

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA ELÉTRICA E ELETRÔNICA
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA

Pedro José Teixeira Pagano

Desenvolvimento de Equipamento para Aplicação da Eletroporação

Florianópolis

2023

Pedro José Teixeira Pagano

Desenvolvimento de Equipamento para Aplicação da Eletroporação

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Engenharia Elétrica do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia Elétrica.

Orientador: Prof^a. Daniela Ota Hisayasu Suzuki, Dr^a. Eng^a.

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra

Pagano, Pedro José Teixeira
Desenvolvimento de Equipamento para Aplicação da
Eletroporação / Pedro José Teixeira Pagano ; orientadora,
Daniela Ota Hisayasu Suzuki, 2023.
77 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico,
Graduação em Engenharia Elétrica, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Engenharia Elétrica. 2. Engenharia eletrica. 3.
Eletroporação. 4. Gerador de Sinais. 5. Eletroporador. I.
Suzuki, Daniela Ota Hisayasu . II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Graduação em Engenharia Elétrica. III.
Título.

Pedro José Teixeira Pagano

Este Trabalho Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Bacharel em Engenharia Elétrica” e aceito, em sua forma final, pelo Curso de Graduação em Engenharia Elétrica.

Florianópolis, 11 de julho de 2023.

Prof. Miguel Moreto, Dr.
Coordenador do Curso de Graduação em Engenharia Elétrica

Banca Examinadora:

Profa. Daniela Ota Hisayasu Suzuki, Dra.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Laurent Didier Bernard, PhD.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Guilherme Brasil Pintarelli, Ph.D.
Universidade Federal de Santa Catarina

Eng. Eletric. Daniella de Lourdes Luna Santana de Andrade, Me.
Universidade Federal de Santa Catarina

À memória dos meus avós Ênio e Elonir

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a toda minha família, especialmente aos meus pais, Mara e Carlos, por absolutamente tudo, eles são referência para minha vida.

Aos meus irmãos Brisa e Francisco, pela incondicional parceria e apoio, sem vocês essa caminhada não seria a mesma. A minha Prima Bruna, por me orientar em relação a uma questão relacionada ao processo cirúrgico.

Agradeço a minha orientadora, Profa. Dra. Daniela Ota Hisayasu Suzuki, pela oportunidade e confiança desde o primeiro contato. Obrigado pela disposição e generosidade em compartilhar diversos conhecimentos da Engenharia Biomédica, em especial aos estudos da Eletroporação.

Aos Dr. Eng. Guilherme B. P. e Afrânio A. C. Jr. por serem sempre presentes e dispostos me ajudando durante todo o período que estive no IEB.

Ao Electroporation Research Group do IEB-UFSC. Obrigado, queridos companheiros, ao longo desses anos esta pesquisa recebeu contribuições imensuráveis. Com vocês, compartilho das alegrias do trabalho e do sucesso em equipe.

Gostaria de expressar minha gratidão aos queridos amigos que encontrei durante minha jornada universitária, em especial à turma que ingressou em agosto de 2016. Em particular, agradeço a Maria Luiza Fabrício de Oliveira, Marina Galarça Santa Catarina, Gabriel Germino Martins de Jesus, Vitória Rigoni e Juliana Vincoletto Rosa. Somente vocês sabem o quão grande foi o esforço necessário e somente vocês compreendem essa vitória.

Sou grato aos muitos amigos e amigas que me apoiaram mesmo antes do início da graduação, ouvindo minhas reclamações e me ajudando a compreender as situações e seguir em frente. Em especial, agradeço a Aurora, Vitória e Mariana, pois sem vocês a vida não seria a mesma. E agradeço a Carlos, Matheus e Maicon, amigos para todas as horas.

Finalmente, sou grato a Universidade Federal de Santa Catarina por fornecer a estrutura necessária para a realização desta pesquisa, e por me proporcionar a formação em engenharia elétrica.

Todas as vitórias ocultam uma abdicação (BEAUVOIR, Simone).

RESUMO

A otimização dos tratamentos para doenças não transmissíveis, como o câncer é essencial para melhorar a sobrevivência e a expectativa de vida das pessoas. Atualmente, a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia são os principais tratamentos disponíveis. No entanto, a eletroporação (EP) é uma técnica promissora que pode ser aplicada sozinha ou em combinação com outras técnicas para o tratamento de tumores cancerosos. A EP consiste na formação de poros na membrana celular como resultado da aplicação de campos elétricos (EF) de curta duração e grande magnitude, permitindo a permeabilização da célula e o transporte de moléculas que não seriam possíveis em um estado de homeostase. Dependendo da intensidade do EF, o pulso aplicado pode ser reversível (RE), permitindo a recuperação celular após a aplicação, ou irreversível (IRE), resultando em morte celular. O presente estudo tem por objetivo desenvolver o eletroporador compatível aos ensaios de pesquisas em eletroporação do IEB-UFSC com tensão de saída variável. O equipamento foi desenvolvido de forma modular de forma a facilitar a construção e análise de funcionamento. Além disso, foi realizado também a simulação de um novo modelo de eletrodo inserido dentro de uma ponteira de pipeta para ser empregado nas aplicações de eletroporação em colônias de células. O presente equipamento demonstrou bons resultados nos testes realizados alcançando a tensão de 755 V, quanto ao modelo de eletrodo proposto, o mesmo foi capaz de cobrir todo o espaço entre os eletrodos com um campo maior que 100 V/cm e extrapolar para além desta área. Desta forma, o presente equipamento e a nova topologia de eletrodo se mostraram versáteis e habilitando uma gama de aplicações pertinentes as análises realizadas no IEB-UFSC.

Palavras-chave: Eletroporador. Eletroporação. Campo Elétrico. Eletroquimioterapia.

ABSTRACT

The optimization of treatments for non-communicable diseases, such as cancer, is essential to improve people's survival and life expectancy. Currently, surgery, radiation therapy, and chemotherapy are the main available treatments. However, electroporation (EP) is a promising technique that can be applied alone or in combination with other techniques for the treatment of cancerous tumors. EP consists of the formation of pores in the cell membrane as a result of the application of short-duration, high-magnitude electric fields (EF), allowing cell permeabilization and the transport of molecules that would not be possible in a state of homeostasis. Depending on the intensity of the EF, the applied pulse can be reversible (RE), allowing for cell recovery after application, or irreversible (IRE), resulting in cell death. The present study aims to develop an electroporator compatible with the electroporation research assays at IEB-UFSC with variable output voltage. The equipment was developed in a modular way to facilitate construction and functional analysis. Additionally, a simulation of a new electrode model inserted into a pipette tip was also performed to be used in electroporation applications in cell colonies. The present equipment showed good results in the tests performed, reaching a voltage of 755 V. As for the proposed electrode model, it was able to cover the entire space between the electrodes with a field greater than 100 V/cm and extrapolate beyond this area. Thus, the present equipment and the new electrode topology proved to be versatile and enabled a range of applications relevant to the analyses carried out at IEB-UFSC.

Keywords: Electroporator. Electroporation. Electric Field. Electrochemotherapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Relação tempo e Intensidade do campo elétrico na eletroporação.	20
Figura 2 - Demonstração do processo de eletroporação em quatro passos, da esquerda para a direita. A célula e uma substância no meio celular, a aplicação da técnica, a substância adentrando o meio intracelular após a abertura dos poros e por fim as duas possibilidades de resultado da aplicação, a célula continuar viável mesmo com a substância em seu interior ou morte celular.	21
Figura 3 - Processo de formação de caminhos aquosos, nas três imagens superiores temos o modelo molecular idealizado, enquanto nas três imagens inferiores apresentam o modelo de simulação da dinâmica molecular em nível atômico. Ambos os modelos temos em (a) a bicamada intacta, em (b) as moléculas de água começam a penetrar a camada e em (c) os fosfolípidios adjacentes se reorientam para estabilizar o poro.	22
Figura 4 - Modelos de eletrodos para aplicação da eletroporação.	25
Figura 5 – Forma de onda de um único pulso de aplicação da eletroporação, o sobressinal apresentado é causa devida as componentes indutivas e capacitivas presentes na carga. Em A temos o valor máximo em regime permanente.	29
Figura 6 – Esquemático de funcionamento do Eletroporador, onde L representa o tecido que recebe a aplicação, C representa o capacitor e S as chaves comutadoras.	30
Figura 7 - Diagrama de blocos do eletroporador, em azul representa a placa principal e em amarelo a placa de controle e LCD e em verde a placa do banco de capacitores.	31
Figura 8 - Esquemático do bloco de fontes, as áreas pontilhadas em vermelho representam os reguladores, enquanto que as azuis são os filtros capacitivos e em verde os retificadores.	32
Figura 9 - Bloco do painel. Em verde parte referente a placa de botões, em vermelho conexões para a LCD e em azul as conexões com a placa principal.	33
Figura 10 - Sistema das chaves IGBTs (em verde), conexões de alta tensão para os eletrodos (em vermelho).	34
Figura 11 - Driver de conexão com o microcontrolador (em vermelho) e Sistema de filtro Sallen-key de 4ª ordem de alta tensão (em verde).	35

Figura 12 - Esquemático do bloco de controle, suas conexões e as saídas de retorno visual e sonoro.	36
Figura 13 - Circuito de carregamento do banco de capacitores, em vermelho área onde foi necessário implementar fisicamente.	37
Figura 14 - <i>Top e bottom layer</i> da placa principal.	38
Figura 15 - <i>Top e bottom layer</i> da placa de botões.	38
Figura 16 - <i>Bottom layer</i> da placa retificadora do banco de capacitores a esquerda e a direita a placa dos capacitores.	39
Figura 17 - Placas principal e de botões impressas.	40
Figura 18 - Placa de carregamento do banco de capacitores, a esquerda circuito retificador e a direita conexões para os capacitores e a placa principal.	40
Figura 19 - Teste de onda quadrada no terminal de <i>Gate</i> do transistor, o sinal em amarelo representa a entrada do optoacoplador enquanto o sinal em azul a saída.	42
Figura 20 – A esquerda imagem real da ponteira de pipeta com os valores de suas dimensões, ao centro modelo virtual da ponteira de pipeta e a direita o mesmo modelo mostrando o posicionamento dos eletrodos em verde, no modelo todo o interior da ponteira de pipeta é considerado como batata.	44
Figura 21 - Gráfico da equação 4.4.	46
Figura 22 - Malha de elementos tetraédricos.	47
Figura 23 - Teste de tensão máxima de saída.	50
Figura 24 - Distribuição do campo elétrico e do potencial elétrico em duas vistas. A esquerda e no centro embaixo o campo elétrico em forma de múltiplas camadas e a direita e no centro em cima em forma de volume o potencial elétrico. A seta em roxo simboliza o final dos eletrodos.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Dimensões da ponteira de pipeta.....	43
Tabela 2 – Propriedades elétricas para o modelo de batata.	47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
DNA	ácido desoxirribonucleico (Deoxyribonucleic acid)
ECT	Eletroquimioterapia (Electrochemotherapy)
EF	Campos Elétricos (Electric Field)
EP	Eletroporação
ESOPE	Procedimento Operacional Padrão Europeu para Aplicação da Eletroporação (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy)
ETERM	Limiar Que Antecede Lesões Térmicas
GND	Terra (Ground)
i2c	Protocolo De Comunicação Serial
IEB	Instituto de Engenharia Biomédica
IGBT	Transistor Bipolar de Porta Isolada (Insulated-Gate Bipolar Transistor)
IRE	Limiar de Eletroporação Irreversível
LCD	Tela de Cristal Líquido (Liquid Crystal Display)
LED	Diodo Emissor De Luz (Light-Emitting Diode)
MOSFET	Transistor De Efeito De Campo Metal Óxido Semicondutor (Metal-Oxide Semiconductor Field Effect Transistor)
NTIRE	Eletroporação Irreversível Não Térmica (Nonthermal Irreversible Electroporation)
PCB	Placa De Circuito Impresso (Printed Circuit Board)
PIBITI	Programa de Bolsa de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação
PEF	Campo Elétrico Pulsado (Pulsed Electric Fields)
pH	Potencial Hidrogeniônico
RE	Limiar de Eletroporação Reversível
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	OBJETIVOS	17
1.1.1	Objetivo Geral	17
1.1.2	Objetivos Específicos	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1	ELETROPORAÇÃO	19
2.2	ELETROQUIMIOTERAPIA.....	23
2.3	ELETRODOS	24
2.4	MODELAGEM NUMÉRICA	25
2.5	EQUIPAMENTO	27
3	ELETROPORADOR.....	29
3.1	Desenvolvimento Esquemático do Equipamento	30
3.1.1	Fonte.....	31
3.1.2	Painel.....	32
3.1.3	Circuito de chaveamento	33
3.1.4	Circuito de controle.....	36
3.1.5	Circuito do Banco de Capacitores	36
3.2	Desenvolvimento da Placa de Circuito Impresso	37
3.3	Confecção e Montagem	39
3.4	Testes.....	41
4	ANÁLISE COMPUTACIONAL	43
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	49
6	CONCLUSÃO	53
7	REFERÊNCIAS.....	67
	APÊNDICE A – EQUIPAMENTOS COMERCIAIS	73
	APÊNDICE B - PLACA IMPRESA	74
	B1) Placa com os componentes inseridos e em funcionamento.	74

B3) Painel montado na caixa de proteção.....	76
B4) Distribuição das placas no interior da caixa de proteção.....	77

1 INTRODUÇÃO

A otimização de tratamentos para doenças não transmissíveis como o câncer compõe um fator essencial na melhoria da sobrevida e conseqüentemente na expectativa de vida das pessoas. O câncer é a segunda maior causa de mortes no mundo (BRAY *et al.*, 2018), os tratamentos existentes incluem cirurgia de remoção e tratamentos não cirúrgicos como a radiação e a quimioterapia, podendo ser administrados separadamente (NARAYAN, 2021), em conjunto (WASAN *et al.*, 2017) ou ainda como terapia alvo (SAWYERS, 2004).

A eletroporação (EP) é considerada um tratamento baseado no fenômeno biológico de permeabilização da célula, podendo ser aplicada sozinha ou em combinação com a administração de drogas quimioterápicas para o tratamento de tumores cancerosos. O processo da EP consiste na formação de poros na membrana celular como resultado da aplicação de campos elétricos (EF), suficientemente altos e de curta duração (MIR, 2006). Os poros aparecem devido a uma momentânea permeabilização da célula, e facilitam o transporte de moléculas, o qual não seria possível caso a mesma estivesse em um estado de homeostase (KOTNIK; PUCIHAR; MIKLAVČIČ, 2010).

De acordo com a magnitude e duração do EF, a EP pode ser caracterizado como reversível (RE), sendo que após a aplicação os poros voltam a se fechar possibilitando a recuperação celular, ou irreversível (IRE), quando o dano celular causado pelos poros é muito grande, dessa forma impossibilitando que eles se fechem e com isso ocasionando a morte celular. Um outro efeito do fenômeno da EP está relacionado com o efeito Joule e/ou eletrólise, nesses casos ocorre dano térmico e/ou dano em função da mudança no pH (RUBINSKY, 2007).

Além da aplicação médica, a técnica de eletroporação possui aplicações na indústria de alimentos (MORALES-DE LA PEÑA; ELEZ-MARTÍNEZ; MARTÍN-BELLOSO, 2011) e em transferência genética (FUJII *et al.*, 2015). A inativação dos microrganismos por meio da IRE pode ser utilizado na desinfecção bacteriana de resíduos líquidos em hospitais e por consequência reduzindo a liberação de aditivos químicos no meio ambiente (LIU *et al.*, 2013). A técnica que usa a EP para inativação

microbiológica é geralmente referida como campo elétrico pulsado (PEF) e age a partir da desativação enzimática para preservação de longo prazo de alimentos, podendo ser combinado com outros processos tradicionais, como o térmico (HUO et al., 2018; KOTNIK et al., 2015; REBEŘSEK et al., 2015; SAULIS, 2010). Nos últimos anos, essa técnica vem sendo empregada não apenas em alimentos líquidos como sucos, vinhos, cervejas e leite, mas também em alimentos semissólidos e sólidos (TOEPFL, 2011).

A eletroquimioterapia (ECT) consiste em um tratamento para tumores que utilizam a eletroporação reversível, como um catalizador para os efeitos das drogas quimioterápicas nas células (SUZUKI *et al.*, 2018). Outra forma de tratamento de tumores consiste por meio da eletroporação irreversível não térmica (NTIRE), usada em procedimentos clínicos onde é desejada a ablação do neoplasma (GARCIA *et al.*, 2010; GOLBERG; YARMUSH, 2013; NEAL *et al.*, 2012). O procedimento de ECT requer um extenso estudo e planejamento que inclui a estimativa na quantidade de medicamentos quimioterápicos, capaz de cobrir todo o volume do tumor a magnitude mínima do EF, que seja suficiente para induzir a eletroporação do tecido e a configuração de eletrodo adequado para aplicação de maneira a maximizar os resultados (GEHL *et al.*, 2018). Nesse sentido, o procedimento operacional padrão europeu para aplicação da eletroquimioterapia (ESOPE) foi lançado em 2006 (MIR *et al.*, 2006) e atualizado em 2018 (GEHL *et al.*, 2018), com o intuito de estabelecer os parâmetros necessários para o tratamento de nódulos cutâneos e subcutâneos com ECT. Com a necessidade de cobrir toda a área tumoral, novos eletrodos têm sido propostos para melhorar a efetividade dos tratamentos de cânceres com eletroporação (SUZUKI *et al.*, 2021).

Os modelos matemáticos são uma ferramenta poderosa para prever os efeitos químicos e fisiológicos nos tecidos através de simulação computacional. Estes modelos são capazes de prever o volume de tecido coberto pelo EF e a topologia de eletrodo mais adequada para a aplicação. Dessa maneira, emergindo da necessidade de validar os resultados encontrados em modelos matemáticos, existe a alternativa do uso de vegetais, conforme o conceito de 3R, possibilitando o refinamento dos processos, a redução da angústia e a substituição de animais (do inglês, *refinement, reduce and replace*).

Para a aplicação da EP se faz necessária a utilização de um equipamento capaz de aplicar pulsos de tensão na ordem de centenas de volts e corrente de dezenas de amperes, podendo ser configurado para funcionar de acordo com o protocolo ESOPE. Desta forma, o presente estudo focalizou em desenvolver o eletroporador compatível aos ensaios de pesquisas em eletroporação do IEB-UFSC com tensão de saída de até 800V e uma nova topologia de eletrodo a ser empregada nas análises realizadas no Instituto de Engenharia Biomédica da Universidade Federal de Santa Catarina (IEB-UFSC).

A motivação que levou ao desenvolvimento deste estudo e pesquisa veio do período em que realizei iniciação científica com bolsa de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (PIBITI), dentro do grupo de pesquisa em eletroporação no IEB-UFSC, entre os anos de 2018 e 2022. Na época foi identificada a necessidade de um novo equipamento para a realização dos ensaios de eletroporação, objetivando dinamizar os processos e trazer maior segurança em relação a disponibilidade de aparelhos para utilização.

1.1 OBJETIVOS

Foram identificados o objetivo geral e os objetivos específicos do trabalho, apresentados nas subseções seguintes.

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver o eletroporador compatível aos ensaios de pesquisas em eletroporação do IEB-UFSC com tensão de saída de até 800V e uma nova topologia de eletrodo para ser empregada nas análises realizadas no IEB-UFSC.

1.1.2 Objetivos Específicos

Para cumprir com o objetivo geral proposto, os seguintes objetivos específicos devem ser cumpridos:

- 1) Desenhar o circuito elétrico do eletroporador, que contém: fonte de energia, amplificadores, dispositivos de controle e sensores;
- 2) Construir e montar as placa de circuito impresso (PCB) aplicáveis;
- 3) Verificar se as saídas de tensão atendem as especificações;
- 4) Construir um modelo computadorizado de eletrodo compatível para aplicação no interior de uma ponteira de pipeta.

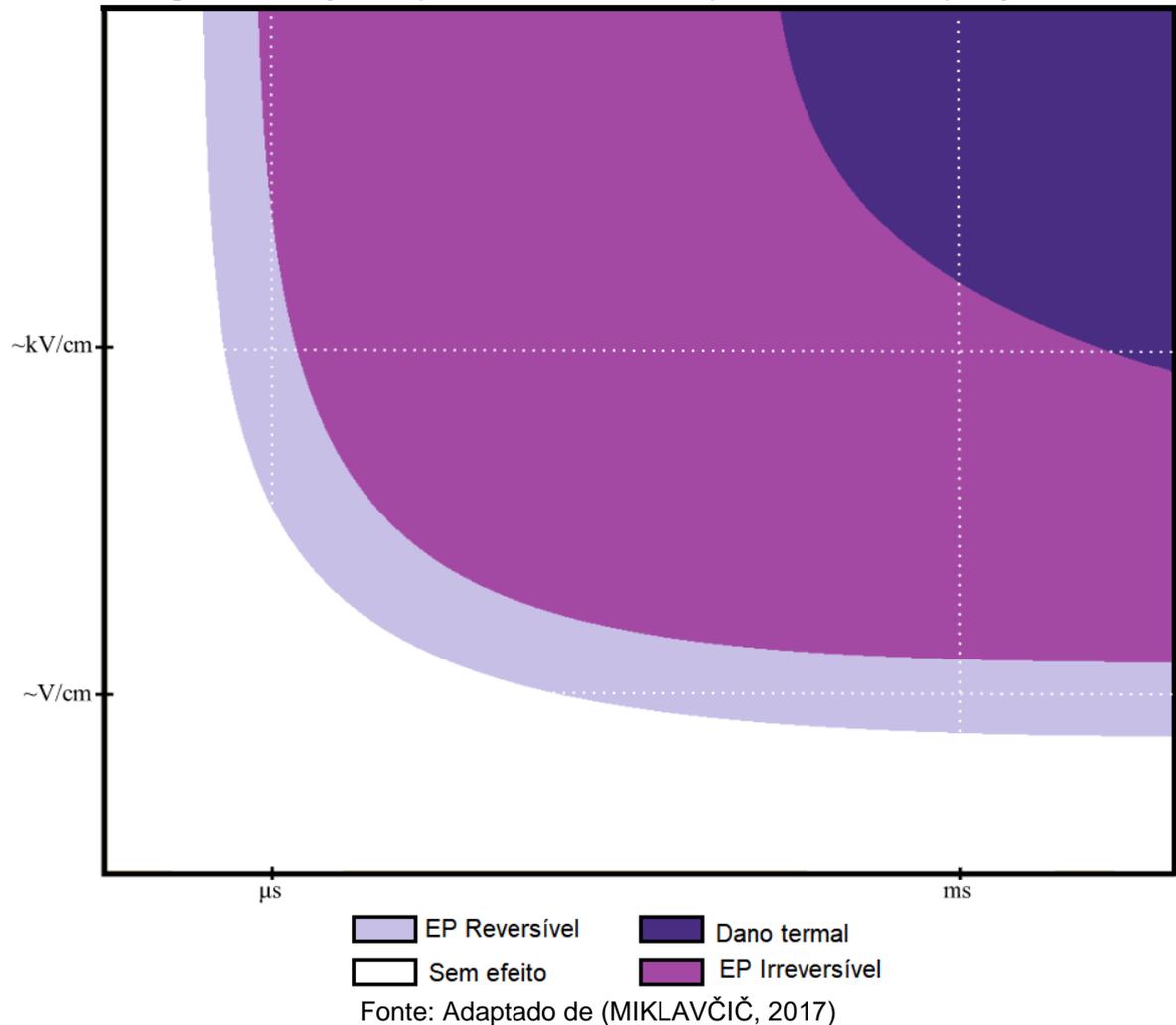
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A partir da indução do potencial transmembrana na célula é que ocorre a EP, usualmente obtida através da aplicação de um campo elétrico pulsado, este por sua vez atingido pela variação da tensão elétrica nos eletrodos. Desta forma, percebe-se a necessidade de compreensão dos fenômenos relacionados a eletricidade e a biologia para o entendimento do processo da eletroporação.

2.1 ELETROPORAÇÃO

A EP consiste em um processo compreendido como o fenômeno no qual ocorre a alteração da permeabilidade celular causada pela aplicação de pulsos de alta tensão e com curta duração, suficientemente grandes para causar o efeito. A técnica pode ser aplicada tanto em células isoladas como em tecidos, no entanto diversos fatores podem interferir nos resultados da aplicação da EP, sendo a intensidade do campo elétrico o principal responsável. A EP é definida em três limiares de intensidade de campo elétrico, onde torna-se possível observar possíveis diferenças nos resultados. O primeiro limiar é definido como o valor mínimo para que ocorra eletroporação reversível (RE), ou seja, o valor mínimo de intensidade de campo elétrico necessário para que comece a ocorrer a EP. O segundo limiar diz respeito a intensidade máxima que a célula é capaz de suportar, sem que a estrutura seja permanentemente danificada, conhecido como eletroporação irreversível (IRE). Por último, é definido o limiar quando há a máxima intensidade de campo elétrico, sem causar lesões térmicas (ETERM) nas células ou tecidos devido ao efeito Joule. É possível prever o efeito da eletroporação em células de acordo com o tempo e a intensidade do campo aplicado, a Figura 1 apresenta essa relação (MIKLAVČIČ, 2017).

Figura 1 - Relação tempo e Intensidade do campo elétrico na eletroporação.



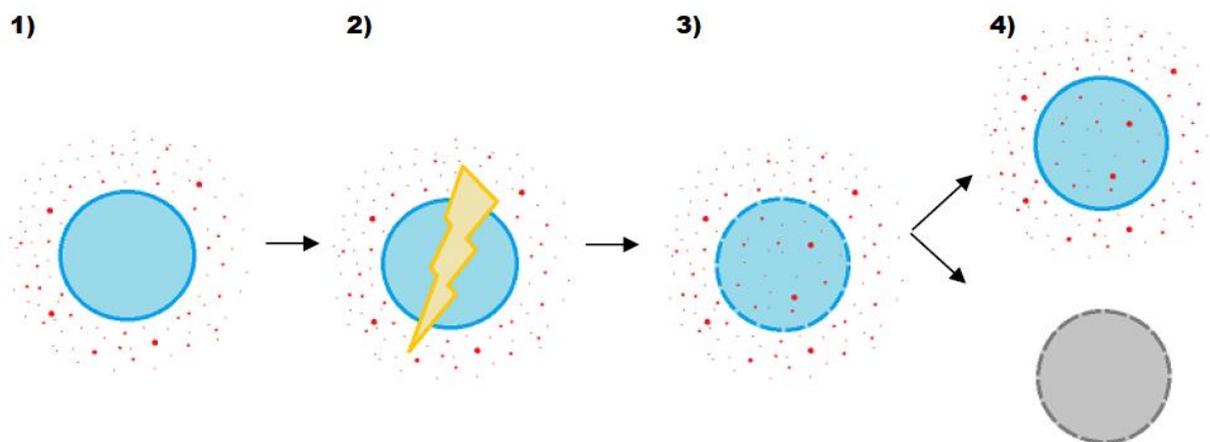
Quando aplicamos um campo elétrico que atinge o limiar reversível, ocorre a eletroporação reversível (RE), nessa situação a célula tem um aumento temporário de sua permeabilidade devido a abertura de poros em sua membrana celular. É importante observar que, ao ser interrompida a aplicação, os poros da célula voltam a se fechar retornando então ao estado inicial de homeostase (IVORRA, 2013). A partir da aplicação da RE torna-se possível inserir substâncias no meio intracelular sem causar diretamente a morte da célula, essa metodologia pode ser aplicada para facilitar a entrada de genes, de drogas, de corantes e das proteínas. Ao se utilizar dessa técnica em combinação com drogas quimioterápicas (ESCOFFRE; ROLS, 2012), pode-se criar um efeito catalisador no processo de introdução de fármacos em células cancerosas, possibilitando assim reduzir as dosagens de medicamentos como o tempo de tratamento.

Ao ultrapassar o segundo limiar, podemos observar os efeitos da eletroporação irreversível (IRE), onde o dano causado à célula devido à abertura de poros é de tal proporção que inviabiliza o seu fechamento, dessa forma impossibilita o controle do transporte transmembrana, que resulta então em perda de homeostase (RUBINSKY; ONIK; MIKUS, 2007; WALTER B. CANNON, 1929) e por fim levando a morte celular.

A partir do terceiro limiar, constata-se os efeitos da eletroporação irreversível somados a danos térmicos. Este tipo de aplicação usualmente não apresenta aplicações práticas, considerando que as vantagens da aplicação da eletroporação estão conectadas ao fato de ser um processo não-térmico e que gera uma lesão controlada no local onde é aplicada.

A EP celular é usualmente representada em quatro passos, conforme a Figura 2. No passo 1, temos a célula no meio celular rodeada por uma substância qualquer. No passo 2, aplicamos um campo suficientemente grande para causar o efeito de abertura de poros. No terceiro passo, com os poros abertos, a substância consegue entrar no meio intracelular. No último passo, após a aplicação a célula pode se encaminhar para dois possíveis resultados, o primeiro onde os poros voltam a se fechar e a célula continua viável e com a substância do meio externo em seu interior ou, a célula é incapaz de fechar os poros causando então a morte celular.

Figura 2 - Demonstração do processo de eletroporação em quatro passos, da esquerda para a direita. A célula e uma substância no meio celular, a aplicação da técnica, a substância adentrando o meio intracelular após a abertura dos poros e por fim as duas possibilidades de resultado da aplicação, a célula continuar viável mesmo com a substância em seu interior ou morte celular.

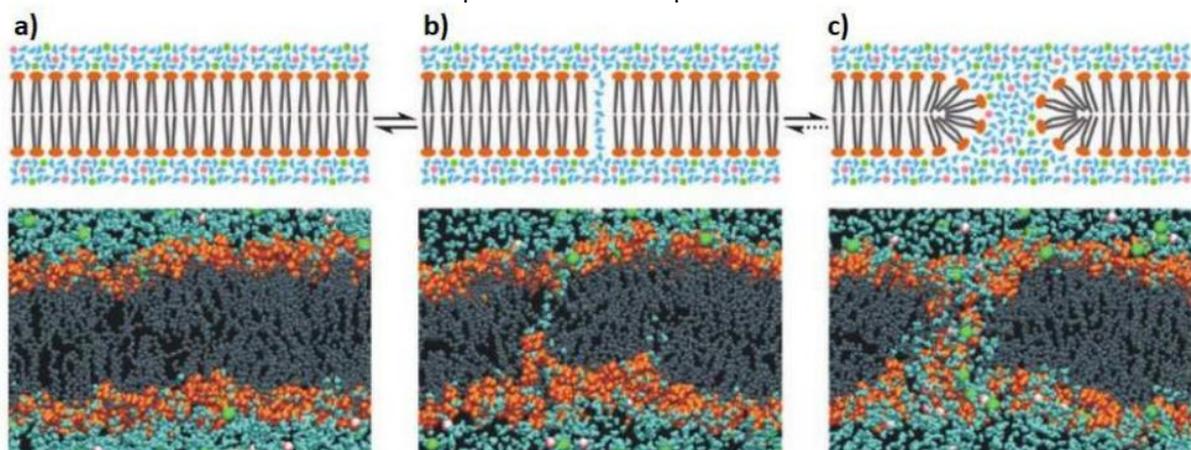


Fonte: Adaptado de (<https://electroporation.ufsc.br/>).

Observa-se que a dinâmica envolvida nos estudos da EP, ainda não é completamente compreendida, a literatura sugere dois modelos principais para explicação do processo, o primeiro através da formação de caminhos aquosos, sendo um processo bioeletroquímico. O segundo, sugere que praticamente toda a membrana celular sofra alterações na sua composição devido ao campo elétrico aplicado. Contudo, há uma concordância de que poros de dimensões nanométricas são criados e que os mesmos podem ser observados (JIANG; DAVALOS; BISCHOF, 2015; LEE *et al.*, 2012)

Considerando o modelo físico mais aceito, a formação de poros se dá pela penetração de colunas de moléculas de água na bicamada fosfolipídica da membrana celular. Com a aplicação de campos elétricos, as moléculas de água por serem polares se orientam de forma a criar um amontoado das mesmas, que perfuram a camada lipídica. Com isso os fosfolipídios adjacentes se reorientam para o interior da membrana, de forma a estabilizar os poros e permitir a transferência de substâncias do meio extracelular para intracelular. A Figura 3 apresenta de forma esquemática o funcionamento deste processo.

Figura 3 - Processo de formação de caminhos aquosos, nas três imagens superiores temos o modelo molecular idealizado, enquanto nas três imagens inferiores apresentam o modelo de simulação da dinâmica molecular em nível atômico. Ambos os modelos temos em (a) a bicamada intacta, em (b) as moléculas de água começam a penetrar a camada e em (c) os fosfolipídios adjacentes se reorientam para estabilizar o poro.



Fonte: (COBO, 2014)

2.2 ELETROQUIMIOTERAPIA

A partir da EP diversas técnicas foram desenvolvidas, dentre elas destaca-se a eletroquimioterapia (ECT), utilizada para o tratamento de tumores. O processo da ECT consiste na combinação da eletroporação reversível com agentes quimioterápicos, objetivando a remoção de tumores. A técnica vem sendo empregada para o tratamento de tumores cutâneos e subcutâneos em clínicas europeias e para o tratamento veterinário no Brasil e Argentina, sendo indicada para o tratamento de melanoma e carcinoma cutâneo e sarcoma subcutâneo (MIR *et al.*, 2006; UK, 2022).

O princípio de funcionamento da ECT parte do fato de ao aumentarmos a permeabilidade celular com a eletroporação reversível podemos inserir medicamentos no meio intracelular, que em condições normais seriam mais difíceis. Em condições ideais de RE foram observados um aumento considerável (na ordem de milhares de vezes) na citotoxicidade da substância quimioterápica aplicada a culturas celulares. Nas aplicações em ratos os resultados obtidos tiveram um acréscimo de até mil vezes (MIR *et al.*, 1991; SERŠA *et al.*, 1998).

A utilização da ECT permite a entrega da droga para a célula de forma mais eficiente, quando comparada a quimioterapia tradicional, sendo suas características de particular interesse para o tratamento de tumores em regiões nas quais a margem cirúrgica não é possível ou prejudica a qualidade de vida do paciente. A margem recomendada de excisão de melanoma cutâneo varia de 10 mm a 50 mm (WHEATLEY *et al.*, 2016) podendo ser inviável para regiões como pescoço, mãos e cabeça. Em função à seletividade presente na ECT as células tumorais são eliminadas, enquanto o tecido saudável é preservado. Além disso, ela aumenta a resposta do sistema imunológico, possui efeitos anti-hemorrágicos e pode ser combinada com procedimentos tradicionais (CALVET; MIR, 2016).

No momento atual a droga mais aplicada em tratamentos com ECT é a bleomicina, devido ao seu modo de atuação na célula e por apresentar um aumento expressivo na toxicidade. Em condições normais, a bleomicina tem um transporte lento pela membrana (PRON *et al.*, 1999), contudo em contato com as células eletroporadas temos uma facilitação nesse processo, devido a abertura dos poros. Uma vez dentro do meio intracelular a Bleomicina torna-se capaz de separar as

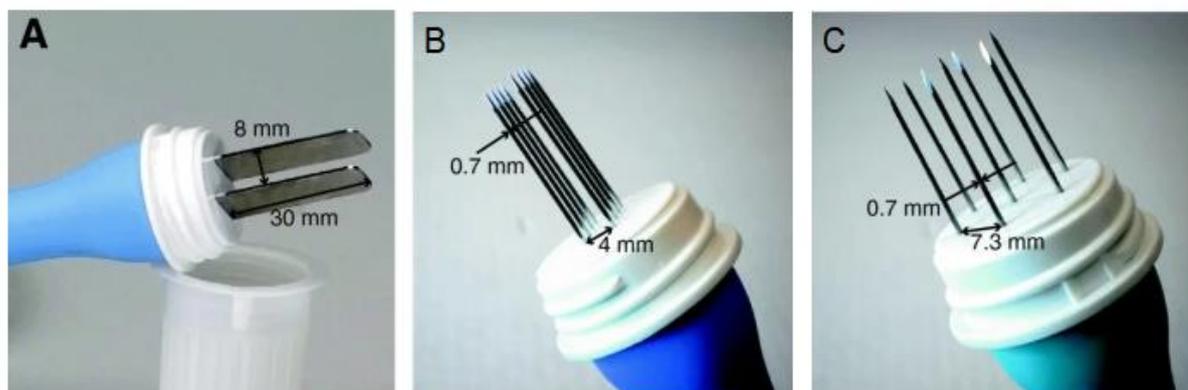
células do DNA. Por esse motivo, em tratamentos de ECT as doses utilizadas são menores que os valores tradicionais, pois as células estão propensas a realizar o transporte da droga para o meio intracelular.

Apesar de promissor o tratamento utilizando ECT, ele traz grandes desafios, sendo necessário garantir que toda a região do tumor seja atingida pelo campo elétrico com intensidade suficiente para que ocorra seus efeitos. Neste âmbito, foi divulgado em 2006 o padrão europeu para aplicação de eletroquimioterapia (ESOPE) (MIR *et al.*, 2006) com os procedimentos a serem adotados desde análise pré-clínica até a aplicação da ECT. Este padrão hoje em dia é amplamente aceito para uso clínico e mostrou uma melhora significativa nos casos estudados.

2.3 ELETRODOS

Para o desenvolvimento da terapia os pulsos elétricos são aplicados na região desejada com auxílio de eletrodos, desta forma é fundamental que a topologia de eletrodo escolhido seja aquela que apresentará os melhores resultados e maior eficiência. O protocolo ESOPE apresenta três principais tipos de eletrodos estudados para as diferentes aplicações. O primeiro modelo de eletrodo aplicado é o de placas paralelas. Este modelo pode ter diferentes espaçamentos entre as placas, sendo considerado ideal para o tratamento de pequenos tumores superficiais e para suspensões de células (MIR *et al.*, 2006). O segundo modelo consiste no eletrodo com uma configuração de agulhas paralelas, recomendado para pequenos nódulos com aplicação apenas de anestesia local. Por último, um eletrodo de agulhas com matriz hexagonal, empregado normalmente em tumores com mais de 10 mm de diâmetro em conjunto com anestesia geral, devido as altas tensões necessárias na aplicação (SERSA *et al.*, 2011). A Figura 4 apresenta os três principais modelos para aplicação da eletroporação. Em aplicações onde o tumor tem dimensões superiores que a área contemplada pelo eletrodo, o tratamento pode ser realizado por meio do reposicionamento do eletrodo para uma nova área, de forma que o campo elétrico atinja todo o volume do tumor.

Figura 4 - Modelos de eletrodos para aplicação da eletroporação.



Fonte: Adaptado de (MIKLAVČIČ *et al.*, 2014)

Novos modelos de eletrodos estão sendo desenvolvidos para aplicações em tumores profundos (EDHEMOVIC *et al.*, 2011; MIKLAVČIČ *et al.*, 2012; PINTARELLI, 2018; SUZUKI *et al.*, 2018), no entanto maiores estudos e testes clínicos são necessários para comprovação da eficácia dessas novas topologias de eletrodos e a segurança do procedimento. Essa tecnologia vem sendo aperfeiçoada para o tratamento de tumores com diâmetro superior a 30 mm, todavia este valor do limite superior do escopo proposto no ESOPE. Em parceria com um grupo de pesquisadores do IEB-UFSC, foi desenvolvido uma nova topologia de eletrodo para aplicação em cavidades e suas vizinhanças, como por exemplo o duto nasal, oral e anal. Esta criação está protegida pela patente número BR 10 2021 019917 2, representa o resultado do grupo que tinha o objetivo de avançar os limites da tecnologia e contribuir com uma solução eficiente no tratamento em áreas, onde os modelos convencionais não têm acesso.

2.4 MODELAGEM NUMÉRICA

É de conhecimento que os estudos da eletroporação possuem relação com a amplitude, a frequência, a forma, o número e a taxa de repetição do pulso (WEAVER *et al.*, 2012). A combinação de diversas possibilidades paramétricas (amplitude, duração e número de pulsos), inseridas pelo usuário do equipamento que realiza a eletroporação, possibilita atingir de maneira reversível ou irreversível os sistemas

celulares de células animais e vegetais, sejam esses preparados em suspensão de células ou tecido, *in vitro*, *in vivo* ou em *ex vivo*.

Além disso, a caracterização das propriedades dielétricas dos tecidos biológicos torna-se dependente de variados fatores como as propriedades geométricas das células, da vascularização, da variação de potencial de hidrogênio (pH) e da concentração de oxigênio (SIENI *et al.*, 2020). Com o desenvolvimento de novos protocolos e eletrodos pode ser interessante o planejamento do tratamento e estudo do comportamento dos tecidos, quando submetidos a campos elétricos de forma a prever as alterações fisiológicas através de simulações numéricas, com o objetivo de aumentar a qualidade e efetividade do tratamento (RAMOS, 2005; ŠEL *et al.*, 2003; ZUPANIC; KOS; MIKLAVCIC, 2012).

Diversos trabalhos modelaram a dinâmica relacionada a condutividade biológica (GOLBERG *et al.*, 2014; IVORRA; MIR; RUBINSKY, 2010; NEAL *et al.*, 2012; ŠEL *et al.*, 2005), por intermédio de softwares que utilizam o método de elementos finitos, nos quais são feitas aproximações numéricas destes modelos permitindo o cálculo das alterações na condutividade no tecido e com isso prevendo a distribuição do campo elétrico (RAMOS, 2005; ŠEL *et al.*, 2003). As equações que foram utilizadas para a descrição do comportamento da condutividade dos tecidos em relação ao campo elétrico nesses modelos foram as funções sigmóides, Gompertz adaptada e Peleg-Fermi (GARCIA; ARENA; DAVALOS, 2012; GOLBERG; RUBINSKY, 2010; IVORRA; MIR; RUBINSKY, 2010; NEAL *et al.*, 2012; PAVŠELJ *et al.*, 2005; SANO *et al.*, 2018; ŠEL *et al.*, 2005). Sendo os modelos atuais amplamente empregados nos trabalhos de ECT (RANGEL *et al.*, 2019; SUZUKI *et al.*, 2017, 2018).

Com objetivo de realizar estudos e planejamentos de tratamentos, considerando a abordagem dos 3Rs para testes em o uso de vegetais emergiu como forma de validar a eficiência dos modelos numéricos de eletroporação (BERKENBROCK *et al.*, 2019; PINTARELLI *et al.*, 2023). A batata (*Solanum tuberosum*) vem empregando um papel essencial devido a facilidade de acesso, ter seus parâmetros elétricos amplamente conhecidos e seus resultados poderem ser estendidos ao encontrados em animais. Além disso, após a aplicação da eletroporação na batata é possível observar o escurecimento do tecido vegetal na

área onde ocorreu a eletroporação, comportamento que não está presente em tecido animal (BERKENBROCK *et al.*, 2019).

Os modelos numéricos para a aplicação da eletroporação decorrem através de experimentações dos tecidos desejados. Dessa forma, aplicando os potenciais elétricos do protocolo da EP de maneira a representar a curva de condutividade a partir dos valores obtidos de corrente elétrica. Nesta etapa busca-se obter os limiares de eletroporação reversível, sendo que este valor varia entre os diferentes tipos de tecidos. Em tecidos animais com tumores esse limiar é de 40 kV/m em pulsos com duração de 100 μ s (ŠEL *et al.*, 2005). Ao alcançarmos este valor é observado então um aumento na corrente elétrica até a saturação, onde todas as células submetidas ao campo foram permeabilizadas. A partir das aplicações de potenciais maiores observa-se um platô na condutividade, considerado como o limiar irreversível. Realiza-se então a inserção desses valores nas equações de análises para então encontrar os resultados do modelo.

Atualmente, os modelos existentes para descrever a distribuição do campo se apresentam do tipo estático, onde a distribuição é resultado da condutividade máxima alcançada. Sendo este o único parâmetro empregado no cálculo da distribuição de campo elétrico no *software*. Desta forma, as análises experimentais decorrentes levam em conta apenas o último pulso para validação dos modelos. Em contrapartida, é possível realizar o cálculo da distribuição do campo dinamicamente considerando a dependência de mais parâmetros, além da condutividade como permissividade e evolução da temperatura, estes modelos são conhecidos como modelos dinâmicos.

2.5 EQUIPAMENTO

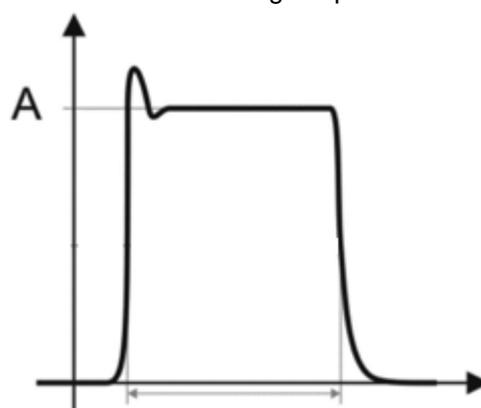
Os protocolos de campos pulsados utilizados na eletroporação são gerados por um equipamento denominado eletroporador. Tal equipamento é capaz de gerar uma forma de onda de alta tensão quadradas com amplitude, duração, número de pulsos e frequência de repetição de acordo com o desejado para a aplicação. A quantidade de energia entregue às células e aos tecidos depende da combinação destes parâmetros, para aplicação biomédica este valor pode chegar a alguns Joules, enquanto para a área agrícola pode alcançar a casa das centenas ou milhares de

Joules (REBERSEK *et al.*, 2014). No mercado há atualmente diversos modelos de equipamentos para aplicação da eletroporação com diferentes configurações e aplicações, no apêndice A há mais informações a respeito desses modelos. O Instituto de Engenharia Biomédica da UFSC (IEB-UFSC) possui um equipamento próprio para aplicação da eletroporação a partir de protocolos pré-definidos e personalizados (PINTARELLI; ANTÔNIO JR.; SUZUKI, 2019). Estes equipamentos já foram utilizados em outros estudos com aplicação tanto em células como em tecidos (BERKENBROCK *et al.*, 2019; BERKENBROCK; MACHADO; SUZUKI, 2018).

3 ELETROPORADOR

Um eletroporador consiste em um equipamento capaz de gerar sinais de onda quadrada, com amplitude na ordem de quilovolts e pulsos com duração entre microssegundos e milissegundos, como pode ser observado na Figura 5. A partir de eletrodos o equipamento é capaz de aplicar campos elétricos em amostras de tecidos biológicos.

Figura 5 – Forma de onda de um único pulso de aplicação da eletroporação, o sobressinal apresentado é causa devida as componentes indutivas e capacitivas presentes na carga. Em A temos o valor máximo em regime permanente.

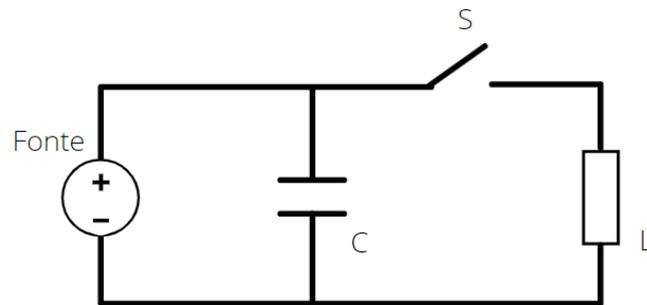


Fonte: Elaborado pelo autor.

Para que o tratamento com EP desenvolva alta eficiência há a necessidade de que o sinal aplicado seja reproduzido com precisão (REBERSEK *et al.*, 2014). Equipamentos com essa característica de saída normalmente utilizam fonte de alimentação comutadora de alta tensão, com transistores de efeito de campo metal oxido (MOSFET, do inglês, *metal oxide semiconductor field effect transistor*) ou ainda transistores bipolares de porta isolada (IGBT, do inglês, *Insulated-gate bipolar transistor*) como chaves de comutação (PUC *et al.*, 2001; TOKMAKÇI, 2006), esses componentes têm a capacidade de alcançar alguns milhares de Volts e vários Amperes (BERTACCHINI *et al.*, 2007).

A amplitude do pulso é determinada pela fonte de alimentação enquanto a duração do pulso, sua frequência e o total de pulsos entregues a carga são definidos pela sequência de comutação aplicados as chaves. A Figura 6 apresenta o esquemático representativo do funcionamento do eletroporador.

Figura 6 – Esquemático de funcionamento do Eletroporador, onde L representa o tecido que recebe a aplicação, C representa o capacitor e S as chaves comutadoras.



Fonte: Elaborado pelo autor.

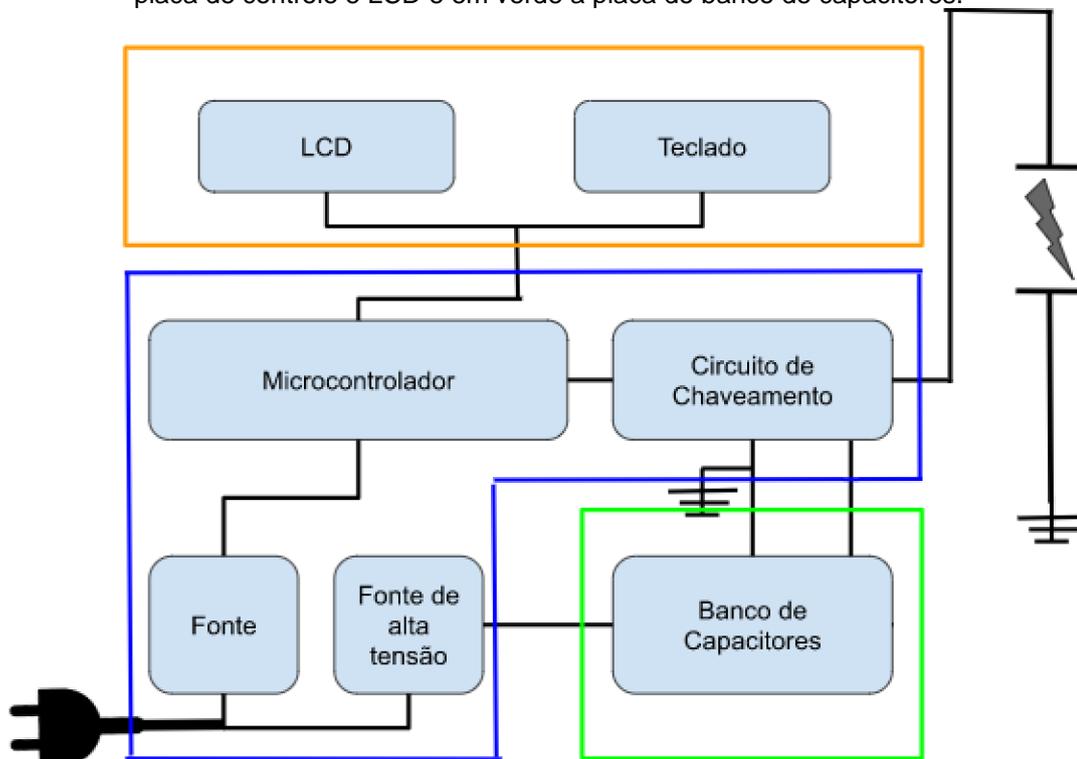
O principal problema relacionado a eletroporação se refere aos pulsos que são de alta tensão e curta duração, desta forma a energia necessária para a aplicação precisa ser gerada e armazenada em um capacitor C antes da aplicação. Por consequência disso, durante a aplicação a tensão decai ΔV_l , como apresentado na equação 3.0 apresentado por (REBERSEK *et al.*, 2014). Devido à queda de tensão, faz-se necessário projetar o capacitor, ocasionando desvantagem por ser mais difícil para alterar a amplitude entre os pulsos.

$$\Delta V_l = \frac{t_p}{C \cdot |L|}, \text{ onde } t_p \text{ é a duração do pulso} \quad (3.0)$$

3.1 DESENVOLVIMENTO ESQUEMÁTICO DO EQUIPAMENTO

Na primeira parte do projeto desenvolveu-se o esquemático do equipamento. Para maior facilidade o projeto foi elaborado de maneira modular, desta forma cada modulo poderia ser testado e validado, antes de realizar a construção em uma placa de circuito impresso (PCB). A Figura 7 apresenta o diagrama de blocos do eletroporador.

Figura 7 - Diagrama de blocos do eletroporador, em azul representa a placa principal e em amarelo a placa de controle e LCD e em verde a placa do banco de capacitores.

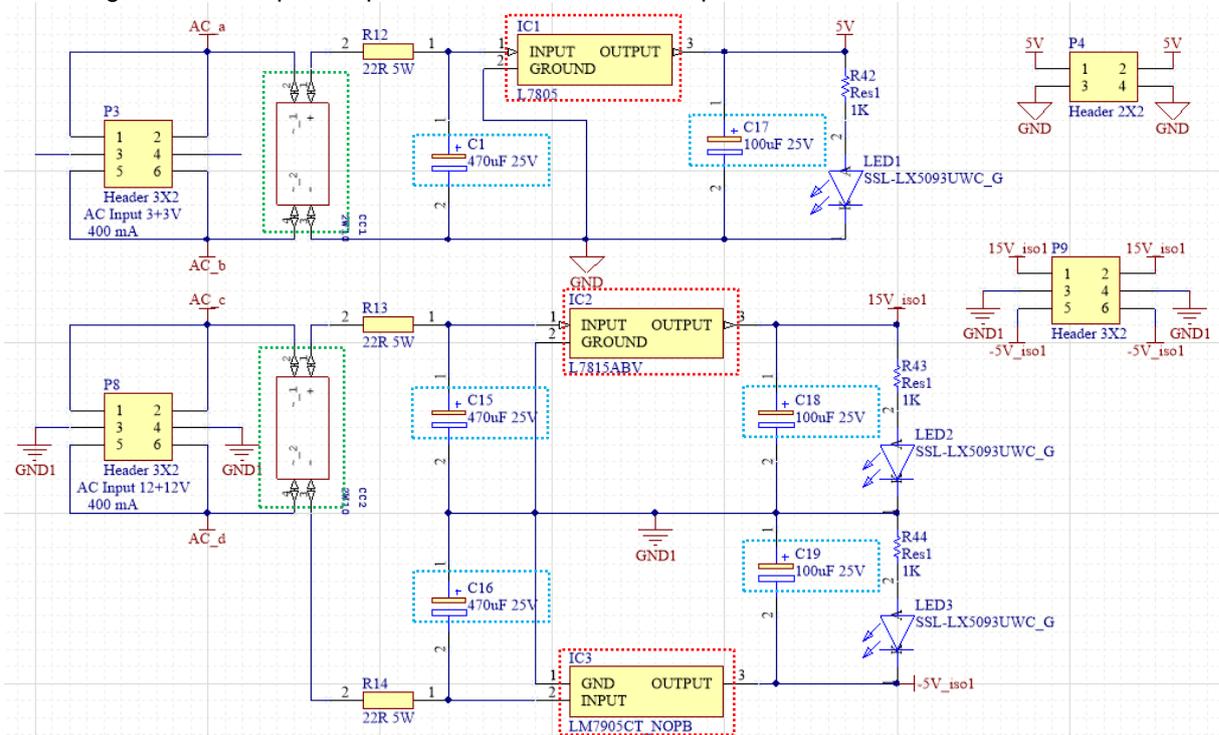


Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.1 Fonte

O bloco de fontes é responsável pelo fornecimento de energia para todos os outros sistemas do aparelho. Esse sistema consiste em três fontes retificadoras de onda completa, sendo elas com tensão de saída de 5 V, 15 V e -5 V respectivamente. Todas elas seguem a mesma topologia formada por transformador, retificador, regulador e filtro capacitivo tanto na entrada como na saída do regulador. Além disso foram incluídos leds nas saídas para ter um retorno visual quando elas estiverem em operação. A Figura 8 apresenta o esquemático do bloco de fontes.

Figura 8 - Esquemático do bloco de fontes, as áreas pontilhadas em vermelho representam os reguladores, enquanto que as azuis são os filtros capacitivos e em verde os retificadores.

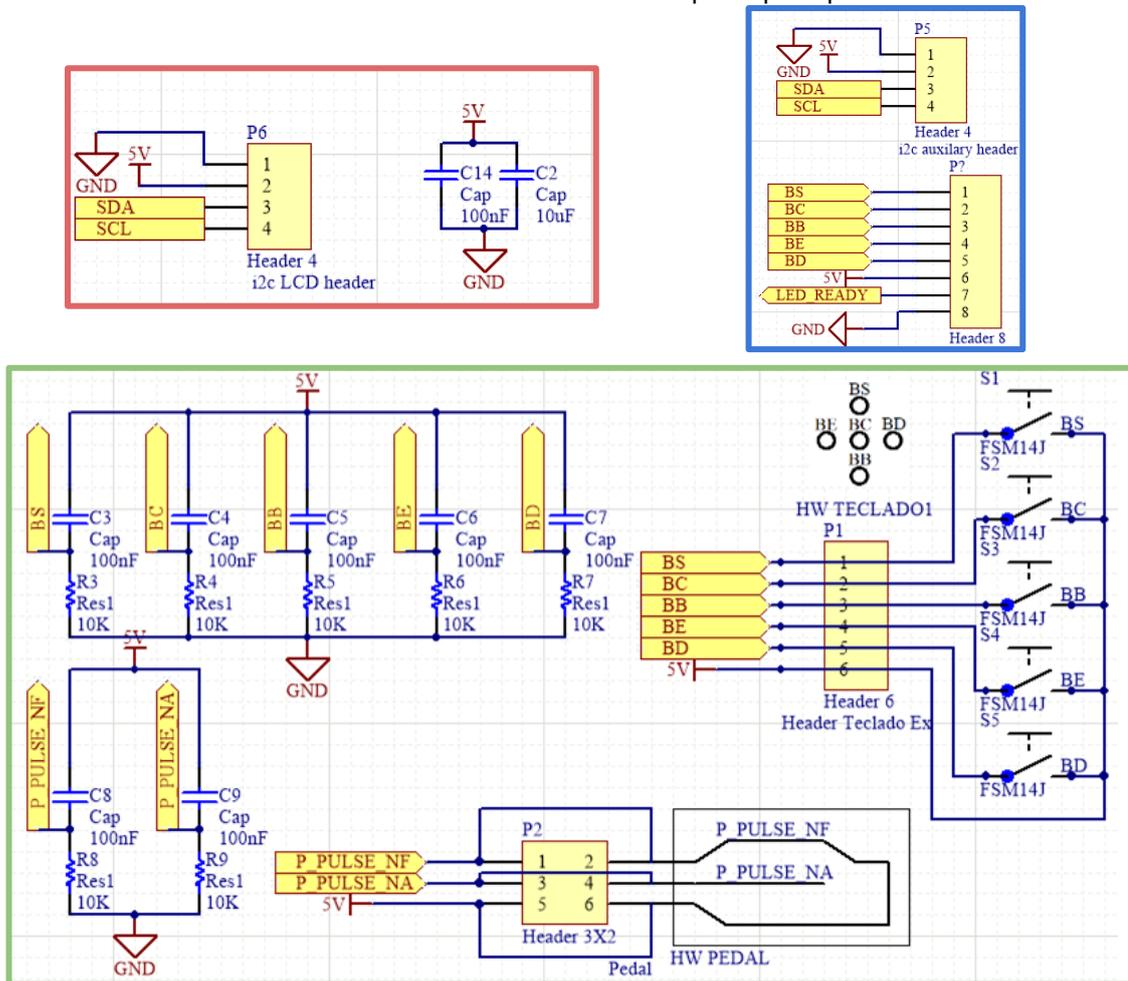


Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.2 Painel

O bloco painel é responsável pela interface homem máquina, permitindo a seleção entre os protocolos pré-definidos no sistema. Como requisito do projeto foi definido que para o LCD seria utilizado um modelo comercial, devido a facilidade de utilização, assim como o custo reduzido. O bloco foi composto pelos botões do tipo *push-button*, que seriam anexados a carcaça do equipamento e do display LCD, que utiliza o protocolo i2c. Desta forma, na placa principal do projeto seria necessário apenas ter as conexões para os botões e LCD, visto que estes estariam anexos fora da placa principal. A Figura 9 apresenta o bloco do painel.

Figura 9 - Bloco do painel. Em verde parte referente a placa de botões, em vermelho conexões para a LCD e em azul as conexões com a placa principal.



Fonte: Elaborado pelo autor.

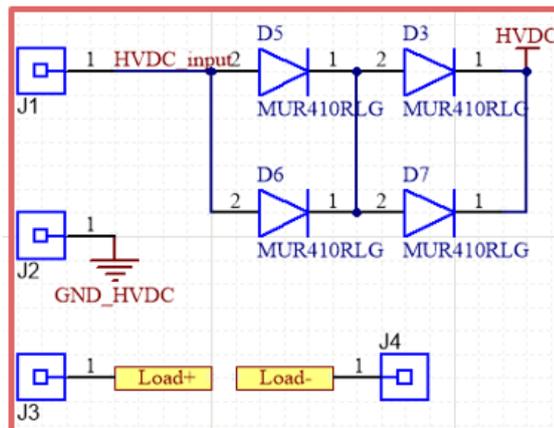
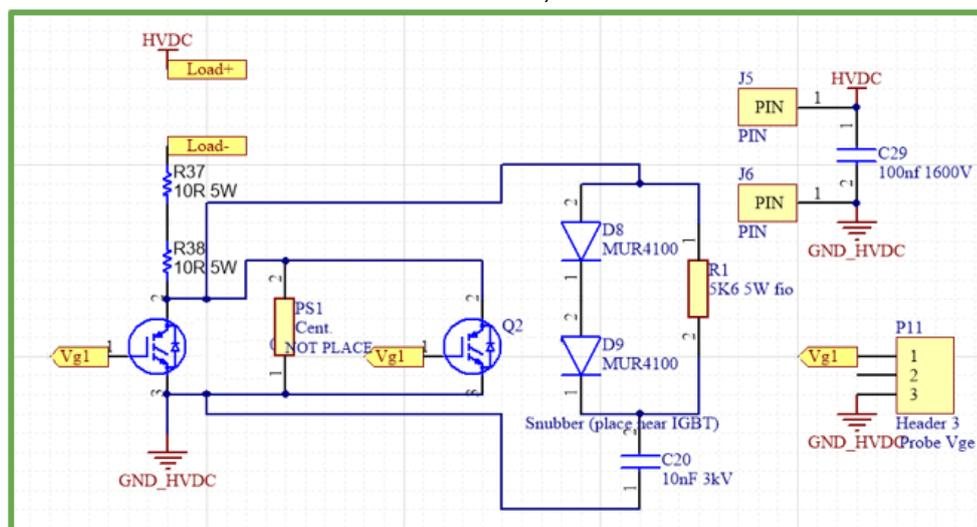
3.1.3 Circuito de chaveamento

Um circuito de chaveamento tal qual um interruptor de luz tem seu funcionamento demarcado por dois estados, ligado e desligado. Desta forma, no bloco de chaveamento temos um circuito responsável por permitir ou não a passagem de corrente para os eletrodos. Devido as características na aplicação da eletroporação optou-se pela utilização de transistores do tipo IGBT, estes modelos são capazes de suportar tensões na ordem de milhares, correntes na ordem das dezenas de amperes e frequências de na ordem de 100 kHz. Além disso, considerando o valor elevado da tensão e consequentemente da corrente de pico presente no início de cada pulso, exemplificada na Figura 5, optou-se por utilizar dois transistores em paralelo de forma

reduzir a possibilidade de queima dos componentes causada por um curto-circuito devido à resistência entre eletrodos ser baixa em certos tecidos.

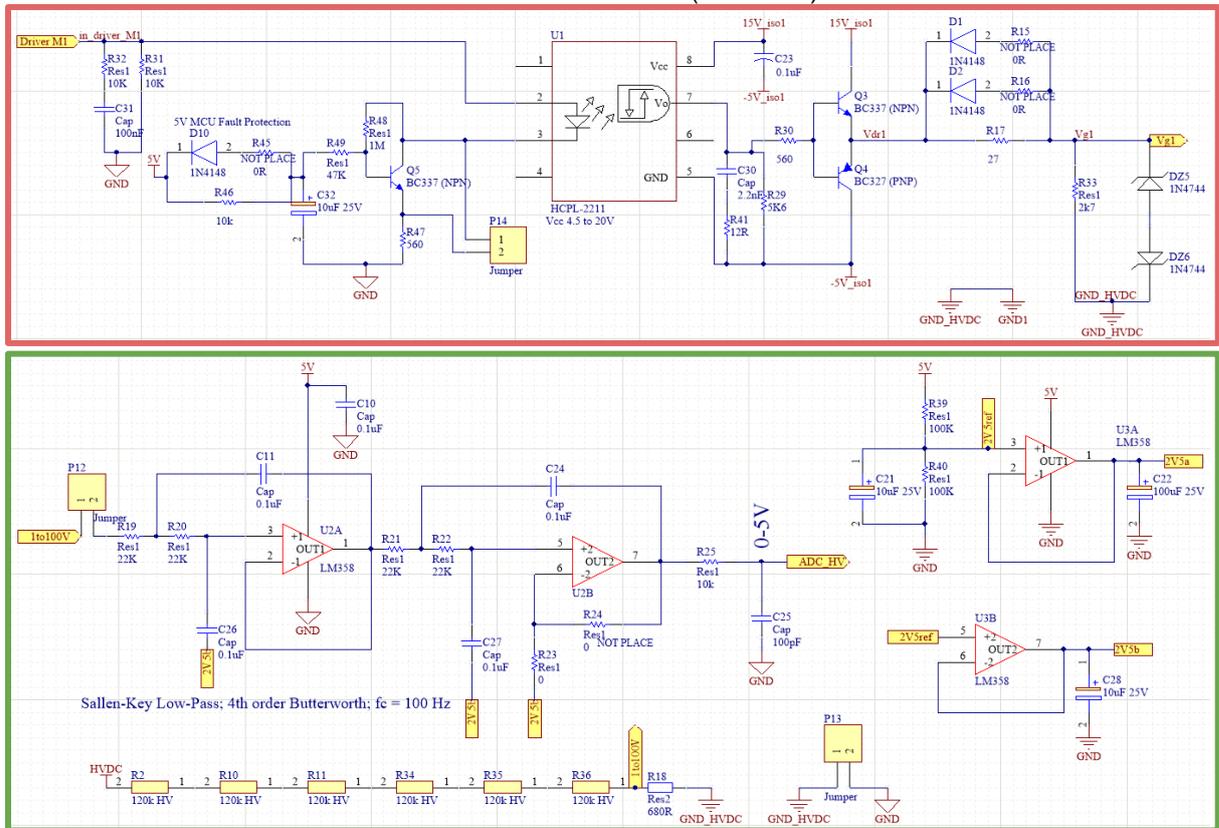
Os transistores do tipo IGBT não podem ser acionados diretamente pelo circuito controle, desta forma junto ao circuito de chaveamento foi introduzido um circuito de *driver* que realiza a interfase entre os sistemas de controle e chaveamento. As Figuras 10 e 11 apresentam o esquemático do circuito de chaveamento, as conexões com os eletrodos e o sistema de *driver*.

Figura 10 - Sistema das chaves IGBTs (em verde), conexões de alta tensão para os eletrodos (em vermelho).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 11 - Driver de conexão com o microcontrolador (em vermelho) e Sistema de filtro Sallen-key de 4ª ordem de alta tensão (em verde).



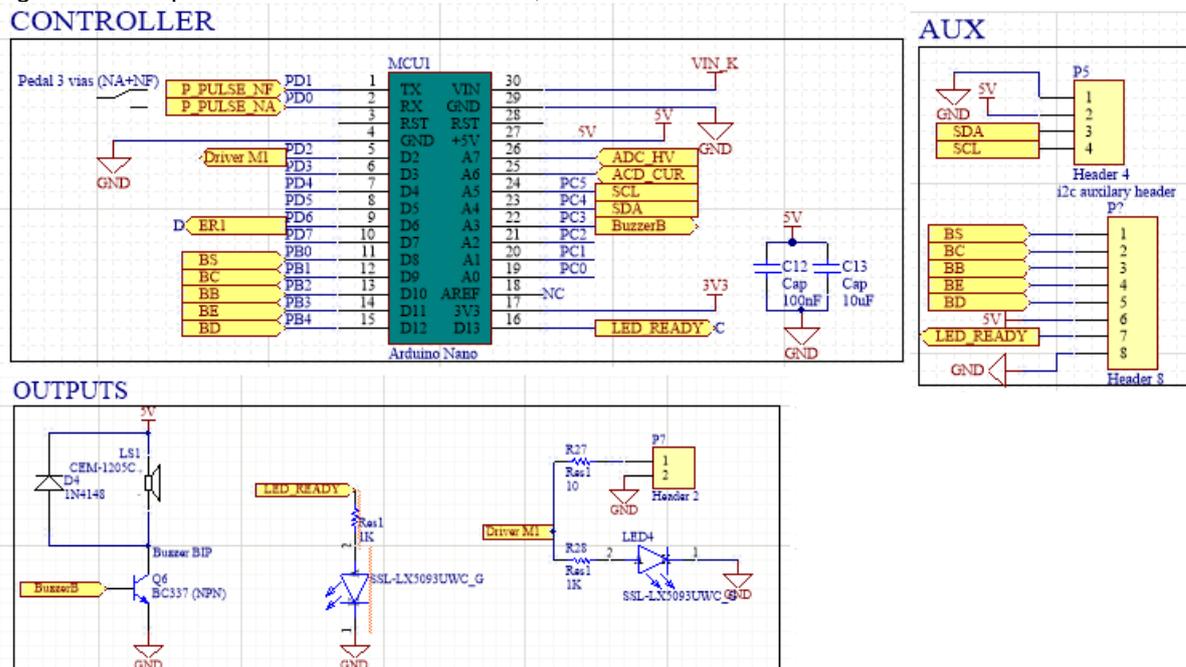
Fonte: Elaborado pelo autor.

É importante observar a maneira que o equipamento foi desenvolvido criou-se duas referências distintas, uma ao lado de alta e outra ao lado de baixa tensão. Desta forma, decidiu-se pela utilização de um optoacoplador no driver que faz a interface entre os circuitos de alta e baixa tensão, com isso os sinais de comunicação enviados pelo sistema de controle não têm contato direto com a área de alta tensão e consequentemente, sem a passagem de corrente. Neste grupo também foi utilizado um sistema para aquisição e apresentação da tensão na tela do dispositivo. Para realizar isto foi usado um filtro analógico do tipo passa baixa na topologia *Butterworth* de quarta ordem, proposto por Pintarelli (PINTARELLI, 2018). O intuito do uso deste filtro se dá para eliminar ruídos de alta frequência (frequência de corte de 100 kHz) e ter uma alteração de fase próxima de zero para frequências até uma década, antes da frequência de corte.

3.1.4 Circuito de controle

O circuito de controle é responsável pelo controle da aplicação dos pulsos de acordo com os protocolos inseridos nele e escolhidos pelo usuário. Pela facilidade de acesso e disponibilidade foi utilizada uma placa Arduino Nano com um ATMEGA 328 (Arduino LLC, 2023). O código utilizado nela foi baseado no proposto por (PINTARELLI, 2018) com pequenas alterações. O código encontra-se no Apêndice B. Além disso, no circuito de controle foram inseridos um sistema sonoro e de leds, com a função de dar um retorno ao usuário durante aplicação. A Figura 12 apresenta o esquemático do bloco do circuito de controle.

Figura 12 - Esquemático do bloco de controle, suas conexões e as saídas de retorno visual e sonoro.



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.1.5 Circuito do Banco de Capacitores

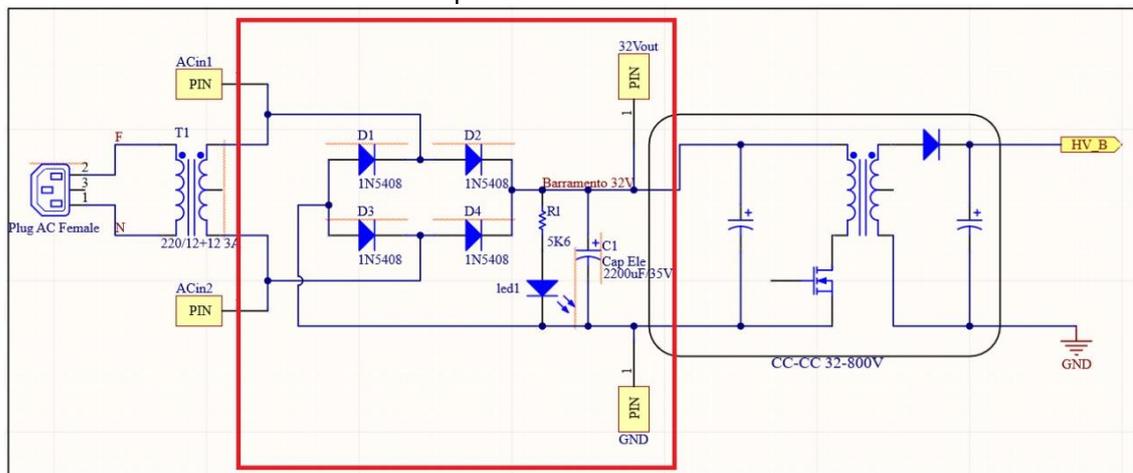
O circuito do banco de capacitores é composto por um circuito retificador, uma fonte de alta tensão comercial do tipo CC-CC 32-800 V e o banco de capacitores com capacidade energética de 75 Joules é composto por dois capacitores de 470 μF em série e estes em paralelo com dois capacitores de 100 nF em série, as equações 3.1 e 3.2 apresentam o cálculo da capacidade energética considerando a tensão de 800

V. Esse circuito é responsável por realizar a carga dos capacitores para aplicação e foi desenvolvido externamente a placa principal. A Figura 13 apresenta este circuito.

$$E = \frac{1}{2} \cdot C_{eq} \cdot V^2 = 75 J \quad (3.1)$$

$$C_{eq} = \frac{470\mu F + 100nF}{2} \cong 235 \mu F \quad (3.2)$$

Figura 13 - Circuito de carregamento do banco de capacitores, em vermelho área onde foi necessário implementar fisicamente.



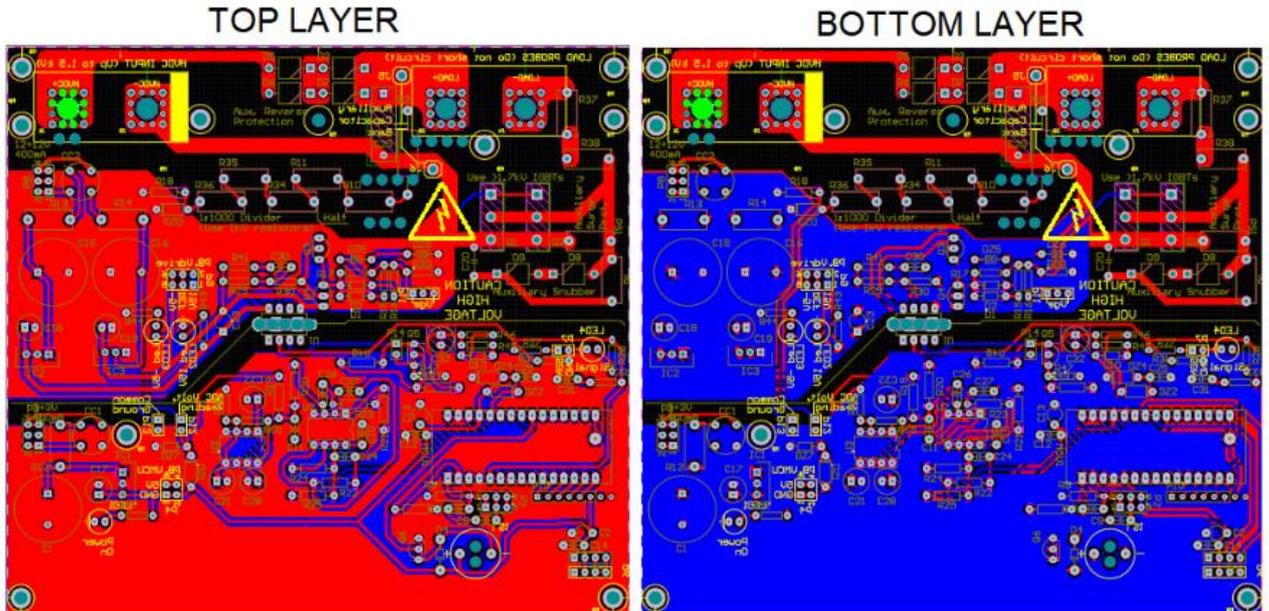
Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2 DESENVOLVIMENTO DA PLACA DE CIRCUITO IMPRESSO

A partir dos esquemáticos desenvolvidos realizou-se então o desenvolvimento do modelo em placa de circuito impresso (PCB). Devido à complexidade do projeto optou-se pela utilização de uma placa do tipo dupla-face, com isso reduzindo a necessidade de utilização de *jumpers*. Além disso, para maior segurança do projeto da placa foi dividida duas áreas, uma de alta e outra de baixa tensão, essas áreas estão conectadas apenas pelo optoacoplador e em função disso elas estão eletricamente isoladas. Na Figura 14 temos a placa PCB desenvolvida neste projeto, nela é possível observar a utilização da área inutilizada de cobre como referências (GNDs), devido a separação entre as áreas de alta e baixa tensão temos então dois GNDs. Por fim, foi desenvolvido também a PCB para os botões no painel de controle.

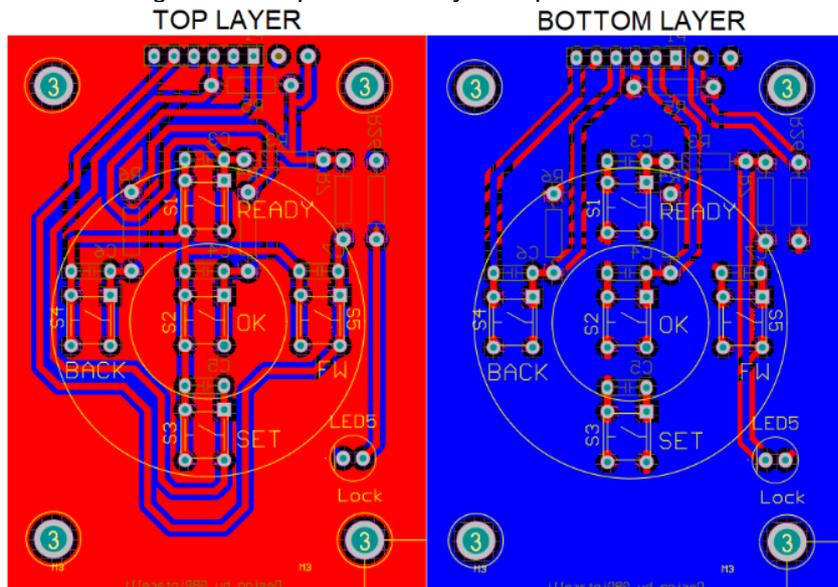
Em seguida foi desenvolvido o modelo digital da PCB dos controles a serem anexados à carcaça do equipamento, a Figura 15 apresenta este modelo.

Figura 14 - Top e bottom layer da placa principal.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 - Top e bottom layer da placa de botões.

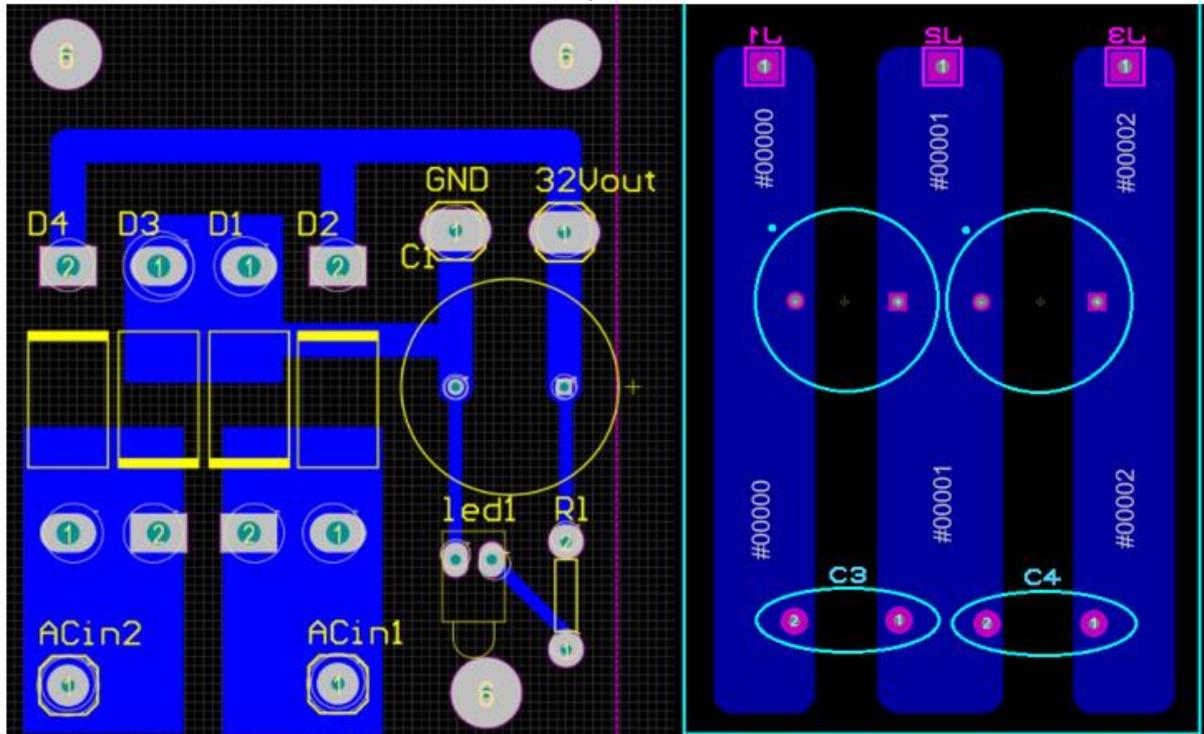


Fonte: Elaborado pelo autor.

Por fim, a placa de carregamento do capacitor necessitou apenas do PCB do retificador de onda completa e do banco de capacitores, visto que a fonte utilizada foi um modelo comercial. Devido a restrições físicas impostas pelo modelo de carcaça

utilizado foi necessário separar em duas placas, uma com o circuito retificador e outra apenas com o banco de capacitores, como apresentado na Figura 16.

Figura 16 - *Bottom layer* da placa retificadora do banco de capacitores a esquerda e a direita a placa dos capacitores.

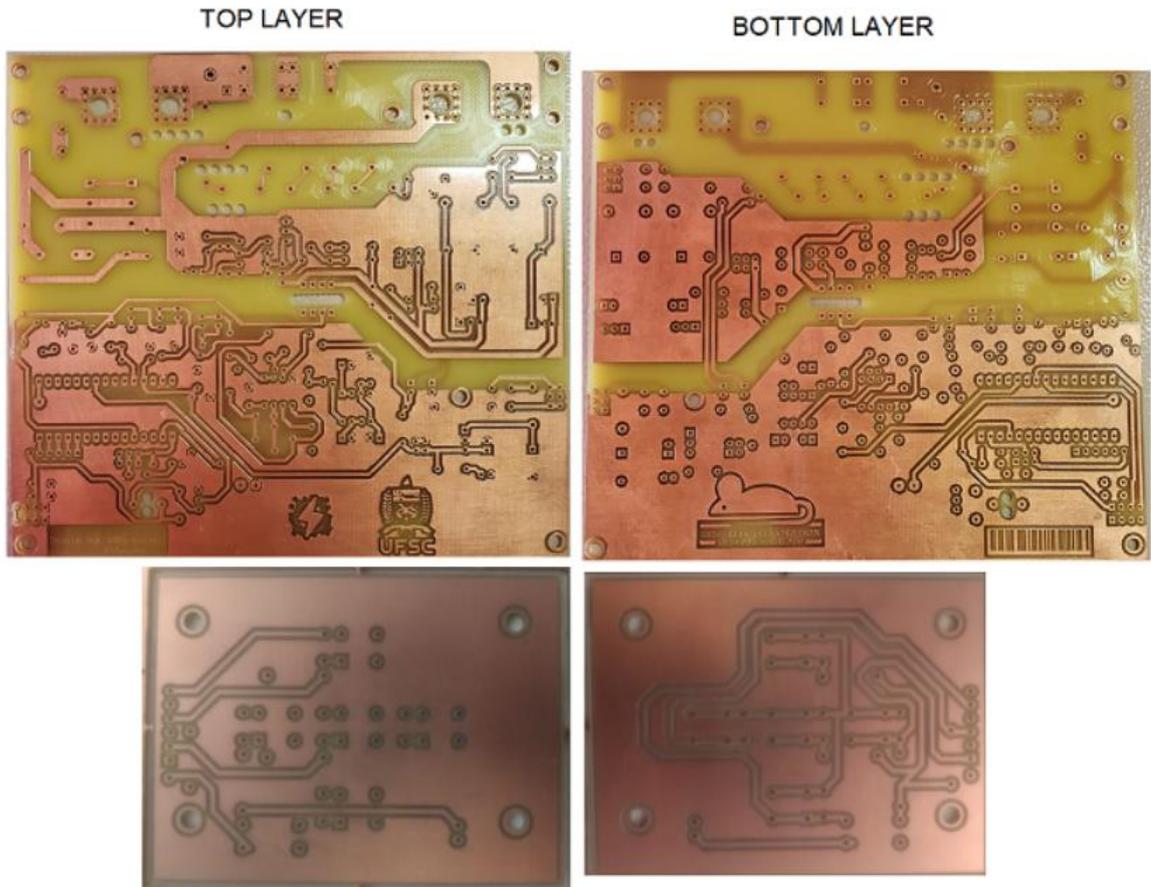


Fonte: Elaborado pelo autor.

3.3 CONFECÇÃO E MONTAGEM

A partir do modelo digital da PCB o próximo passo no desenvolvimento deste projeto foi a confecção da placa em si. O modelo foi impresso com o auxílio de uma máquina “*Prototipadora de PCI PCB-Proto 2*” da marca *TTP Industria Mecânica*. A Figura 17 apresenta o modelo já impresso. Na sequência foi realizada a montagem com os componentes seguindo o modelo modular, de forma que permitisse testar cada módulo e verificar se está de acordo com o desejado.

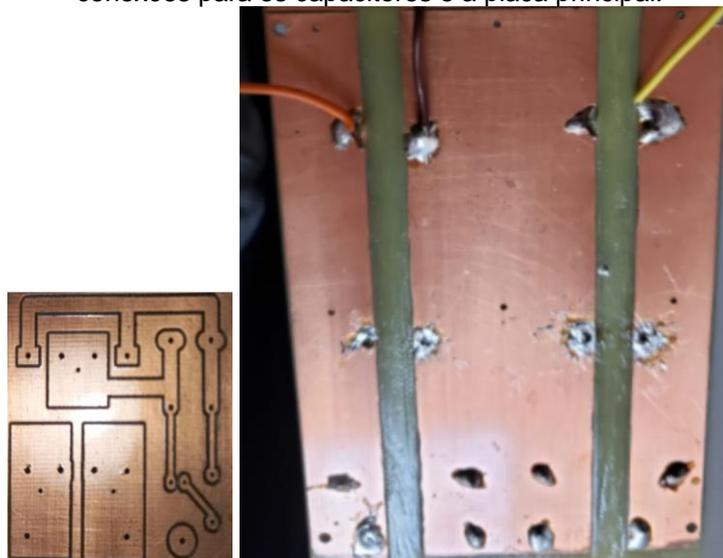
Figura 17 - Placas principal e de botões impressas.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para a placa de carregamento dos capacitores temos dois PCBs apresentados na Figura 18.

Figura 18 - Placa de carregamento do banco de capacitores, a esquerda circuito retificador e a direita conexões para os capacitores e a placa principal.

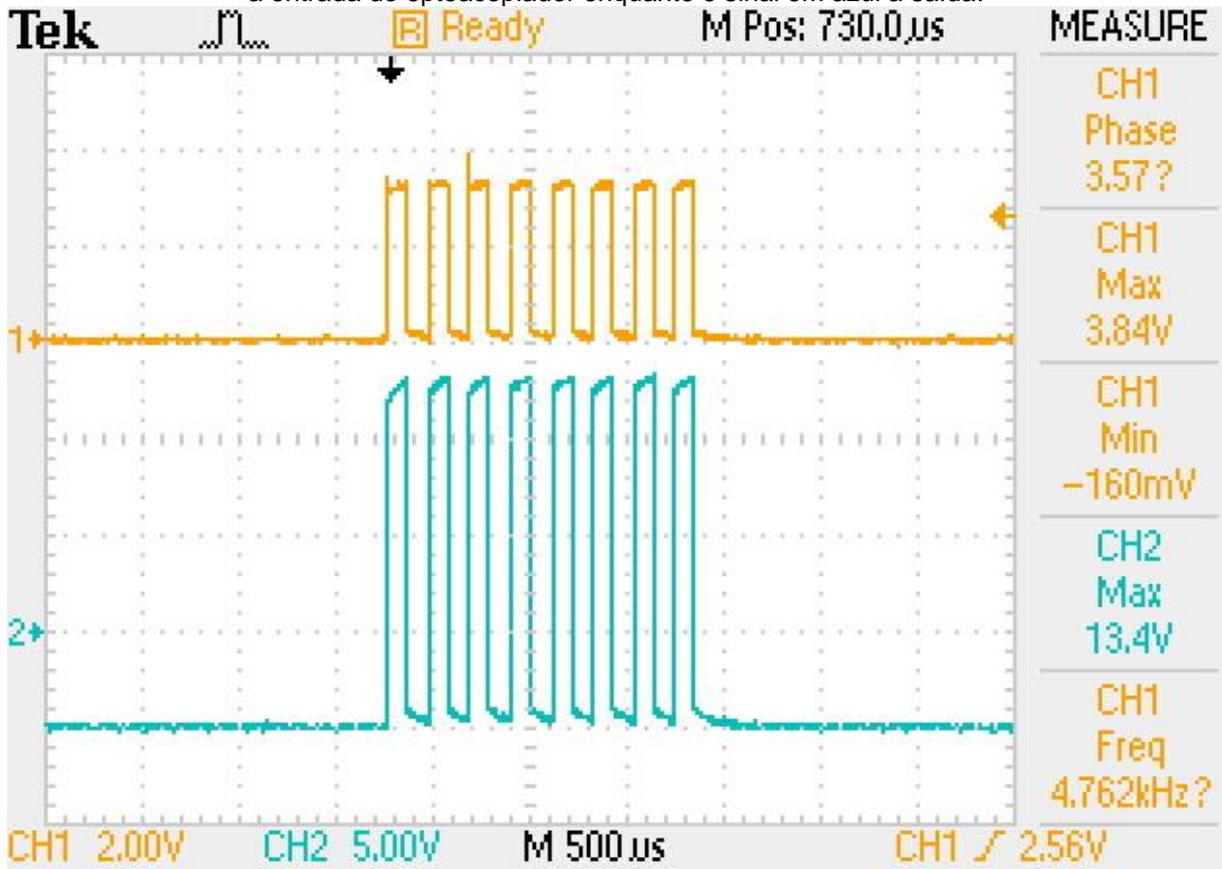


Fonte: Elaborado pelo autor.

3.4 TESTES

Os testes realizados durante a etapa de construção e montagem do projeto são apresentados a seguir. Nesta etapa foram realizados testes de funcionalidade nos módulos e por fim na placa como um todo. Para a circuito de fontes foi realizada a conexão com a rede de energia e verificado se na saída dos reguladores eram encontradas as tensões de -5 V, +5 V e 15 V, além disso, verificou-se também se os LEDs de sinalização ligavam de forma a demonstrar que o circuito estava energizado. No circuito de chaveamento realizou-se testes no driver, para tal aplicou-se uma onda quadrada qualquer no pino 2 do opto acoplador, em seguida verificou-se se esta mesma onda era visível, tanto no pino 7 do optoacoplador como também no terminal de Gate do transistor com amplitude de -5 V e +15 V, como é apresentado na Figura 19. Os testes para o circuito de controle e painel foram executados em conjunto, conectou-se o microcontrolador, o LCD e os botões, em seguida os circuito foi alimentado com a finalidade de verificar as informações apresentadas na tela do LCD e se os botões executavam as funções estipuladas.

Figura 19 - Teste de onda quadrada no terminal de *Gate* do transistor, o sinal em amarelo representa a entrada do optoacoplador enquanto o sinal em azul a saída.



Fonte: Elaborado pelo autor.

4 ANÁLISE COMPUTACIONAL

O presente equipamento objetivou ser utilizado pelo IEB em pesquisas relacionadas à temática da eletroporação. Desta forma, para avaliar a eficiência do equipamento para a pretendida área decidiu-se por realizar a aplicação do protocolo em um novo modelo de eletrodo, inserido dentro de uma ponteira de pipeta de 200 ul.

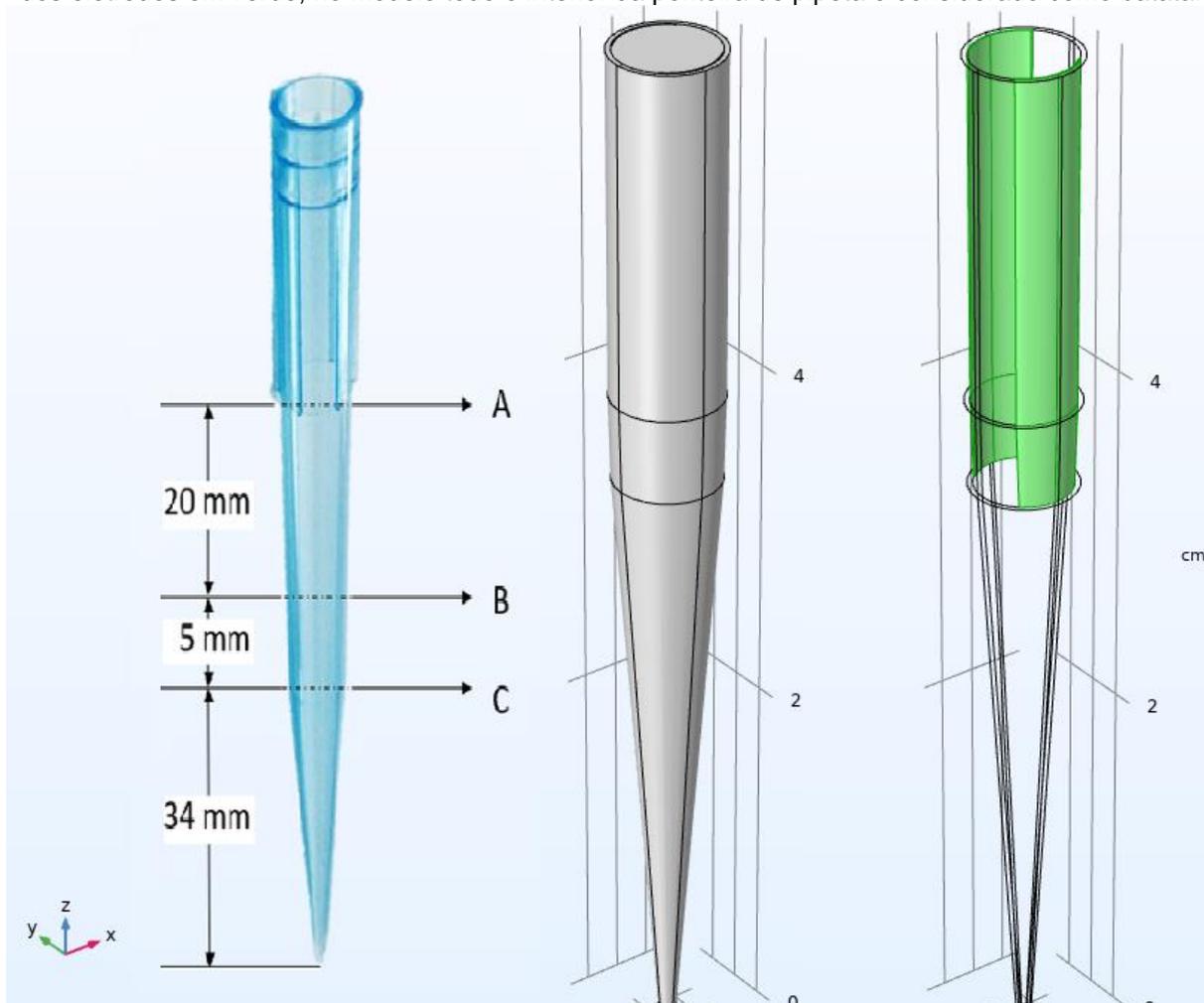
A escolha de desenvolver este novo modelo de eletrodo se deu pelo fato de que, nas aplicações em células dispersas em meio aquoso há a necessidade de utilizar a pipeta para transferir o material de seu recipiente para o local de aplicação (PINTARELLI, 2018). Desta forma, com este novo modelo seria possível realizar a eletroporação diretamente da pipeta, sem a necessidade de transferir para o terceiro ambiente de aplicação. Contudo, não foram encontrados na literatura estudos sobre as características elétricas dessas dispersões, visto que ao variar a concentração de leveduras haverá uma variação de suas propriedades elétricas, como as descritas na tabela 2, desta forma, como este não é o objetivo principal deste trabalho definiu-se que para validar o funcionamento do eletrodo, a batata (*Solanum tuberosum*) seria utilizada. As características do modelo de eletrodo a ser desenvolvido são apresentadas na Figura 20 e na Tabela 1. As medidas utilizadas no modelo foram obtidas a partir da média de 5 medidas obtidas com o uso de um paquímetro (Vonder Ltda, Brasil) e com incerteza de 0,025 mm das medidas. É relevante destacar que, para se obter proporções mais precisas, a medida de diâmetro foi realizada em três pontos distintos, demarcados na Figura 20 pelas letras A, B e C. Além disso, também é apresentado à disposição dos eletrodos dentro da ponteira de pipeta.

Tabela 1 – Dimensões da ponteira de pipeta.

Local	Medida de Diâmetro (mm)	Medida de Comprimento (mm)
	Média	Média
A	6.35	34
B	6.25	5
C	5.99	20

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20 – A esquerda imagem real da ponteira de pipeta com os valores de suas dimensões, ao centro modelo virtual da ponteira de pipeta e a direita o mesmo modelo mostrando o posicionamento dos eletrodos em verde, no modelo todo o interior da ponteira de pipeta é considerado como batata.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir das características físicas da ponteira de pipeta foi então desenvolvido o modelo para simulações dentro do software *Comsol Multiphysics*® versão licenciada pelo IEB-UFSC 5.1 (Comsol Inc, Suécia), executado em um servidor cluster (Intel Xeon Gold 6126 @2.60 GHz, 20 cores, 300 RAM) de sistemas operacional Ubuntu Linux (x64, Canonical Ltd. Reino Unido). O software utiliza análise de elementos finitos e através destes modelos é possível prever a área que irá ser eletroporada, a Figura 20 mostra o modelo da ponteira de pipeta dentro do *software*.

A distribuição do campo elétrico em sistemas biológicos pode ser descrita por meio da equação de Laplace na condição estacionária, como é apresentado pela equação 4.1.

$$-\nabla \cdot (\sigma \cdot \nabla V) = 0 \quad (4.1)$$

Onde a condutividade elétrica no tecido é 0, sendo este dependente do campo elétrico (S/m) e o potencial elétrico aplicado V (V). O gradiente de potencial elétrico ∇ por sua vez é representado pela distribuição do campo elétrico E descrito na equação 4.2. Na superfície de contato entre o eletrodo, o tecido é utilizado para modelagem a condição de Dirichlet e para separar o segmento condutor do entorno, sendo então aplicada a condição de contorno de Neumann ($J_n = 0$, onde J_n é a densidade de corrente elétrica normal (A/m²) nos limites externos do modelo) (COROVIC *et al.*, 2013).

$$E = -\nabla V \quad (4.2)$$

A função sigmoide, que foi utilizada por Ivorra, é apresentada pela equação 4.3 onde descreve as mudanças de condutividade do tecido da batata quando exposta a campos elétricos (IVORRA; MIR; RUBINSKY, 2010), em que σ indica a condutividade elétrica no tecido vegetal (S/m) e E o campo elétrico.

$$\sigma(E) = 0,03 + 0,35 \cdot e^{-e^{-0,01(|E|-250)}} \quad (4.3)$$

Na EP existe uma dependência da condutividade na propagação dos campos. Em testes práticos já foram observados um aumento da corrente elétrica durante a aplicação de um protocolo de eletroporação (REDDY, 2006), sendo assim, Miklavcic *et al.* (ŠEL *et al.*, 2005) propuseram um modelo sigmoide de dependência descrito pelas equação 4.4, 4.5 e 4.6. A figura 21 apresenta o gráfico da equação 4.4.

$$\sigma(E) = \sigma_0 + \frac{\sigma_{max} - \sigma_0}{1 + D \cdot e^{-\left(\frac{E-A}{B}\right)}} \quad (4.4)$$

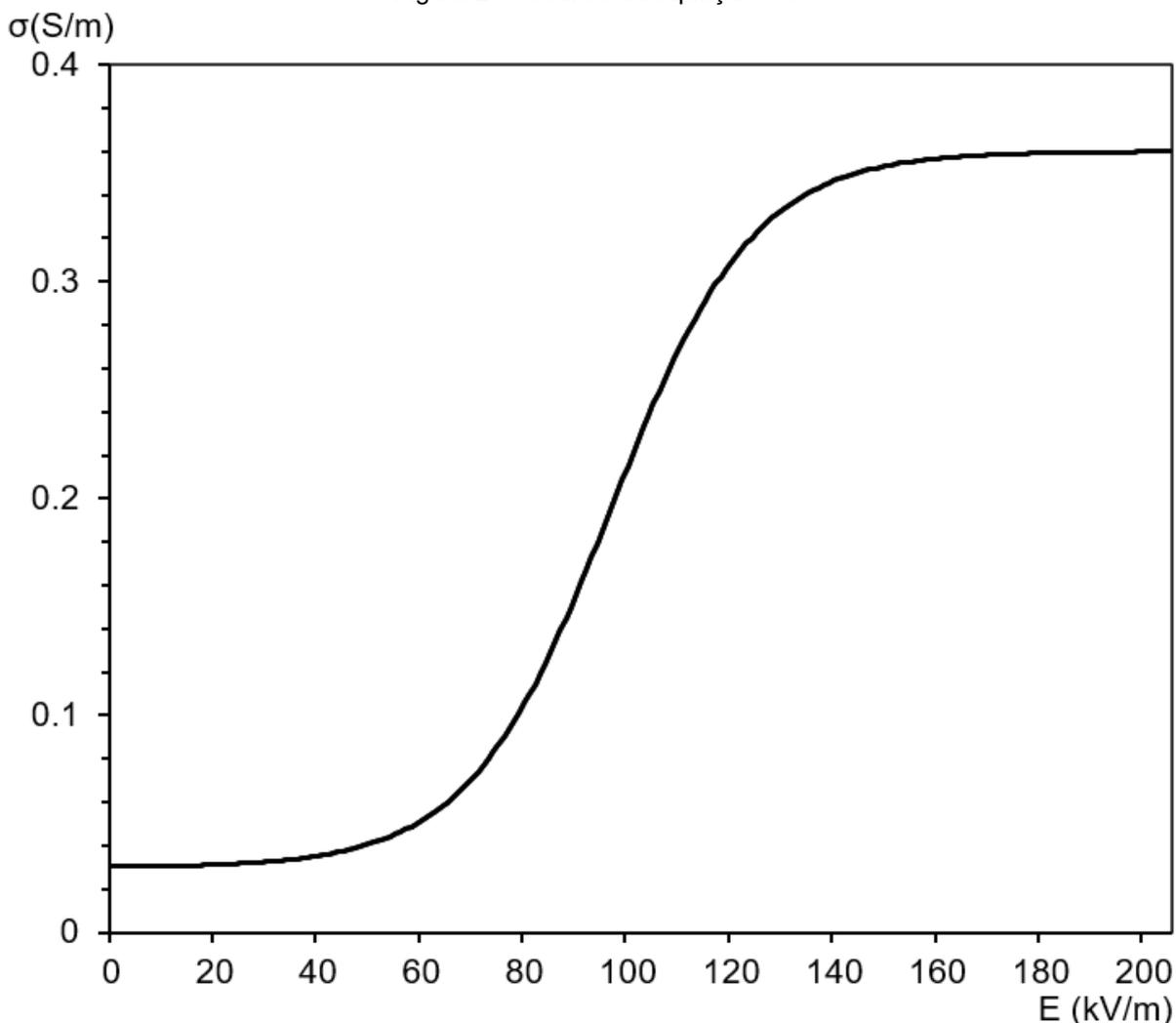
$$A = \frac{E_{ire} + E_{re}}{2} \quad (4.5)$$

$$B = \frac{E_{ire} - E_{re}}{C} \quad (4.6)$$

Onde os parâmetros σ_0 e σ_{max} são as condutividades inicial e máxima do tecido, enquanto os parâmetros C e D são ajustes na função sigmoide propostas por

Miklavcic (ŠEL *et al.*, 2005), já RE e IRE são os limiares para a ocorrência da eletroporação reversível e irreversível respectivamente, a figura 21 apresenta o gráfico da equação 4.4.

Figura 21 - Gráfico da equação 4.4



Fonte: Elaborado pelo autor.

A partir do modelo geométrico foram definidos os materiais utilizados e suas propriedades elétricas, o software utilizado tem em sua base de dados uma vasta variedade de materiais com suas propriedades físicas já estabelecidas. Contudo, neste projeto foram utilizados plásticos, do tipo polipropileno, cobre e a batata, sendo necessário apenas introduzir as propriedades da mesma, pois estas não apresentam valores dentro da base de dados do Comsol.

As propriedades elétricas da batata seguem o que foi estabelecido pela equação descrita por (SUÁREZ *et al.*, 2014), onde há uma dependência que varia de acordo

com a intensidade do campo aplicada, visto que células eletroporadas possuem uma condutividade superior em relação as que não foram, a Tabela 2 apresenta os valores utilizados.

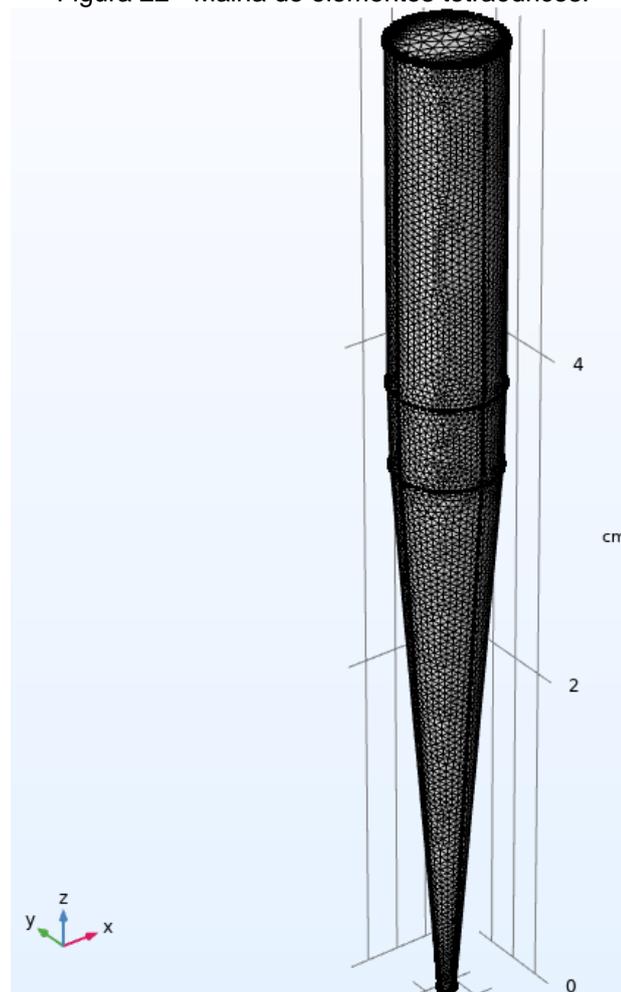
Tabela 2 – propriedades elétricas para o modelo de batata.

σ_0 (S/m)	σ_{max} (S / m)	E_{re} (V / m)	E_{ire} (V / m)
0,03	0,36	10000	120000

Fonte: adaptado de (SUÁREZ *et al.*, 2014)

Com o modelo desenvolvido optou-se por deixar o software controlar a distribuição da malha de acordo com o tipo de estudo empregado nele, no caso, elétrico e estacionário, além disso, para uma melhor resolução nos resultados utilizou-se uma malha do tipo “*finer*”, desta forma o número total de elementos tetraédricos foi de 198127, como é apresentado pela Figura 21.

Figura 22 - Malha de elementos tetraédricos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

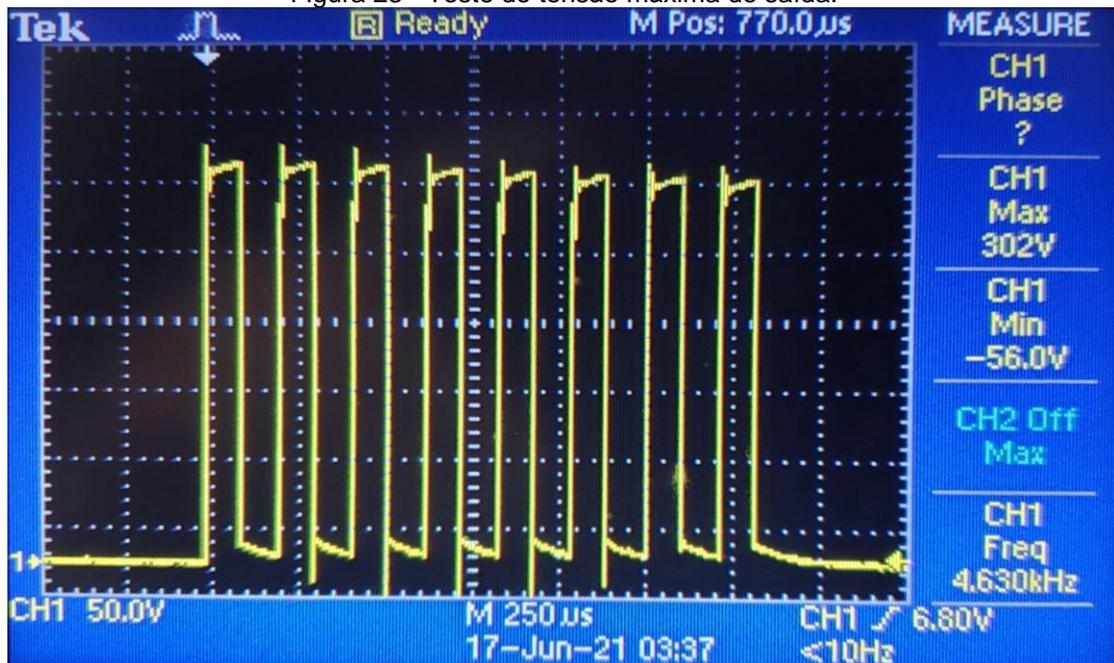
Por fim, com a malha construída bastou apenas selecionar o tipo de física utilizada, no caso, foi escolhida a física do tipo corrente elétrica e definiu-se a diferença de potencial entre os dois eletrodos, apresentados na figura 20 como sendo 450V.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Desde os primeiros testes clínicos em 1991 (MIR, 1991), a ECT tem apresentado resultados com alta efetividade, especialmente na área veterinária (P. SPUGNINI *et al.*, 2015). Em câncer de pele do tipo melanoma o tratamento apresentou-se mais vantajoso do que o procedimento cirúrgico excepcional, uma vez que o processo de cicatrização se mostrou mais rápido e com menos efeitos colaterais (KAEHLER; EGBERTS; HAUSCHILD, 2010). Esse processo é uma intervenção especialmente interessante para lesões na cabeça, no pescoço e áreas problemáticas, uma vez que preserva mais os tecidos. Além disso, a ECT pode ser utilizada com aplicação de anestesia local, sendo mais tranquilo para o paciente e mais vantajoso para aqueles com múltiplas comorbidades, em comparação com o uso da anestesia geral (ALEINIK *et al.*, 2015).

No terceiro capítulo, com a placa completamente montada, realizou-se teste com uma carga resistiva composta por um resistor de 25 ohms, 50 W e 5% de tolerância, com a carga conectada foi avaliado se o equipamento entregava a forma de onda desejada na carga e a tensão máxima alcançada. A Figura 22 apresenta os resultados alcançados com este teste. Sendo importante observar que devido às limitações presentes no equipamento e em sua ponteira que não suporta tensões superiores a 300 V, foi necessário que o resultado fosse captado a partir do resistor em série com a carga presente na placa com valor de 10 ohm. Desta forma, para extrapolar este resultado para a carga de teste é necessário multiplicar sua amplitude por 2,5 devido à lei de ohm e às propriedades de circuitos elétricos em série, onde $V_{carga} = R_{carga} \cdot \frac{V_{R1}}{R1} \rightarrow V_{carga} = 25 \cdot \frac{302}{10} = 755V$. No Apêndice C consta uma figura da placa montada e em funcionamento dentro da caixa respectivamente.

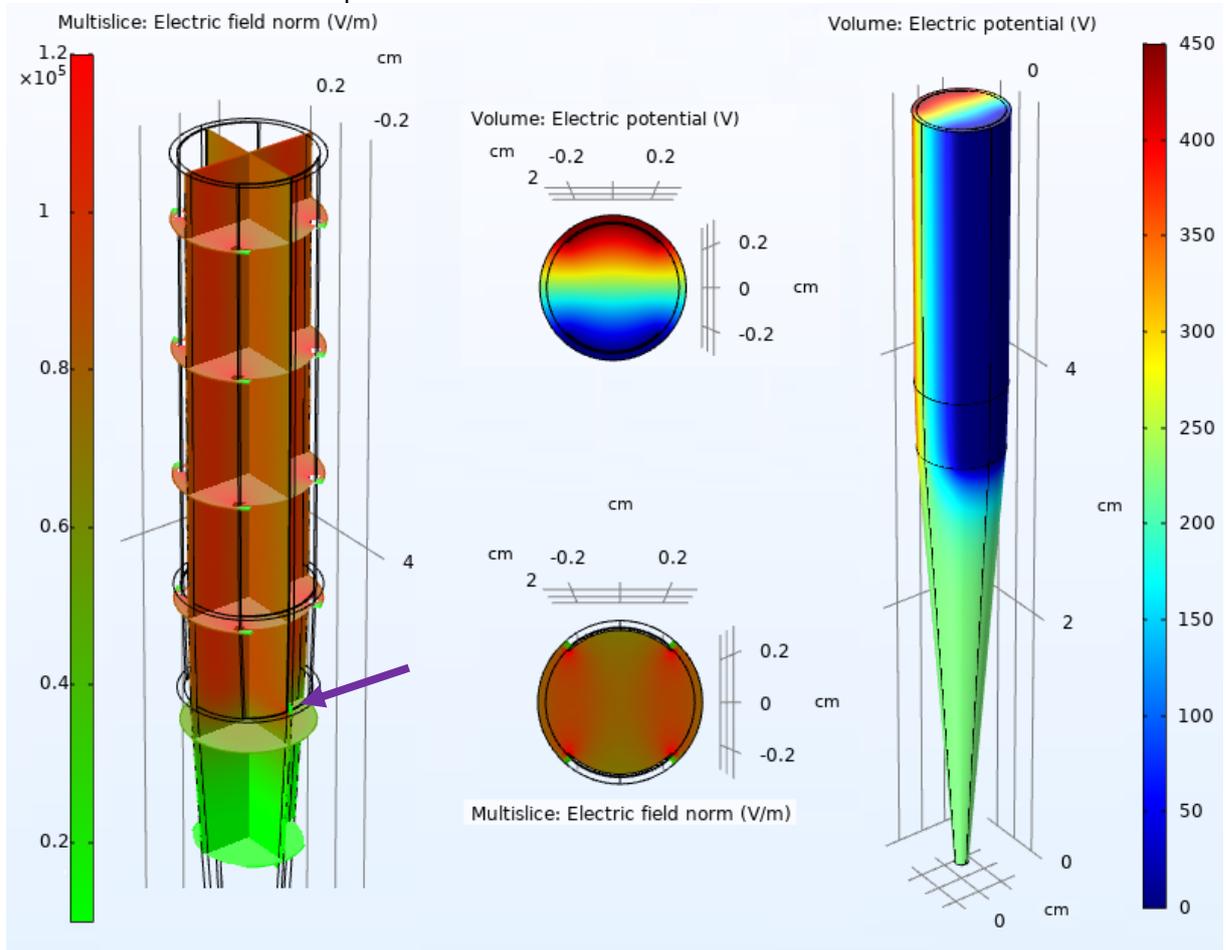
Figura 23 - Teste de tensão máxima de saída.



Fonte: Elaborado pelo autor.

No quarto capítulo tendo o modelo completamente desenvolvido no Comsol é possível então realizar a simulação e avaliar o volume que atingiu a intensidade mínima de campo elétrico para ocorrer a eletroporação, neste caso, 100 V/cm. A Figura 24 apresenta o resultado de distribuição do campo elétrico e do potencial elétrico.

Figura 24 - Distribuição do campo elétrico e do potencial elétrico em duas vistas. A esquerda e no centro embaixo o campo elétrico em forma de múltiplas camadas e a direita e no centro em cima em forma de volume o potencial elétrico. A seta em roxo simboliza o final dos eletrodos.



Fonte: Elaborado pelo autor.

É possível observar que toda a batata na área entre os eletrodos atingiu o nível mínimo para efeito da eletroporação. Além disso, a área abaixo da seta roxa que é uma região abaixo dos eletrodos também foi eletroporada. Quanto ao potencial elétrico, é possível notar ainda na imagem as áreas mais próximas aos eletrodos de 450 V em vermelho e 0 V em azul escuro.

Com o objetivo de oferecer uma solução flexível e versátil para a aplicação de técnicas de eletroporação em células e tecidos, foi desenvolvido um gerador de ondas quadradas programável, compatível com diferentes protocolos de eletroporação. O protótipo permite a configuração de protocolos para a aplicação de técnicas de eletroporação reversíveis e irreversíveis em células individuais, pequenas populações celulares e tecidos. Além disso, o equipamento possui uma saída variável em tensão, com capacidade de atingir até 755 V nos testes realizados, este valor corresponde a

cerca de 95% do valor proposto inicialmente e proporciona um amplo espectro de aplicações em diversos tipos de amostras. Combinado com diferentes tipos de eletrodos, o equipamento oferece maior flexibilidade para as aplicações de eletroporação, possibilitando a realização de experimentos em diferentes amostras e condições experimentais.

Além disso os testes *in silico* com o eletrodo dentro de uma ponteira pipeta mostraram a possibilidade de bons resultados e praticidade na aplicação de eletroporação em colônias de células.

6 CONCLUSÃO

Com base nos objetivos propostos neste trabalho foi possível explorar os aspectos relacionados ao desenvolvimento de um aparelho eletrônico. Para estudo de desenvolvimento do aparelho eletroporador e da nova topologia de eletrodo foi necessário o entendimento não apenas dos conhecimentos adquiridos durante o curso de Engenharia Elétrica, mas também os conhecimentos referentes a área biológica específica à aplicação da eletroporação. Essa característica de interdisciplinaridade presente dentro da área de Engenharia Biomédica proporciona uma formação mais ampla e necessária nesta época, onde há cada vez mais são desenvolvidos aparelhos eletrônicos para fins hospitalares.

Dessa forma, este trabalho de conclusão de curso mostrou-se fundamental para aprimoramento dos conhecimentos nesta etapa final de formação em Engenharia Elétrica e será uma base para formações acadêmicas futuras.

Com o intuito de avançar nos estudos nessa área, sugere-se como estudos futuros os seguintes tópicos:

- Estudo para verificar a eficiência *in vitro* do eletrodo proposto neste trabalho;
- Proposta de nova versão do equipamento eletroporador com maior potência.

7 REFERÊNCIAS

- ALEINIK, A. N. *et al.* Electroporation Application as an Alternative to Radiation Therapy. **Advanced Materials Research**, [S. l.], v. 1084, p. 381–383, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/amr.1084.381>
- BERKENBROCK, J. A. *et al.* Verification of Electroporation Models Using the Potato Tuber as In Vitro Simulation. **Journal of Medical and Biological Engineering**, [S. l.], v. 39, n. 2, p. 224–229, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40846-018-0408-8>
- BERKENBROCK, J. A.; MACHADO, R. G.; SUZUKI, D. O. H. Electrochemotherapy Effectiveness Loss due to Electric Field Indentation between Needle Electrodes: A Numerical Study. **Journal of Healthcare Engineering**, [S. l.], v. 2018, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/6024635>
- BERTACCHINI, C. *et al.* Design of an irreversible electroporation system for clinical use. **Technology in Cancer Research and Treatment**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 313–320, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/153303460700600408>
- BERTACCHINI, C. Cliniporator: Medical Electroporation of Tumors. In: Miklavcic, D. (eds) Handbook of Electroporation. **Springer**, [S. l.], 2017.
- BIOTECH. **ELECTROcell B10 HV-LV**. [S. l.: s. n.]
- BRAY, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [S. l.], v. 68, n. 6, p. 394–424, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3322/caac.21492>
- CALVET, C. Y.; MIR, L. M. The promising alliance of anti-cancer electrochemotherapy with immunotherapy. **Cancer and Metastasis Reviews**, [S. l.], v. 35, n. 2, p. 165–177, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10555-016-9615-3>
- COBO, B. 3D Assessment of Irreversible Electroporation Treatments in Vegetal Models Treball de Fi de Grau. [S. l.], 2014.
- COROVIC, S. *et al.* Modeling of electric field distribution in tissues during electroporation. **BioMedical Engineering Online**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 1–27, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1475-925X-12-16>
- EDHEMOVIC, I. *et al.* Electrochemotherapy: A new technological approach in treatment of metastases in the liver. **Technology in Cancer Research and Treatment**, [S. l.], v. 10, n. 5, p. 475–485, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.7785/tcrt.2012.500224>
- ESCOFFRE, J.-M.; ROLS, M.-P. Electrochemotherapy: Progress and Prospects. **Current Pharmaceutical Design**, [S. l.], v. 18, n. 23, p. 3406–3415, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/138161212801227087>
- FUJII, M. *et al.* Efficient genetic engineering of human intestinal organoids using electroporation. **Nature Protocols**, [S. l.], v. 10, n. 10, p. 1474–1485, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.088>
- GARCIA, P. A. *et al.* Intracranial nonthermal irreversible electroporation: In vivo analysis. **Journal of Membrane Biology**, [S. l.], v. 236, n. 1, p. 127–136, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00232-010-9284-z>
- GARCIA, P. A.; ARENA, C. B.; DAVALOS, R. V. Towards a predictive model of electroporation-based therapies using pre-pulse electrical measurements. **Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in**

Medicine and Biology Society, EMBS, [S. l.], p. 2575–2578, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1109/EMBC.2012.6346490>

GEHL, J. *et al.* Updated standard operating procedures for electrochemotherapy of cutaneous tumours and skin metastases. **Acta Oncologica**, [S. l.], v. 57, n. 7, p. 874–882, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/0284186X.2018.1454602>

GOLBERG, A. *et al.* Tissue heterogeneity in structure and conductivity contribute to cell survival during irreversible electroporation ablation by “electric field sinks”. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 5, p. 1–7, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/srep08485>

GOLBERG, A.; RUBINSKY, B. A statistical model for multidimensional irreversible electroporation cell death in tissue. **BioMedical Engineering Online**, [S. l.], v. 9, p. 1–13, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1475-925X-9-13>

GOLBERG, A.; YARMUSH, M. L. Nonthermal irreversible electroporation: Fundamentals, applications, and challenges. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, [S. l.], v. 60, n. 3, p. 707–714, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1109/TBME.2013.2238672>

IVORRA, A. **Tissue Electroporation as a Bioelectric Phenomenon: Basic Concepts**. [S. l.: s. n.]. v. 1E-book. Disponível em: <https://doi.org/DOI 10.1007/978-3-642-05420-4>

IVORRA, A.; MIR, L. M.; RUBINSKY, B. Electric field redistribution due to conductivity changes during tissue electroporation: Experiments with a simple vegetal model. **IFMBE Proceedings**, [S. l.], v. 25, n. 13, p. 59–62, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-642-03895-2-18>

JIANG, C.; DAVALOS, R. V.; BISCHOF, J. C. A review of basic to clinical studies of irreversible electroporation therapy. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, [S. l.], v. 62, n. 1, p. 4–20, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1109/TBME.2014.2367543>

KAEHLER, K. C.; EGBERTS, F.; HAUSCHILD, A. Electrochemotherapy in symptomatic melanoma skin metastases: Intraindividual comparison with conventional surgery. **Dermatologic Surgery**, [S. l.], v. 36, n. 7, p. 1200–1202, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1524-4725.2010.01608.x>

KOTNIK, T.; PUCIHAR, G.; MIKLAVČIČ, D. Induced transmembrane voltage and its correlation with electroporation-mediated molecular transport. **Journal of Membrane Biology**, [S. l.], v. 236, n. 1, p. 3–13, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00232-010-9279-9>

LEE, E. W. *et al.* Electron microscopic demonstration and evaluation of irreversible electroporation-induced nanopores on hepatocyte membranes. **Journal of Vascular and Interventional Radiology**, [S. l.], v. 23, n. 1, p. 107–113, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jvir.2011.09.020>

LIU, C. *et al.* Conducting nanosponge electroporation for affordable and high-efficiency disinfection of bacteria and viruses in water. **Nano Letters**, [S. l.], v. 13, n. 9, p. 4288–4293, 2013. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/nl402053z>

MIKLAVČIČ, D. *et al.* Electrochemotherapy: Technological advancements for efficient electroporation-based treatment of internal tumors. **Medical and Biological Engineering and Computing**, [S. l.], v. 50, n. 12, p. 1213–1225, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11517-012-0991-8>

MIKLAVČIČ, D. *et al.* Electrochemotherapy: From the drawing board into medical practice. **BioMedical Engineering Online**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 1–20, 2014.

Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1475-925X-13-29>

MIKLAVČIČ, D. **Handbook of Electroporation**. [S. l.: s. n.]. v. 1–4E-book.

Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-3-319-32886-7>

MIR, L. M. *et al.* Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, [S. l.], v. 27, n. 1, p. 68–72, 1991. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0277-5379\(91\)90064-K](https://doi.org/10.1016/0277-5379(91)90064-K)

MIR, L. M. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first clinical trial. [S. l.], v. 313, n. 13, p. 613–618, 1991.

MIR, L. M. Bases and rationale of the electrochemotherapy. **European Journal of Cancer, Supplement**, [S. l.], v. 4, n. 11, p. 38–44, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejcsup.2006.08.005>

MIR, L. M. *et al.* Standard operating procedures of the electrochemotherapy: Instructions for the use of bleomycin or cisplatin administered either systemically or locally and electric pulses delivered by the Cliniporator™ by means of invasive or non-invasive electrodes. **European Journal of Cancer, Supplement**, [S. l.], v. 4, n. 11, p. 14–25, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejcsup.2006.08.003>

MORALES-DE LA PEÑA, M.; ELEZ-MARTÍNEZ, P.; MARTÍN-BELLOSO, O. Food Preservation by Pulsed Electric Fields: An Engineering Perspective. **Food Engineering Reviews**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 94–107, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12393-011-9035-7>

NARAYAN, V. M. Radiotherapy With or Without Chemotherapy in Muscle-Invasive Bladder Cancer. **50 Studies Every Urologist Should Know**, [S. l.], p. 147–152, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/med/9780190655341.003.0026>

NEAL, R. E. *et al.* Experimental characterization and numerical modeling of tissue electrical conductivity during pulsed electric fields for irreversible electroporation treatment planning. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, [S. l.], v. 59, n. 4, p. 1076–1085, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1109/TBME.2012.2182994>

P. SPUGNINI, E. *et al.* Electrochemotherapy as First Line Cancer Treatment: Experiences from Veterinary Medicine in Developing Novel Protocols. **Current Cancer Drug Targets**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 43–52, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2174/156800961601151218155340>

PAVŠELJ, N. *et al.* The course of tissue permeabilization studied on a mathematical model of a subcutaneous tumor in small animals. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, [S. l.], v. 52, n. 8, p. 1373–1381, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1109/TBME.2005.851524>

PINTARELLI, G. B. TÉCNICAS DE ELETROPORAÇÃO: DISPOSITIVO ELETRÔNICO E ENSAIOS EM LEVEDURAS Dissertação submetido ao Programa de Santa Catarina (UFSC) para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Orientador : Florianópolis. [S. l.], 2018.

PINTARELLI, G. B. *et al.* Musa acuminata as Electroporation Model. [S. l.], 2023.

PINTARELLI, G. B.; ANTÔNIO JR., A.; SUZUKI, D. O. H. **Equipamento para Aplicação de Pulsos de Tensão Elétrica de Amplitude, Período e Forma de Onda Variáveis e Análise de Efetividade para Técnicas de Eletroporação na Transfecção Genética e Tratamento de Neoplasias**. RPI00060. Concessão: 2019.

PRON, G. *et al.* Internalisation of the bleomycin molecules responsible for bleomycin toxicity: A receptor-mediated endocytosis mechanism. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 57, n. 1, p. 45–56, 1999. Disponível em:

[https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(98\)00282-2](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(98)00282-2)

PUC, M. *et al.* Electroporator for in vitro cell permeabilization. **Radiology and Oncology**, [S. l.], v. 35, n. 3, p. 203–207, 2001.

RAMOS, A. Effect of the electroporation in the field calculation in biological tissues. **Artificial Organs**, [S. l.], v. 29, n. 6, p. 510–513, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2005.29084.x>

RANGEL, M. M. M. *et al.* Electrochemotherapy in the treatment of neoplasms in dogs and cats. **Austral Journal of Veterinary Sciences**, [S. l.], v. 51, n. 2, p. 45–51, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.4067/S0719-81322019000200045>

REBERSEK, M. *et al.* Cell Membrane Electroporation - Part 3: The Equipment. **The First Crossing of Greenland**, [S. l.], p. 28–72, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/cbo9781139014915.005>

REBERSEK, M.; D. MIKLAVCIC. Concepts of Electroporation Pulse Generation and Overview of Electric Pulse Generators for Cell and Tissue Electroporation. **Advanced Electroporation Techniques in Biology and Medicine**, [S. l.], p. 323–339, 2010.

REDDY, J. **An Introduction to the Finite Element Method**. 3ed. ed. [S. l.]: McGraw-Hill, 2006. *E-book*.

RUBINSKY, B. Irreversible electroporation in medicine. **Technology in Cancer Research and Treatment**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 255–259, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/153303460700600401>

RUBINSKY, B.; ONIK, G.; MIKUS, P. Irreversible electroporation: A new ablation modality - Clinical implications. **Technology in Cancer Research and Treatment**, [S. l.], v. 6, n. 1, p. 37–48, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/153303460700600106>

SANO, M. B. *et al.* Optimization of a single insertion electrode array for the creation of clinically relevant ablations using high-frequency irreversible electroporation. **Computers in Biology and Medicine**, [S. l.], v. 95, n. February, p. 107–117, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.compbiomed.2018.02.009>

SAWYERS, C. Targeted cancer therapy. **Nature**, [S. l.], v. 432, p. 294–297, 2004.

ŠEL, D. *et al.* Finite-Element Modeling of Needle Electrodes in Tissue From the Perspective of Frequent Model Computation. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, [S. l.], v. 50, n. 11, p. 1221–1232, 2003. Disponível em: <https://doi.org/10.1109/TBME.2003.818466>

ŠEL, D. *et al.* Sequential finite element model of tissue electroporation. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, [S. l.], v. 52, n. 5, p. 816–827, 2005. Disponível em: <https://doi.org/10.1109/TBME.2005.845212>

SERŠA, G. *et al.* **Electrochemotherapy of Small Tumors; The Experience from the ESOPE (European Standard Operating Procedures for Electrochemotherapy) Group**. [S. l.: s. n.]. *E-book*.

SERŠA, G. *et al.* Electrochemotherapy with cisplatin: Potentiation of local cisplatin antitumour effectiveness by application of electric pulses in cancer patients. **European Journal of Cancer**, [S. l.], v. 34, n. 8, p. 1213–1218, 1998. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0959-8049\(98\)00025-2](https://doi.org/10.1016/S0959-8049(98)00025-2)

SIENI, E. *et al.* Electric field distribution study in inhomogeneous biological tissues. **International Journal of Numerical Modelling: Electronic Networks, Devices and Fields**, [S. l.], v. 33, n. 2, p. 1–13, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jnm.2699>

SPUGNINI, E. P. *et al.* Novel Instruments for the Implementation of Electrochemotherapy Protocols: From Bench Side to Veterinary Clinic. **Journal of Cellular Physiology**, [S. l.], v. 232, n. 3, p. 490–495, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jcp.25505>

SPUGNINI EP, MELILLO A, QUAGLIUOLO L, BOCCELLINO M, VINCENZI B, PASQUALI P, B. A. Definition of novel electrochemotherapy parameters and validation of their in vitro and in vivo effectiveness. [S. l.], 2014.

STAAL, L. G.; GILBERT, R. Clinical Aspects of Electroporation. **Clinical Aspects of Electroporation**, [S. l.], 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/978-1-4419-8363-3>

SUÁREZ, C. *et al.* The role of additional pulses in electroporation protocols. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. 1–13, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113413>

SUZUKI, D. O. H. *et al.* Novel application for electrochemotherapy: Immersion of nasal cavity in dog. **Artificial Organs**, [S. l.], v. 41, n. 8, p. 767–773, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/aor.12858>

SUZUKI, D. O. H. *et al.* Oral Mucosa Model for Electrochemotherapy Treatment of Dog Mouth Cancer: Ex Vivo, In Silico, and In Vivo Experiments. **Artificial Organs**, [S. l.], v. 42, n. 3, p. 297–304, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/aor.13003>

SUZUKI, D. O. H. *et al.* **DISPOSITIVO DE APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS EM CAVIDADE**. BR10202101991. Concessão: 2021.

TOEPFL, S. Pulsed Electric Field food treatment - scale up from lab to industrial scale. **Procedia Food Science**, [S. l.], v. 1, p. 776–779, 2011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.profoo.2011.09.117>

TOKMAKÇI, M. A high-voltage pulse generation instrument for electrochemotherapy method. **Journal of Medical Systems**, [S. l.], v. 30, n. 3, p. 145–151, 2006. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10916-005-7979-y>

UK, C. R. **Electrochemotherapy for cancers affecting the skin**. [s. l.], 2022. Disponível em: https://www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment/other/photodynamic-therapy?_gl=1*u4uhd4*_ga*MzM0MzY0MzU3LjE2NjU0NzY2NTQ.*_ga_58736Z2GN N*MTY2NTQ3NjY1NC4xLjEuMTY2NTQ3NjgwNi4zOC4wLjA. Acesso em: 10 out. 2022.

WALTER B. CANNON. Physiological Reviews. **Physiological Reviews**, [S. l.], v. 9, n. 3, p. 399–431, 1929.

WASAN, H. S. *et al.* First-line selective internal radiotherapy plus chemotherapy versus chemotherapy alone in patients with liver metastases from colorectal cancer (FOXFIRE, SIRFLOX, and FOXFIRE-Global): a combined analysis of three multicentre, randomised, phase 3 trials. **The Lancet Oncology**, [S. l.], v. 18, n. 9, p. 1159–1171, 2017. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30457-6](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30457-6)

WEAVER, J. C. *et al.* A brief overview of electroporation pulse strength-duration space: A region where additional intracellular effects are expected. **Bioelectrochemistry**, [S. l.], v. 87, p. 236–243, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2012.02.007>

WHEATLEY, K. *et al.* Surgical excision margins in primary cutaneous melanoma: A meta-analysis and Bayesian probability evaluation. **Cancer Treatment Reviews**, [S. l.], v. 42, p. 73–81, 2016. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2015.10.013>

ZUPANIC, A.; KOS, B.; MIKLAVCIC, D. Treatment planning of electroporation-based medical interventions: Electrochemotherapy, gene electrotransfer and irreversible electroporation. **Physics in Medicine and Biology**, [S. l.], v. 57, n. 17, p. 5425–5440, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/0031-9155/57/17/5425>

APÊNDICE A – EQUIPAMENTOS COMERCIAIS

Com base na revisão bibliográfica das especificações presentes nos equipamentos utilizados comercialmente para a aplicação da eletroporação.

legenda:

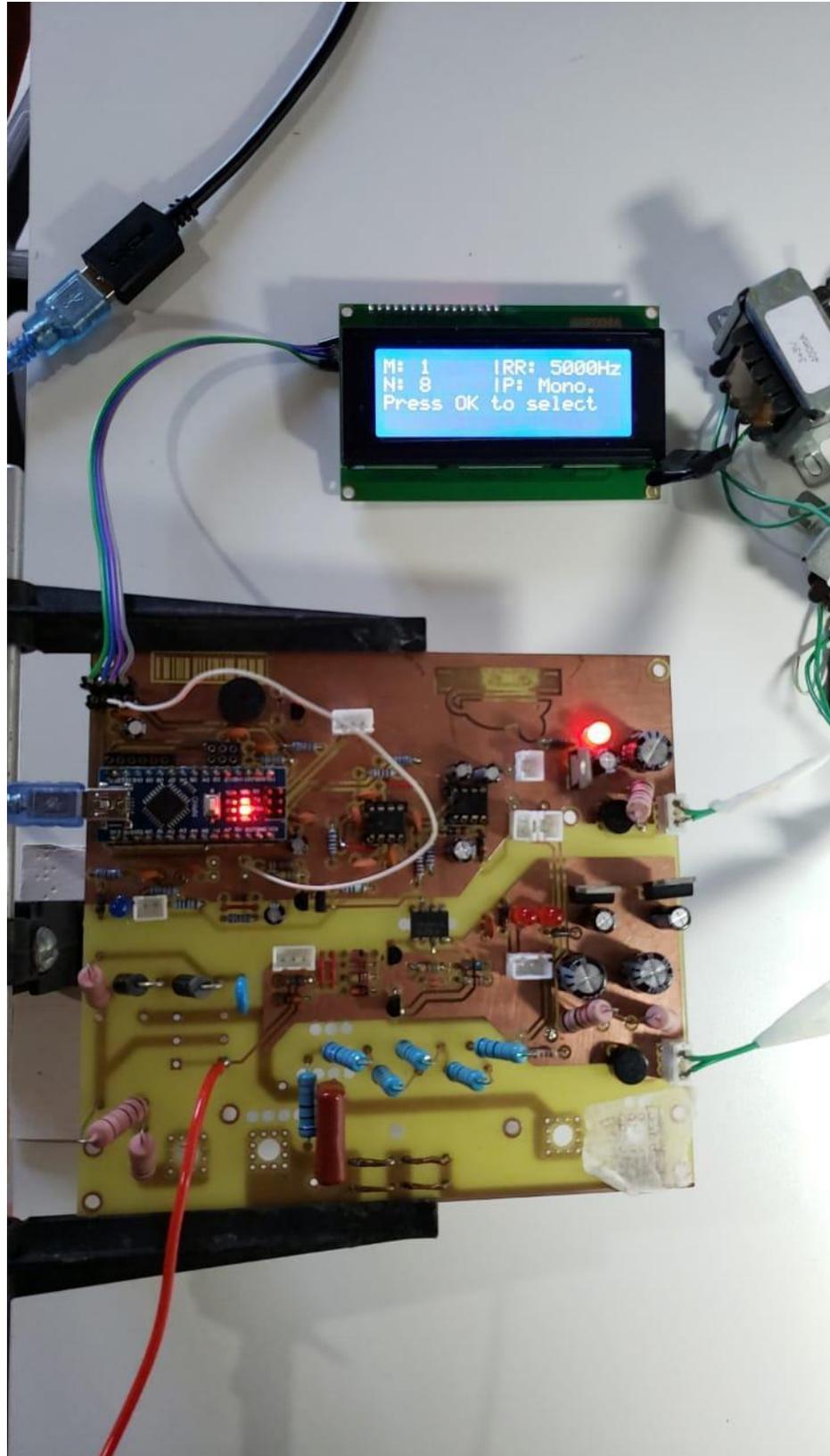
(*) - modelo utiliza eletrodos padronizados.

(**) - equipamento permite utilizar modelos personalizados.

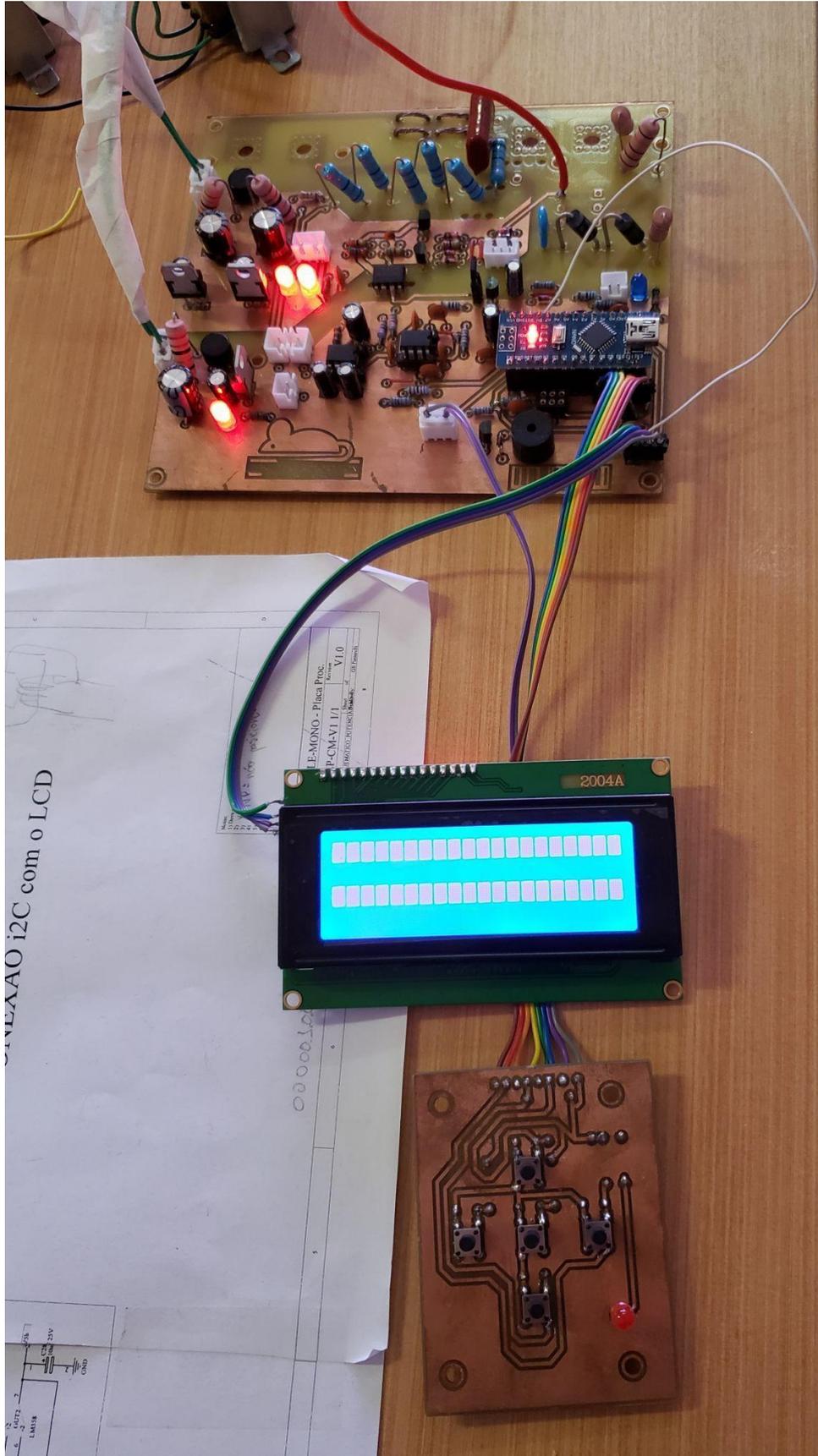
Equipamento	Aplicação	Número de pulsos	Duração dos pulsos	Frequência de repetição	Amplitude dos pulsos	Corrente Máxima
Igea Cliniporator EPS02*	EQT	4-8	100uS	1 Hz ou 5 kHz	400/730/960 V	20 A
Igea Cliniporator Vitae*	EQT / EGT	4-8	100uS	1 Hz ou 5 kHz	400/730/960 V	20 A
Igea Cliniporator Vitae**	EQT / EGT	4+4 (bipolar)	-	1 kHz	500 - 3000 V	50 A
Angiodynamics NanoKnife BTX ECM830	NTIRE	10 - 100	20 - 100 uS	-	100 - 3000 V	50 A
	EQT/EGT	1 - 36	10 - 600 uS	0,1 - 10 Hz	30 - 3000 V	< 500 A (descarga capacitiva)
Protech International CUY21EDIT	EGT	-	0,0001 - 1 S	1 Hz - 10 Hz	1 - 500 V	< 5 A
Biopulse S. R.L Onkodisruptor	ECT	8	50 uS + 50 uS	-	300 - 1500 V	5 A
	(vet)	bipolar				
Leroy Biotech Electricell B10	EQT/EGT	1 - 10000	5 - 50000 uS	0,1 Hz - 1 KHz	0 - 1000 V	6 - 10 A

Fonte: Adaptado de (BERTACCHINI, 2017; BERTACCHINI *et al.*, 2007; BIOTECH, 2010; REBERSEK *et al.*, 2014; REBERSEK; D. MIKLAVCIC, 2010; RUBINSKY; ONIK; MIKUS, 2007; SPUGNINI *et al.*, 2017; SPUGNINI EP, MELILLO A, QUAGLIUOLO L, BOCELLINO M, VINCENZI B, PASQUALI P, 2014; STAAL; GILBERT, 2011).

APÊNDICE B - PLACA IMPRESSA
B1) PLACA COM OS COMPONENTES INSERIDOS E EM
FUNCIONAMENTO.



B2) Placa montada e conectada com a placa de botões



B3) Painel montado na caixa de proteção.



B4) DISTRIBUIÇÃO DAS PLACAS NO INTERIOR DA CAIXA DE PROTEÇÃO.

