



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS REITOR JOÃO DAVID FERREIRA LIMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA QUÍMICA

Anderson Silva

**Estudo *in silico* do emprego de encapsulinas e anidrases carbônicas na
remoção extracorpórea de CO₂**

Florianópolis

2020

Anderson Silva

**Estudo *in silico* do emprego de encapsulinas e anidrases carbônicas na
remoção extracorpórea de CO₂**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Química da Universidade
Federal de Santa Catarina para a obtenção do título
de Mestre em Engenharia Química.
Orientador: Prof. Dr. Agenor Furigo Júnior

Florianópolis

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silva, Anderson

Estudo in silico do emprego de encapsulinas e anidrases carbônicas na remoção extracorpórea de CO₂ / Anderson Silva ; orientador, Agenor Furigo Júnior, 2020.

105 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Florianópolis, 2020.

Inclui referências.

1. Engenharia Química. 2. Anidrase carbônica. 3. Encapsulina. 4. Remoção Extracorpórea de CO₂. 5. Simulação. . I. Furigo Júnior, Agenor. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química. III. Título.

Anderson Silva

Estudo *in silico* do emprego de encapsulinas e anidrases carbônicas na remoção extracorpórea de CO₂

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Bruno Francisco Oechsler, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Sergio Yesid Gómez González, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Agenor Furigo Júnior, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2020.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais pelo apoio e compreensão.

Agradeço ao professor Dr. Agenor Furigo Júnior por ter sido meu orientador.

Agradeço às professoras Dr.a. Palova Santos Balzer e Dr.a. Janaína Karine Andrezza por terem escrito as cartas de recomendação durante o processo seletivo.

Agradeço aos professores Dr. Sergio Yesid Gomez Gonzalez, Dr. Leonel Teixeira Pinto e Dr. Adriano da Silva por terem auxiliado a sanar algumas dúvidas em relação à simulação.

Agradeço à FAPESC pelo apoio financeiro através da bolsa de mestrado.

RESUMO

A biotecnologia é aplicada no aprimoramento de diversas tecnologias, incluindo aquelas de uso médico. Os equipamentos chamados de oxigenadores por membrana extracorpórea são exemplos que já passaram por diversas melhorias, mas que ainda apresentam uma dificuldade: a hemocompatibilidade. Tais máquinas substituem a função dos pulmões (troca de CO_2 e O_2) em pacientes que não conseguem respirar por si mesmos, e geralmente requerem a administração de anticoagulantes para minimizar problemas de hemocompatibilidade, mesmo que isso possa acrescentar ao risco de sangramento. O aumento da eficiência na troca de CO_2 é uma forma de permitir a redução da área de contato entre sangue e membrana, tornando a hemocompatibilidade menos problemática. A imobilização da enzima anidrase carbônica, que catalisa a reação reversível de hidratação do CO_2 , se demonstrou uma alternativa, mas ainda resta saber se ela sobreviveria às proteases do sangue. Uma forma de protegê-las seria encapsulando-as. Neste trabalho, foi avaliado, *in silico*, como as estruturas conhecidas como encapsulinas, ou nanocompartimentos bacterianos, poderiam afetar a performance da troca gasosa e a vida útil da anidrase carbônica imobilizada, considerando que encapsulinas são imunes à proteólise e conferem a mesma proteção às moléculas que estejam em seu interior. Para isso, modelos matemáticos uni e bidimensionais transientes foram construídos e simulados em linguagem Python, levando em conta o fenômeno de difusão, convecção, reação química, deposição de material sobre a membrana e a troca entre hemácias e plasma. Os métodos numéricos utilizados foram implementados corretamente, conforme evidenciado pela análise de verificação. Resultados das simulações mostram que o uso de enzimas diminui a pressão parcial média de CO_2 no sangue, porém menos CO_2 é removido, contrariando resultados experimentais da literatura. Os resultados sugerem que a degradação proteolítica pode ser combatida apenas com um excesso de enzimas; e que as encapsulinas são úteis no caso da degradação tornar a deposição de plaquetas um problema.

Palavras-chave: Anidrase Carbônica. Encapsulina. Remoção Extracorpórea de CO_2 . Simulação.

ABSTRACT

Biotechnology has been applied on the improvement of many other technologies, including medical equipment. Extracorporeal membrane oxygenators are examples of that; they are used as an artificial lung when patients cannot breathe by themselves. Despite all the improvements that it has been through, it still has a main problem: hemocompatibility. In order to prevent the blood from coagulating after contact with the equipment, doctors administrate anticoagulants, which, in turn, may increase the chances of bleeding. If blood-membrane contact area is reduced, hemocompatibility restraints are too. Enhancing CO₂ exchange is a way to allow to reduce contact area, and it has been found that carbonic anhydrase, an enzyme which catalyzes the reversible hydration of CO₂, immobilized on the membrane may be an effective way to achieve that. The question now is whether the enzyme will survive proteolytic degradation by blood proteases. This study aimed at modeling and simulating how making use of encapsulin, a bacterial nanocompartment, to protect carbonic anhydrase could impact gas exchange performance and the enzyme life-time within the device, since encapsulins are known for not being susceptible to proteolysis as well as keeping molecules in its lumen from being degraded. One and two dimensional, transient models were constructed in Python, taking into account diffusion, convection, reaction, blood components deposition onto the membrane, and exchange between red blood cells and blood plasma. The numerical methods employed were correctly implemented, as shown by code verification. Results from the models show that the use of enzymes reduces the mean CO₂ partial pressure in the blood but less CO₂ is removed, contradicting experimental results from the literature. Results suggest that an excess of enzyme may be used to alleviate the problem caused by proteolytic degradation, while encapsulins may be useful in case proteolytic degradation accelerates platelet deposition onto the membrane.

Keywords: Carbonic Anhydrase. Encapsulin. Extracorporeal CO₂ Removal. Simulation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Configuração básica de um oxigenador por membrana.....	20
Figura 2: Esquema da geometria usada nas simulações.....	37
Figura 3: Esquema com as reações em cada fase e os fenômenos modelados.....	50
Figura 4: Perfil numérico e exato para P_{CO_2} (mmHg) do modelo 1D sem enzima.....	53
Figura 5: Perfil numérico e exato para P_{CO_2} (mmHg) do modelo 2D sem enzima.....	54
Figura 6: Comportamento do erro com o refinamento da malha espacial ($P_{CO_2}^P$ 1D com enzima).....	56
Figura 7: Comportamento do erro com o refinamento da malha espacial ($P_{CO_2}^P$ 2D com enzima encapsulada).....	57
Figura 8: Comportamento do erro com o refinamento temporal ($C_{HCO_3}^R$ 1D sem enzima).....	57
Figura 9: Comportamento do erro com o refinamento temporal (C_H^R 1D sem enzima).	58
Figura 10: Comportamento do erro com o refinamento temporal ($P_{O_2}^P$ 2D com enzima encapsulada).	58
Figura 11: Comportamento do erro com o refinamento da malha temporal (C_H^P 1D sem enzima).....	59
Figura 12: Comportamento do erro com o refinamento da malha temporal ($P_{CO_2}^R$ 2D sem enzima).....	59
Figura 13: Erro da iteração no tempo para os modelos 1D.....	60
Figura 14: Erro da iteração no tempo para os modelos 2D.....	61
Figura 15: Comparação entre perfis de P_{CO_2} média, modelos 1D.....	63
Figura 16: Comparação entre perfis de C_{HbCO_2} média, modelos 1D.....	64
Figura 17: Comparação entre perfis de C_{HCO_3} média, modelos 1D.....	64
Figura 18: Comparação entre perfis de número total de mols de carbono, modelos 1D.....	65
Figura 19: Razão $C_{HCO_3}^P \cdot C_H^P / C_{CO_2}^P$ para a condição de contorno sobre a membrana.	66
Figura 20: Razão $C_{HCO_3}^P \cdot C_H^P / C_{CO_2}^P$ para o volume de controle adjacente à membrana.	66
Figura 21: Razão $C_{HCO_3}^P \cdot C_H^P / C_{CO_2}^P$ para volume de controle interno.....	67

Figura 22: Perfil de $k_m^{CO_2}$ proposto para representar deposição (efeito baixo).	69
Figura 23: Perfis de número total de mols de carbono para modelo com deposição usando efeito baixo.	70
Figura 24: Perfil de $k_m^{CO_2}$ proposto para representar deposição (deposição intensa para a membrana sem enzima).....	71
Figura 25: Perfis de P_{CO_2} média para modelos com deposição intensa na membrana sem enzima.	71
Figura 26: Perfis de concentração de carbono total com deposição usando dados intensos para modelo sem enzima.....	72
Figura 27: Perfil de $k_m^{CO_2}$ proposto para representar deposição na simulação de 10h (deposição baixa para membrana sem enzima).....	73
Figura 28: Perfis do número total de mols de carbono com deposição usando efeito baixo para modelo sem enzima (10h).	74
Figura 29: Perfis do número total de mols de carbono para modelos com condição de contorno reescrita (sem deposição).	78
Figura 30: Percentual de enzimas restantes de acordo com diferentes degradações proteolíticas.	80
Figura 31: Sistema de coordenadas usado na discretização.	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de encapsulinas e suas características.	28
Tabela 2: Descrição das variáveis, seus valores e referências.	44
Tabela 3: Dados usados no estudo de refinamento.	55
Tabela 4: Erros percentuais para a conservação de mols de carbono.	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

bCA	enzima anidrase carbônica de eritrócitos bovinos
CA	enzima anidrase carbônica
DNA	ácido desoxirribonucleico
ECCO ₂ R	remoção extracorpórea de CO ₂
ECMO	oxigenação extracorpórea por membrana
hCAII	enzima anidrase carbônica humana II
PISO	Pressure Implicit with Splitting of Operator
RuBisCO	enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase
SIMPLE	Semi-Implicit Method for Pressure-Linked Equations

LISTA DE SÍMBOLOS

α_{CO_2}	Solubilidade de CO ₂ no plasma
α_{O_2}	Solubilidade molar do O ₂ no plasma
$\alpha_{O_2}^{vol}$	Solubilidade volumétrica do O ₂ no plasma
β^{Hb}	Capacidade de tamponamento da hemoglobina
β^P	Capacidade de tamponamento do plasma
θ	Capacidade difusiva de O ₂ no sangue
A_{poros}	Soma da área transversal dos poros das encapsulinas presentes em um volume de controle
A	Área da face de um volume de controle por onde gases são trocados
C_{ENZ}	Concentração de enzima CA, por volume de encapsulina em um volume de controle (modelo com hCA encapsulada)
$C_{ENZ}^{área}$	Concentração de enzima CA, por área de troca gasosa em um volume de controle (modelo com hCA, mas sem encapsulina)
$C_{HCO_3}^P$	Concentração de bicarbonato no plasma
$C_{HCO_3}^R$	Concentração de bicarbonato na hemácia
C_H^P	Concentração de prótons no plasma
C_H^R	Concentração de prótons na hemácia
C_{Hb}	Concentração de hemoglobina
C_{HbCO_2}	Concentração de carbamato na hemácia
$C_{protease}$	Concentração de protease
cap	Capacidade da hemoglobina em transportar O ₂
cat	Fator de catálise para reação de hidratação nas hemácias
$D_{CO_2}^P$	Coefficiente de difusão do CO ₂ no plasma, multiplicado pela porosidade (1-Hct) e dividido por tortuosidade = 2
$D_{CO_2}^{poro}$	Coefficiente de difusão de CO ₂ pelo poro da encapsulina
$D_{CO_2}^{tr}$	Coefficiente de troca de CO ₂ entre plasma e hemácia
$D_{HCO_3}^P$	Coefficiente de difusão do HCO ₃ ⁻ no plasma, multiplicado pela porosidade (1-Hct) e dividido por tortuosidade = 2

$D_{HCO_3}^{poro}$	Coeficiente de difusão de HCO_3^- pelo poro da encapsulina
$D_{HCO_3}^{tr}$	Coeficiente de troca de HCO_3^- entre plasma e hemácia
D_H^P	Coeficiente de difusão do H^+ em água, multiplicado pela porosidade (1-Hct) e pela fração do sangue que é água (0,9) e dividido por tortuosidade = 2
D_H^{poro}	Coeficiente de difusão de H^+ pelo da encapsulina
$D_{O_2}^P$	Coeficiente de difusão do O_2 no plasma, multiplicado pela porosidade (1-Hct) e dividido por tortuosidade = 2
$D_{propanal}^{poro}$	Coeficiente de difusão de propanal no poro de PduA (referência para D_{poros}^{ENC})
$D_{propanol}^{poro}$	Coeficiente de difusão de propanodiol no poro de PduA (referência para D_{poros}^{ENC})
H	Tamanho da direção y
Hct	Hematócrito
K_M	Constante de Michaelis-Menten para hidratação catalítica
K_M^{deg}	Constante de Michaelis-Menten para degradação proteolítica
K_{ZO}	Constante de ionização do grupo amino da oxiemoglobina
K_{ZR}	Constante de ionização d grupo amino da hemoglobina não oxigenada
k_1	Constante de equilíbrio para a reação espontânea de hidratação
k_C	Constante de ionização da carboxiemoglobina
k_a	Constante de formação de carbamato
k_{cat}	Número de renovação para hidratação catalítica de CO_2
k_{cat}^{deg}	Número de renovação para degradação proteolítica
km_{CO_2}	Coeficiente de troca convectiva de CO_2
km_{O_2}	Coeficiente de troca convectiva de O_2
$k_p^{CO_2}$	Coeficiente de partição de CO_2 entre plasma e corrente gasosa
$k_p^{O_2}$	Coeficiente de partição de O_2 entre plasma e corrente gasosa
k_u	Constante de hidratação espontânea do CO_2
k_v	Constante de desidratação espontânea do CO_2
K	Constante de dissociação de H_2CO_3
L_{poro}	Comprimento do poro da encapsulina, ou espessura da encapsulina

L	Tamanho da direção x
n_{poros}	Número de poros na encapsulina (apenas nos pentâmeros)
Nt	Número de pontos para o tempo
Nx	Número de pontos para a direção 'x'
Ny	Número de pontos para a direção 'y'
$P_{CO_2}^P$	Pressão parcial de CO_2 no plasma
$P_{CO_2}^R$	Pressão parcial de CO_2 na hemácia
$P_{O_2}^P$	Pressão parcial de O_2 no plasma
$P_{O_2}^R$	Pressão parcial de O_2 na hemácia
pH_{virt}	pH do plasma que estaria em equilíbrio com pH das hemácias
R_{ext}^{ENC}	Raio externo da encapsulina
R_{inte}^{ENC}	Raio interno da encapsulina
R_{poro}^{ENC}	Raio do poro da encapsulina
R	Constante dos gases
r	Razão de Gibbs-Donnan
S	Saturação da hemoglobina
$t_{1/2}^{Cl}$	<i>Half-time</i> de equilíbrio para troca de Cl^-/HCO_3^- pela membrana das hemácias
$t_{1/2}^R$	<i>Half-time</i> de equilíbrio para troca de CO_2 através da membrana das hemácias
v_m	Velocidade média do escoamento
T	Temperatura
tf	Tempo de simulação
V^B	Volume de sangue no volume de controle; igual ao volume do volume de controle na fase sangue
V_{ENC}	Volume de todas as encapsulinas ocupando a área de 1 volume de controle
V^P	Volume de plasma no volume de controle
V^R	Volume de hemácias no volume de controle
v	Velocidade média do escoamento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo Geral	17
1.1.2	Objetivos Específicos	17
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	19
2.1	EQUIPAMENTOS MÉDICOS DE TROCA GASOSA POR MEMBRANA	19
2.2	ANIDRASE CARBÔNICA E A REMOÇÃO DE CO ₂	23
2.3	NANOCOMPARTIMENTOS BACTERIANOS: ENCAPSULINAS	26
2.4	ESTUDOS <i>IN SILICO</i>	30
3	METODOLOGIA	36
3.1	EQUAÇÕES PRINCIPAIS	37
3.2	CONDIÇÕES DE CONTORNO	38
3.2.1	Condição de contorno em $x = L$ para modelo sem enzimas	38
3.2.2	Condição de contorno em $x = L$ para modelo com enzimas encapsuladas	39
3.2.3	Condição de contorno em $x = L$ para modelo com enzimas	40
3.3	VARIÁVEIS AUXILIARES.....	40
3.4	TERMOS FONTE	41
3.5	TROCA DE MASSA ENTRE HEMÁCIAS E PLASMA	42
3.6	DEGRADAÇÃO PROTEOLÍTICA	42
3.7	CINÉTICA DA ANIDRASE CARBÔNICA NO CONTORNO	43
3.8	DADOS UTILIZADOS E CONDIÇÕES INICIAIS	44
3.9	DEPOSIÇÃO DE MATERIAL SOBRE A MEMBRANA	48
3.10	ASPECTO GERAL DA SIMULAÇÃO	49
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	52
4.1	MODELOS OBTIDOS.....	52

4.2	ANÁLISE DO CÓDIGO: VERIFICAÇÃO	52
4.2.1	Verificação com solução analítica	53
4.2.2	Erro com o refinamento	54
4.2.3	Erro com a iteração no tempo	60
4.2.4	Análise de consistência: conservação do carbono.....	61
4.3	DISCUSSÃO DE RESULTADOS PARA MODELOS UNIDIMENSIONAIS...	62
4.3.1	Comparação entre resultados numéricos e experimentais	63
4.3.2	O efeito antideposição da enzima	67
4.3.3	O efeito antideposição: efeito baixo	68
4.3.4	O efeito antideposição: efeito intenso	70
4.3.5	O efeito antideposição: efeito baixo e tempo mais longo.....	72
4.3.6	Modificação das condições de contorno	74
4.3.7	Comentários relevantes quanto ao uso das encapsulinas	79
4.3.8	Comparação entre 1D e 2D	83
5	CONCLUSÕES E SUGESTÕES.....	84
	REFERÊNCIAS	86
	APÊNDICE A – Discretização das equações e condições de contorno.	92
	APÊNDICE B – Aplicação do método das soluções manufaturadas ...	100

1 INTRODUÇÃO

A biotecnologia consegue contribuir para a melhoria de tecnologias de diversas áreas, a medicina inclusive. Um exemplo simples seria a produção de antibióticos, ou outras moléculas, por micro-organismos.

Alguns dos equipamentos usados para a prestação de atendimento médico também vêm sendo alvos de melhorias por parte de abordagens biotecnológicas, como a melhoria na eficiência da troca gasosa de equipamentos que atuam na respiração extracorpórea por membrana.

Tais máquinas possuem membranas que separam a corrente gasosa da sanguínea, permitindo a troca de CO_2 por O_2 , i.e., substituindo a função dos pulmões.

Desde o surgimento dos primeiros equipamentos empregando membranas de silicone, houve muitas melhorias relacionadas aos materiais utilizados, conferindo maior segurança e praticidade.

Atualmente, os problemas mais persistentes são: (i) garantir a hemocompatibilidade e (ii) controlar a necessidade de anticoagulantes, de modo a prevenir hemorragias. Esses dois problemas dificultam o emprego da técnica e aumentam os riscos de resultados desfavoráveis, logo, qualquer melhora significativa nisso seria relevante. A técnica já demonstrou ser capaz de melhorar as chances de recuperação em problemas respiratórios graves.

Uma proposta que vem sendo verificada é a de imobilizar enzimas anidrases carbônicas na membrana de tais dispositivos. Apenas CO_2 e O_2 permeiam a membrana, mas a maior parte do CO_2 se encontra na forma de bicarbonato (HCO_3^-), logo, ao catalisar a conversão $\text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CO}_2$, a enzima facilita a remoção do CO_2 . A facilitação da remoção pode permitir a redução da área de contato sangue-membrana, o que ameniza problemas com hemocompatibilidade, podendo minimizar a necessidade de anticoagulantes. A troca de O_2 é menos limitante que a de CO_2 em certas condições de operação.

Essa abordagem já foi validada experimentalmente e se demonstrou eficiente, mas há a preocupação de que as proteases presentes no sangue venham a degradar as anidrases carbônicas, e que o benefício de sua presença seja diminuído conforme sua degradação avança.

Uma forma de lidar com isso seria tentando encapsular tais enzimas, algo apenas explorado até o momento usando nitrato de celulose. Neste trabalho, os nanocompartimentos bacterianos conhecidos como encapsulinas, estruturas proteicas com formato icosaédrico oco e que são resistentes à proteólise, bem como conferem tal característica às moléculas em seu interior, foram avaliadas quanto a sua capacidade de prolongar a vida útil das anidrases carbônicas imobilizadas na membrana. Por se tratar de algo novo, o estudo foi conduzido *in silico*, com o intuito de melhor entender a contribuição de cada variável e facilitar o planejamento de experimentos futuros.

1.1 OBJETIVOS

Nas seções abaixo estão descritos o objetivo geral e os objetivos específicos.

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar, *in silico*, o impacto do uso de encapsulinas para a proteção de anidrases carbônicas contra a degradação proteolítica em equipamentos de troca gasosa por membrana.

1.1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos foram:

- a) simular uni (1D) e bidimensionalmente (2D) os fenômenos envolvidos na troca gasosa em respiradores extracorpóreos;
- b) simular a presença de encapsulinas imobilizadas na membrana e com anidrases carbônicas em seu interior;
- c) simular a presença de proteases no sangue por meio da inclusão da cinética de degradação da anidrase carbônica humana II;
- d) comparar a remoção de CO₂ ao longo do tempo quando as encapsulinas estiverem presentes e ausentes;

e) avaliar a importância do efeito das enzimas sobre a hemocompatibilidade (efeito antideposição de componentes celulares sobre a membrana).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este capítulo apresenta informações relevantes à compreensão do trabalho. Aqui são esclarecidos o contexto atual das pesquisas neste tema, bem como a forma com que diferentes ideias exploradas na literatura vêm a se relacionar neste projeto.

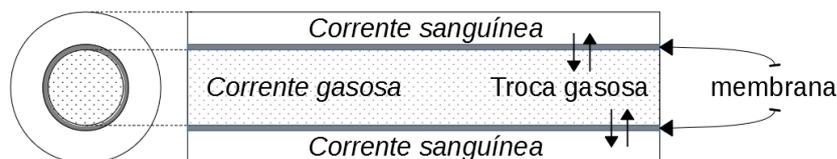
O texto começa discutindo os respiradores artificiais, enfatizando a possibilidade de melhorias, e depois passa a discutir conceitos e recursos que serão aplicados em busca de tal aprimoramento. Os recursos seriam: a enzima anidrase carbônica, os nanocompartimentos bacterianos chamados de encapsulinas e as técnicas para estudos *in silico*, cada qual apresentado com os conceitos pertinentes.

2.1 EQUIPAMENTOS MÉDICOS DE TROCA GASOSA POR MEMBRANA

A troca gasosa extracorpórea consegue reduzir a mortalidade e aumentar a sobrevivência sem sequelas de pacientes com problemas respiratórios graves, conforme revisado por Makdisi e Wang (2015). Ela viabiliza que os pacientes tenham tempo de se recuperar para: (i) passarem pelos próximos procedimentos; ou (ii) possam respirar por si mesmos e serem liberados do hospital (MAKDISI; WANG, 2015).

Técnicas de troca gasosa por membranas são utilizadas para suprir as necessidades de remoção de CO₂ e infusão de O₂ de pacientes cujos pulmões e/ou coração não podem fazê-lo (KACMAREK; STOLLER; HEUER, 2017). Nestas situações, o pulmão, responsável pela troca gasosa, é substituído por uma membrana polimérica, enquanto que, o coração, responsável pela circulação do sangue, é substituído pelo bombeamento do equipamento (ELLIOTT; NAVA; SCHÖNHOFER, 2018). Aqui serão discutidas duas variantes: (i) a oxigenação extracorpórea por membrana (ECMO) e (ii) a remoção extracorpórea de dióxido de carbono (ECCO₂R). A Figura 1 ilustra o princípio básico do equipamento, que consiste em separar o sangue e a corrente gasosa com uma membrana permeável aos gases que precisam ser trocados, CO₂ e O₂. A corrente gasosa, rica em O₂ e pobre em CO₂, permite a troca por difusão pela membrana, em que este é removido do sangue e aquele é infundido nele.

Figura 1: Configuração básica de um oxigenador por membrana.



Fonte: Do autor (2020).

A diferença básica entre as duas é que a primeira, ECMO, atua na troca de CO_2 e O_2 , também substituindo o coração, se necessário. Já a segunda, ECCO₂R, atua na remoção de CO_2 quando a demanda pela troca de O_2 não é crítica. ECCO₂R costuma ser empregada como um auxiliar da ventilação mecânica (uma máquina bombeia o ar para dentro dos pulmões, onde a troca gasosa ocorre). Durante a ventilação mecânica protetora, em que se usam baixas taxas de bombeamento a fim de preservar os pulmões, pode ocorrer o acúmulo de CO_2 no sangue, que é removido por ECCO₂R de modo a se manter a baixa taxa de ventilação (ELLIOTT; NAVA; SCHÖNHOFER, 2018; ROMAY; FERRER, 2016). A ventilação mecânica com baixas taxas de bombeamento está associada à redução de lesão pulmonar induzida pelo ventilador (VILI) (GRAMATICOPOLO et al., 2010). Em linguagem simples, a respiração mecânica induz a formação de lesões nos pulmões por gerar fluxos de ar que diferem daqueles que existiriam caso os pulmões estivessem funcionando sem auxílio.

Nos casos em que ECMO é utilizada para suporte cardiopulmonar recebe a denominação de suporte venoarterial (VA); quando apenas a função pulmonar é suprida (ECMO ou ECCO₂R), o termo é suporte venovenoso (VV). No modo VA, o sangue é drenado com uma cânula a partir de uma veia, passa pelo equipamento e é retornado por outra cânula posicionada numa artéria. A diferença no procedimento VV reside no fato de que o sangue é coletado e devolvido pelas veias, seja com uma cânula de duplo lúmen em uma única veia, ou duas cânulas em veias distintas (WILKINS; STOLLER; KACMAREK, 2009). Os vasos sanguíneos usados, artérias e/ou veias, dependem do estado de saúde do paciente, entre outros fatores.

Os dois modos, ECMO e ECCO₂R, desviam parte do fluxo de sangue para o equipamento, logo, pode ser necessário transfusões de sangue para compensar estes desvios. A fração da vazão sanguínea que é desviada representa o quanto o paciente está dependente do equipamento para a manutenção da respiração e/ou

circulação. As técnicas de VA exigem maiores fluxos sanguíneos do que VV, pois podem estar suprindo a função cardíaca juntamente à respiratória (KACMAREK; STOLLER; HEUER, 2017).

Diversas dificuldades relacionadas ao emprego dos equipamentos poderiam ser discutidas (KACMAREK; STOLLER; HEUER, 2017), incluindo também questões sobre quando usar cada uma das técnicas (MAURI; ZANELLA; PESENTI, 2013), porém, considerando o foco deste trabalho, serão discutidos dois problemas, que ao longo do tempo já foram reduzidos pela evolução da técnica, mas que ainda são frequentes, são eles: (i) a coagulação do sangue na membrana ou outros pontos do equipamento, e (ii) o sangramento.

Os dois problemas estão relacionados. O sangue tende a coagular ao entrar em contato com material estranho, neste caso a parede interna dos tubos e a própria membrana. Para evitar isso, anticoagulantes são administrados e controlados durante o tempo em que o paciente permanecer recebendo suporte. A anticoagulação controlada para evitar coágulos já basta para aumentar as chances de sangramento, no entanto, pacientes sob suporte podem ter passado, ou estarem passando, por procedimentos cirúrgicos, o que agrava as chances de hemorragia. A manutenção da anticoagulação deve buscar um equilíbrio entre o risco de hemorragia e o de formação de coágulos (ELLIOTT; NAVA; SCHÖNHOFER, 2018).

Algumas abordagens já vêm sendo colocadas em prática, a fim de simplificar a gestão dos riscos citados anteriormente. Alguns equipamentos possuem, nas superfícies que entram em contato com o sangue, uma cobertura de heparina, o que aumenta a hemocompatibilidade da mesma, reduzindo a propensão à coagulação (ELLIOTT; NAVA; SCHÖNHOFER, 2018; KACMAREK; STOLLER; HEUER, 2017; SIDEBOTHAM et al., 2012). Além disso, o uso de membranas de polimetilpenteno, em substituição às membranas de silicone (NUSZKOWSKI et al., 2014), trouxe maior eficiência na troca gasosa (RONCON-ALBUQUERQUE; PAIVA, 2013; TOOMASIAN et al., 2005), permitindo a redução da área de contato membrana-sangue, reduzindo as chances de sensibilização, além de ser dito possuir maior hemocompatibilidade que o silicone (NUSZKOWSKI et al., 2014).

De acordo com estudos, a remoção de O_2 é mais dependente do fluxo de sangue, seja no pulmão ou no equipamento, enquanto que a de CO_2 é mais dependente do fluxo de gás, que, no caso dos pulmões, é o ar inalado, e, no caso do

equipamento (ECMO ou ECCO₂R), é a corrente gasosa (*sweep gas*) que circula pela face da membrana oposta àquela em que circula o sangue (PEEK et al., 2009). No caso da ventilação mecânica, vazões menores de ventilação previnem danos aos pulmões, mas, devido à dependência da remoção de CO₂ pelo fluxo gasoso, passa a haver o acúmulo de CO₂, cuja remoção pode ser feita por ECCO₂R. O problema desta abordagem é que a remoção ainda é apenas parcial, e, se for completa, fluxos mais altos de sangue são necessários (até 2 L/min) (CROTTI et al., 2012).

Com o intuito de remover CO₂ de forma mais eficiente, se propôs aumentar o gradiente de concentração deste através da membrana, o que aumentaria o fluxo de sua remoção. Para tal, foi proposto acidificar levemente o sangue a fim de deslocar o equilíbrio do CO₂ para a sua forma dissolvida (e não como HCO₃⁻, que será discutida na próxima seção). Em testes com modelos animais, essa abordagem aumentou, em média, 70% a remoção de CO₂ e não foram observados efeitos adversos, mesmo com 48 horas de monitoramento (ZANELLA et al., 2012).

As principais vantagens em aumentar a taxa de remoção de CO₂ são: (i) possibilitar uma menor área de contato entre membrana e sangue (ARAZAWA et al., 2012; KAAR et al., 2007; KIMMEL et al., 2013), reduzindo os problemas com hemocompatibilidade; e (ii) possibilitar um menor fluxo de sangue, o que permite o uso de cânulas mais finas, e facilita o controle da coagulação (ROMAY; FERRER, 2016). A coagulação é dependente da cinética das reações envolvidas e do transporte de massa difusivo/convectivo e, portanto, pode ser limitada por ambos, sendo que para fluxos mais baixos, o processo é limitado pelo transporte de massa (RANA; NEEVES, 2016). Pode-se observar que a primeira vantagem, assim como a segunda, se relaciona com os dois problemas citados em parágrafos anteriores, pois, quanto menos problemas envolvendo a hemocompatibilidade entre membrana e sangue, menor será a tendência à formação de coágulos, diminuindo a necessidade de anticoagulantes, o que reduz as chances de hemorragia.

Além da acidificação, o uso da enzima anidrase carbônica no aprimoramento da remoção de CO₂ já foi avaliado e mostra resultados promissores. Isso será discutido na próxima seção.

2.2 ANIDRASE CARBÔNICA E A REMOÇÃO DE CO₂

Outra ideia explorada para aumentar o gradiente de CO₂, e que beneficiaria principalmente a técnica de ECCO₂R, é a imobilização da enzima anidrase carbônica (CA) na face da membrana em contato com o sangue. Essa enzima catalisa a reação reversível de hidratação do dióxido de carbono, $\text{CO}_{2(d)} + \text{H}_2\text{O}_{(aq)} \leftrightarrow \text{HCO}_3^-_{(aq)} + \text{H}^+_{(aq)}$, permitindo que o CO₂ sendo transportado na forma de bicarbonato (HCO₃⁻), cerca de 90% do CO₂ sanguíneo é transportado desta forma (GUYTON, 1977 *apud* SVITEK; FEDERSPIEL, 2008), seja convertido para a forma dissolvida, CO_{2(d)}, aumentando o gradiente e melhorando a troca gasosa. O restante do CO₂ está presente ligado à hemoglobina (Hb-CO₂, 5%), chamado carbamato (a ligação do CO₂ ao grupo amina da hemoglobina), e na forma dissolvida (5%) (GUYTON, 1977 *apud* SVITEK; FEDERSPIEL, 2008).

A anidrase carbônica de eritrócitos bovinos (bCA) foi imobilizada em uma membrana de polimetilpenteno e avaliada com sangue bovino, obtendo-se uma remoção de CO₂ 36% maior do que a membrana não modificada (ARAZAWA et al., 2012).

Um dos trabalhos combinou a abordagem da acidificação, discutida na seção anterior, com a catálise pela enzima. Os autores imobilizaram anidrase carbônica em membranas de polimetilpenteno e usaram a corrente gasosa com 2,2 % de SO₂, capaz de acidificar levemente o sangue próximo à membrana. Quando apenas as enzimas foram usadas, o aumento na remoção de CO₂ foi de 31% (de 197 para 258 L/min.m²), já quando apenas a acidificação foi empregada, o aumento foi de 17% (de 197 para 230 mL/min.m²). Ao avaliar as duas abordagens simultaneamente, o aumento foi de 109% (de 197 para 411 mL/min.m²), indicando um efeito sinérgico. Nos casos em que a acidificação foi usada, o pH do sangue bovino na saída estava entre 7,35 e 7,38, não estando fora dos valores fisiológicos (ARAZAWA et al., 2015).

Os autores que iniciaram a utilização da enzima basearam a ideia no fato de que esta já se encontra presente no interior das hemácias, sendo chamada de anidrase carbônica humana II (hCAII), e atua no processo de troca gasosa nos pulmões e no equilíbrio entre bicarbonato e dióxido de carbono dissolvido, que age como um tamponante do pH sanguíneo. Isso foi uma observação importante, pois

qualquer coisa que vá entrar em contato com o sangue desperta preocupações quanto à hemocompatibilidade e, considerando que hCAII é comum ao organismo humano e ao próprio sangue, o seu uso poderia contornar problemas de compatibilidade que outras moléculas poderiam apresentar. A síntese da enzima pela tecnologia do DNA recombinante seria uma forma de viabilizar sua obtenção.

Alguns trabalhos já forneceram os primeiros dados sobre a hemocompatibilidade de uma membrana com a enzima imobilizada. Membranas comerciais de polipropileno com bCA imobilizadas na superfície apresentaram 72% menor deposição de plaquetas em relação a uma membrana de polimetilpenteno sem enzimas, e 58% menor que a membrana de polipropileno sem enzima. No mesmo trabalho, a ativação de plaquetas foi reduzida em 59% e 50% em relação à membrana de polimetilpenteno e polipropileno sem enzimas, respectivamente (OH et al., 2010). Estes resultados (obtidos da Figura 2 do artigo) indicam menor sensibilização do sangue por parte da membrana com enzimas, mas não esclarece o porquê disso.

Outro trabalho também comparou uma membrana de polipropileno com e sem hCAII recombinante imobilizada e observou (com base na Figura 6b do trabalho) uma redução de 76% na deposição de plaquetas com a imobilização das enzimas (KIMMEL et al., 2013). Uma redução de 95% na deposição de plaquetas foi observada ao imobilizar bCA em membranas de polimetilpenteno, ao mesmo tempo em que um aumento de 36% no fluxo de remoção de CO₂ foi registrado (ARAZAWA et al., 2012).

A imobilização de bCA em membranas de polimetilpenteno não prejudicou a troca gasosa de CO₂ e O₂ (KAAR et al., 2007), o que foi um achado importante para instigar o prosseguimento das pesquisas. Recentemente, alguns itens sendo pesquisados são: (i) como imobilizar a enzima de modo que não se desprenda e mantenha a atividade enzimática ao longo da vida útil da membrana, (ii) como atender os critérios de hemocompatibilidade da membrana com a enzima presente e (iii) a viabilidade técnica e econômica de produzir, purificar e imobilizar as enzimas em membranas que são descartáveis, devido à contaminação biológica.

Neste trabalho o foco se encontrou no primeiro item, no que diz respeito à manutenção da atividade enzimática ao longo do tempo, já que existe a preocupação de que a interação entre o sangue e as enzimas imobilizadas cause a

inativação destas. Parte da preocupação é justificada pela presença de proteases no sangue, que são enzimas capazes de hidrolisar outras proteínas.

As hCAII naturalmente presentes no sangue se encontram dentro dos eritrócitos (hemácias) e, portanto, estão protegidas da ação das proteases. Outras proteínas podem simplesmente não apresentar os aminoácidos reconhecidos pelas proteases ou eles não estão acessíveis (ou seja, não estão expostos) e assim não são hidrolisadas.

Caso a hCAII seja imobilizada na membrana, ela não contaria com a proteção das hemácias e poderia ser degradada caso apresentasse as sequências de aminoácidos reconhecidas pelas proteases do sangue. A presença de proteases no sangue é estudada devido a sua relação com certas doenças. De acordo com a literatura, o perfil proteolítico do sangue se encontra alterado em certas enfermidades e, o conhecimento do perfil normal e do alterado, característico para diferentes enfermidades, poderia ser utilizado para diagnóstico e tratamento (LEFKOWITZ; SCHMID-SCHÖNBEIN; HELLER, 2010).

Não foram encontrados estudos sobre a degradação de CA em contato com o sangue, apenas foi levantada essa hipótese por autores que avaliaram o efeito da presença da enzima na remoção de CO₂. Apesar disso, foram encontrados trabalhos que confirmam a presença de quimotripsina, e outras proteases, no sangue (LEFKOWITZ; SCHMID-SCHÖNBEIN; HELLER, 2010), e outro trabalho que validou a degradação de anidrase carbônica I e II pela tal protease *in vitro* (OSBORNE; TASHIAN, 1981). Os valores para a quimotripsina no soro de pessoas saudáveis se encontra entre 14,7 a 77,5 ng/mL, média de 37,5 ng/mL (desvio padrão de 19,6 ng/mL), determinado por um radioimunoensaio (IWAKI et al., 1983). A concentração pode ser considerada baixa, mas proteases são enzimas, logo, algumas moléculas dela conseguem clivar diversas moléculas do substrato.

Um dos primeiros trabalhos a avaliar o uso de CA para o aprimoramento de equipamentos de troca gasosa extracorpórea estava preocupado com a estabilidade da enzima em relação à temperatura e ao armazenamento. Os autores encapsularam a enzima em nitrato de celulose e a imobilizou em uma membrana de silicone, o material usado na época. Foram feitos testes iniciais em batelada comparando a enzima livre com a encapsulada. A encapsulação melhorou a retenção da atividade enzimática para o armazenamento em todas as temperaturas

testadas (4, 37 e 50°C). Ao testar a enzima encapsulada num sistema que simulasse a circulação sanguínea, 90% do fluxo de remoção inicial (estado estacionário) foi preservado após 10 dias armazenados em uma solução salina (SALLEY et al., 1992).

Diante dos resultados anteriores e do conhecimento de que a imobilização de enzimas costuma rendê-las mais resistentes à inativação, por mais que perdas na atividade enzimática estejam associadas, torna-se interessante a ideia de imobilizá-las por encapsulamento e depois imobilizar a cápsula na membrana. Isso poderia proteger as enzimas de proteases no sangue, apesar de que o efeito de melhora na hemocompatibilidade pudesse ser perdido, dependendo das propriedades do material da cápsula, o que carece investigação.

Alguns fatores definiriam a viabilidade ou não de se encapsular a enzima: (i) o ganho em estabilidade precisa compensar perdas de atividade e (ii) o aumento de custos advindos da encapsulação precisa ser justificado. Vale ressaltar que as situações em que ECMO ou ECCO₂R podem ser aplicadas são tão diversas que é provável ser possível comercializar diferentes versões das membranas (com enzima imobilizada, com enzima encapsulada/imobilizada e sem enzima) que atenderiam aos critérios de diferentes situações, tornando desnecessário que todas as membranas passassem a ter enzimas encapsuladas e imobilizadas.

Alguns trabalhos descobriram estruturas proteicas que se auto-organizam em icosaedros ocos, e que podem ser utilizadas para encapsular proteínas. O fato de tais estruturas não apresentarem degradação por proteases, mesmo sendo estruturas proteicas, despertou o interesse de que pudessem ser usadas para proteger as CAs, funcionando como um encapsulamento.

A próxima seção esclarece o que são e de onde vêm tais moléculas, as encapsulinas, e como poderiam ser empregadas no aperfeiçoamento da troca gasosa extracorpórea.

2.3 NANOCOMPARTIMENTOS BACTERIANOS: ENCAPSULINAS

Antes de associar o uso das encapsulinas com o tema do projeto, será apresentada uma introdução sobre tais estruturas.

Dentro das células de qualquer ser vivo, diversas reações serão conduzidas e, considerando a variedade destas, é de se esperar que um meio intracelular

homogêneo e único poderia não satisfazer as condições adequadas para todas elas. É por isso que as células eucariotas apresentam compartimentalização na forma de diferentes organelas (URRY et al., 2016), que, basicamente, criam microambientes intracelulares permitindo um meio diferente do encontrado no citosol (CASEM, 2016) e que seja mais favorável ao processo internalizado. Um exemplo simples disso seria o lisossomo, uma vesícula intracelular com pH ácido que contribui para a degradação de moléculas (PRYOR, 2012), evitando que o citosol todo tivesse de ser acidificado.

As células procariotas não apresentam organelas (URRY et al., 2016), mas foi observada a presença de estruturas proteicas aproximadamente esféricas que, após estudadas em mais detalhes, se mostraram capazes de internalizar enzimas para certas funções (NICHOLS et al., 2017). Ao fazerem isso, tais estruturas acabavam criando um microambiente para as reações, suprimindo a função de uma organela. Vale ressaltar que os diversos poros presentes nestas estruturas estão associados ao transporte de moléculas de substratos e produtos (WILLIAMS et al., 2018).

Diversas estruturas foram identificadas, algumas em escala nanométrica, com diâmetros entre 25-35 nm (NICHOLS et al., 2017), e outras, maiores, com diâmetros entre 80-400 nm (NIKLOWITZ; DREWS, 1956; SHIVELY, 1974; KERFELD et al., 2010; YEATES et al., 2011; CHOWDHURY et al., 2014; *apud* NICHOLS et al., 2017). Ao se referir àquelas, utiliza-se o termo nanocompartimentos bacterianos, e a estas, microcompartimentos bacterianos (NICHOLS et al., 2017). Na literatura é possível encontrar variações desta nomenclatura.

As encapsulinas são um exemplo de nanocompartimentos, sendo formadas inteiramente por várias unidades de um mesmo polipeptídeo, que se aglomeram em uma estrutura quase esférica (um icosaedro) (WILLIAMS et al., 2018). Essas estruturas são ocas, permitindo a internalização de outras proteínas, bastando que estas contenham o sinal peptídico C-terminal adequado (CASSIDY-AMSTUTZ et al., 2016). Desta forma, as encapsulinas internalizam enzimas específicas, separando essas reações do restante do citosol.

Como exemplos são citados três organismos produtores de encapsulinas e as características destas, sendo eles: *Myxococcus xanthus*, *Rhodococcus erythropolis* e *Thermotoga maritima*.

A Tabela 1 apresenta um resumo das características relevantes de cada encapsulina, incluindo suas dimensões e qual sua suposta função no organismo que a produz. Nos casos em que a função relaciona-se ao armazenamento de ferro, isso já conta com alguns estudos comprobatórios que mostram a necessidade da bactéria em evitar que o ferro fique no citosol formando radicais livres (MCHUGH et al., 2014), já no caso da degradação da lignina, ainda busca-se entender como as enzimas internalizadas conseguem ter acesso a um substrato muito maior do que o poro que liga o meio intra- e extra-encapsulina (RAHMANPOUR; BUGG, 2013).

Tabela 1: Exemplos de encapsulinas e suas características.

Organismo	D _{ext} D _{int}	Nº de subunidades	Suposta função <i>in vivo</i>	Referência
<i>M. xanthus</i>	32 26	180	Armazena excesso de íons de ferro	(MCHUGH et al., 2014)
<i>R. erythropolis</i>	28 ^a --	60 ^a	Degradação de lignina ^b	^a (TAMURA et al., 2015) ^b (RAHMANPOUR; BUGG, 2013)
<i>T. maritima</i>	23,5 21,25*	60	Armazena excesso de íons de ferro	(SUTTER et al., 2008)

* a média da faixa de valores informada pelos autores.

Na segunda coluna, os diâmetros interno (D_{int}) e externo (D_{ext}) estão em nanômetros.

A terceira coluna contém o número de subunidades que formam o compartimento.

Fonte: Adaptado da literatura (coluna 'Referência').

A relação das encapsulinas com o tema deste trabalho vem do fato de que elas internalizam enzimas que contenham o sinal peptídico para tal, como citado anteriormente. Após essa descoberta, os autores começaram a especular sobre a possibilidade de fundir uma proteína qualquer ao sinal de encapsulação e avaliar se ainda ocorreria a expressão adequada dos compartimentos.

Alguns testes foram feitos utilizando proteínas fluorescentes, como a *green fluorescent protein*, GFP, simplesmente pela facilidade em avaliar os resultados com detectores de fluorescência. Um dos trabalhos utilizou a encapsulina de *T. maritima* para encapsular sfGFP (*super folded GFP*) e percebeu que um sinal C-terminal de 15 aminoácidos, correspondente aos últimos aminoácidos da proteína que é

internalizada in vivo, era suficiente para a correta montagem dos compartimentos com sfGFP em seu interior (CASSIDY-AMSTUTZ et al., 2016).

Outros trabalhos resolveram avaliar se uma enzima, que não a naturalmente presente, poderia ser internalizada e manter sua atividade. A descarboxilase Aro10p de *Saccharomyces cerevisiae* foi fusionada com o sinal adequado, expressa com encapsulinas de *M. xanthus* e teve sua atividade confirmada com o substrato 4-hidroxifenilpiruvato, reforçando a ideia de que encapsulinas possam ser utilizadas como nanobiorreatores (LAU et al., 2018). Alguns pesquisadores com foco em aplicações médicas já confirmaram a possibilidade de usar as encapsulinas como *displays*, ou seja, expressar uma molécula na sua superfície externa, a fim de modular a interação com outras moléculas. Como exemplo, um trabalho expressou o epítipo do vírus Influenza A (da gripe) na superfície de encapsulinas de *T. maritima* e confirmou o desenvolvimento de uma resposta imune em ratos, indicando o potencial para o desenvolvimento de vacinas (LAGOUTTE et al., 2018).

Um dos textos consultados continha que, em testes iniciais, cujos resultados ainda não foram apresentados, a enzima anidrase carbônica foi co-expressa com a enzima ribulose-1,5-bisfosfato carboxilase oxigenase (RuBisCO, que fixa CO₂ nas plantas) e internalizadas em encapsulinas, permanecendo funcionais. Os autores ainda não publicaram os resultados, mas a intenção deles era a de aprimorar a fixação de carbono em plantas de interesse agrícola (GIESSEN; SILVER, 2017).

Tendo em conta os trabalhos que mostram que proteínas encapsuladas por encapsulinas não são degradadas por proteases (CASSIDY-AMSTUTZ et al., 2016; TAMURA et al., 2015; WILLIAMS et al., 2018) e que ainda mantêm sua atividade enzimática (LAGOUTTE et al., 2018; LAU et al., 2018), incluindo a própria CA (GIESSEN; SILVER, 2017), foco deste trabalho, foi levantada a hipótese de que a internalização de hCAII por encapsulinas poderia ser uma abordagem para aumentar a retenção da atividade das enzimas em contato com o sangue durante ECMO/ECCO₂R. Ainda mais encorajador, os trabalhos que mostraram a possibilidade de expor moléculas na superfície externa da encapsulina induzem a cogitar a possibilidade de que a hemocompatibilidade poderia ser melhorada com a modificação da superfície do nanocompartimento.

A avaliação desta hipótese, do uso das encapsulinas com hCAII para a troca gasosa extracorpórea, experimentalmente, é necessária, mas haveria um custo

relativamente alto ao considerar que diversos parâmetros precisariam ser testados. Por isso, surgiu a ideia de fazer uma avaliação inicial *in silico*, ou seja, computacionalmente, de forma que a relação entre as diferentes variáveis envolvidas pudesse ser compreendida e o número de experimentos necessários, em trabalhos futuros, pudesse ser reduzido. Além da redução de custos, a simulação computacional permite avaliar parâmetros antes de fazer testes com animais e humanos, podendo reduzir o uso de animais nas pesquisas e fornecer maior convicção sobre a técnica para o momento em que será testada em humanos.

A seção seguinte aborda a aplicação de simulações computacionais em estudos e relaciona isso com o tema deste trabalho e com o que já foi discutido até este ponto.

2.4 ESTUDOS *IN SILICO*

Antes de comentar sobre as abordagens *in silico* dos equipamentos em estudo neste trabalho, será feita uma breve introdução às simulações.

A Dinâmica Computacional de Fluidos (CFD, do inglês) usa conhecimentos de matemática, física e computação para simular o escoamento de fluidos e a interação destes com os sólidos. Com a adição de informações de outras áreas (biologia, química, etc), as aplicações são muito variadas (BLAZEK, 2015).

Com a evolução das técnicas e dos computadores, CFD passou a ser utilizada para otimização e pesquisa em diferentes áreas, por exemplo: aviação, turbomáquinas, desenho de automóveis e navios, entre outros (BLAZEK, 2015). Isso indica que CFD, quando conduzida corretamente, pode gerar resultados úteis e confiáveis.

De modo geral, os problemas resolvidos *in silico* envolvem equações complexas demais para serem resolvidas analiticamente (uma solução exata), logo, são empregadas técnicas de resolução numéricas (uma solução aproximada).

O processo de discretização permite tornar um sistema de equações diferenciais em um sistema de equações algébricas que aproxima o sistema original.

O método de discretização por volumes finitos é encontrado em alguns programas de CFD comerciais, já que ele garante a conservação da grandeza em cada volume de controle (VERSTEEG; MALALASEKERA, 2007). O prefácio da

segunda edição do livro de Versteeg e Malalasekera (2007) também comenta sobre o fato da técnica de volumes finitos ser mais facilmente compreendida dentro da engenharia, facilitando sua aplicação por engenheiros.

Simulações permitem que parâmetros sejam variados com mais facilidade do que seriam em bancada, e os resultados são úteis caso os devidos cuidados sejam tomados. É provável que justamente essa facilidade em avaliar parâmetros tenha instigado estudos sobre os equipamentos de ECMO e ECCO₂R *in silico*.

Até a data em que este texto foi escrito, não foram encontrados trabalhos que avaliassem, *in silico*, a presença de anidrase carbônica na remoção de CO₂ do sangue, fosse em português ou em inglês. Os trabalhos encontrados tratavam da remoção de CO₂ sem as enzimas, ou o uso da enzima para a captura/remoção de CO₂ de outros fluidos, que não o sangue. Ainda assim, esses trabalhos contribuíram para a metodologia deste estudo e, portanto, alguns serão citados nos parágrafos seguintes. Vale ressaltar que alguns trabalhos avaliaram o impacto das enzimas na remoção de CO₂ do sangue experimentalmente, conforme comentado na seção sobre anidrase carbônica.

Este primeiro exemplo de aplicação de CAs não envolve o sangue, mas sim a absorção, em uma fase líquida, do CO₂ presente em efluentes gasosos. O autor discutiu a influência de variáveis como: carga de enzimas, tamponamento, presença e ausência da catálise e fluxo contra- e co-correntes. Entre as conclusões alcançadas, o autor ressaltou a maior eficiência da configuração em contra-corrente. Ademais, foi observado que a presença de líquido nos poros da membrana criavam uma maior resistência à transferência de massa, mas que esta poderia ser compensada com a imobilização da enzima nestes poros e com o aumento da contribuição convectiva (ILIUTA; ILIUTA, 2017).

Agora, quanto ao uso de simulações no estudo de respiradores extracorpóreos, o impacto da vazão dos fluidos, sangue e gás, foi avaliado e verificou-se que a remoção de CO₂ é afetada pela vazão do gás, sendo diretamente proporcional a esta (MANAP; WAHAB; ZUKI, 2017). Há mais trabalhos que demonstram este comportamento. Já foi avaliado, por exemplo, que ao aumentar a vazão do gás em 8 vezes, um aumento de apenas 1% na troca de O₂ ocorreu, mas que a remoção de CO₂ subiu quase linearmente até que a vazão de gás fosse o dobro da sanguínea (TURRI; YANAGIHARA, 2011). Esse tipo de resultado, como

ressaltaram Manap, Wahab e Zuki (2017), mostra como simulações podem fornecer informações importantes sobre o impacto de cada variável, de forma que os fabricantes não dependam da simples tentativa e erro com protótipos para otimização dos equipamentos e condições de operação.

A maioria das simulações idealiza a disposição das fibras que compõem a membrana, considerando-as regularmente espaçadas, por exemplo, de modo a simplificar o estudo. Isso é feito com o prejuízo de afastar a geometria computacional da real. Todavia, dois estudos foram na direção contrária, já que neles os autores buscaram garantir que a geometria real fosse representada computacionalmente, cada qual com uma abordagem distinta. No primeiro caso, o autor começou criando um modelo 3D com as fibras na posição em que conduziria o estudo, depois, construiu protótipos com uma impressora 3D (HORMES et al., 2011). Isso garantiu que modelo e realidade coincidissem, ao menos em termos de disposição das fibras. Já no segundo caso, o autor digitalizou a estrutura 3D de dois protótipos, transferiu isso para o computador, fez o processamento adequado e gerou a malha sobre esta estrutura (D'ONOFRIO et al., 2017). O próprio autor ressaltou que isso permite estudar o equipamento em seu estado final e não como ele foi projetado. Empresas que produzem membranas para ECMO/ECCO₂R poderiam se beneficiar disso.

Para que o sangue seja adequadamente representado em ECMO/ECCO₂R, se faz necessário considerar o seu comportamento não-newtoniano. Entre os modelos existentes, o modelo de Casson e de Quemada se destacam, sendo que para taxas de cisalhamento mais baixas o modelo de Quemada é melhor (MARCINKOWSKA-GAPIŃSKA et al., 2007). Ambos os modelos aparecem tão frequentemente em simulações envolvendo sangue, que alguns autores desenvolveram soluções analíticas para o estado estacionário. A equação de Popel e Enden (1993), usando o modelo de Quemada, representa o perfil de velocidade do fluido escoando dentro de um tubo com gradiente de pressão constante, de uma forma que, se o fator de atrito for conhecido, a equação de Darcy-Weisbach pode ser utilizada para determinar a queda de pressão, evitando a solução do campo de pressões e velocidades por métodos como o *Semi-Implicit Method for Pressure-Linked Equations* (SIMPLE) ou *Pressure Implicit Split Operator* (PISO). O trabalho de MOUZA et al. (2018) fornece equações para o cálculo da queda de pressão para

sangue escoando em um tubo, segundo o modelo de Casson, que, a princípio, pode ser facilmente substituído pelo de Quemada e utilizado com a equação de Popel e Enden (1993).

Além do comportamento não newtoniano, o sangue pode sofrer o efeito de Fåhræus–Lindqvist, que ocorre quando o sangue circula por vasos de pequeno diâmetro, fazendo com que as hemácias se acumulem na região central, deixando uma camada de plasma com comportamento newtoniano rente às paredes do tubo (FÅHRÆUS; LINDQVIST, 1931). A necessidade de modelar isso depende do diâmetro pelo qual ocorre o escoamento, sendo que Fahraeus e Lindqvist (1931) evidenciaram isso para diâmetros menores que cerca de 0,3 mm, mas valores até 0,5 mm são encontrados na literatura (BARBEE; COKELET, 1971a,b; GAEHTGENS, 1980; PRIES et al., 1996 *apud* FOURNIER, 2017).

O comportamento não-newtoniano do sangue se deve, em grande parte, à presença de hemácias (BAIETH, 2008). Os modelos de Quemada e Casson levam isso em consideração ao usar o hematócrito, i.e., a fração volumétrica do sangue ocupada por hemácias.

As hemácias também impactam a transferência de massa e o balanço de espécies, já que dentro delas ocorrem reações que não existem no plasma.

Diferentes abordagens foram encontradas na literatura para lidar com isso. Em estudos sobre a troca gasosa através da placenta (HILL; POWER; LONGO, 1973a) e dos pulmões (HILL; POWER; LONGO, 1973b), modelos muito semelhantes foram desenvolvidos para calcular as concentrações de HCO_3^- , CO_2 , carbamato, oxiemoglobina e H^+ no plasma e dentro das hemácias separadamente. Tanto o efeito de Haldane, em que o CO_2 tende a se desprender da hemoglobina e deixar o sangue conforme a concentração de oxigênio se eleva, quanto o efeito de Bohr, em que o oxigênio se desprende mais facilmente da hemoglobina com o aumento na concentração de CO_2 , foram passíveis de avaliação com os modelos de Hill, Power e Longo (1973b), pois os autores ligaram as duas quantidades através do pH sanguíneo. Os autores notaram que o efeito de Haldane, na troca gasosa pulmonar, foi responsável por 46,4% da remoção de CO_2 , enquanto que o efeito de Bohr impactou em 2% a troca de O_2 (HILL; POWER; LONGO, 1973b), indicando que trabalhos que modelam apenas CO_2 , mesmo na presença de O_2 , podem estar subestimando a remoção daquele.

Os trabalhos de Hill, Power e Longo (1973a,1973b) modelaram a interação entre hemácias e plasma de uma forma tão detalhada que ele pôde discutir isso mais aprofundadamente. Uma das observações foi de que a reação de hidratação do CO_2 era muito mais veloz no interior das hemácias, devido à presença de anidrases carbônicas, fazendo com que o sangue, após deixar os pulmões ou a placenta, ainda precisasse de tempo para que as concentrações entre hemácias e plasma atingissem o equilíbrio. Não foram encontrados estudos que avaliassem se o sangue, ao deixar o ECMO/ECCO₂R, precisa de tempo para reestabelecer o equilíbrio entre hemácias e plasma, mas a metodologia de Hill, Power e Longo (1973a,1973b) certamente poderia ser útil ao investigar isso.

Para simplificar a abordagem da presença de hemácias, alguns autores usam tortuosidade e porosidade em seus modelos. Hormes et al. (2011) usaram isso, representando a região entre hemácias, ocupada por plasma, como poros em que O_2 podia difundir até ser capturado pela hemoglobina. A tortuosidade foi empregada para contabilizar a dificuldade de difundir entre os poros. No caso do CO_2 , os autores inseriram termos para considerar a difusão de CO_2 como bicarbonato ou ligado a hemoglobina, além da ideia de porosidade/tortuosidade já empregadas para O_2 .

Os trabalhos supracitados e diversos outros encontrados na literatura, incluindo trabalhos unicamente experimentais, podem servir de fonte para os dados que são inseridos nas simulações de ECMO/ECCO₂R. Alguns autores já buscaram desenvolver equações para o cálculo de alguns parâmetros do sangue, principalmente aqueles para difusão de O_2 e CO_2 . Svitek e Federspiel (2008) buscaram desenvolver uma forma de calcular o coeficiente de difusão utilizando experimentos feitos em água e depois adaptados para o sangue (incluindo CO_2 como HCO_3^-). Já Vaslef et al. (1994) utilizaram experimentos com água para estudar a transferência de O_2 no sangue. Hormes et al (2011) usaram o trabalho de Svitek e Federspiel (2008) com algumas modificações, e também aplicaram as equações de Vaslef et al. (1994) para comparação, observando boa concordância entre o modelo deles (adaptado do próprio Svitek) com o de Svitek e Federspiel (2008), mas registrando uma superestimação da troca de O_2 pelo modelo de Vaslef et al. (1994).

O próximo capítulo conta com mais detalhes sobre os valores adotados nas simulações e a metodologia desenvolvida.

3 METODOLOGIA

De uma forma resumida, escreveu-se um algoritmo em Python 3, usando a discretização pelo método dos volumes finitos, com discretização totalmente implícita para a variação temporal e diferenças centrais para os termos difusivos e convectivos. Todas as equações discretizadas constam no Apêndice A.

Para lidar adequadamente com a presença de convecção, o método chamado *weighed upstream differencing scheme* (WUDS), proposto por Raithby, foi aplicado, conforme descrito por Marchi (1993) (Eq. 1 e 2). Apenas o perfil do plasma usou WUDS, o perfil das hemácias não continha difusão e utilizou apenas diferenças centrais.

$$\beta = \frac{1+0,005Pe^2}{1+0,05Pe^2} \quad (1)$$

$$\alpha = \frac{Pe^2}{10+2Pe^2} \quad (2)$$

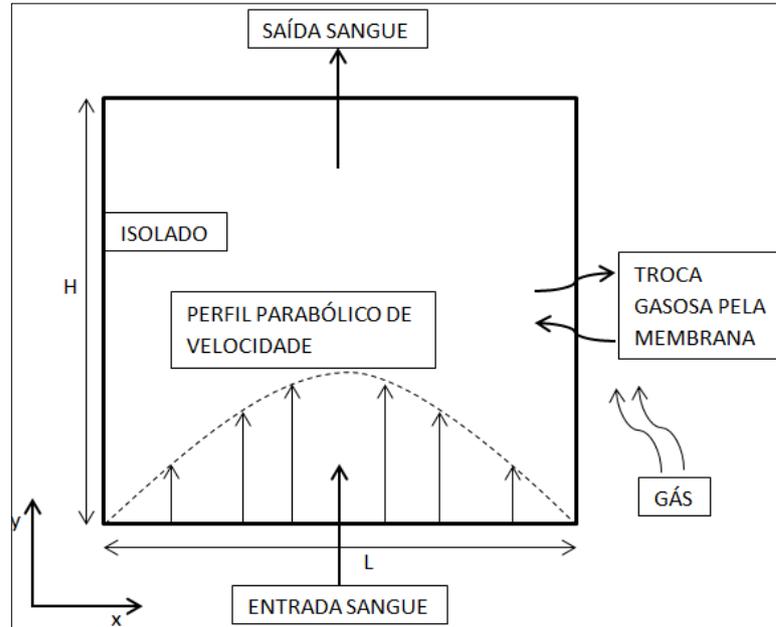
E o número de Peclet (Pe) foi calculado pela Eq. (3), onde H é o comprimento da direção y (sentido do escoamento), $v_y(x)$ é o perfil de velocidades, N_y é o número de pontos em y , e D_{ab} é o coeficiente de difusão.

$$Pe = \frac{H \times v_y(x)}{N_y \times D_{ab}} \quad (3)$$

A geometria utilizada foi retangular, conforme Figura 2. Para simplificar o código e permitir maior atenção às reações químicas ocorrendo no plasma, nas hemácias e entre estes, um perfil (newtoniano) laminar parabólico foi assumido, conforme Eq. (4) (foram consideradas propriedades constantes, queda de pressão linear na direção y e estado estacionário com componente de velocidade apenas na direção y em função de x). Ressalta-se que o sangue, na verdade, se comporta como um fluido não-newtoniano, conforme discuto na Revisão da Literatura. Diante dessa consideração, os modelos para representar o comportamento não-newtoniano (Quemada e Casson) não foram necessários. O efeito de Fåhræus–Lindqvist foi ignorado.

$$v_y = 6v_m \left(\frac{x}{L} - \frac{x^2}{L^2} \right) \quad (4)$$

Figura 2: Esquema da geometria usada nas simulações.



Fonte: Do autor, (2020).

3.1 EQUAÇÕES PRINCIPAIS

A Eq. (5) modela o transporte de massa no plasma, e a Eq. (6) modela o transporte nas hemácias, que não difundem, apenas são carregadas pelo fluxo sanguíneo. As hemácias ainda podem apresentar perfil na direção x por estarem trocando substâncias com o plasma, que certamente apresenta perfil nesta direção. C representa a concentração da espécie, D o coeficiente de difusão no plasma, R o termo de reação mais o termo de troca entre hemácias e plasma, e v_y o perfil de velocidades ($v_y = v_y(x)$). O sobrescrito P se refere ao plasma e R se refere às hemácias (do inglês, *red blood cell*). Para O_2 e CO_2 a equação foi dividida pelo coeficiente de solubilidade para trabalhar com pressão parcial.

$$\frac{\partial c^P}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c^P}{\partial x^2} - v_y \frac{\partial c^P}{\partial y} + R^P \quad (5)$$

$$\frac{\partial c^R}{\partial t} = -v_y \frac{\partial c^R}{\partial y} + R^R \quad (6)$$

A Eq. (6) não foi utilizada para calcular o valor da concentração de O_2 nas hemácias. A equação para isso (pressão parcial de O_2 na hemácia) é fornecida adiante.

As três situações consideradas (sem enzima, com enzima e com enzima encapsulada) foram modeladas usando as Eq. (5) e (6), sendo que diferentes condições de contorno existiam para a posição $x = L$ onde a troca gasosa através da membrana ocorre.

3.2 CONDIÇÕES DE CONTORNO

A entrada de sangue ocorre em $y = 0$ (mantendo esse ponto sempre com a concentração inicial) e a saída em $y = H$, sendo que apenas o transporte convectivo foi considerado na direção y . Na parede $x = 0$ o fluxo é nulo, e em $x = L$ ocorre a troca através da membrana e a atuação das enzimas e encapsulinas, caso estejam presentes. Somente difusão foi considerada na direção x . Há reação homogênea em todo o meio, incluindo reações químicas e a troca de espécies entre hemácias e plasma, de acordo com equações de Hill, Power e Longon (1973b).

O modelo 1D não apresenta a direção y , por isso não conta com o termo convectivo. No caso 1D, as espécies no plasma em $x = 0$ foram consideradas como tendo concentração constante igual à concentração inicial.

Tanto no modelo uni- quanto bidimensional, não foi considerado o perfil de concentrações na membrana nem na fase gasosa. Alguns trabalhos citam que a maior resistência à troca de massa se encontra na fase líquida (o sangue) (FEDERSPIEL; HENCHIR, 2004; WICKRAMASINGHE; GARCIA; HAN, 2002).

3.2.1 Condição de contorno em $x = L$ para modelo sem enzimas

Na parede em $x = L$ do modelo sem enzimas foi aplicada a condição de fluxo nulo, Eq. (7), para as espécies que não difundem através da membrana (H^+ e HCO_3^-). Para o CO_2 , a condição em $x = L$ foi de fluxo difusivo igual ao fluxo convectivo, Eq (8), assim como para O_2 , Eq (9), sendo que esta foi a condição de O_2 para todos os modelos, já que a enzima não interage com o oxigênio. O sobrescrito G se refere ao gás.

$$D_i^P \frac{dc_i^P}{dx} \Big|_{x=L} = 0 \quad (7)$$

$$-D_{CO_2}^P \frac{dc_{CO_2}^P}{dx} \Big|_{x=L} = km_{CO_2} \left(k_p^{CO_2} C_{CO_2}^P \Big|_{x=L} - C_{CO_2}^G \right) \quad (8)$$

$$D_{O_2}^P \frac{dc_{O_2}^P}{dx} \Big|_{x=L} = km_{O_2} \left(C_{O_2}^G - k_p^{O_2} C_{O_2}^P \Big|_{x=L} \right) \quad (9)$$

3.2.2 Condição de contorno em $x = L$ para modelo com enzimas encapsuladas

Para o modelo com encapsulinas, a condição de descontinuidade de fluxos foi empregada para as espécies que interagem com as enzimas encapsuladas, atravessando ou não a membrana, representado pelas Eq. (10) a (12). O sobrescrito *ENC* se refere à encapsulina, que eram variáveis a serem calculadas com a solução do contorno, juntamente com as concentrações no plasma no contorno (sobrescrito *P* em $x = L$). As Eq. (13) a (15) representam um balanço de massa para as encapsulinas e calculam a concentração no interior delas.

$$D_{CO_2}^P A \frac{dc_{CO_2}^P}{dx} \Big|_{x=L} + km_{CO_2} A \left(k_p^{CO_2} C_{CO_2}^P \Big|_{x=L} - C_{CO_2}^G \right) = -D_{CO_2}^{poro} A_{poros} \frac{C_{CO_2}^P \Big|_{x=L} - C_{CO_2}^{ENC}}{L_{poro}} \quad (10)$$

$$-D_{HCO_3}^P A \frac{dc_{HCO_3}^P}{dx} \Big|_{x=L} = D_{HCO_3}^{poro} A_{poros} \frac{C_{HCO_3}^P \Big|_{x=L} - C_{HCO_3}^{ENC}}{L_{poro}} \quad (11)$$

$$-D_H^P A \frac{dc_H^P}{dx} \Big|_{x=L} = D_H^{poro} A_{poros} \frac{C_H^P \Big|_{x=L} - C_H^{ENC}}{L_{poro}} \quad (12)$$

$$-D_{CO_2}^{poro} A_{poros} \frac{C_{CO_2}^P \Big|_{x=L} - C_{CO_2}^{ENC}}{L_{poro}} = -k_{cat} C_{ENZ} V_{ENC} \frac{C_{CO_2}^{ENC} - C_{HCO_3}^{ENC} C_H^{ENC} / k_1}{K_M + C_{CO_2}^{ENC} - C_{HCO_3}^{ENC} C_H^{ENC} / k_1} \quad (13)$$

$$D_{HCO_3}^{poro} A_{poros} \frac{C_{HCO_3}^P \Big|_{x=L} - C_{HCO_3}^{ENC}}{L_{poro}} = -k_{cat} C_{ENZ} V_{ENC} \frac{C_{CO_2}^{ENC} - C_{HCO_3}^{ENC} C_H^{ENC} / k_1}{K_M + C_{CO_2}^{ENC} - C_{HCO_3}^{ENC} C_H^{ENC} / k_1} \quad (14)$$

$$D_H^{poro} A_{poros} \frac{C_H^P \Big|_{x=L} - C_H^{ENC}}{L_{poro}} = -k_{cat} C_{ENZ} V_{ENC} \frac{C_{CO_2}^{ENC} - C_{HCO_3}^{ENC} C_H^{ENC} / k_1}{K_M + C_{CO_2}^{ENC} - C_{HCO_3}^{ENC} C_H^{ENC} / k_1} \quad (15)$$

A solução das Eq. (10) a (15) foi simultânea devido à dependência entre elas. As Eq. (13) a (15) já estão na forma discreta.

3.2.3 Condição de contorno em $x = L$ para modelo com enzimas

A condição de descontinuidade de fluxo também foi empregada para o caso em que havia apenas as enzimas imobilizadas, conforme Eq. (16) a (18).

$$D_{CO_2}^P \frac{dC_{CO_2}^P}{dx} \Big|_{x=L} + km_{CO_2} \left(k_p^{CO_2} C_{CO_2}^P \Big|_{x=L} - C_{CO_2}^G \right) = -k_{cat} C_{ENZ}^{área} \frac{C_{CO_2}^P - C_{HCO_3}^P C_H^P / k_1}{K_M + C_{CO_2}^P - C_{HCO_3}^P C_H^P / k_1} \Big|_{x=L} \quad (16)$$

$$-D_{HCO_3}^P \frac{dC_{HCO_3}^P}{dx} \Big|_{x=L} = -k_{cat} C_{ENZ}^{área} \frac{C_{CO_2}^P - C_{HCO_3}^P C_H^P / k_1}{K_M + C_{CO_2}^P - C_{HCO_3}^P C_H^P / k_1} \Big|_{x=L} \quad (17)$$

$$-D_H^P \frac{dC_H^P}{dx} \Big|_{x=L} = -k_{cat} C_{ENZ}^{área} \frac{C_{CO_2}^P - C_{HCO_3}^P C_H^P / k_1}{K_M + C_{CO_2}^P - C_{HCO_3}^P C_H^P / k_1} \Big|_{x=L} \quad (18)$$

3.3 VARIÁVEIS AUXILIARES

Ao todo, foram modeladas 9 espécies e mais 3 variáveis auxiliares. As espécies modeladas foram: as pressões parciais do dióxido de carbono no plasma ($P_{CO_2}^P$) e na hemácia ($P_{CO_2}^R$), do oxigênio no plasma ($P_{O_2}^P$) e na hemácia ($P_{O_2}^R$); as concentrações de bicarbonato no plasma ($C_{HCO_3}^P$) e na hemácia ($C_{HCO_3}^R$), de íons hidrogênio no plasma (C_H^P) e na hemácia (C_H^R), e de carbamato na hemácia (C_{HbCO_2}). As variáveis auxiliares foram: a saturação de hemoglobina (S), a razão do equilíbrio de Gibbs-Donnan (r), e a capacidade de difusão de O_2 por mL de sangue (θ). As equações para o cálculo das variáveis auxiliares se encontram abaixo, Eq. (19) a Eq. (24) (HILL; POWER; LONGO, 1973b). A pressão parcial se refere à pressão que estaria em equilíbrio com a concentração dissolvida no líquido, dependente da solubilidade. A razão de Gibbs-Donnan se relaciona ao equilíbrio de cargas entre o interior da hemácia e o plasma (HILL; POWER; LONGO, 1973b).

$$\frac{dS}{dt} = \frac{100}{cap} \frac{\theta}{60} (P_{O_2}^P - P_{O_2}^R) \quad (19)$$

$$\theta = (3,287(1 - e^{0,1117(100-S)}) + 7,05 \times 10^{-3} S - 0,8142) \frac{cap}{0,20} \quad (20)$$

$$r = (5,8 \times 10^{-4} pH_{virt}^P - 4,37 \times 10^{-3}) S - 0,529 pH_{virt}^P + 4,6 \quad (21)$$

$$S = 100 \frac{a_1 \delta + a_2 \delta^2 + a_3 \delta^3 + \delta^4}{a_4 + a_5 \delta + a_6 \delta^2 + a_7 \delta^3 + \delta^4} \quad (22)$$

$$pH_{virt}^P = -\log_{10}(r C_H^R) \quad (23)$$

$$\delta = P_{O_2}^R 10^\Gamma \text{ onde } \Gamma = 0,40(pH_{virt}^P - 7,4) + 0,06(\log_{10} 40 - \log_{10} P_{CO_2}^R) \quad (24)$$

A pressão parcial de oxigênio na hemácia ($P_{O_2}^R$) foi calculada iterativamente com a Eq. (22) acima, que usa as seguintes constantes: $a_1 = -8532$, $a_2 = 2121$, $a_3 = -67.07$, $a_4 = 936000$, $a_5 = -31350$, $a_6 = 2396$, $a_7 = -67.10$ (HILL; POWER; LONGO, 1973b).

3.4 TERMOS FONTE

Os termos fontes (R) foram adaptados das equações de Hill, Power e Longo (1973b), e a forma final utilizada neste trabalho é definida pelas Eq. (25) a (32). As reações homogêneas que ocorrem em cada fase assim como a troca entre hemácias e plasma estão inclusas em tais equações. Os termos fontes para CO_2 e O_2 geram unidades de mmHg/s, pois estas equações foram resolvidas diretamente para pressão parcial. A linearização/discretização dos termos fontes consta no Apêndice A.

$$R_{CO_2}^P = \frac{1}{\alpha_{CO_2}} \left[-k_u \alpha_{CO_2} P_{CO_2}^P + \frac{k_v}{K} C_H^P C_{HCO_3}^P + \frac{D_{CO_2}^{tr}}{V^P} (P_{CO_2}^R - P_{CO_2}^P) \right] \quad (25)$$

$$R_{HCO_3}^P = - \left[-k_u \alpha_{CO_2} P_{CO_2}^P + \frac{k_v}{K} C_H^P C_{HCO_3}^P \right] - \frac{D_{HCO_3}^{tr}}{V^P} \left(C_{HCO_3}^P - \frac{C_{HCO_3}^R}{r} \right) \quad (26)$$

$$R_{O_2}^P = \frac{-1}{\alpha_{O_2}^{vol}} \frac{\theta}{60} (P_{O_2}^P - P_{O_2}^R) \quad (27)$$

$$R_H^P = -2,303 \frac{C_H^P}{\beta^P} \left[-k_u \alpha_{CO_2} P_{CO_2}^P + \frac{k_v}{K} C_H^P C_{HCO_3}^P \right] \quad (28)$$

$$R_{CO_2}^R = \frac{1}{\alpha_{CO_2}} cat \left[-k_u \alpha_{CO_2} P_{CO_2}^R + \frac{k_v}{K} C_H^R C_{HCO_3}^R \right] - \frac{1}{\alpha_{CO_2}} k_a \alpha_{CO_2} P_{CO_2}^R (C_{Hb} - C_{HbCO_2}) \left(\frac{S}{100} \frac{K_{ZO}}{K_{ZO} + C_H^R} + \left(1 - \frac{S}{100} \right) \frac{K_{ZR}}{K_{ZR} + C_H^R} \right) - \frac{1}{\alpha_{CO_2}} \frac{k_a}{k_c} C_{HbCO_2} C_H^R - \frac{1}{\alpha_{CO_2}} \frac{D_{CO_2}^{tr}}{V^R} (P_{CO_2}^R - P_{CO_2}^P) \quad (29)$$

$$R_{HCO_3}^R = -cat \left[-k_u \alpha_{CO_2} P_{CO_2}^R + \frac{k_v}{K} C_H^R C_{HCO_3}^R \right] + \frac{D_{HCO_3}^{tr}}{V^P} \left(C_{HCO_3}^P - \frac{C_{HCO_3}^R}{r} \right) \quad (30)$$

$$R_H^R = -2,303 \frac{C_H^R}{\beta^{Hb}} cat \left[-k_u \alpha_{CO_2} P_{CO_2}^R + \frac{k_v}{K} C_H^R C_{HCO_3}^R \right] + 2,303 \frac{C_H^R}{\beta^{Hb}} 1,5 k_a \alpha_{CO_2} P_{CO_2}^R (C_{Hb} - C_{HbCO_2}) \left(\frac{S}{100} \frac{K_{ZO}}{K_{ZO} + C_H^R} + \left(1 - \frac{S}{100} \right) \frac{K_{ZR}}{K_{ZR} + C_H^R} \right) - 2,303 \frac{C_H^R}{\beta^{Hb}} 1,5 \frac{k_a}{k_c} C_{HbCO_2} C_H^R + 2,303 \frac{C_H^R}{\beta^{Hb}} 0,6 \frac{cap}{100} \frac{1}{Hct} \frac{1}{22,4} \frac{dS}{dt} \quad (31)$$

$$R_{HbCO_2} = k_a \alpha_{CO_2} P_{CO_2}^R (C_{Hb} - C_{HbCO_2}) \left(\frac{S}{100} \frac{K_{ZO}}{K_{ZO} + C_H^R} + \left(1 - \frac{S}{100} \right) \frac{K_{ZR}}{K_{ZR} + C_H^R} \right) - \frac{k_a}{k_c} C_{HbCO_2} C_H^R \quad (32)$$

A linearização dos termos fontes foi realizada de acordo com o método de Picard, conforme Eq. (33) (VERSTEEG; MALALASEKERA, 2007).

$$S_{linearizado} = S^* + \frac{\partial S}{\partial \phi_P}^* (\phi_P - \phi_P^*) \quad (33)$$

O asterisco (*) indica que o valor é calculado usando os valores obtidos na iteração anterior. Os valores sem asterisco são aqueles que estão sendo calculados na iteração atual. $S_{linearizado}$ é o termo fonte linearizado; $\partial S / \partial \phi_P$ é o gradiente do termo fonte (S) avaliado em ϕ_P , sendo que ϕ_P é o valor da variável sendo calculada pela equação em que a linearização será inserida.

3.5 TROCA DE MASSA ENTRE HEMÁCIAS E PLASMA

Os valores dos coeficientes de troca de massa entre hemácias e plasma para CO_2 ($D_{\text{CO}_2}^{tr}$) e HCO_3^- ($D_{\text{HCO}_3^-}^{tr}$) foram determinados pelas Eq. (34) e (35) (HILL; POWER; LONGO, 1973b).

$$D_{\text{CO}_2}^{tr} = 0,693 \frac{\alpha_{\text{CO}_2}}{t_{1/2}^R} \frac{1}{1/V^P + 1/V^R} \quad (34)$$

$$D_{\text{HCO}_3^-}^{tr} = \frac{0,693}{t_{1/2}^{Cl}} \frac{1}{1/V^P + 1/V^R} \quad (35)$$

Devido a sua importância para este trabalho, as equações de Hill, Power e Longo (1973b) foram implementadas e o resultado do autor foi reproduzido com sucesso. Foi necessário um balanço de unidades para corrigir alguns erros nas equações apresentadas no artigo, indicando que o autor fez a implementação das equações corretas, mas se equivocou no momento de transcrevê-las para o texto publicado. Isso não é discutido em Resultados e Discussão.

3.6 DEGRADAÇÃO PROTEOLÍTICA

No caso em que a degradação proteolítica foi considerada, foi adotado um modelo cinético de Michaelis-Menten com dados da enzima quimiotripsina

(OSBORNE; TASHIAN, 1981). As outras proteases presentes foram modeladas indireta e não idealmente pelo aumento da concentração de quimiotripsina usado na Eq (36). A concentração de quimiotripsina no sangue foi maior do que a de enzima imobilizada, o que afeta a validade da Eq (36), que assume a hipótese de Michaelis-Menten de saturação da enzima, mas esta foi a única equação encontrada na literatura para a degradação proteolítica da anidrase carbônica. A Eq (36) também não havia sido testada para o substrato imobilizado. Osborne e Tashian (1981) usaram concentrações de substrato e protease de ordens de grandezas semelhantes, e fizeram adaptações nos cálculos para lidar com a falha da hipótese de que a concentração de substrato livre é igual a de substrato total.

$$\frac{dC_{ENZ}}{dt} = -k_{cat}^{deg} C_{protease} \frac{C_{ENZ}}{K_M^{deg} + C_{ENZ}} \quad (36)$$

3.7 CINÉTICA DA ANIDRASE CARBÔNICA NO CONTORNO

A cinética da anidrase carbônica foi expressa de acordo com a Eq (37), que leva em consideração a reação nos dois sentidos, hidratação e desidratação (RUSSO et al., 2016). Essa equação foi aplicada nas condições de contorno envolvendo as enzimas. A constante k_1 é a constante de equilíbrio da reação catalisada e K_M é a constante de Michaelis-Menten.

$$-\frac{dC_{CO_2}}{dt} = \frac{dC_{HCO_3}}{dt} = \frac{dC_H}{dt} = k_{cat} C_{ENZ} \frac{C_{CO_2} - C_{HCO_3} C_H / k_1}{K_M + C_{CO_2} - C_{HCO_3} C_H / k_1} \quad (37)$$

Para estipular a concentração de enzima imobilizada na membrana, foi primeiramente calculado um valor máximo ($h_{m\acute{a}x}$) e depois selecionada uma fração disso para as simulações. O valor de $h_{m\acute{a}x}$ foi definido como o número de mols da enzima necessário para cobrir completamente a superfície da membrana presente em um volume de controle (A), considerando que cada molécula da enzima ocupasse uma área equivalente a um círculo de 6 nm de diâmetro, estimado pela estrutura cristalina PDB 6B00 (KEAN et al., 2018), disponível no *Protein Data Bank*. A Eq (38) representa o cálculo realizado, em que N_A é o número de Avogadro ($6,022 \times 10^{26}$ moléculas por kmol, pois a simulação trabalhou com kmol/m³)

$$h_{m\acute{a}x} = \frac{A}{\pi R_{ENC}^2 N_A} \quad (38)$$

Um raciocínio semelhante foi usado para o máximo de encapsulinas que poderiam estar presentes, obtendo a Eq (39), onde A é a área da membrana para um volume de controle (m^2) e R_{ENC}^{ext} é o raio externo da encapsulina.

$$h_{max}^{ENC} = \frac{A}{\pi R_{ENC}^{ext}} \quad (39)$$

O trabalho de Sutter et al. (2008) estimou que cerca de 20 moléculas de sfGFP foram inseridas dentro de cada encapsulina, em média. Como sfGFP e hCA possuem massas moleculares semelhantes, considerou-se que cerca de 20 moléculas de hCA poderiam ser inseridas em cada compartimento, mas valores mais baixos que isso foram usados nas simulações (5 moléculas por encapsulina).

3.8 DADOS UTILIZADOS E CONDIÇÕES INICIAIS

Os dados utilizados foram coletados de simulações e trabalhos experimentais disponíveis em diversos periódicos e são apresentados na Tabela 2. Sempre que uma informação não for dada explicitamente, significa que o dado corresponde ao da Tabela 2. O significado de variáveis não comentadas no texto pode ser obtido nesta mesma tabela.

Tabela 2: Descrição das variáveis, seus valores e referências.

Variável	Descrição	Valor ou Valor Inicial	Ref.
α_{CO_2}	Solubilidade de CO_2 no plasma	0,03 mM/mmHg	[1]
α_{O_2}	Solubilidade molar do O_2 no plasma	1,35E-3 mM/mmHg	[1]
$\alpha_{O_2}^{vol}$	Solubilidade volumétrica do O_2 no plasma	3,03E-5 mL/(mL.mmHg)	[1]
β^{Hb}	Capacidade de tamponamento da hemoglobina	54,1 mEq base/unidade pH	[1]
β^P	Capacidade de tamponamento do plasma	6 mEq base/unidade pH	[1]
θ	Capacidade difusiva de O_2 no sangue	2,85 mL/(mL.min.mmHg)	[1]
A_{poros}	Soma da área transversal dos poros das encapsulinas presentes em um volume de controle	$0,8h_{max}^{ENC}n_{poros}\pi(R_{poro}^{ENC})^2$	

A	Área da face de um volume de controle por onde gases são trocados	m^2	
C_{ENZ}	Concentração de enzima CA, por volume de capsulina em um volume de controle (modelo com hCA encapsulada)	$0,8h_{max}^{ENC}$ para 5 moléculas de hCA por capsulina	
$C_{ENZ}^{área}$	Concentração de enzima CA, por área de troca gasosa em um volume de controle (modelo com hCA, mas sem capsulina)	$0,8h_{max}$	
$C_{HCO_3}^P$	Concentração de bicarbonato no plasma	23,99 mM	[1]
$C_{HCO_3}^R$	Concentração de bicarbonato na hemácia	16,55 mM	[1]
C_H^P	Concentração de prótons no plasma	42,66 nM	[1]
C_H^R	Concentração de prótons na hemácia	61,47 nM	[1]
C_{Hb}	Concentração de hemoglobina	20,70 mM	[1]
C_{HbcO_2}	Concentração de carbamato na hemácia	2,34 mM	[1]
$C_{protease}$	Concentração de protease	37,5 ng/mL	[2]
cap	Capacidade da hemoglobina em transportar O_2	0,201 mL O_2 / mL sangue	[1]
cat	Fator de catálise para reação de hidratação nas hemácias	13000	[1]
$D_{CO_2}^P$	Coefficiente de difusão do CO_2 no plasma, multiplicado pela porosidade (1-Hct) e dividido por tortuosidade = 2	2,0322E-10 m^2/s	[8],[9]
$D_{CO_2}^{poro}$	Coefficiente de difusão de CO_2 pelo poro da capsulina	1E-12 m^2/s **	
$D_{CO_2}^{tr}$	Coefficiente de troca de CO_2 entre plasma e hemácia	Eq. (34) L/s	[1]
$D_{HCO_3}^P$	Coefficiente de difusão do HCO_3^- no plasma, multiplicado pela porosidade (1-Hct) e dividido por tortuosidade = 2	1,2705E-10 m^2/s	[8],[9]
$D_{HCO_3}^{poro}$	Coefficiente de difusão de HCO_3^- pelo poro da capsulina	1E-11 m^2/s **	
$D_{HCO_3}^{tr}$	Coefficiente de troca de HCO_3^- entre plasma e hemácia	Eq. (35) mol/(mmHg.s)	[1]
D_H^P	Coefficiente de difusão do H^+ em água, multiplicado pela porosidade (1-Hct) e pela fração do sangue que é água (0,9) e dividido por tortuosidade = 2	1,188E-9 m^2/s	[10]
D_H^{poro}	Coefficiente de difusão de H^+ pelo da capsulina	1E-12 m^2/s **	
$D_{O_2}^P$	Coefficiente de difusão do O_2 no plasma, multiplicado pela porosidade (1-Hct) e dividido por tortuosidade = 2	4,95E-10 m^2/s	[8],[9]

$D_{propanal}^{poro}$	Coeficiente de difusão de propanal no poro de PduA (referência para D_{poros}^{ENC})	4,7E-10 m ² /s	[11]
$D_{propanol}^{poro}$	Coeficiente de difusão de propanodiol no poro de PduA (referência para D_{poros}^{ENC})	4,9E-10 m ² /s	[11]
H	Tamanho da direção y	1 m	
Hct	Hematócrito	0,45	[1]
K_M	Constante de Michaelis-Menten para hidratação catalítica	20E-3 M	[4]
K_M^{deg}	Constante de Michaelis-Menten para degradação proteolítica	189,6E-6 M	[3]
K_{ZO}	Constante de ionização do grupo amino da oxiemoglobina	8,4E-9 M	[1]
K_{ZR}	Constante de ionização do grupo amino da hemoglobina não oxigenada	7,2E-8 M	[1]
k_1	Constante de equilíbrio para a reação espontânea de hidratação	$\frac{k_u K}{k_v}$	[4]
k_c	Constante de ionização da carboxiemoglobina	2,4E-5	[1]
k_a	Constante de formação de carbamato	5000 M ⁻¹ s ⁻¹	[1]
k_{cat}	Número de renovação para hidratação catalítica de CO ₂	1E6 s ⁻¹	[4]
k_{cat}^{deg}	Número de renovação para degradação proteolítica	16,6E-4 s ⁻¹	[3]
km_{CO_2}	Coeficiente de troca convectiva de CO ₂	3E-5 m/s *	
km_{O_2}	Coeficiente de troca convectiva de O ₂	5E-6 m/s *	
$k_p^{CO_2}$	Coeficiente de partição de CO ₂ entre plasma e corrente gasosa	$\frac{RT}{\alpha_{CO_2}}$ mol CO ₂ gás/ mol CO ₂ no plasma	
$k_p^{O_2}$	Coeficiente de partição de O ₂ entre plasma e corrente gasosa	$\frac{RT}{\alpha_{O_2}}$ mol O ₂ gás/ mol O ₂ no plasma	
k_u	Constante de hidratação espontânea do CO ₂	0,12 s ⁻¹	[1]
k_v	Constante de desidratação espontânea do CO ₂	89 s ⁻¹	[1]
K	Constante de dissociação de H ₂ CO ₃	5,5E-4 M	[1]
L_{poro}	Comprimento do poro da encapsulina, ou espessura da encapsulina	2 nm	[5]
L	Tamanho da direção x	0,0005 m (2D) 0,01 m (1D)	
n_{poros}	Número de poros na encapsulina (apenas nos pentâmeros)	12	[7]
Nt	Número de pontos para o tempo		
Nx	Número de pontos para a direção 'x'		
Ny	Número de pontos para a direção 'y'		
$P_{CO_2}^P$	Pressão parcial de CO ₂ no plasma	46 mmHg	[1]
$P_{CO_2}^R$	Pressão parcial de CO ₂ na hemácia	46 mmHg	[1]

$P_{O_2}^P$	Pressão parcial de O ₂ no plasma	40 mmHg	[1]
$P_{O_2}^R$	Pressão parcial de O ₂ na hemácia	40 mmHg	[1]
pH_{virt}	pH do plasma que estaria em equilíbrio com pH das hemácias		
R_{ext}^{ENC}	Raio externo da encapsulina	24 nm	[5]
R_{inte}^{ENC}	Raio interno da encapsulina	22 nm	[5]
R_{poro}^{ENC}	Raio do poro da encapsulina	0,15 nm	[6]
R	Constante dos gases	62,36 m ³ .mmHg/(K.kmol)	
r	Razão de Gibbs-Donnan	0,69	[1]
S	Saturação da hemoglobina	72,16 %	[1]
$t_{1/2}^{Cl}$	<i>Half-time</i> de equilíbrio para troca de Cl ⁻ /HCO ₃ ⁻ pela membrana das hemácias	0,2 s	[1]
$t_{1/2}^R$	<i>Half-time</i> de equilíbrio para troca de CO ₂ através da membrana das hemácias	0,001 s	[1]
v_m	Velocidade média do escoamento	0,002 m/s	
T	Temperatura	300 K	
tf	Tempo de simulação	segundos	
V^B	Volume de sangue no volume de controle; igual ao volume do volume de controle na fase sangue	$L/N_x \times H/N_y$ (2D) L/N_x (1D)	
V_{ENC}	Volume de todas as encapsulinas ocupando a área de 1 volume de controle	$0,8h_{max}^{ENC} \frac{4}{3} \pi (R_{inte}^{ENC})^3$	
V^P	Volume de plasma no volume de controle	$(1 - Hct)V^B$ Litros	[1]
V^R	Volume de hemácias no volume de controle	$HctV^B$ Litros	[1]
v	Velocidade média do escoamento	0,002 m/s	

Coluna Referências: [1] (HILL; POWER; LONGO, 1973b); [2] (IWAKI et al., 1983); [3] (OSBORNE; TASHIAN, 1981); [4] (RUSSO et al., 2016); [5] (SUTTER et al., 2008); [6] (WILLIAMS et al., 2018); [7] (NICHOLS et al., 2017); [8] (SVITEK; FEDERSPIEL, 2008); [9] (HORMES et al., 2011); [10] (SOUDIJN, 2012) ; [11] (PARK et al., 2017).

* Por falta de dados adequados na literatura, foi aplicado um valor inicial que permitisse a execução da simulação.

** Usando dados de (PARK et al., 2017) como referência.

Fonte: Do autor, (2020).

Além de informações sobre o sangue e as enzimas, as simulações deste trabalho precisavam de dados sobre as encapsulinas. Parâmetros para a difusão de espécies pelos poros da encapsulina não foram encontrados na literatura, nem trabalhos propondo equações para o seu cálculo. Havia duas formas principais de

lidar com isso: (i) ignorar a indisponibilidade de um valor para a difusão e apenas estudar uma faixa de valores, de modo a entender o impacto disso nas variáveis de interesse; ou (ii) determinação experimental.

Devido à dificuldade em se conceber um experimento para determinar a difusão através dos poros da encapsulina, considerou-se utilizar a técnica de dinâmica molecular para estimar tais valores computacionalmente. Após avaliação, a técnica não foi empregada, pois o tempo requerido para o preparo das equações e para entendimento da metodologia prejudicaria o desenvolvimento do restante do projeto.

Uma faixa de valores para coeficientes de difusão pelos poros da encapsulina foi utilizado, sendo que os coeficientes de difusão de propanodiol e propanaldeído pelo poro de um microcompartimento bacteriano (PduA) foram utilizados como referência (PARK et al., 2017).

Por falta de dados na literatura, os coeficientes de partição foram definidos como a razão da concentração de 100 mmHg da substância no gás (usando a lei dos gases ideais para obter a concentração) pela concentração de 100 mmHg da substância no plasma (pressão que estaria em equilíbrio com a concentração no plasma em função da solubilidade), conforme Eq. (40) e (41).

$$k_p^{CO_2} = \frac{100/RT}{100\alpha_{CO_2}} = \frac{RT}{\alpha_{CO_2}} \quad (40)$$

$$k_p^{O_2} = \frac{100/RT}{100\alpha_{O_2}} = \frac{RT}{\alpha_{O_2}} \quad (41)$$

3.9 DEPOSIÇÃO DE MATERIAL SOBRE A MEMBRANA

Devido a algumas observações feitas durante a interpretação dos resultados, que serão detalhadas no próximo capítulo, todos os códigos passaram por uma adaptação para permitirem um valor de coeficiente de transferência de massa convectiva transiente. O intuito era simular a formação de depósitos de células (ex: plaquetas) e proteínas do sangue sobre a membrana, e o conseqüente aumento da resistência à troca gasosa. Com a escassez de dados cinéticos para este fenômeno, foi proposto um perfil genérico de redução do coeficiente de convecção com o tempo como forma de simular o aumento da dificuldade da troca gasosa. A Eq. (42) foi

utilizada para os coeficientes do oxigênio e dióxido de carbono. k_m^i (m/s) é $k_m^{CO_2}$ ou $k_m^{O_2}$; k_{mo}^i (m/s) é o valor inicial de k_m^i para O_2 ou CO_2 ; t é o tempo (h); k_{min}^i (m/s) é valor mínimo de k_m^i quando $t \rightarrow \infty$; $a = k_{mo}^i - k_{min}^i$ (m/s); $b = k_{min}^i$ (m/s); e c é o coeficiente do expoente (h^{-1}).

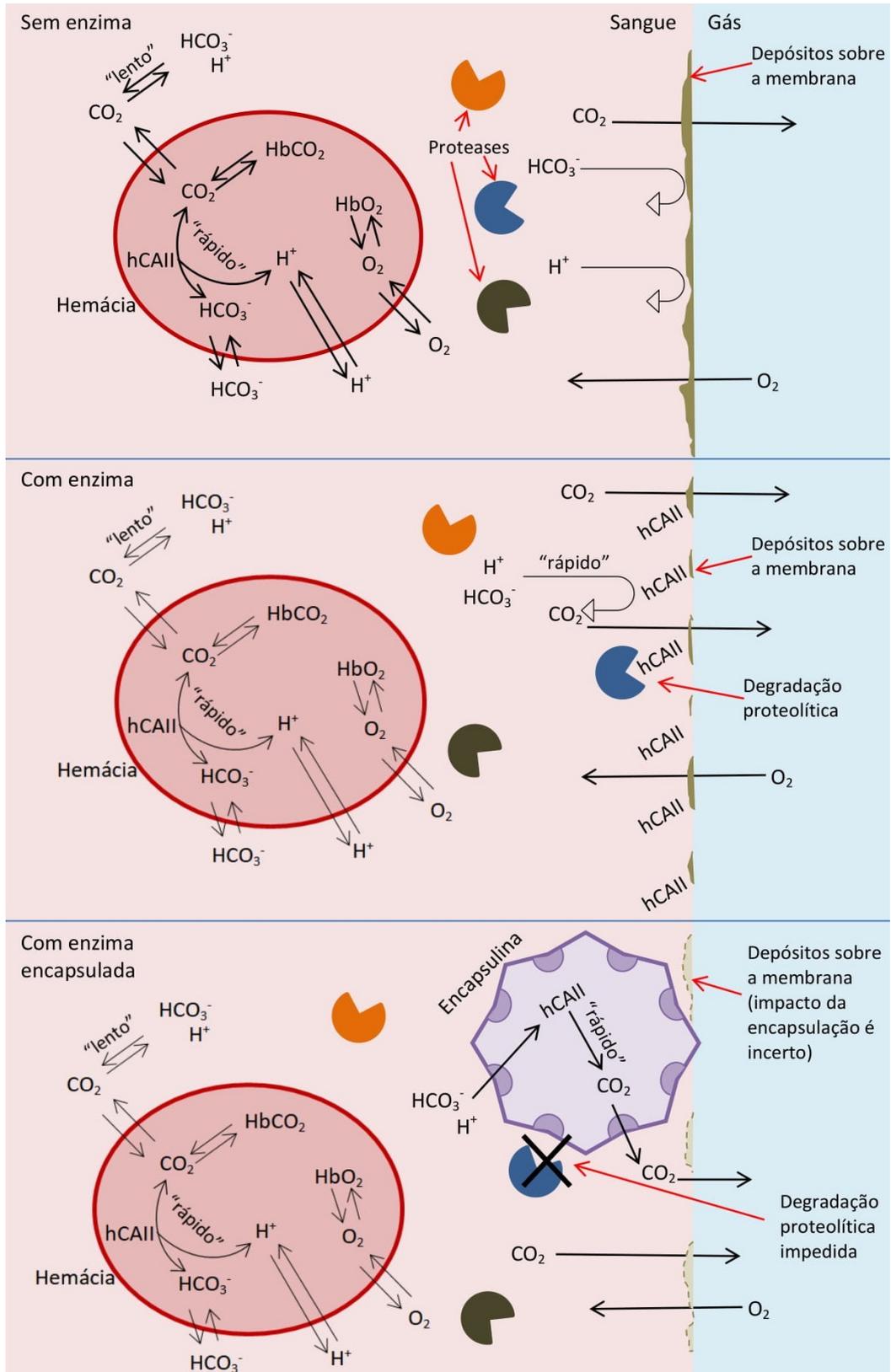
$$k_m^i = ae^{\Gamma} + b, \text{ onde } \Gamma = -ct \quad (42)$$

Os dados utilizados para os valores iniciais dos coeficientes foram 3E-5 m/s para CO_2 e 5E-6 m/s para o O_2 . Os demais dados foram fornecidos no momento da discussão de resultados. O uso da Eq. (42) se deu na forma de uma análise de sensibilidade, em que o efeito da deposição de material sobre a membrana foi considerado baixo ou intenso e o impacto na remoção de carbono foi avaliado.

3.10 ASPECTO GERAL DA SIMULAÇÃO

Em resumo, os seguintes aspectos foram inclusos nos modelos: a presença de proteases no sangue, a presença de enzimas anidrases carbônicas encapsuladas ou não, a presença de hemácias (com reações diferentes das do plasma), o efeito das enzimas/encapsulinas contra a deposição de material sobre a membrana e a presença da corrente gasosa com concentrações constantes de O_2 e CO_2 . A Figura 3 apresenta com mais detalhes as reações presentes em cada fase e os fenômenos modelados (a membrana separando as fases não foi modelada, por isso não consta na figura).

Figura 3: Esquema com as reações em cada fase e os fenômenos modelados.



Fonte: Do autor, (2020).

Ao todo, 6 códigos foram escritos, 3 deles unidimensionais transientes e os demais bidimensionais transientes. Os casos sem enzima, com enzima e com encapsulina foram modelados separadamente, por isso que tanto as versões 1D quanto 2D totalizaram 3 códigos cada. Todos os códigos foram verificados pelo método das soluções manufaturadas (uma breve explicação do método e as soluções propostas constam no Apêndice B), mas nenhum deles foi validado com dados experimentais, pois o autor não conduziu os próprios experimentos, e não foram encontrados, na literatura, trabalhos que pudessem ser representados pelos modelos criados, pois mesmos os experimentos mais simples apresentavam configurações complexas.

O erro da iteração no tempo foi monitorado, de forma a garantir que o código apenas avançasse ao atingir o critério de convergência de $1E-12$ para os perfis de íons H^+ , $1E-8$ para os demais perfis de concentração e $1E-6$ para a razão do equilíbrio de Gibbs-Donan (r). O comportamento do erro com o refinamento espacial e temporal da malha também foi avaliado, de forma a decidir qual refinamento usar nas simulações. A análise da conservação do número de mols do elemento carbono foi conduzida em todos os códigos, como uma forma de avaliar a conservação de massa.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste capítulo se encontram os resultados obtidos e a discussão pertinente. A discussão começa esclarecendo as características dos modelos obtidos e depois aborda a verificação do código. Ao final consta a discussão sobre as dificuldades encontradas e as tentativas de solução, precedidas de uma análise de conservação de massa.

4.1 MODELOS OBTIDOS

Este parágrafo tem como objetivo apresentar os códigos criados e facilitar o entendimento deste capítulo. Foram construídos modelos uni (1D) e bidimensionais (2D), ambos considerando variações temporais. O modelo 2D contava com convecção e difusão, enquanto que o modelo 1D apenas com a última. A maioria dos parâmetros foi encontrada na literatura, mas alguns tiveram de ser estimados ou arbitrariamente atribuídos de forma que o código pudesse ser executado (conforme Metodologia). Em caso de sucesso na simulação, os parâmetros faltantes poderiam ser estudados.

4.2 ANÁLISE DO CÓDIGO: VERIFICAÇÃO

Antes de proceder com a discussão dos resultados das simulações, o código foi verificado a fim de conferir a qualidade da solução numérica. O processo de verificação não fornece informações acerca da acurácia com que o modelo matemático representa os fenômenos envolvidos.

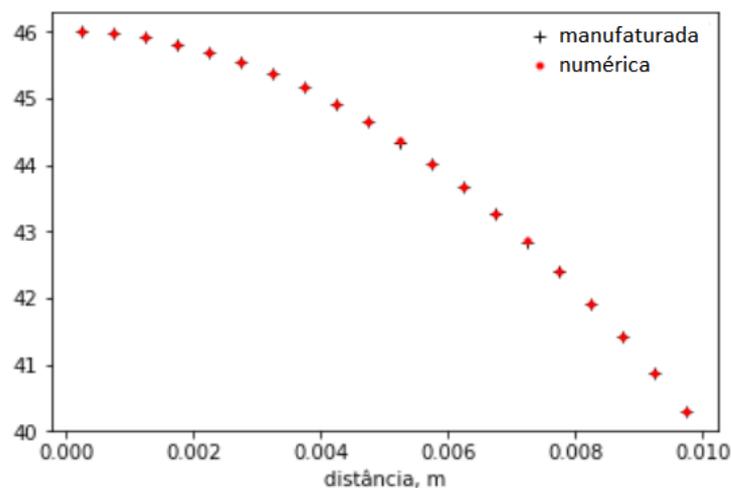
A verificação se dividiu em: verificação com o método das soluções manufaturadas, avaliação do comportamento do erro com o refinamento das malhas espacial e temporal, bem como com a iteração no tempo e análise de conservação de massa (número de mols de carbono).

4.2.1 Verificação com solução analítica

Uma forma eficiente de verificação do código é a comparação do resultado numérico com a solução analítica do problema. O método das soluções manufaturadas permite propor uma solução quando esta é desconhecida, e então adaptar o código para que a nova solução passe a ser aceita.

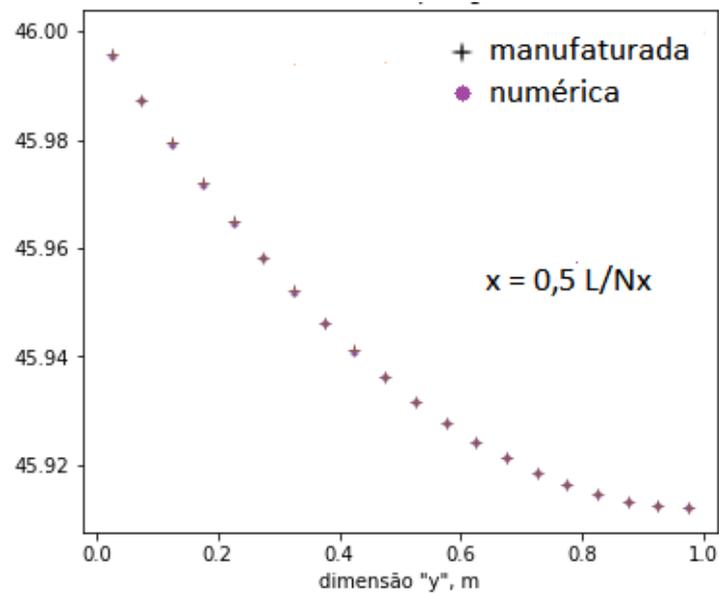
Todos os códigos gerados foram verificados e não apresentaram erros. Apenas os dados da Tabela 2 foram usados nos testes. As Figuras 4 e 5 ilustram a concordância entre a solução numérica e a exata (manufaturada), indicada pela sobreposição dos pontos (numérica) e cruzes (manufaturada). Ambos os gráficos foram gerados para $t_f = 60$ s e $N_t = 36.000$.

Figura 4: Perfil numérico e exato para P_{CO_2} (mmHg) do modelo 1D sem enzima.



Fonte: Do autor, (2020).

Figura 5: Perfil numérico e exato para P_{CO_2} (mmHg) do modelo 2D sem enzima.



Fonte: Do autor, (2020).

Em resumo, todos os códigos passaram na verificação com a solução analítica.

4.2.2 Erro com o refinamento

Para avaliar a relação entre o refinamento espacial ou temporal com o erro, foram conduzidas simulações com 5 diferentes refinamentos. A Tabela 3 contém os dados utilizados nos testes.

Tabela 3: Dados usados no estudo de refinamento.

Estudo do refinamento da malha temporal ($t_f = 1$ s)						
1D/2D	Malha espacial	Extra Grossa	Grossa	Média	Fina	Extra Fina
1D ^a	100	285	585	1170	2340	4680
2D ^b	100 x 100	285	585	1170	2340	4680
Estudo do refinamento da malha espacial (1D: $t_f = 1$ s; 2D: $t_f = 0,01$ s)						
1D/2D	Malha temporal	Extra Grossa	Grossa	Média	Fina	Extra Fina
1D ^c	10.000	10	20	40	80	160
2D ^d	150	10 x 10	20 x 20	40 x 40	80 x 80	160 x 160
^a o ponto da posição 50 da malha espacial, no tempo final (t_f), foi comparado. ^b o ponto da posição (50,50) da malha espacial, no tempo final (t_f), foi comparado. ^c o ponto médio entre a posição 5 e 6 da malha espacial extra grossa, no tempo final (t_f), foi comparado. ^d o ponto médio entre as posições (5,5), (6,5), (5,6) e (6,6) da malha espacial extra grossa, no tempo final (t_f), foi comparado.						

Fonte: Do autor, (2020).

Malhas espaciais com 320 e 640 pontos em cada direção também foram testadas, mas não houve mudança nos resultados, então esses dados não foram apresentados.

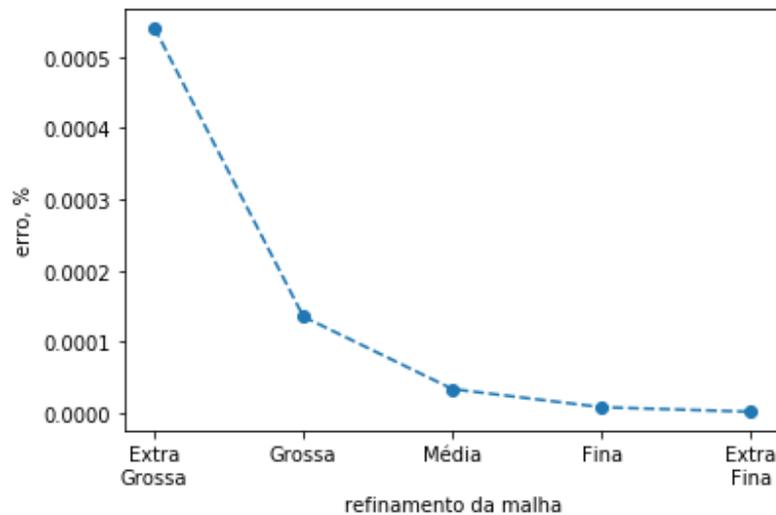
O comportamento esperado seria de que o erro reduzisse com malhas mais finas, e isso foi observado para o refinamento espacial, mas não para o temporal. Vale ressaltar que em todos os casos o erro era bem pequeno, sendo $1E-4$ % a ordem do maior erro percentual dos modelos 1D, e $1E-5$ % a ordem do maior erro percentual dos modelos 2D. Apenas o erro dos perfis de concentração foram avaliados, ou seja, sem considerar variáveis auxiliares. O erro representa a diferença percentual entre o resultado numérico e a solução manufaturada em relação à solução manufaturada, conforme Eq. (43).

$$Erro = 100 * \frac{|solução_{numérica} - solução_{manufaturada}|}{solução_{manufaturada}} \quad (43)$$

Para mostrar visualmente os resultados, alguns dos gráficos gerados foram selecionados, e constam neste trabalho como as Figuras 6 a 12. A tentativa foi de ilustrar os melhores e piores comportamentos encontrados.

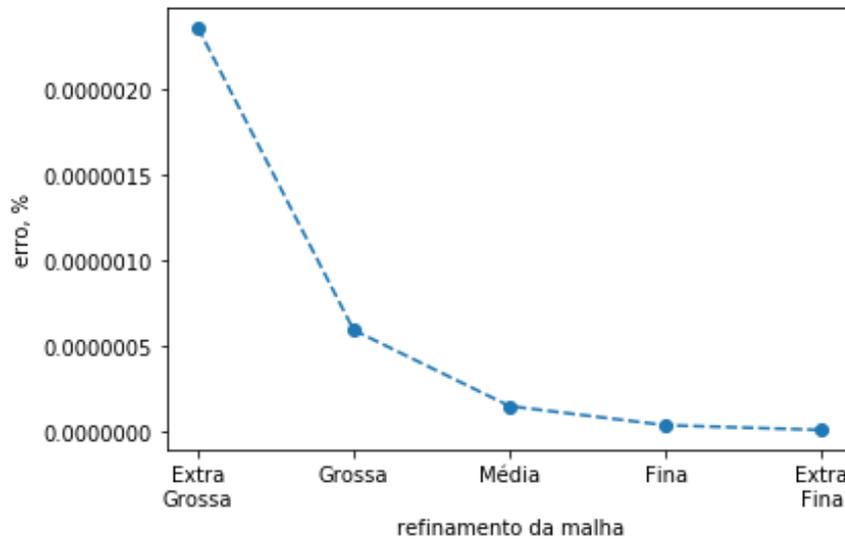
Os comportamentos mais coerentes com o esperado foram observados para o refinamento espacial. As Figuras 6 e 7 mostram o comportamento do erro para a pressão parcial de CO₂ nos modelos 1D com enzima e 2D com enzima encapsulada, respectivamente. Em ambos foi possível observar a clara redução do erro com o refinamento da malha. Esse foi o comportamento observado para todas as análises envolvendo o refinamento espacial.

Figura 6: Comportamento do erro com o refinamento da malha espacial (P_{CO₂}^P 1D com enzima).



Fonte: Do autor, (2020).

Figura 7: Comportamento do erro com o refinamento da malha espacial ($P_{CO_2}^P$ 2D com enzima encapsulada).

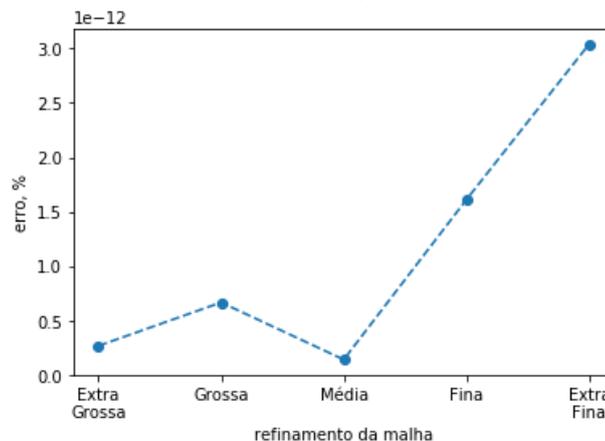


Fonte: Do autor, (2020).

O refinamento da malha temporal não apresentou o comportamento esperado para o erro, pois em alguns casos este não reduziu com o uso de malhas mais finas.

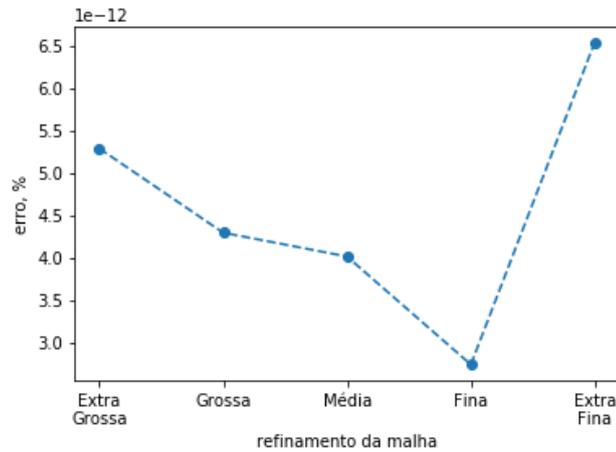
As Figuras 8 a 10 mostram como o erro sobe com o refinamento temporal para a concentração de bicarbonato nas hemácias (modelo 1D sem enzima), a concentração de H^+ nas hemácias (1D sem enzima) e a pressão parcial de oxigênio no plasma (modelo 2D com enzima encapsulada).

Figura 8: Comportamento do erro com o refinamento temporal ($C_{HCO_3}^R$ 1D sem enzima).



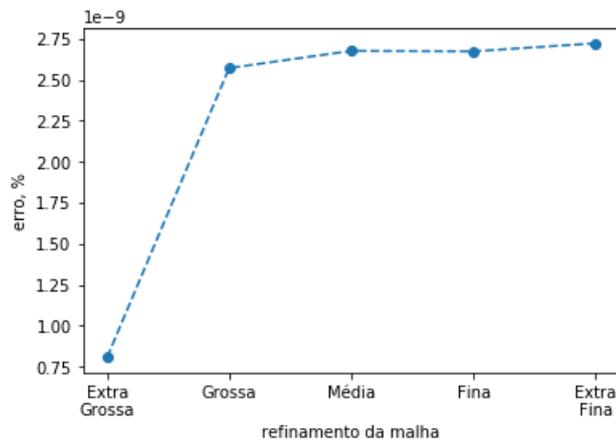
Fonte: Do autor, (2020).

Figura 9: Comportamento do erro com o refinamento temporal (C_H^R 1D sem enzima).



Fonte: Do autor, (2020).

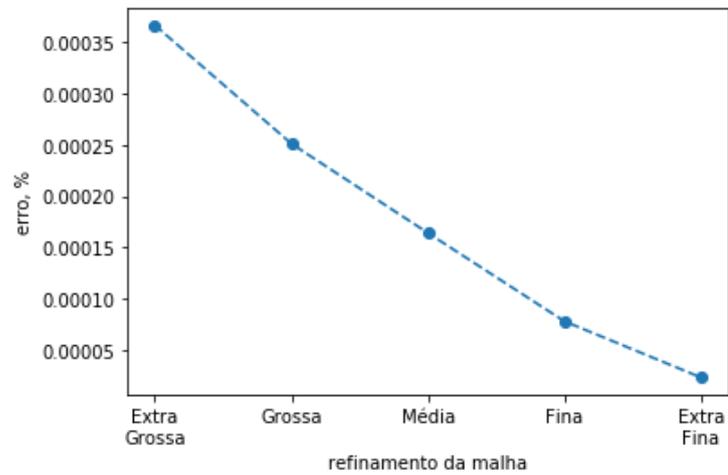
Figura 10: Comportamento do erro com o refinamento temporal ($P_{O_2}^P$ 2D com enzima encapsulada).



Fonte: Do autor, (2020).

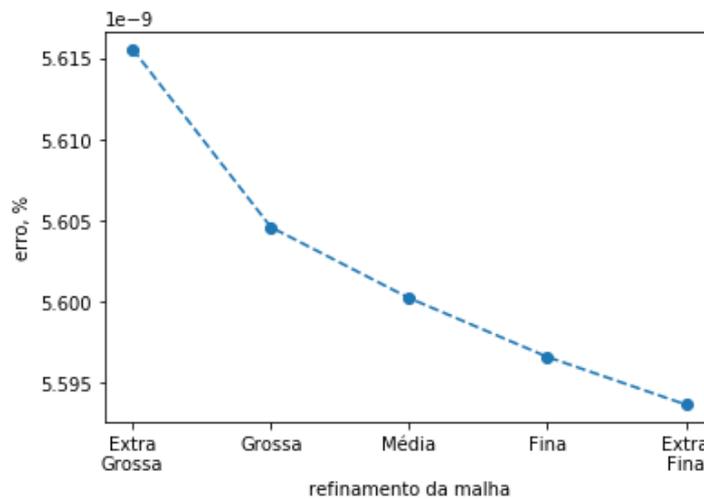
Alguns dos perfis apresentaram redução do erro com o refinamento da malha temporal, conforme o esperado. Exemplos disso foram os perfis de H^+ no plasma (1D sem enzima), Figura 11, e a pressão parcial de CO_2 nas hemácias (2D sem enzima), Figura 12.

Figura 11: Comportamento do erro com o refinamento da malha temporal (C_H^P 1D sem enzima).



Fonte: Do autor, (2020).

Figura 12: Comportamento do erro com o refinamento da malha temporal ($P_{CO_2}^R$ 2D sem enzima).



Fonte: Do autor, (2020).

Em resumo, o comportamento do erro com o refinamento espacial estava condizente com o esperado; o erro para o refinamento temporal era crescente em alguns casos, mas ainda assim um erro bem pequeno.

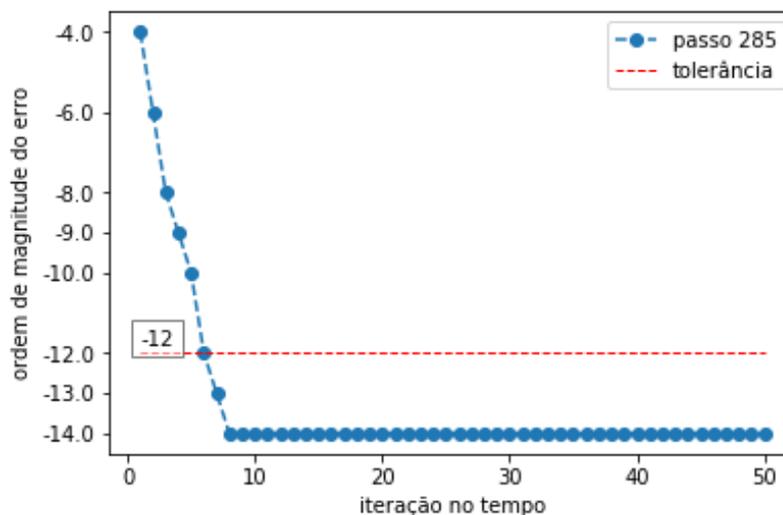
4.2.3 Erro com a iteração no tempo

Para a avaliação do comportamento do erro com a iteração no tempo, os códigos foram executados forçando-se 50 iterações para cada passo. Os dados utilizados foram $t_f = 0,1$ s, $N_t = 285$, $N_x = 40$ e $N_y = 40$, sendo que os modelos 1D não usavam N_y . Aqui o erro representa a maior diferença entre o valor da concentração da iteração anterior e da atual (cada concentração tinha seu próprio erro, o maior em cada iteração foi plotado).

A diferença entre os modelos 2D reside nas condições de contorno, assim como para os modelos 1D. Logo, o comportamento do erro entre modelos 2D foi semelhante, assim como entre modelos 1D. As Figuras 13 e 14 mostram gráficos para o comportamento da ordem do erro com o número de iterações (no passo 285 de 285).

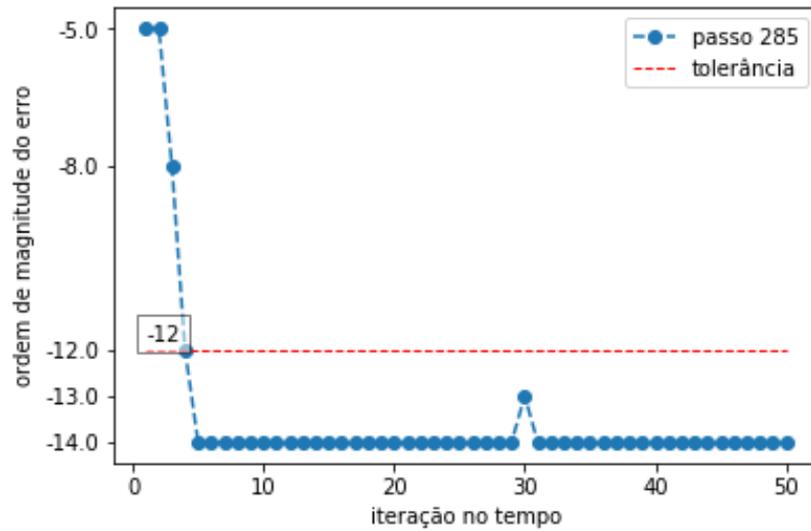
A variação observada para o caso 2D na 30ª iteração, Figura 14, ocorreu pois o erro estava muito próximo da transição da ordem -13 para -14 e não porque havia algum problema com a estabilidade do mesmo.

Figura 13: Erro da iteração no tempo para os modelos 1D.



Fonte: Do autor, (2020).

Figura 14: Erro da iteração no tempo para os modelos 2D.



Fonte: Do autor, (2020).

Em resumo, todos os modelos tinham erro com a interação no tempo aceitável e dentro do esperado.

4.2.4 Análise de consistência: conservação do carbono

Para avaliar se o código conservava massa, foi feito o balanço do número de mols de carbono entrando e deixando o domínio. A Tabela 4 apresenta os erros de cada modelo, bem como os dados usados na simulação. O erro foi calculado com a Eq. (44).

$$erro = 100 \left| \frac{total\ de\ carbono\ em\ t=0 - total\ de\ carbono\ em\ t=tf}{total\ de\ carbono\ que\ entrou - total\ de\ carbono\ que\ saiu} \right| - 100 \quad (44)$$

Tabela 4: Erros percentuais para a conservação de mols de carbono.

1D/2D	Descrição	Erro (%)
1D	Sem enzima	0,069
	Com enzima	0,117
	Com enzima encapsulada	0,067
2D	Sem enzima	2,229
	Com enzima	2,126
	Com enzima encapsulada	2,261
Dados para a simulação 1D: $t_f = 96$ h, $N_x = 20$, $N_t = 207.360.000$		
Dados para a simulação 2D: $t_f = 3,5$ h, $N_x = 30$, $N_y = 15$, $N_t = 7.560.000$		

Fonte: Do autor, (2020).

Os modelos 1D apresentaram erros menores que 0,2%, mesmo para 96 h de simulação, já os modelos 2D apresentaram erros maiores que 2% em 3,5 h, sendo que o erro aumentava para tempos maiores, inviabilizando simulações mais longas. O erro do modelo 2D para 2h46min ficava em torno de 1,7%, mostrando uma relação de proporcionalidade entre o erro e o tempo de simulação (t_f). Isso permite concluir que havia um erro pequeno em cada passo no tempo que ia se acumulando a uma taxa constante, e não um grande erro em alguns passos específicos da iteração no tempo. Foram feitas tentativas de reduzir tal erro, mas sem êxito.

Em resumo, o erro de conservação de massa para os modelos 1D eram menores, tornando-os mais adequados para a discussão das simulações. Os equipamentos de ECMO/ECCO₂R podem ser utilizados por dias, tornando necessário simulações de várias horas.

4.3 DISCUSSÃO DE RESULTADOS PARA MODELOS UNIDIMENSIONAIS

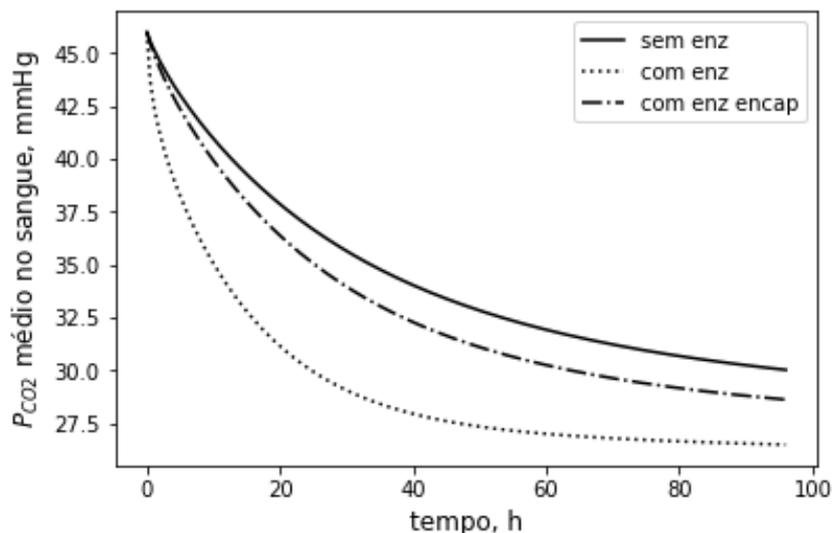
Os modelos 1D e 2D apresentaram comportamento semelhante, inclusive para alguns dos erros encontrados nos resultados. Como os modelos 1D executavam mais rapidamente e erravam menos na conservação de massa, eles foram usados na discussão.

A discussão foi separada em etapas: (i) constatação de que não havia concordância com os experimentos; (ii) formulação da hipótese de que o efeito antideposição precisava ser modelado; (iii) teste do modelo antideposição com dados realísticos/sensatos; (iv) teste do modelo antideposição com dados exagerados; (v) teste do modelo antideposição com dados realísticos e tempo mais longo; (vi) correção das condições de contorno; (vii) comentários pertinentes acerca do uso das encapsulinas e (viii) breve comparação entre 1D e 2D.

4.3.1 Comparação entre resultados numéricos e experimentais

A Figura 15 contém os perfis da pressão parcial média de CO_2 no sangue (inclui a pressão no plasma e nas hemácias ponderada pelo volume de cada fase). Foi observado que a presença das enzimas acelerava a redução de P_{CO_2} , e que com as encapsulinas havia uma menor velocidade de redução. Ambos os modelos com enzimas usavam 80% do máximo teórico.

Figura 15: Comparação entre perfis de P_{CO_2} média, modelos 1D.

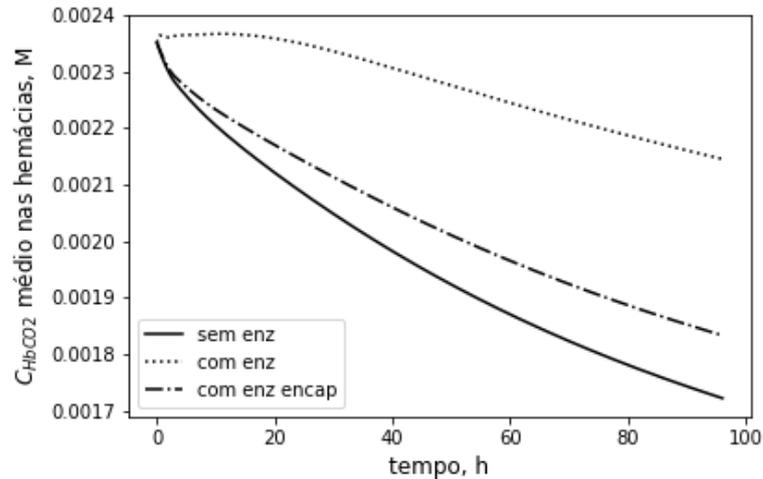


Fonte: Do autor, (2020).

Os gráficos para a concentração média de carbamato (Figura 16) e bicarbonato (Figura 17) mostraram que nos casos com enzima essas duas substâncias desciam mais lentamente, armazenando CO_2 na forma ligada, que não era computado por P_{CO_2} . Por isso P_{CO_2} desceu mais rapidamente para os casos com

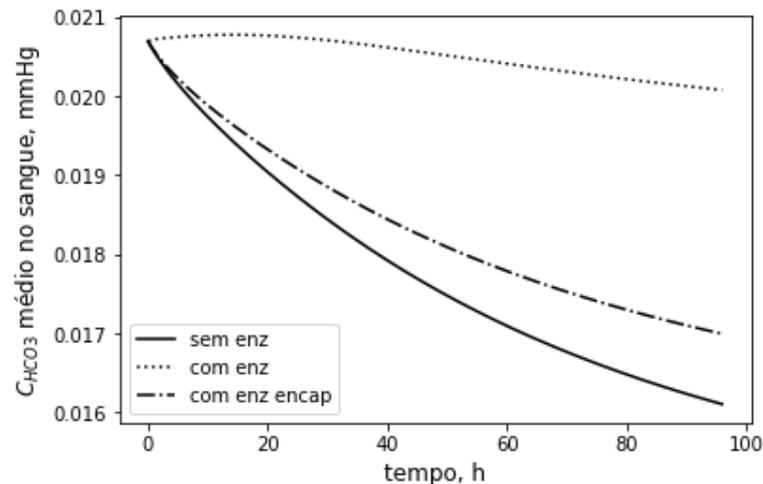
enzima, já que o CO_2 era removido através da membrana e não era reposto rapidamente pela liberação do CO_2 ligado.

Figura 16: Comparação entre perfis de C_{HbCO_2} média, modelos 1D.



Fonte: Do autor, (2020).

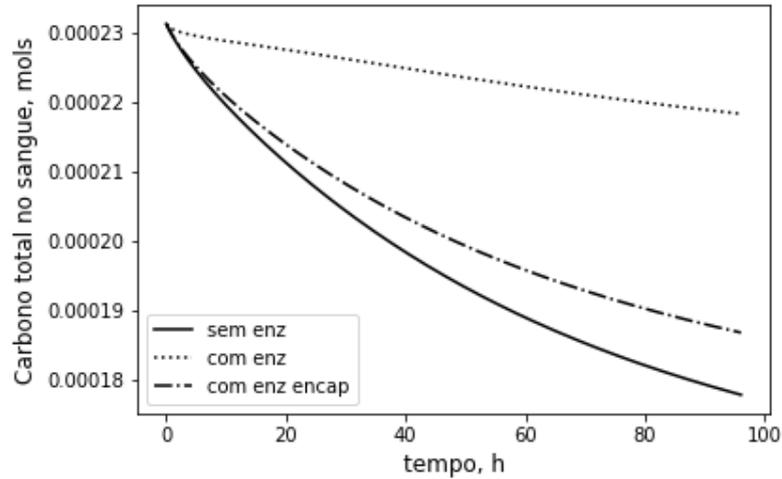
Figura 17: Comparação entre perfis de C_{HCO_3} média, modelos 1D.



Fonte: Do autor, (2020).

Ao plotar o total de carbono no meio ($P_{\text{CO}_2} + \text{HCO}_3^- + \text{HbCO}_2$), e não apenas aquele na forma de P_{CO_2} , Figura 18, observou-se que o modelo sem enzima removeu mais carbono do que os com enzima. Isso não corroborava com os resultados experimentais de Arazawa et al. (2012), que mediram o CO_2 no sangue e na corrente gasosa, usando este último para estimar a quantidade de CO_2 removido, que era maior com o emprego de enzimas.

Figura 18: Comparação entre perfis de número total de mols de carbono, modelos 1D.

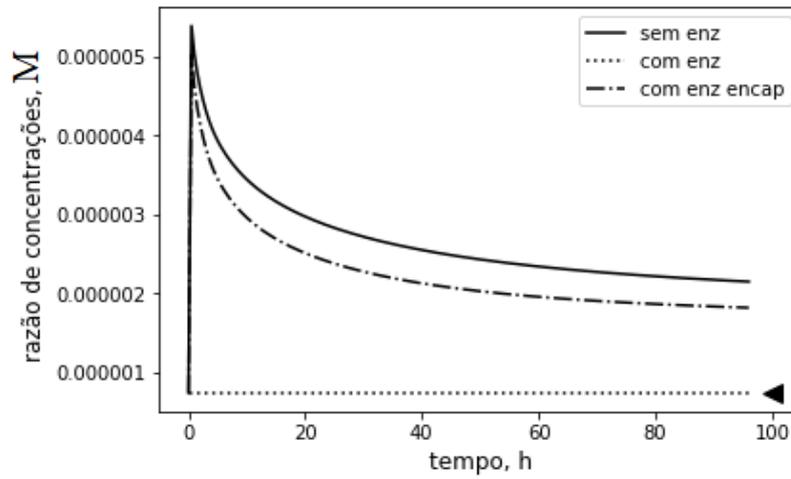


Fonte: Do autor, (2020).

Era esperado que a enzima facilitasse a liberação do dióxido de carbono ligado à água (bicarbonato), por isso surgiu a dúvida de que a sua presença não estivesse modelada corretamente. Diante disso, os perfis de bicarbonato, íons de hidrogênio e CO_2 foram usados para avaliar se o equilíbrio químico entre eles estava sendo respeitado. O equilíbrio foi calculado por uma razão de concentrações, $C_{\text{HCO}_3}^P C_H^P / C_{\text{CO}_2}^P$.

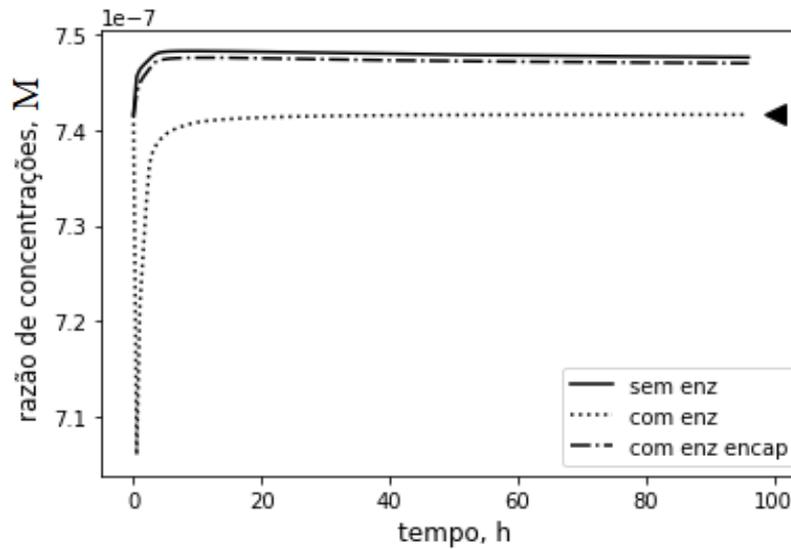
Para a condição de contorno e o volume de controle adjacente à membrana, apenas o modelo com enzima não encapsulada manteve o equilíbrio, conforme Figuras 19 e 20. Os demais atingiram o estado estacionário fora do equilíbrio (seta preta, constante de equilíbrio para a reação espontânea de hidratação, k_1).

Figura 19: Razão $C_{\text{HCO}_3^{\text{P}}}.C_{\text{H}^{\text{P}}}/C_{\text{CO}_2^{\text{P}}}$ para a condição de contorno sobre a membrana.



Fonte: Do autor, (2020).

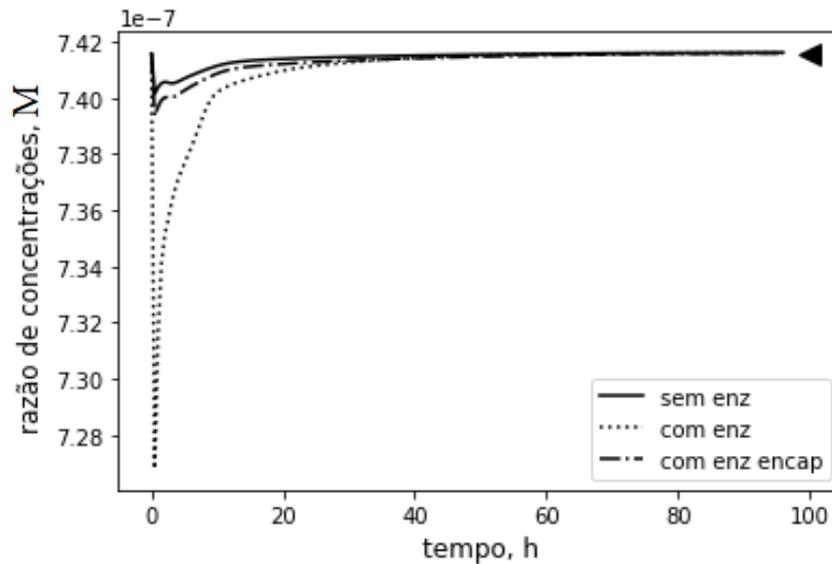
Figura 20: Razão $C_{\text{HCO}_3^{\text{P}}}.C_{\text{H}^{\text{P}}}/C_{\text{CO}_2^{\text{P}}}$ para o volume de controle adjacente à membrana.



Fonte: Do autor, (2020).

Para os volumes de controle não adjacentes à membrana (ou seja, internos), todos atingiram o equilíbrio (seta preta), como consta na Figura 21.

Figura 21: Razão $C_{\text{HCO}_3^{\text{P}}}.C_{\text{H}^{\text{P}}}/C_{\text{CO}_2^{\text{P}}}$ para volume de controle interno.



Fonte: Do autor, (2020).

Faz sentido que, quando a enzima está em contato direto com o sangue, este mantenha o equilíbrio, já que a enzima permite que rapidamente ocorram as conversões necessárias. O contrário ocorre na ausência do contato direto da enzima com o sangue, já que, devido à constante remoção de CO_2 e entrada de O_2 , a reação espontânea do plasma não consegue reequilibrar rapidamente. Nos volumes de controle internos, a reação espontânea era capaz de manter o equilíbrio, pois, devido a não estarem em contato direto com o contorno, estes volumes de controle não passavam pelas mudanças bruscas de concentração ocasionadas pela troca através da membrana.

Diante disso, a modelagem da enzima não comprometeu o equilíbrio $C_{\text{HCO}_3^{\text{P}}}.C_{\text{H}^{\text{P}}}/C_{\text{CO}_2^{\text{P}}}$ característico do sangue.

Em resumo, os resultados das simulações não concordam qualitativamente com observações experimentais da literatura, e a cinética enzimática da anidrase carbônica não é a responsável por isso.

4.3.2 O efeito antideposição da enzima

Os trabalhos que envolvem o estudo do uso da enzima anidrase carbônica na remoção de CO_2 do sangue acreditam que seu efeito se deve à reação química

catalisada, mas modelando apenas isso não foi possível reproduzir o comportamento observado por Arazawa et al. (2012), pois as enzimas não auxiliaram na remoção do carbono. A literatura (ARAZAWA et al., 2012; KIMMEL et al., 2013; OH et al., 2010) também ressalta o efeito das enzimas em impedir a deposição de plaquetas sobre a membrana, um indicativo de melhora na hemocompatibilidade. Foi levantada a hipótese de que seria necessário modelar esse efeito, juntamente com a catálise, para que os resultados da simulação concordassem com os experimentos da literatura. Diante da escassez de dados cinéticos para o fenômeno de deposição de plaquetas e proteínas sobre a membrana usada em ECMO/ECCO₂R, foi proposto um modelo genérico com dados não-reais a fim de avaliar a hipótese em questão.

O modelo foi descrito em Metodologia e envolve a redução do valor do coeficiente de transferência de massa convectiva de forma a simular a maior dificuldade do CO₂ e O₂ em atravessar a membrana. Foi considerado que o efeito antideposição se deve a presença da enzima e não a sua atividade catalítica, porém isso carece de investigação.

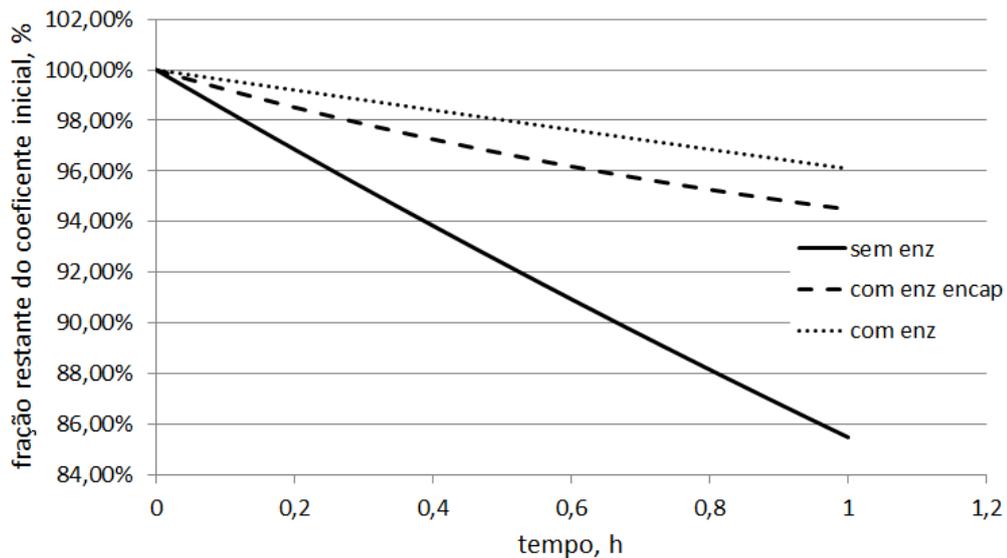
O trabalho de Arazawa et al. (2012) verificou 95% menos deposição de plaquetas quando as enzimas estavam presentes, logo, os dados do perfil de deposição foram escolhidos de forma que o modelo sem enzimas perdesse a capacidade de troca gasosa mais rapidamente. Os resultados obtidos com este perfil serviram para avaliar a hipótese sobre a necessidade de modelar o efeito antideposição, mas não foram conclusivos, pois dados reais para o processo de deposição precisam ser coletados e implementados em um modelo apropriado.

4.3.3 O efeito antideposição: efeito baixo

A Figura 22 mostra os perfis de coeficientes de convecção adotados para simular a deposição baixa. Apenas o coeficiente de CO₂ é mostrado, pois O₂ tinha uma curva com o mesmo comportamento, apenas valores diferentes (as constantes a , b e c eram as mesmas para os dois, apenas mudando o valor de k_{mo}^i). Era esperado que o modelo sem enzima sofresse mais com a deposição, seguido pelos modelos com enzima (devido à perda da enzima) e com enzima encapsulada (desde que a encapsulina contribísse para evitar a deposição). A não degradação das

encapsulinas poderia garantir efeito contínuo contra a deposição. Os dados foram: (i) sem enzimas: $a = 2,4E-5$; $b = 6E-6$; $c = 0,2$; (ii) com enzimas: $a = 2,4E-5$; $b = 6E-6$; $c = 0,05$; (iii) enzima encapsulada: $a = 3E-6$; $b = 2,7E-5$; $c = 0,8$.

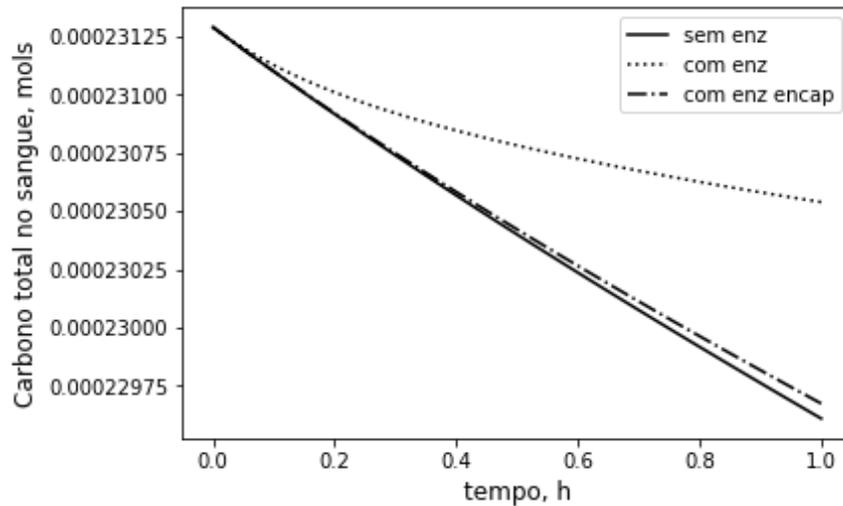
Figura 22: Perfil de $k_m^{CO_2}$ proposto para representar deposição (efeito baixo).



Fonte: Do autor, (2020).

A Figura 23 contém as curvas para o carbono total dos modelos com e sem enzimas quando a deposição foi considerada (de acordo com o perfil acima). Mesmo com a deposição, o modelo sem enzimas ainda removeu mais carbono do que os com enzimas.

Figura 23: Perfis de número total de mols de carbono para modelo com deposição usando efeito baixo.



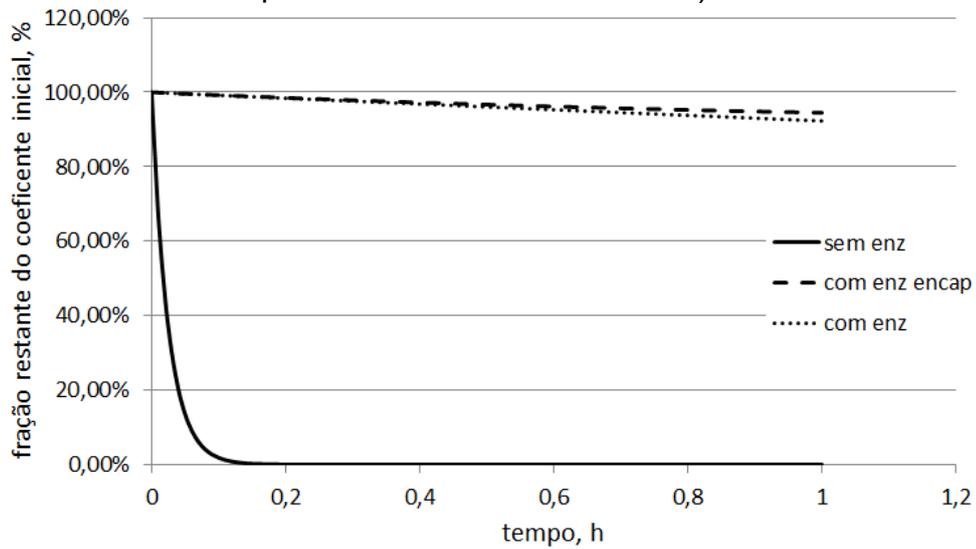
Fonte: Do autor, (2020).

Em resumo, a inclusão do efeito antideposição com um efeito baixo não foi suficiente para que a simulação concordasse com a literatura.

4.3.4 O efeito antideposição: efeito intenso

A inclusão da deposição só gerou perfis de remoção de carbono coerentes com a literatura quando a perda na eficiência da troca gasosa do modelo sem enzima foi considerada intensa, conforme Figura 24, que mostra o novo perfil proposto para k_m . Este novo perfil gerou uma queda brusca no coeficiente de convecção do modelo sem enzimas, mas a literatura não conta com dados que validem a possibilidade de a deposição ser tão severa, ou seja, causar uma queda tão grande e rápida da troca gasosa. O perfil do caso sem enzima atinge o mínimo, 0,1% do inicial, em menos de 12 minutos (0,2 h). Dados usados: (i) sem enzimas: $a = 3E-5$, $b = 3E-8$, $c = 40$; (ii) com enzimas: $a = 3E-5$, $b = 3E-8$, $c = 0,08$; (iii) enzima encapsulada: $a = 3E-6$, $b = 2,7E-5$, $c = 0,8$.

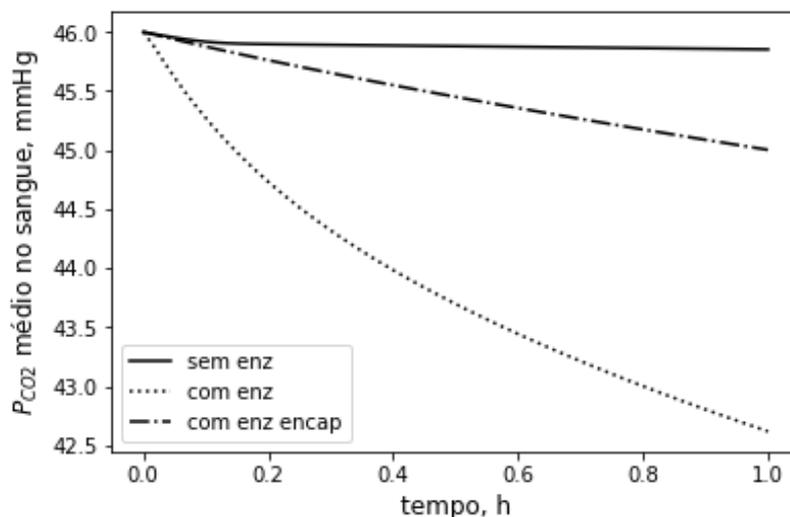
Figura 24: Perfil de $k_m^{CO_2}$ proposto para representar deposição (deposição intensa para a membrana sem enzima).



Fonte: Do autor, (2020).

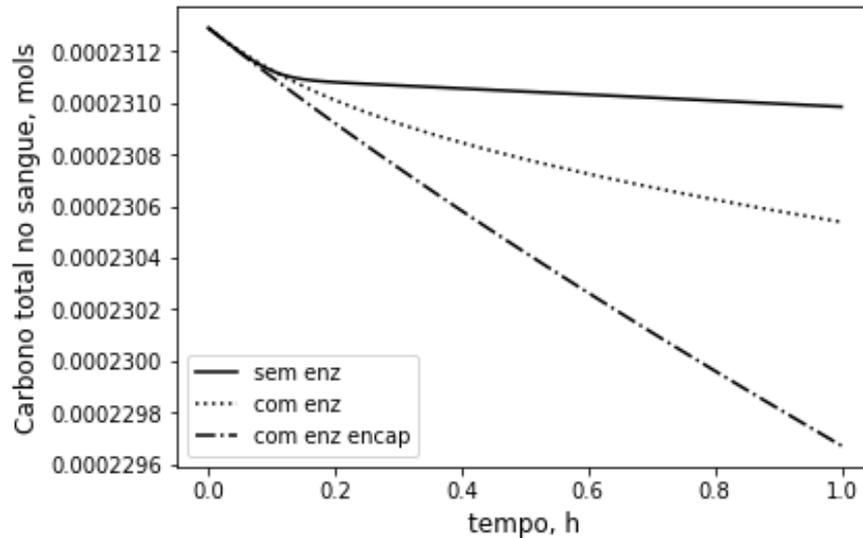
A Figura 25 contém as curvas para P_{CO_2} dos modelos com e sem enzimas, considerando o efeito da deposição intensa de material sobre a membrana sem enzima (perfil acima). Assim como para o modelo sem deposição (Figura 15), a presença das enzimas acelera a redução de P_{CO_2} , mas agora isso está associado a uma maior remoção de carbono, conforme Figura 26, corroborando com o comportamento observado em experimentos.

Figura 25: Perfis de P_{CO_2} média para modelos com deposição intensa na membrana sem enzima.



Fonte: Do autor, (2020).

Figura 26: Perfis de concentração de carbono total com deposição usando dados intensos para modelo sem enzima



Fonte: Do autor, (2020).

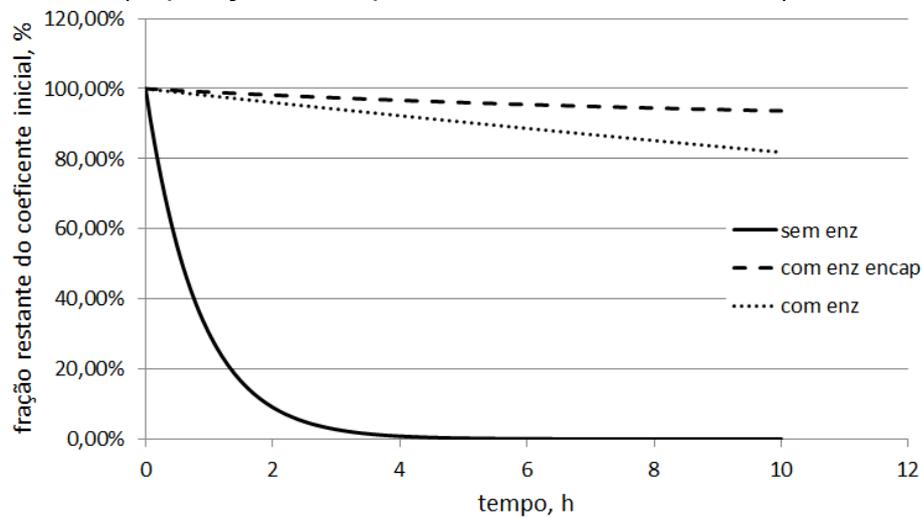
Em resumo, a inclusão da deposição com efeito intenso gerou perfis coerentes com a literatura, mas fisicamente é improvável que a deposição de componentes do sangue sobre a membrana seja tão intensa.

4.3.5 O efeito antideposição: efeito baixo e tempo mais longo

Os gráficos anteriores, que contavam com o efeito da deposição, incluíam apenas 1 h de simulação. Foi executada uma nova simulação com um período mais longo, 10 h, a fim de avaliar se, neste caso, ao considerar deposição menos severa para a situação sem enzima, ainda seria possível obter perfis de remoção de carbono coerentes com a literatura.

A Figura 27 contém o perfil usado para representar a deposição baixa para a simulação de 10 h. Após 2 h o modelo sem enzima ainda contava com 10% do coeficiente convectivo inicial, chegando a menos de 1% por volta de 4h. Dados usados: (i) sem enzimas: $a = 3E-5$, $b = 3E-8$, $c = 1,2$; (ii) com enzimas: $a = 3E-5$, $b = 3E-8$, $c = 0,02$; (iii) enzima encapsulada: $a = 3E-6$, $b = 2,7E-5$, $c = 0,1$.

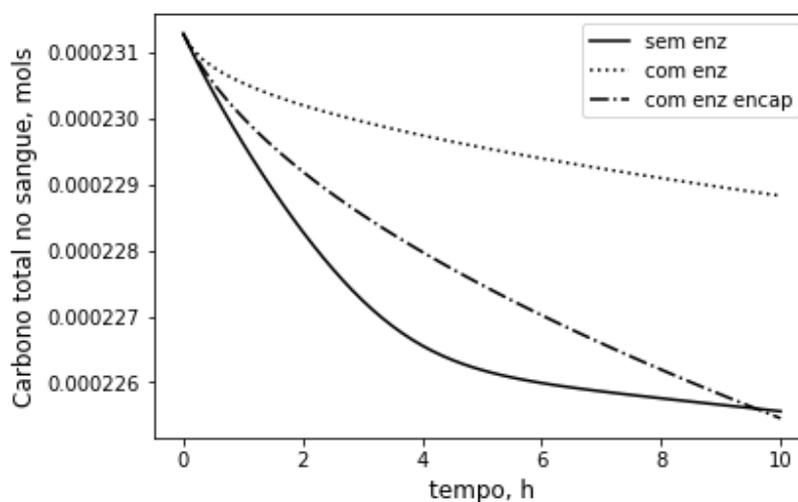
Figura 27: Perfil de $k_m^{CO_2}$ proposto para representar deposição na simulação de 10h (deposição baixa para membrana sem enzima).



Fonte: Do autor, (2020).

Na Figura 28, a remoção de carbono para o modelo sem enzima é maior do que os demais até por volta de 10 h, momento em que o modelo com enzima encapsulada passa a apresentar menor concentração de carbono. O fato do modelo sem enzima remover mais carbono durante as primeiras horas indicou que não era somente a modelagem da deposição que estava faltando, mas que as próprias condições de contorno não representavam adequadamente o fenômeno. É provável que essa fosse a causa para a necessidade de considerar a deposição na membrana sem enzima tão intensa, pois era necessário compensar o erro da condição de contorno.

Figura 28: Perfis do número total de mols de carbono com deposição usando efeito baixo para modelo sem enzima (10h).



Fonte: Do autor, (2020).

Seria esperado que, nas primeiras horas, quando a deposição ainda não tinha se tornado um problema, os modelos com enzimas removessem mais carbono. A ideia é que a enzima/encapsulina possa oferecer uma vantagem ao longo do tempo tanto devido à atividade catalítica, que tem efeito máximo no início e pode reduzir com a degradação proteolítica, quanto ao combate à deposição sobre a membrana, cujo efeito se torna mais evidente ao longo do tempo.

Em resumo, a remoção de CO_2 só era coerente com a literatura quando dados intensos (mais intensos do que seria esperado na prática) eram usados nos perfis de deposição, o que tirava a credibilidade do resultado. Ainda, problemas nas condições de contorno pareciam ser o que ocasionava tal situação.

4.3.6 Modificação das condições de contorno

Como os indícios apontavam para a condição de contorno como causa do problema com a remoção de CO_2 , esta seção foi destinada a explicar as equações usadas no contorno, e o raciocínio que levou a elas. A discussão foca no CO_2 , HCO_3^- e H^+ , pois a condição para O_2 era simples. A condição para o caso sem enzima também era simples, portanto com poucas chances de que possuísse erros. Logo, os casos com enzimas provavelmente eram os responsáveis pelo problema.

No contorno em que se encontrava a membrana com a enzima ocorriam três fenômenos simultaneamente: (i) substâncias chegavam por difusão através do plasma; (ii) substâncias eram consumidas (HCO_3^- e H^+) e produzidas (CO_2) pela enzima; e (iii) apenas uma substância, o CO_2 , deixava o plasma através da membrana.

Buscando na literatura, a condição de descontinuidade de fluxos (FÓRUM COMSOL, 2010) foi a que pareceu melhor agrupar os três fenômenos. A condição pode ser interpretada como: a diferença entre o que chega e o que efetivamente sai pelo contorno é igual ao que foi consumido/gerado pela reação.

No caso da enzima não encapsulada, as substâncias chegavam através da difusão pelo plasma ($-D^P \frac{\partial C}{\partial x} \Big|_{x=L}$) e saíam por convecção na fase gasosa ($k_m(C|_{x=L} - C_{GAS})$), com a diferença entre elas sendo o consumo/geração pela reação enzimática ($k_{cat} C_{ENZ} \frac{[CO_2] - [HCO_3^-][H^+]/k_1}{K_M + [CO_2] - [HCO_3^-][H^+]/k_1} \Big|_{x=L}$). Apenas CO_2 saía por convecção, portanto era o único que contava com um termo de saída convectiva não-nulo.

O termo de reação enzimática representava a reação de hidratação, ou seja, formação de HCO_3^- , logo, gerava um valor negativo, já que aqui a enzima catalisava a desidratação. Por isso o termo de reação era acompanhado de um sinal negativo, de forma a tornar o resultado positivo e permitir a coerência de sinais. O termo de difusão também contava com um sinal negativo para a coerência de sinais, já que o gradiente de concentração decrescia em direção ao contorno ($\frac{\partial C}{\partial x} < 0$). O termo de convecção do CO_2 era positivo, pois a concentração de CO_2 no plasma era sempre maior que no gás, logo, o sinal negativo à frente deste termo pertence ao cálculo da diferença entre entrada (difusão) e saída (convecção), e não a uma correção de sinais.

A condição para CO_2 tinha inicialmente a forma da Eq (45).

$$\begin{aligned}
 & - \left[-D_{CO_2}^P \frac{dC_{CO_2}^P}{dx} \Big|_{x=L} - km_{CO_2} \left(k_p^{CO_2} C_{CO_2}^P \Big|_{x=L} - C_{CO_2}^G \right) \right] = \\
 & -k_{cat} C_{ENZ}^{área} \frac{C_{CO_2}^P - C_{HCO_3}^P C_H^P / k_1}{K_M + C_{CO_2}^P - C_{HCO_3}^P C_H^P / k_1} \Big|_{x=L} \quad (45)
 \end{aligned}$$

Assim, se a enzima produzisse CO_2 (desidratação), tornando o lado direito da igualdade positivo, a remoção por convecção seria maior que a chegada por difusão, tornando a esquerda da igualdade também positiva. A condição de contorno apresentada em Metodologia, Eq (16), havia passado por simplificação de sinais, por isso tinha um aspecto diferente.

Para as enzimas encapsuladas o raciocínio foi similar, porém em vez de haver consumo/geração diretamente pela enzima, havia consumo/geração na forma da substância entrando/saindo da capsulina, cujo interior contava com a reação.

No caso da enzima encapsulada, as substâncias chegavam através da difusão pelo plasma ($-D^P \frac{\partial C}{\partial x} \Big|_{x=L}$) e saíam por convecção na fase gasosa ($k_m(C|_{x=L} - C_{GÁS})$), com a diferença entre elas sendo a entrada/saída pelos poros da capsulina ($D_H^{poro} A_{poros} \frac{C_i^P|_{x=L} - C_i^{ENC}}{L_{poro}}$). O trânsito de substâncias pelos poros da capsulina, por sua vez, alimentava a reação enzimática encapsulada ($k_{cat} C_{ENZ} V_{ENC} \frac{[CO_2] - [HCO_3^-][H^+]/k_1}{K_M + [CO_2] - [HCO_3^-][H^+]/k_1} \Big|_{\substack{interior \\ capsulina}}$).

O mesmo cuidado com os sinais que foi destinado ao caso sem capsulinas também foi dado para este caso, mas, ainda assim, as equações não se comportaram como deveriam.

Como uma tentativa de reescrever as condições de contorno, o trabalho de Iliuta e Iliuta (2017) foi consultado. Os autores simularam o processo de captura de CO_2 de uma fase gasosa em uma fase líquida, e contavam com a enzima anidrase carbônica imobilizada na membrana, catalisando a reação de hidratação de CO_2 . De todas as configurações usadas pelos autores, a que mais se assemelhava ao caso deste trabalho seria a situação em que os poros da membrana continham gás, mas não líquido.

Os autores consideraram a presença explícita da membrana separando a fase líquida e a gasosa, ou seja, desenvolveram um perfil para três regiões: líquido, membrana e gás. A condição de contorno para o perfil da membrana na interface membrana-gás afirmava uma igualdade entre fluxo difusivo na membrana e convectivo no gás, conforme Eq. (46).

$$k_m^{gás} \Delta C|_{memb/gás} = -D^{memb} \frac{\partial C_{memb}}{\partial x} \Big|_{memb/gás} \quad (46)$$

Para a interface membrana-líquido a condição para o perfil da membrana era de igualdade de fluxos difusivos, conforme Eq (47).

$$D^{memb} \frac{\partial C_{memb}}{\partial x} \Big|_{memb/liq} = D^{liq} \frac{\partial C_{liq}}{\partial x} \Big|_{memb/liq} \quad (47)$$

A condição no mesmo ponto, mas para o perfil do líquido era de fluxo difusivo igual ao fluxo reativo na superfície, de acordo com Eq (48).

$$-D^{liq} \frac{\partial C_{liq}}{\partial x} \Big|_{memb/liq} = \text{ReaçãoEnzimática}|_{memb/liq} \quad (48)$$

Na interface membrana-líquido do modelo de Iliuta e Iliuta (2017) também ocorriam três fenômenos: (i) CO₂ chegava por difusão através dos poros da membrana; (ii) reagia com a enzima na superfície da membrana para formar HCO₃⁻ e H⁺; e (iii) as substâncias difundiam para dentro do líquido. Notou-se que, apesar deste trabalho e o de Iliuta e Iliuta (2017) contarem com três fenômenos na interface membrana-líquido, Iliuta e Iliuta (2017) não tentaram incluir todos em uma única equação para a condição de contorno, mantendo o termo de reação apenas para o contorno do perfil do líquido (o autor igualou o fluxo difusivo no líquido com a reação, Eq (48 41), e também com o fluxo do outro lado da interface, Eq (47), que era de difusão na membrana, assim a reação apareceu apenas para o lado do líquido).

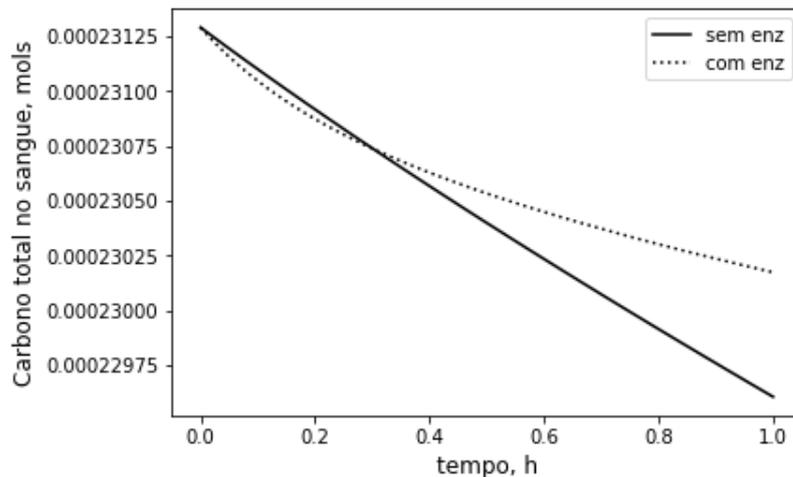
Como os resultados computacionais dos autores corroboraram com os experimentos deles, foi tentado reescrever as condições de contorno baseando-se na ideia de Iliuta e Iliuta (2017). Desta forma, a condição para bicarbonato e íons hidrogênio permaneceram as mesmas das Eq. (17) e (18). Já a condição para CO₂, que efetivamente contava com os três fenômenos, foi reescrita usando as Eq. (49) e (50). Ressalta-se que deste modo o fluxo difusivo no líquido aparece uma vez igualado à reação enzimática e outra ao fluxo existente do outro lado da interface (fluxo convectivo), assim como Iliuta e Iliuta (2017). Isso para o caso com enzimas não encapsuladas.

$$-D_{CO_2}^P \frac{dC_{CO_2}^P}{dx} \Big|_{x=L} = -k_{cat} C_{ENZ}^{área} \frac{C_{CO_2}^P - C_{HCO_3}^P C_H^P / k_1}{K_M + C_{CO_2}^P - C_{HCO_3}^P C_H^P / k_1} \Big|_{x=L} \quad (49)$$

$$-D_{CO_2}^P \frac{dC_{CO_2}^P}{dx} \Big|_{x=L} = km_{CO_2} \left(k_p^{CO_2} C_{CO_2}^P \Big|_{x=L} - C_{CO_2}^G \right) \quad (50)$$

Mesmo assim, a remoção de carbono para o caso sem enzima foi maior após 1 h, apesar de que foi menor até cerca de 18 min (0,3 h), conforme Figura 29. O modelo usado para gerar a Figura 29 não incluía o efeito de antedeposição, mas os testes feitos com o efeito geraram perfis com as mesmas características (dados não mostrados).

Figura 29: Perfis do número total de mols de carbono para modelos com condição de contorno reescrita (sem deposição).



Fonte: Do autor, (2020).

Outras tentativas de corrigir as condições de contorno foram feitas. Os resultados obtidos puderam ser divididos em dois grupos: (i) a condição de contorno não passou pela análise de lógica, já que algumas equações tornavam o sistema impossível de resolver; e (ii) as equações passaram na avaliação de lógica, mas, quando reorganizadas, geravam o mesmo conjunto de equações que já vinha sendo utilizado e que apresentava os erros mencionados em parágrafos anteriores.

Diante da falta de êxito em corrigir as condições de contorno, a última observação feita foi de que, apesar de o código ter sido verificado usando o método das soluções manufaturadas, o mesmo ainda continha erros de modelagem. Isso não implica em ineficácia por parte do método das soluções manufaturadas ou ainda

má implementação deste, já que o método apenas verifica os cálculos quanto à coerência matemática, mas não avalia coerência física (ROACHE, 2019).

4.3.7 Comentários relevantes quanto ao uso das encapsulinas

Apesar dos problemas com as condições de contorno que impedem a discussão sobre o impacto da encapsulação na troca gasosa e outros aspectos, existem algumas observações que valem a pena serem feitas, e constam nos parágrafos seguintes.

Uma das discussões mais importantes seria aquela quanto à proteção que as encapsulinas ofereceriam à enzima. Com as primeiras simulações, sem o efeito da deposição, as proteases pareciam não ser importantes (mais detalhes abaixo, Figura 30), e a razão para isso parecia ser (com o erro no contorno fica difícil ter certeza) a alta atividade da enzima anidrase carbônica, detentora de um dos mais altos números de renovação ($k_{cat} = 1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$) já registrados (KHALIFAH, 1971). A título de comparação, a enzima RuBisCO, responsável pelo importante processo de fixação de CO_2 durante a fotossíntese, tem $k_{cat} = 3 \text{ s}^{-1}$ (SAGE, 2002 *apud* MA et al., 2014).

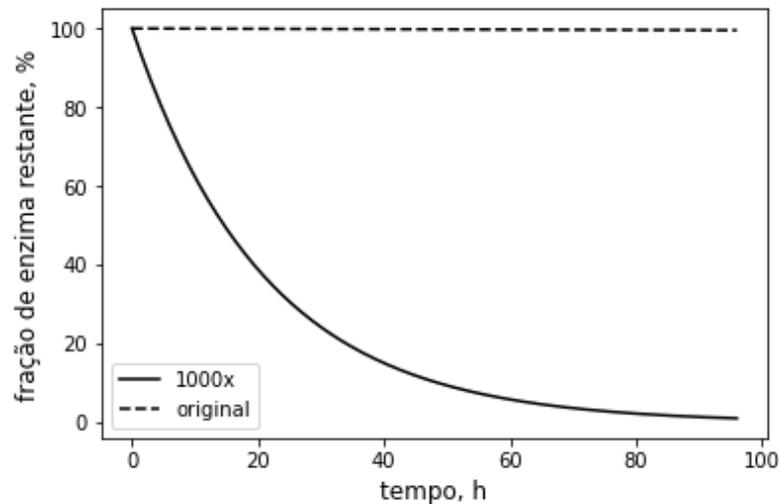
Com uma atividade catalítica tão alta, é provável que mesmo baixas concentrações da enzima fossem suficientes para desempenhar o papel na remoção do carbono. Logo, se uma quantidade razoável de enzimas fosse imobilizada, e a degradação proteolítica não fosse severa, mesmo sem encapsulação um número suficiente de moléculas da enzima poderia sobreviver e garantir a melhora na troca gasosa.

Outra situação possível seria aquela em que a degradação proteolítica fosse moderada/severa e o efeito antideposição fosse significativo. Neste caso, o consumo da enzima deveria contar com maior impacto na remoção de carbono, já que isso permitiria a deposição de material sobre a membrana e o aumento na dificuldade de passagem dos gases.

Além de a excelente atividade catalítica contribuir para o bom desempenho de baixas concentrações da enzima, o modelo de proteólise adotado não consumia a enzima a uma taxa significativa. Para os dados originais de degradação, após 96 h ainda restavam 99,55% do inicial, que era 80% do máximo. Quando a taxa original foi multiplicada por 1000, com o intuito de simular a presença de outras proteases

além da quimiotripsina, ainda restavam 1,07% do inicial após 96 h. A Figura 30 mostra a variação da concentração de enzimas em relação ao valor inicial, incluindo os dados originais e aqueles multiplicados por 1000.

Figura 30: Percentual de enzimas restantes de acordo com diferentes degradações proteolíticas.



Fonte: Do autor, (2020)

Como comentado anteriormente, baixas concentrações de enzimas pareciam ser suficientes, logo, mesmo com o fator de 1000, os 1,07% de enzimas restantes eram capazes de gerar a mesma remoção de CO_2 que o caso com dados originais de degradação (nos modelos sem deposição). Não foi possível confirmar se isso se devia de fato à alta atividade catalítica da enzima ou ao erro da condição de contorno.

A equação da degradação proteolítica usou o perfil de Michaelis-Menten, mas a concentração de quimiotripsina no sangue era maior do que a de enzimas imobilizadas, logo, a hipótese de que a concentração de substrato livre é igual à concentração total de substrato não era respeitada. Contudo, outros modelos não foram encontrados na literatura.

Além disso, os autores Osborne e Tashian (1981) usaram no modelo de proteólise a concentração de anidrase carbônica e não a concentração de sítios de clivagem, que se refere ao número de posições na cadeia de aminoácidos que poderiam ser hidrolisadas. Um modelo de degradação proteolítica que considere as principais proteases do sangue teria que considerar o fato de que diferentes

proteases possuem diferentes sítios de clivagem. Caso a degradação seja relevante tanto pelo impacto sobre a atividade catalítica quanto pela redução do efeito antideposição proporcionado pela enzima, seria importante considerar as seguintes questões: após clivagem em que posições a enzima pode deixar de ter atividade catalítica? Será que essa mesma clivagem seria o suficiente para anular o efeito antideposição? Ou o fragmento restante da enzima, ainda fixo na membrana, seria capaz de manter ao menos parte do efeito antideposição?

De acordo com Arazawa et al. (2012) e as referências citadas por eles, a atuação da enzima anidrase carbônica contra a deposição de plaquetas carece investigação, mas dois mecanismos foram sugeridos: a enzima obstrui o local onde componentes do sangue se ligariam, não dependendo da atividade enzimática; ou a enzima catalisaria a formação de óxido nítrico (NO) na superfície da membrana (AAMAND et al., 2009), conhecido por impedir a ativação e aderência de plaquetas nos vasos sanguíneos (FROST; REYNOLDS; MEYERHOFF, 2005). Caso ambos os mecanismos sejam relevantes, então a atividade catalítica da enzima assume ainda maior destaque. É interessante observar que as reações envolvendo CO_2 e NO parecem não compartilhar o mesmo sítio ativo, já que inibidores da reação com CO_2 não impedem a reação com NO (AAMAND et al., 2009), indicando que a clivagem da enzima pode afetar a catálise de CO_2 e o efeito antideposição de forma diferenciada. Não se sabe se a enzima consegue catalisar as duas reações simultaneamente, ou se a ocorrência de uma impede a outra, gerando uma espécie de competição entre as diferentes reações.

Toda a discussão sobre degradação proteolítica tinha como objetivo embasar a discussão quanto ao uso de encapsulinas. Como os modelos não eram muito sensíveis às variações na concentração de enzimas, parecia que usar um excesso de enzima em vez de encapsulá-las seria mais vantajoso. No entanto, após ter observado a incoerência na remoção de carbono e suspeitado que o efeito antideposição precisasse ser incluso, surgiu a preocupação de como as encapsulinas afetariam isso, já que as enzimas em seu interior não estariam mais em contato direto com os componentes do sangue.

Para discutir isso foi necessário recorrer ao exposto em parágrafo anterior acerca dos mecanismos pelos quais a anidrase carbônica poderia influenciar a deposição de plaquetas na membrana.

Caso o efeito antideposição se deva ao impedimento físico das plaquetas entrarem em contato com a membrana, então a encapsulação poderia conservar isso caso a encapsulina fosse o novo impedimento. No entanto, Lagoutte et al. (2018) mostraram que encapsulinas injetadas em ratos causaram uma resposta imune, já que são provenientes de bactérias. Como as encapsulinas estariam em contato com o sangue, talvez pudessem ocasionar uma resposta imune em humanos também. Isso poderia ser superado com a modificação da superfície da encapsulina, de forma análoga ao que foi feito por Lagoutte et al. (2018) para representar antígenos virais na sua superfície e então usar em imunização, mas a modificação aqui teria de ser para minimizar a imunogenicidade (capacidade de induzir resposta por parte do sistema imune).

No contexto em que a produção de óxido nítrico fosse parte do efeito antideposição, a catálise desta reação no interior da encapsulina se tornaria essencial. Desta forma, a dificuldade das moléculas envolvidas na produção de NO em transitarem pelos poros definiria o impacto da encapsulação sobre a antideposição.

Existe a possibilidade de que os dois mecanismos atuem em conjunto, situação em que as preocupações dos dois parágrafos anteriores teriam de ser abordadas também em conjunto.

Além da modificação com o intuito de evitar uma resposta imune, a encapsulina poderia ter sua sequência aminoacídica alterada para aumentar o tamanho dos poros e facilitar a difusão, conforme experimentos realizados por Williams et al. (2018), que aumentaram a difusão pelo poro da encapsulina de *T. maritima* em 7 vezes. Isso poderia melhorar a difusão, porém com provável perda na seletividade. O pequeno diâmetro dos poros faz com que moléculas passantes interajam com os aminoácidos que formam as paredes dos poros, contribuindo para a seleção do que pode ou não passar, dependendo das características químicas dos aminoácidos. Na revisão de Nichols et al. (2017), os autores comentam sobre poros de encapsulinas de diferentes organismos serem carregados positivamente, negativamente ou neutros.

Um exemplo da utilidade da seletividade do poro é o carboxissomo, uma esfera proteica oca, maior que uma encapsulina, que armazena as enzimas RuBisCO e anidrase carbônica (KIMBER, 2014). Os poros positivamente carregados

desta estrutura facilitam a passagem dos íons HCO_3^- em detrimento das moléculas de CO_2 e O_2 . Isso favorece que o HCO_3^- entre no compartimento, seja convertido em CO_2 pela anidrase carbônica, e o CO_2 seja fixado pela enzima RuBisCO. O CO_2 produzido no interior tem dificuldade de sair pelos poros e acaba acumulando e contribuindo com a reação de fixação. O fato do O_2 não poder entrar facilmente impede que ele compita com o CO_2 pela enzima RuBisCO (MAHINTHICHAICHAN et al., 2018). Isso tem o resultado final de melhorar a fixação de carbono, algo que foi descoberto em cianobactérias e que agora cientistas tentam transferir para os cloroplastos de plantas (LONG et al., 2018), a fim de acelerar a produção de biomassa.

Se o carboxissomo fosse utilizado na remoção de CO_2 do sangue, o CO_2 produzido teria dificuldade em deixar o interior do compartimento. Isso mostra que poros que facilitem a entrada de HCO_3^- automaticamente dificultam a saída de CO_2 , devido à diferença de cargas. Uma forma de contornar isso envolveria aumentar os poros para tornar a interação entre a substância difundindo e as paredes do poro menos importante, ou explorar compartimentos que possuam poros com diferentes propriedades químicas. Uma mesma encapsulina pode, por exemplo, apresentar poros neutros e carregados negativamente (NICHOLS et al., 2017), o que permitiria o trânsito de moléculas com diferentes propriedades químicas.

4.3.8 Comparação entre 1D e 2D

O motivo pelo qual modelos 1D e 2D foram criados era para avaliar a necessidade de usar um modelo 2D. Mesmo com os erros encontrados, o comportamento do modelo 1D era semelhante ao 2D, pois compartilhavam as mesmas condições de contorno e, portanto, os mesmos erros. Isso pode indicar que, no caso em que os códigos estivessem livres de erros, os modelos 1D poderiam ser empregados no planejamento de quais parâmetros usar nos modelos 2D. Isso permitiria, por exemplo, otimizar o tempo gasto na execução do modelo 2D, mais lento, com base em resultados preliminares do modelo 1D, mais ágil.

5 CONCLUSÕES E SUGESTÕES

Este trabalho visou avaliar, *in silico*, o emprego de encapsulinas na proteção da enzima anidrase carbônica usada na remoção extracorpórea de CO₂. Devido aos problemas oriundos das condições de contorno, não foi possível tirar conclusões a respeito da utilidade da encapsulação. No entanto, algumas observações pertinentes foram feitas, e estão sumarizadas nos parágrafos subsequentes.

Modelos 1D e 2D foram construídos, sendo que ambos apresentam comportamento semelhante, indicando que o modelo 1D, mais ágil, pode ser usado na obtenção de resultados preliminares, para então executar o modelo 2D com os parâmetros pré-selecionados do modelo 1D, agilizando o processo de análise.

A presença das encapsulinas foi modelada e, apesar de inconclusivo, resultados indicam que um excesso de enzima pode ser mais vantajoso do que a encapsulação, desde que a degradação proteolítica não tenha impacto significativo sobre a hemocompatibilidade da membrana. As enzimas são capazes de reduzir a deposição de proteínas e plaquetas na superfície da membrana, contribuindo para a compatibilidade entre sangue e membrana, mas o mecanismo ainda não é claro.

Dependendo da intensidade da contribuição do efeito antideposição para a melhora na remoção de CO₂, a encapsulação passa a afetar mais do que apenas o transporte de CO₂ e bicarbonato. Considerando que o efeito antideposição pode estar relacionado ou não à atividade catalítica da enzima em produzir NO, a encapsulação, além de gerar resistência à transferência de massa de CO₂/HCO₃⁻/H⁺, poderia limitar o acesso da enzima aos substratos da formação de NO, ou ainda dificultar a saída deste (NO) pelos poros.

Quanto à modelagem da degradação proteolítica, apenas um trabalho foi encontrado que tratava especificamente da degradação da anidrase carbônica humana II. Os dados cinéticos pertenciam à degradação por quimiotripsina (OSBORNE; TASHIAN, 1981), uma protease encontrada no sangue, e eram aplicados em um modelo de cinética de Michaelis-Menten. A implementação foi fácil, porém, após constatar que a deposição sobre a membrana poderia ser importante, surgiu a dúvida se o modelo de proteólise capturaria o impacto da degradação sobre a atividade da anidrase carbônica relacionada ao CO₂ e à antideposição, já que

diferentes regiões da enzima parecem estar envolvidas com cada uma delas (AAMAND et al., 2009).

Diante disso, como sugestão para trabalhos futuros, tanto experimentais quanto *in silico*, fica a necessidade de avaliar a relevância do efeito antideposição e sua natureza (depende de catálise ou da obstrução física?), principalmente a fim de saber se ele precisa ser modelado. Caso sim, seria necessário obter dados e uma forma matemática de representá-lo.

Seria interesse desenvolver um modelo de proteólise que conseguisse capturar o impacto distinto da degradação sobre a desidratação do bicarbonato e sobre a antideposição, caso eles realmente apresentem distinção significativa.

Certamente, uma forma diferente de modelar as condições de contorno com enzimas se faz necessário, já que a abordagem de descontinuidade de fluxos não funcionou.

Para concluir, apesar dos estudos *in silico* serem úteis para reduzir o tempo e dinheiro gastos com estudos experimentais, ficou claro neste trabalho que muitos detalhes do comportamento dos fenômenos estão ausentes, comprometendo a modelagem. Neste caso, pareceu sensato fazer uma última sugestão: avaliar a relevância da degradação proteolítica sobre a contribuição da enzima experimentalmente, assim seria possível identificar quais fenômenos precisam ser modelados, e, possivelmente, fornecer dados para sua modelagem.

REFERÊNCIAS

- AAMAND, R. et al. Generation of nitric oxide from nitrite by carbonic anhydrase: a possible link between metabolic activity and vasodilation. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 297, n. 6, p. H2068–H2074, dez. 2009.
- ARAZAWA, D. T. et al. Immobilized carbonic anhydrase on hollow fiber membranes accelerates CO₂ removal from blood. **Journal of Membrane Science**, v. 403–404, n. 8, p. 25–31, jun. 2012.
- ARAZAWA, D. T. et al. Acidic sweep gas with carbonic anhydrase coated hollow fiber membranes synergistically accelerates CO₂ removal from blood. **Acta Biomaterialia**, v. 25, p. 143–149, out. 2015.
- BAIETH, H. E. A. Physical parameters of blood as a non-Newtonian fluid. **International Journal of Biomedical Science**, v. 4, n. 4, p. 323–329, 2008.
- BLAZEK, J. Introduction. In: **Computational Fluid Dynamics: Principles and Applications**. [s.l.] Elsevier, 2015. p. 1–5.
- CASEM, M. L. Organelles. In: **Case Studies in Cell Biology**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 157–192.
- CASSIDY-AMSTUTZ, C. et al. Identification of a Minimal Peptide Tag for in Vivo and in Vitro Loading of Encapsulin. **Biochemistry**, v. 55, n. 24, p. 3461–3468, 2016.
- CROTTI, S. et al. Artificial lung as an alternative to mechanical ventilation in COPD exacerbation. **European Respiratory Journal**, v. 39, n. 1, p. 212–215, 1 jan. 2012.
- D'ONOFRIO, C. et al. Three-dimensional computational model of a blood oxygenator reconstructed from micro-CT scans. **Medical Engineering & Physics**, v. 47, p. 190–197, set. 2017.
- ELLIOTT, M.; NAVA, S.; SCHÖNHOFER, B. **Non-Invasive Ventilation and Weaning: Principles and Practice**. 2. ed. [s.l.] CRC Press, 2018.
- FÅHRÆUS, R.; LINDQVIST, T. THE VISCOSITY OF THE BLOOD IN NARROW CAPILLARY TUBES. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 96, n. 3, p. 562–568, mar. 1931.
- FEDERSPIEL, W. J.; HENCHIR, K. A. Lung, Artificial: Basic Principles and Current Applications. **Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering**, p. 910–921, 2004.
- FÓRUM COMSOL. **Regarding Flux Discontinuity Boundary Condition In The Diffusion Module**. Disponível em: <<https://br.comsol.com/forum/thread/7952/regarding-flux-discontinuity-boundary-condition-in-the-diffusion-module>>. Acesso em: 4 dez. 2019.
- FOURNIER, R. L. The physical and flow properties of blood and other fluids. In:

Basic Transport Phenomena in Biomedical Engineering. 4. ed. Boca Raton: CRC Press, 2017. p. 153–205.

FROST, M. C.; REYNOLDS, M. M.; MEYERHOFF, M. E. Polymers incorporating nitric oxide releasing/generating substances for improved biocompatibility of blood-contacting medical devices. **Biomaterials**, v. 26, n. 14, p. 1685–1693, maio 2005.

GIESSEN, T. W.; SILVER, P. A. Engineering carbon fixation with artificial protein organelles. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 46, p. 42–50, 2017.

GRAMATICOPOLO, S. et al. Extracorporeal CO₂ Removal – A Way to Achieve Ultraprotective Mechanical Ventilation and Lung Support: The Missing Piece of Multiple Organ Support Therapy. In: **Cardiorenal Syndromes in Critical Care**. Basel: KARGER, 2010. v. 165p. 174–184.

HILL, E. P.; POWER, G. G.; LONGO, L. D. A mathematical model of carbon dioxide transfer in the placenta and its interaction with oxygen. **Am J Physiol**, v. 224, n. 2, p. 283–99, 1973a.

HILL, E.; POWER, G.; LONGO, L. Mathematical simulation of pulmonary O₂ and CO₂ exchange. **American Journal of Physiology-Legacy Content**, v. 224, n. 4, p. 904–917, abr. 1973b.

HORMES, M. et al. A validated CFD model to predict O₂ and CO₂ transfer within hollow fiber membrane oxygenators. **International Journal of Artificial Organs**, v. 34, n. 3, p. 317–325, 2011.

ILIUTA, I.; ILIUTA, M. C. Investigation of CO₂ removal by immobilized carbonic anhydrase enzyme in a hollow-fiber membrane bioreactor. **AIChE Journal**, v. 63, n. 7, p. 2996–3007, jul. 2017.

IWAKI, K. et al. Radioimmunoassay for human pancreatic chymotrypsin and measurement of serum immunoreactive chymotrypsin contents in various diseases. **Research communications in chemical pathology and pharmacology**, v. 40, n. 3, p. 489–96, jun. 1983.

KAAR, J. L. et al. Towards improved artificial lungs through biocatalysis. **Biomaterials**, v. 28, n. 20, p. 3131–3139, jul. 2007.

KACMAREK, R. M.; STOLLER, J. K.; HEUER, A. J. **Egan's Fundamentals of Respiratory Care**. 11. ed. [s.l.] Elsevier, 2017.

KEAN, K. M. et al. Structural insights into a thermostable variant of human carbonic anhydrase II. **Protein Science**, v. 27, n. 2, p. 573–577, fev. 2018.

KHALIFAH, R. G. The carbon dioxide hydration activity of carbonic anhydrase. I. Stop-flow kinetic studies on the native human isoenzymes B and C. **The Journal of biological chemistry**, v. 246, n. 8, p. 2561–73, 25 abr. 1971.

- KIMBER, M. S. Carboxysomal Carbonic Anhydrases. In: [s.l.: s.n.], p. 89–103.
- KIMMEL, J. D. et al. Carbonic anhydrase immobilized on hollow fiber membranes using glutaraldehyde activated chitosan for artificial lung applications. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 24, n. 11, p. 2611–2621, 26 nov. 2013.
- LAGOUTTE, P. et al. Simultaneous surface display and cargo loading of encapsulin nanocompartments and their use for rational vaccine design. **Vaccine**, v. 36, n. 25, p. 3622–3628, 2018.
- LAU, Y. H. et al. Prokaryotic nanocompartments form synthetic organelles in a eukaryote. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.
- LEFKOWITZ, R. B.; SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W.; HELLER, M. J. Whole blood assay for elastase, chymotrypsin, matrix metalloproteinase-2, and matrix metalloproteinase-9 activity. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 19, p. 8251–8258, 2010.
- LONG, B. M. et al. Carboxysome encapsulation of the CO₂-fixing enzyme Rubisco in tobacco chloroplasts. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 3570, 3 dez. 2018.
- MA, F. et al. Isotopically nonstationary ¹³C flux analysis of changes in Arabidopsis thaliana leaf metabolism due to high light acclimation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 111, n. 47, p. 16967–16972, 25 nov. 2014.
- MAHINTHICHAICHAN, P. et al. Selective Permeability of Carboxysome Shell Pores to Anionic Molecules. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 122, n. 39, p. 9110–9118, 4 out. 2018.
- MAKDISI, G.; WANG, I.-W. Extra Corporeal Membrane Oxygenation (ECMO) review of a lifesaving technology. **Journal of thoracic disease**, v. 7, n. 7, p. E166-76, jul. 2015.
- MANAP, H. H.; WAHAB, A. K. A.; ZUKI, F. M. Mathematical Modelling of Carbon Dioxide Exchange in Hollow Fiber Membrane Oxygenator. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**, v. 210, n. 1, p. 1–12, 2017.
- MARCINKOWSKA-GAPIŃSKA, A. et al. Comparison of three rheological models of shear flow behavior studied on blood samples from post-infarction patients. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v. 45, n. 9, p. 837–844, 8 set. 2007.
- MARCHI, C. H. Esquemas de Alta Ordem para a Solução de Escoamentos de Fluidos sem Dispersão Numérica. **Journal of the Brazilian Society of Mechanical Sciences**, v. 15, n. 3, p. 231–249, 1993.
- MAURI, T.; ZANELLA, A.; PESENTI, A. Extracorporeal Gas Exchange: Present and Future. In: **Annual Update in Intensive Care and Emergency Medicine 2013**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 609–619.
- MCHUGH, C. A. et al. A virus capsid-like nanocompartment that stores iron and

protects bacteria from oxidative stress. **The EMBO journal**, v. 33, n. 17, p. 1–16, 2014.

MOUZA, A. et al. A Simplified Model for Predicting Friction Factors of Laminar Blood Flow in Small-Caliber Vessels. **Fluids**, v. 3, n. 4, p. 75, 19 out. 2018.

NICHOLS, R. J. et al. Encapsulins: molecular biology of the shell. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 52, n. 5, p. 583–594, 2017.

NUSZKOWSKI, M. M. et al. The Bypass Circuit: Hardware Options. In: **Comprehensive Surgical Management of Congenital Heart Disease**. 2. ed. [s.l.] CRC Press, 2014. p. 141–161.

OH, H.-I. et al. Hemocompatibility Assessment of Carbonic Anhydrase Modified Hollow Fiber Membranes for Artificial Lungs. **Artificial Organs**, v. 34, n. 5, p. 439–442, maio 2010.

OSBORNE, W. R. A.; TASHIAN, R. E. The Proteolytic Degradation of Normal and Variant Human Carbonic Anhydrase Isozymes. **The Journal of biological chemistry**, v. 256, n. 3, p. 1330–1334, 1981.

PARK, J. et al. Molecular Dynamics Simulations of Selective Metabolite Transport across the Propanediol Bacterial Microcompartment Shell. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 121, n. 34, p. 8149–8154, 31 ago. 2017.

PEEK, G. J. et al. Efficacy and economic assessment of conventional ventilatory support versus extracorporeal membrane oxygenation for severe adult respiratory failure (CESAR): a multicentre randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 374, n. 9698, p. 1351–1363, out. 2009.

PEPEL, A. S.; ENDEN, G. An analytical solution for steady flow of a Quemada fluid in a circular tube. **Rheologica Acta**, v. 32, n. 4, p. 422–426, 1993.

PRYOR, P. R. Analyzing Lysosomes in Live Cells. In: [s.l: s.n.]. p. 145–157.

RAHMANPOUR, R.; BUGG, T. D. H. Assembly in vitro of *Rhodococcus jostii* RHA1 encapsulin and peroxidase DypB to form a nanocompartment. **FEBS Journal**, v. 280, n. 9, p. 2097–2104, 2013.

RANA, K.; NEEVES, K. B. Blood flow and mass transfer regulation of coagulation. **Blood Reviews**, v. 30, n. 5, p. 357–368, set. 2016.

ROACHE, P. J. The Method of Manufactured Solutions for Code Verification. In: BEISBART, C.; SAAM, N. J. (Eds.). . **Computer Simulation Validation. Simulation Foundations, Methods and Applications**. Simulation Foundations, Methods and Applications. Cham: Springer International Publishing, 2019. p. 295–318.

ROMAY, E.; FERRER, R. Extracorporeal CO₂ removal: Technical and physiological fundamentals and principal indications. **Medicina Intensiva (English Edition)**, v. 40, n.

1, p. 33–38, jan. 2016.

RONCON-ALBUQUERQUE, R.; PAIVA, J. A. Recent Advances and Novel Applications of Modern ECMO. In: **Annual Update in Intensive Care and Emergency Medicine 2013**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 621–633.

RUSSO, M. E. et al. Modeling of slurry staged bubble column for biomimetic CO₂ capture. **International Journal of Greenhouse Gas Control**, v. 47, p. 200–209, abr. 2016.

SALLEY, S. O. et al. Thermal, Operational, and Storage Stability of Immobilized Carbonic Anhydrase in Membrane Lungs. **ASAIO Journal**, v. 38, n. 3, p. M684–M687, jul. 1992.

SIDEBOTHAM, D. et al. Venovenous Extracorporeal Membrane Oxygenation in Adults: Practical Aspects of Circuits, Cannulae, and Procedures. **Journal of Cardiothoracic and Vascular Anesthesia**, v. 26, n. 5, p. 893–909, out. 2012.

SOUDIJN, M. L. **Proton Transport in Aqueous Ionic Solutions**. [s.l.] University of Amsterdam, 2012.

SUTTER, M. et al. Structural basis of enzyme encapsulation into a bacterial nanocompartment. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 15, n. 9, p. 939–947, 2008.

SVITEK, R. G.; FEDERSPIEL, W. J. A mathematical model to predict CO₂ removal in hollow fiber membrane oxygenators. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 36, n. 6, p. 992–1003, 2008.

TAMURA, A. et al. Packaging guest proteins into the encapsulin nanocompartment from *Rhodococcus erythropolis* N771. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 112, n. 1, p. 13–20, 2015.

TOOMASIAN, J. M. et al. A polymethylpentene fiber gas exchanger for long-term extracorporeal life support. **ASAIO Journal**, 2005.

TURRI, F.; YANAGIHARA, J. I. Computer-assisted numerical analysis for oxygen and carbon dioxide mass transfer in blood oxygenators. **Artificial Organs**, v. 35, n. 6, p. 579–592, 2011.

URRY, L. A. et al. Evolution, the Themes of Biology, and Scientific Inquiry. In: **Campbell Biology**. 11. ed. [s.l.] Pearson, 2016. p. 2–27.

VASLEF, S. N. et al. Use of a Mathematical Model to Predict Oxygen Transfer Rates in Hollow Fiber Membrane Oxygenators. **ASAIO Journal**, v. 40, n. 4, p. 990–996, out. 1994.

VERSTEEG, H. K.; MALALASEKERA, W. **An Introduction to Computational Fluid**

Dynamics: The Finite Volume Method. 2. ed. [s.l.] Pearson, 2007.

WICKRAMASINGHE, S. R.; GARCIA, J. D.; HAN, B. Mass and momentum transfer in hollow fibre blood oxygenators. **Journal of Membrane Science**, v. 208, n. 1–2, p. 247–256, out. 2002.

WILKINS, R. L.; STOLLER, J. K.; KACMAREK, R. M. **Egan - Fundamentos da Terapia Respiratória.** 9. ed. [s.l.] Elsevier, 2009.

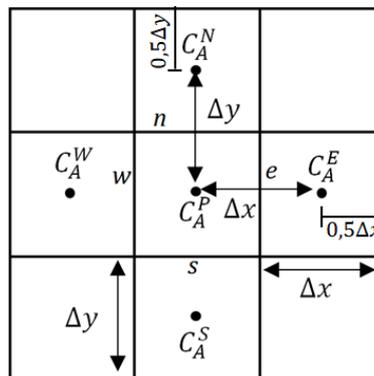
WILLIAMS, E. M. et al. Pore Engineering for Enhanced Mass Transport in Encapsulin Nanocompartments. **ACS Synthetic Biology**, v. 7, n. 11, p. 2514–2517, 16 nov. 2018.

ZANELLA, A. et al. **Blood Acidification Enhances Extracorporeal Carbon Dioxide Removal: Long Term Animal Study.** D58. EXTRACORPOREAL MEMBRANE OXYGENATION: RESTING INJURED LUNGS. **Anais...**American Thoracic Society, maio 2012Disponível em: http://www.atsjournals.org/doi/abs/10.1164/ajrccm-conference.2012.185.1_MeetingAbstracts.A6020

APÊNDICE A – Discretização das equações e condições de contorno

O sistema de coordenadas usa a notação da Figura 31. O sobrescrito indica posição em (N = North/Norte, S = South/Sul, W = West/Oeste, E = East/Leste, P = ponto sendo calculado). O sobescrito indica a espécie (na Figura 31, a espécie é genericamente representada por A)

Figura 31: Sistema de coordenadas usado na discretização.



Fonte: Do autor, (2020).

PERFIS PARA HEMÁCIA E PLASMA

Para os perfis de concentração no plasma e na hemácia, a representação das concentrações usa o seguinte esquema: C_m^{n*} , onde n é plasma (P) ou hemácia (R); e m é a posição do volume (N, S, W, E, P) de acordo com o esquema da Figura 31. O asterisco indica que o valor é o da iteração anterior (trata-se de um processo iterativo por Gauss-Seidel). A ausência do asterisco indica tratar-se do valor atualmente sendo calculado. As letras minúsculas indicam as interfaces entre volumes de controle (n = north/norte, s = south/sul, w = west/oeste, e = east/leste).

EQUAÇÃO PARA O PERFIL DE CONCENTRAÇÃO NO PLASMA, Eq. (51)

$$\begin{aligned}
 & \frac{C_P^P - C_P^{P*}}{\Delta t} \Delta x \Delta y \\
 &= D \left[\beta_e \frac{C_E^P - C_P^P}{\Delta x} - \beta_w \frac{C_P^P - C_W^P}{\Delta x} \right] \Delta y \\
 &- 6v_m \left(\frac{x_e^2}{2L} - \frac{x_e^3}{3L^2} - \frac{x_w^2}{2L} + \frac{x_w^3}{3L^2} \right) \{ (0,5 + \alpha_e) C_P^P - (0,5 - \alpha_e) C_E^P \\
 &- [(0,5 + \alpha_w) C_W^P - (0,5 - \alpha_w) C_P^P] \} + S_{linearizado} \Delta x \Delta y
 \end{aligned} \tag{51}$$

EQUAÇÃO PARA O PERFIL DE CONCENTRAÇÃO NA HEMÁCIA, E1. (52)

$$\begin{aligned}
 & \frac{C_P^R - C_P^{R*}}{\Delta t} \Delta x \Delta y \\
 &= -6v_m \left(\frac{x_e^2}{2L} - \frac{x_e^3}{3L^2} - \frac{x_w^2}{2L} + \frac{x_w^3}{3L^2} \right) \{ (0,5 + \alpha_e) C_P^R - (0,5 - \alpha_e) C_E^R \\
 &- [(0,5 + \alpha_w) C_W^R - (0,5 - \alpha_w) C_P^R] \} + S_{linearizado} \Delta x \Delta y
 \end{aligned} \tag{52}$$

TERMOS FONTES

Para os termos fontes, a representação das concentrações usa o seguinte esquema: C_m^{n*} , onde n é plasma (P) ou hemácia (R); e m é a substância em questão (CO_2 , HCO_3^- , O_2 , HbCO_2 , H^+). O asterisco indica que o valor é o da iteração anterior (trata-se de um processo iterativo por Gauss-Seidel). A ausência do asterisco indica tratar-se do valor atualmente sendo calculado. Nos termos fontes, todas as concentrações se referem à posição P (concentração no mesmo volume sendo calculado).

TERMO FONTE LINEARIZADO PARA O PERFIL DE CO₂ NO PLASMA, Eq.

(53)

$$S_{linearizado}^{CO_2 plasma} = \frac{1}{\alpha_{CO_2}} \left[-k_u \alpha_{CO_2} P_{CO_2}^{P*} + \frac{k_v}{K} C_H^{P*} C_{HCO_3}^{P*} + \frac{D_{CO_2}^{tr}}{V^P} (P_{CO_2}^{R*} - P_{CO_2}^{P*}) \right] + \frac{1}{\alpha_{CO_2}} \left(-k_u \alpha_{CO_2} - \frac{D_{CO_2}^{tr}}{V^P} \right) (P_{CO_2}^P - P_{CO_2}^{P*})$$

(53)

TERMO FONTE LINEARIZADO PARA O PERFIL DE HCO₃⁻ NO PLASMA,

Eq. (54)

$$S_{linearizado}^{HCO_3 plasma} = - \left(-k_u \alpha_{CO_2} P_{CO_2}^{P*} + \frac{k_v}{K} C_H^{P*} C_{HCO_3}^{P*} \right) - \frac{D_{HCO_3}^{tr}}{V^P} \left(C_{HCO_3}^{P*} - \frac{C_{HCO_3}^{R*}}{r^*} \right) + \left(-\frac{k_v}{K} C_H^{P*} - \frac{D_{HCO_3}^{tr}}{V^P} \right) (C_{HCO_3}^P - C_{HCO_3}^{P*})$$

(54)

TERMO FONTE LINEARIZADO PARA O PERFIL DE O₂ NO PLASMA, Eq.

(55)

$$S_{linearizado}^{O_2 plasma} = -\frac{1}{\alpha_{O_2}^{vol}} \frac{\theta^*}{60} (P_{O_2}^{P*} - P_{O_2}^{R*}) - \frac{1}{\alpha_{O_2}^{vol}} \frac{\theta^*}{60} (P_{O_2}^P - P_{O_2}^{P*})$$

(55)

TERMO FONTE LINEARIZADO PARA O PERFIL DE H⁺ NO PLASMA, Eq.

(56)

$$S_{linearizado}^H plasma = -2,303 \frac{C_H^P}{\beta^P} \left[-k_u \alpha_{CO_2} P_{CO_2}^{P*} + \frac{k_v}{K} C_H^{P*} C_{HCO_3}^{P*} \right] - \frac{2,303}{\beta^P} \left[-k_u \alpha_{CO_2} P_{CO_2}^{P*} + 2 \frac{k_v}{K} C_H^{P*} C_{HCO_3}^{P*} \right] (C_H^P - C_H^{P*})$$

(56)

TERMO FONTE LINEARIZADO PARA O PERFIL DE CO₂ NA HEMÁCIA, Eq.

(57)

$$\begin{aligned}
 S_{linearizado}^{CO2\ hemácia} = & \frac{1}{\alpha_{CO2}} cat \left[-k_u \alpha_{CO2} P_{CO2}^{R*} + \frac{k_v}{K} C_H^{R*} C_{HCO3}^{R*} \right] \\
 & - \frac{1}{\alpha_{CO2}} k_a \alpha_{CO2} P_{CO2}^{R*} (C_{Hb} - C_{HbCO2}^{*}) \left(\frac{S^*}{100} \frac{K_{zo}}{K_{zo} + C_H^{R*}} + \left(1 - \frac{S^*}{100} \right) \frac{K_{zr}}{K_{zr} + C_H^{R*}} \right) \\
 & - \frac{1}{\alpha_{CO2}} \frac{k_a}{k_c} C_{HbCO2}^{*} C_H^{R*} - \frac{1}{\alpha_{CO2}} \frac{D_{CO2}^{tr}}{V^R} (P_{CO2}^{R*} - P_{CO2}^R) \\
 & + \left\{ \frac{1}{\alpha_{CO2}} cat [-k_u \alpha_{CO2}] \right. \\
 & - \frac{1}{\alpha_{CO2}} k_a \alpha_{CO2} (C_{Hb} - C_{HbCO2}^{*}) \left(\frac{S^*}{100} \frac{K_{zo}}{K_{zo} + C_H^{R*}} + \left(1 - \frac{S^*}{100} \right) \frac{K_{zr}}{K_{zr} + C_H^{R*}} \right) \\
 & \left. - \frac{1}{\alpha_{CO2}} \frac{D_{CO2}^{tr}}{V^R} \right\} (P_{CO2}^R - P_{CO2}^{R*})
 \end{aligned}
 \tag{57}$$

TERMO FONTE LINEARIZADO PARA O PERFIL DE HCO₃⁻ NA HEMÁCIA,

Eq. (58)

$$\begin{aligned}
 S_{linearizado}^{HCO3\ hemácia} = & -cat \left[-k_u \alpha_{CO2} P_{CO2}^{R*} + \frac{k_v}{K} C_H^{R*} C_{HCO3}^{R*} \right] + \frac{D_{HCO3}^{tr}}{V^P} \left(C_{HCO3}^{P*} - \frac{C_{HCO3}^{R*}}{r^*} \right) \\
 & + \left\{ -cat \frac{k_v}{K} C_H^{R*} - \frac{1}{r^*} \frac{D_{HCO3}^{tr}}{V^P} \right\} (C_{HCO3}^R - C_{HCO3}^{R*})
 \end{aligned}
 \tag{58}$$

TERMO FONTE LINEARIZADO PARA O PERFIL DE H^+ NA HEMÁCIA, Eq.

(59)

$$\begin{aligned}
 & S_{\text{linearizado}}^{H \text{ hemácia}} \\
 &= -2,303 \frac{C_H^{R*}}{\beta_{Hb}} \text{cat} \left[-k_u \alpha_{CO_2} P_{CO_2}^{R*} + \frac{k_v}{K} C_H^{R*} C_{HCO_3}^{R*} \right] \\
 &+ 2,303 \frac{C_H^{R*}}{\beta_{Hb}} 1,5 k_a \alpha_{CO_2} P_{CO_2}^{R*} (C_{Hb} - C_{HbCO_2}^{R*}) \left(\frac{S^*}{100} \frac{K_{ZO}}{K_{ZO} + C_H^{R*}} + \left(1 - \frac{S^*}{100} \right) \frac{K_{ZR}}{K_{ZR} + C_H^{R*}} \right) \\
 &- 2,303 \frac{C_H^{R*}}{\beta_{Hb}} 1,5 \frac{k_a}{k_c} C_{HbCO_2}^{R*} C_H^{R*} + 2,303 \frac{C_H^{R*}}{\beta_{Hb}} 0,6 \frac{\text{cap}}{100} \frac{1}{Hct} \frac{1}{22,4} \frac{dS^*}{dt} \\
 &+ \left\{ \begin{aligned} & -\frac{2,303}{\beta_{Hb}} \text{cat} \left[-k_u \alpha_{CO_2} P_{CO_2}^{R*} + 2 \frac{k_v}{K} C_H^{R*} C_{HCO_3}^{R*} \right] \\ & + \frac{2,303}{\beta_{Hb}} 1,5 k_a \alpha_{CO_2} P_{CO_2}^{R*} (C_{Hb} - C_{HbCO_2}^{R*}) \left(\frac{S^*}{100} \frac{K_{ZO}^2}{(K_{ZO} + C_H^{R*})^2} + \left(1 - \frac{S^*}{100} \right) \frac{K_{ZR}^2}{(K_{ZR} + C_H^{R*})^2} \right) \\ & - 2 \frac{2,303}{\beta_{Hb}} 1,5 \frac{k_a}{k_c} C_{HbCO_2}^{R*} C_H^{R*} + \frac{2,303}{\beta_{Hb}} 0,6 \frac{\text{cap}}{100} \frac{1}{Hct} \frac{1}{22,4} \frac{dS^*}{dt} \end{aligned} \right\} (C_H^{R*} \\
 &- C_H^{R*})
 \end{aligned} \tag{59}$$

TERMO FONTE LINEARIZADO PARA O PERFIL DE CARBAMATO

($HbCO_2$) NA HEMÁCIA, Eq. (60)

$$\begin{aligned}
 & S_{\text{linearizado}}^{HbCO_2 \text{ hemácia}} = k_a \alpha_{CO_2} P_{CO_2}^{R*} (C_{Hb} - C_{HbCO_2}^{R*}) \left(\frac{S^*}{100} \frac{K_{ZO}}{K_{ZO} + C_H^{R*}} + \left(1 - \frac{S^*}{100} \right) \frac{K_{ZR}}{K_{ZR} + C_H^{R*}} \right) \\
 & \quad - \frac{k_a}{k_c} C_{HbCO_2}^{R*} C_H^{R*} \\
 & + \left\{ -k_a \alpha_{CO_2} P_{CO_2}^{R*} \left(\frac{S^*}{100} \frac{K_{ZO}}{K_{ZO} + C_H^{R*}} + \left(1 - \frac{S^*}{100} \right) \frac{K_{ZR}}{K_{ZR} + C_H^{R*}} \right) - \frac{k_a}{k_c} C_H^{R*} \right\} (C_{HbCO_2} - C_{HbCO_2}^{R*})
 \end{aligned} \tag{60}$$

CONDIÇÕES DE CONTORNO

As concentrações sobre os contornos estão a uma distância $0,5\Delta x$ ou $0,5\Delta y$ do ponto P no centro do volume de controle adjacente ao contorno (conforme Figura A1). Por isso na discretização da difusão aparece 0,5 no denominador.

CONDIÇÃO DE CONTORNO PARA SITUAÇÃO SEM ENZIMAS ($x = L$), Eq. (61) a Eq. (64)

$\text{CO}_2^{\text{PLASMA}}$:

$$-D_{\text{CO}_2}^P \frac{(C_{\text{CO}_2}^P|_{x=L} - C_{\text{CO}_2,P}^P)}{0,5\Delta x} = km_{\text{CO}_2}(C_{\text{CO}_2}^P|_{x=L} - k_p^{\text{CO}_2} C_{\text{CO}_2}^{\text{gás}}) \quad (61)$$

$\text{HCO}_3^- \text{ PLASMA}$:

$$-D_{\text{HCO}_3}^P \frac{C_{\text{HCO}_3}^P|_{x=L} - C_{\text{HCO}_3,P}^P}{0,5\Delta x} = 0 \quad (62)$$

$\text{H}^+ \text{ PLASMA}$:

$$-D_H^P \frac{C_H^P|_{x=L} - C_{H,P}^P}{0,5\Delta x} = 0 \quad (63)$$

$\text{O}_2^{\text{PLASMA}}$:

$$D_{\text{O}_2}^P \frac{(C_{\text{O}_2}^P|_{x=L} - C_{\text{O}_2,P}^P)}{0,5\Delta x} = km_{\text{O}_2}(k_p^{\text{O}_2} C_{\text{O}_2}^{\text{gás}} - C_{\text{O}_2}^P|_{x=L}) \quad (64)$$

CONDIÇÃO DE CONTORNO PARA SITUAÇÃO COM ENZIMAS ($x = L$), Eq. (65) a (68)

$\text{CO}_2^{\text{PLASMA}}$:

$$\begin{aligned} D_{\text{CO}_2}^P \frac{(C_{\text{CO}_2}^P|_{x=L} - C_{\text{CO}_2,P}^P)}{0,5\Delta x} + km_{\text{CO}_2}(k_p^{\text{CO}_2} C_{\text{CO}_2}^P|_{x=L} - C_{\text{CO}_2}^G) \\ = -k_{\text{cat}} C_{\text{ENZ}}^{\text{área}} \frac{C_{\text{CO}_2}^P - C_{\text{HCO}_3}^P C_H^P/k_1}{K_M + C_{\text{CO}_2}^P - C_{\text{HCO}_3}^P C_H^P/k_1} \Big|_{x=L} \end{aligned} \quad (65)$$

HCO_3^- PLASMA :

$$-D_{\text{HCO}_3}^P \frac{c_{\text{HCO}_3}^P|_{x=L} - c_{\text{HCO}_3,P}^P}{0,5\Delta x} = 0 \quad (66)$$

H^+ PLASMA :

$$-D_H^P \frac{c_H^P|_{x=L} - c_{H,P}^P}{0,5\Delta x} = 0 \quad (67)$$

O_2 PLASMA :

$$D_{\text{O}_2}^P \frac{(c_{\text{O}_2}^P|_{x=L} - c_{\text{O}_2,P}^P)}{0,5\Delta x} = k_m^{\text{CO}_2} (k_p^{\text{O}_2} C_{\text{O}_2}^{\text{gás}} - c_{\text{O}_2}^P|_{x=L}) \quad (68)$$

CONDIÇÃO DE CONTORNO PARA SITUAÇÃO COM ENZIMAS
ENCAPSULADAS ($x = L$), Eq. (69) a (72)

CO_2 PLASMA :

$$\begin{aligned} D_{\text{CO}_2}^P A \frac{(c_{\text{CO}_2}^P|_{x=L} - c_{\text{CO}_2,P}^P)}{0,5\Delta x} + km_{\text{CO}_2} A (k_p^{\text{CO}_2} c_{\text{CO}_2}^P|_{x=L} - C_{\text{CO}_2}^G) \\ = -D_{\text{CO}_2}^{\text{poro}} A_{\text{poros}} \frac{c_{\text{CO}_2}^P|_{x=L} - C_{\text{CO}_2}^{\text{ENC}}}{L_{\text{poro}}} \end{aligned} \quad (69)$$

HCO_3^- PLASMA :

$$-D_{\text{HCO}_3}^P A \frac{c_{\text{HCO}_3}^P|_{x=L} - c_{\text{HCO}_3,P}^P}{0,5\Delta x} = D_{\text{HCO}_3}^{\text{poro}} A_{\text{poros}} \frac{c_{\text{HCO}_3}^P|_{x=L} - C_{\text{HCO}_3}^{\text{ENC}}}{L_{\text{poro}}} \quad (70)$$

H^+ PLASMA :

$$-D_H^P A \frac{c_H^P|_{x=L} - c_{H,P}^P}{0,5\Delta x} = D_H^{\text{poro}} A_{\text{poros}} \frac{c_H^P|_{x=L} - C_H^{\text{ENC}}}{L_{\text{poro}}} \quad (71)$$

O_2 PLASMA :

$$D_{O_2}^P \frac{(c_{O_2}^P|_{x=L} - c_{O_2,P}^P)}{0,5\Delta x} = k_m^{CO_2} (k_p^{O_2} C_{O_2}^{gás} - c_{O_2}^P|_{x=L}) \quad (72)$$

CONDIÇÃO DE CONTORNO PARA $x = 0$ ($i = CO_2, O_2, HCO_3^-, H^+$), Eq. (73)
e (74)

1D :

$$C_i^P|_{x=0} = C_i^P(t = 0) \quad (73)$$

2D :

$$\frac{(c_{i,P}^P - c_i^P|_{x=0})}{0,5\Delta x} = 0 \quad (74)$$

CONDIÇÃO DE CONTORNO PARA $y = 0$ ($i = CO_2, O_2, HCO_3^-, H^+$ e $j = R$ ou P), Eq. (75)

$$C_i^j|_{y=0} = C_i^j(t = 0) \quad (75)$$

CONDIÇÃO DE CONTORNO PARA $y = H$ ($i = CO_2, O_2, HCO_3^-, H^+$ e $j = R$ ou P)

$$\frac{(c_i^j|_{y=H} - c_{i,P}^j)}{0,5\Delta x} = 0 \quad (76)$$

APÊNDICE B – Aplicação do método das soluções manufaturadas

BREVE ESCLARECIMENTO SOBRE O MÉTODO

Comparar a solução numérica de uma equação com a solução analítica é uma forma de verificar se o código está funcionando adequadamente. Esse processo não verifica se o modelo adotado representa adequadamente o fenômeno, apenas verifica se o código resolve as equações corretamente.

Algumas equações são complexas demais para obter uma solução analítica com a qual comparar. As equações poderiam ser simplificadas até que uma solução analítica fosse viável, mas desta forma não é possível verificar as equações completas em um único teste.

O método das soluções manufaturadas permite fazer isso, pois o sistema de equações completo é manipulado para que a solução proposta seja aceita. Desta forma, uma única verificação vale para todas as equações simultaneamente e sem necessidade de simplificações. Esse novo conjunto de equações (após a manipulação) é solucionado numericamente e comparado com a solução proposta.

As referências citadas no texto principal, e.g., ROACHE (2019), podem ser consultadas para mais informações. Aqui um breve exemplo será dado para compreensão do método, seguido pelas soluções propostas para a verificação das equações usadas neste trabalho.

EXEMPLO SIMPLES

Suponha que a equação $x + \log_{10}(2x) = 6$ precise ser resolvida numericamente. Resolvendo iterativamente com auxílio de uma calculadora $x^{k+1} = 6 - \log_{10}(2x^k)$ usando $x^0 = 1$ obtém-se que a solução é $x = 5$. Ao resolver numericamente no computador, se a solução for $x = 5$, o método numérico foi implementado corretamente. Supondo que a solução não pudesse ser facilmente encontrada para a comparação, o método das soluções manufaturadas poderia ser aplicado como descrito a seguir.

Primeiro, uma solução precisa ser proposta. Aqui $x^{manuf} = 88$ será adotado para mostrar que a solução proposta não precisa ser um palpite baseado na solução real (que pode ser desconhecida).

A equação precisa ser manipulada para aceitar a solução proposta. Para isso, um termo extra é adicionado. No caso de fenômenos de transporte, esse termo deve ser tratado como um termo fonte extra. A equação com o termo extra se torna $x + \log_{10}(2x) = 6 + Q^{manuf}$. Agora a solução proposta ($x^{manuf} = 88$) é aplicada na equação e o termo fonte é calculado, obtendo-se $Q^{manuf} \cong 84,25$.

A nova equação $x + \log_{10}(2x) = 6 + 84,25$ admite $x = x^{manuf} = 88$ como solução. Resolvendo numericamente, a equação deve gerar $x \cong 88$, validando a implementação. Após isso, é necessário lembrar que a equação a ser resolvida é aquela que não contém Q^{manuf} . Percebe-se que durante a verificação com o método chega-se a uma resposta ($x = 88$) que não tem relação com a solução de interesse ($x = 5$), mas isso é normal, pois a verificação avalia se as operações matemáticas estão corretas e não se a solução proposta tem significado para o problema em questão. Roache (2019) conta com orientações sobre os cuidados ao propor a solução. Vale ressaltar que a solução poderia ser uma função (e.g., perfil de temperatura ou concentração) e não uma constante, sendo necessário propor funções como solução.

SOLUÇÕES PROPOSTAS – MODELO UNIDIMENSIONAL

O sobrescrito ° indica tratar-se do valor inicial dado na Tabela 2.

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA $P_{CO_2}^P$, Eq. (77)

$$P_{CO_2}^{P,manuf} = -1000x^2t + P_{CO_2}^{P,o} \quad (77)$$

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA $P_{CO_2}^R$, Eq. (78)

$$P_{CO_2}^{R,manuf} = -\frac{4}{20}t + P_{CO_2}^{R,o} \quad (78)$$

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA $P_{O_2}^P$, Eq. (79)

$$P_{O_2}^{P,manuf} = (500x^2 + x)t + P_{O_2}^{P,o} \quad (79)$$

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA $P_{O_2}^R$, Eq. (80)

$$P_{O_2}^{R,manuf} = \frac{4}{20}t + P_{O_2}^{R,o} \quad (80)$$

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA $C_{HCO_3}^P$, Eq. (81)

$$C_{HCO_3}^{P,manuf} = (x^2 - 2Lx)t + C_{HCO_3}^{P,o} \quad (81)$$

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA $C_{HCO_3}^R$, Eq. (82)

$$C_{HCO_3}^{R,manuf} = -0,0001t + C_{HCO_3}^{R,o} \quad (82)$$

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA C_H^P , Eq. (83)

$$C_H^{P,manuf} = (1 \times 10^{-6}x^2 - 2 \times 10^{-6}Lx)t + C_H^{P,o} \quad (83)$$

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA C_H^R , Eq. (84)

$$C_H^{R,manuf} = -1 \times 10^{-10}t + C_H^{R,o} \quad (84)$$

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA C_{HbCO_2} , Eq. (85)

$$C_{HbCO_2}^{manuf} = 1 \times 10^{-5}t + C_{HbCO_2}^o \quad (85)$$

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA S , Eq. (86)

$$S^{manuf} = (1000x^2 + 2x)t + S^o \quad (86)$$

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA θ , Eq. (87)

$$\theta^{manuf} = xt + \theta^o \quad (87)$$

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA r , Eq. (88)

$$r^{manuf} = (10x^2 - 20Lx) + r^o \quad (88)$$

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA δ , Eq. (89)

$$\delta^{manuf} = (1000x^2 + x)t + x^o \quad (89)$$

SOLUÇÕES PROPOSTAS – MODELO BIDIMENSIONAL

O sobrescrito o indica tratar-se do valor inicial dado na Tabela 2.

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA $P_{CO_2}^P$, Eq. (90)

$$P_{CO_2}^{P,manuf} = 700x^2(500y^2 - 1000Hy)t + (e^x - x)(1 \times 10^{-4}x^2 - 2 \times 10^{-4}y)t + P_{CO_2}^{P,o} \quad (90)$$

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA $P_{CO_2}^R$, Eq. (91)

$$P_{CO_2}^{R,manuf} = 1 \times 10^{-4}(500y^2 - 1000y)t + P_{CO_2}^{R,o} \quad (91)$$

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA $P_{O_2}^P$, Eq. (92)

$$P_{O_2}^{P,manuf} = 700x^2(-500y^2 + 1000Hy)t + (e^x - x)(-1 \times 10^{-4}y^2 + 2 \times 10^{-4}y)t + P_{O_2}^{P,o} \quad (92)$$

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA $P_{O_2}^R$, Eq. (93)

$$P_{O_2}^{R,manuf} = 1 \times 10^{-4}(-500y^2 + 1000y)t + P_{O_2}^{R,o} \quad (93)$$

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA $C_{HCO_3}^P$, Eq. (94)

$$C_{HCO_3}^{P,manuf} = x^2(500y^2 - 1000Hy)t + (e^x - x)(1 \times 10^{-5}y^2 - 2 \times 10^{-5}y)t + C_{HCO_3}^{P,o} \quad (94)$$

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA $C_{HCO_3}^R$, Eq. (95)

$$C_{HCO_3}^{R,manuf} = 1 \times 10^{-7}(500y^2 - 1000y)t + C_{HCO_3}^{R,o} \quad (95)$$

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA C_H^P , Eq. (96)

$$C_H^{P,manuf} = x^2(1 \times 10^{-3}y^2 - 2 \times 10^{-3}Hy)t + (e^x - x)(1 \times 10^{-10}y^2 - 2 \times 10^{-10}y)t + C_H^{P,o} \quad (96)$$

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA C_H^R , Eq. (97)

$$C_H^{R,manuf} = 1 \times 10^{-7}(1 \times 10^{-3}y^2 - 2 \times 10^{-3}y)t + C_H^{R,o} \quad (97)$$

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA C_{HbCO_2} , Eq. (98)

$$C_{HbCO_2}^{manuf} = 2 \times 10^{-7}(60y^2 - 120y)t + C_{HbCO_2}^o \quad (98)$$

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA S , Eq. (99)

$$S^{manuf} = 1 \times 10^{-4}(-500y^2 + 1000y)t + S^o \quad (99)$$

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA θ , Eq. (100)

$$\theta^{manuf} = 20xyt + \theta^o \quad (100)$$

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA r , Eq. (101)

$$r^{manuf} = x^2(1500y^2 - 3000y)t + (e^x - x)(1 \times 10^{-4}y^2 - 2 \times 10^{-4}y)t + r^o \quad (101)$$

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA δ , Eq. (102)

$$\delta^{manuf} = 700x^2(-500y^2 + 1000y)t + (e^x - x)(-1 \times 10^{-4}y^2 + 2 \times 10^{-4}y)t + \delta^o \quad (102)$$

SOLUÇÃO PROPOSTA PARA $v_y(x)$, Eq. (103)

Foi proposto o perfil newtoniano desenvolvido em Metodologia.

$$v_y^{manuf} = 6v_{méd} \left(\frac{x}{L} - \frac{x^2}{L^2} \right) \quad (103)$$