017).

2.2.1 Modelos da eletropermeabilização no nível celular

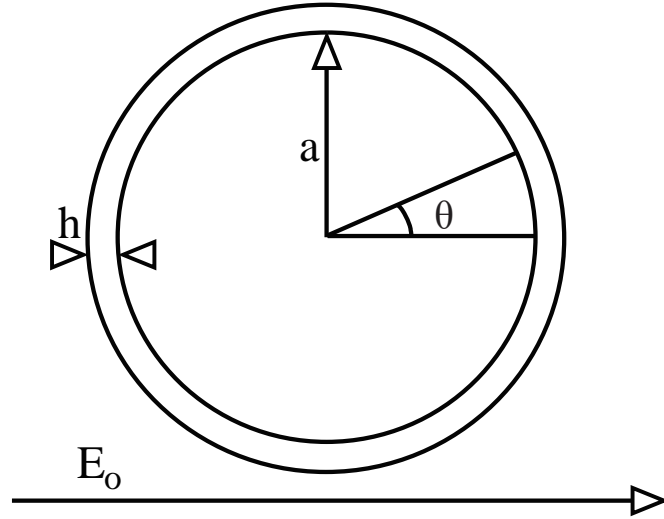
Os modelos da eletropermeabilização no nível celular buscam encontrar as características dos poros formados na membrana, como dimensões e densidade de poros, além do valor do potencial transmembrana - V_m .

Um modelo simples para o cálculo do V_m apresentado na literatura é de uma célula esférica, onde o esboço da seção transversal é apresentado na Figura 4. Para se obter o V_m considera-se uma célula esférica imersa em um líquido condutor iônico sob influência de um campo elétrico E_o aplicado na forma de degrau com distribuição espacial uniforme. A célula possui raio a e espessura h . O V_m é dado pela Equação (2.10) (RAMOS; SUZUKI; MARQUES, 2006), (KINOSITA et al., 1992):

$$V_m = -1,5FaE_o\cos\theta(1 - e^{t/\tau}) \quad (2.10)$$

onde, θ é o ângulo entre a direção do campo e o vetor normal à superfície da membrana relativo ao centro da célula, E_o é o campo elétrico, τ é a constante de tempo de carregamento da membrana e F é um termo que depende da condutividade.

Figura 4 – Modelo simplificado de uma célula com espessura da membrana h , raio a , θ é o ângulo entre a direção do campo elétrico e o vetor normal à superfície da membrana e E_o é o campo aplicado.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Dependendo da relação entre a condutividade do meio interno σ_i , do meio externo σ_o e da membrana celular σ_m , obtêm-se diferentes relações matemáticas para F e τ (SUZUKI, 2009).

Se $\sigma_m \leq \sigma_i, \sigma_o$:

$$F = \frac{2\sigma_o[2\sigma_m + \sigma_i + (\sigma_m - \sigma_i)(\frac{a-h}{a})^3 - 3\sigma_m(\frac{a-h}{a})]}{(2\sigma_m + \sigma_i)(2\sigma_o + \sigma_m) + 2(\frac{a-h}{a})^3(\sigma_i - \sigma_m)(\sigma_m - \sigma_o)} \quad (2.11)$$

$$\tau = aC_m \frac{\sigma_i + 2\sigma_o}{2\sigma_i\sigma_o + aG_m(\sigma_i + 2\sigma_o)} \quad (2.12)$$

onde G_m é a condutância da membrana não eletropermeabilizada (10^{-3} S/cm²), C_m é a capacitância da membrana ($1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) (SUZUKI, 2009), (NEUMANN, 1989).

Se $\sigma_m \ll \sigma_o \ll \sigma_i$ e $a \gg h$:

$$F = \left[1 + \frac{0,5a\sigma_m}{h\sigma_o} \right]^{-1} \quad (2.13)$$

com $G_m \ll \frac{2\sigma_i\sigma_o}{\sigma_i + 2\sigma_o}$:

$$\tau = aC_m \frac{\sigma_i + 2\sigma_o}{2\sigma_i\sigma_o} \quad (2.14)$$

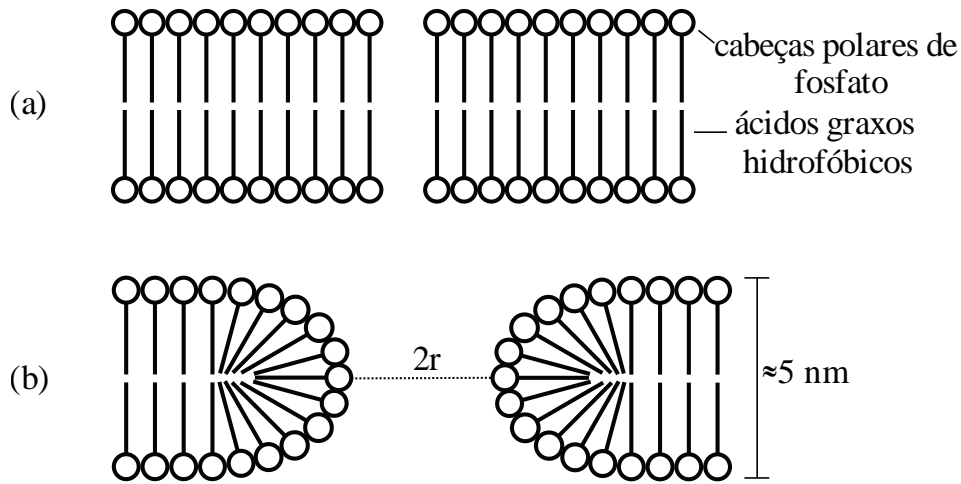
As Equações (2.13) e (2.14) são válidas para um meio extracelular de baixa condutividade (SUZUKI, 2009), (NEUMANN, 1989). O modelo descrito por tais equações

leva a uma aproximação do V_m na ocorrência da eletropermeabilização, uma vez que a condutância de membrana G_m é não uniforme na membrana permeabilizada.

a) *Modelo de Poro*

Os poros na membrana celular basicamente se dividem em dois tipos: poro hidrofóbico e poro hidrofílico. Os poros hidrofóbicos surgem e desaparecem na membrana constantemente, devido a agitação térmica e não são estáveis. Segundo Suzuki (2009), os poros hidrofílicos são estruturas estáveis que permitem a circulação iônica através da membrana e que se originaram da expansão dos poros hidrofóbicos (SUZUKI, 2009). A Figura 5 , ilustra os poros hidrofóbicos e os poros hidrofílicos.

Figura 5 – a) Poro hidrofóbico. b) Poro hidrofílico.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Na literatura, os trabalhos de revisão de Weaver e Chizmadzhev (1996) e Chen et al. (2006) apresentam o modelo para a formação dos poros na membrana (WEAVER; CHIZMADZHEV, 1996), (CHEN et al., 2006). O ponto de partida para esse modelo considera a bicamada lipídica como um sistema metaestável (o sistema permanece em uma configuração diferente da de menor energia) em que a tensão superficial Γ (energia por unidade de área) da membrana é positiva, devido à interação das moléculas lipídicas da membrana com a água. A abordagem básica para a formação de poros na membrana considera o balanço de energia na membrana, que sem distúrbio, possui a energia Γ por unidade de área. Entretanto, quando um poro circular é criado, há uma perda de energia devido à eliminação de uma área da membrana em contato com a água e um aumento de energia devido ao alargamento das distâncias intermoleculares no perímetro do poro. A formulação matemática para a contribuição mecânica da energia de poro é apresentada na Equação (2.15), onde γ é a tensão linear no poro e r é o raio do poro.

$$W_m(r) = 2\pi r\gamma - \Gamma\pi r^2 \quad (2.15)$$

A energia elétrica relacionada à polarização da membrana pode ser incluída no modelo apresentado na Equação (2.15). Para isso, considera-se a variação da energia armazenada em um capacitor polarizado com potencial V_m , onde a capacitância sofre alterações devido à abertura do poro, modificando a permissividade de $\varepsilon_m \approx 2$ da bicamada lipídica para $\varepsilon_w \approx 81$ da água:

$$W(r, V_m) = W_m - \frac{C_{LW}(V_m)^2 \pi r^2}{2} \quad (2.16)$$

$$C_{LW} = \left(\frac{\varepsilon_w}{\varepsilon_m} - 1 \right) C_m \quad (2.17)$$

sendo, C_m a capacitância por unidade de área da membrana.

b) Dinâmica dos Poros

A dinâmica dos poros hidrofílicos é algo complexo e vem sendo explorado a décadas. Na literatura, é postulado que este processo é modelado por uma função de distribuição de densidade de poros $n(r, t)$ que depende do tempo e do raio 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 . Supõe-se que a função de distribuição de densidade de poros pode ser obtida como solução da equação de Smoluchowsky (WEAVER; CHIZMADZHEV, 1996):

$$\frac{\partial n}{\partial t} = \mu \frac{\partial}{\partial r} \left(n \frac{\partial W}{\partial r} \right) + D \frac{\partial^2 n}{\partial r^2} \quad (2.18)$$

onde, μ e D são os coeficientes de mobilidade e difusão no espaço do raio dos poros. Os coeficientes de mobilidade e difusão são relacionados pela relação de Einstein $\mu = D/K_B T$, sendo T a temperatura em Kelvin e K_B a constante de Boltzmann. W é a energia de poro e seu gradiente determina a força de expansão dos poros.

A resolução da Equação (2.18) é proposta pelo grupo de pesquisa da Universidade de Duke (DEBRUIN; KRASSOWSKA, 1998), (DEBRUIN; KRASSOWSKA, 1999) e (NEU; KRASSOWSKA, 1999). Os autores transformaram a equação diferencial parcial (EDP) em uma equação diferencial ordinária (EDO), considerando que todos os poros criados possuem o mesmo diâmetro. Assim, a dinâmica da densidade de poros $N(t)$ que não depende do raio do poro, é relacionado com a função de distribuição de poros $n(r, t)$ por:

$$N(t) = \int_0^\infty n(r, t) dr \quad (2.19)$$

Neu e Krassowska (1999) argumentam que ao investigar o processo de eletropermeabilização biológica, a equação de Smoluchowsky possui vários problemas e apresentam as seguintes justificativas para a transformação da EDP em EDO: 1) as constantes da Equação (2.18) não podem ser obtidas de maneira direta, sendo utilizados argumentos teóricos para se obter uma estimativa da ordem de grandeza dessas constantes, levando a uma análise qualitativa do processo de eletropermeabilização; 2) A conexão entre as

variáveis da EDP e as quantidades que estão disponíveis a partir das experiências está longe de ser óbvio. 3) A EDP com seus coeficientes variáveis não tem solução analítica e deve ser resolvida numericamente. Entretanto, devido à dependência exponencial da criação e taxas de destruição da energia dos poros e escalas temporais e espaciais diferentes faz com que a solução numérica seja complexa de se obter (NEU; KRASSOWSKA, 1999).

Como uma transformação da equação Smoluchowsky, os pesquisadores da Universidade de Duke propõem a Equação (2.20) como a taxa de variação no tempo da densidade superficial de poros (DEBRUIN; KRASSOWSKA, 1998):

$$\frac{dN(t)}{dt} = \alpha e^{\beta(V_m)^2} \left(1 - \frac{N(t)}{N_o} e^{-q\beta(V_m)^2} \right) \quad (2.20)$$

onde, N_o é a densidade de poros na membrana em regime permanente sem polarização. β , α e q são constantes empiricamente especificadas.

A Equação (2.20) descreve a taxa de variação de poros na membrana por unidade de área sendo baseada na energia de poro. A taxa de criação de poros K_p é baseada na equação de Arrhenius (DEBRUIN; KRASSOWSKA, 1998):

$$K_p \approx e^{-W(r, V_m)/K_B T} \quad (2.21)$$

sendo, $W(r, V_m)$ a energia de um poro com raio r no potencial transmembrana V_m , T é a temperatura em Kelvin e K_B a constante de Boltzmann. Quando um poro é formado na membrana, uma porção da camada lipídica que a constitui é substituída por água. Esse fato, provoca uma mudança na capacitância da membrana resultando na Equação (2.16). Substituindo a Equação (2.16) na Equação (2.21) obtêm-se (DEBRUIN e KRASSOWSKA, 1998):

$$K_p \approx e^{-W_m(r)/kT} e^{C_{LW} \pi r^2 V_m^2 / 2K_B T} \quad (2.22)$$

O primeiro termo exponencial da expressão (2.22) é constante. Considerando a hipótese de que a criação de poros depende da exponencial de V_m^2 , obtêm-se (DEBRUIN; KRASSOWSKA, 1998):

$$\frac{dN}{dt} = \alpha e^{\beta(V_m)^2} \quad (2.23)$$

onde $\beta = C_{LW} \pi r^2 / 2K_B T$ e $\alpha = e^{-W_m(r)/K_B T}$ são constantes. Segundo Debruim e Krasowska (1998), a Equação (2.23) apresenta um problema de destruição da membrana mesmo para $V_m=0$ V, onde há um aumento de poros sem um limite. Essa ruptura espontânea é observada em experimentos com bicamadas lipídicas planares, mas não em membranas biológicas. Assim, é proposto um valor de estado estacionário de N em um V_m particular:

$$\frac{dN}{dt} = \alpha e^{\beta(V_m)^2} \left(1 - \frac{N}{N_{eq}} \right) \quad (2.24)$$

sendo N_{eq} a densidade de equilíbrio dos poros para um dado valor de V_m . N_{eq} é avaliado assumindo uma distribuição de equilíbrio dos poros no espaço se seus raios n_{eq} é governado pela lei de Boltzmann:

$$n_{eq}(r, V_m) = A e^{-W(r, V_m)/K_B T} \quad (2.25)$$

onde A é uma constante e $n_{eq}(r, V_m)dr$ é a densidade de poros com raio entre r e $r + dr$ para um dado valor de V_m . Considerando que a energia $W(r, V_m)$ possui um mínimo local em $r = r_m$ e que todos os poros existem nesse mínimo, a Equação (2.25) pode ser reduzida para a densidade de equilíbrio dos poros (DEBRUIN; KRASSOWSKA, 1998):

$$N_{eq} = A e^{-W(r_m, V_m)/K_B T} \quad (2.26)$$

Substituindo a Equação (2.16) na Equação (2.26) obtêm-se:

$$N_{eq} = N_o e^{q\beta(V_m)^2} \quad (2.27)$$

onde $N_o = A e^{-W_m(r_m)/K_B T}$ é a densidade de equilíbrio de poros quando $V_m=0$ V e $q = (r_m/r)^2$. Substituindo a Equação (2.27) na Equação (2.24) obtêm-se a Equação (2.20)(DEBRUIN; KRASSOWSKA, 1998).

Para a determinação da condutância de membrana eletropermeabilizada G_m , Neu e Krassowska (1999) assumem a hipótese que todos os poros possuem o mesmo diâmetro e utilizam o resultado obtido da Equação (2.20):

$$G_m = N G_p \quad (2.28)$$

onde G_p é a condutância em um poro simples. Ela assume que os poros fornecem vias para o movimento de cargas (NEU; KRASSOWSKA, 1999). A equação da condutância de poro simples foi proposta por Glaser et al. (1988) (GLASER et al., 1988) e Barnett (1990) (BARNETT; WEAVER, 1991) baseado na equação de Nernst-Planck; esta, por sua vez é função do potencial transmembrana:

$$G_p = \left(\frac{\pi r_p^2 \sigma_p}{h} \right) \frac{e^{\frac{V_m}{V_k}} - 1}{\left[\frac{W_o e^{\xi} - \varsigma V_m}{W_o - \varsigma V_m} \right] e^{\frac{V_m}{V_k}} - \left[\frac{W_o e^{\xi} + \varsigma V_m}{W_o + \varsigma V_m} \right]} \quad (2.29)$$

onde $\xi = \frac{W_o - \varsigma V_m}{V_k}$, $V_k = \frac{K_B T}{e}$, ς é o comprimento relativo da entrada do poro, $T=300$ K, e é a carga elementar. r_p é o raio do poro, W_o é a barreira de energia dentro do poro. A condutância de poro simples calculada pela Equação (2.29) 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; KRASSOWSKA, 1999), (SUZUKI, 2009).

c) Mobilidade Iônica

Experimentos em membrana planares foram realizados por Glaser et al. (1988) (GLASER et al., 1988). Os pesquisadores encontraram a dependência de $\ln(\Delta I/\Delta t)$ por Vm^2 com pulsos de 0,65 a 1,9 V:

$$\ln\left(\frac{\Delta I}{\Delta t}\right) = A + BVm^2 \quad (2.30)$$

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

Ramos et al. (2004) utilizaram o modelo de transporte iônico através da membrana proposto por Glaser et al. (1988) e assumiram que a membrana intacta possui mobilidade iônica insignificante e que todo transporte iônico deve ocorrer pelos poros criados na eletropermeabilização (RAMOS; SUZUKI; MARQUES, 2004). Para isso, Ramos et al. (2004) definem a mobilidade relativa na membrana (λ) como a relação entre a mobilidade iônica na membrana (μ_m) e na água (μ_a), como:

$$\lambda = \frac{\mu_m}{\mu_a} \quad (2.31)$$

Conforme o trabalho de Glaser et al. (1988), a taxa de variação da mobilidade relativa é uma função do Vm^2 :

$$\frac{d\lambda}{dt} = \beta e^{\left(\frac{Vm}{V_p}\right)^2} \quad (2.32)$$

onde V_p e α são constantes, embora haja a possibilidade da dependência com a temperatura. Segundo os autores, os resultados obtidos com o modelo são semelhantes a trabalhos experimentais realizados por outros pesquisadores, sendo um modelo útil para a simulação da eletropermeabilização em células, permitindo realizar previsões sobre a permeabilidade da membrana, distribuição do potencial, bem como a ruptura da mesma (RAMOS; SUZUKI; MARQUES, 2004).

Ramos (2005) utilizou o modelo de Glaser et al. (1988) para simulações com o Método do Circuito Equivalente da eletropermeabilização a nível celular e de tecidos. Concluiu que o fenômeno da eletropermeabilização não pode ser ignorado quando tecidos biológicos são estimulados por campos elétricos intensos (RAMOS, 2005).

2.2.2 Modelos da Eletropermeabilização em Tecidos

A eletropermeabilização em tecidos biológicos possibilita o tratamento de doenças, e por isso tem atraído a atenção de diversos pesquisadores nos últimos anos. Um exemplo é o tratamento do câncer com a eletroquimioterapia, aplicável tanto em humanos quanto em animais. Para esse tipo de tratamento, por exemplo, é necessário obter as características do tumor (dimensões, propriedades elétricas) para a elaboração de um protocolo de eletropermeabilização, determinação da geometria dos eletrodos e a realização de simulações

para prever a distribuição de campo elétrico e corrente elétrica na região de interesse. Para a simulação numérica é necessário um modelo matemático que represente o processo de eletropermeabilização. Na literatura, são encontrados basicamente um modelo térmico e dois modelos elétricos: o estático e o dinâmico.

a) Modelo Estático

No modelo estático, é resolvida a equação da continuidade, admitindo que a densidade de corrente no tecido possui divergente nulo:

$$-\nabla \cdot (\sigma \nabla V) = 0 \quad (2.33)$$

onde σ é a condutividade elétrica do tecido e V é o potencial elétrico. É chamado de modelo estático pois não considera a variação da condutividade no tempo. Os pesquisadores utilizam a condutividade no final de cada pulso, ignorando as variações durante o pulso (COROVIC; ZUPANIC; MIKLAVCIC, 2008), (COROVIC et al., 2013). Outro aspecto importante desprezado é a dispersão dielétrica dos tecidos. Devido a interdependência entre o campo elétrico e a condutividade, os pesquisadores propõe diferentes funções para relacionar essas grandezas, como: funções do tipo linear, exponencial e Heaviside e realizam comparações com valores de condutividade experimental, (COROVIC et al., 2013). O uso desse modelo matemático permite calcular de maneira aproximada a distribuição estática do campo elétrico; porém, não permite obter qualquer resultado dinâmico do fenômeno.

b) Modelo Dinâmico

O modelo dinâmico da eletropermeabilização biológica deve representar de maneira quantitativa a forma de onda da corrente experimental, distribuição do campo elétrico e condutividade do tecido como função do tempo.

Langus et al. (2016) propõem um modelo dinâmico para simulação com o MEF. A densidade de corrente total que circula pelo tecido é dada pela soma de dois termos: densidade de corrente de condução e densidade de corrente de deslocamento conforme apresenta a Equação (2.34). Os autores assumem que a condutividade do tecido σ é função de outras três variáveis subsidiárias: nível de poração (ρ_{por}), indicador de dano na poração (ϑ_σ) e indicador de dano térmico (ϑ_T). Essas variáveis são funções da amplitude do campo elétrico local E (LANGUS et al., 2016).

$$\vec{j} = \vec{j}_\sigma + \vec{j}_C \quad (2.34)$$

$$\vec{j}_\sigma = \sigma(\rho_{por}, \vartheta_\sigma, \vartheta_T) \vec{E} \quad (2.35)$$

Os autores propuseram o seguinte conjunto de equações baseado em curvas experimentais da corrente elétrica.

$$\sigma(\rho_{por}, \vartheta_\sigma, \vartheta_T) = \left(\sigma_{MIN} + (\sigma_{MAX} - \sigma_{MIN}) \rho_{por} \cdot \left(1 - \alpha_\sigma e^{\frac{-\vartheta_\sigma}{\tau_\sigma}} \right) \right) (1 + \alpha_T \log(1 + \vartheta_T)) \quad (2.36)$$

$$\rho_{por.}(E, \Delta t, \rho_{por.}^{t-\Delta t}) = \max \left(\frac{E - E_{MIN}}{E_{MAX} - E_{MIN}}, \rho_{por.}^{t-\Delta t} e^{\frac{-\Delta t}{\tau_{por.}}} \right) \quad (2.37)$$

$$\vartheta_{\sigma}(E, \Delta t, \vartheta_{por.}^{t-\Delta t}) = \alpha \vartheta_{\sigma} E \Delta t + \vartheta_{\sigma}^{t-\Delta t} e^{\frac{-\Delta t}{\tau_{por.}}} \quad (2.38)$$

$$\vartheta_T(E, \Delta t, \vartheta_T^{t-\Delta t}) = \alpha \vartheta_T E \Delta t + \vartheta_T^{t-\Delta t} e^{\frac{-\Delta t}{\tau_T}} \quad (2.39)$$

$$\vec{j}_C(\vec{E}, \Delta t, \vec{E}^{t-\Delta t}) = \frac{\alpha_C}{R_C} (\vec{E} - \vec{E}^{t-\Delta t}) e^{\frac{-\Delta t}{R_C C}} \quad (2.40)$$

Onde σ_{MIN} e σ_{MAX} são a condutividade inicial e final do tecido respectivamente, E_{MIN} e E_{MAX} são os limiares mínimos e máximo de campo elétrico respectivamente, τ_{por} é o tempo de relaxação para a poração, α_{σ} é a amplitude de crescimento do poro, τ_{σ} é o tempo de de crescimento do poro, α_T é a amplitude do modelo térmico, τ_T é o tempo da difusão térmica, $\alpha \vartheta_{\sigma}$ é a amplitude do dano de poração, $\alpha \vartheta_T$ é a amplitude do dano térmico, α_C é a amplitude do modelo capacitivo, R_C é a resistência no modelo capacitivo, C é a capacitância e Δt é o passo de simulação.

No modelo dinâmico, Langus et al. (2016) não utilizam a Equação (2.33) devido à carga armazenada ou liberada nas camadas lipídicas dentro do volume do tecido. Assim, os autores utilizam a equação da continuidade dinâmica:

$$\nabla \cdot (\sigma \vec{E}) = -\frac{\partial \rho_v}{\partial t} \quad (2.41)$$

Langus et al. (2016) combinaram as Equações (2.40) e (2.41) para obterem a Equação (2.42) para ser resolvida pelo MEF.

$$\nabla \cdot (\sigma \vec{E}) = \frac{\alpha_C}{R_C} (\vec{E} - \vec{E}^{t-\Delta t}) e^{\frac{-\Delta t}{R_C C}} \quad (2.42)$$

Apesar das curvas de corrente simuladas apresentarem um erro máximo de 5% em relação aos dados experimentais, o modelo proposto por Langus et al. (2016) é complexo sendo composto por 14 parâmetros que devem ser ajustados. Os autores não comentam qual o método utilizado para determinar tais parâmetros. Além disso, ao final do trabalho os autores destacam que não possuem nenhuma explicação teórica ou experimental do porque tal conjunto de equações foi utilizado para a modelagem dinâmica do processo de eletropermeabilização biológica.

O modelo apresentado por Voyer et al.(2018) para tecidos é baseado no modelo a nível celular proposto por Leguèbe et al. (2014). A condutividade homogênea da membrana é dada por (VOYER et al., 2018):

$$\sigma_m = \sigma_{m0} + \sigma_{m1} X_1(t, v_m) + \sigma_{m2} X_2(t, X_1) \quad (2.43)$$

onde σ_{m0} é a condutividade da membrana intacta, σ_{m1} e σ_{m2} são a condutividade de eletropermeabilização e a permeabilização de longo prazo respectivamente. O processo X_1 descreve o rápido e elevado aumento da condutividade da membrana celular:

$$\frac{dX_1}{dt} = \begin{cases} \frac{\beta_1(v_m) - X_1}{\tau_1}, & \beta_1(v_m) \geq X_1 \\ 0, & \beta_1(v_m) \leq X_1 \end{cases} \quad (2.44)$$

sendo τ_1 o tempo característico do aumento de X_1 . β_1 é uma função do tipo sigmoide cujos parâmetros devem ser ajustados a partir de resultados experimentais. Voyer et al. (2018) propõem a seguinte função para β_1 :

$$\beta_1(v_m) = \frac{1}{2} \left(1 + \tanh \left(k_1 \left(\frac{v_m^2}{V_{th}^2} - 1 \right) \right) \right) \quad (2.45)$$

V_{th} é um limiar de tensão e k_1 é um coeficiente de modulação do efeito do limiar.

O processo X_2 segundo os autores está relacionado com as mudanças dos lipídios da membrana, que depende de X_1 e do campo elétrico. Os autores propõem a seguinte relação para X_2 :

$$\frac{dX_2}{dt} = \begin{cases} \frac{\beta_2(X_1) - X_2}{\tau_2}, & \beta_2(X_1) \geq X_2 \\ 0, & \beta_2(X_1) \leq X_2 \end{cases} \quad (2.46)$$

τ_2 é o tempo característico para o aumento de X_2 . O termo β_2 também é uma função do tipo sigmoide dada por:

$$\beta_2(X_1) = \frac{1}{2} \left(1 + \tanh \left(k_2 \left(\frac{X_1}{X_{th}} - 1 \right) \right) \right) \quad (2.47)$$

Voyer et al. (2018) realizaram a simulação numérica em duas dimensões com um *software* baseado em elementos finitos. Os parâmetros do modelo foram ajustados para coincidir com as curvas experimentais de corrente em fígado de rato obtidas no trabalho de Sel et al. (2005) (Sel et al., 2005). As curvas de corrente experimentais e simuladas são semelhantes. Apesar disso, tal modelo foi desenvolvido apenas para um único pulso e o processo de fechamento dos poros(ou seja, recomposição da membrana).

c) Modelo Térmico

No processo da eletropermeabilização biológica, a avaliação da distribuição de campo elétrico é um dos fatores mais importantes para determinar a região de tecido eletropermeabilizada. No entanto, efeitos secundários devem ser levados em consideração para a elaboração de protocolos de eletropermeabilização, sendo o de maior importância o aquecimento térmico (DAVALOS; RUBINSKY; MIR, 2003). Tecidos biológicos são sensíveis à temperatura, que influencia a condutividade e constante dielétrica. Estima-se que, durante a aplicação de campos elétricos intensos, a temperatura da amostra pode aumentar de 1 a 10 °C. Contudo, esse aumento de temperatura não causa lesão térmica. O dano térmico ocorre se a temperatura atingir 54 °C por mais de 10 s (HENLE; DETHLEFSEN, 1980),

(SAPARETO; DEWEY, 1984), (GOLDBERG et al., 1995), (DUNKI-JACOBS; PHILIPS; II, 2014).

O modelo matemático utilizado para a transferência de calor em tecidos biológicos é conhecido como equação da biotransferência de calor:

$$\nabla \cdot (k \nabla T) + w_b c_b (T_a - T) + \lambda = \rho c_p \frac{\partial T}{\partial t} \quad (2.48)$$

onde k é a condutividade térmica do tecido, T é a temperatura em Kelvin, w_b é a perfusão sanguínea, c_b é a capacidade térmica no sangue, T_a é a temperatura da artéria, λ é a geração metabólica de calor, ρ é a densidade do tecido e c_p é a capacidade térmica do tecido (PENNES, 1948).

Com o uso do modelo térmico proposto na Equação (2.48) juntamente com o modelo elétrico estático/dinâmico é possível avaliar o aumento da temperatura na região eletropermeabilizada, bem como, a distribuição da temperatura na amostra (DAVALOS; RUBINSKY; MIR, 2003), (GARCIA; DAVALOS; MIKLAVCIC, 2014), (RAMOS; WEINERT, 2017).

Nesta tese o modelo dinâmico da eletropermeabilização biológica será discutido no capítulo 3. O modelo térmico utilizado nas simulações é baseado na Equação (2.48).

2.2.3 Técnicas experimentais de caracterização da eletropermeabilização em células e tecidos

Na literatura, são encontradas algumas técnicas que permitem avaliar a ocorrência do fenômeno de eletropermeabilização em células e tecidos. Tais técnicas norteiam os pesquisadores para a elaboração dos experimentos bem como os materiais necessários para tal. Assim os resultados encontrados são de extrema importância para a elucidação e avaliação das hipóteses propostas.

a) Variação da condutividade

Uma das principais características da ocorrência da eletropermeabilização biológica é o aumento da condutividade do tecido (WEAVER; CHIZMADZHEV, 1996). Apesar disso, não há uma maneira direta de medir a condutividade do tecido durante a aplicação de campo elétrico, sendo necessário o uso de grandezas indiretas como tensão aplicada e corrente que circula pela amostra. Além disso, é necessário levar em consideração a forma de distribuição do campo elétrico.

O trabalho de Ivorra et al. (2009), utilizou amostras de tecidos de rato com fibrossarcomas e apresentou a variação da condutividade durante e após a aplicação de pulsos (IVORRA et al., 2009). Para a aplicação do campo elétrico foi utilizado um sistema de discos paralelos, com protocolos de pulsos de tensão. Em um osciloscópio, os autores obtêm os valores de tensão e corrente medidos com sensores e calculam a condutividade

baseada em um condutor com seção transversal S uniforme ao longo do comprimento L e campo elétrico uniforme nesse volume:

$$\frac{1}{\sigma(t)} = \frac{V(t)S}{i(t)L}, \quad (2.49)$$

sendo, $V(t)$ a tensão, $i(t)$ a corrente e $\sigma(t)$ a condutividade elétrica. A Equação (2.49) é correta para um meio não dispersivo. No entanto, tecidos biológicos possuem intensa dispersão dielétrica como destacado na seção (2.1). Uma técnica para compensar os efeitos reativos da amostra é proposta no trabalho de Ramos et al. (2012); para medição da condutividade de suspensão de células biológicas, os autores utilizam uma combinação de pulsos retangulares juntamente com sinais senoidais em frequências onde os efeitos reativos e dispersivos da amostras são mínimos (RAMOS et al., 2012).

Após a aplicação dos pulsos, Ivorra et al. (2009), realizam a medição da impedância com um sistema de eletrodos tetrapolar em um analisador de impedância. Com o resultado experimental da condutividade após o pulso, o seguinte modelo matemático foi proposto pelos autores:

$$\sigma(t) = A - B \ln(t - t_o), \quad (2.50)$$

onde, $t - t_o$ é o tempo após a aplicação do pulso, A e B são constantes.

Outro trabalho que apresenta a variação da condutividade durante a eletropermeabilização de tecidos é proposto por Neal et al. (2012); os autores utilizaram amostras de rins de porco e eletrodos de placas paralelas (NEAL et al., 2012). Para a obtenção da condutividade, eles utilizam a Equação (2.49) e desprezam a dispersão dielétrica.

Os trabalhos de Ramos e Schneider (2012) (RAMOS; SCHNEIDER, 2012) e Ramos e Farias (2013) (RAMOS; FARIAS, 2013) avaliam a variação da condutividade de células em suspensão de *Kluyveromyces marxianus* medindo a impedância antes e após a eletropermeabilização biológica. Os autores destacam que a análise de impedância das células em suspensão permite avaliar o grau de permeabilização produzido pelo campo elétrico.

As técnicas apresentadas nos itens b) e c) são aplicados em poucas células ou células isoladas.

b) Microscopia Eletrônica de Rápido Congelamento

A microscopia eletrônica de rápido congelamento consiste na aplicação de campo elétrico e o rápido congelamento da amostra, revelando assim as microestruturas na membrana permeabilizada (CHANG; REESE, 1990). O trabalho realizado por Chang e Reese (1990), comprovou experimentalmente a criação de poros na membrana, sendo que até então havia apenas a hipótese do surgimento de poros. Os pesquisadores realizaram experimentos com eritrócitos humano; superfície homogêneas dessas células homogêneas facilita a visualização da estrutura no microscópio. Foi possível observar poros na membrana

com tamanhos variados de diâmetros entre 20 nm a 120 nm com uma grande concentração de poros entre 40 nm e 60 nm. O tempo para o desaparecimento dos poros é de 10 segundos após a aplicação do pulso, expondo assim a recuperação da membrana celular.

c) Microscopia de Fluorescência

A microscopia de fluorescência utiliza um corante fluorescente sensível à tensão juntamente com a microscopia de vídeo. Kinoshita et al. (1988) colocaram ovos de ouriço do mar imerso em corante fluorescente e aplicaram campo elétrico. Como resultado, obtiveram uma imagem com diferente intensidade de luz emitida pelo corante fluorescente permitindo a obtenção do valor do potencial transmembrana. Com tal experimento foi possível obter resultados experimentais de V_m em função do ângulo entre a posição na membrana celular e o campo elétrico aplicado. Os pesquisadores utilizaram dois protocolos de eletropermeabilização: subcrítico (100 V/cm) e supercrítico (400 V/cm) com duração de 25 μs (KINOSHITA et al., 1988).

A Equação (2.10) fornece o valor teórico para o potencial transmembrana. No entanto, devido a não uniformidade da condutância de membrana (G_m), o potencial transmembrana não pode ser obtido de forma analítica. Assim, para ser possível uma comparação com os resultados experimentais os autores utilizaram uma solução numérica, propondo a seguinte equação para $G_m(\theta)$:

$$G_m(\theta) = \begin{cases} \frac{G_o(|\cos\theta| - \cos\theta_c)}{(1 - \cos\theta_c)} & (\theta \leq \theta_c, 180^\circ - \theta_c \leq \theta) \\ 0 & (\theta_c < \theta < 180^\circ - \theta_c) \end{cases} \quad (2.51)$$

onde, G_o é a condutância máxima e θ_c é o ângulo crítico para a ocorrência do fenômeno de eletropermeabilização.

Os autores também observaram a saturação do processo para o protocolo supercrítico quando o potencial transmembrana saturou em grande região da membrana. Tal efeito pode ser justificado pelo grande número de poros criados na membrana, dificultando assim o acúmulo de íons nas proximidades da membrana.

2.2.4 Limiar de eletropermeabilização biológica em tecidos

Em tecidos biológicos para a ocorrência do fenômeno de eletropermeabilização é necessário um determinado limiar de campo elétrico. No trabalho de Weinert (2017), é apresentado uma técnica com rampas de tensão para determinar o limiar de eletropermeabilização. Para fígado de rato, o limiar de campo elétrico obtido foi de 300 V/cm (WEINERT, 2017). Kranjc e Miklavčič (2016) apontaram, a existência de poucos estudos relatando o limiar para eletroporação reversível em tecidos. Uma delas utilizou amostras de tecido de fígado de coelho e obteve limiar de 460 V/cm, com o uso de simulações numéricas (KRANJC; MIKLAVČIČ, 2016).

Para células os limiares de eletropermeabilização reversível são bem conhecidos, com valores de campo elétrico entre 400 e 600 V/cm (CEMAZAR et al., 1998). Para a eletropermeabilização irreversível são utilizados campos elétricos entre 1000 e 2000 V/cm (JIANG; DAVALOS; BISCHOF, 2015).

2.2.5 Métodos numéricos para a caracterização da eletropermeabilização em células e tecidos

O uso de métodos numéricos para resolver problemas eletromagnéticos com geometrias complexas e diferentes materiais é algo indispensável para a obtenção de resultados na engenharia, ainda mais quando se trata de materiais biológicos onde a obtenção de soluções analíticas é complexa. As simulações de eletropermeabilização biológica em células ou tecidos são baseados principalmente em três métodos de cálculos presentes na literatura: Método das Diferenças Finitas (MDF), Método dos Elementos Finitos (MEF) e o Método do Circuito Equivalente (MCE). Existem outros métodos de cálculos, como o proposto por Ramos (2010), o qual utiliza a lei de Coulomb para o cálculo do campo elétrico na superfície da célula, e a equação da continuidade para o cálculo da diferença de potencial elétrico entre as faces da membrana. A grande vantagem desse método de cálculo é a velocidade do processamento devido a discretização superficial, ao invés da discretização volumétrica dos demais métodos (RAMOS, 2010).

O MDF é empregado em simulações de eletropermeabilização com variação temporal e com poucas células. Alguns pesquisadores utilizaram o MDF para a resolução da equação de Smoluchowski (BARNETT; WEAVER, 1991), ou para simular a eletropermeabilização em uma única célula utilizando a Equação (2.20) (KRASSOWSKA; FILEV, 2007). Como resultado apresentam grandezas com variação temporal: número de poros na membrana, condutância de membrana, potencial transmembrana e raio do poro. Apesar disso, tais resultados não representam de maneira quantitativa os resultados experimentais devido à dificuldade em determinar as constantes dos modelos.

O MEF é utilizado em simulações de eletropermeabilização com modelos estáticos e dinâmicos com grandes quantidades de células. O principal objetivo dos pesquisadores é a determinação da região espacial eletropermeabilizada para uma dada geometria de eletrodo e protocolo de eletropermeabilização. (COROVIC; ZUPANIC; MIKLAVCIC, 2008), (COROVIC et al., 2013), (SUZUKI et al., 2014), (LANGUS et al., 2016), (VOYER et al., 2018).

O MCE foi proposto por Ramos et al. (2003), como um método de cálculo com variação temporal da distribuição do campo elétrico e da corrente elétrica em um meio com baixa condutividade e elevada constante dielétrica. É baseado em elementos de circuito, condutâncias e capacitâncias que modelam os processos de condução e polarização elétrica nos materiais envolvidos (RAMOS; RAIZER; MARQUES, 2003), (RAMOS; SUZUKI,

2017). Em tecidos biológicos, o MCE permite a correta modelagem dos efeitos dispersivos da amostra, bem como simulações com variação temporal da corrente elétrica e da variação da temperatura como destacado no trabalho de Ramos e Weinert (2017) (RAMOS; WEINERT, 2017). Permite a simulações a nível celular ou de tecidos conforme relata o trabalho de Ramos (2005) (RAMOS, 2005).

a) Método do Circuito Equivalente

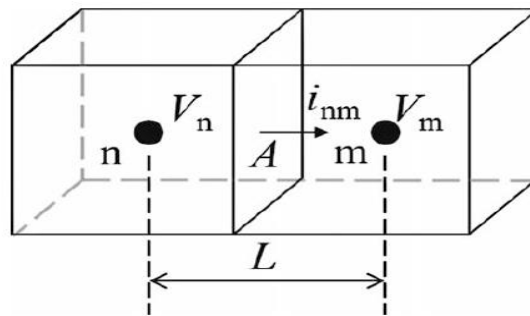
Nessa seção será apresentado todo desenvolvimento matemático do Método do Circuito Equivalente. Tal método foi utilizado para a obtenção dos resultados simulados neste trabalho. O texto abaixo é baseado nos trabalhos de Ramos et al. (2003) (RAMOS; RAIZER; MARQUES, 2003), (RAMOS; SUZUKI, 2017) e (RAMOS; WEINERT, 2017).

O primeiro passo é a determinação da corrente elétrica entre dois elementos de material dividida de forma retangular como apresentado na Figura 6. Considerando que a porção de material é pequena o suficiente para considerá-la homogênea a corrente i_{nm} pode ser obtida por:

$$i_{nm} = \sigma_s \frac{A}{L} (V_n - V_m) + \varepsilon_\infty \varepsilon_o \frac{A}{L} \frac{d}{dt} (V_n - V_m) \quad (2.52)$$

onde i_{nm} é a corrente elétrica, V_n e V_m são os potenciais elétricos no centro dos elementos n e m , respectivamente, L é a distância entre os elementos, A é a área de contato, σ_s é a condutividade estática, ε_∞ é a constante dielétrica em alta frequência e ε_o é a permissividade do vácuo. O circuito equivalente do sistema apresentado na Figura 6 é mostrado na Figura 7.

Figura 6 – Modelo geométrico para obtenção do circuito equivalente do material. V_m e V_n são os potenciais nos centros dos elementos m e n , respectivamente e i_{nm} é a corrente elétrica entre os volumes diferenciais.

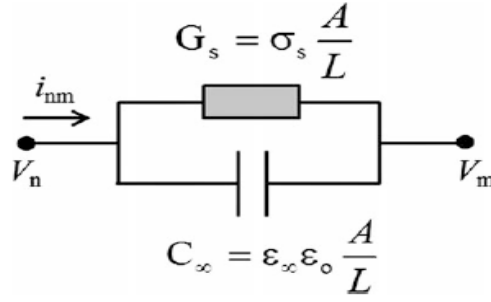


Fonte: (RAMOS; SUZUKI, 2017).

A resposta transitória da corrente elétrica em um meio dispersivo depende dos tempos de relaxação e da intensidade da dispersão. A polarização do meio resulta em um campo contrário ao campo elétrico aplicado, modificando a densidade de corrente no meio:

$$\vec{j}_d = \sigma_d (\vec{E} - \vec{E}_r) \quad (2.53)$$

Figura 7 – Circuito equivalente para um meio linear, homogêneo e sem dispersão dielétrica.



Fonte: (RAMOS; SUZUKI, 2017).

onde σ_d e \vec{j}_d são incrementos na condutividade e densidade de corrente devido a dispersão em relação aos valores considerados na Equação (2.52). \vec{E}_r é o campo de reação e \vec{E} é o campo elétrico aplicado devido à polarização do meio. A Equação (2.53) refere-se a valores médios macroscópicos no volume da amostra analisada. Podemos relacionar o campo elétrico com a diferença de potencial entre os elementos adjacentes da seguinte maneira:

$$i_d = \sigma_d \frac{A}{L} (\Delta V - \Delta V_r) \quad (2.54)$$

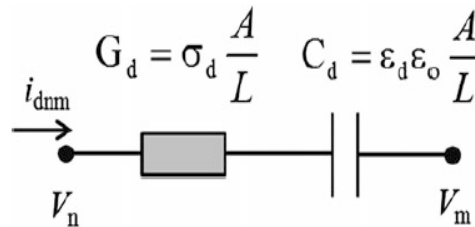
onde, i_d é a corrente de dispersão.

Devido à hipótese de linearidade no processo de polarização, o potencial de reação pode ser escrito como sendo proporcional ao acúmulo de carga, variando no tempo como proporcional à integral no tempo da corrente elétrica dispersiva:

$$i_{dnm} = G_d \left(\Delta V - \frac{1}{C_d} \int_0^t i_d dt' \right) \quad (2.55)$$

onde C_d e G_d são a capacitância e a condutância relacionadas com o processo de dispersão. A Figura 8 apresenta o circuito equivalente do processo de dispersão de primeira ordem.

Figura 8 – Circuito equivalente para uma dispersão de primeira ordem.



Fonte: (RAMOS; SUZUKI, 2017).

A corrente dispersiva no domínio do tempo para uma forma de onda genérica da fonte de excitação é obtida através do cálculo iterativo com pequenos passos de tempo Δt

quando comparado com o tempo de relaxação do circuito $\tau = C_d/G_d$. A queda de tensão no capacitor é obtida por:

$$G_d (V_n - V_m - V_c) = C_d \frac{V_c - V'_c}{\Delta t} \quad (2.56)$$

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 (2.56):

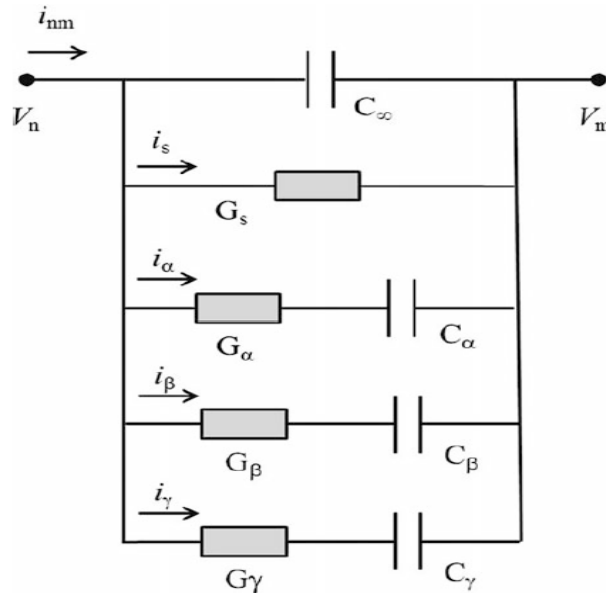
$$V_c = \frac{\frac{\Delta t}{\tau} (V_n - V_m) + V'_c}{\left(1 + \frac{\Delta t}{\tau}\right)} \quad (2.57)$$

Pode-se obter então a corrente dispersiva com o auxílio da seguinte expressão:

$$i_{dnm} = G_d (V_n - V_m - V_c) = G_d \left[\frac{(V_n - V_m) - V'_c}{\left(1 + \frac{\Delta t}{\tau}\right)} \right] \quad (2.58)$$

O processo de condução e polarização possui o circuito equivalente apresentado na Figura 9, sendo representadas as bandas de dispersão α , β e γ . A condução em baixas frequências é representada pela condutância G_s , onde C_∞ representa os processos de polarização com tempos de relaxação muito menores que os apresentados pelos processos de dispersão modelados pelas bandas α , β e γ .

Figura 9 – Circuito equivalente para um material biológico com dispersões de primeira ordem.



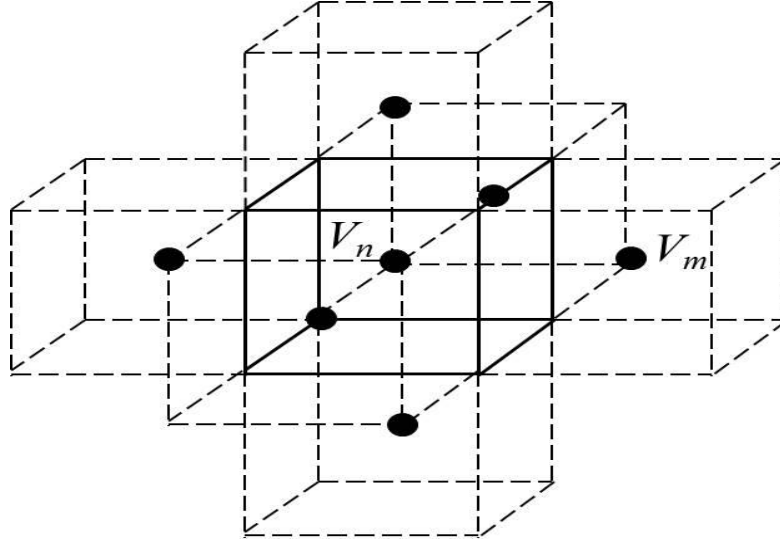
Fonte: (RAMOS; SUZUKI, 2017).

A simulação da distribuição de corrente elétrica e de campo elétrico em tecidos biológicos aplicados a partir de eletrodos com determinado potencial pode ser realizada com o método do circuito equivalente aplicado a uma matriz tridimensional de pequenos

volumes que formam a geometria do problema a ser simulado. A Figura 10 exemplifica a discretização com blocos cúbicos do domínio. No centro de cada bloco é definido um nó do circuito equivalente do material. Dentro da malha, cada bloco possui seis blocos vizinhos, e na periferia são aplicadas as condições de contorno. A solução numérica para a distribuição de potenciais elétricos nos nós do circuito equivalente no domínio tempo consiste na resolução do sistema de equações obtido com a aplicação da primeira lei de Kirchhoff para todos os nós da malha. Para a Figura 10, a equação dos nós para o nó central é obtida por:

$$\sum_{m=1}^6 \left[C_{nm} \frac{d}{dt} (V_n - V_m) + (i_s + i_\alpha + i_\beta + i_\gamma)_{nm} \right] = 0 \quad (2.59)$$

Figura 10 – Esquema de discretização espacial para aplicação da modelagem pelo circuito equivalente.



Fonte: (RAMOS; SUZUKI, 2017).

De acordo com a equação da continuidade, o somatório das correntes na Equação (2.59) pode ser substituído pela taxa de variação da carga elétrica acumulada no nó central:

$$\sum_{m=1}^6 \left[(i_s + i_\alpha + i_\beta + i_\gamma)_{nm} \right] = - \frac{dQ_n}{dt} \quad (2.60)$$

Aplicando a Equação (2.60) na Equação (2.59) e integrando ambas, obtemos as equações básicas para solução numérica pelo método do circuito equivalente:

$$V_n = \frac{1}{\sum_{m=1}^6 C_{\infty nm}} \left[Q_n + \sum_{m=1}^6 C_{\infty nm} V_m \right] \quad (2.61)$$

$$Q_n = Q'_n - \Delta t \sum_{m=1}^6 (i_s + i_\alpha + i_\beta + i_\gamma)_{nm} \quad (2.62)$$

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

A cada iteração da simulação, que equivale a um passo de tempo Δt , utilizando a Equação (2.62) a carga elétrica é atualizada através da integração numérica, sendo as correntes no integrando obtidas a partir dos valores anteriores de potencial elétrico na malha discretizada. Na sequência, ocorre a atualização dos potenciais pela Equação (2.61) utilizando o método de Gauss-Seidel. É necessário que o passo de tempo Δt possua valor bem menor (10 % ou menos) que o menor tempo de relaxação do circuito equivalente para que ocorra convergência da simulação.

As condições de contorno aplicadas na extremidade da malha 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. Em interfaces com diferentes materiais, as condições exigidas de continuidade de potencial e densidade de corrente elétrica são atendidas naturalmente com a modelagem por circuito elétrico.

Observe que cada banda de dispersão na Figura 9 representada por elementos de circuito, apresentam características de dispersões de Debye. Contudo, devido a complexidade dos tecidos biológicos o modelo empírico de Cole-Cole Equação (2.9) é amplamente empregado, devido a característica de representar uma banda de dispersão com uma distribuição contínua de tempos de relaxação. .

A implementação do modelo de Cole-Cole em termos de circuito é complexo. Dessa forma Ramos e Suzuki (2016) propõe utilizar 3 bandas de Debye para representar uma banda de Cole-Cole. A distribuição dos tempos de relaxação é τ_o , $30\tau_o$ e $\tau_o/30$. Dessa forma, para a banda alfa a constante dielétrica complexa é obtida por:

$$\widehat{\varepsilon}_\alpha(\omega) \approx \Delta\varepsilon_\alpha \left[\frac{a_o}{1 + j\omega\tau_\alpha} + \frac{a_{baixo}}{1 + j\omega 30\tau_\alpha} + \frac{a_{alto}}{1 + j\omega\tau_\alpha/30} \right] \quad (2.63)$$

$$a_o = \frac{g(\ln\tau_\alpha)}{g(\ln\tau_\alpha) + g(\ln 30\tau_\alpha) + g(\ln\tau_\alpha/30)} \quad (2.64)$$

$$a_{baixo} = \frac{g(\ln 30\tau_\alpha)}{g(\ln\tau_\alpha) + g(\ln 30\tau_\alpha) + g(\ln\tau_\alpha/30)} \quad (2.65)$$

$$a_{alto} = \frac{g(\ln\tau_\alpha/30)}{g(\ln\tau_\alpha) + g(\ln 30\tau_\alpha) + g(\ln\tau_\alpha/30)} \quad (2.66)$$

Uma função de dispersão baseada em uma distribuição contínua de tempos de relaxação pode ser descrita como uma combinação linear de dispersões de primeira ordem nas quais os coeficientes são definidos por uma função de distribuição $g(\ln\tau)$.

No caso da dispersão de Cole-Cole, $g(\ln\tau)$ é dado por (BÖTTCHER; BORDEWIJK, 1973):

$$g(\ln\tau) = \frac{1}{2\pi} \frac{\sin(\alpha\pi)}{\cosh[(1-\alpha)\ln(\tau_o/\tau)] - \cos(\alpha\pi)} \quad (2.67)$$

b) Modelo Térmico implementado no MCE

O modelo térmico implementado no MCE é baseado na Equação (2.48) com algumas adaptações. Os termos de perfusão sanguínea e geração metabólica foram desprezados, uma vez que os experimentos realizados são *ex vivo*. Assim é incluído um termo de dissipação térmica no volume do tecido representado por ρ_{diss} :

$$\nabla \cdot (k \nabla T) + \rho_{diss} = \rho c_p \frac{\partial T}{\partial t} \quad (2.68)$$

O cálculo térmico é realizado na mesma malha de discretização espacial do caso elétrico. Assim, cada elemento no interior da malha possui 6 elementos vizinhos. Inicialmente é necessário transformar a equação diferencial para a forma integral. Aplicando o teorema de Gauss na Equação (2.68) obtêm-se:

$$\oint_S k \nabla T \cdot d\vec{S} + P_{diss} = \rho c_p \Delta V \frac{dT}{dt} \quad (2.69)$$

onde S é a superfície das faces de um bloco, P_{diss} é a potência dissipada no volume ΔV 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. A integral de fluxo pode ser convertida em um somatório efetuado nas faces desse bloco.

$$-\sum_{n=1}^6 k_n \Delta S_n \left[\frac{T_o(t) - T_n(t)}{\Delta L_n} \right] + P_{diss} = \rho c_p \Delta V \left[\frac{T_o(t) - T(t - \Delta t)}{\Delta t} \right] \quad (2.70)$$

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

Definindo a capacitância e condutância térmica por:

$$C_t = \rho c_p \Delta V_n \quad (2.71)$$

$$G_t = \frac{k_n \Delta S_n}{\Delta L_n} \quad (2.72)$$

pode-se reorganizar a Equação (2.70) para aplicar o método iterativo para calcular a temperatura. Isolando o termo T_o , obtêm-se a expressão para o cálculo da temperatura no domínio de análise:

$$T_o(t) = \frac{C_{to} T(t - \Delta t) + [P_{diss} + \sum_{n=1}^6 G_{tn} T_n(t)] \Delta t}{C_{to} + \Delta t \sum_{n=1}^6 G_{tn}} \quad (2.73)$$

No cálculo térmico realizado pelo MCE, a temperatura é obtida resolvendo a Equação (2.73) em cada bloco da malha de discretização espacial utilizando 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 devido ao tempo de resposta térmica ser muito mais lento que o elétrico.

3 MODELO DE ELETROPERMEABILIZAÇÃO

O modelo aplicado nesta tese utiliza como base o trabalho de (DEBRUIN; KRAS-SOWSKA, 1998) apresentado na Equação (2.20). Com ela os autores determinam a taxa de variação da densidade de poros criados na membrana, sendo que estes possuem o mesmo diâmetro. Podemos multiplicar ambos os lados pela condutância de um poro g_p , para assim obtermos uma expressão em termos da condutância por unidade de área da membrana g_m (RAMOS; WEINERT, 2017):

$$\frac{dg_m(t)}{dt} = \frac{g_o e^{(V_m/V_1)^2} - g_m(t)}{\tau_o e^{(V_m/V_2)^2}} \quad (3.1)$$

$$g_o = N_o g_p \quad (3.2)$$

$$\tau_o = \frac{N_o}{\alpha} \quad (3.3)$$

$$V_1 = \sqrt{\frac{q}{\beta}} \quad (3.4)$$

$$V_2 = \sqrt{\frac{q-1}{\beta}} \quad (3.5)$$

Assim, a Equação (3.1) deve representar a princípio a dinâmica da eletropermeabilização a partir de valores dos limiares V_1 e V_2 , do tempo de relaxação inicial τ_o e da condutância intacta g_o . Afim de aplicar tal modelo em tecidos, deve-se considerar o efeito macroscópico da variação da condutância de membrana a partir de um processo de promediação espacial.

Definindo a condutividade de eletroporação macroscópica σ_p como a média espacial da condutância da membrana no volume ocupado pela células do tecido, do ponto de vista macroscópico, as grandezas como o potencial transmembrana V_m e os limiares V_1 e V_2 são substituídos pelo campo elétrico médio no volume da célula multiplicado por uma distância característica da ordem do diâmetro celular.

$$\frac{d\sigma_p(t)}{dt} = \frac{\sigma_o e^{(E/E_1)^2} - \sigma_p(t)}{\tau_o e^{(E/E_2)^2}} \quad (3.6)$$

Ao observar a Equação (3.6), não há um limite para σ_p levando a conclusão que tal termo pode assumir qualquer valor. Tal efeito não é observado nos resultados experimentais, onde há uma saturação da corrente. Ou seja, é necessário determinar um limite superior relativo ao termo $\sigma_o e^{(E/E_1)^2}$:

$$\frac{\sigma_o e^{(E/E_1)^2} \sigma_t}{\sigma_o e^{(E/E_1)^2} + \sigma_t} = \frac{\sigma_o \sigma_t}{\sigma_o + \sigma_t e^{-(E/E_1)^2}} \quad (3.7)$$

onde σ_t é o valor máximo que a condutividade do tecido pode alcançar com a eletropermeabilização. A condutividade máxima, depende da intensidade de eletropermeabilização, mas também, das propriedades do meio ao redor das células, como a condutividade dos eletrólitos, geometria das células e espaços intersticiais.

Outro item que deve ser observado na Equação (3.6) é o tempo de relaxação. Quando são utilizados protocolos do tipo pulso de tensão é possível observar uma fase inicial rápida, com tempos de subida da corrente elétrica da ordem de microssegundos. No entanto, com o passar do tempo há uma diminuição da taxa de aumento da condutividade. Cessando o pulso, há uma recuperação lenta da membrana, diminuindo a condutividade do tecido mais lentamente do que na aplicação do pulso. A partir dessas constatações experimentais, o tempo de relaxação varia entre um valor mínimo e um valor máximo durante o fenômeno de eletropermeabilização. Desse modo, o termo $\tau_o e^{(E/E_2)^2}$ deve ser substituído por:

$$\tau_o e^{(E/E_2)^2} = \tau_{min} + \Delta\tau e^{-(E/E_2)^2} \quad (3.8)$$

Com essas modificações obtemos o seguinte modelo empírico para a eletropermeabilização em tecidos (RAMOS; WEINERT, 2017), (WEINERT; PEREIRA; RAMOS, 2019):

$$\frac{d\sigma_p(t)}{dt} = \frac{\sigma_{eq} - \sigma_p(t)}{\tau_{min} + \Delta\tau e^{-(E(t)/E_2)^2 (\sigma_t/(\sigma_t + \sigma_p(t)))^2}} \quad (3.9)$$

$$\sigma_{eq} = \frac{\sigma_o \sigma_t}{\sigma_o + \sigma_t e^{-(E(t)/E_1)^2 (\sigma_t/(\sigma_t + \sigma_p(t)))^2}} \quad (3.10)$$

onde, σ_o é a condutividade de eletropermeabilização inicial, E_1 e E_2 são os limiares de eletropermeabilização e $E(t)$ é o campo elétrico. O parâmetro σ_t possui importantes funções para o modelo. Ele limita o valor da σ_p e produz uma divisão de tensão com a condutividade da membrana resultando na redução do potencial transmembrana quando a eletropermeabilização se torna intensa. O termo $\sigma_t/(\sigma_t + \sigma_p(t))$ modela esse efeito nas Equações (3.9) e (3.10).

O modelo de eletropermeabilização apresentado nas Equações (3.9) e (3.10) contém 6 parâmetros a serem ajustados: 2 condutividades $\sigma_o(S/m)$ e $\sigma_t(S/m)$, 2 tempos de relaxação $\tau_{min}(s)$ e $\tau_{min} + \Delta\tau(s)$ e dois limiares de campo $E_1(V/m)$ e $E_2(V/m)$.

No trabalho de Ramos e Weinert (2017), os autores realizaram a simulação de um pulso aplicado com eletrodos de agulhas paralelas sob amostras de fígado de rato. Tal trabalho apresenta algumas limitações: a simulação de apenas um pulso de tensão sem a verificação da memória da eletropermeabilização e o ajuste dos parâmetros realizados na tentativa e erro.

Na sequência, o trabalho de Weinert et al. (2019) (WEINERT; PEREIRA; RAMOS, 2019) apresenta algumas modificações no modelo a fim de inserir o efeito da memória de

eletropermeabilização. Os parâmetros σ_t e E_2 são substituído pelas seguintes equações:

$$\sigma_t = c_1 E_m + c_2 \sigma_p + c_3 \quad (3.11)$$

$$E_2 = c_4 e^{\alpha E_m} + c_5 E_m + c_6 \sigma_p + c_7 \quad (3.12)$$

onde $c_1 - c_7$ e α são constantes, E_m é a amplitude máxima do campo elétrico e σ_p é a condutividade de eletropermeabilização antes do próximo pulso. Os resultados experimentais foram obtidos de fígado de rato estimulado por eletrodos de placas paralelas e agulhas. As formas de onda aplicadas nos eletrodos foram pulsos retangulares e rampas de tensão. Os autores realizaram simulações 1D (placas paralelas) e 2D (agulhas) no *software* MatLab® utilizando o MCE. Para a determinação dos parâmetros, foi utilizado o algoritmo genético do Matlab®.

Apesar das modificações representarem bons resultados para a dinâmica da eletropermeabilização, o modelo se mostrou complexo, com o aumento de 8 parâmetros.

Assim, o modelo base apresentado nas Equações (3.9) e (3.10) foi utilizado, sendo que os resultados promissores obtidos justificam o seu uso para a dinâmica da eletropermeabilização biológica.

4 SISTEMA DESENVOLVIDO PARA TESTE DE ELETROPERMEABILIZAÇÃO

Nessa seção, será apresentada o eletropermeabilizador desenvolvido, os sensores de tensão e corrente e o sistema de aquisição de dados. Para a obtenção dos resultados foram utilizados 2 eletropermeabilizadores. Um foi desenvolvido durante a dissertação de mestrado que consiste em um amplificador linear, sendo possível aplicar qualquer forma de onda no tecido. É limitado a tensão de 400 V e o tempo de subida/descida são lentos da ordem de 40 μs (WEINERT, 2017). O segundo eletropermeabilizador é apresentado a seguir.

4.1 ELETROPERMEABILIZADOR

O eletropermeabilizador é o dispositivo responsável por aplicar uma determinado sinal de tensão ou corrente na amostra que se deseja eletropermeabilizar. Os eletropermeabilizadores de tensão são os mais comuns em experimentos de tecidos biológicos, e os de corrente utilizados em experimentos de *patch – clamp*. O nível de tensão depende do espaçamento de eletrodos utilizados, sendo necessário determinado valor de campo elétrico para a ocorrência da eletropermeabilização.

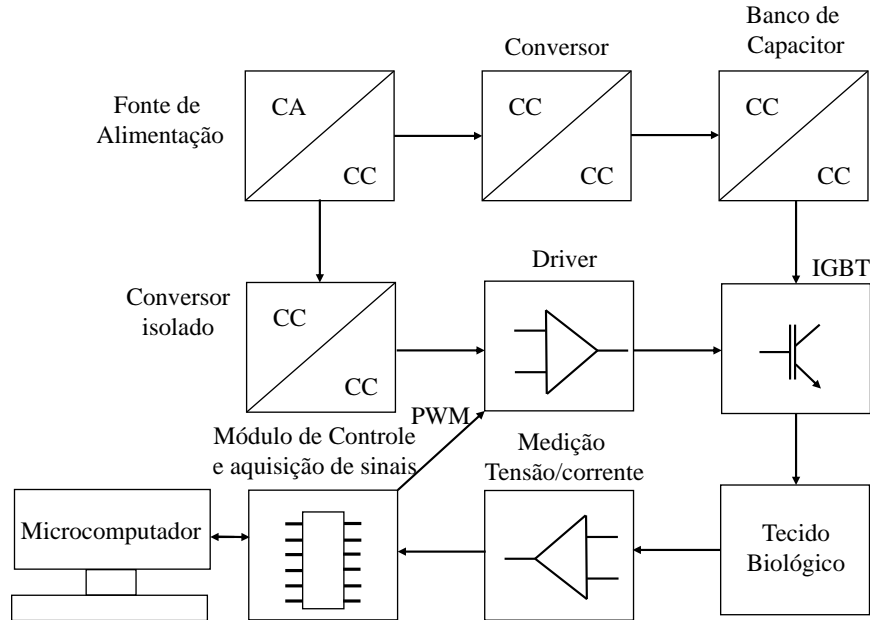
4.1.1 Eletropermeabilizador Desenvolvido

O eletropermeabilizador desenvolvido pode alcançar 800 V, para isso foi utilizado um conversor DC-DC com tensão de entrada de até 16 V e tensão de saída variável de 90 V até 800 V (ZVS, 2019). Como o conversor não consegue fornecer instantaneamente a corrente necessária, optou-se por carregar um banco de capacitor com a capacitância total de 940 μF . Para aplicar os pulsos de tensão, foi utilizado um IGBT IRG4PH40UD que possui uma tensão de ruptura de 1200 V, permite circular uma corrente 21 A e o tempo de acionamento mínimo é de 81 ηs (RECTIFIER, 2019). O acionamento do IGBT é realizado com o *driver* DRO100S25A (SUPPLIER, 2019). A Figura 11 apresenta o esquemático do eletropermeabilizador. A Figura 12 apresenta o protótipo construído.

4.1.2 Sensores de Tensão e Corrente

A medição da tensão aplicada sob o tecido biológico foi realizada com um divisor resistivo e um amplificador de instrumentação INA 163 da Texas Instruments ®. O INA 163 apresenta densidade de ruído de $1 \eta V/\sqrt{Hz}$ em 1 kHz e banda passante de 800 kHz com ganho de 100 V/V. O divisor resistivo promove uma redução linear da forma de onda aplicada na amostra, permitindo o acoplamento desse sinal as entradas do amplificador de instrumentação. A tensão aplicada a carga pode variar de 90 V até 800 V. Assim foi proposto 3 faixas de medições tensão (90 V - 300 V), (300 V - 600 V) e (600 V - 800 V) afim de obter qualidade no sinal de saída aumentando a relação sinal-ruído. O usuário

Figura 11 – Esquemático do Eletropermeabilizador desenvolvido. A fonte de alimentação fornece energia tanto para o conversor quanto para conversor isolado que irá alimentar o *driver* de acionamento da chave IGBT.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

define qual divisor utilizar. A máxima tensão para qualquer caso deve ser 3,3 V sendo essa a tensão máxima na entrada do conversor analógico-digital.

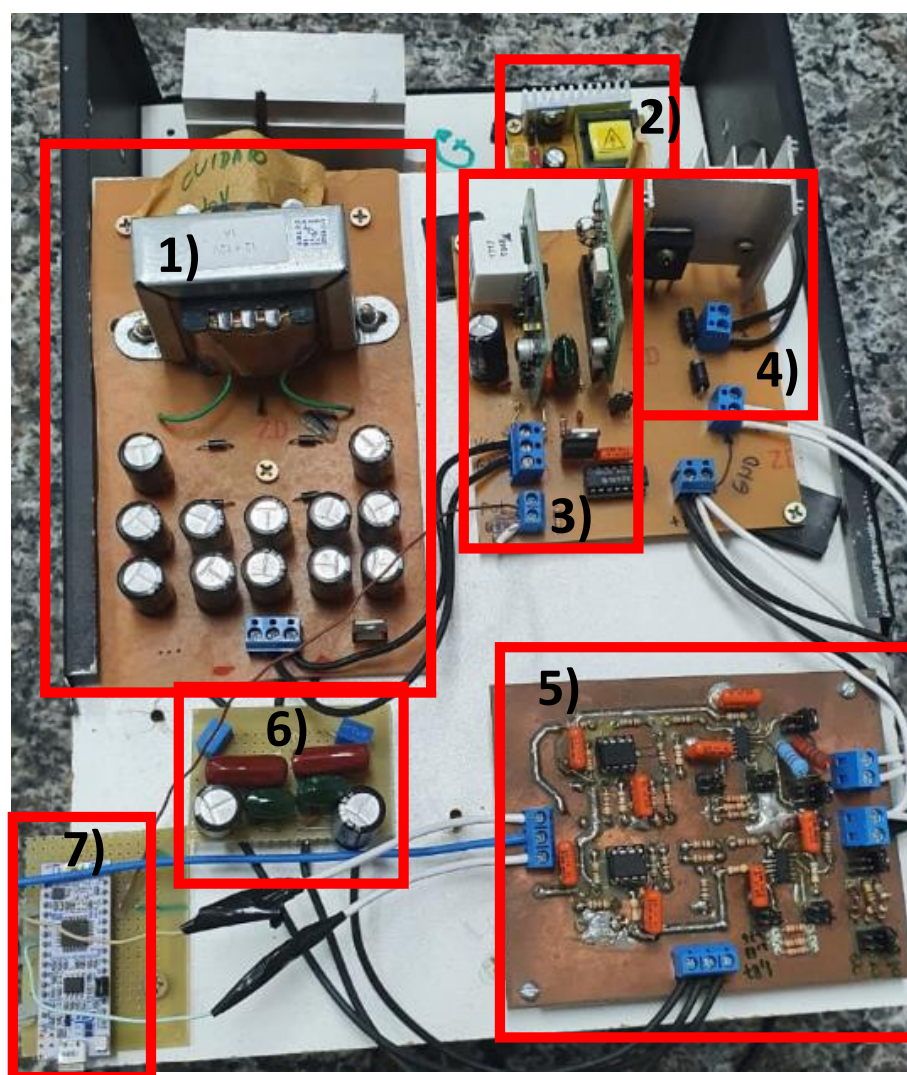
A medição da corrente foi realizada com resistor *shunt* ligado ao amplificador de instrumentação INA 163 da Texas Instruments®. Assim como no transdutor de tensão, a medição da corrente conta com 3 resistores *shunt* para a leitura de correntes nos seguintes intervalos (0 - 2 A), (2 A - 5 A) e (5 A - 10 A). A máxima tensão de saída do transdutor e corrente deve ser 3,3 V.

Na alimentação dos amplificadores, foram implementados filtros passa-baixas conforme recomenda os fabricantes para a eliminação de ruídos da fonte de alimentação. A Figura 13 apresenta o esquemático dos sensores de tensão e corrente utilizados neste projeto.

4.1.3 Aquisição de dados

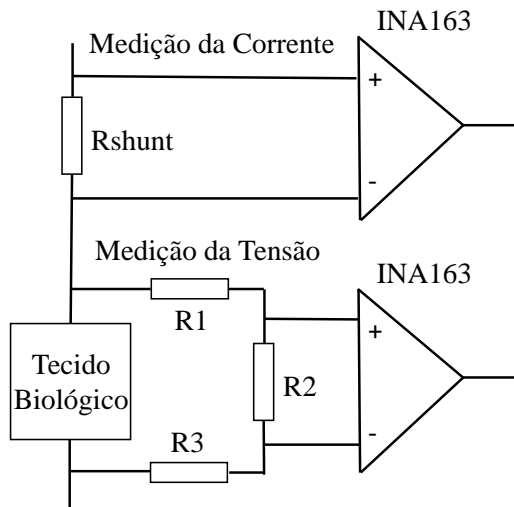
Para a aquisição de dados foi utilizado a plataforma NUCLEO-F303K8 sendo composta por um processador ARM® Cortex® M4, conversor analógico-digital de 12 bits com velocidade de 5 MSps, 64 Kbyte de memória RAM e periférico de comunicação USART (9 Mbit/s) (ST, 2019).

Figura 12 – Protótipo do eletropermeabilizador construído. 1) Fonte de alimentação com retificação de ponte completa; 2) Conversor DC-DC (16 V-800 V); 3) *Driver* de acionamento do IGBT; 4) Chave IGBT; 5) Sistema de medição de tensão e corrente e condicionamento de sinais; 6) Filtros analógicos RL na alimentação DC; 7) Plataforma NUCLEO F303K8.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Figura 13 – Esquemático dos sensores de tensão e corrente. Foram utilizados resistores de filme de carbono.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

A plataforma NUCLEO opera em conjunto com o *software* MatLab®. No MatLab®, o usuário determina as características do protocolo (Número de pulsos, tempo em nível alto, tempo em nível baixo, frequência de amostragem), tais informações são enviadas a plataforma que gera os sinais de PWM e aplica no *driver* que aciona o IGBT. Ao mesmo tempo, os conversores analógicos digitais operam salvando os valores da conversão na memória RAM. Após o término do protocolo, os dados da conversão são enviados ao MatLab® para análise.

Com os dados no MatLab® é aplicado as transformações de ganho e calibração dos sinais recebidos e então são salvos.

4.1.4 Leitura da temperatura

Para a leitura da temperatura na superfície da amostra foi utilizada uma câmera térmica da FLIR®, modelo FLIR C2. A câmera foi posicionada a 5 cm da amostra. A aquisição de dados foi realizada com o *software* FLIR tools plus, cuja a taxa de amostragem é de 2,5 imagens por segundo. A exatidão da câmera é de $\pm 2^\circ\text{C}$ (FLIR, 2019).

5 AMOSTRAS BIOLÓGICAS E PROTOCOLO DE ELETROPERMEABILIZAÇÃO

Foram realizados experimentos com duas espécies de animais: coelhos e ratos.

5.1 AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE COELHOS

Foram utilizadas amostras de fígado, rim e coração de coelhos da linhagem Leporidae, espécie *Oryctolagus cuniculus*. Sendo utilizado 12 animais para a obtenção dos resultados. Os órgãos foram obtidos da aula de Técnica Operatória do curso de Medicina da Universidade da Região de Joinville - UNIVILLE. Todos os procedimentos realizados com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso de Animais - CEUA/UNIVILLE, (processo 02/2019). Após o uso das amostras, as mesmas foram armazenadas em saco de lixo infectante e congeladas até a coleta da empresa Engepas Industrial para a incineração do material. O tempo máximo do uso dos tecidos após a eutanásia dos animais foi de 2 horas.

Os órgãos foram fracionados com a finalidade de aumentar o número de amostras. Assim as amostras de fígado e rim obtinham arestas de 20 mm x 20 mm x 10 mm. O coração não possui uma estrutura homogênea sendo *oco* seu interior devido os átrios e ventrículos. Dessa forma, tal órgão foi fragmentado ao meio, tendo dimensões de 10 mm x 10 mm e 5 mm de espessura.

O protocolo de eletropermeabilização empregado em tratamentos quimioterápicos consiste na aplicação de 8 pulsos, com duração de 100 μ s e intervalo de 1 s entre os pulsos (MIKLAVČIČ et al., 2014). Contudo, o objetivo desse trabalho é avaliar se o modelo de eletropermeabilização utilizado, representa de maneira confiável todas as variações apresentadas pelos seguintes protocolos:

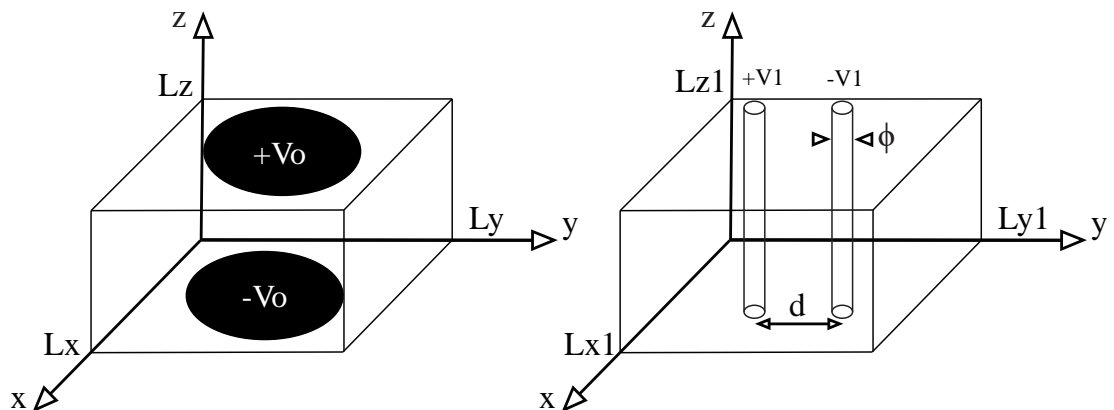
- Protocolo A) 10 pulsos de tensão, tempo em nível alto/baixo 99,5 μ s, tempo de subida/descida 0,5 μ s. Amplitude das tensões: 200 V, 500 V e 800 V.
- Protocolo B) 10 pulsos de tensão, tempo em nível alto/baixo 9,5 μ s, tempo de subida/descida 0,5 μ s. Amplitude das tensões: 200 V, 500 V e 800 V.
- Protocolo C) Rampa de tensão, com aumento linear variando de 0 V a 400 V, configurados nos tempos de: 100 μ s, 200 μ s, 300 μ s, 400 μ s, 500 μ s, 600 μ s, 700 μ s, 800 μ s e 2400 μ s.
- Protocolo D) 2 pulsos de tensão, tempo em nível alto 100 μ s, tempo em nível baixo ajustável de 1 s até 10 s, tempo de subida/descida 0,5 μ s. Amplitude da tensão: 720 V.

No Protocolo A) o objetivo é verificar se o modelo é capaz de representar o fenômeno da memória da eletropermeabilização. No Protocolo B) com o aumento da frequência fundamental para 50 kHz, pretende visualizar o efeito da dispersão dielétrica presente nos tecidos biológicos. Com o Protocolo C), pretende-se testar o modelo com outra forma de onda de tensão.

Para a aplicação dos protocolos A), B) e D), foi utilizado um sistema de um par agulhas paralelas de aço inox separadas por uma distância de 5,4 mm. As agulhas possuem um diâmetro de 0,6 mm e altura de 15 mm. Assim, os campos máximos obtidos são: 370 V/cm, 926 V/cm, 1333 V/cm e 1481 V/cm para as tensões de 200 V, 500 V, 720 V e 800 V respectivamente.

No protocolo C), utilizou-se de dois sistemas para aplicação do campo elétrico: Eletrodos de placas paralelas circulares com diâmetro de 15 mm e espaçamento de 3 mm. Tal sistema foi confeccionado com placas de circuito impresso sendo o cobre coberto por uma camada de ouro; Um par de eletrodos de agulhas paralelas com espaçamento de 2,8 mm, diâmetro das agulhas de 0,7 mm e altura de 10 mm. O eletropermeabilizador utilizado para a aplicação da tensão na forma de rampa foi desenvolvido durante a dissertação de mestrado (WEINERT, 2017). A Figura 14 apresenta a geometria de eletrodos utilizada.

Figura 14 – Eletrodos utilizados na aplicação de campo elétrico.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

5.2 AMOSTRAS BIOLÓGICAS DE RATOS

Devido as dimensões dos tecidos foi utilizado apenas o fígado de rato da linhagem Wistar e espécie isogênico entre 2 a 3 meses de idade. Os procedimentos experimentais foram realizados sob autorização do processo CEUA/UNIVILLE (02/2019) comentado na seção anterior. Cada fígado foi fragmentado na forma de um retângulo com arestas de 15 mm e espessura de 3 mm, sendo utilizado 11 animais para a obtenção dos resultados.

Os seguintes protocolos de eletropermeabilização foram aplicados no fígado de rato, com o eletropermeabilizador desenvolvido na dissertação de mestrado, pois, o eletropermeabilizador de até 800 V estava em desenvolvimento quando as amostras biológicas estavam disponíveis.

- Protocolo E) 10 pulsos de tensão, tempo em nível alto 452 μ s, tempo em nível baixo 472 μ s, tempo de subida 41 μ s, tempo de descida 28 μ s. Amplitude das tensões 200 V, 300 V e 400 V. Aplicado com os eletrodos de agulhas paralelas com espaçamento de 2,8 mm, obtendo campos máximos de 714 V/cm, 1071 V/cm e 1428 V/cm para as tensões de 200 V, 300 V e 400 V respectivamente.
- Protocolo F) 2 pulsos de tensão, tempo em nível alto 452 μ s, tempo em nível baixo ajustável de 1 ms até 6 s, tempo de subida 41 μ s, tempo de descida 28 μ s. Amplitude das tensão 400 V. Aplicado com eletrodos de placas paralelas circulares com diâmetro de 15 mm.

O uso do Protocolo E) permite avaliar se o modelo é capaz de representar a memória da eletropermeabilização para esse tipo de tecido. O Uso do Protocolo D) e F) é para obter experimentalmente o tempo de recuperação dos poros na membrana.

5.3 MEMÓRIA DA ELETROPERMEABILIZAÇÃO

O tempo de recuperação da membrana celular é algo pouco discutido na literatura. Alguns trabalhos relatam que esse processo é lento e pode levar de minutos a horas (ROLS; TEISSIÉ, 1990), (NEUMANN et al., 1998), (PAKHOMOV et al., 2009). Alguns estudos preliminares apontam que o fechamento lento dos poros é devido a peroxidação lipídica, uma oxidação degenerativa dos lipídios (REMS et al., 2019). A microscopia eletrônica de rápido congelamento é uma técnica que foi utilizada para determinar o tamanho dos poros e o tempo de fechamento dos poros. Essa técnica foi utilizada em 1990 e é extremamente complexa e envolve diversos recursos que não estão disponíveis para essa pesquisa. O que há disponível são as formas de onda da corrente. Para uma avaliação quantitativa do tempo de recuperação da membrana celular, foram aplicados o Protocolo D) e o Protocolo F). O tempo entre pulsos foi configurado nos seguintes intervalos para o Protocolo D): de

1 s, 2 s, 3 s, 4 s e 10 s para fígado de coelho e de 1 s para rim e coração de coelho. Para o Protocolo F) foram utilizados os seguintes tempos: 1 ms, 10 ms, 50 ms, 100 ms, 300 ms, 500 ms, 700 ms, 900 ms, 1 s, 2 s, 3 s, 4 s, 5 s e 6 s para amostras de fígado de rato. Para avaliar se houve a recuperação da membrana é realizado uma comparação percentual entre a média da corrente obtida entre os dois pulsos. Quanto menor a diferença percentual maior é a recuperação dos poros no intervalo entre os pulsos.

Para as amostras de fígado de rato foi utilizado o sistema de eletrodos de placas paralelas circulares com 15 mm de diâmetro e espaçadas de 3 mm. Para as amostras de coelho foi utilizado o sistema de agulhas com diâmetro de 0,6 mm e espaçamento de 5,4 mm.

5.4 PROPRIEDADES DO TECIDO INTACTO

As características do tecido intacto, necessárias para simulação foram obtidas com a leitura do espectro de impedância das amostras no analisador de impedância da Agilent® modelo 4294A. O analisador de impedância foi calibrado sendo realizadas duas medições: em curto circuito, obtendo os valores da resistência e indutância parasita; em circuito aberto, obtendo assim, a capacitância parasita.

As amostras dos tecidos de coelho e rato foram fracionadas com as seguintes dimensões: 20 mm x 20 mm x 3 mm. Desse modo, foram acondicionadas no sistema de placas paralelas circulares de 15 mm de diâmetro e sua espessura de 3 mm. Para a conversão para valores de condutividade e constante dielétrica foram utilizadas as seguintes relações:

$$\sigma = G \frac{d}{A} \quad (5.1)$$

$$\varepsilon_r = B \frac{d}{\omega \varepsilon_o A} \quad (5.2)$$

onde G é a condutância, B a susceptância, d a distância entre os eletrodos, A é a área dos eletrodos, ω é a frequência angular, σ é a condutividade, ε_r é a constante dielétrica e ε_o a permissividade do vácuo.

Utilizando a função de algoritmo genético do *software* MatLab® foi possível obter os parâmetros de dispersão da banda β utilizando o modelo de Cole-Cole da Equação (2.9) e minimizando o erro entre os dados obtidos com as curvas experimentais. O algoritmo genético foi configurado com os seguintes parâmetros: tamanho da população = 100, *crossover* = 0,85 e gerações = 50. Mais informações sobre o algoritmo genético por ser encontrado em (MATHWORKS, 2020).

5.5 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS COM AS AMOSTRAS DE TECIDOS BIOLÓGICOS

Após a eutanásia dos animais os órgãos foram removidos e acondicionados em uma embalagem plástica e acomodados em uma caixa térmica com gelo, a fim de preservar as propriedades do tecido até a realização dos experimentos.

Antes do experimento de eletropermeabilização as amostras biológicas foram retiradas da caixa térmica e fracionadas. A fim de obter uma homogeneidade nos tamanhos das amostras foi desenvolvido um gabarito para o corte delas. Assim as amostras estimuladas com eletrodos de agulhas possuem uma espessura de aproximadamente 10 mm; enquanto que as estimuladas com placas paralelas uma espessura de aproximadamente 3 mm. O comprimento e largura foram mantidos em aproximadamente um quadrado com arestas de 20 mm. Apenas para o coração foi utilizado tamanhos diferentes conforme descritos na seção anterior.

Após o fracionamento, com o auxílio da câmera térmica da FLIR® aguardou-se a temperatura da amostra atingir 20 °C e então foi acondicionada junto ao sistema de eletrodos. Após foi aplicado determinado o protocolo de eletropermeabilização e então a amostra foi descartada. O sistema de eletrodos foi limpo e uma nova amostra acondicionada.

Algumas amostras foram utilizadas para a obtenção das propriedades elétricas do tecido intacto. O procedimento experimental é semelhante ao descrito anteriormente, contudo ao invés de aplicar o protocolo de eletropermeabilização é realizada a leitura da impedância da amostra pelo analisador de impedância da Agilent®.

6 SIMULAÇÃO

A simulação da eletropermeabilização biológica foi realizada em dois programas: um baseado no Método do Circuito Equivalente e outro em Métodos dos Elementos Finitos sendo o COMSOL Multiphysics® licença 9201828. Foram realizadas simulações tridimensionais em ambos os métodos de cálculos. O modelo implementado em ambos os simuladores foi apresentado nas Equações (3.9) e (3.10). Os parâmetros do modelo foram obtidos com o MCE, minimizando o erro entre a corrente simulada e a corrente experimental. Tais parâmetros foram utilizados no COMSOL Multiphysics® para a obtenção da corrente elétrica com esse simulador. O ponto de partida para os valores dos parâmetros foi obtido do trabalho de Weinert et al. (2019) (WEINERT; PEREIRA; RAMOS, 2019).

O objetivo de utilizar dois simuladores não é para compará-los, e sim mostrar que o modelo de eletropermeabilização proposto é possível de ser implementado em um programa comercial. O COMSOL Multiphysics® é um programa muito sofisticado com diversos algoritmos para a rápida convergência do cálculo numérico, não seria justo uma comparação com o MCE que foi desenvolvido no âmbito acadêmico.

O *software* que utiliza o MCE foi desenvolvido pelo professor Airton Ramos em linguagem C e está disponível apenas no laboratório de eletromagnetismo da Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC. Esse programa possui algumas funcionalidades como: inclusão de modelos de dispersão de Debye ou Cole-Cole; inclusão da simulação térmica baseada na equação da transferência de calor; malha regular configurada pelo usuário; além disso, o *software* conta com instruções de ajuda e é de fácil utilização.

Para a saída de dados, o professor Airton Ramos desenvolveu um *script* para o *software* MatLab® que permite o usuário obter os dados de entrada e os resultados da simulação, com figuras de distribuições de campo elétrico, densidade de corrente, temperatura, potenciais, bem como formas de onda no domínio do tempo da corrente elétrica, condutividade entre outras funcionalidades.

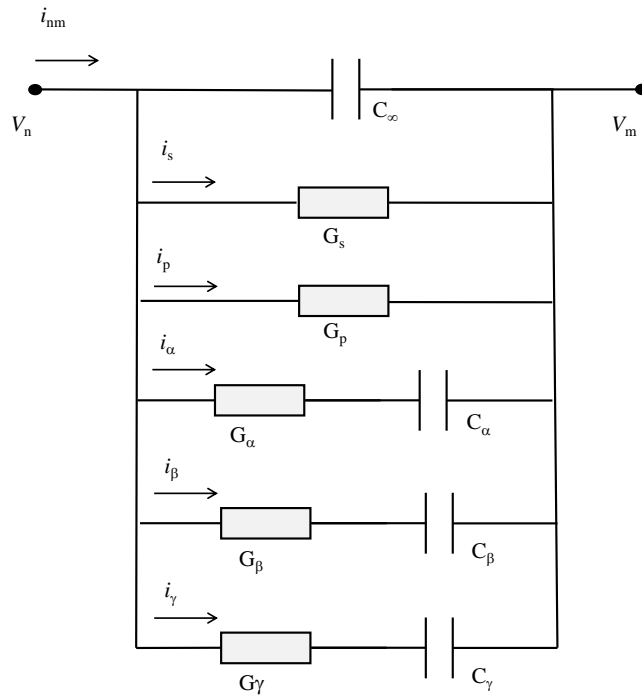
6.1 IMPLEMENTAÇÃO DO MODELO NO MCE

A inclusão do modelo de eletropermeabilização no MCE consiste em modificar a Figura 9 e a Equação (2.59), da seguinte forma, acrescentando o termo de corrente de eletroporação - i_p :

$$\sum_{m=1}^6 \left[C_{nm} \frac{d}{dt} (V_n - V_m) + (i_s + i_\alpha + i_\beta + i_\gamma + i_p)_{nm} \right] = 0 \quad (6.1)$$

No MCE, a condutividade de eletropermeabilização σ_p é calculada em cada elemento da malha em função do módulo do campo elétrico E . Após, para obter as componentes de

Figura 15 – Circuito equivalente para um material biológico com dispersões de primeira ordem com inclusão da eletropermeabilização



Fonte: Adaptado de (RAMOS e SUZUKI, 2016).

corrente é realizado a decomposição de σ_p nos eixos do sistema de coordenadas utilizando os cossenos diretores. A Figura 15, mostra o circuito equivalente para um material biológico com a inclusão da eletropermeabilização.

Com base na geometria de eletrodos apresentada na Figura 14 é necessário definir uma malha de discretização espacial, desse modo, foram implementado os seguintes protocolos:

- Protocolos A), B) e C) para eletrodos de agulhas foram configurados com a seguinte discretização: 100 divisões no eixo x e y, 10 divisões no eixo z perfazendo um total de 100000 elementos. Assim as arestas de um elemento na direção x e y possuem um comprimento de $9,9 \times 10^{-5}$ metros e na direção z 9×10^{-4} metros.
- Protocolo C) aplicado com eletrodos de placas paralelas: 100 divisões no eixo x e y, 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 $1,98 \times 10^{-4}$ metros e na direção z $9,66 \times 10^{-5}$ metros.
- Protocolo E): 50 divisões no eixo x, y e z perfazendo um total de 125000 elementos. Assim as arestas de um elemento na direção x, y e z possuem um comprimento de $9,8 \times 10^{-5}$ metros.

O passo de tempo Δt para a convergência das simulações foi de 1×10^{-7} . As propriedades térmicas apresentadas na Tabela 2 foram obtidas do *software* COMSOL Multiphysics® e o coeficiente de transferência de calor h_t do trabalho de Davalos et al. (2003) (DAVALOS; RUBINSKY; MIR, 2003). Tais propriedades são para o fígado humano. Não foram obtidos valores para os órgãos utilizados.

Tabela 2 – Parâmetros do modelo térmico

Parâmetros	Valor Tecidos	Valor Aço Inox
c_p (J/kgK)	3540	502
ρ (kg/m ³)	1079	7850
k (W/mK)	0,52	15,9
h_t (W/m ² K)*	500	

Fonte: (MULTIPHYSICS, 2019), *(DAVALOS; RUBINSKY; MIR, 2003)

6.2 IMPLEMENTAÇÃO DO MODELO NO COMSOL MULTIPHYSICS®

Para a implementação do modelo no COMSOL Multiphysics® é necessário inserir uma função matemática do tipo *dode*. A seguinte equação diferencial é incluída para a configuração no *software*:

$$e_a \frac{\partial^2 \sigma_p}{\partial t^2} + d_a \frac{\partial \sigma_p}{\partial t} = f \quad (6.2)$$

Observando o modelo proposto de eletropermeabilização, basta ajustar os termos $e_a = 0$, $d_a = 1$ e f para inserir o modelo proposto.

Foi realizada uma simulação no domínio do tempo sendo resolvida as seguintes equações da teoria eletromagnética:

$$\nabla \cdot \vec{J} = -\frac{\partial \rho}{\partial t} \quad (6.3)$$

$$\vec{J} = \sigma \vec{E} + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} \quad (6.4)$$

$$\vec{E} = -\nabla V \quad (6.5)$$

A equação da continuidade é apresentada em (6.3). A Equação (6.4) são as componentes de densidade de corrente sendo $\sigma \vec{E}$ a densidade de corrente de condução, $\partial \vec{D} / \partial t$ a densidade de corrente de deslocamento. A condutividade σ é a soma de duas componentes $\sigma = \sigma_s + \sigma_p$, onde σ_s é a condutividade estática do tecido e σ_p a condutividade de eletropermeabilização. A Equação (6.5) é a relação constitutiva entre o campo elétrico e o potencial elétrico. Observe que a parcela não conservativa do campo elétrico não foi incluída no modelo. Observe que não foi implementado a dispersão dielétrica nesse *software* comercial.

Para o cálculo térmico, é utilizada a equação de transferência de calor apresentada em (2.48). Os parâmetros do cálculo térmico são apresentados na Tabela 2.

O *software* COMSOL Multiphysics® gerou malhas com a seguinte quantidades de elementos: Protocolos A) e B) - 48969 elementos; Protocolo C) aplicado com agulhas - 39773 elementos; Protocolo C) aplicado com placas paralelas - 73428 elementos.

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 ESPECTROS DE CONDUTIVIDADE E CONSTANTE DIELÉTRICA

7.1.1 Amostras de tecido de coelho

Os espectros de condutividade e constante dielétrica são apresentados nas Figuras 16, 17 e 18, obtidos através do uso das Equações (5.1) e (5.2). São apresentados resultados de dois ensaios realizados em diferentes dias, sendo *Dados 1* e *Dados 2* os representados nas cores preta e vermelha, respectivamente. As curvas *Média* foram obtidas através de 5 medições. O termo D representa o desvio padrão. Os experimentos foram realizados na temperatura de 20 °C.

A Tabela 3 apresenta os parâmetros da banda β de dispersão do modelo de Cole-Cole, assim como a condutividade estática - σ_s . Tais parâmetros foram obtidos com o auxílio do algoritmo genético do *software* MatLab® para cada amostra individual dos tecidos analisados.

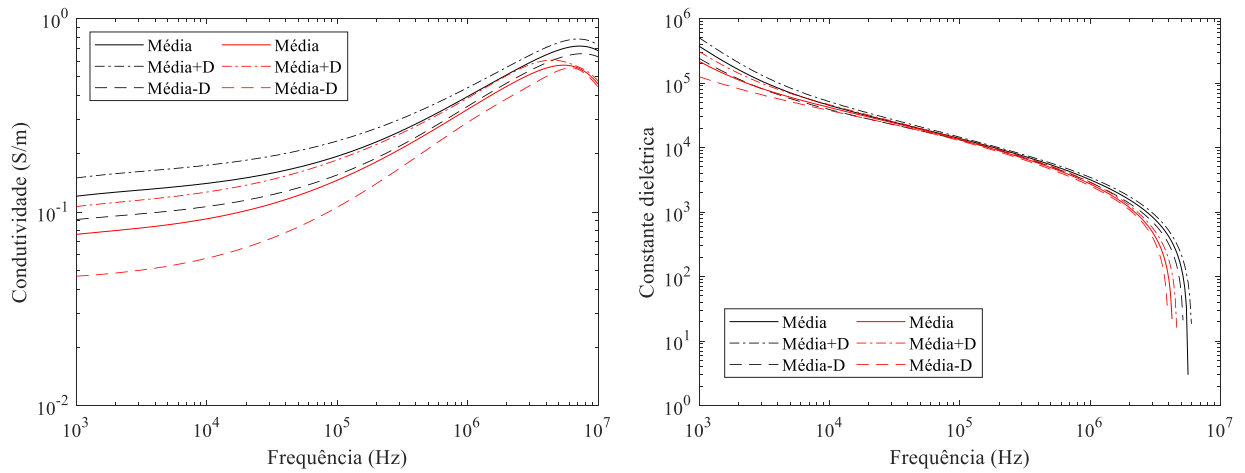
Os resultados de condutividade e constante dielétrica são apresentados a partir de 1 kHz, pois os pulsos de tensão dos protocolos aplicados em tecidos de coelho possuem a frequência fundamental em 5 kHz e 50 kHz. Além disso, a polarização de eletrodo pode ser desprezada a partir dessa frequência.

Ao observar os espectros de condutividade e constante dielétrica, fica evidente que as propriedades elétricas dos tecidos variam com a frequência e de animal para animal. Considerando a condutividade na frequência de 1 kHz e tomando como referência os *Dados 1* em relação aos *Dados 2* têm-se as seguintes variações percentuais: coração 36 %, rim 34 % e fígado 37 %. É importante destacar que o intervalo de medição entre *Dados 1* e *Dados 2* foi de 30 dias. Esse interstício nas medições pode ser uma justificativa para a variação das propriedades relacionadas a condutividade. Algumas hipóteses surgem para justificar tais diferenças: idade, alimentação, porcentagem de gordura no tecido. Outra questão é o contato dos tecidos com o eletrodo metálico, como o tecido é mole é possível que uma parcela não esteja em contato com o eletrodo levando a desvios na leitura. Apesar de tais diferenças, a ordem de grandeza e a variação espectral da condutividade dos tecidos são semelhantes sendo na frequência de 1 kHz a maior diferença percentual.

Os dados de entrada para a simulação da dispersão dielétrica no MCE são apresentados na Tabela 3, sendo os *Dados 1* utilizados para simular os Protocolos A) e C) e os *Dados 2* para o Protocolo B). Observe que são utilizados os dados de condutividade. O único parâmetro de constante dielétrica utilizado é o ε_∞ sendo configurado com o valor de 1000. A constante dielétrica em altas frequências influencia apenas a corrente de deslocamento; como o tecido é considerado homogêneo, isso não interfere na distribuição de campo elétrico e densidade de corrente de condução. Além disso, os valores da condutividade e

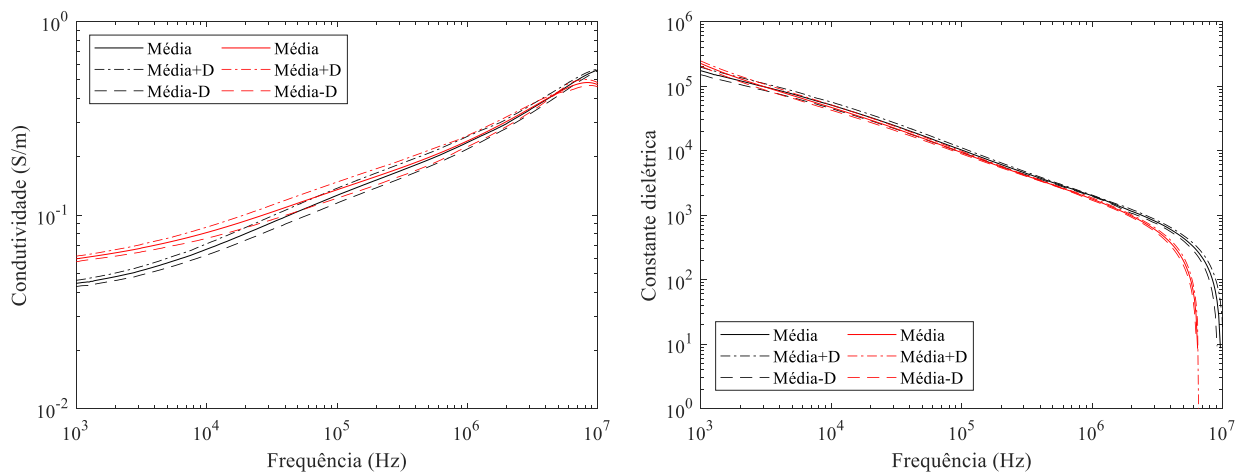
constante dielétrica acima de 5 MHz não são confiáveis devido a impedância parasita não ser totalmente compensada no procedimento de calibração do analisador de impedâncias. Contudo, devido a frequência utilizada nos protocolos de eletropermeabilização, a energia das componentes espectrais nas altas frequências (acima de 1 MHz) são desprezíveis. O valor de ε_{∞} determina o menor tempo de relaxação; assim, o passo de tempo deve ser limitado a um décimo desse valor para garantir a convergência no processo de cálculo no MCE.

Figura 16 – Condutividade e constante dielétrica do coração de coelho



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

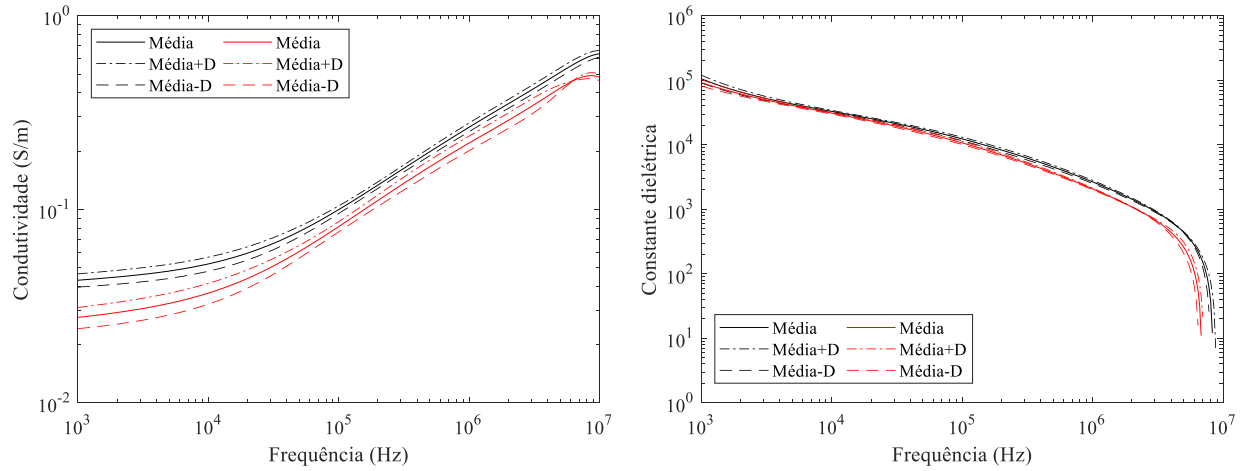
Figura 17 – Condutividade e constante dielétrica do rim de coelho



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Os parâmetros da Tabela 3 possuem a mesma ordem de grandeza aos apresentados no trabalho de Gabriel et al. (1996) (GABRIEL; LAU; GABRIEL, 1996) para tecidos de origem bovina, mostrados na Tabela 1. Uma diferença ocorre na apresentação dos

Figura 18 – Condutividade e constante dielétrica do fígado de coelho



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Tabela 3 – Parâmetros do modelo de dispersão obtidos com o Algoritmo Genético para amostras de tecido de coelho. Os parâmetros são apresentados em Média \pm Desvio Padrão, os termos com * são referentes as amostras dos *Dados 2*.

Parâmetros	Coração	Rim	Fígado
σ_s^* (S/m)	$0,0819 \pm 0,0119$	$0,0689 \pm 0,0252$	$0,0292 \pm 0,0076$
$\Delta\sigma^*$ (S/m)	$0,0563 \pm 0,0054$	$0,044 \pm 0,0031$	$0,0518 \pm 0,0044$
$\tau_3(\mu s)^*$	$11,3 \pm 2,34$	$14,0 \pm 1,88$	$8,88 \pm 1,14$
β^*	$0,45 \pm 0,0187$	$0,36 \pm 0,022$	$0,40 \pm 0,022$
σ_s (S/m)	$0,127 \pm 0,0327$	$0,0589 \pm 0,0030$	$0,0475 \pm 0,0166$
$\Delta\sigma$ (S/m)	$0,076 \pm 0,0079$	$0,0479 \pm 0,0076$	$0,0957 \pm 0,023$
$\tau_3(\mu s)$	$7,93 \pm 0,61$	$11,1 \pm 1,88$	$7,17 \pm 0,71$
β	$0,41 \pm 0,032$	$0,39 \pm 0,027$	$0,37 \pm 0,040$

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

dados. No trabalho de Gabriel et. al. (1996), é apresentado a amplitude da dispersão na permissividade $\Delta\epsilon$ e neste trabalho é apresentado o $\Delta\sigma$ devido a entrada de dados no MCE. Contudo, tais termos são relacionados pela seguinte expressão (Böttcher; BordeWIJK, 1973):

$$\Delta\sigma = \frac{\epsilon_o \Delta\epsilon}{\tau} \quad (7.1)$$

Outra semelhança está nos dados de σ_s também presentes nos modelos de eletro-permeabilização estático e dinâmico propostos por outros grupos de pesquisa. O trabalho de Sel et al. (2005) apresentam o valor de σ_s entre 0,027 S/m e 0,091 S/m para fígado de coelho (Sel et al., 2005). Para rins de porco o valor de σ_s é entre 0,012 S/m e 0,03 S/m (NEAL et al., 2012). Para fígado bovino o valor apresentado por Langus et al. (2016) foi

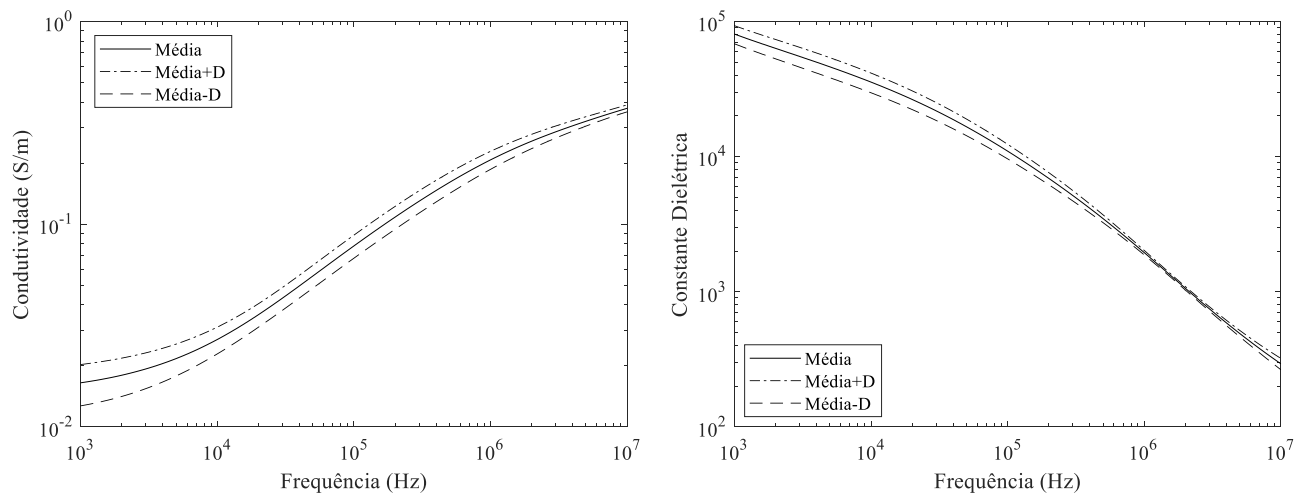
de 0,065 S/m (LANGUS et al., 2016).

7.1.2 Amostras de fígado de rato

Os espectros de condutividade e constante dielétrica para o fígado de rato são apresentados na Figura 19 cujas médias (*Média*) e desvio padrão (*D*) são oriundas de 7 amostras. Os parâmetros de dispersão foram obtidos da mesma forma aos apresentados para os tecidos do coelho e possuem os seguintes valores de média e desvio padrão: $\sigma_s = 0,0173 \pm 0,0039$ (S/m), $\Delta\sigma = 0,0524 \pm 0,008767$ (S/m), $\tau_3 = 10,6 \pm 1,15(\mu s)$ e $\beta = 0,37 \pm 0,020$.

Apesar de diferentes espécies, há semelhança entre os espectros de fígado de rato e coelho. Contudo, é necessário cuidado com a generalização dos espectros. Assim, caso se deseje obter uma simulação realista dos fenômenos elétricos que ocorrem no tecido recomenda-se o levantamento das propriedades elétricas conforme foi apresentado nesse trabalho.

Figura 19 – Condutividade e constante dielétrica do fígado de rato



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

7.2 CURVAS EXPERIMENTAIS E SIMULADAS DA ELETROPERMEABILIZAÇÃO EM COELHOS E RATOS

Nessa seção, são apresentados as curvas de correntes experimentais e simuladas, para os tecidos de fígado, rim e coração de coelho, além do tecido de fígado de rato. Os resultados serão apresentados em função do campo elétrico máximo que corresponde a 370 V/cm, 926 V/cm e 1481 V/cm para os potenciais de 200 V, 500 V e 800 V respectivamente. A média experimental e simulada do aumento da temperatura na superfície da amostra é apresentada para o Protocolo A) . No estímulo de 370 V/cm, o aumento de temperatura ficou na mesma ordem de grandeza do ruído térmico dificultando a interpretação desse

resultado. O aumento de temperatura foi insignificante no Protocolo B). Os Protocolos A) e B) não foram realizados no campo elétrico de 370 V/cm devido a quantidade limitada de amostras de coração. Nos gráficos dessa seção as curvas *Exp* é composta pela média de 5 amostras, *D* é o desvio padrão adicionado ou subtraído da média. Os experimentos foram realizados na temperatura de 20°C. A curva *MCE Sem Ep* é a simulação para não ocorrência do fenômeno de eletropermeabilização. As curvas *MCE* e *COMSOL* são os resultados obtidos pelos dois métodos de simulação. Vale destacar que a dispersão dielétrica não foi implementada no *software* COMSOL Multiphysics®.

7.2.1 Amostras de tecido de fígado de coelho

Ao observar as curvas de corrente experimental na Figura 20 estimuladas com o Protocolo A) para os campos elétricos de 926 V/cm e 1481 V/cm é nítido o comportamento da eletropermeabilização. Há um aumento da corrente durante o primeiro pulso, devido a criação e expansão de poros na membrana celular facilitando assim a movimentação dos íons presentes no meio. Nos pulsos subsequentes há um aumento adicional da corrente, ou seja, há um efeito de memória da eletropermeabilização onde os poros criados durante o pulso anterior não conseguem se fechar no intervalo de tempo entre os pulsos. Tal efeito se deve a peroxidação lipídica da membrana celular (REMS et al., 2019). Contudo, o aumento da corrente atinge um limite, ocorrendo a saturação do processo. Uma justificativa para a saturação é a grande quantidade de poros presentes na membrana celular. A saturação ocorre a partir do momento em que o número de poros criados apenas compensa os poros fechados no intervalo entre pulsos. Isso tende a acontecer na medida em que a condutividade inicial nos pulsos é alta.

A Tabela 4 apresenta o aumento percentual das correntes experimentais no final de cada pulso em relação ao final do pulso anterior. Nota-se que o maior aumento percentual ocorre nos quatro pulsos iniciais. São apresentados resultados para o Protocolo A) e B).

Para a curva de 370 V/cm (Figura 20a) é difícil observar a ocorrência da eletropermeabilização, devido ao fato do potencial transmembrana ser próximo ao limiar e, por isso, o fenômeno de eletropermeabilização apresentar baixa intensidade. Assim o aumento da corrente durante o pulso é mínimo ou não ocorre. Essa é uma das razões da apresentação da simulação sem a ocorrência da eletropermeabilização. Comparando as correntes (com e sem eletropermeabilização) fica evidente a ocorrência do fenômeno. A título de comparação entre as correntes simuladas no MCE com e sem eletropermeabilização temos os seguintes dados da diferença percentual da corrente ao final do primeiro pulso apresentado na Tabela 5 para os Protocolos A) e B).

No Protocolo B) o tempo de duração do pulso foi diminuído, aumentando assim a frequência fundamental da onda para 50 kHz. A Figura 21 apresenta as curvas de correntes experimentais para o fígado de coelho estimulados com esse protocolo. Nessa faixa de

Tabela 4 – Aumento percentual da corrente elétrica experimental, o termo P12 indica o aumento percentual da corrente ao final do segundo pulso em relação ao primeiro, a mesma lógica é aplicada aos demais termos. O termo Pa é o aumento percentual acumulado ao longo dos pulsos, obtido pela soma algébrica dos aumentos percentuais. Fíg é a abreviação de Fígado. Os índices a) e b) se referem as curvas dos protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) respectivamente

Ensaio	P12	P23	P34	P45	P56	P67	P78	P89	P910	Pa
Fíg. 370 V/cm a)	3,33	3,54	1,54	0,96	2,54	0,95	0,13	1,25	0,37	14,61
Fíg. 926 V/cm a)	4,20	2,72	1,55	1,40	1,40	0,85	0,78	0,70	0,70	14,30
Fíg. 1481 V/cm a)	4,51	2,43	1,97	1,87	0,75	1,45	1,04	0,83	0,67	15,53
Fíg. 370 V/cm b)	-2,37	0,78	1,07	-3,08	2,88	-1,84	4,33	-2,07	3,18	2,88
Fíg. 926 V/cm b)	4,50	2,38	1,40	0,36	3,33	0,98	1,18	0,49	1,50	16,12
Fíg. 1481 V/cm b)	2,53	3,29	2,65	1,47	1,02	1,43	0,74	0,98	0,48	14,59

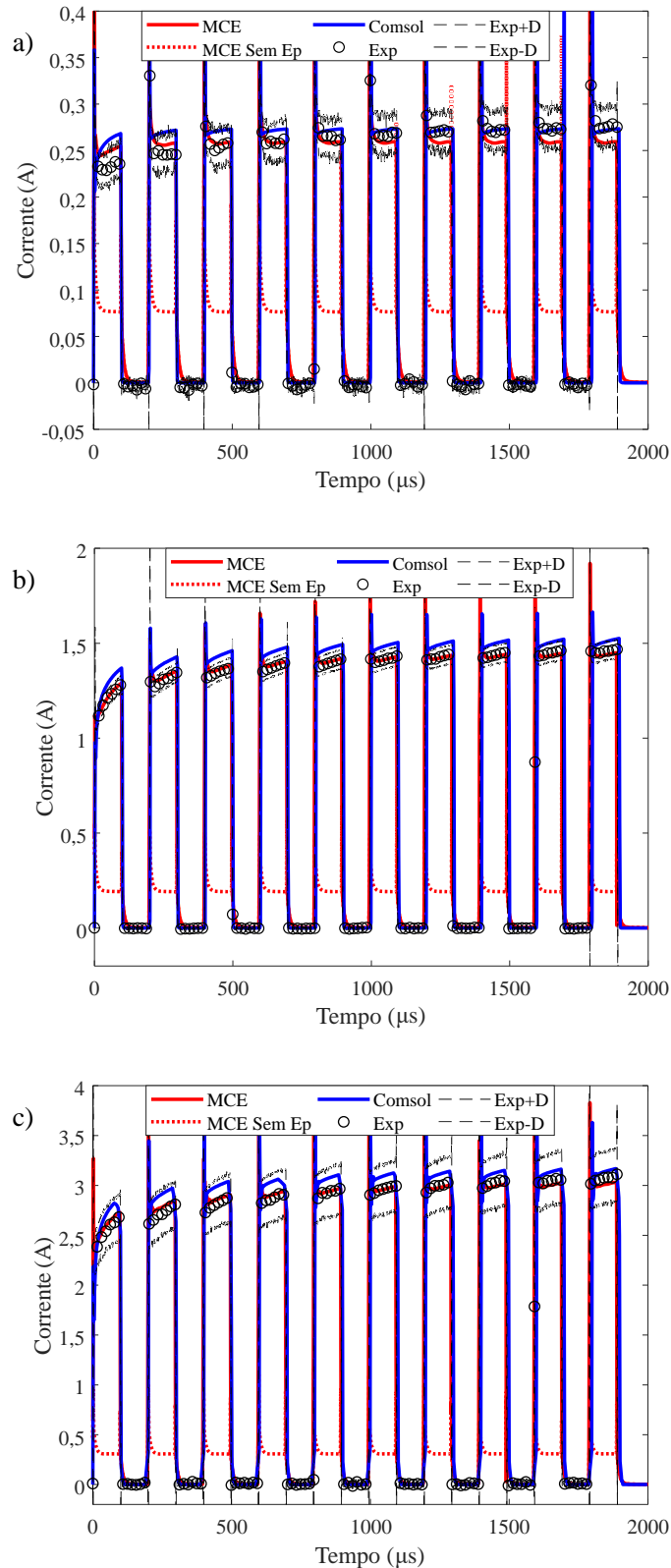
Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Tabela 5 – Aumento percentual da corrente simulada com eletropermeabilização em relação a corrente simulada sem eletropermeabilização ao final do primeiro pulso para amostras de fígado de coelho. Os índices a) e b) se referem as curvas dos protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) respectivamente

Ensaio	370 V/cm	926 V/cm	1481 V/cm
Fígado a)	235 %	575 %	792 %
Fígado b)	79 %	268 %	404 %

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Figura 20 – Forma de onda das correntes experimentais e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para amostras de fígado de coelho estimuladas com o protocolo de 5 kHz (Protocolo A), e eletrodos de agulhas. Os índices a), b) e c) são os resultados para os campos elétricos de 370 V/cm, 926 V/cm e 1481 V/cm respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

frequência as curvas experimentais de corrente praticamente não apresenta evidência da eletropermeabilização devido a intensa corrente de deslocamento que se sobrepõem à corrente resultante da abertura de poros no tecido. A simples visualização da forma de onda não é capaz de informar se a eletropermeabilização está ou não ocorrendo. Ao comparar o aumento percentual das correntes simuladas no MCE (com e sem eletropermeabilização) ao final do primeiro pulso é possível constatar a ocorrência do fenômeno conforme apresenta a Tabela 5. Apesar da ocorrência do fenômeno nota-se que o aumento da corrente devido a eletropermeabilização é inferior ao apresentado pelo Protocolo A) tal fato pode ser justificado: pela largura do pulso no Protocolo B) ser 10 % da largura do pulso no Protocolo A); o aumento da frequência e a condutividade mais elevada devido a dispersão dielétrica provoca um aumento da corrente simulada sem eletropermeabilização. A título de comparação, a resposta em frequência de células em suspensão foi avaliada por García-Sánchez et al. (2018), onde foi utilizado diferentes protocolos senoidais para avaliar o percentual de células permeabilizadas, por meio da espectroscopia de fluorescência. Até 50 kHz o percentual de células permeabilizadas é próximo a 90 %, na frequência de 100 kHz o percentual de células eletropermeabilizadas ficou menor que 20 % (GARCÍA-SÁNCHEZ et al., 2018). Tal efeito revela que a intensidade da eletropermeabilização reduz com o aumento da frequência aplicada.

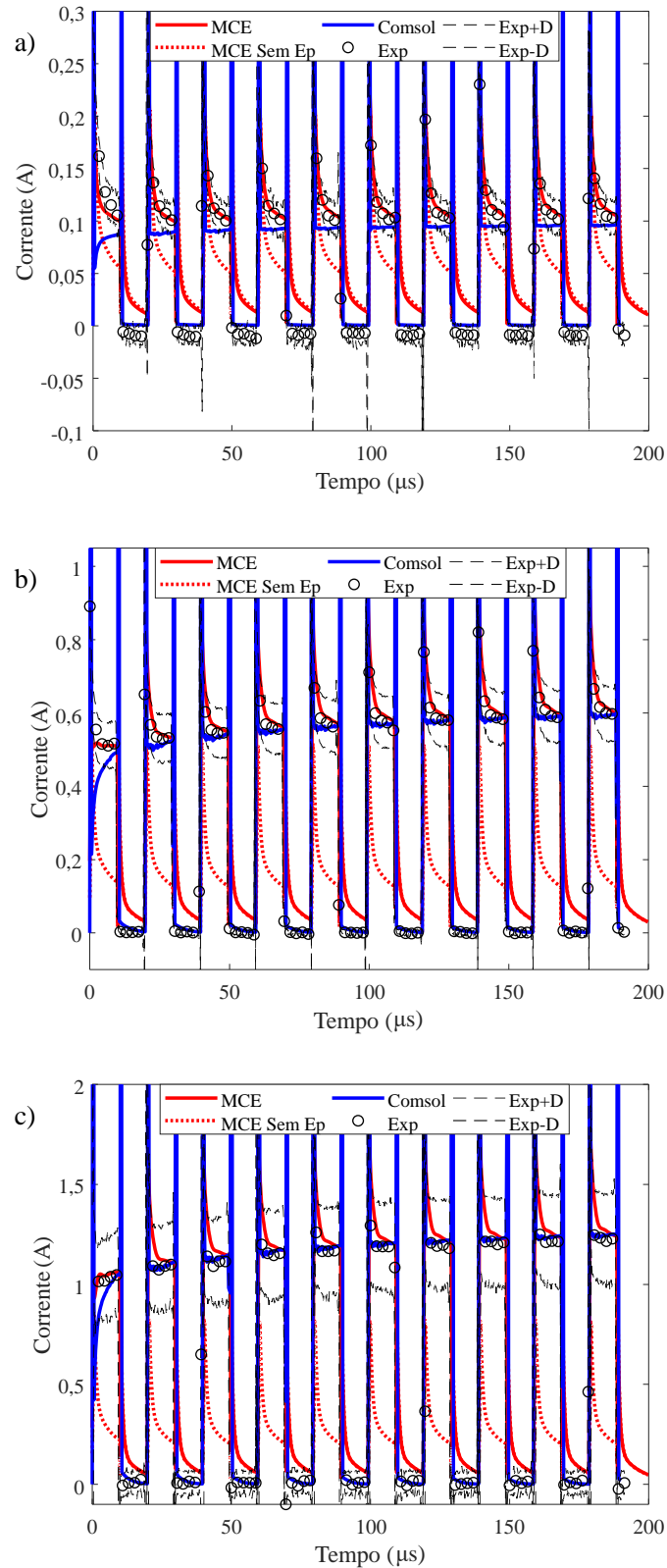
O aumento da corrente experimental entre os pulsos consecutivos ocorre para os campos elétricos de 926 V/cm e 1481 V/cm, como apresenta a Tabela 4. Tais valores apresentam flutuações, contudo, o aumento percentual acumulado é de aproximadamente 15 % entre os protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) exceto para o campo elétrico de 370 V/cm. A justificativa para essa diferença está na corrente de deslocamento que interfere muito na corrente do Protocolo B).

As correntes obtidas pela simulação com o uso do modelo proposto apresentado nas Equações (3.9) e (3.10) são semelhantes as médias dos resultados experimentais conforme apresentam as Figuras 20 e 21. A Figura 22, apresenta os erros percentuais entre as médias experimentais e as curvas de correntes obtidas por simulação para o fígado de coelho, sendo os índices a) e b) referentes ao protocolo de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) respectivamente. O erro percentual foi calculado com base no valor médio da corrente durante o pulso. Os picos devido a corrente de deslocamento foram suprimidos para o cálculo do erro.

As simulações obtidas com o MCE apresentam boa concordância com os resultados experimentais com erros abaixo de 8 %. Exceto para o primeiro pulso do Protocolo B), contudo os resultados simulados estão dentro dos desvios padrões experimentais.

As simulações obtidas com o COMSOL Multiphysics® apresentaram erros de 4 % maiores aos apresentados pelo MCE no Protocolo A). No Protocolo B) o erro atingiu 40 % para o primeiro pulso estimulado com o campo elétrico de 370 V/cm. Tais erros

Figura 21 – Forma de onda das correntes experimentais e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para amostras de fígado de coelho estimuladas com o protocolo de 50 kHz (Protocolo B), e eletrodos de agulhas. Os índices a), b) e c) são os resultados para os campos elétricos de 370 V/cm, 926 V/cm e 1481 V/cm respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

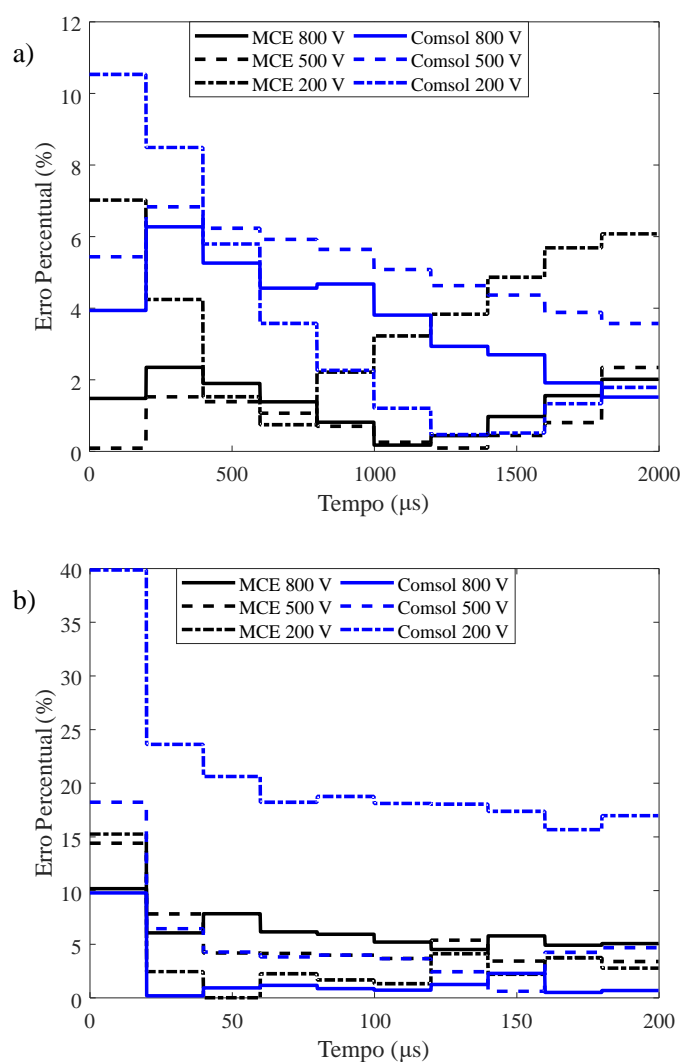
são associados a dispersão dielétrica que não está sendo modelado neste *software*. Com o aumento da frequência os efeitos dispersivos do tecido biológico não podem ser ignorados sob pena de subestimar a corrente que circula no tecido. No Protocolo A) há grande semelhança entre os resultados simulados com ambos os métodos, isso revela que a dispersão dielétrica tem menor influência nessa faixa de frequência, contudo os resultados obtidos com o MCE apresentam menor erro em comparação com os obtidos com o COMSOL Multiphysics®. Vale destacar que o objetivo do trabalho não é comparar os dois métodos numéricos, contudo, salienta-se que o tempo de simulação em ambos os simuladores ficou em torno de 10 horas para as discretizações espaciais utilizadas.

Os valores dos parâmetros utilizados nas simulações dos Protocolos A) e B) para fígado de coelho são apresentados na Tabela 6. O parâmetro σ_t foi ajustado entre os dois protocolos. Os parâmetros σ_t e E_2 foram ajustados para os diferentes níveis de tensão. Os demais parâmetros não sofreram alterações em função do protocolo ou da amplitude de campo elétrico aplicado sob o tecido. A variação de σ_t em função do Protocolo A) ou B) pode ser justificado pela diferença de animal, fato já observado nas propriedades elétricas do tecido intacto. A dependência de σ_t com a intensidade de campo elétrico aplicado é justificada devido o nível de criação de poros na membrana celular. Esse parâmetro está intimamente relacionado com a condutividade do eletrólito. É obvio que σ_t nunca atinge a condutividade do eletrólito, pois caso isso ocorra a membrana seria destruída como no fenômeno de eletropermeabilização irreversível. Além de limitar o valor de σ_p , σ_t produz uma divisão de tensão com a condutividade da membrana resultando na redução do potencial transmembrana quando a eletropermeabilização se torna intensa. O termo $\sigma_t / (\sigma_t + \sigma_p(t))$ modela esse efeito nas Equações (3.9) e (3.10). O parâmetro E_2 influencia no tempo de relaxação, ou seja, está relacionado com a abertura e fechamento dos poros na membrana. Observa-se que tal parâmetro aumenta com o aumento do campo elétrico aplicado de maneira proporcional, mantendo a mesma ordem de grandeza do quociente E/E_2 . Com o resultado obtido com os valores do parâmetro E_2 supõe-se que a velocidade de abertura dos poros sofre pouca influência da intensidade de campo elétrico aplicado sob o tecido.

A Figura 23 apresenta a média da condutividade de eletropermeabilização simulada no MCE. Os índices a) e b) se referem aos resultados para os protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) respectivamente. O volume entre os eletrodos foi considerado no cálculo da média, sendo limitado às seguintes dimensões: eixo x - de 0,0 mm e 9,9 mm; eixo y de 2,6 mm e 7,4 mm; eixo z - 0,0 mm e 9,0 mm (Figura 24). As curvas de condutividade apresentadas na Figura 23 a) e b) corroboram com as características que já foram apresentadas do fenômeno de eletropermeabilização, o aumento da condutividade durante o pulso, a diminuição entre pulsos, o efeito da memória e a saturação do processo.

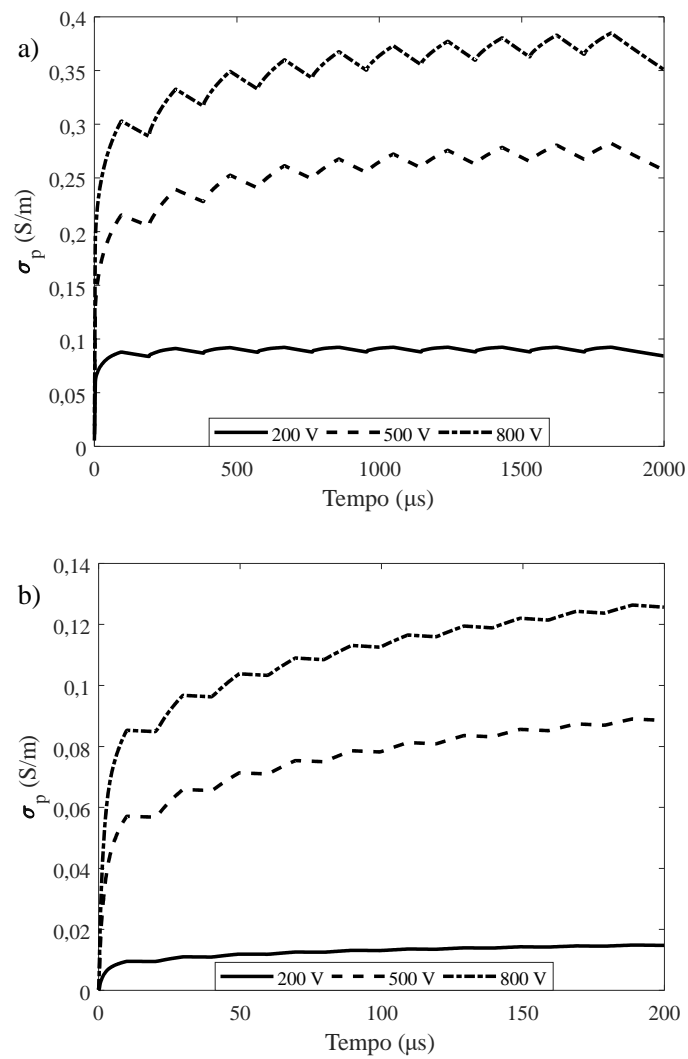
A Figura 25 apresenta as curvas de nível σ_p simulada no MCE na superfície da

Figura 22 – Erros percentuais por pulso no cálculo da corrente obtida por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para amostras de fígado de coelho estimuladas pelo protocolo de 5 kHz (protocolo A) em a) e pelo protocolo de 50 kHz (protocolo B) em b)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Figura 23 – Médias das condutividades de eletropermeabilização de amostras de fígado de coelho como função do tempo na sequência de 10 pulsos para os campos elétricos de 370 V/cm, 926 V/cm e 1481 V/cm. Protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) apresentados em a) e b) respectivamente



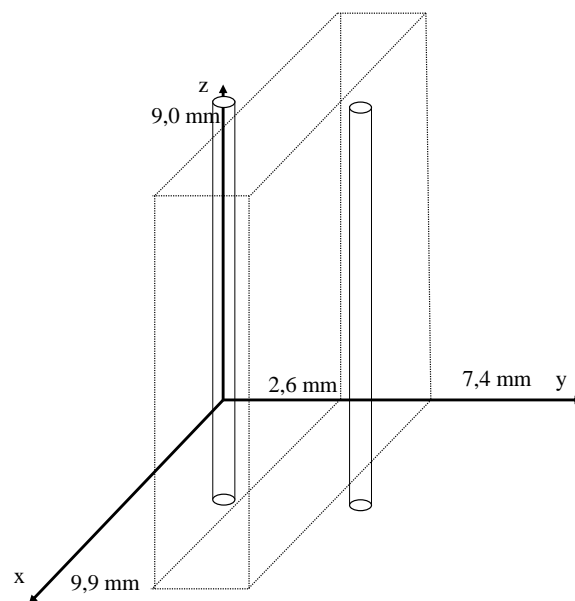
Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Tabela 6 – Parâmetros do modelo de eletropermeabilização para amostras fígado de coelho, que minimizam o erro entre as curvas numéricas e experimentais. Os índices a) e b) se referem aos protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) respectivamente

Parâmetros	Fígado 370 V/cm	Fígado 926 V/cm	Fígado 1481 V/cm
σ_o (S/m)	1×10^{-8}	1×10^{-8}	1×10^{-8}
σ_t (S/m) a)	0,135	0,350	0,465
σ_t (S/m) b)	4×10^{-2}	0,150	0,200
τ_{min} (s)	1×10^{-6}	1×10^{-6}	1×10^{-6}
$\Delta\tau$ (s)	2×10^{-3}	2×10^{-3}	2×10^{-3}
E_1 (V/m)	2300	2300	2300
E_2 (V/m)	7000	20000	30000

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

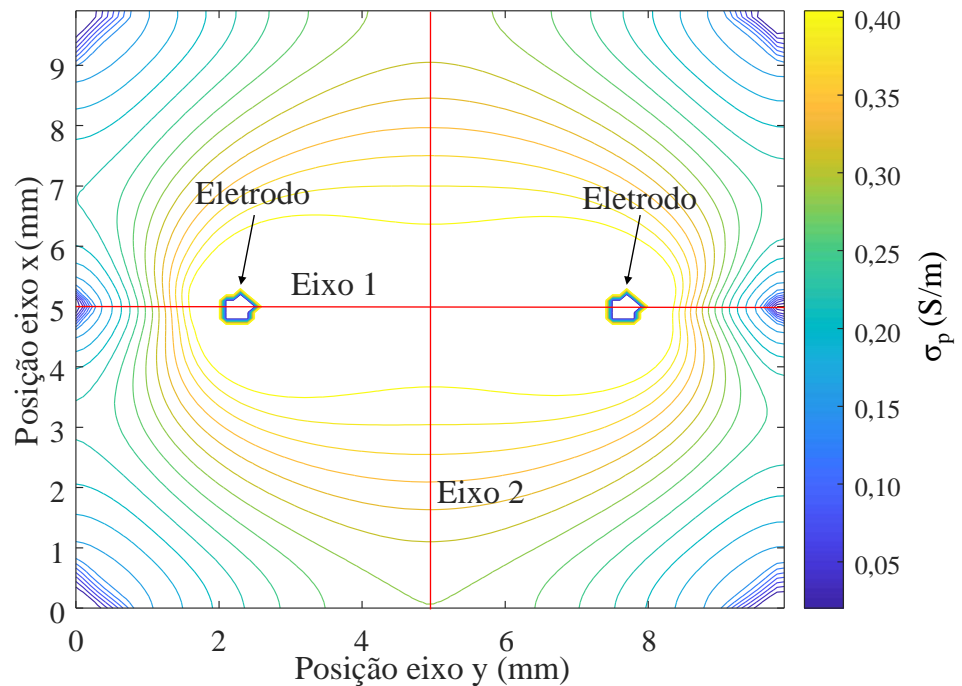
Figura 24 – Região espacial para o cálculo da condutividade de eletropermeabilização média. Os eletrodos não fazem parte dessa região



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

amostra ao final do protocolo de 5 kHz (protocolo A) estimulado com o campo elétrico de 1481 V/cm. De modo em geral a região entre e ao redor dos eletrodos atinge o valor de σ_t em todas as simulações. Com esse gráfico é possível obter a região de tecido eletropermeabilizada, sendo fundamental na elaboração de protocolos clínicos como na eletroquimioterapia.

Figura 25 – Curvas de nível de σ_p para amostras de fígado de coelho estimulada com 1481 V/cm com eletrodos de agulhas ao final do protocolo de 5 kHz (protocolo A). É destacado as posições do par de eletrodos de agulhas



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

As curvas de temperatura da superfície das amostras são apresentadas em dois eixos: *Eixo1* e *Eixo 2* conforme apresenta a Figura 25. Essa será uma análise qualitativa entre as curvas numéricas e experimentais. A razão para isso, é a baixa frequência de amostragem das imagens térmicas - 2,5 imagens por segundo. Assim, ao final do protocolo foi realizada a simulação térmica por mais 400 ms sendo apresentadas as imagens nesse instante de tempo. Esse controle não ocorre na obtenção das curvas experimentais cuja imagem foi capturada no intervalo de 0 ms e 400 ms após o início dos pulsos.

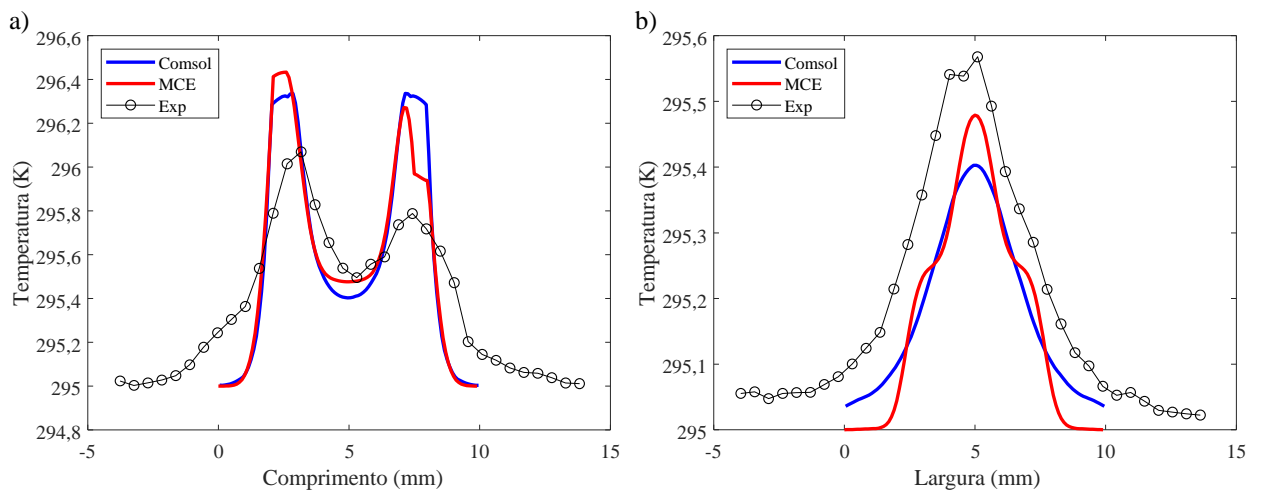
As Figuras 26 e 27 apresentam a distribuição de temperatura ao longo dos Eixos 1 e 2. Há semelhança na ordem de grandeza entre os valores simulados e experimentais. Observa-se que ao redor dos eletrodos há um aquecimento intenso, fato esse já esperado devido a intensidade do campo elétrico e a maior dissipação de potência nessa região. Comparando os programas de simulação ambos utilizam a equação de transferência de calor - Equação (2.48) e os resultados obtidos são praticamente idênticos. O objetivo da

leitura das imagens térmicas é uma contra prova a fim de verificar se o modelo proposto está realizando o cálculo de maneira correta.

A dependência da condutividade com o aumento da temperatura não foi incluída no modelo de eletropermeabilização utilizado. Ramos e Weinert (2017) (RAMOS; WEINERT, 2017) apresentam a variação dos parâmetros do modelo com o aumento da temperatura, contudo, foi verificado que sua inclusão apresenta uma diferença de 1,5% na forma de onda da corrente para o campo elétrico de 1481 V/cm. Com a finalidade de deixar o modelo mais simples, optou-se por desprezar esse efeito, visto que, o aumento da temperatura não influência de maneira significativa a forma de onda da corrente elétrica obtida.

O aumento de temperatura é uma preocupação na eletropermeabilização irreversível. Tal técnica utiliza de alta tensão fornecida em comprimentos de pulsos curtos para alterar permanentemente a permeabilidade das membranas celulares, que resulta em morte celular retardada por apoptose (DAVALOS; RUBINSKY; MIR, 2003), (DUNKI-JACOBS; PHILIPS; II, 2014). Além da destruição celular sem o uso de energia térmica, a eletropermeabilização irreversível não atinge o tecido conjuntivo subjacente, e assim, a restrição de estruturas vitais pode ser evitada (DAVALOS; MIR; RUBINSKY, 2005), (DUNKI-JACOBS; PHILIPS; II, 2014).

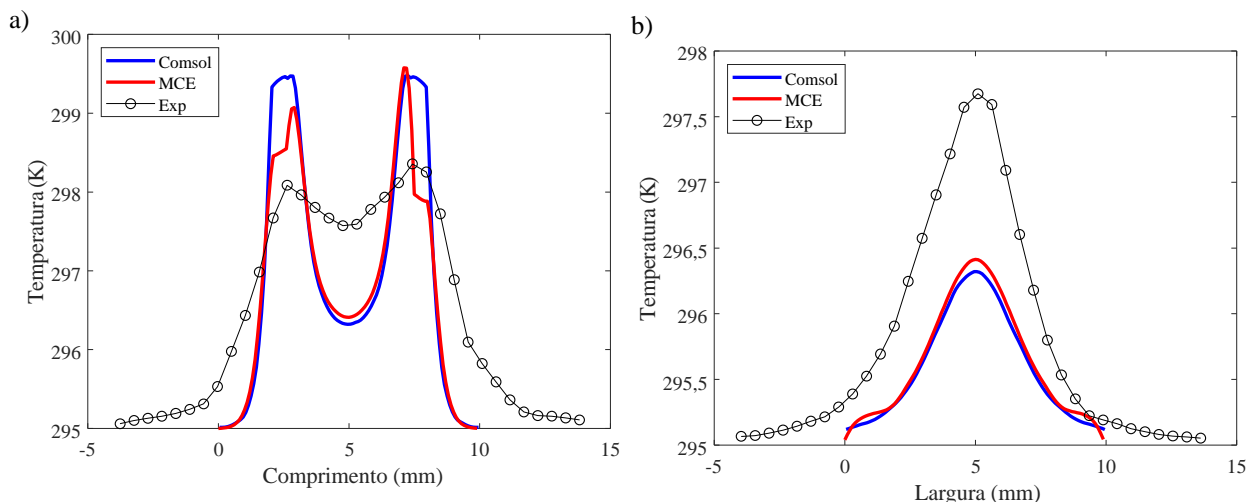
Figura 26 – Distribuição de temperatura experimental e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® na superfície da amostra de fígado de coelho estimulada com 926 V/cm do protocolo de 5 kHz (protocolo A). Os índices a) e b) se referem aos *Eixos 1 e 2* respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

O fígado de coelho também foi estimulado com rampas de tensão, aplicado com eletrodos de agulhas e placas paralelas - Protocolo C). Não foram obtidos resultados para os demais órgãos devido à quantidade limitada de amostras. Para cada rampa foram utilizadas três amostras de fígado de coelho, assim nos gráficos o termo *Exp* representa a média das aquisições.

Figura 27 – Distribuição de temperatura experimental e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® na superfície da amostra de fígado de coelho estimulada com 1481 V/cm do protocolo de 5 kHz (protocolo A). Os índices a) e b) se referem aos *Eixos 1 e 2* respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Os principais protocolos reportados na literatura são pulsos de tensão devido a sua eficiência na permeabilização de células (KOTNIK et al., 2003). O objetivo da rampa é testar o modelo de eletropermeabilização proposto com outra forma de onda e além disso com campo elétrico uniforme (eletrodo de placas paralelas).

As Figuras 28 e 29 apresentam os resultados obtidos para os eletrodos de agulha e placas paralelas respectivamente. São apresentados resultados para os tempos de subida de 100 μ s, 500 μ s e 800 μ s, embora todos os tempos destacados no Protocolo C) tenham sido realizados, o modelo conseguiu representar adequadamente todas as rampas, uma vez que os erros médios entre as curvas de correntes experimentais e simuladas flutuam em torno de 6 % conforme apresenta a Tabela 7. As formas de onda da corrente experimental apresentam dois tipos de comportamento: no início da rampa há um comportamento linear, em que a eletropermeabilização não está ocorrendo; quando o campo elétrico atinge o limiar de eletropermeabilização a derivada da corrente aumenta, mudando a inclinação da forma de onda da corrente.

Há outros trabalhos com a forma de onda de rampa de tensão, o trabalho de Pliquett et al. (2003) se utiliza de forma de onda trapezoidal com rampa de subida de 150 kV/s. A forma de onda da corrente experimental corrobora com os resultados obtidos nesse trabalho, com um comportamento linear e não linear dependendo da intensidade de campo elétrico aplicado (PLIQUETT et al., 2004). Tal efeito também é verificado em experimentos de *patch clamp* à nível celular (CRANFIELD et al., 2014), (HOILES et al., 2014).

A Figura 30 apresenta a forma de onda da corrente simulada no MCE versus o campo elétrico aplicado. Ao observar essa figura é possível verificar uma mudança na inclinação da rampa quando o campo elétrico atinge 600 V/cm, indicando o limiar de eletropermeabilização para o fígado de coelho. Kranjc e Miklavcic (2016) obtiveram por meio de simulação numérica o valor de 460 V/cm para o mesmo tecido (KRANJC; MIKLAVČIČ, 2016)

Os parâmetros de simulação $\sigma_o = 1 \times 10^{-8}$ (S/m), $\tau_o = 1 \times 10^{-6}$ (s) e $E_1 = 2300$ (V/m) são iguais para todas as simulações obtidas para os eletrodos de agulhas e placas paralelas. O parâmetro $\Delta\tau$ apresentou o valor de 2×10^{-3} (s) e 4×10^{-3} (s) para a simulação com eletrodos de agulhas e placas paralelas respectivamente. Os parâmetros σ_t e E_2 são apresentados na Tabela 8.

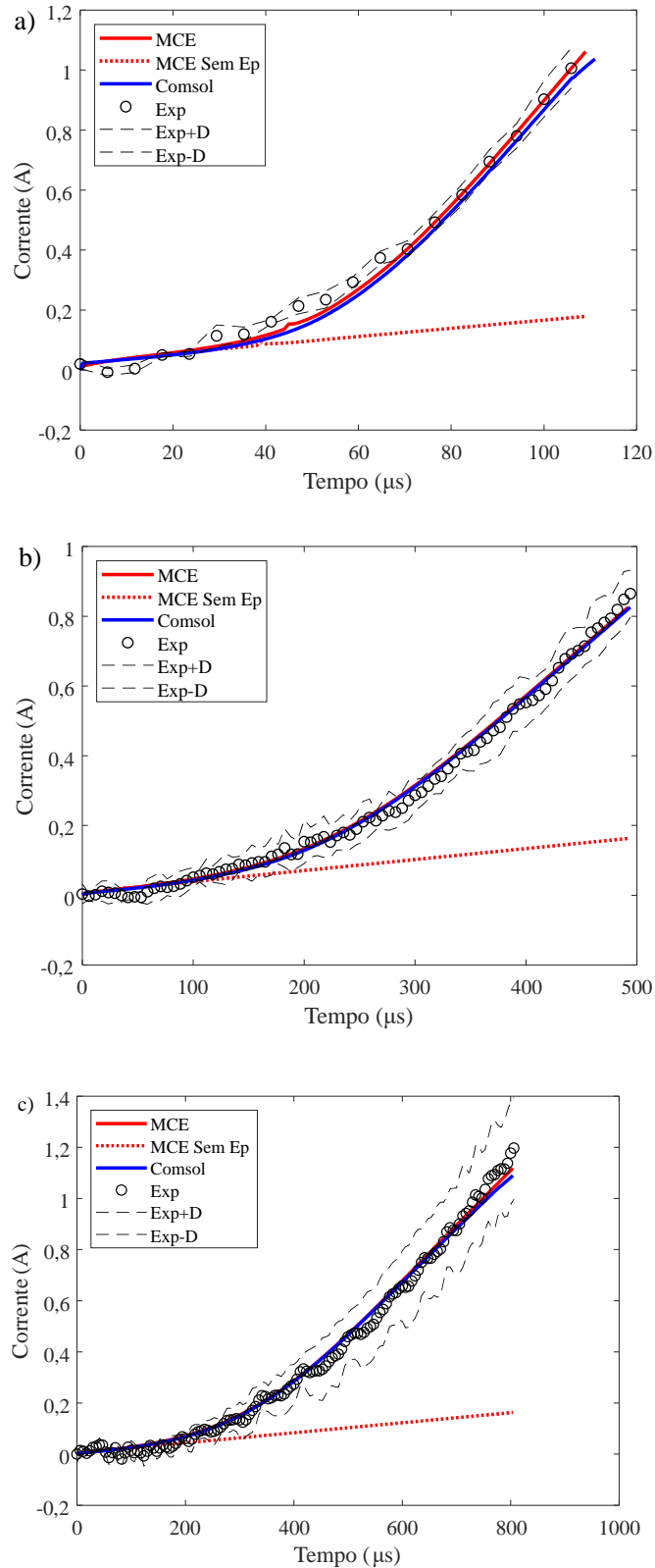
Tabela 7 – Erro médio entre as curvas de correntes experimentais e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para o Protocolo C). Os índices (*) e (+) se referem aos experimentos com eletrodos de agulha e placas paralelas circulares respectivamente

Tempo (μ s)	MCE (*)	COMSOL (*)	MCE (+)	COMSOL (+)
100	5,75	6,62	7,10	6,32
200	4,10	5,67	5,49	4,97
300	6,41	5,40	4,87	5,68
400	5,73	5,49	4,52	4,62
500	6,80	7,07	4,81	5,27
600	7,02	6,94	5,02	5,81
700	6,28	5,10	3,91	3,91
800	5,66	5,45	6,75	5,00
2400	8,15	6,65	8,38	3,14

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

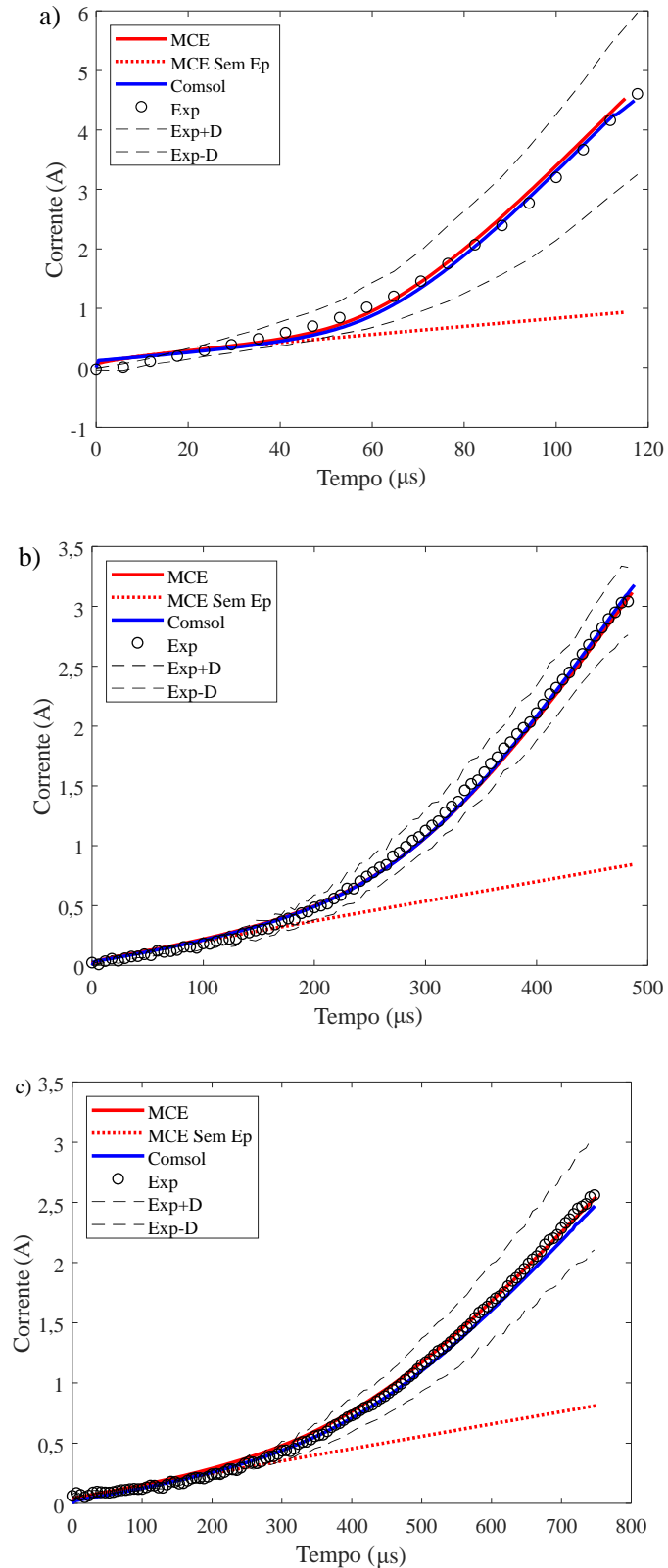
De maneira geral os parâmetros σ_t e E_2 sofreram alterações significativas entre os resultados obtidos pelas rampas de tensão com diferentes eletrodos. Tal diferença pode ser explicada pela forma de distribuição do campo elétrico entre os eletrodos. No caso dos eletrodos de agulhas o campo elétrico é não uniforme conforme apresenta a Figura 31a). O campo elétrico uniforme é obtido com eletrodos de placas paralelas como mostra a Figura 31b). Outro aspecto a ser notado é a maior intensidade de campo elétrico para os eletrodos de agulhas em comparação com os obtidos para placas paralelas para a mesma tensão de estímulo, tal fato leva a uma eletropermeabilização mais intensa, sendo necessário maiores valores de σ_t nessas simulações.

Figura 28 – Forma de onda das correntes experimentais e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para amostras de fígado de coelho estimuladas com o Protocolo C) com eletrodos de agulhas com os tempos de subida das rampas de 100 μs a), 500 μs b) e 800 μs c)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Figura 29 – Forma de onda das correntes experimentais e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para amostras de fígado de coelho estimuladas com o Protocolo C) com eletrodos de placas circulares paralelas com os tempos de subida das rampas de 100 μs a), 500 μs b) e 800 μs c)



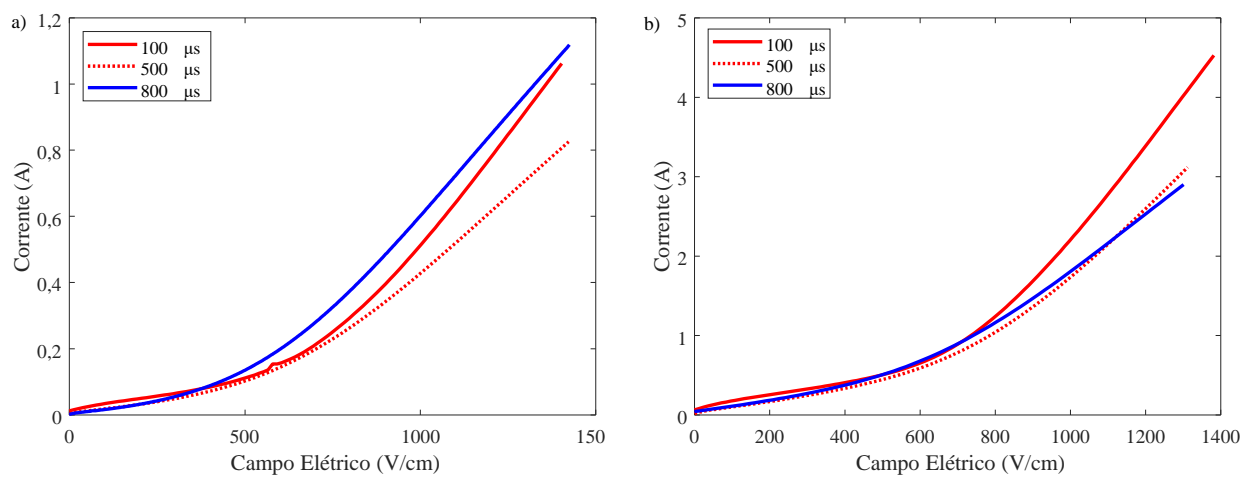
Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Tabela 8 – Parâmetros do modelo de eletropermeabilização para amostras de fígado de rato estimuladas com o Protocolo C). Os índices (*) e (+) se referem aos experimentos com eletrodos de agulha e placas paralelas circulares respectivamente

Tempo (μs)	σ_t (S/m) (*)	E_2 (V/m) (*)	σ_t (S/m) (+)	E_2 (V/m)(+)
100	0,30	35000	0,16	30000
200	0,25	35000	0,15	40800
300	0,18	35000	0,14	40800
400	0,20	35000	0,14	40800
500	0,18	40800	0,11	40800
600	0,19	40800	0,08	40800
700	0,22	40800	0,10	40800
800	0,23	40800	0,08	40800
2400	0,30	50000	0,12	40800

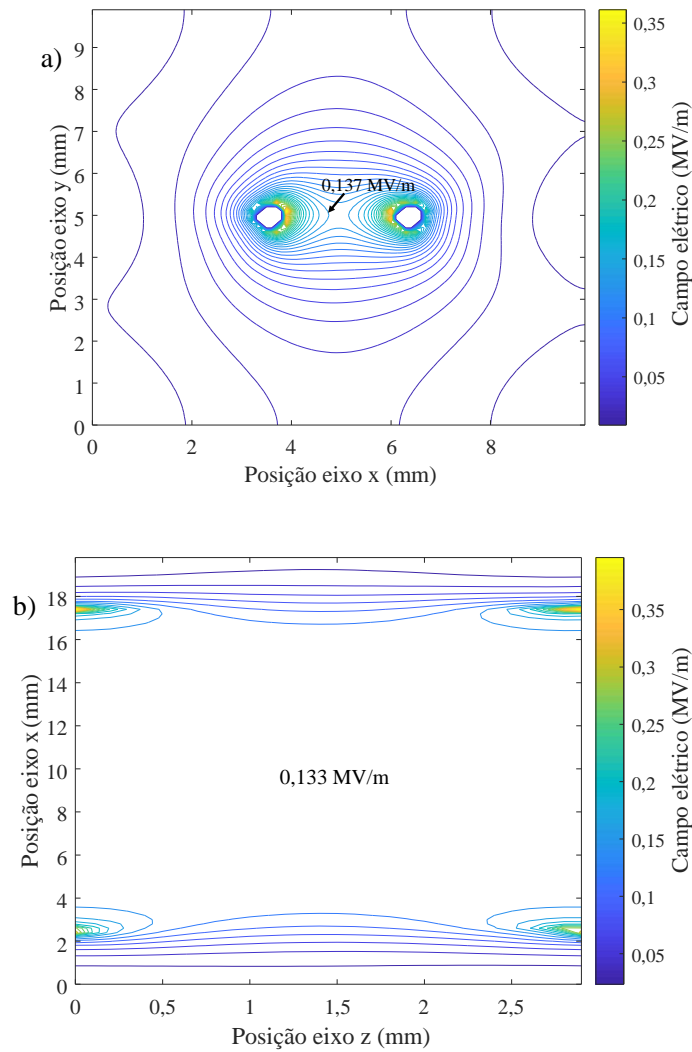
Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Figura 30 – Forma de onda das correntes simuladas no MCE versus campo elétrico para amostras de fígado de coelho estimuladas com o Protocolo C) com eletrodos de agulhas paralela em a) e placas paralelas circulares em b).



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Figura 31 – Distribuição de campo elétrico ao final da rampa de $100\ \mu\text{s}$ obtidas pelo programa MCE. a) eletrodos de agulhas e b) eletrodos de placas paralelas



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

7.2.2 Amostras de tecido de coração de coelho

Os resultados apresentados nessa seção são para as amostras de coração de coelho. De maneira geral as análises são semelhantes as já relatadas na seção anterior. Serão discutidas eventuais diferenças entre os resultados.

As Figuras 32 e 33 apresentam as curvas de correntes experimentais e obtidas por simulações com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para os protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) respectivamente. A principal diferença entre as correntes obtidas para o fígado e coração de coelho está na amplitude. Embora as correntes possuam praticamente a mesma amplitude, vale ressaltar que a espessura das amostras de fígado continham 10 mm contra 5 mm do coração. Tal resultado já era esperado uma vez que a condutividade estática obtida para as amostras de coração é aproximadamente 2,7

vezes maior que para as amostras de fígado conforme apresenta a Tabela 3.

O aumento percentual das correntes experimentais no final de cada pulso em relação ao pulso anterior é apresentado na Tabela 9. A comparação entre as corrente simuladas no MCE com e sem eletropermeabilização ao final do primeiro pulso é mostrado na Tabela 10.

Apenas os parâmetros σ_t e E_2 sofreram alterações para a obtenção dos resultados simulados no tecido de coração de coelho, eles são apresentados na Tabela 11. Os demais parâmetros são iguais aos obtidos para o fígado de coelho tendo os seguintes valores: $\sigma_o = 1 \times 10^{-8}$ (S/m), $\tau_{min} = 1 \times 10^{-6}$ (s), $\Delta\tau = 2 \times 10^{-3}$ (s), e $E_1 = 2300$ (V/m).

Tabela 9 – Aumento percentual da corrente elétrica experimental, o termo P12 indica o aumento percentual da corrente ao final do segundo pulso em relação ao primeiro, a mesma lógica é aplicada aos demais termos. O termo Pa é o aumento percentual acumulado ao longo dos pulsos. Cor é a abreviação de Coração. Os índices a) e b) se referem as curvas dos protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) respectivamente

Ensaio	P12	P23	P34	P45	P56	P67	P78	P89	P910	Pa
Cor. 926 V/cm a)	1,95	1,49	1,33	0,78	0,70	0,71	0,31	0,63	0,54	8,43
Cor. 1481 V/cm a)	2,94	1,79	1,47	1,14	0,55	1,50	0,63	0,59	1,13	11,74
Cor. 926 V/cm b)	1,34	1,32	0,29	0,87	0,50	0,50	0,36	0,28	0,21	5,67
Cor. 1481 V/cm b)	0,91	1,76	0,19	1,53	-0,38	1,14	0,00	-0,37	1,13	5,91

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

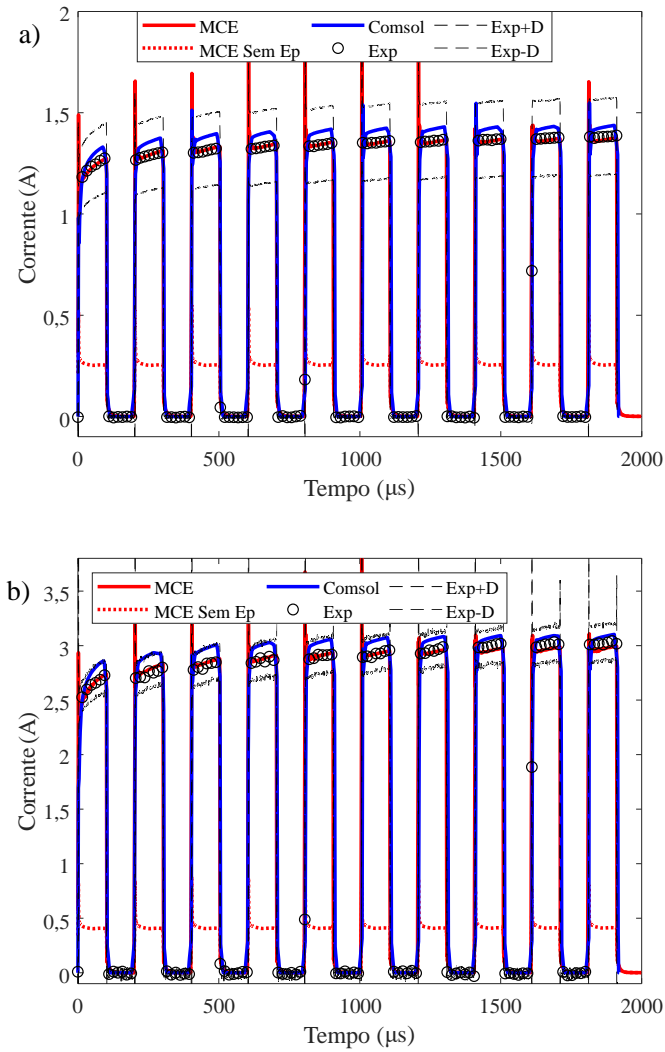
Tabela 10 – Aumento percentual da corrente simulada com eletropermeabilização em relação a corrente simulada sem eletropermeabilização ao final do primeiro pulso para amostras de coração de coelho. Os índices a) e b) se referem as curvas dos protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) respectivamente

Ensaio	926 V/cm	1481 V/cm
Coração a)	402 %	575 %
Coração b)	466 %	540 %

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

A Figura 34 apresenta os erros percentuais por pulso no cálculo da corrente obtida por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para amostras de coração de coelho para os protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B). As correntes simuladas obtidas com o programa MCE obtiveram erros percentuais abaixo

Figura 32 – Forma de onda das correntes experimentais e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para amostras de coração de coelho estimuladas com o protocolo de 5 kHz (Protocolo A), e eletrodos de agulhas. Os índices a), b) e c) são os resultados para os campos elétricos de 370 V/cm, 926 V/cm e 1481 V/cm respectivamente



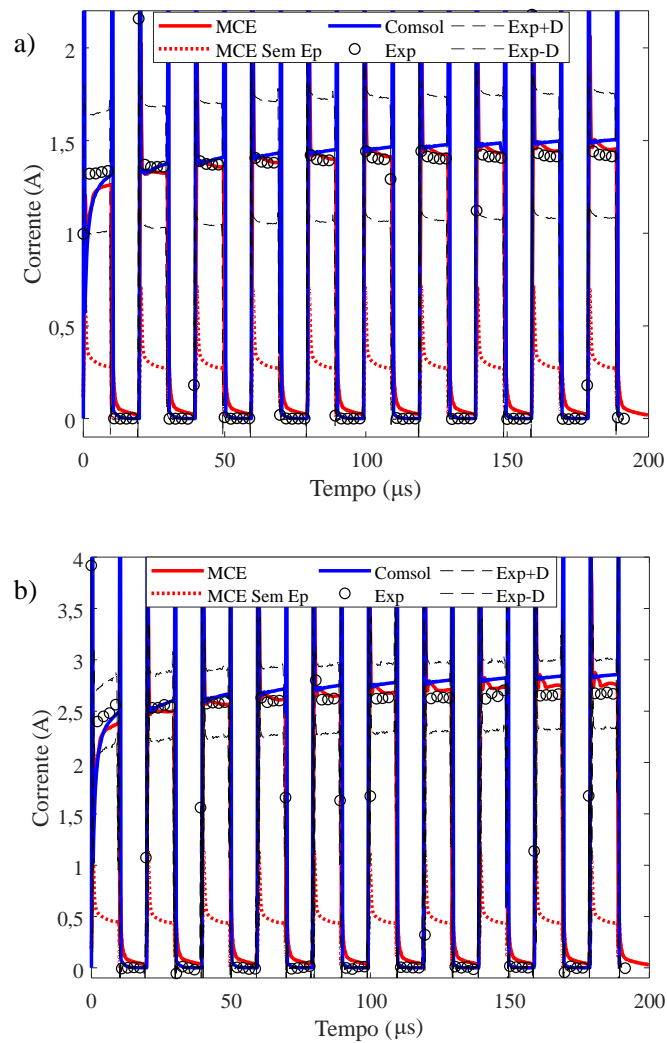
Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Tabela 11 – Parâmetros do modelo de eletropermeabilização para amostras de coração de coelho. Os índices a) e b) se referem aos protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) respectivamente

Parâmetros	Coração 926 V/cm	Coração 1481 V/cm
σ_t (S/m) a)	0,600	0,855
σ_t (S/m) b)	0,700	0,855
E_2 (V/m)	17000	27000

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

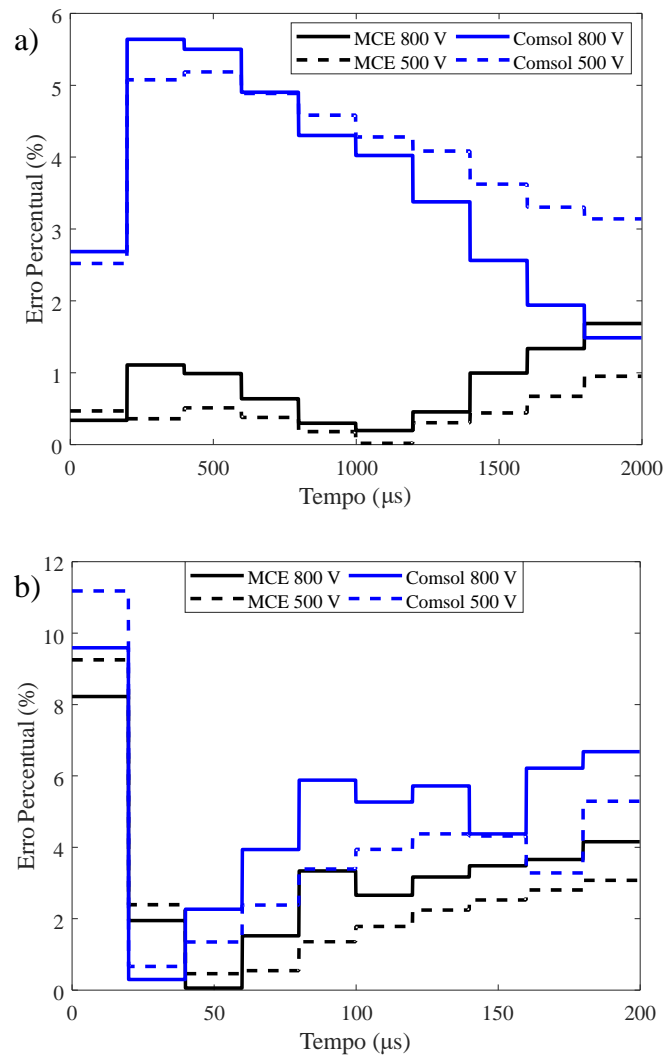
Figura 33 – Forma de onda das correntes experimentais e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para amostras de coração de coelho estimuladas com o protocolo de 50 kHz (Protocolo B), e eletrodos de agulhas. Os índices a), b) e c) são os resultados para os campos elétricos de 370 V/cm, 926 V/cm e 1481 V/cm respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

de 2 % para o Protocolo A) e 4 % para o Protocolo B) exceto para o primeiro pulso do Protocolo B) com erros percentuais próximos a 9 %. Os resultados obtidos com o COMSOL Multiphysics® apresentam erros maiores, contudo as curvas de correntes simuladas estão dentro do desvio padrão experimental.

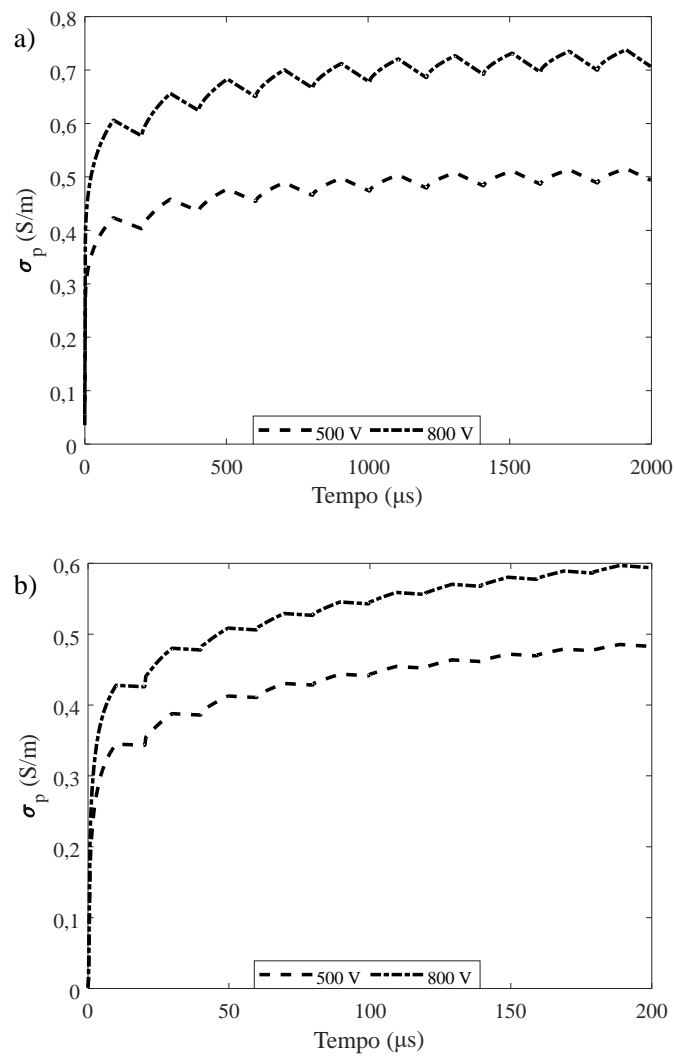
Figura 34 – Erros percentuais por pulso no cálculo da corrente obtida por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para amostras de coração de coelho estimuladas pelo protocolo de 5 kHz (protocolo A) em a) e pelo protocolo de 50 kHz (protocolo B) em b)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

A Figura 35 apresenta a média da condutividade de eletropermeabilização simulada no MCE calculada no volume destacado na Figura 24.

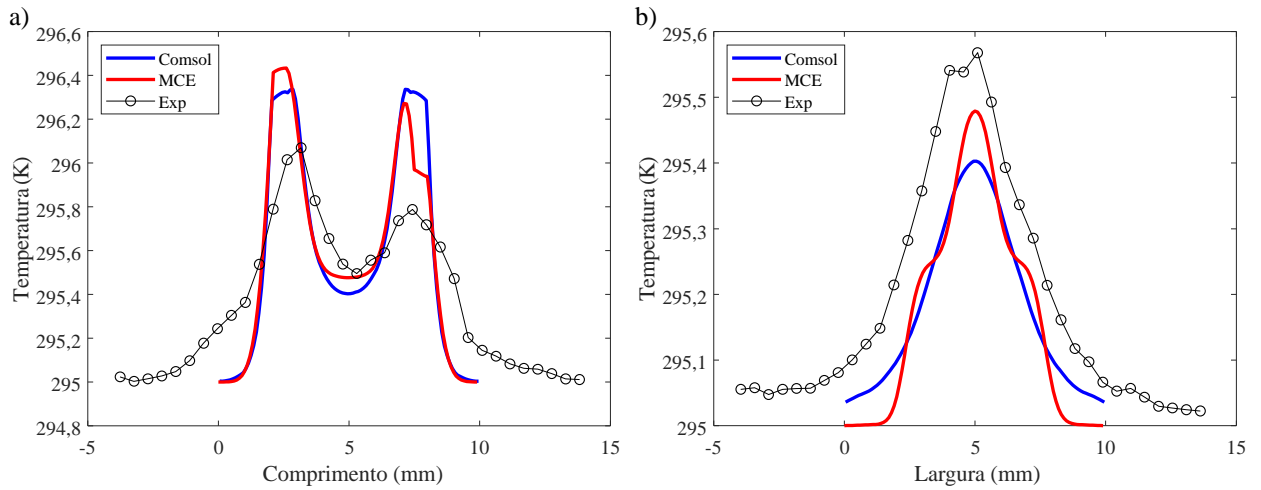
Figura 35 – Médias das condutividades de eletropermeabilização de amostras de coração de coelho como função do tempo na sequência de 10 pulsos para os campos elétricos de 370 V/cm, 926 V/cm e 1481 V/cm. Protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) apresentados em a) e b) respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

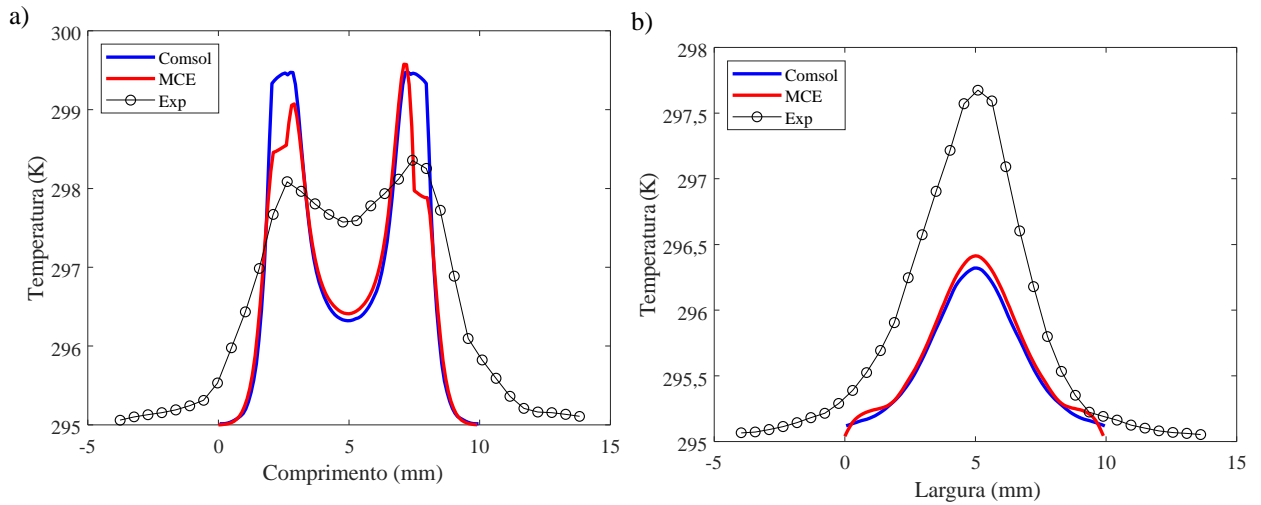
As Figuras 36 e 37 apresentam a distribuição de temperatura ao longo dos Eixos 1 e 2. Observa-se grande semelhança entre as distribuições de temperatura simuladas e experimental.

Figura 36 – Distribuição de temperatura experimental e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® na superfície da amostra de coração de coelho estimulada com 926 V/cm do protocolo de 5 kHz (protocolo A). Os índices a) e b) se referem aos *Eixos 1 e 2* respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Figura 37 – Distribuição de temperatura experimental e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® na superfície da amostra de coração de coelho estimulada com 1481 V/cm do protocolo de 5 kHz (protocolo A). Os índices a) e b) se referem aos *Eixos 1 e 2* respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

7.2.3 Amostras de tecido de rim de coelho

Nessa seção são apresentados os resultados obtidos para o tecido de rim de coelho. Apenas as diferenças serão discutidas.

As Figuras 38 e 39 apresentam as curvas de correntes experimentais e obtidas por simulações com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para os Protocolos A) e B) respectivamente.

O aumento percentual das correntes experimentais no final de cada pulso em relação ao pulso anterior é apresentado na Tabela 12. A comparação entre as corrente simuladas no MCE com e sem eletropermeabilização ao final do primeiro pulso é mostrado na Tabela 13.

Tabela 12 – Aumento percentual da corrente elétrica experimental para amostras de rim de coelho, o termo P12 indica o aumento percentual da corrente ao final do segundo pulso em relação ao primeiro, a mesma lógica é aplicada aos demais termos. O termo Pa é o aumento percentual acumulado ao longo dos pulsos. Os índices a) e b) se referem as curvas dos protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) respectivamente

Ensaio	P12	P23	P34	P45	P56	P67	P78	P89	P910	Pa
Rim 370 V/cm a)	0,91	1,01	0,58	0,06	0,20	0,87	-0,21	-0,04	-0,39	2,99
Rim 926 V/cm a)	2,43	1,71	1,28	1,29	0,57	0,71	0,58	0,51	0,43	9,51
Rim 1481 V/cm a)	3,12	1,86	2,01	1,20	0,87	0,57	0,18	0,77	0,78	11,36
Rim 370 V/cm b)	-0,60	-0,36	0,15	0,83	-0,79	-0,70	0,87	0,01	0,38	-0,21
Rim 926 V/cm b)	0,25	1,41	0,65	1,14	0,65	0,56	0,39	0,39	0,39	5,83
Rim 1481 V/cm b)	2,38	1,65	0,96	0,88	0,84	1,01	-0,03	1,19	0,40	9,28

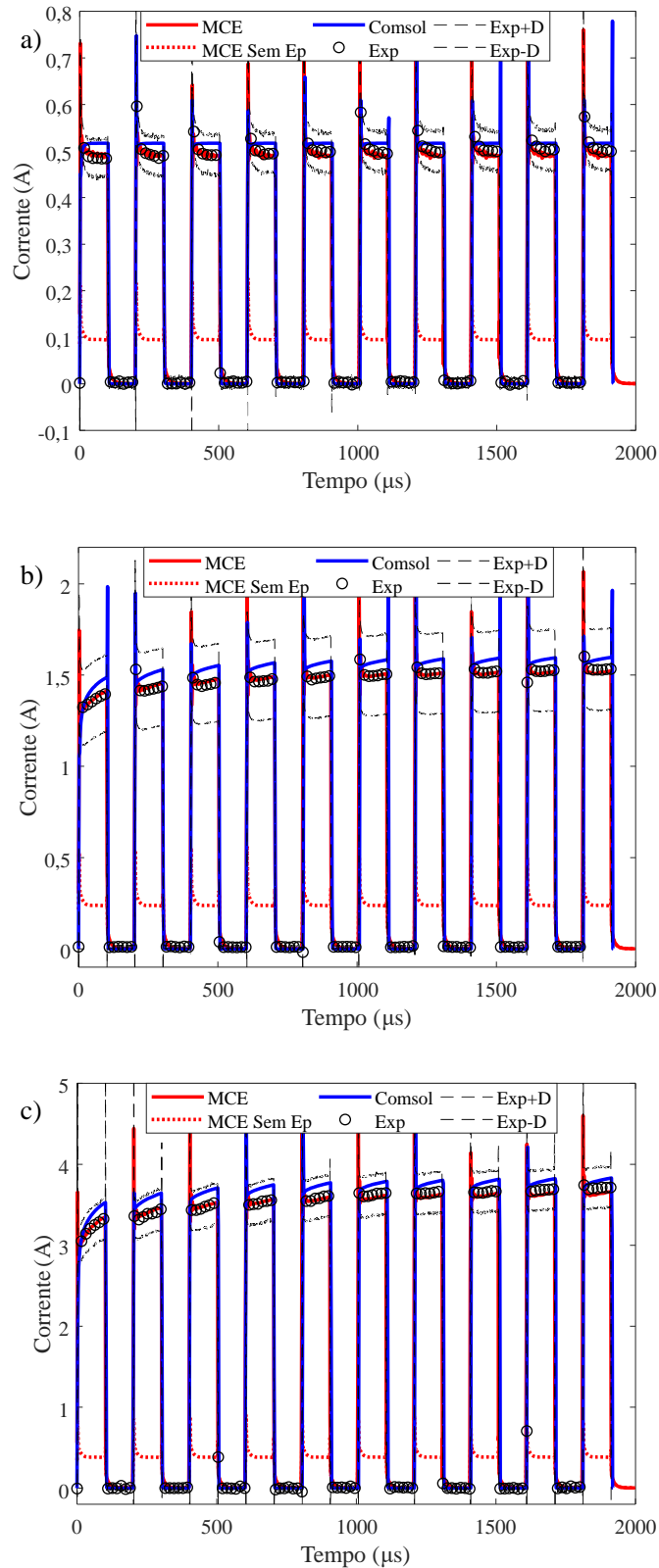
Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Tabela 13 – Aumento percentual da corrente simulada com eletropermeabilização em relação a corrente simulada sem eletropermeabilização ao final do primeiro pulso para amostras de rim de coelho. Os índices a) e b) são relacionados aos protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) respectivamente

Ensaio	370 V/cm	926 V/cm	1481 V/cm
Rim a)	422 %	500 %	787 %
Rim b)	120 %	183 %	271 %

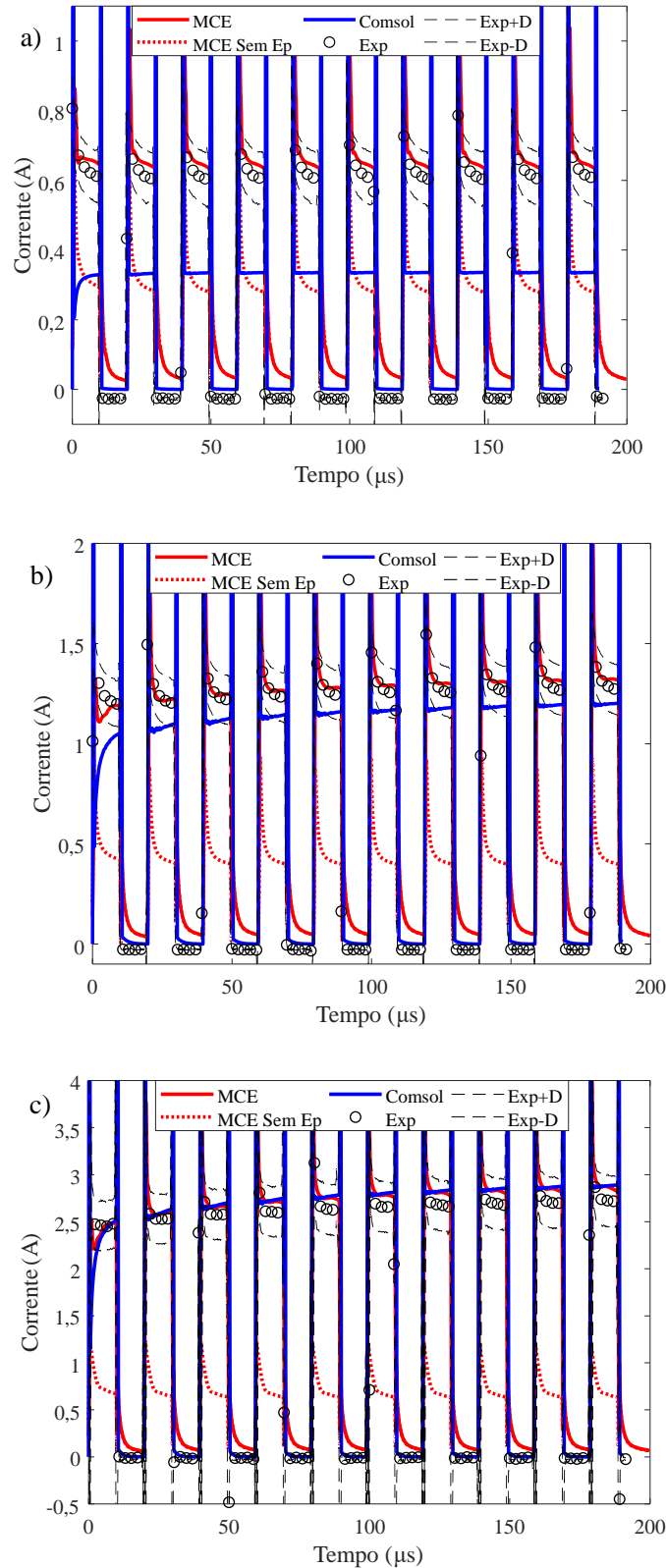
Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Figura 38 – Forma de onda das correntes experimentais e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para amostras de rim de coelho estimuladas com o protocolo de 5 kHz (Protocolo A), e eletrodos de agulhas. Os índices a), b) e c) são os resultados para os campos elétricos de 370 V/cm, 926 V/cm e 1481 V/cm respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Figura 39 – Forma de onda das correntes experimentais e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para amostras de rim de coelho estimuladas com o protocolo de 50 kHz (Protocolo B), e eletrodos de agulhas. Os índices a), b) e c) são os resultados para os campos elétricos de 370 V/cm, 926 V/cm e 1481 V/cm respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Apenas os parâmetros σ_t e E_2 sofreram alterações para a obtenção dos resultados simulados no tecido de rim de coelho, eles são apresentados na Tabela 14. Os demais parâmetros são iguais aos obtidos para o fígado e coração de coelho tendo os seguintes valores: $\sigma_o = 1 \times 10^{-8}$ (S/m), $\tau_{min} = 1 \times 10^{-6}$ (s), $\Delta\tau = 2 \times 10^{-3}$ (s), e $E_1 = 2300$ (V/m).

Tabela 14 – Parâmetros do modelo de eletropermeabilização para amostras de rim de coelho. Os índices a) e b) se referem aos protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) respectivamente.

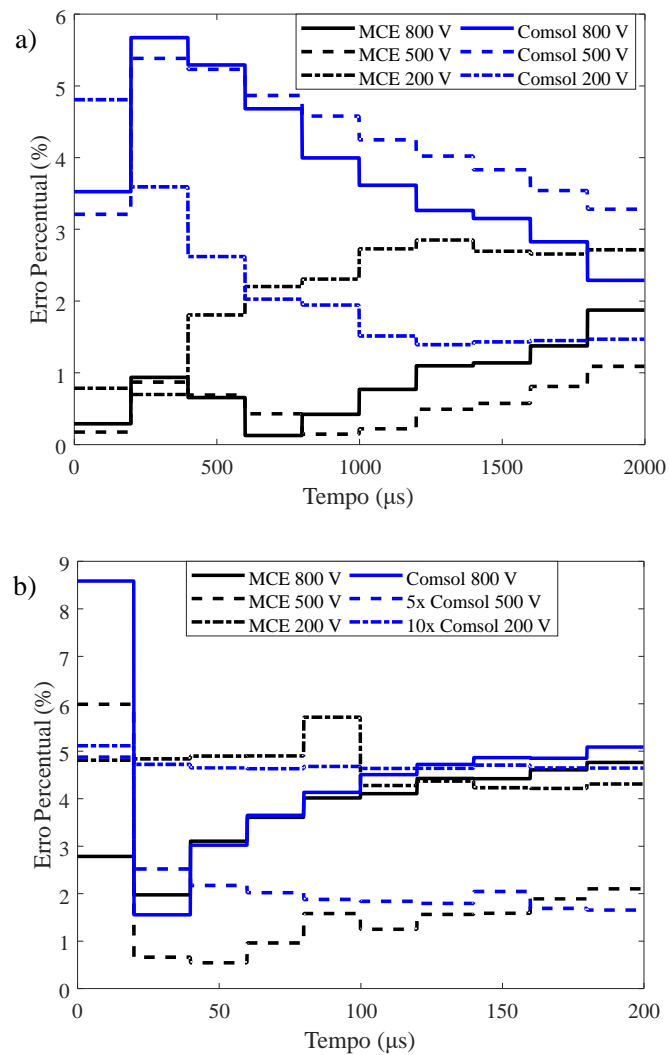
Parâmetros	Rim 370 V/cm	Rim 926 V/cm	Rim 1481 V/cm
σ_t (S/m) a)	0,29	0,345	0,55
σ_t (S/m) b)	0,13	0,27	0,41
E_2 (V/m) a) e b)	5000	17000	28000

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

A Figura 40 apresenta os erros percentuais por pulso no cálculo da corrente obtida por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para amostras de rim de coelho para os protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B). As correntes simuladas obtidas com o programa MCE obtiveram erros percentuais abaixo de 3 % para o Protocolo A) e 6 % para o Protocolo B). Os resultados obtidos com o COMSOL Multiphysics® apresentam erros maiores, principalmente no Protocolo B) para os campos elétricos de 370 V/cm e 926 V/cm, devido a dispersão dielétrica que não foi incluída na simulação nesse programa. Assim, no Protocolo B) para os campos elétricos de 370 V/cm e 926 V/cm o erro percentual atinge 50% e 25% respectivamente.

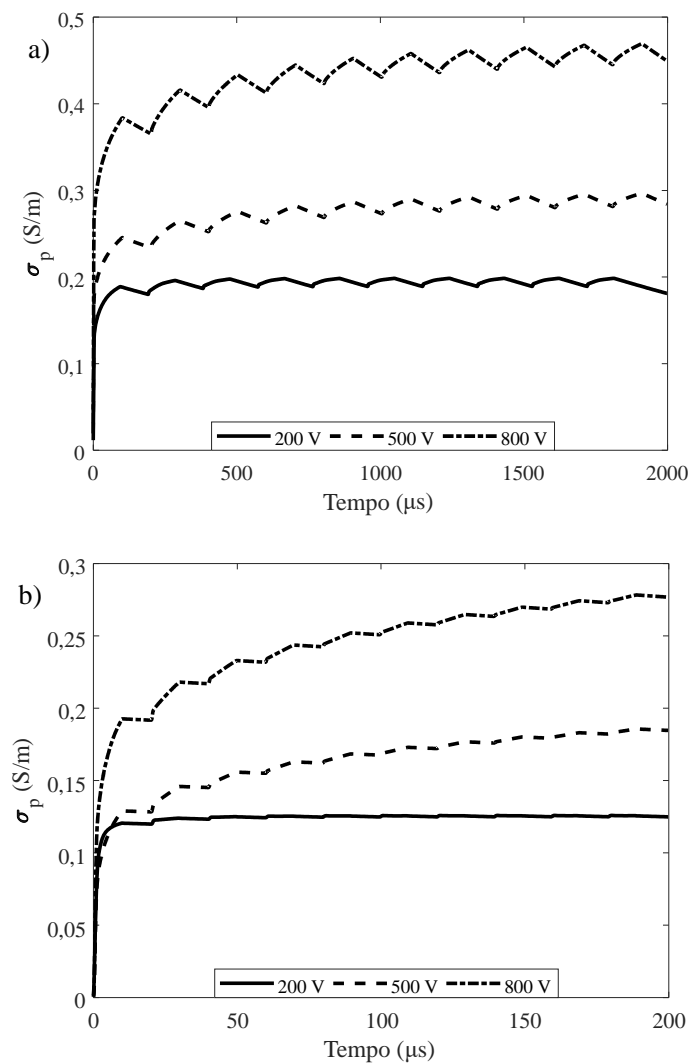
A Figura 41 apresenta a média da condutividade de eletropermeabilização simulada no MCE calculada no volume destacado na Figura 24.

Figura 40 – Erros percentuais por pulso no cálculo da corrente obtida por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® para amostras de rim de coelho estimuladas pelo protocolo de 5 kHz (protocolo A) em a) e pelo protocolo de 50 kHz (protocolo B) em b). Em b) as curvas do COMSOL Multiphysics® devem ser multiplicada pelo fator 5 e 10



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

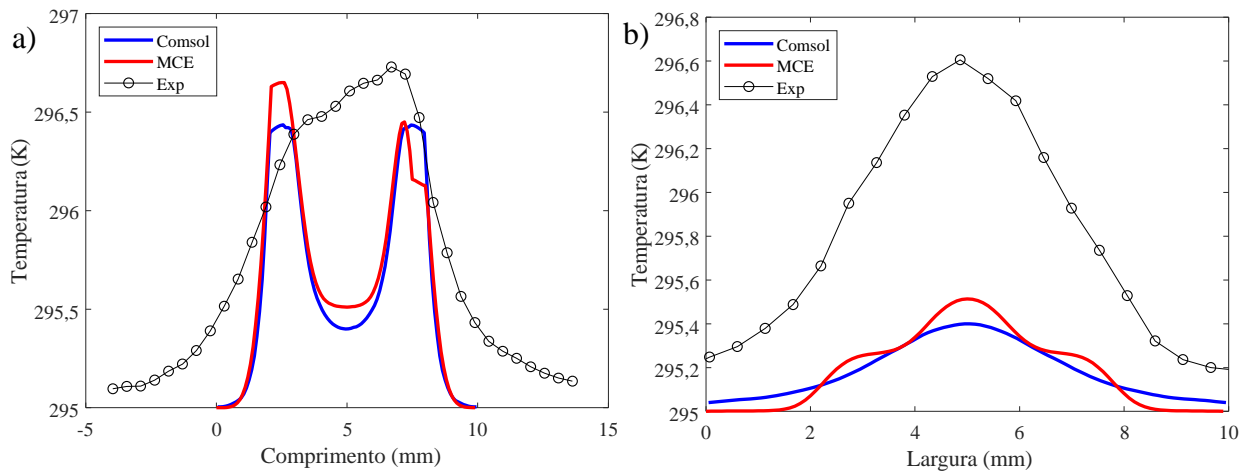
Figura 41 – Médias das condutividades de eletropermeabilização de amostras de rim de coelho como função do tempo na sequência de 10 pulsos para os campos de 370 V/cm, 926 V/cm e 1481 V/cm. Protocolos de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B) apresentados em a) e b) respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

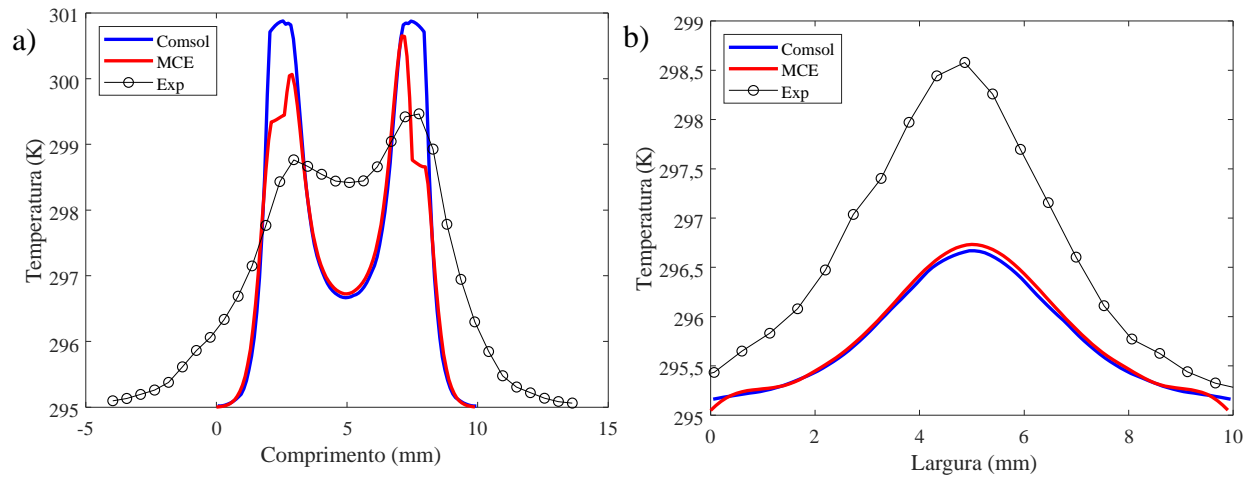
As Figuras 42 e 43 apresentam a distribuição de temperatura ao longo dos Eixos 1 e 2. Observa-se grande semelhança entre as distribuições de temperatura simuladas e experimental.

Figura 42 – Distribuição de temperatura experimental e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® na superfície da amostra de rim de coelho estimulada com 926 V/cm do protocolo de 5 kHz (protocolo A). Os índices a) e b) se referem aos *Eixos 1 e 2* respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Figura 43 – Distribuição de temperatura experimental e obtidas por simulação com os programas MCE e COMSOL Multiphysics® na superfície da amostra de rim de coelho estimulada com 1481 V/cm do protocolo de 5 kHz (protocolo A). Os índices a) e b) se referem aos *Eixos 1 e 2* respectivamente



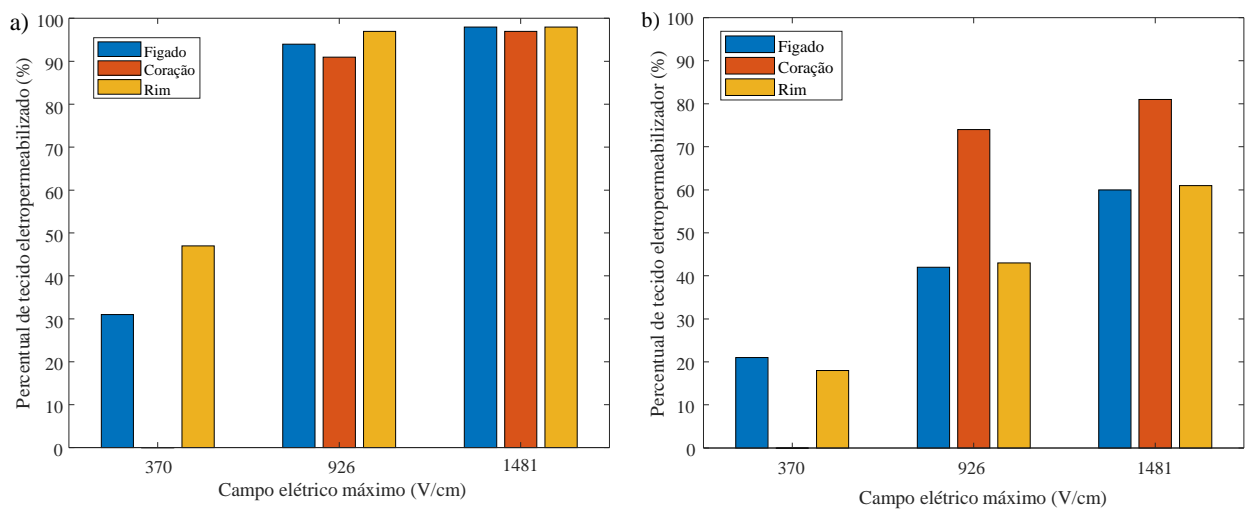
Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

7.2.4 Comparação da eletropermeabilização biológica em tecidos de coelho

Ao comparar os resultados obtidos para os diferentes tecidos, fígado, coração e rim de coelho é possível observar grandes semelhanças entre eles. O que difere são as amplitudes das formas de onda de corrente, condutividade de eletropermeabilização e distribuição espacial de temperatura, fato esse já esperado devido às características elétricas e térmicas de cada tecido.

Para o planejamento da eletroquimioterapia uma informação essencial é a obtenção da região de tecido eletropermeabilizado. Na literatura para obter essa avaliação os pesquisadores apresentam gráficos de distribuição de campo elétrico (MIKLAVČIČ et al., 2014), (COROVIC; ZUPANIC; MIKLAVČIČ, 2008), (COROVIC et al., 2013). Contudo, essa é uma informação indireta, propomos nesta tese uma comparação com o valor da condutividade estática do tecido apresentada na Tabela 3. Supondo que para a ocorrência da eletropermeabilização a condutividade de eletropermeabilização (σ_p) deve ser superior ao dobro da condutividade estática. A Figura 44 apresenta o percentual de área do tecido cuja a condutividade de eletropermeabilização é o dobro da condutividade estática na superfície da amostra no final dos Protocolos A) e B). A área da superfície da amostra simulada é de $98 \mu m^2$ (9,9mm x 9,9mm).

Figura 44 – Percentual de área dos tecidos de coelho cuja a condutividade de eletropermeabilização é superior ao dobro da condutividade estática na superfície da amostra e ao final do protocolo de 5 kHz (protocolo A) e 50 kHz (protocolo B). Área de simulação no programa MCE $98 \mu m^2$ (9,9mm x 9,9mm). Protocolo A) e B) apresentado nos índices a) e b) respectivamente.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Ao observar a Figura 44a) fica evidente que o aumento do campo elétrico de 370 V/cm para 926 V/cm eleva significativamente a área de tecido eletropermeabilizado

segundo a suposição utilizada. Contudo, ao aumentar o campo elétrico para 1481 V/cm o aumento percentual em relação a área obtida para 926 V/cm foi de aproximadamente 4%.

Para o protocolo de 50 kHz (protocolo B) o resultado da região de tecido eletropermeabilizado segundo a suposição utilizada é apresentada na Figura 44b). A área atingida é menor comparada com o Protocolo A). Todavia, tal resultado já era esperado uma vez que a largura do pulso no Protocolo B) é 10 % da largura do pulso no Protocolo A). Ou seja, menos tempo de estímulo do tecido e por consequência menos poros criados.

7.2.5 Amostras de tecido de fígado de rato

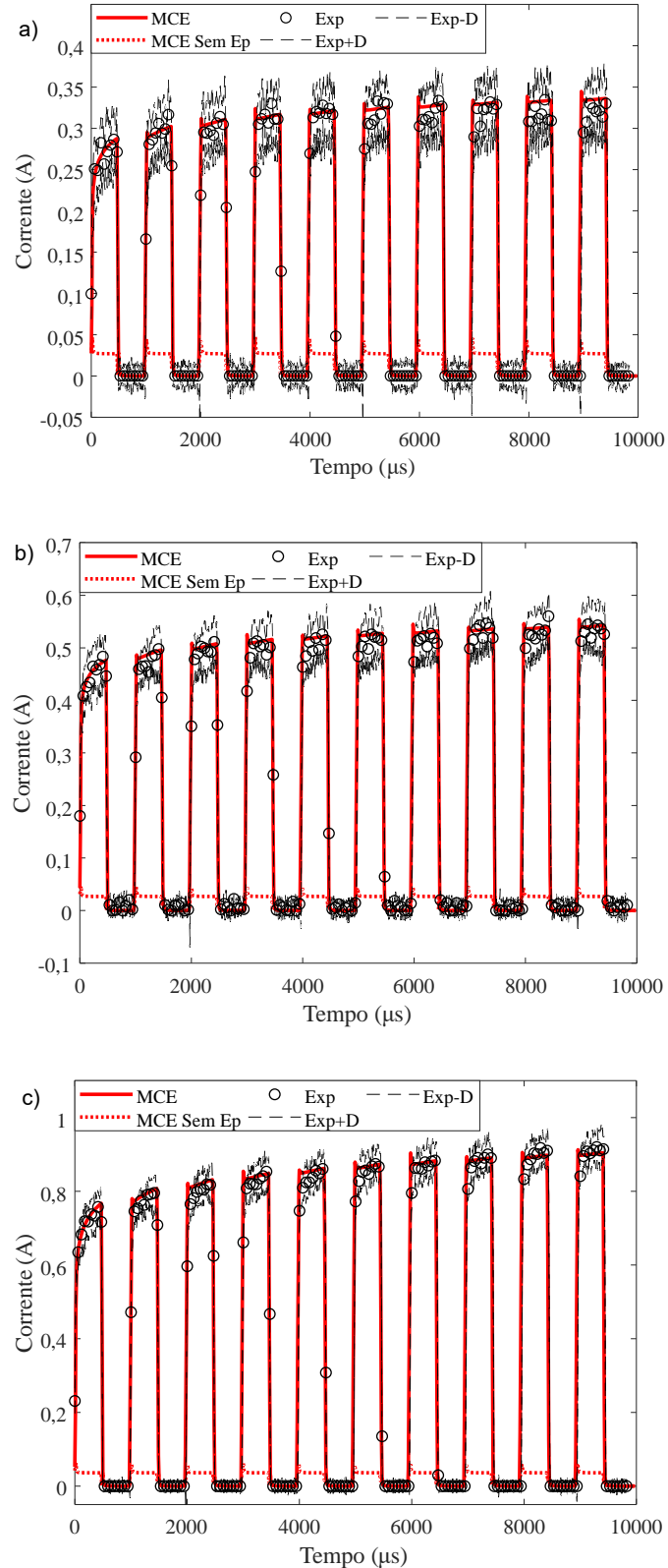
Nessa seção são apresentadas curvas obtidas para o fígado de rato. Devido as dimensões dos tecidos desses animais apenas o fígado foi viável para o estudo. Os comentários a respeito das formas de onda de corrente experimentais e simuladas já foram destacados nos itens anteriores. A Figura 45 apresenta a forma de onda das correntes experimentais e obtidas por simulação com o programa MCE para amostras de fígado de rato. A Figura 46 apresenta os erros percentuais entre as médias experimentais e as curvas de correntes obtidas por simulação para o fígado de rato. Os resultados simulados apresentam erro máximo de 4,1 % em relação a média das correntes experimentais. Os parâmetros utilizados na simulação são apresentados na Tabela 15. Comparando com os parâmetros obtidos para o fígado de Coelho o parâmetro $\Delta\tau$ apresentou maior variação. Contudo o protocolo utilizado não foi o mesmo. Apesar disso, observa-se que o modelo proposto foi capaz de representar corretamente a corrente experimental obtida.

Tabela 15 – Parâmetros do modelo de eletropermeabilização para amostras de fígado de Rato

Parâmetros	Fígado 714 V/cm	Fígado 926 V/cm	Fígado 1481 V/cm
σ_o (S/m)	1×10^{-8}	1×10^{-8}	1×10^{-8}
σ_t (S/m)	0,30	0,35	0,46
τ_{min} (s)	1×10^{-6}	1×10^{-6}	1×10^{-6}
$\Delta\tau$ (s)	1×10^{-1}	1×10^{-1}	1×10^{-1}
E_1 (V/m)	2300	2300	2300
E_2 (V/m)	15000	20000	30000

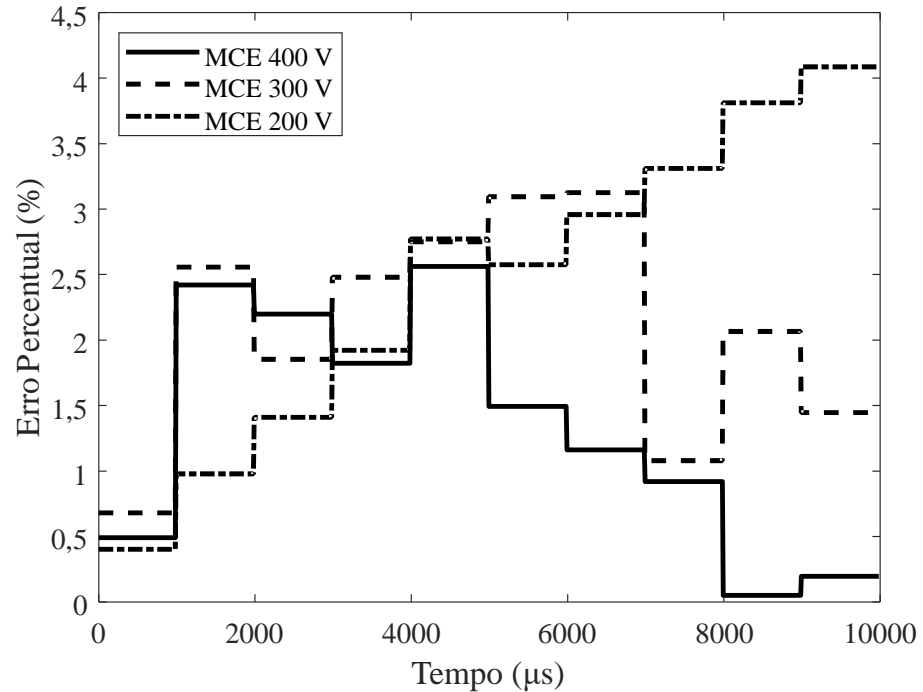
Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Figura 45 – Forma de onda das correntes experimentais e obtidas por simulação com o programa MCE para amostras de fígado de rato estimuladas com o protocolo de 1 kHz (protocolo E). Os índices a), b) e c) são os resultados para os campos elétricos de 714 V/cm, 1071 V/cm e 1428 V/cm respectivamente



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Figura 46 – Erros percentuais por pulso no cálculo da corrente obtida por simulação com o programa MCE para amostras de fígado de rato estimulada pelo protocolo de 1 kHz (protocolo E)



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

7.2.6 Análise dos parâmetros do modelo de eletropermeabilização

Com base nos parâmetros do modelo obtidos que minimizam o erro entre a curva simulada e a curva experimental pode-se fazer as seguintes constatações:

- Os parâmetros σ_o , τ_{min} e E_1 são iguais para protocolos de pulsos e rampas.
- Apenas o parâmetro σ_t variou entre os Protocolos A) e B). A diferença entre os Protocolos A) e B) é a frequência fundamental dos pulsos cujos valores são de 5 kHz e 50 kHz respectivamente. Vale destacar também que o intervalo de tempo entre a realização do Protocolo A) e B) foi de 30 dias.
- O valor de σ_t é aproximadamente 9 vezes o valor de σ_s para o campo elétrico máximo de 1481 V/cm.

A fim de compreender com mais detalhes a função de cada parâmetro do modelo utilizado foram realizadas simulações com a variação dos mesmos. Tomando como base os parâmetros obtido no Protocolo A) para o fígado de coelho estimulado com o campo elétrico de 1428 V/cm cada parâmetro será variado individualmente nos seguintes valores apresentados na Tabela 16. Por exemplo, o parâmetro σ_t foi modificado e os demais parâmetros foram mantidos nos valores obtidos para o fígado de coelho estimulado com a tensão

de 800 V, a mesma lógica se aplica aos demais. Os parâmetros foram alterados em torno do valor que minimiza o erro entre a curva experimental e simulada. Os parâmetros presentes na coluna V_0 foram utilizados para obter a curva simulada para o fígado estimulado com pulsos de campo elétrico máximo de 1428 V/cm. O parâmetro de condutividade inicial da eletropermeabilização - σ_o não foi modificado, uma vez que seu valor é menor.

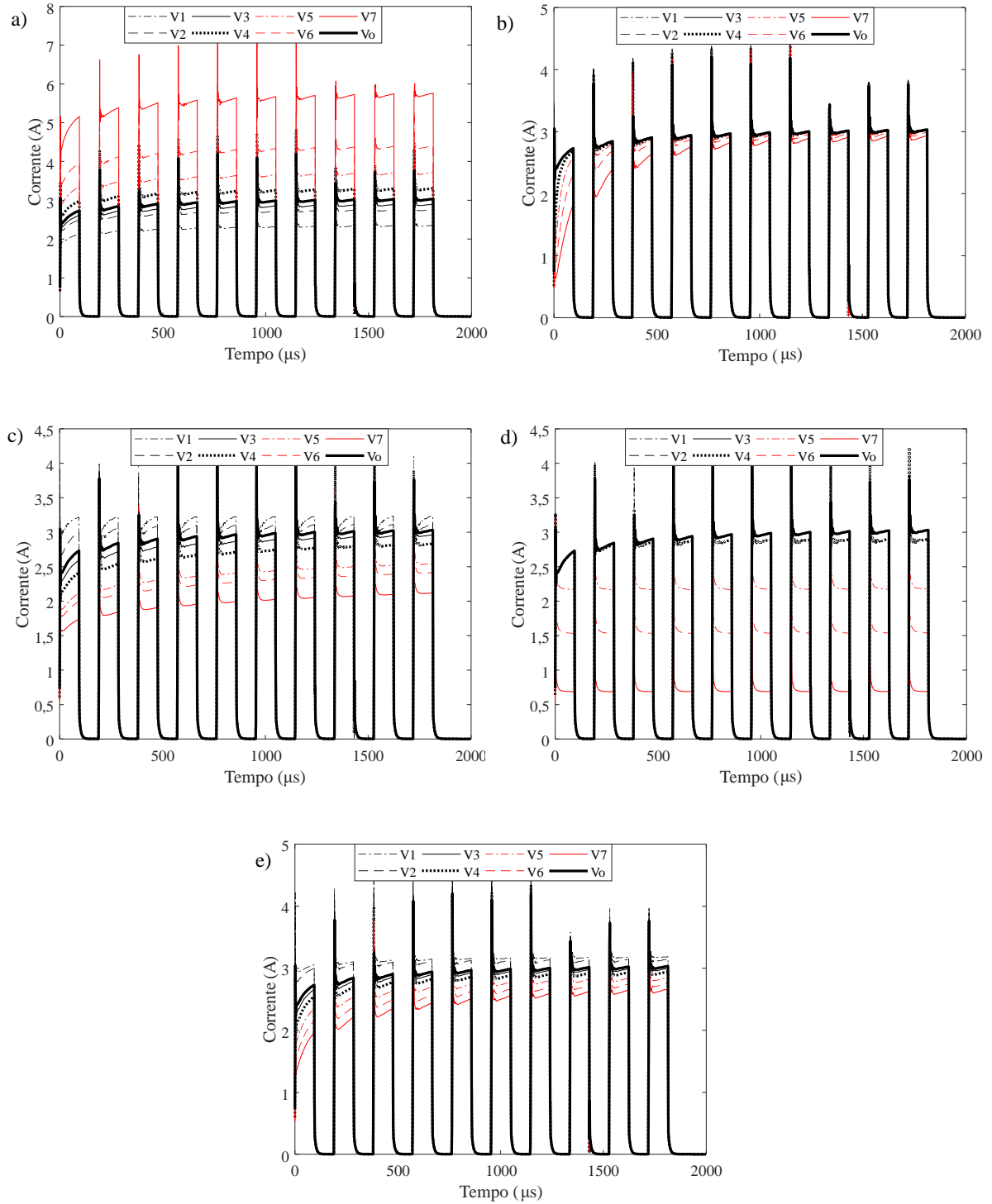
A Figura 47a) apresenta a variação da curva de corrente em função de σ_t , que afeta a amplitude de todos os pulsos. Para o parâmetro τ_{min} valores de tempo abaixo de 10 μs não alteram de maneira significativa a forma de onda. Com o aumento do tempo, a forma de onda dos primeiros pulsos é fortemente afetado como mostra a Figura 47b). Os parâmetros $\Delta\tau$ e E_2 apresentam comportamento similares, sendo responsáveis pela forma da onda e dinâmica do processo. Também interferem na amplitude do sinal conforme apresenta as Figuras 47c) e 47e) . O parâmetro E_2 influencia no tempo de relaxação do fenômeno. A resposta do sistema é lenta para o limiar de 50000 V/m se comparado com o limiar de 20000 V/m. Com relação ao parâmetro E_1 valores abaixo de 8000 V/m não alteram de maneira significativa a forma de onda. Com o aumento desse parâmetro a forma e a amplitude são modificados perdendo inclusive a forma exponencial da forma de onda experimental como apresenta a Figura 47d).

Tabela 16 – Valores dos parâmetros do modelo utilizados para a análise de sensibilidade

Parâmetro	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V0
σ_t (S/m)	0,348	0,418	0,442	0,512	0,581	0,697	0,930	0,465
τ_{min} (μs)	0,1	0,5	2,0	10	25	50	100	1,0
$\Delta\tau$ (ms)	0,1	0,5	4,0	10	50	100	500	2,0
E_1 (V/m)	500	1000	4000	8000	15000	20000	30000	2300
E_2 (V/m)	20000	25000	32000	35000	40000	45000	50000	30000

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Figura 47 – Comportamento da forma de onda de corrente com a variação dos parâmetros: a) σ_t , b) τ_{min} , c) $\Delta\tau$, d) E_1 e e) E_2 . A Tabela 16 apresenta os valores dos parâmetros utilizados em cada simulação.

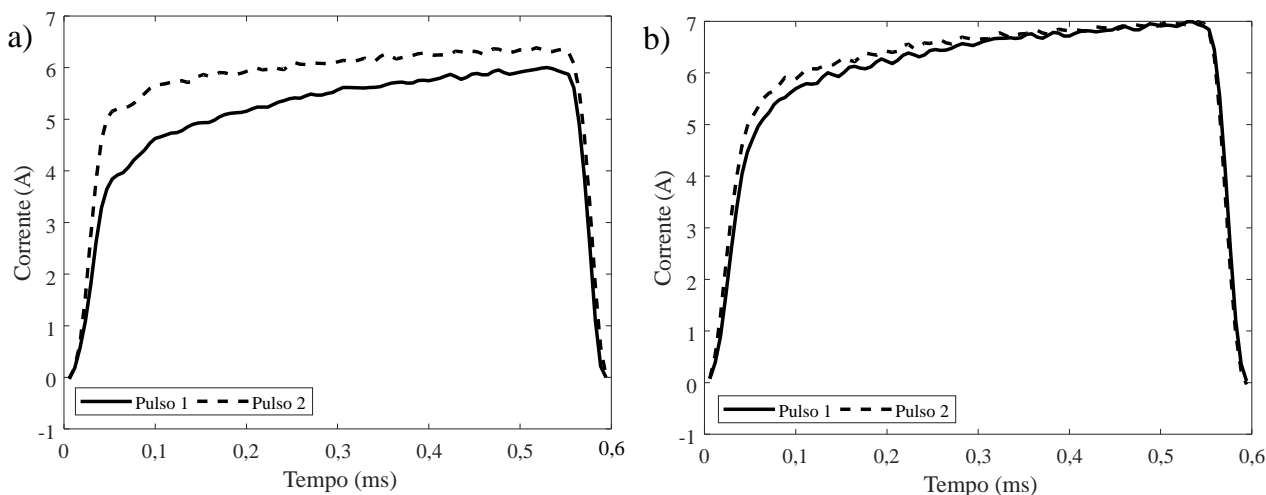


Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

7.2.7 Efeito da Memória de Eletropermeabilização

A Figura 48 a) e b) apresentam a forma de onda da corrente para amostras de fígado de rato aplicado o Protocolo F) com o tempo entre pulsos de 1 ms e 6 s respectivamente. Nota-se que com o aumento do tempo entre pulsos as formas de onda da corrente entre os pulsos tendem a se aproximar. Assim pode-se concluir que os poros abertos durante o primeiro pulso se recuperaram no intervalo de tempo entre os pulsos. A Figura 49 apresenta a média da diferença percentual e o desvio padrão para todos os intervalos de tempo das amostras de fígado de rato. Para cada intervalo de tempo o experimento foi repetido três vezes com amostras novas.

Figura 48 – Forma de onda da corrente para amostras de fígado de rato para o primeiro e segundo pulso com o tempo entre pulsos de: a) 1 ms b) 6s. Pulso com a largura de aproximadamente 500 μ s



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

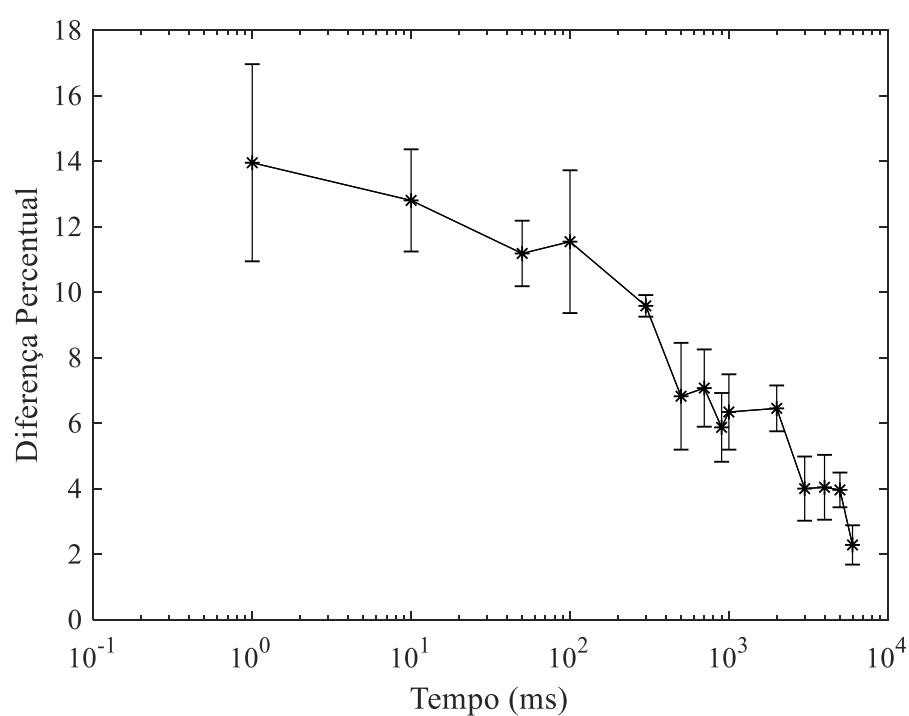
Para os tecidos de coelho a Tabela 17 apresenta a diferença percentual entre os pulso com o desvio padrão. Para cada intervalo de tempo foram utilizadas 5 amostras.

A configuração do tempo em nível baixo entre os pulsos para as amostras do tecido de coelho foi realizado de acordo com os resultados obtidos previamente para o fígado de rato apresentado na Figura 49. As amostras de rim e coração de coelho eram escassas, assim o experimento foi realizado apenas para um único intervalo de tempo.

Ao observar a Figura 49 é nítido a recuperação da membrana com o aumento do tempo entre os pulsos. A partir dos resultados obtidos para fígado de rato e tecidos de coelho o tempo de recuperação da membrana celular situa-se entre 1 s e 10 s. Tempo esse semelhante ao obtido pelo trabalho de Chang e Reese (1990) para células isoladas de eritrócitos cujo tempo foi de 10 s (CHANG; REESE, 1990).

Com esse resultado os protocolos de eletropermeabilização existentes devem ser

Figura 49 – Diferença percentual entre a média (3 amostras) da corrente de dois pulsos separados pelo intervalo de tempo indicado no gráfico. Campo elétrico de 1333 V/cm aplicado com eletrodos de placas paralelas circulares. As barras indicam o desvio padrão.



Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

Tabela 17 – Diferença percentual entre as correntes de dois pulsos consecutivos para tecidos de coelho

Ensaio	Média	Desvio Padrão
Coração 1 s	2,29	0,24
Rim 1 s	1,65	0,73
Fígado 1 s	4,50	2,45
Fígado 2 s	3,25	0,82
Fígado 3 s	2,29	0,24
Fígado 4 s	2,73	0,31
Fígado 10 s	2,11	0,27

Fonte: Elaborado pelo autor, 2020.

questionados, principalmente o utilizado na eletroquimioterapia que consiste na aplicação de 8 pulsos consecutivos, sendo que cada pulso com duração de $100\ \mu\text{s}$ e o intervalo de tempo entre os pulsos consecutivos de 1 s. Observe que o tempo entre pulsos é da mesma ordem de grandeza do tempo de recuperação da membrana obtido. A redução do tempo entre pulsos aumenta a quantidade de quimioterápicos no interior da célula? Trabalhos futuros são necessários para avaliar o protocolo com a melhor taxa de entrega da droga para o interior da célula.

Outro aspecto importante é a reutilização das amostras em futuros experimentos de eletropermeabilização. Com esse trabalho, sabe-se que a ordem de grandeza do tempo de recuperação da membrana é em torno de segundos. Assim, uma mesma amostra poderia ser reutilizada para o levantamento de novos dados.

8 CONCLUSÃO

Esta tese apresentou resultados experimentais e computacionais do fenômeno de eletropermeabilização biológica em tecidos. Foi utilizado o modelo dinâmico da eletropermeabilização proposto por Ramos e Weinert (2017) (RAMOS; WEINERT, 2017) que descreve as características físicas do fenômeno: o rápido aumento da condutividade do tecido, o efeito de memória da eletropermeabilização e a saturação do fenômeno.

Para a obtenção dos resultados experimentais foi desenvolvido um eletropermeabilizador capaz de gerar pulsos de tensão com amplitude de 800 V. Foram utilizados tecidos biológicos de duas espécies de animais: fígado, rim e coração de coelho e fígado de rato, sendo os órgãos fracionados para aumentar o número de amostras para os ensaios. Para a simulação numérica foram utilizados dois métodos de cálculos: um baseado no Método do Circuito Equivalente - MCE e o segundo no Método dos Elementos Finitos sendo utilizado o *software* COMSOL Multiphysics®.

Os resultados experimentais podem ser resumidos nos seguintes itens:

- Os espectros de impedância para amostras de tecidos de coelho e rato possuem a mesma ordem de grandeza dos espectros de tecidos de origem bovina apresentados por Gabriel et al. (GABRIEL; LAU; GABRIEL, 1996).
- No Protocolo A) aplicado com tensão de 500 V e 800 V é nítido a visualização da eletropermeabilização. A corrente elétrica aumenta durante o pulso. Entre pulsos subsequentes os poros não conseguem se recuperar e ocorre o efeito da memória da eletropermeabilização sendo a corrente maior que o pulso anterior. Contudo esse aumento atinge um limite provocando a saturação do processo.
- No Protocolo A) aplicado com tensão de 200 V o aumento da corrente elétrica durante o pulso é mínimo ou não ocorre. A eletropermeabilização nesse caso está ocorrendo. Entretanto os níveis de corrente devido os mecanismos normais de condução e dispersão da amostra possuem ordem de grandeza similar a corrente de eletropermeabilização.
- O aumento de temperatura é significativo para o Protocolo A) aplicado com a tensão de 800 V atingindo aproximadamente 5°C.
- No Protocolo B) devido o aumento da frequência fundamental para 50 kHz, a simples visualização da forma de onda da corrente não é capaz de informar a ocorrência da eletropermeabilização. Isso se deve a intensa dispersão dielétrica e corrente de deslocamento que ocorre nessa faixa de frequência.
- No Protocolo C) com as curvas de corrente elétrica é possível observar dois estágios: no início da rampa a corrente aumenta de maneira linear, ou seja, a eletropermea-

bilização não ocorre; após a tensão atingir um limiar há um aumento gradual da corrente revelando a ocorrência do fenômeno.

- No Protocolo E) devido o tempo de subida ser de $40 \mu\text{s}$ e uma frequência fundamental de 1 kHz, os efeitos dispersivos e da corrente de deslocamento não interferem na forma de onda da corrente.
- Nos Protocolos D) e F) é possível estimar o tempo de recuperação da membrana com o controle do tempo em nível baixo entre pulsos. Para tempos curtos entre pulsos há grande diferença entre as curvas de correntes, com o aumento do tempo entre pulsos a diferença diminui. Assim, o tempo de recuperação da membrana dos tecidos utilizados estão entre 1 s e 10 s.

O modelo proposto juntamente com os métodos de cálculo numéricos obteve resultados muito próximos as curvas experimentais. No Protocolo A) o ajuste com o MCE resultou em erros menores que 7%, enquanto que para o COMSOL Multiphysics® os erros atingiram 11%. No Protocolo B) o erro máximo obtido com a simulação no MCE foi de 15%, para o COMSOL Multiphysics® o erro máximo foi de 50 %. No Protocolo C) o erro com o programa MCE atingiu de 8,38 %, enquanto que para o COMSOL Multiphysics® o erro máximo foi de 7,07 %. Para as amostras de fígado de rato o erro máximo obtido com o programa MCE foi de 4,1 %.

Os resultados simulados com ambos os programas de simulação são muito semelhantes. Contudo, vale destacar que o modelo da dispersão dielétrica foi incluído apenas no programa MCE. Por essa razão que os resultados obtidos com o programa COMSOL Multiphysics® para o Protocolo B) apresentam erros da ordem de 50 %. O Protocolo B) apresenta frequência fundamental de 50 kHz e nessa região espectral a dispersão dielétrica não pode ser ignorada sob pena de subestimar a corrente elétrica.

O uso do modelo de eletropermeabilização biológica proposto por Ramos e Weinert (2017) gerou as seguintes conclusões:

- Foi capaz de representar a dinâmica da eletropermeabilização biológica com base na comparação entre os resultados experimentais e computacionais tanto para pulsos quanto para rampas de tensão. Tal fato mostra a qualidade do modelo utilizado.
- Permite a visualização da distribuição espacial da condutividade de eletropermeabilização, sendo possível o uso clínico com o auxílio da simulação numérica para prever a região do tecido eletropermeabilizado.
- Não está limitado a um único método de cálculo, sendo possível a implementação em programas de simulações comerciais, facilitando o seu uso por diversos pesquisadores.

- Os parâmetros do modelo dependem do tipo de tecido, da geometria dos eletrodos e da intensidade de campo aplicado. A dependência com o tipo de tecido pode ser justificada pelas propriedades elétricas distintas dos mesmos. O modelo proposto por Ramos e Weinert (2017) depende do campo elétrico, a mudança da geometria de eletrodos consequentemente altera a distribuição de campo elétrico na região, afetando assim o valor dos parâmetros do modelo. A intensidade de campo aplicado influencia na quantidade e dimensão de poros criados na membrana, devido a esse fator há também variação dos parâmetros.

Comparando o modelo proposto por Ramos e Weinert (2017) com relação aos modelos proposto por Langus et al. (2016) (LANGUS et al., 2016) e Voyer et al. (2018) (VOYER et al., 2018) geram as seguintes conclusões:

- Baixa quantidade de parâmetros no modelo;
- Explicação física para os parâmetros do modelo;
- Representação da memória da eletropermeabilização. Voyer et al. (2018) apresenta resultado simulado para um único pulso de tensão;
- Apesar do modelo proposto por Ramos e Weinert (2017) ser empírico, ele foi baseado no trabalho de (DEBRUIN; KRASSOWSKA, 1998) que apresenta uma transformação da equação de Smoluchowsky e obtêm uma expressão para a variação da densidade de poros na membrana. Langus et al. (2016) destacam que não possuem nenhuma explicação teórica ou experimental pelo qual as equações foram escolhidas para modelar o comportamento da eletropermeabilização;

Os resultados experimentais e computacionais do aumento da temperatura na superfície das amostras possuem a mesma ordem de grandeza. Tal fato corrobora com a qualidade do modelo de eletropermeabilização utilizado, pois, o aumento de temperatura está relacionado com a dissipação de potência no volume da amostra que por sua vez depende da condutividade e campo elétrico.

Outro resultado obtido pelo presente trabalho foi o tempo de fechamento dos poros na membrana celular. Sua obtenção é simples, onde basta comparar as formas de onda de corrente entre dois pulsos consecutivos com diferentes intervalos de tempo entre eles. O tempo de recuperação da membrana celular ficou entre 1 s e 10 s para os tecidos estudados.

Com a obtenção e comprovação da validade do modelo proposto, o trabalho não se encerra nesta tese. Novos estudos são necessários como destacados a seguir:

- A avaliação da região eletropermeabilizada comparando o valor da condutividade de eletropermeabilização com o valor da condutividade estática é promissora. Contudo,

estudos clínicos são necessários para avaliar quantas vezes a condutividade de eletropermeabilização deve ser maior que a condutividade estática para a ocorrência da eletropermeabilização.

- Até que faixa de frequência a dispersão dielétrica pode ser negligenciada sem prejuízo na estimativa do valor da corrente elétrica ?
- O protocolo aplicado na eletroquimioterapia é o mais eficiente ?
- Uso do presente modelo em análises clínicas na oncologia veterinária e avaliação dos resultados obtidos. Na sequência buscar parcerias para a aplicação da eletroquimioterapia em seres humanos.
- Caracterização dos parâmetros no modelo para outros tipos de tecidos e animais. Elaboração de um banco de dados com tais resultados a ser utilizado por diversos profissionais.
- Aumentar a frequência de amostragem do sistema de aquisição das imagens térmicas. Para obter com mais detalhes a resposta temporal do aumento da temperatura.
- Realizar experimentos *in-vivo* para avaliar a influência de artérias nos resultados de aumento da temperatura.

REFERÊNCIAS

- ANDREOU, V. et al. Shelf-life evaluation of virgin olive oil extracted from olives subjected to nonthermal pretreatments for yield increase. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, Elsevier BV, v. 40, p. 52–57, apr 2017. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 28.
- BARNETT, A.; WEAVER, J. C. Electroporation: a unified, quantitative theory of reversible electrical breakdown and mechanical rupture in artificial planar bilayer membranes. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, Elsevier BV, v. 320, n. 2, p. 163–182, apr 1991. Citado 2 vezes nas páginas 34 e 42.
- BENAZZO, M.; BERTINO, G.; GROSELJ, A. Electrochemotherapy of head and neck cancer. In: MIKLAVCIC, D. (Ed.). *Handbook of Electroporation*. [S.l.]: Springer, 2017. cap. Electrochemotherapy of Head and Neck Cancer. Citado na página 29.
- BÖTTCHER, C. J. F.; BORDEWIJK, P. *Theory of Electric Polarization*. [S.l.]: Elsevier, 1973. Citado 2 vezes nas páginas 47 e 68.
- CAMPANA, L. G.; MARCONATO, S. G. and Roberto; MATTHIESSEN, L. W. Electrochemotherapy for breast cancer. In: MIKLAVCIC, D. (Ed.). *Handbook of Electroporation*. [S.l.]: Springer, 2017. cap. Electrochemotherapy for Breast Cancer. Citado na página 29.
- CEMAZAR, M. et al. Effect of electric-field intensity on electroporation and electrosensitivity of various tumor-cell lines in vitro. *Electro- and Magnetobiology*, Informa UK Limited, v. 17, n. 2, p. 263–272, jan 1998. Citado na página 42.
- CHANG, D.; REESE, T. Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy. *Biophysical Journal*, Elsevier BV, v. 58, n. 1, p. 1–12, jul 1990. Citado 3 vezes nas páginas 18, 40 e 106.
- CHEN, C. et al. Membrane electroporation theories: a review. *Medical & Biological Engineering & Computing*, Springer Science and Business Media LLC, v. 44, n. 1-2, p. 5–14, feb 2006. Citado na página 31.
- COROVIC, S. et al. Modeling of electric field distribution in tissues during electroporation. *BioMedical Engineering OnLine*, Springer Science and Business Media LLC, v. 12, n. 1, p. 16, 2013. Citado 3 vezes nas páginas 36, 42 e 100.
- 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*, Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE), v. 36, n. 4, p. 1665–1672, aug 2008. Citado 3 vezes nas páginas 36, 42 e 100.
- CRANFIELD, C. G. et al. Transient potential gradients and impedance measures of tethered bilayer lipid membranes: Pore-forming peptide insertion and the effect of electroporation. *Biophysical Journal*, Elsevier BV, v. 106, n. 1, p. 182–189, jan 2014. Citado na página 81.
- CUNHA, R. M. de C. et al. Electrochemotherapy treatment of oral extramedullary plasmacytoma of the tongue: a retrospective study of three dogs. *Ciência Rural*, FapUNIFESP (SciELO), v. 47, n. 12, nov 2017. Citado na página 29.

- DAVALOS, R. V.; MIR, L. M.; RUBINSKY, B. Tissue ablation with irreversible electroporation. *Annals of Biomedical Engineering*, Springer Science and Business Media LLC, v. 33, n. 2, p. 223–231, feb 2005. Citado na página 80.
- DAVALOS, R. V.; RUBINSKY, B.; MIR, L. M. Theoretical analysis of the thermal effects during in vivo tissue electroporation. *Bioelectrochemistry*, v. 61 1-2, p. 99–107, 2003. Citado 5 vezes nas páginas 19, 38, 39, 64 e 80.
- DEBRUIN, K. A.; KRASSOWSKA, W. Electroporation and shock-induced transmembrane potential in a cardiac fiber during defibrillation strength shocks. *Annals of Biomedical Engineering*, Springer Science and Business Media LLC, v. 26, n. 4, p. 584–596, jul 1998. Citado 5 vezes nas páginas 32, 33, 34, 50 e 111.
- DEBRUIN, K. A.; KRASSOWSKA, W. Modeling electroporation in a single cell. i. effects of field strength and rest potential. *Biophysical Journal*, Elsevier BV, v. 77, n. 3, p. 1213–1224, sep 1999. Citado 2 vezes nas páginas 32 e 34.
- DUNKI-JACOBS, E. M.; PHILIPS, P.; II, R. C. G. M. Evaluation of thermal injury to liver, pancreas and kidney during irreversible electroporation in an in vivo experimental model. *British Journal of Surgery*, Wiley, v. 101, n. 9, p. 1113–1121, jun 2014. Citado 2 vezes nas páginas 39 e 80.
- ESMAEILI, N.; FRIEBE, M. Electrochemotherapy: A review of current status, alternative IGP approaches, and future perspectives. *Journal of Healthcare Engineering*, Hindawi Limited, v. 2019, p. 1–11, jan 2019. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 29.
- FLIR. *FLIR TOOLS +*. [S.l.], 2019. Disponível em: <<https://www.flir.com/support/products/flir-tools-plus#Overview>>. Acesso em: 20 out. 2019. Citado na página 56.
- FOSTER, R.; SCHWAN, H. P. Handbook of biological effects of electromagnetic fields. In: _____. [S.l.]: CRC Press, 1995. cap. Dielectric properties of tissues, p. 25–102. Citado 2 vezes nas páginas 22 e 23.
- 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 & Biology*, v. 41, p. 2271–2293, 1996. Citado 5 vezes nas páginas 24, 25, 26, 67 e 109.
- GARCIA, P. A.; DAVALOS, R. V.; MIKLAVCIC, D. A numerical investigation of the electric and thermal cell kill distributions in electroporation-based therapies in tissue. *PLoS ONE*, Public Library of Science (PLOS), v. 9, n. 8, p. e103083, aug 2014. Citado 2 vezes nas páginas 19 e 39.
- GARCÍA-SÁNCHEZ, T. et al. Sine wave electroporation reveals the frequency-dependent response of the biological membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Elsevier BV, v. 1860, n. 5, p. 1022–1034, may 2018. Citado na página 73.
- GARNER, H. et al. Electrochemotherapy: transition from laboratory to the clinic. *IEEE Engineering in Medicine and Biology Magazine*, Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE), v. 15, n. 6, p. 124–132, nov 1996. Citado na página 28.
- GLASER, R. W. et al. Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Elsevier BV, v. 940, n. 2, p. 275–287, may 1988. Citado 2 vezes nas páginas 34 e 35.

- GOLDBERG, E. et al. Cell membrane electroporation modeling: A multiphysics approach. *Bioelectrochemistry@ARTICLE1420703*, author=D. Sel and D. Cukjati and D. Batiuskaite and T. Slivnik and L. M. Mir and D. Miklavcic, journal=IEEE Transactions on Biomedical Engineering, title=Sequential finite element model of tissue electroporabilization, year=2005, volume=52, number=5, pages=816-827,, v. 124, p. 28 – 39, 2018. ISSN 1567-5394. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1567539417305819>>. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 27.
- GOLDBERG, S. N. et al. Tissue ablation with radiofrequency: Effect of probe size, gauge, duration, and temperature on lesion volume. *Academic Radiology*, Elsevier BV, v. 2, n. 5, p. 399–404, may 1995. Citado na página 39.
- GRANATA, V. et al. Electrochemotherapy of locally advanced pancreatic cancer. In: MIKLAVCIC, D. (Ed.). *Handbook of Electroporation*. [S.l.]: Springer, 2017. cap. Electrochemotherapy of Locally Advanced Pancreatic Cancer. Citado na página 29.
- HENLE, K. J.; DETHLEFSEN, L. A. TIME-TEMPERATURE RELATIONSHIPS FOR HEAT-INDUCED KILLING OF MAMMALIAN CELLS. *Annals of the New York Academy of Sciences*, Wiley, v. 335, n. 1 Thermal Chara, p. 234–253, mar 1980. Citado na página 38.
- HOILES, W. et al. An engineered membrane to measure electroporation: Effect of tethers and bioelectronic interface. *Biophysical Journal*, Elsevier BV, v. 107, n. 6, p. 1339–1351, sep 2014. Citado na página 81.
- ITA, K. Perspectives on transdermal electroporation. *pharmaceutics*, 2016. Citado na página 28.
- 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*, IOP Publishing, v. 54, n. 19, p. 5949–5963, sep 2009. Citado na página 39.
- JIANG, C.; DAVALOS, R. V.; BISCHOF, J. C. A review of basic to clinical studies of irreversible electroporation therapy. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE), v. 62, n. 1, p. 4–20, jan 2015. Citado na página 42.
- KINOSITA, K. et al. Electroporation of cell membrane visualized under a pulsed-laser fluorescence microscope. *Biophysical Journal*, Elsevier BV, v. 53, n. 6, p. 1015–1019, jun 1988. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 41.
- KINOSITA, K. et al. Events of membrane electroporation visualized on a time scale from microsecond to seconds. In: *Guide to Electroporation and Electrofusio*n. [S.l.]: Elsevier, 1992. p. 29–46. Citado na página 29.
- KOTNIK, T. et al. Role of pulse shape in cell membrane electroporabilization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, Elsevier BV, v. 1614, n. 2, p. 193–200, aug 2003. Citado na página 81.
- KOTNIK, T. et al. Membrane electroporation and electroporabilization: Mechanisms and models. *Annual Review of Biophysics*, Annual Reviews, v. 48, n. 1, p. 63–91, may 2019. Citado na página 18.

KRANJC, M.; MIKLAVČIČ, D. Electric field distribution and electroporation threshold. In: *Handbook of Electroporation*. [S.l.]: Springer International Publishing, 2016. p. 1–17. Citado 2 vezes nas páginas 41 e 82.

KRASSOWSKA, W.; FILEV, P. D. Modeling electroporation in a single cell. *Biophysical Journal*, Elsevier BV, v. 92, n. 2, p. 404–417, jan 2007. Citado na página 42.

LANGUS, J. et al. Dynamic finite-element model for efficient modelling of electric currents in electroporated tissue. *Scientific Reports*, Springer Science and Business Media LLC, v. 6, n. 1, may 2016. Citado 5 vezes nas páginas 19, 36, 42, 69 e 111.

LAROU, E. et al. High throughput cellular biosensor for the ultra-sensitive, ultra-rapid detection of aflatoxin m1. *Food Control*, Elsevier BV, v. 29, n. 1, p. 208–212, jan 2013. Citado na página 28.

MATHWORKS. *Algoritmo Genético*. [S.l.], 2020. Disponível em: <<https://www.mathworks.com/discovery/genetic-algorithm.html>>. Acesso em: 29 abr. 2020. Citado na página 60.

MAČEK-LEBAR, A.; MIKLAVČIČ, D. Cell electroporability to small molecules in vitro: control by pulse parameters. *Radiology and Oncology*, v. 35, n. 3, Sep. 2001. Disponível em: <<https://www.radioloncol.com/index.php/ro/article/view/1446>>. Citado na página 18.

MIKLAVČIČ, D. et al. Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice. *BioMedical Engineering OnLine*, Springer Science and Business Media LLC, v. 13, n. 1, p. 29, 2014. Citado 5 vezes nas páginas 18, 28, 29, 57 e 100.

MIR, L. M.; BANOUN, H.; PAOLETTI, C. Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electroporability: Direct access to the cytosol. *Experimental Cell Research*, Elsevier BV, v. 175, n. 1, p. 15–25, mar 1988. Citado na página 18.

MULTIPHYSICS, C. *COMSOL Multiphysics®*. [S.l.], 2019. Disponível em: <<https://br.comsol.com/>>. Acesso em: 01 mai. 2019. Citado na página 64.

NEAL, 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*, Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE), v. 59, n. 4, p. 1076–1085, apr 2012. Citado 2 vezes nas páginas 40 e 68.

NEU, J. C.; KRASSOWSKA, W. Asymptotic model of electroporation. *Phys. Rev. E*, American Physical Society, v. 59, p. 3471–3482, Mar 1999. Disponível em: <<https://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.59.3471>>. Citado 3 vezes nas páginas 32, 33 e 34.

NEUMANN, E. The relaxation hysteresis of membrane electroporation. In: *Electroporation and Electrofusion in Cell Biology*. [S.l.]: Springer US, 1989. p. 61–82. Citado na página 30.

NEUMANN, E. et al. Mechanism of electroporative dye uptake by mouse b cells. *Biophysical Journal*, Elsevier BV, v. 74, n. 1, p. 98–108, jan 1998. Citado na página 59.

- PAKHOMOV, A. G. et al. Lipid nanopores can form a stable, ion channel-like conduction pathway in cell membrane. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, Elsevier BV, v. 385, n. 2, p. 181–186, jul 2009. Citado na página 59.
- PENNES, H. H. Analysis of tissue and arterial blood temperatures in the resting human forearm. *Journal of Applied Physiology*, American Physiological Society, v. 1, n. 2, p. 93–122, aug 1948. Citado na página 39.
- PLIQUETT, U. et al. Electroporation of subcutaneous mouse tumors by rectangular and trapezium high voltage pulses. *Bioelectrochemistry*, Elsevier BV, v. 62, n. 1, p. 83–93, apr 2004. Citado na página 81.
- RAMAMOORTH, M.; NARVEKAR, A. Non viral vectors in gene therapy - an overview. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 2015. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 28.
- RAMOS, A. Effect of the electroporation in the field calculation in biological tissues. *Artificial Organs*, Wiley, v. 29, n. 6, p. 510–513, jun 2005. Citado 2 vezes nas páginas 35 e 43.
- RAMOS, A. Improved numerical approach for electrical modeling of biological cell clusters. *Medical & Biological Engineering & Computing*, Springer Science and Business Media LLC, v. 48, n. 4, p. 311–319, mar 2010. Citado na página 42.
- RAMOS, A. *Eletromagnetismo*. [S.l.]: Blucher, 2016. ISBN 978-85-212-0969-0. Citado 3 vezes nas páginas 22, 23 e 24.
- RAMOS, A.; FARIAS, H. D. Numerical analysis of impedance spectra of yeast suspensions. *Journal of Microwaves, Optoelectronics and Electromagnetic Applications*, FapUNIFESP (SciELO), v. 12, n. 2, p. 647–654, dec 2013. Citado na página 40.
- RAMOS, A.; RAIZER, A.; MARQUES, J. L. A new computational approach for electrical analysis of biological tissues. *Bioelectrochemistry*, Elsevier BV, v. 59, n. 1-2, p. 73–84, apr 2003. Citado 2 vezes nas páginas 42 e 43.
- RAMOS, A.; SCHNEIDER, A. L. Electroporation of *kluveromyces marxianus* and -d-galactosidase extraction. In: *Applied Biological Engineering - Principles and Practice*. [S.l.]: InTech, 2012. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 40.
- RAMOS, A. et al. Sinusoidal signal analysis of electroporation in biological cells. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE), v. 59, n. 10, p. 2965–2973, oct 2012. Citado na página 40.
- RAMOS, A.; SUZUKI, D.; MARQUES, J. Numerical study of the electrical conductivity and polarization in a suspension of spherical cells. *Bioelectrochemistry*, Elsevier BV, v. 68, n. 2, p. 213–217, may 2006. Citado na página 29.
- RAMOS, A.; SUZUKI, D. O. H. Computational approach for electrical analysis of biological tissue using the equivalent circuit model. In: MIKLAVCIC, D. (Ed.). *Handbook of Electroporation*. [S.l.]: Springer, 2017. cap. Computational Approach for Electrical Analysis of Biological Tissue Using the Equivalent Circuit Model. Citado 5 vezes nas páginas 22, 43, 44, 45 e 46.

- RAMOS, A.; SUZUKI, D. O. H.; MARQUES, J. L. B. Numerical simulation of electroporation in spherical cells. *Artificial Organs*, Wiley, v. 28, n. 4, p. 357–361, apr 2004. Citado na página 35.
- RAMOS, A.; WEINERT, R. L. Mathematical and computational method for electrical analysis of biological tissues. *Journal of Computational Electronics*, Springer Science and Business Media LLC, v. 17, n. 1, p. 382–391, sep 2017. Citado 7 vezes nas páginas 19, 39, 43, 50, 51, 80 e 109.
- RANGEL, M. M. M. et al. Electrochemotherapy on bladder - preliminary results. *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, Biomedical Research Network, LLC, v. 12, n. 2, dec 2018. Citado na página 29.
- RECTIFIER, I. *IGBT IRG4PH40UD*. [S.l.], 2019. Disponível em: <<http://www.irf.com/product-info/datasheets/data/irg4ph40ud.pdf>>. Acesso em: 20 jan. 2019. Citado na página 53.
- REMS, L. et al. The contribution of lipid peroxidation to membrane permeability in electroporation: A molecular dynamics study. *Bioelectrochemistry*, Elsevier BV, v. 125, p. 46–57, feb 2019. Citado 2 vezes nas páginas 59 e 70.
- ROLS, M.; TEISSIÉ, J. Electroporation of mammalian cells. quantitative analysis of the phenomenon. *Biophysical Journal*, Elsevier BV, v. 58, n. 5, p. 1089–1098, nov 1990. Citado na página 59.
- SAPARETO, S. A.; DEWEY, W. C. Thermal dose determination in cancer therapy. *International Journal of Radiation Oncology*Biophysics*Physics*, Elsevier BV, v. 10, n. 6, p. 787–800, apr 1984. Citado na página 39.
- SCOTT-TAYLOR, T. et al. Human tumour and dendritic cell hybrids generated by electrofusion: potential for cancer vaccines. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, Elsevier BV, v. 1500, n. 3, p. 265–279, mar 2000. Citado 2 vezes nas páginas 18 e 28.
- Sel, D. et al. Sequential finite element model of tissue electroporation. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 52, n. 5, p. 816–827, 2005. Citado 2 vezes nas páginas 38 e 68.
- SILVEIRA, L. M. et al. Utilização de eletroquimioterapia para carcinoma de células escamosas tegumentar em felino. *Pesquisa Veterinária Brasileira, FapUNIFESP (SciELO)*, v. 36, n. 4, p. 297–302, apr 2016. Citado na página 29.
- SPUGNINI, E. P.; BALDI, A. Electrochemotherapy in veterinary oncology: State-of-the-art and perspectives. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v. 49, n. 5, p. 967 – 979, 2019. ISSN 0195-5616. *Cancer in Companion Animals*. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019556161930083X>>. Citado na página 29.
- ST. Nucleo F303K8. [S.l.], 2019. Disponível em: <<https://www.st.com/en/evaluation-tools/nucleo-f303k8.html#resource>>. Acesso em: 12 jul. 2019. Citado na página 54.

- SUPPLIER. DRIVER SIMPLER - DRO100S25A. [S.l.], 2019. Disponível em: <http://www.supplier.ind.br/site/arquivosprodutos/datasheet_dro100s25a_0412128.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2019. Citado na página 53.
- SUZUKI, D. O. et al. Numerical model of dog mast cell tumor treated by electrochemotherapy. *Artificial Organs*, Wiley, v. 39, n. 2, p. 192–197, jul 2014. Citado 2 vezes nas páginas 29 e 42.
- SUZUKI, D. O. H. Estudo da condutividade elétrica de suspensões de eritrócitos de ratos durante aplicação de campos elétricos intensos: teoria, modelagem e experimentação. Tese (Doutorado) — Universidade Federal de Santa Catarina, 2009. Citado 5 vezes nas páginas 18, 27, 30, 31 e 34.
- SUZUKI, D. O. H. et al. Oral mucosa model for electrochemotherapy treatment of dog mouth cancer: *Ex vivo*, *in silico*, and *in vivo* experiments. *Artificial Organs*, Wiley, v. 42, n. 3, p. 297–304, oct 2017. Citado na página 29.
- TEISSIÉ, J. et al. Recent biotechnological developments of electropulsation. a prospective review. *Bioelectrochemistry*, Elsevier BV, v. 55, n. 1-2, p. 107–112, jan 2002. Citado na página 28.
- TOZON, N.; TAMZALI, Y.; CEMAZAR, M. Electrochemotherapy in veterinary oncology. In: MIKLAVCIC, D. (Ed.). *Handbook of Electroporation*. [S.l.]: Springer, 2017. cap. Electrochemotherapy in Veterinary Oncology. Citado na página 29.
- VOYER, D. et al. Dynamical modeling of tissue electroporation. *Bioelectrochemistry*, Elsevier BV, v. 119, p. 98–110, feb 2018. Citado 4 vezes nas páginas 19, 37, 42 e 111.
- WEAVER, J. C.; CHIZMADZHEV, Y. Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, Elsevier BV, v. 41, n. 2, p. 135–160, dec 1996. Citado 3 vezes nas páginas 31, 32 e 39.
- WEINERT, R.; PEREIRA, E.; RAMOS, A. Inclusion of memory effects in a dynamic model of electroporation in biological tissues. *Artificial Organs*, Wiley, v. 43, n. 7, p. 688–693, jan 2019. Citado 3 vezes nas páginas 19, 51 e 62.
- WEINERT, R. L. Estudo experimental e computacional de eletropermeabilização de tecidos biológicos. *Dissertação (Mestrado)* — Universidade do Estado de Santa Catarina, 2017. Citado 3 vezes nas páginas 41, 53 e 58.
- Yao, C. et al. Analysis of dynamic processes in single-cell electroporation and their effects on parameter selection based on the finite-element model. *IEEE Transactions on Plasma Science*, v. 45, n. 5, p. 889–900, 2017. Citado na página 27.
- 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*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 88, n. 10, p. 4409–4413, may 1991. Citado na página 28.
- ZVS. Conversor DC-DC. [S.l.], 2019. Disponível em: <<https://pt.aliexpress.com/item/32762742856.html?spm=a2g0s.9042311.0.0.2742b90aF8PDqi>>. Acesso em: 05 fev. 2019. Citado na página 53.