



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA

Raul Guedert

Modelo dinâmico de eletroporação baseado na dispersão de tecidos biológicos

Florianópolis – SC
2023

Raul Guedert

Modelo dinâmico de eletroporação baseado na dispersão de tecidos biológicos

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de doutor em Engenharia Elétrica.

Orientadora: Profa. Daniela Ota Hisayasu Suzuki, Dra.

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

Guedert, Raul

Modelo dinâmico de eletroporação baseado na dispersão de tecidos biológicos / Raul Guedert ; orientadora, Daniela Ota Hisayasu Suzuki, 2023.

146 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Engenharia Elétrica. 2. Eletroporação. 3. Eletroquimioterapia. 4. Dispersão Biológica. 5. Modelagem Matemática. I. Suzuki, Daniela Ota Hisayasu. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Engenharia Elétrica. III. Título.

Raul Guedert

Modelo dinâmico de eletroporação baseado na dispersão de tecidos biológicos

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

Prof. Alexandre Visintainer Pino, Dr.
Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Prof. Cesar Ramos Rodrigues, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Guilherme Brasil Pintarelli, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Roddy Alexander Romero Antayhua, Dr.
Instituto Federal de Santa Catarina (IFSC)

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

Prof. Telles Brunelli Lazzarin, Dr.
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Engenharia Elétrica

Profa. Daniela Ota Hisayasu Suzuki, Dra.
Orientadora

Florianópolis – SC, 2023.

AGRADECIMENTOS

É praticamente impossível agradecer nominalmente a todas as pessoas que participaram da realização desse trabalho. Dessa forma, os agradecimentos partem, desde já, para todos que de alguma forma fazem parte da minha trajetória, em especial:

À minha orientadora, Professora Daniela O. H. Suzuki, que desde o término da graduação me guiou no desafio do mundo acadêmico, sempre aberta a novas ideias e propostas, mostrando atalhos e abrindo caminhos para que minhas melhores habilidades fossem encontradas e utilizadas.

Aos demais professores do Departamento de Engenharia Elétrica e Eletrônica da Universidade Federal de Santa Catarina, por toda minha formação desde a graduação ao doutorado. Especialmente àqueles que ensinaram além do currículo.

Aos servidores técnico-administrativos do Departamento de Engenharia Elétrica e Eletrônica, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica e da Universidade em geral, sempre dispostos a resolver qualquer problema burocrático e retirar dúvidas em relação aos procedimentos. Nenhum bacharel, licenciado, mestre ou doutor se formaria na Universidade sem o trabalho realizado pelos senhores e senhoras.

Aos servidores terceirizados, responsáveis pela limpeza e segurança do campus, essenciais para o bom funcionamento da Universidade e dos laboratórios.

Aos colegas de graduação, mestrado e doutorado, especialmente Guilherme Pintarelli, Afrânio Antônio Jr., Daniella de Andrade, Jéssica da Silva, Juliana Rosa, Pedro Pagano, Matheus Valente, Jorge Lourenci, Gizele Ginklings, Giovanni Cimolin, José Vinícius, Isabella Garcia, Bruno de Brida, Bruno Neckel, Guilherme Mendonça e Erich Oehninger pelo companheirismo em toda a jornada durante os onze anos de formação acadêmica.

Uma especial gratidão aos meus pais, José Carlos Guedert e Sandra Figueredo, que sempre prezaram pela educação como o legado mais valioso de um pai para um filho.

À minha família, de sangue e de coração, por todo o apoio durante toda minha jornada, em especial Ivan, Júlia, Gabriel, Paula, Fernando, Carolina, Beatriz, Lucas, Jucélia, Sidnei, Artur, Rafael, Luís Otávio, Raquel, Sérgio (*in memoriam*), Ana, Ivani, Dimas, Iani, Antonela e Helena.

Aos meus avós (*in memoriam*) Gisela, Mário, Otávio e Alceste, pilares que proporcionaram a construção de famílias incríveis.

Ao CNPQ, pela bolsa de doutorado garantida durante todo o curso.

À PROEX/CAPES pelo financiamento na publicação de artigo em revista *open-access*.

À sociedade brasileira, pelo financiamento da ciência desenvolvida no país.

“Viver vale a pena se você puder contribuir de alguma forma para esta corrente infinita de progresso.”
(Paul Dirac)

RESUMO

Membranas celulares podem sofrer abertura de poros em sua bicamada fosfolipídica a partir de estímulos por campos elétricos de curta duração e alta intensidade em um fenômeno denominado eletroporação. A abertura dos poros causa um aumento de permeabilidade da membrana, permitindo o transporte de substâncias entre os meios intra e extra-celulares. A eletroquimioterapia é uma técnica baseada em eletroporação para catalisar o efeito de quimioterápicos. A segurança e eficácia da eletroquimioterapia é auxiliada por protocolos procedurais e simulações numéricas. Simulações numéricas permitem avaliar as regiões do tecido que serão eletroporadas e a corrente elétrica associada. Os modelos em eletroporação trazem maior confiabilidade para os resultados simulados ao incorporarem a variação das propriedades elétricas do meio devido a ocorrência do fenômeno. Modelos em tecidos geralmente utilizam o domínio estático, voltados a avaliar apenas o resultado final do protocolo utilizado. No entanto, variações temporais nos protocolos fazem parte da discussão sobre a eficácia do tratamento e conforto do paciente. Modelos estáticos não carregam informações sobre variações temporais, indicando uma possível limitação em sua definição. A utilização de modelos dinâmicos pode ampliar o estudo em relação à diferentes protocolos. Modelos dinâmicos em tecido propostos atualmente possuem limitações, especialmente na implementação das características dispersivas do tecido. Esse trabalho apresenta o desenvolvimento de um novo modelo dinâmico de eletroporação em tecidos, construído com base na dispersão de tecidos biológicos. O trabalho está organizado em três estudos. No primeiro estudo, verificamos experimentalmente a limitação de três modelos estáticos em relação à alterações em aspectos temporais. Através de experimentações com tecidos de ratos Wistar, observou-se um acréscimo na corrente elétrica ao final de protocolos de eletroporação com frequência de repetição de 1 Hz e 5 kHz. O acréscimo foi de 10,8 % para fígado, 5,8 % para mucosa oral e 4,7 % para músculo. Apesar do modelo conseguir prever a corrente para o mesmo protocolo em que foi desenvolvido (frequência de repetição de 1 Hz), o aumento da frequência de repetição inviabiliza o modelo. Dessa forma, um novo modelo dinâmico de eletroporação em tecidos é proposto para permitir simulações no domínio temporal. O segundo estudo apresenta a inserção dos efeitos dispersivos de tecidos biológicos no simulador por elementos finitos no domínio do tempo através do método de equações diferenciais auxiliares. Um algoritmo genético é utilizado para parametrização dos efeitos dispersivos em multi-polos de dispersão de Debye. Implementação e parametrização são testados através de estudos experimentais e simulados com tecido vegetal (*Solanum tuberosum*). A parametrização da dispersão de *Solanum tuberosum* entre 40 Hz e 10 MHz pode ser realizada com 4 polos de Debye. Simulações no domínio do tempo e da frequência permitem avaliar o método de transformação implementado. Os erros máximos foram de $\pm 0,01$ na magnitude e $\pm 1,5$ na fase ao comparar simulações no domínio da frequência e do tempo. A comparação com dados experimentais em um estímulo por trem de pulsos quadrados permitiu confirmar a implementação da dispersão biológica na simulação no domínio do tempo. No terceiro estudo, um novo modelo dinâmico de eletroporação é proposto ao extrapolar um modelo de células. O acréscimo de condutividade ocasionado pela eletroporação é incorporado à dispersão biológica. Parâmetros do modelo são determinados para o tecido de *Solanum tuberosum*. O modelo é capaz de explicar a dinâmica da condutividade elétrica do tecido durante um trem de oito pulsos quadrados com 5 kHz de frequência de repetição e

magnitudes de campo elétrico entre 10 kV/m e 100 kV/m. Os erros entre simulação e dados experimentais foram máximos para os campos de 20 kV/m e 50 kV/m ($\pm 11\%$ em relação a média), no limite do intervalo de confiança (IC = 95%). Para os demais campos os erros foram menores que 5% em relação a média. A comparação entre os resultados experimentais e simulados para tecido vegetal (*Solanum tuberosum*) comprova a viabilidade do modelo proposto.

Palavras-chave: Célula. Condutividade. Dispersão de Debye. Método de Elementos Finitos. Eletroquimioterapia. Membrana Celular. Polarização.

ABSTRACT

Cell membranes can undergo a pore opening in their phospholipid bilayer by applying short but intense electric fields. This phenomenon is called electroporation. The opening of the pores increases the permeability of the membrane and allows the transport of substances through the intra- and extracellular environment. Electrochemotherapy is a medical technology based on electroporation to catalyse the action of chemotherapeutic agents. The success and safety of the technology is based on standard operating procedures and numerical simulations. Numerical simulations allow us to determine the regions of electroporated tissue and the associated electric current. Electroporation models increase the simulation feasibility by including the tissue electric properties changes depending on electroporation occurrence. Tissue electroporation models are often developed in the static domain, once the outcome is evaluated only at the end of the protocol. However, the temporal aspects of the protocol can vary to increase patient comfort or improve the efficacy of the treatment. Static models do not include the dependence on temporal variations. Changing the protocol time signature could invalidate the static model. On the other hand, dynamic models could improve studies on protocol time signature variations. Dynamic models of tissue electroporation proposed to this date do not consider the tissue biologic dispersion completely. This thesis presents the development of a new dynamic model of tissue electroporation based on biological dispersion. The thesis contains three different studies. In the first study, we tested the limitations of the static model related to changes in the time signature of the protocol. Animal experiments with Wistar rats show that the electric current increases if only the repetition rate of a standard protocol is changed from 1 Hz to 5 kHz. The increase was 10,8 % in the liver, 5,8 % in the oral mucosa, and 4,7 % in the muscle. Although the model succeeds in predicting the current for the same protocol that it was conceived (1 Hz repetition rate), changing the repetition rate invalidate the model. A new dynamic model of electroporation in tissues is proposed to allow simulations in the time domain. The second study presents the implementation of biological dispersion in the finite element method software in the time domain through the auxiliary differential equation method. A genetic algorithm is used to parameterise the biological dispersion effect into a multipole Debye dispersion. The implementation of biological dispersion has been tested and validated with simulations and experiments using a plant tissue (*Solanum tuberosum*). The parameterisation of *Solanum tuberosum* dispersion between 40 Hz and 10 MHz can be performed with 4 Debye poles. Simulations in the time and frequency domains confirmed the domain transformation method. The maximum errors were $\pm 0,01$ in magnitude and $\pm 1,5$ in phase when comparing the simulations in both domains. In addition, we compared the simulated and experimental data with the square-wave signal, which confirmed the feasibility of the implementation of biological dispersion. In the third study, a new dynamic model of electroporation was proposed with a cell-model extrapolation. The increase in conductivity caused by electroporation is added to the biological dispersion. The model parameters for *Solanum tuberosum* were defined. The model can explain the dynamics of conductivity increase during a square-wave pulse train with a repetition rate of 5 kHz and a magnitude between 10 kV/m and 100 kV/m. The errors between simulation and experiments were maximum at 20 kV/m and 50 kV/m (± 11 % related to average), in the upper limit of the confidence interval (CI = 95 %). The errors were less than 5 % related to average to all other

magnitudes. The comparison between experiments and simulations with plant tissue (*Solanum tuberosum*) confirmed the feasibility of the model.

Keywords: Cell. Cell membrane. Conductivity. Debye dispersion. Electrochemtherapy. Finite Element Method. Polarization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Processo de abertura dos poros devido ao potencial transmembrana supra-fisiológico	23
Figura 2 – Representação ilustrativa da relação entre a magnitude do campo elétrico e o tempo de exposição para ocorrência dos quatro possíveis desfechos ao estimular células com campos elétricos	24
Figura 3 – (A) Trem de pulsos monopolar e (B) trem de pulsos bipolar recomendados pelo ESOPE	26
Figura 4 – Circuito elétrico equivalente para um modelo de célula com condutividade interna constante e polarização desprezível imersa em suspensão eletrólita de condutividade constante e polarização desprezível	31
Figura 5 – Dispersão dielétrica de tecido muscular com as respectivas bandas de dispersão	33
Figura 6 – Aumento do vetor densidade de polarização no tempo após o estímulo de um campo elétrico \vec{E}_0 constante em $t = 0$ (degrau unitário)	36
Figura 7 – Exemplo gráfico da diminuição da permissividade relativa (A) e do aumento da condutividade (B) em função da frequência devido a um polo de dispersão de Debye com tempo de relaxação de $100 \mu\text{s}$. .	39
Figura 8 – Exemplo gráfico da diminuição da permissividade relativa em função da frequência devido a um polo de dispersão de Cole-Cole para diferentes parâmetros empíricos	41
Figura 9 – Gráfico do modelo estático de eletroporação em tecidos	45
Figura 10 – Circuito elétrico equivalente utilizado por Voyer <i>et al.</i> para o desenvolvimento do modelo dinâmico	49
Figura 11 – Circuito elétrico equivalente utilizado por Ramos e Weinert para simular os efeitos dispersivos em tecidos biológicos	51
Figura 12 – Diagrama síntese da metodologia estatística	59
Figura 13 – (A) Peça de fígado com eletrodo de agulhas posicionado e (B, C) geometria inserida no simulador	63
Figura 14 – Resumo dos resultados da experimentação animal	65
Figura 15 – Aparato experimental para varredura em frequência das propriedades elétricas de <i>Solanum tuberosum</i>	75
Figura 16 – Resultado gráfico da parametrização da dispersão dielétrica de <i>Solanum tuberosum</i> para 2, 4 e 6 polos de Debye	78
Figura 17 – Amostra e geometria gerada a partir da rotação do modelo axissimétrico 2D para simulação de amostras de batata (<i>Solanum tuberosum</i>)	79

Figura 18 – Simulação no domínio da frequência da dispersão dielétrica de <i>Solanum tuberosum</i> parametrizada com 4 polos de Debye	81
Figura 19 – Simulação no domínio do tempo da dispersão dielétrica de <i>Solanum tuberosum</i> parametrizada com 4 polos de Debye	82
Figura 20 – Simulação no domínio do tempo com pulsos quadrados da dispersão dielétrica de <i>Solanum tuberosum</i> parametrizada com 4 polos de Debye	83
Figura 21 – Forma sigmoideal das funções β_0 e β_1	89
Figura 22 – Correntes elétricas experimentais e simuladas de eletroporação em <i>Solanum tuberosum</i> para magnitude de campo elétrico entre 10 kV/m e 40 kV/m	90
Figura 23 – Correntes elétricas experimentais e simuladas de eletroporação em <i>Solanum tuberosum</i> para magnitude de campo elétrico entre 50 kV/m e 100 kV/m	91
Figura 24 – Concentração dos estados dinâmicos da eletroporação para 20 kV/m e 100 kV/m no centro da amostra	92
Figura 25 – Aumento da temperatura por efeito Joule no centro da amostra . . .	92
Figura 26 – Condutividade estática com influências da eletroporação e do aumento da temperatura no centro da amostra	93
Figura 27 – Espectro do protocolo de eletroporação com pulso unipolar de 100 μ s e frequência de repetição de 5 kHz	121
Figura 28 – Espectro do protocolo de eletroporação com pulso bipolar de 100 μ s e frequência de repetição de 5 kHz	124
Figura 29 – Resultado das correntes elétricas experimentais e simuladas com e sem o fator de correção para (A) fígado, (B) mucosa oral e (C) músculo	125
Figura 30 – Resultado gráfico da parametrização da dispersão dielétrica de <i>Solanum tuberosum</i> para (A, B) 1, (C, D) 2, (E, F) 3 e (G, H) 4 polos de Debye	138
Figura 31 – Resultado gráfico da parametrização da dispersão dielétrica de <i>Solanum tuberosum</i> para (A, B) 5, (C, D) 6, (E, F) 7 e (G, H) 8 polos de Debye	139
Figura 32 – Instantes de tempo para medição da condutividade instantânea . . .	140
Figura 33 – Acréscimo da condutividade do tecido dependente da magnitude do campo elétrico no primeiro instante do primeiro pulso	141
Figura 34 – Acréscimo da condutividade do tecido dependente da magnitude do campo elétrico durante o primeiro pulso	142
Figura 35 – Concentração das dinâmicas da eletroporação P_0 , P_1 e P_2 no centro da amostra	143
Figura 36 – Concentração das dinâmicas da eletroporação P_0 , P_1 e P_2 no centro da amostra	144

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Bandas de dispersões dielétricas relacionadas a diferentes meios e estruturas biológicas	32
Tabela 2 – Descrição dos parâmetros das funções do modelo proposto por Langus <i>et al.</i> (47)	48
Tabela 3 – Parâmetros de Eletroporação para modelos estáticos de fígado, mucosa oral e músculo	61
Tabela 4 – Resultados do teste de normalidade de Shapiro-Wilk para os protocolos	65
Tabela 5 – Resultados dos testes de comparação entre diferentes grupos	66
Tabela 6 – Percentual de potência do sinal do protocolo unipolar do ESOPE para cada intervalo de frequência	67
Tabela 7 – Resultado da parametrização da dispersão dielétrica de <i>Solanum tuberosum</i> para 2, 4 e 6 polos de Debye	77
Tabela 8 – Resultados da simulação para magnitude e fase nos domínios da frequência e do tempo em 1 kHz, 100 kHz e 1 MHz	81
Tabela 9 – Propriedades termo-físicas à 20 °C (293,15 K) dos materiais utilizados no estudo	87
Tabela 10 – Parâmetros do modelo dinâmico de eletroporação para <i>Solanum tuberosum</i>	89
Tabela 11 – Erro percentual médio da corrente elétrica simulada para cada pulso	94
Tabela 12 – Percentual de potência do sinal para cada intervalo de frequência	120
Tabela 13 – Percentual de potência do sinal para trem de pulso unipolar e bipolar com frequência de repertição de 5 kHz	123
Tabela 14 – Resultado da parametrização da dispersão dielétrica de <i>Solanum tuberosum</i> de 1 à 4 polos de Debye	136
Tabela 15 – Resultado da parametrização da dispersão dielétrica de <i>Solanum tuberosum</i> de 1 à 8 polos de Debye	137
Tabela 16 – Acréscimo da condutividade instantânea nos instantes inicial e final do primeiro pulso relativo às medidas em 10 kV/m	141

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	Algoritmo Genético
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CFD	<i>Computational Fluid Dynamics</i> (Fluidodinâmica computacional)
EDA	Equação Diferencial Auxiliar
EDO	Equação Diferencial Ordinária
ESOPE	<i>European Standard Operating Procedures on Electrochemotherapy</i> (Procedimentos Operacionais Padrão em Eletroquimioterapia Europeu)
FEM	<i>Finite Element Method</i> (Método de Elementos Finitos)
IEB	Instituto de Engenharia Biomédica
PEF	<i>Pulsed Electric Fields</i> (Campos Elétricos Pulsados)
TMP	<i>Transmembrane Potential</i> (Potencial Transmembrana)
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina

LISTA DE SÍMBOLOS

\vec{E}	Vetor Campo Elétrico [V/m]
t	Tempo [s]
n_p	Número do Pulso
σ	Condutividade Elétrica do Meio [S/m]
ε	Permissividade Elétrica do Meio [F/m]
μ	Permeabilidade Magnética do Material [N/A ²]
α	Banda de Dispersão em Tecidos Biológicos
β	Banda de Dispersão em Tecidos Biológicos
δ	Banda de Dispersão em Tecidos Biológicos
γ	Banda de Dispersão em Tecidos Biológicos
\vec{P}	Vetor Densidade de Polarização [C/m ²]
ε_0	Permissividade do Vácuo [F/m]
χ	Susceptibilidade Elétrica do Material [1]
\vec{D}	Vetor Campo de Deslocamento Elétrico [C/m ²]
ε_r	Permissividade Elétrica Relativa do Meio [1]
τ	Constante de Tempo Específica [s]
d	Operador Diferencial
\mathcal{F}	Operador Transformada de Fourier
ω	Frequência Angular [rad/s]
$j\omega$	Frequência Angular Complexa [rad/s]
k	Número Inteiro
\vec{J}	Vetor Densidade de Corrente Elétrica [A/m ²]
j	Número Imaginário ($\sqrt{-1}$)
\Re	Parte Real de Uma Função
\Im	Parte Imaginária de Uma Função
π	Número Pi (3,141 592 653 59...)
f	Frequência [Hz]
E	Magnitude do Campo Elétrico [V/m]
D	Parâmetro da Função Sigmoidal do Modelo Estático
e	Número de Euler (2,718 281 828 45...)
C	Parâmetro da Função Sigmoidal do Modelo Estático
ρ_{por}	Nível de poração
θ	Modelo de Dano Celular
R	Resistência Elétrica [Ω]
C	Capacitância [F]
$\vec{\nabla}$	Operador Divergência
i	Corrente Elétrica [A]

V	Tensão Elétrica [V]
S	Seção Transversal [m ²]
∇	Operador Gradiente
φ	Diferença de Potencial Elétrico [V]
ℓ	Comprimento [m]
G	Condutância [S]
P_1	Dinâmica da Eletroporação (Abertura de poros)
P_2	Dinâmica da Eletroporação (Expansão de poros)
β_1	Função de Relação Sigmoidal
β_2	Função de Relação Sigmoidal
k_1	Constante do Modelo de Relação Sigmoidal
d_c	Diâmetro da Célula [m]
k_2	Constante do Modelo de Relação Sigmoidal
X_{th}	Limiar para expansão dos poros
∂	Operador Derivada Parcial
ρ	Densidade de Carga Total [C/m ³] ou Densidade do Material [kg/m ³]
\hat{n}	Componente Normal
I	Corrente Elétrica [A]
\mathcal{F}^{-1}	Operador Transformada de Fourier Inversa
\vec{e}	Campo Elétrico Auxiliar [V/m]
e	Componente do Campo Elétrico Auxiliar [V/m]
Y	Admitância [S]
B	Susceptância [S]
ℓ	Largura [m]
A	Área da Seção Transversal [m ²]
P_0	Dinâmica da Eletroporação (Abertura de pré-poros)
β_0	Função de Relação Sigmoidal
E_0	Limiar de Campo Elétrico [kV/m]
E_1	Limiar de Campo Elétrico [kV/m]
T	Período [s] ou Temperatura [K]
c_p	Capacidade Térmica do Material [J/(kg K)]
k	Condutividade Térmica do Material [W/(m K)]
δ	Função Delta de Dirac

PRODUÇÕES CIENTÍFICAS

Produções científicas publicadas no decorrer do período do doutorado (2019 – 2023).

ARTIGOS PUBLICADOS EM REVISTA

GUEDERT, Raul; ANDRADE, Daniella L. L. S.; PINTARELLI, Guilherme B.; SUZUKI, Daniela O. H. Biological dispersion in the time domain using finite element method software. **Scientific Reports**, Springer Science e Business Media LLC, 2023. DOI: 10.1038/s41598-023-49828-1

GUEDERT, Raul; PINTARELLI, Guilherme B.; SILVA, Fátima R. M. B.; SUZUKI, Daniela O. H. Effects of pulse repetition rate in static electrochemotherapy models. **BIOELECTROCHEMISTRY**, v. 153, p. 108499-108499-7, 2023. DOI: 10.1016/j.bioelechem.2023.108499

ANDRADE, Daniella L. L. S.; **GUEDERT, Raul**; PINTARELLI, Guilherme B.; RANGEL, Marcelo M. M.; OLIVEIRA, Krishna D.; QUADROS, Priscila G.; SUZUKI, Daniela O. H. Electrochemotherapy treatment safety under parallel needle deflection. **Scientific Reports**, Springer Science e Business Media LLC, v. 12, n. 1, fev. 2022. DOI: 10.1038/s41598-022-06747-x

TAQUES, Maurício Martins; **GUEDERT, Raul**; MORENO, Kleber; RANGEL, Marcelo Monte Mor; SUZUKI, Daniela Ota Hisayasu. Adjuvant electrochemotherapy after debulking in canine bone osteosarcoma infiltration. **Artificial Organs**, Wiley, v. 45, n. 3, p. 309–315, out. 2020. DOI: 10.1111/aor.13820

CAPÍTULOS DE LIVROS

ANDRADE, Daniella L. L. S.; SILVA, J. R.; **GUEDERT, R.**; Pintarelli, Guilherme B.; BERKENBROCK, J. A.; ACHENBACH, S.; SUZUKI, Daniela O. H. Electrochemotherapy Effectiveness Loss Due to Electrode Bending: An In Silico and In Vitro Study. In: Bastos-Filho, T.F., de Oliveira Caldeira, E.M., Frizera-Neto, A.. (Org.). **XXVII Brazilian Congress on Biomedical Engineering. CBEB 2020**. IFMBE Proceedings. 1ed. Switzerland AG: Springer, Cham, 2022, v. 83, p. 1109-1113. DOI: 10.1007/978-3-030-70601-2_166

RODRIGUES, J. F.; ANDRADE, Daniella L. L. S.; **GUEDERT, R.**; SUZUKI, Daniela O. H. Alpha Development of Software for 3D Segmentation and Reconstruction of Medical Images for Use in Pre-treatment Simulations for Electrochemotherapy: Implementation

and Case Study. In: Bastos-Filho, T.F., de Oliveira Caldeira, E.M., Frizera-Neto, A.. (Org.). **XXVII Brazilian Congress on Biomedical Engineering. CBEB 2020.** IFMBE Proceedings. 1ed. Switzerland AG: Springer, Cham, 2022, v. 83, p. 1773-1780. DOI: 10.1007/978-3-030-70601-2_259

GUEDERT, R.; TAQUES, M. M.; PARO, I. B.; RANGEL, Marcelo M. M.; SUZUKI, Daniela O. H. In Silico Study on Electric Current Density in the Brain During Electrochemotherapy Treatment Planning of a Dog's Head Osteosarcoma. In: Bastos-Filho, T.F., de Oliveira Caldeira, E.M., Frizera-Neto, A. (Org.). **XXVII Brazilian Congress on Biomedical Engineering. CBEB 2020.** IFMBE Proceedings. 1ed.Switzerland AG: Springer, Cham, 2022, v. 83, p. 1095-1100. DOI: 10.1007/978-3-030-70601-2_163 *Artigo eleito terceiro colocado no Prêmio Cândido Pinto de Melo, conforme certificado no Anexo A.*

DA SILVA, Jéssica R.; **GUEDERT, Raul;** PINTARELLI, Guilherme B.; SUZUKI, Daniela O. H. Computational Study of Parameters of Needle Electrodes for Electrochemotherapy. In: Bertemes-Filho, P. (eds) **17th International Conference on Electrical Bioimpedance. ICEBI 2019.** IFMBE Proceedings. 1ed. Singapore: Springer Singapore, 2020, v., p. 193-200. DOI: 10.1007/978-981-13-3498-6_29

DA SILVA, Jéssica R.; **GUEDERT, Raul;** PINTARELLI, Guilherme B.; SUZUKI, Daniela O. H. A Short Review of Membrane Models for Cells Electroporation. In: Bertemes-Filho, P. (eds) **17th International Conference on Electrical Bioimpedance. ICEBI 2019.** IFMBE Proceedings. 1ed.Singapore: Springer Singapore, 2020, v., p. 67-74. DOI: 10.1007/978-981-13-3498-6_11

PINTARELLI, Guilherme Brasil; ANTÔNIO JÚNIOR, Afrânio de Castro; **GUEDERT, Raul;** COSSUL, Sandra; SUZUKI, Daniela O. H. SIMULAÇÕES DE DISTRIBUIÇÃO DE CAMPO E CORRENTE ELÉTRICA EM TECIDOS BIOLÓGICOS. In: Holzmann, Henrique Ajuz. (Org.). **As Engenharias frente a Sociedade, a Economia e o Meio Ambiente 3.** 1ed. Ponta Grossa – PR: Atena Editora, 2019, v. 3, p. 294-306. DOI: 10.22533/at.ed.32019250626

PATENTES

GUEDERT, R.; PINTARELLI, G. B.; A. Antonio Jr.; ANDRADE, D. L. L. S.; SILVA, J. R.; LOPES, L. B.; RAMOS, C. T. S.; ROSA, J. V.; PAGANO, P. J. T.; SUZUKI, D. O. H. Dispositivo de Aplicação de Campos Elétricos em Cavidades. 2021, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020210199172, título: "Dispositivo de Aplicação de Campos Elétricos em Cavidades", Instituição de registro: INPI - Instituto

Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 04/10/2021

REGISTROS DE SOFTWARE

GUEDERT, R.; CORDEIRO NETO, J. B.; SUZUKI, D. O. H. Aplicativo para simulação de Campos Elétricos em Tecidos Biológicos v1.0. 2019. Patente: Programa de Computador. Número do registro: BR512019002123-1, data de registro: 07/05/2019, título: "Aplicativo para simulação de Campos Elétricos em Tecidos Biológicos v1.0", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

PREMIAÇÕES

Terceiro Colocado no Prêmio Cândido Pinto de Melo, oferecido pela Sociedade Brasileira de Engenharia Biomédica no XXVII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica pelo trabalho **In Silico Study on Electric Current Density in the Brain During Electrochemotherapy Treatment Planning of a Dog's Head Osteosarcoma**, em co-autoria com Maurício Martins Taques, Isabela Berndt Paro, Marcelo Monte Mór Rangel e Daniela Ota Hisayasu Suzuki.
Certificado encontra-se no Anexo A.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	OBJETIVOS	28
1.1.1	Objetivo Geral	28
1.1.2	Objetivos Específicos	28
1.2	ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO	28
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	30
2.1	CARACTERIZAÇÃO ELÉTRICA DE TECIDOS BIOLÓGICOS	30
2.1.1	Polarização não-instantânea	33
2.1.2	Polarização e dispersão de Debye	35
2.1.3	Dispersão de Debye completa	37
2.1.4	Efeito da dispersão de Debye na condutividade e permissividade	37
2.1.5	Dispersão de Cole-Cole	40
2.2	ELETROPORAÇÃO EM CÉLULAS	41
2.2.1	Modelo cinético de eletroporação celular	42
2.2.2	Efeito da eletroporação em tecidos	44
2.3	MODELOS ESTÁTICOS DE ELETROPORAÇÃO	44
2.4	MODELOS DINÂMICOS DE ELETROPORAÇÃO	47
2.4.1	Modelo de Langus <i>et al.</i>	47
2.4.2	Modelo de Voyer <i>et al.</i>	49
2.4.3	Modelo de Ramos e Weinert	50
2.4.4	Discussão sobre os modelos	52
3	DEFINIÇÕES METODOLÓGICAS: SIMULAÇÃO E ESTATÍSTICA	55
3.1	SIMULAÇÕES NUMÉRICAS	55
3.1.1	Equacionamento	55
3.1.2	Condições de Contorno	56
3.1.3	Geração do Pulso Quadrado no Tempo	57
3.1.4	Geometria e Malha	58
3.1.5	Cálculo da corrente elétrica injetada pelos terminais	58
3.2	ESTATÍSTICA	58
3.3	EQUIPAMENTO UTILIZADO	59
4	EFEITOS DA FREQUÊNCIA DE REPETIÇÃO NA CORRENTE ELÉTRICA E A VALIDADE DE MODELOS ESTÁTICOS	61
4.1	EXPERIMENTAÇÃO	62
4.1.1	Protocolos de Eletroporação	62
4.1.2	Simulação Numérica	64
4.2	RESULTADOS	64
4.3	DISCUSSÃO	64

5	IMPLEMENTAÇÃO DAS PROPRIEDADES ELÉTRICAS DE TECIDOS EM MÉTODO DE ELEMENTOS FINITOS NO DOMÍNIO DO TEMPO	69
5.1	IMPLEMENTANDO A DISPERSÃO DE DEBYE NO DOMÍNIO DO TEMPO	70
5.2	ALGORÍTMO GENÉTICO PARA PARAMETRIZAÇÃO EM MULTIPOLOS DE DEBYE	73
5.2.1	Dispersão biológica de <i>Solanum tuberosum</i> parametrizada em multi-polos de Debye	74
5.3	EXPERIMENTAÇÃO E SIMULAÇÃO DOS EFEITOS DISPERSIVOS NOS DOMÍNIOS DA FREQUÊNCIA E DO TEMPO	78
5.3.1	Simulação da Dispersão na Frequência e no Tempo	80
5.3.2	Experimentação e Simulação com Trem de Pulsos Quadrados	81
6	MODELO DINÂMICO DE ELETROPORAÇÃO BASEADO NA DISPERSÃO BIOLÓGICA	85
6.1	MODELO DE ELETROPORAÇÃO EM TECIDOS	85
6.1.1	Eletroporação na Dispersão Biológica	86
6.1.2	Análise Térmica	87
6.2	MODELO DINÂMICO DE ELETROPORAÇÃO DE <i>SOLANUM TUBEROSUM</i>	88
6.2.1	Resultados	89
6.3	DISCUSSÃO	93
7	CONCLUSÃO	99
7.1	TRABALHOS FUTUROS	99
	REFERÊNCIAS	101
	APÊNDICE A – ESPECTRO EM FREQUÊNCIA DO PULSO MONOPOLAR	119
	APÊNDICE B – ESPECTRO EM FREQUÊNCIA DO PULSO BIPO-LAR	122
	APÊNDICE C – FATOR DE CORREÇÃO PARA MODELOS ESTÁTICOS	125
	APÊNDICE D – CÓDIGO PARA CÁLCULO DO ESPECTRO DE POTÊNCIA DO PROTOCOLO DE ELETROPORAÇÃO	127
	APÊNDICE E – EXPANSÃO DO MÉTODO EDA PARA MULTIPOLOS DE DEBYE	129
	APÊNDICE F – ALGORITMO GENÉTICO	131
	APÊNDICE G – DISPERSÃO DE <i>SOLANUM TUBEROSUM</i> PARAMETRIZADA	136

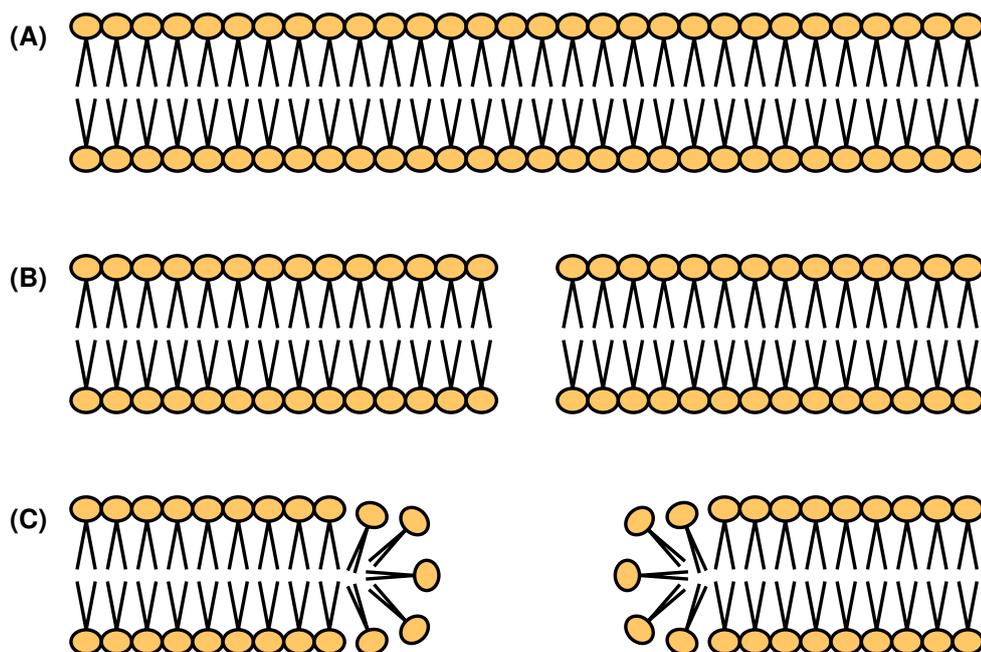
APÊNDICE H – DETERMINAÇÃO INICIAL DOS PARÂMETROS DO MODELO DINÂMICO DE <i>SOLANUM TUBEROSUM</i>	140
APÊNDICE I – CONCENTRAÇÃO DAS DINÂMICAS DA ELETROPORAÇÃO	143
ANEXO A – CERTIFICADO DE TERCEIRO COLOCADO NO CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA	146

1 INTRODUÇÃO

Quando uma célula é submetida a campos elétricos pulsados (PEF – *Pulsed Electric Fields*) de alta intensidade, sua permeabilidade é aumentada em um processo denominado eletropermeabilização (1, 2, 3). Embora os detalhes de como o processo ocorre fisicamente ainda não sejam totalmente entendidos, a teoria de abertura de poros devido a indução de um potencial transmembrana (TMP – *Transmembrane Potential*) supra-fisiológico é amplamente aceita pela literatura (3). Esse processo é denominado eletroporação. O potencial imposto sobre a membrana celular pode ocasionar pequenas falhas na bicamada fosfolipídica, gerando uma abertura de característica hidrofóbica. As falhas na membrana podem se reorganizar gerando uma abertura hidrofílica. Essas aberturas de escala nanométrica fornecem pouca resistência a passagem de íons, fluidos e outras substâncias com dimensões inferiores a dos poros (3, 4). A Figura 1 exemplifica o processo de abertura de poros hidrofílicos através de três estágios: membrana intacta, abertura do poro hidrofóbico (pré-poro) e formação do poro hidrofílico.

A membrana celular é uma barreira natural altamente seletiva, sendo responsável por um equilíbrio fino denominado homeostase (5, 6). É natural imaginar que a abertura de poros na membrana seja potencialmente perigosa para a quebra desse equilíbrio e conseqüente morte celular. Embora a membrana celular seja capaz de

Figura 1 – Processo de abertura dos poros devido ao potencial transmembrana supra-fisiológico



(A) Bicamada fosfolipídica intacta. (B) Abertura de poro hidrofóbico. (C) Reorganização da membrana e abertura de poro hidrofílico.

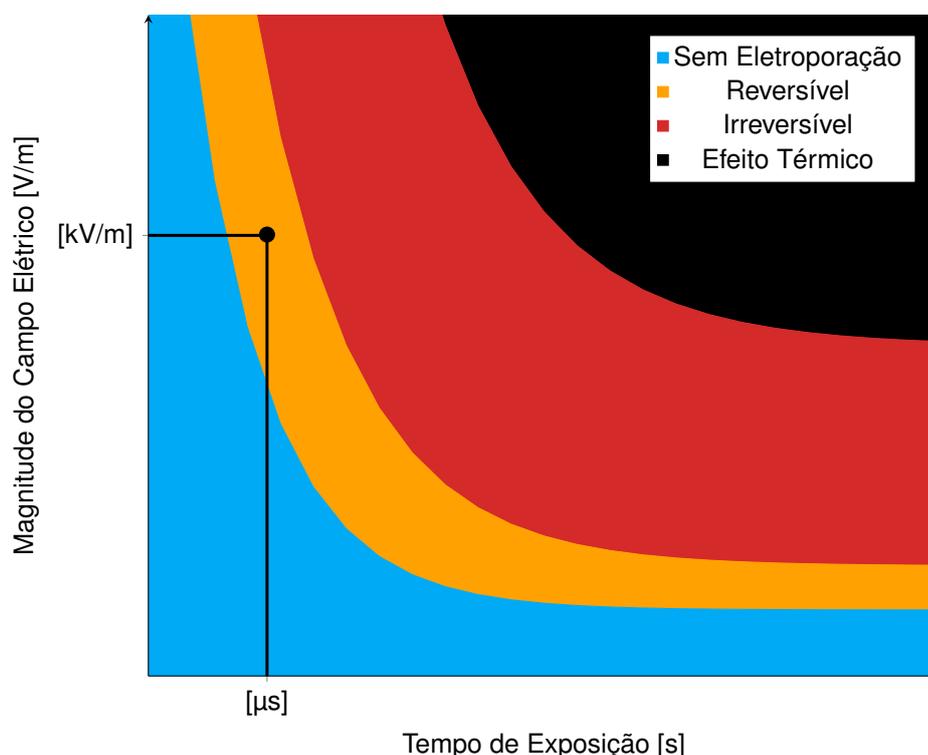
Fonte: Adaptado de (4).

retornar ao seu estado inicial após a supressão do estímulo elétrico, essa capacidade é limitada pela intensidade e tempo do estímulo.

Quatro situações principais podem ocorrer com a célula dependendo da intensidade e do tempo do estímulo. Caso a intensidade do campo esteja abaixo do limiar necessário para induzir o TMP supra-fisiológico, a célula não sofre a permeabilização. Em um segundo caso, se a intensidade do campo ou o tempo de exposição forem muito elevados, a célula acaba morrendo devido a perda de homeostase. Já em casos de intensidade e tempo extremamente elevados, danos térmicos devido ao aquecimento por efeito Joule também podem ser observados. Por fim, se estiver em limiares intermediários, a célula sofre a permeabilização, mas a membrana é capaz de voltar ao seu estado inicial após o cessar do estímulo (7). Os processos de morte celular sem danos térmicos e permeabilização temporária são denominados eletroporação irreversível e eletroporação reversível, respectivamente. A Figura 2 mostra graficamente os possíveis desfechos do estímulo a partir da relação entre tempo de exposição e magnitude do campo elétrico. A região indicada (ordem de magnitude de kV/m e duração de μ s) pertence à região de interesse usada no decorrer desse trabalho.

Existem aplicações tanto médicas quanto industriais para os efeitos da eletroporação. A eletroporação reversível pode ser utilizada para transportar substâncias

Figura 2 – Representação ilustrativa da relação entre a magnitude do campo elétrico e o tempo de exposição para ocorrência dos quatro possíveis desfechos ao estimular células com campos elétricos



Fonte: Adaptado de (5, 7).

pela membrana. Transferência genética (8) e catalisação de efeitos medicamentosos, especialmente quimioterápicos (9), são exemplos de aplicações. Já a eletroporação irreversível pode ser utilizada como técnica de ablação não-térmica de tecidos (10, 11) e pasteurização não-térmica de alimentos (12, 13, 14), uma vez respeitados os limites para evitar ou mitigar danos térmicos associados.

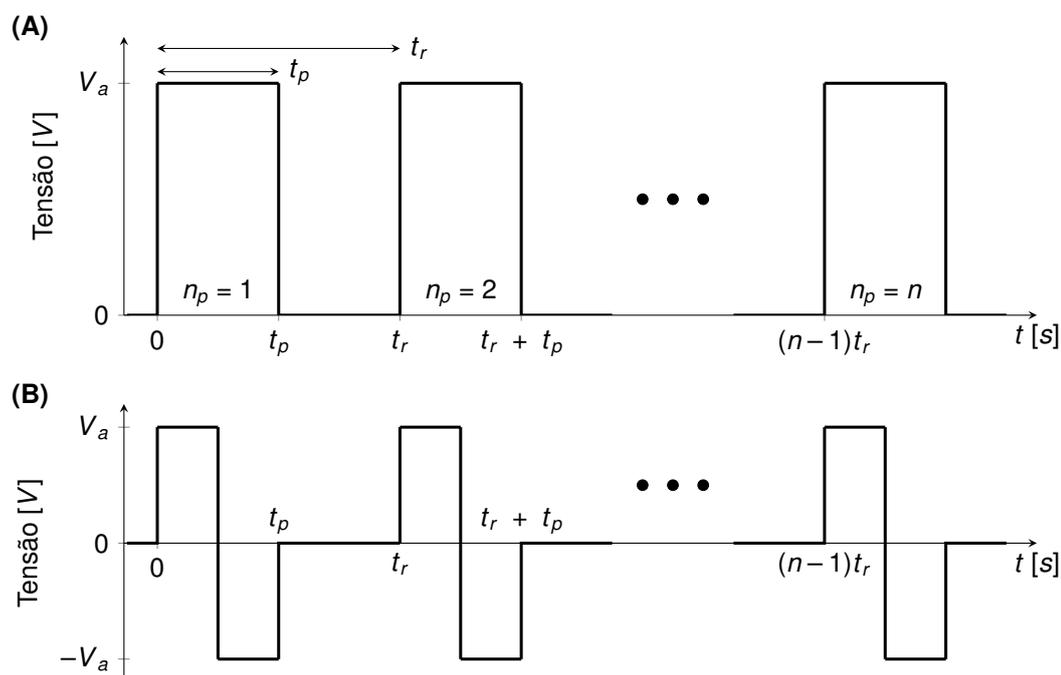
A catalisação de quimioterápicos pelo efeito da eletroporação é denominada eletroquimioterapia. A técnica foi precursora nos procedimentos médicos por eletroporação, utilizando a eletroporação reversível para aumentar a citotoxicidade dos medicamentos ao acelerar seu processo de entrada na célula tumoral (15). Como a eletroporação é utilizada de maneira reversível, ela não causa morte tecidual diretamente, mantendo a alta seletividade de tratamentos por quimioterapia. Uma das vantagens da técnica é a redução de doses medicamentosas (e consequentemente os efeitos colaterais) usando a eletroporação como garantidor de que as células tumorais serão expostas ao efeito do quimioterápico (16). Além disso, a circulação sistêmica do fármaco por vezes também pode ser substituída por aplicações intra-tumorais (17), reduzindo ainda mais os efeitos colaterais do tratamento.

Apesar dos benefícios, a eletroquimioterapia também introduz desafios, já que é necessário assegurar que todo o tecido tumoral seja devidamente eletroporado. Garantir a exposição de todas as células tumorais a níveis de estímulo mínimos para a ocorrência de eletroporação não é uma tarefa trivial (18, 19), já que seus efeitos não são instantaneamente visíveis, especialmente em tecidos animais. Os resultados do tratamento só são conhecidos horas ou mesmo dias após a aplicação do estímulo (20). Para mitigar a possibilidade de falhas – que nesse caso se traduzem em regiões tumorais não eletroporadas – são utilizados protocolos procedurais e técnicas de simulação numérica.

Os Procedimentos Operacionais Padrão em Eletroquimioterapia Europeu (ESOPE) foram publicados inicialmente em 2006 (21), recebendo uma atualização em 2018 (22). Os procedimentos reúnem recomendações de eletrodos e tensões que devem ser utilizados em diferentes casos de tratamento tumoral (23), buscando diminuir a possibilidade de falhas na cobertura do tumor pela eletroporação. O ESOPE também define o protocolo de estímulo, indicando que o mesmo deve ser composto de oito pulsos quadrados (monopolares, bipolares ou alternados) com a tensão recomendada para o eletrodo utilizado. Cada pulso deve ter duração de 100 μ s e repetir a cada 200 μ s ou 1 s (o que corresponde a frequências de repetição entre 5 kHz e 1 Hz). A Figura 3 mostra graficamente dois protocolos do ESOPE. Devido ao seu pioneirismo, os protocolos do ESOPE serviram de base para as demais técnicas de eletroporação em tecidos, como, por exemplo, a ablação por eletroporação irreversível, que adota o mesmo pulso quadrado, mas em sequências de até 50 pulsos.

Além dos procedimentos operacionais, a segurança e desenvolvimento da ele-

Figura 3 – (A) Trem de pulsos monopolar e (B) trem de pulsos bipolar recomendados pelo ESOPE



t_p é o tempo do pulso, definido como $100 \mu\text{s}$. t_r é o tempo de repetição entre cada pulso, que varia de 1 s à $200 \mu\text{s}$. n_p é o número do pulso, sendo $n = 8$ para o ESOPE.

Fonte: Produzido pelo autor.

troporação se baseiam em simulações numéricas. Simulações numéricas permitem observar a distribuição do campo elétrico e a densidade de corrente elétrica em geometrias complexas, permitindo a avaliação de diferentes topologias de eletrodos e assegurando a segurança de tratamentos através de estudos pré-clínicos (24, 25, 26). No campo da eletroporação em tecidos, simuladores comerciais, em especial o COMSOL Multiphysics (COMSOL Inc., www.comsol.com), são frequentemente utilizados (24, 27, 28, 29), uma vez que a curva de aprendizado é menor em relação a implementações por código, variações em parâmetros de entrada como geometrias e malhas são fáceis de implementar e algoritmos de solução numérica são otimizados para diferentes campos da física (30).

Uma simulação só é confiável se os modelos matemáticos utilizados forem adequados. A eletroporação é um processo intrinsecamente elétrico e sua ocorrência altera as propriedades do tecido. Quanto maior a incidência de eletroporação, mais poros são criados e, conseqüentemente, maior a condutividade da membrana celular, visto que os poros fornecem pouca resistência ao fluxo de íons (31). Dessa forma, uma possibilidade de modelagem do fenômeno em tecidos recai sobre observar as alterações nas propriedades elétricas ocasionadas pelo efeito da eletroporação, principalmente a condutividade (32, 33, 34). Como a distribuição de campo elétrico e a densidade de corrente elétrica dependem das propriedades elétricas do meio, é

necessário modelar essa alteração para a obtenção de resultados adequados.

Os estudos realizados em escala tecidual visam avaliar primariamente o desfecho do tratamento, observando quais regiões do tecido serão estimuladas com campo elétrico suficiente para ocorrência do efeito e qual será a corrente necessária (20, 24, 35, 36). Nesses casos não é necessário estudar o comportamento dinâmico, portanto as simulações são realizadas geralmente em domínio estático. Um modelo estático representa um instante de tempo fixo nos protocolos de eletroporação. Dessa forma, os modelos estáticos para eletroquimioterapia relacionam a variação da condutividade do tecido com a ocorrência da eletroporação baseados nos valores experimentais no último pulso do protocolo do ESOPE (37, 38, 39). Esses modelos são geralmente determinados utilizando o protocolo unipolar com 1 Hz de frequência de repetição, que corresponde ao principal protocolo utilizado no início do desenvolvimento da técnica.

Atualmente, existe uma discussão na literatura sobre qual frequência de repetição deve ser utilizada em procedimentos por eletroquimioterapia. O argumento para o uso de 5 kHz é baseado no menor desconforto do paciente, já que apenas uma contração muscular é ocasionada pelo estímulo elétrico (40, 41, 42, 43). Por outro lado, estudos demonstram que a aplicação com 1 Hz é mais eficaz no tratamento dos tumores (44) e possui menor efeito térmico associado (45). Apesar da discussão ainda ativa, a utilização da frequência de 5 kHz têm sido amplamente adotada nos tratamentos.

A definição dos modelos estáticos não carrega informações sobre questões temporais do protocolo (37, 38, 39). Dessa forma, alterar a frequência de repetição pode inviabilizar o modelo, uma vez as propriedades elétricas do tecido e as dinâmicas da eletroporação são influenciadas pelo protocolo utilizado (46). Apesar disso, os modelos desenvolvidos com frequências de repetição de 1 Hz passaram a ser empregados em simulações também para 5 kHz, sem uma avaliação que comprovasse a validade dos modelos para um protocolo com característica temporal diferente.

Em um primeiro estudo, avaliamos a alteração da corrente elétrica em três tecidos de origem animal com a mudança da frequência de repetição do protocolo do ESOPE entre 1 Hz e 5 kHz. O estudo demonstrou um aumento da corrente elétrica para a frequência de repetição de 5 kHz e potencial erros de predição do modelo estático, confirmando uma importante limitação desses modelos. Apesar de existirem maneiras empíricas para a solução parcial do problema, a utilização de modelos dinâmicos de eletroporação em tecidos parece ser a melhor forma de ampliar os estudos em eletroquimioterapia e eletroporação tecidual em geral.

Atualmente, existem três propostas de modelos dinâmicos de eletroporação em tecidos publicadas (47, 48, 49, 50, 51, 52). Apesar dos resultados promissores, os modelos apresentam algumas limitações, como a concepção baseada em formulações empíricas sem contexto físico (47), a incapacidade de prever um trem de pulsos (prevendo somente um degrau unitário) (48), ajustes nos parâmetros do modelo depen-

dendo de variações na entrada (49, 50, 51, 52) e utilização de *softwares* próprios, sem ampla disponibilidade acadêmica (49, 50, 51). Além disso, um modelo desconsidera totalmente (47) e dois modelos consideram apenas parcialmente (48, 49, 50, 51, 52) as características dispersivas das propriedades elétricas dos tecidos.

Dessa forma, propomos o desenvolvimento de um novo modelo dinâmico de eletroporação em tecidos, capaz de considerar as propriedades elétricas do tecido e suas variações devido à ocorrência da eletroporação. O desenvolvimento inicia com o estudo sobre os efeitos dispersivos de tecidos biológicos no domínio do tempo, apresentando uma forma otimizada de inseri-los nos cálculos por elementos finitos no *software* comercial amplamente utilizado na eletroporação (COMSOL). Na sequência, extrapolamos um modelo dinâmico de células e para escala tecidual e inserimos as alterações das propriedades elétricas ocasionadas pela eletroporação. Por fim, os parâmetros do modelo são determinados para tecido de batata inglesa (*Solanum tuberosum*).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Desenvolver um modelo dinâmico de eletroporação em tecidos implementável em *software* de elementos finitos comercial (COMSOL).

1.1.2 Objetivos Específicos

- Inserir os efeitos dispersivos de tecidos biológicos em *software* comercial baseado em elementos finitos no domínio do tempo.
- Extrapolar um modelo dinâmico de células para escala tecidual.
- Realizar ensaios em tecidos biológicos para coletar tensão e corrente elétrica.
- Avaliar o modelo dinâmico com tecido de origem vegetal.

1.2 ORGANIZAÇÃO DO TRABALHO

O Capítulo 2 apresenta a fundamentação teórica para entendimento dos estudos realizados na tese. São apresentadas as características dispersivas dos tecidos e equações para parametrização, as etapas dinâmicas da eletroporação em células, os modelos estáticos de tecidos (37, 38, 39) e três modelos dinâmicos de tecidos (47, 48, 49).

O Capítulo 3 apresenta as definições metodológicas para as simulações e testes estatísticos utilizados nos capítulos seguintes.

O Capítulo 4 apresenta o estudo experimental de aumento de corrente elétrica dependendo da frequência de repetição utilizada no protocolo do ESOPE. O estudo elenca a limitação do modelo estático, indicando a necessidade do uso de modelos dinâmicos.

O Capítulo 5 apresenta o estudo para inserção dos efeitos dispersivos do tecido no domínio do tempo no COMSOL. A implementação proposta é testada através de estudos experimentais e simulados.

O Capítulo 6 apresenta o desenvolvimento do modelo dinâmico. O modelo é determinado para tecido vegetal (*Solanum tuberosum*) e avaliado no protocolo do ESOPE com frequência de repetição de 5 kHz.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo, entenderemos os fundamentos para caracterização das propriedades elétricas de tecidos biológicos, como a dinâmica da eletroporação altera essas propriedades em nível celular e como os efeitos da eletroporação em tecidos são modelados nos domínios estático e temporal.

2.1 CARACTERIZAÇÃO ELÉTRICA DE TECIDOS BIOLÓGICOS

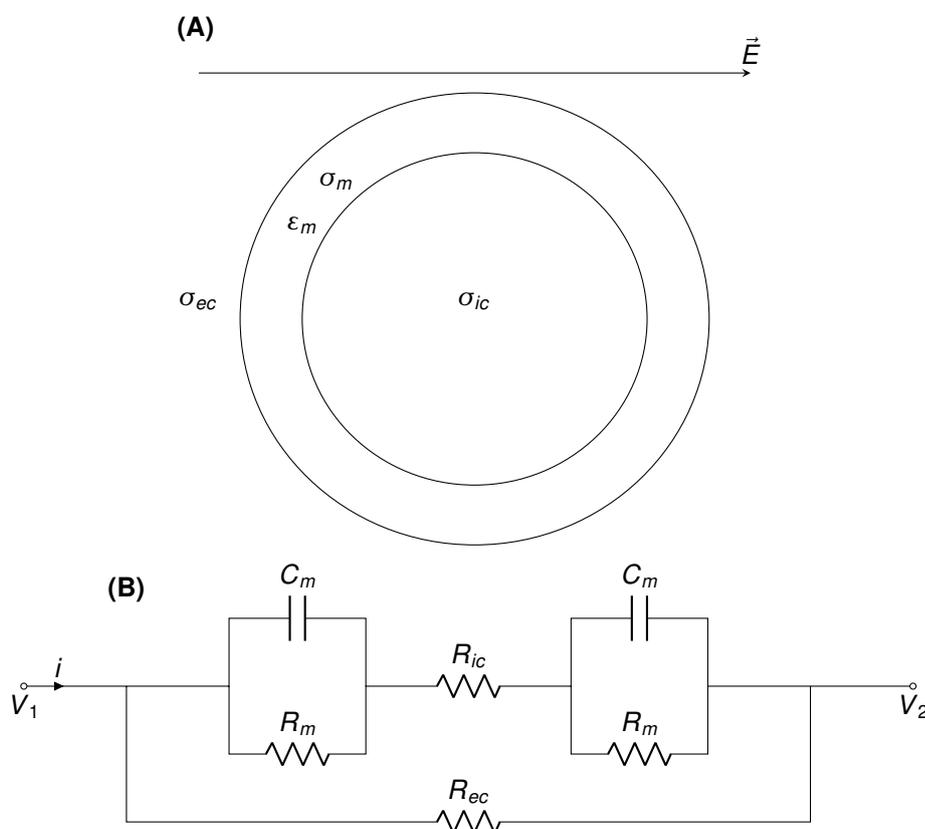
As equações de Maxwell considerando o meio de propagação, definem um material elétrico por três características principais: condutividade (denotada por σ), permissividade elétrica (ϵ) e permeabilidade magnética (μ). A condutividade expressa a facilidade com que o material é capaz de transportar cargas elétricas. A permissividade reflete a interação do material e dos campos elétricos devido à polarização. A permeabilidade é similar a permissividade, mas considerando campos magnéticos ao invés de elétricos.

Tecidos biológicos são estruturas extremamente complexas, com características únicas dependendo da sua função. Em comum, todos os tecidos são constituídos por células, que são as estruturas fundamentais de todos os organismos conhecidos. Do ponto de vista elétrico, tecidos são geralmente organizados em três ambientes principais: os meios intra e extracelulares, de característica primariamente resistiva, e a membrana celular, de característica primariamente capacitiva. Por essa razão, é comum encontrarmos na literatura representações de caracterização elétrica de tecidos biológicos com um circuito elétrico equivalente. A Figura 4 exemplifica essa relação.

Embora o circuito apresentado na Figura 4B represente a característica capacitiva predominante em tecidos, ele não consegue refletir toda a complexidade do sistema. Primeiramente porque circuitos elétricos são representações adimensionais para cálculos elétricos, enquanto tecidos são estruturas tridimensionais. Cálculos elétricos em estruturas tridimensionais envolvem a solução diretamente das equações de Maxwell. Outro ponto refere-se as características dos meios intra e extra-celulares, já que eles não são puramente resistivos devido a efeitos de polarização iônica. Quando medições de impedância em frequência são realizadas em tecidos, as características dos três ambientes elétricos e suas interações é refletida em uma dispersão dielétrica de alta complexidade (53, 54).

Denominamos dispersão dielétrica a variação em frequência das características elétricas de um meio. De maneira geral e em termos de propriedades elétricas equivalentes, os tecidos são pouco condutivos e muito permissivos em baixas frequências, com o acréscimo da condutividade e decréscimo da permissividade para frequências mais altas. Vale ressaltar que a permeabilidade magnética de tecidos biológicos não é

Figura 4 – Circuito elétrico equivalente para um modelo de célula com condutividade interna constante e polarização desprezível imersa em suspensão eletrólita de condutividade constante e polarização desprezível



(A) Modelo gráfico da célula. (B) Representação em circuito elétrico.
Fonte: Produzido pelo autor.

expressiva (55) e portanto não será considerada no contexto desse trabalho. É possível caracterizar quatro bandas de dispersão principais na faixa de frequências entre Hz e GHz a partir de medições de impedância realizadas em tecidos, são elas as bandas α , β , δ e γ (53, 54, 55, 56, 57, 58). Cada banda de dispersão possui diferentes causas principais. Embora normalmente denotadas separadamente, é importante notar que as bandas são naturalmente sobrepostas e interdependentes, e a separação serve apenas como forma de estudar os diferentes efeitos causadores.

A banda de dispersão α ocorre na faixa de frequência de 10 Hz à 10 kHz sendo geralmente associada aos processos de polarização iônica, em grande parte causadas pela resposta da atmosfera de contra-íon existente próximo à superfície da célula carregada. A atmosfera de contra-íon surge quando íons atraem íons de carga oposta diminuindo a mobilidade iônica na região (teoria de Debye-Hückel) (59). A presença de alguns tipos de organela, como o retículo sarcoplasmático em células musculares, também são associadas a forte dispersão α . Além disso, as membranas celulares

contêm canais iônicos com condutâncias variando nessa faixa de frequência, conforme previsto pelas equações de Hodgkin-Huxley (56, 57).

A banda de dispersão β usualmente ocorre na faixa de 10 kHz à 10 MHz estando relacionada principalmente à estrutura do tecido, com membranas celulares pouco condutivas que separam os meios intra e extra-celulares. Quando estimuladas por um campo elétrico, as membranas celulares sofrem um carregamento similar ao efeito de um capacitor, ocasionando uma polarização interfacial (efeito Maxwell-Wagner). Há também contribuições menores caracterizadas principalmente no final da banda de frequência da dispersão β , como a relaxação de proteínas e resíduos de aminoácidos de pequena extensão, além de efeitos Maxwell-Wagner de menor intensidade causados pelas organelas no interior da célula, especialmente núcleo e mitocôndrias (56, 57).

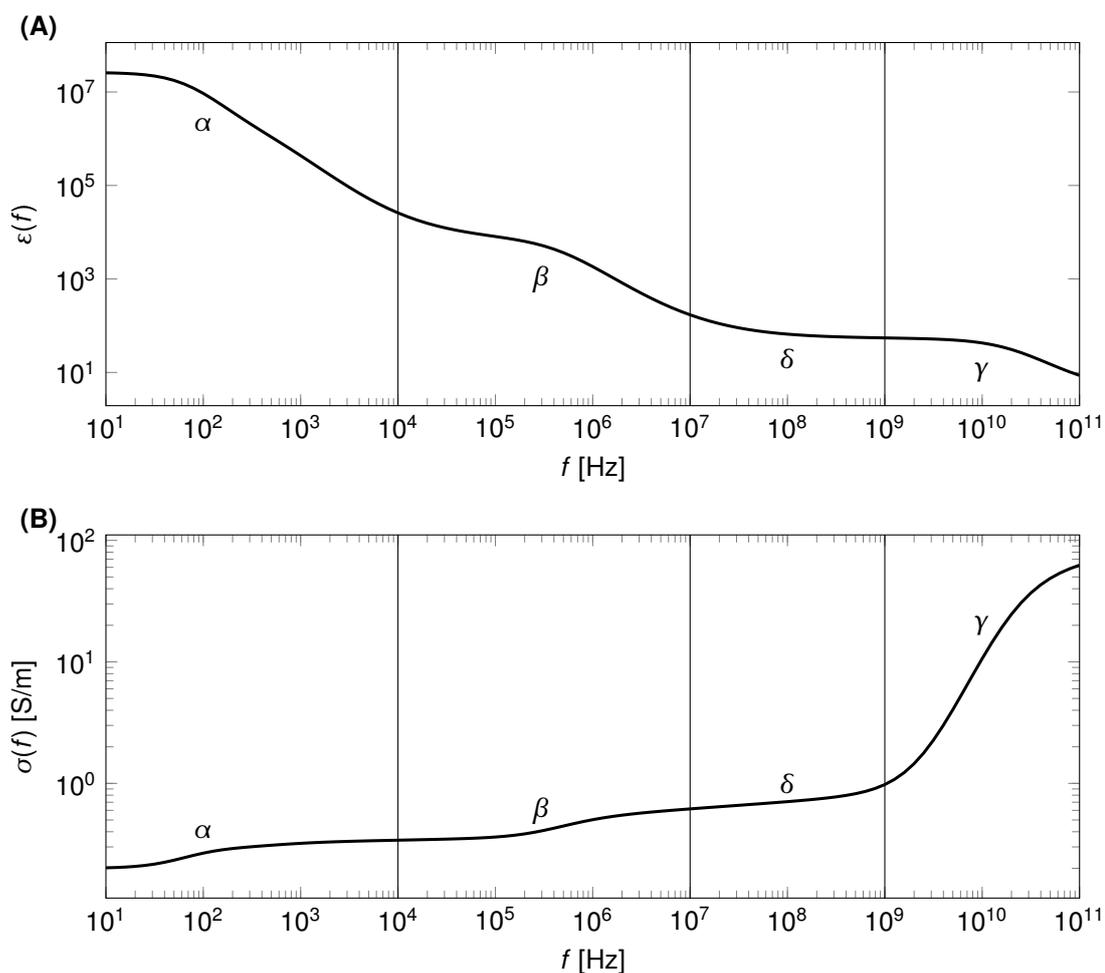
A banda de dispersão γ ocorre principalmente acima da frequência de 1 GHz e está relacionada à polarização da molécula de água. A molécula de água possui frequência de relaxação próxima à 20 GHz. Esse efeito é visível em uma grande gama de tecidos biológicos com tempo de relaxação muito similar, visto que as estruturas biológicas apresentam grandes concentrações de água. Um efeito dispersivo de menor intensidade, caracterizado pela banda δ , pode ser observado entre 10 MHz à alguns GHz, proveniente da ligação das moléculas de água com proteínas. Os efeitos da

Tabela 1 – Bandas de dispersões dielétricas relacionadas a diferentes meios e estruturas biológicas

Água e eletrólitos	γ
Macromoléculas Biológicas:	
Aminoácidos	$\delta + \gamma$
Proteínas	$\beta + \delta + \gamma$
Ácidos nucleicos	$\alpha + \beta + \delta + \gamma$
Vesículas, sem carga superficial	$\beta + \gamma$
com carga superficial	$\alpha + \beta + \gamma$
Células com membranas:	
+ fluidos sem proteínas	$\beta + \gamma$
+ proteínas	$\beta + \delta + \gamma$
+ carga superficial	$\alpha + \beta + \gamma$
+ relaxação da membrana	$\alpha + \beta + \gamma$
+ organelas	$\beta + \delta + \gamma$
+ sistema tubular	$\alpha + \beta + \gamma$
Células com membranas, cargas superficiais, organelas e proteínas	$\alpha + \beta + \delta + \gamma$

Fonte: Adaptado de (57).

Figura 5 – Dispersão dielétrica de tecido muscular com as respectivas bandas de dispersão



Fonte: Dados de músculo (54).

banda δ se sobrepõe aos efeitos citados anteriormente característicos do final da banda β (56, 57). A Tabela 1 mostra resumidamente as bandas de dispersão relacionadas com cada meio biológico. A Figura 5 apresenta a dispersão dielétrica de músculo de origem ovina com as respectivas bandas de dispersão (54).

O processo de caracterização das propriedades elétricas de tecidos biológicos envolve a medição da resposta em frequência através de um analisador de impedâncias e sua parametrização em modelos matemáticos. Nas próximas seções, estudaremos matematicamente as origens da dispersão dielétrica com base nas equações de Maxwell. Com isso, chegaremos aos modelos para parametrizar os dados experimentais.

2.1.1 Polarização não-instantânea

Os estímulos de campo elétrico induzem mudanças na distribuição das cargas elétricas, formam e reorientam os dipolos presentes no material. As mudanças nas

características elétricas do material devido ao estímulo de um campo elétrico externo são conhecidas como polarização. Dessa forma, a permissividade do material é um indicativo da capacidade do material de se polarizar.

Se o material é um dielétrico linear e a polarização é supostamente instantânea, a relação entre o vetor densidade de polarização (\vec{P}) e o campo elétrico aplicado (\vec{E}) é dada por

$$\vec{P} = \epsilon_0 \chi \vec{E} \quad 2.1$$

onde ϵ_0 é a permissividade do vácuo e χ a susceptibilidade do material.

As equações de Maxwell definem um vetor campo de deslocamento (\vec{D}), também denominado indução elétrica, de forma que

$$\vec{D} = \epsilon_0 \vec{E} + \vec{P} \quad 2.2$$

Substituindo 2.1 em 2.2

$$\vec{D} = \epsilon_0 (1 + \chi) \vec{E} \quad 2.3$$

E utilizando a relação entre susceptibilidade e permissividade, tem-se

$$\vec{D} = \epsilon_0 \epsilon_r \vec{E} \quad 2.4$$

onde ϵ_0 é a permissividade do vácuo e ϵ_r a permissividade relativa do material. Note que a susceptibilidade está diretamente relacionada com a permissividade através da relação $\epsilon_r = (1 + \chi)$.

O equacionamento apresentado considera que a polarização do material é instantânea, ou seja, o vetor densidade de polarização (\vec{P}) atinge seu valor máximo sem qualquer atraso em relação ao campo elétrico (\vec{E}). Na prática, materiais elétricos apresentam efeitos de polarização por diversas causas, como polarização eletrônica, iônica, dipolar e interfacial (60).

Quando o material está em estado de equilíbrio elétrico e de repente é estimulado por um campo elétrico, leva-se um tempo finito e não-nulo para que a polarização atinja seu valor máximo. De maneira semelhante, leva-se um tempo finito e não-nulo para o material retornar ao estado de equilíbrio quando o estímulo é interrompido. Denominamos esse efeito como relaxação dielétrica. Uma constante de tempo τ é utilizada para definir a constante de tempo da dinâmica do processo de relaxação (61).

De fato, o processo de polarização é entendido por duas frações principais, \vec{P}_1 resultante de processos eletrônicos e atômicos e \vec{P}_2 resultante dos demais processos (62). Dessa forma, a equação 2.1 pode ser adaptada para

$$\vec{P} = \vec{P}_1 + \vec{P}_2 \quad 2.5$$

\vec{P}_1 normalmente possui constante de tempo τ desprezível e \vec{P}_2 possui um atraso relativo ao campo elétrico aplicado.

2.1.2 Polarização e dispersão de Debye

Debye (63) teorizou o fenômeno de polarização orientacional em gases de baixa pressão. A teoria relata que o processo de polarização do material pela indução de um campo elétrico aplicado compete com a ação de entropia causado pela agitação das moléculas por efeito térmico. Se o material é composto por um único tipo de dipolos que não interagem entre si e for estimulado com um campo elétrico \vec{E} , os vetores densidade de polarização \vec{P}_1 e \vec{P}_2 , segundo Debye, obedecem a seguintes equações

$$\vec{P}_1 = \epsilon_0 \chi_1 \vec{E} \quad 2.6$$

$$\tau \frac{d\vec{P}_2}{dt} = \epsilon_0 \chi_2 \vec{E} - \vec{P}_2 \quad 2.7$$

\vec{P}_1 é definido conforme a Equação 2.6, acompanhando instantaneamente o valor do campo elétrico \vec{E} . Já \vec{P}_2 possui um atraso de constante de tempo τ em relação ao campo aplicado. O valor limite para \vec{P}_2 é definido como $\epsilon_0 \chi_2 \vec{E}$. Para entendermos melhor o fenômeno, podemos avaliar a resposta ao degrau unitário ($u(t)$). Se $\vec{E} = E_0 u(t)$ e $\vec{P}_2(0) = 0$, o vetor densidade de polarização elétrica tem solução

$$\vec{P}(t) = \left[\chi_1 + \chi_2 \left(1 - e^{-\frac{t}{\tau}} \right) \right] \epsilon_0 E_0 \quad 2.8$$

A Figura 6 mostra graficamente a evolução do campo $\vec{P}(t)$ em função do tempo. É possível notar que existe uma parcela instantaneamente polarizada no momento $t = 0$, seguido de um crescimento exponencial até o valor máximo de polarização.

Para analisarmos a resposta de um sistema, podemos generalizar a expressão utilizando a sua resposta ao impulso. Calculando a resposta ao impulso de um campo elétrico do vetor densidade de polarização temos

$$h_{\vec{P}} = \epsilon_0 \left(\chi_1 + \frac{\chi_2}{\tau} e^{-\frac{t}{\tau}} \right) \quad 2.9$$

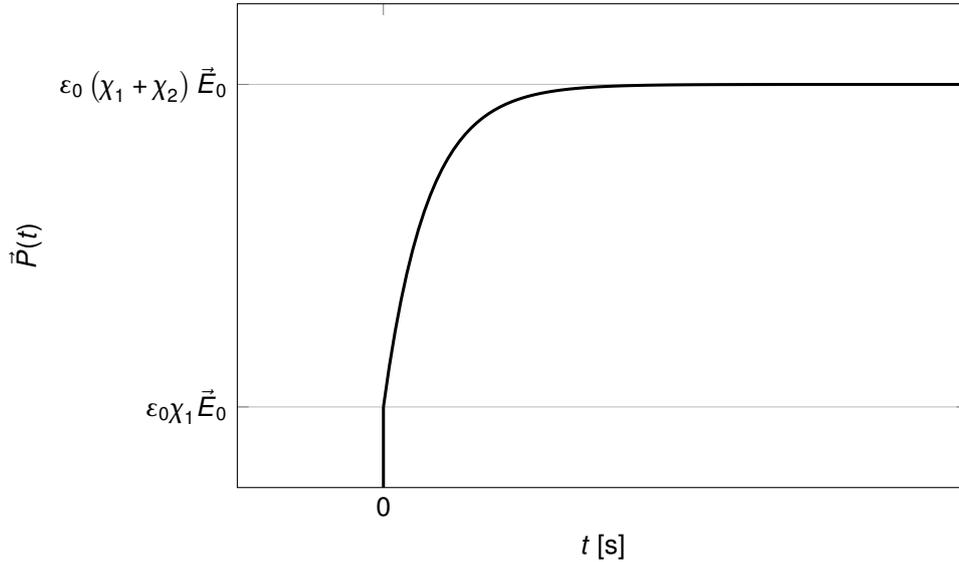
Por fim, calculamos a resposta ao impulso do campo deslocamento elétrico

$$h_{\vec{D}} = \epsilon_0 \left(1 + \chi_1 + \frac{\chi_2}{\tau} e^{-\frac{t}{\tau}} \right) \quad 2.10$$

Usando a relação $\epsilon_1 = \chi_1 + 1$ e calculando a resposta para qualquer campo elétrico

$$\vec{D}(t) = \epsilon_0 \left(\epsilon_1 + \frac{\chi_2}{\tau} e^{-\frac{t}{\tau}} \right) * \vec{E}(t) \quad 2.11$$

Figura 6 – Aumento do vetor densidade de polarização no tempo após o estímulo de um campo elétrico \vec{E}_0 constante em $t = 0$ (degrau unitário)



Fonte: Produzido pelo autor.

Podemos, então, utilizar a propriedade que a convolução torna-se uma multiplicação na frequência. Realizando a transformada de Fourier do campo de deslocamento elétrico ($\mathcal{F}(\vec{D}(t)) = \vec{D}(\omega)$) obtemos

$$\vec{D}(\omega) = \epsilon_0 \overbrace{\left(\epsilon_1 + \frac{\chi_2}{1 + j\omega\tau} \right)}^{\epsilon_r^*(\omega)} \vec{E}(\omega) \quad 2.12$$

O que gera uma permissividade relativa complexa em função da frequência, ou seja, a polarização não-instantânea no tempo é refletida na dispersão em frequência.

Para facilitar o entendimento da equação, Debye sugere calcularmos a permissividade complexa para altas frequências ($\epsilon_\infty = \epsilon_r^*(\omega \rightarrow \infty)$) e estática ($\epsilon_s = \epsilon_r^*(\omega \rightarrow 0)$), dessa forma, temos

$$\epsilon_\infty = \lim_{\omega \rightarrow \infty} \left(\epsilon_1 + \frac{\chi_2}{1 + j\omega\tau} \right) = \epsilon_1 \quad 2.13$$

$$\epsilon_s = \lim_{\omega \rightarrow 0} \left(\epsilon_1 + \frac{\chi_2}{1 + j\omega\tau} \right) = \epsilon_1 + \chi_2 \quad 2.14$$

Assim, podemos redefinir a permissividade relativa complexa considerando que $\epsilon_1 = \epsilon_\infty$ e $\chi_2 = \epsilon_s - \epsilon_\infty = \Delta\epsilon$, resultando na dispersão de Debye

$$\epsilon_r^*(\omega) = \epsilon_\infty + \frac{\Delta\epsilon}{1 + j\omega\tau} \quad 2.15$$

O desenvolvimento apresentado considera apenas um efeito de polarização não instantâneo no tempo, refletido em um polo de dispersão na frequência. Um material

pode ser constituído de N diferentes polos de dispersão. A expansão da equação de Debye para multipolos resulta em

$$\varepsilon_r^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \sum_{k=1}^N \frac{\Delta\varepsilon_k}{1 + j\omega\tau_k} \quad 2.16$$

onde k representa cada polo de dispersão, $\Delta\varepsilon_k$ é a variação da permissividade referente ao polo e τ_k é o tempo de relaxação do polo.

2.1.3 Dispersão de Debye completa

Uma outra forma de representar a dispersão de Debye é utilizá-la para carregar toda a informação do material, incluindo a parcela da condutividade. A equação de Maxwell-Ampère no domínio da frequência é definida da seguinte forma

$$\vec{J} = \sigma \vec{E} + j\omega\varepsilon_0\varepsilon_r \vec{E} \quad 2.17$$

Note que podemos reorganizar a equação acima de forma que

$$\vec{J} = j\omega\varepsilon_0 \left(\frac{\sigma}{j\omega\varepsilon_0} + \varepsilon_r \right) \vec{E} \quad 2.18$$

ε_r foi definida como a dispersão de Debye apresentada nas equações 2.15 e 2.16, mas é possível redefini-la de forma que

$$\varepsilon_r^*(\omega) = \frac{\sigma_s}{j\omega\varepsilon_0} + \varepsilon_\infty + \sum_{k=1}^N \frac{\Delta\varepsilon_k}{1 + j\omega\tau_k} \quad 2.19$$

Note que definimos $\sigma = \sigma_s$ pois consideramos que essa é a parcela estática da condutividade, isto é, independente da frequência. Com isso, chegamos a uma equação de dispersão que carrega todas as características elétricas do material. Na próxima seção discutiremos como a dispersão de Debye afeta individualmente a permissividade e a condutividade do material.

2.1.4 Efeito da dispersão de Debye na condutividade e permissividade

Um dos efeitos importantes da polarização do material, refletida na dispersão em frequência, é a variação da condutividade devido a ocorrência do fenômeno. A polarização não altera diretamente o número de cargas livres relacionadas à condutividade do material, mas componentes da corrente de indução podem ser interpretadas como uma contribuição na corrente de condução.

Para observar analiticamente o aumento da condutividade do material devido a dispersão dielétrica, podemos definir que um polo de dispersão de Debye, representado na Equação 2.19, pode ser separado em duas componentes, uma real e uma imaginária, de forma que

$$\varepsilon^* = \varepsilon' - j\varepsilon'' \quad 2.20$$

Dessa forma, podemos calcular as partes reais e imaginárias correspondendo a

$$\varepsilon' = \Re(\varepsilon_r^*(\omega)) = \Re\left(\frac{\sigma_s}{j\omega\varepsilon_0} + \varepsilon_\infty + \frac{\Delta\varepsilon}{1 + j\omega\tau}\right) = \varepsilon_\infty + \frac{\Delta\varepsilon}{1 + \omega^2\tau^2} \quad 2.21$$

$$\varepsilon'' = -\Im(\varepsilon_r^*(\omega)) = -\Im\left(\frac{\sigma_s}{j\omega\varepsilon_0} + \varepsilon_\infty + \frac{\Delta\varepsilon}{1 + j\omega\tau}\right) = \frac{\sigma_s}{\omega\varepsilon_0} + \omega\tau \frac{\Delta\varepsilon}{1 + \omega^2\tau^2}$$

Considerando agora a Lei de Maxwell-Ampère no domínio da frequência, apresentada na Equação 2.17, suprimindo a parcela da corrente de condução (visto que adicionamos ela na definição da dispersão) e substituindo a dispersão de Debye pelas suas componentes reais e imaginárias apresentadas na Equação 2.20, temos

$$\vec{J}(\omega) = j\omega\varepsilon_0 (\varepsilon' - j\varepsilon'') \vec{E}(\omega) \quad 2.22$$

Realizando a distributiva

$$\vec{J}(\omega) = \overbrace{(j\omega\varepsilon_0\varepsilon'')}^{\sigma(\omega)} \vec{E}(\omega) + j\omega\varepsilon_0\varepsilon' \vec{E}(\omega) \quad 2.23$$

Se considerarmos uma frequência muito acima da frequência fundamental do polo de dispersão, podemos calcular o acréscimo de condutividade total relativo àquele polo de dispersão de Debye, de forma que

$$\lim_{\omega \rightarrow \infty} \sigma(\omega) = \lim_{\omega \rightarrow \infty} \omega\varepsilon_0\varepsilon'' \quad 2.24$$

Substituindo ε'' e calculando o limite

$$\lim_{\omega \rightarrow \infty} \sigma_s + \omega^2\tau \frac{\varepsilon_0\Delta\varepsilon}{1 + \omega^2\tau^2} = \sigma_s + \frac{\varepsilon_0\Delta\varepsilon}{\tau} = \sigma_\infty \quad 2.25$$

Assim, considerando que o acréscimo da condutividade é dada pela relação $\Delta\sigma = \sigma_\infty - \sigma_s$, temos

$$\Delta\sigma = \frac{\varepsilon_0\Delta\varepsilon}{\tau} \quad 2.26$$

onde $\Delta\sigma$ representa o acréscimo da condutividade relativo à condutividade estática do material para um polo de dispersão de Debye.

De maneira geral, podemos definir o aumento de permissividade e condutividade dependentes da frequência devido a dispersão de Debye como

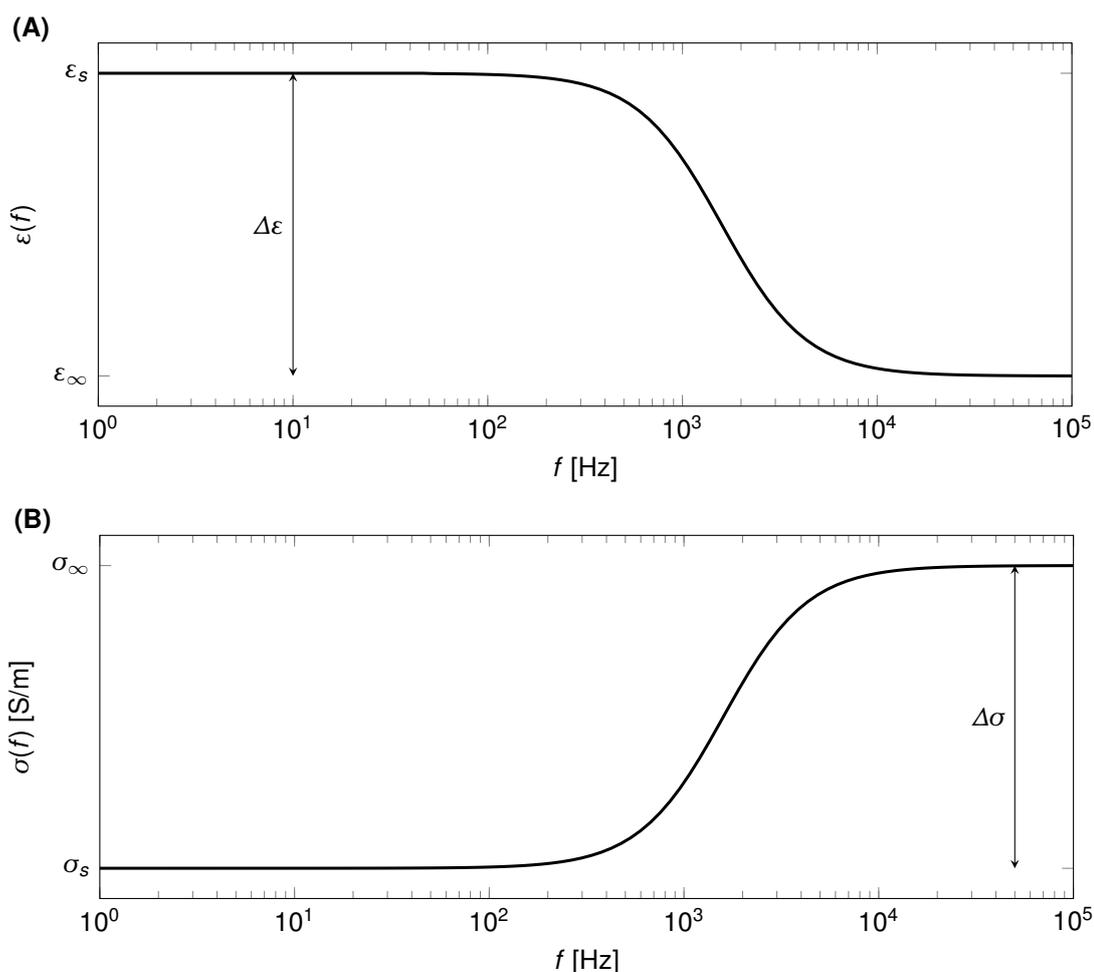
$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\Delta\varepsilon}{1 + \omega^2\tau^2} \quad 2.27$$

$$\sigma(\omega) = \sigma_s + \omega^2 \tau^2 \frac{\Delta\sigma}{1 + \omega^2 \tau^2}$$

A Figura 7 mostra graficamente o aumento da condutividade e a diminuição da permissividade relativa em função da frequência devido a uma dispersão de Debye com tempo de relaxação $\tau = 100 \mu\text{s}$. Note que, como o gráfico está indicado através da frequência em Hertz, é necessário realizar a conversão $\omega = 2\pi f$.

O desenvolvimento do modelo de dispersão de Debye proporcionou a capacidade de parametrizar os resultados práticos observados. O processo de caracterização elétrica de um material envolve a medição de sua impedância com relação a frequência através de um analisador de impedâncias. Esses dados podem ser então parametrizados em um modelo matemático. No entanto, conforme discutido anteriormente, as

Figura 7 – Exemplo gráfico da diminuição da permissividade relativa (A) e do aumento da condutividade (B) em função da frequência devido a um polo de dispersão de Debye com tempo de relaxação de $100 \mu\text{s}$



σ_s e σ_∞ são as condutividades estáticas e para altas frequências, respectivamente. ϵ_s e ϵ_∞ são as permissividades em baixa e alta frequência. $\Delta\sigma$ e $\Delta\epsilon$ são as variações de condutividade e permissividade do polo de dispersão.

Fonte: Produzido pelo autor.

medições em tecidos biológicos resultam em uma dispersão de alta complexidade. A parametrização com o modelo de Debye provou-se complexa para esses casos. Para facilitar o processo de parametrização, diversos modelos de dispersão foram propostos a partir do modelo de Debye.

2.1.5 Dispersão de Cole-Cole

O estudo dos irmãos Cole (64, 65) propôs uma generalização do modelo proposto por Debye adicionando empiricamente um fator λ^1 no expoente da constante de relaxação complexa, conforme mostrado na equação a seguir

$$\varepsilon_r^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\Delta\varepsilon}{1 + (j\omega\tau)^{1-\lambda}} \quad 2.28$$

onde λ é um número entre 0 e 1.

Assim como o modelo de Debye, o modelo de Cole-Cole pode ser extrapolado para diversos polos e apresentado de forma completa com a adição da condutividade estática, conforme a equação abaixo.

$$\varepsilon_r^*(\omega) = \frac{\sigma_s}{j\omega\varepsilon_0} + \varepsilon_\infty + \sum_{k=1}^N \frac{\Delta\varepsilon_k}{1 + (j\omega\tau_k)^{1-\lambda_k}} \quad 2.29$$

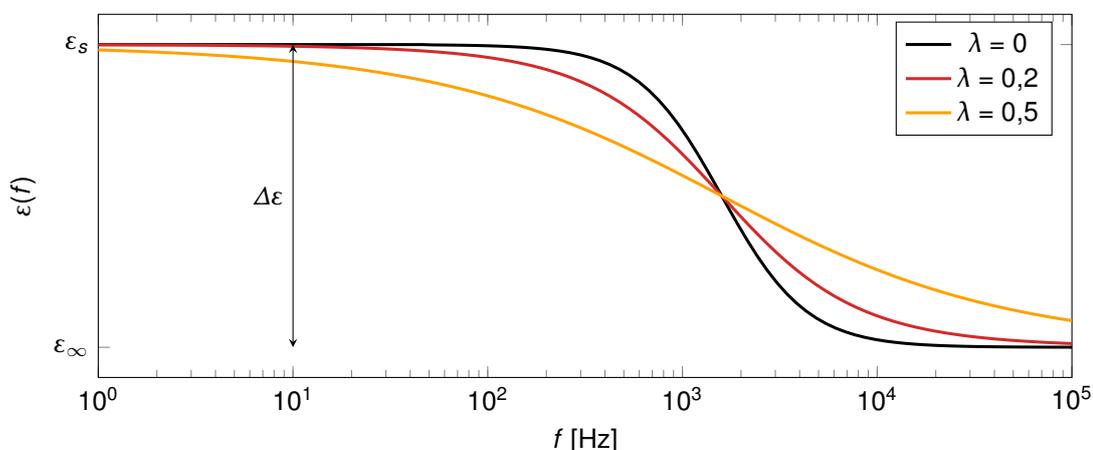
A adição de um novo parâmetro permite ajustar a curva de dispersão dielétrica com menores erros em relação as bandas de Debye. Note que para o caso específico onde $\lambda = 0$, as dispersões de Cole-Cole e Debye são iguais. Ao variar λ o formato da curva na frequência é esticado, permitindo um maior controle na geração do modelo. A Figura 8 mostra graficamente a diferença entre $\lambda = 0$ (dispersão de Debye), $\lambda = 0,2$ e $\lambda = 0,5$ na permissividade relativa do mesmo exemplo mostrado na Figura 7.

Gabriel *et al.* (53, 54) realizaram medições de dispersão dielétrica em diversos tecidos biológicos e parametrizaram os dados utilizando o modelo de Cole-Cole. Os tecidos são caracterizados por quatro polos de Cole-Cole, cada um representando as principais bandas discutidas anteriormente: α , β , δ e γ . Como os erros entre os dados experimentais e as representações por quatro polos de Cole-Cole são pequenos, tornou-se padrão a representação de tecidos biológicos através do modelo de Cole-Cole (55).

Dessa forma, é possível representar matematicamente as características elétricas de um material biológico através dos modelos de Cole-Cole. No entanto, a eletroporação altera a estrutura celular e suas propriedades elétricas, especialmente a condutividade da membrana celular. Na seção seguinte, estudaremos a dinâmica do processo de abertura de poros e sua influência na condutividade da membrana celular e do tecido.

¹ Usualmente se utiliza α para denotar o fator de Cole-Cole, como α também é utilizado para descrever uma banda de dispersão, λ foi adotado no caso do modelo.

Figura 8 – Exemplo gráfico da diminuição da permissividade relativa em função da frequência devido a um polo de dispersão de Cole-Cole para diferentes parâmetros empíricos



Tempo de relaxação é de 100 μ s para as três curvas. λ é o parâmetro empírico da dispersão de Cole-Cole. $\Delta\epsilon$ é a variação de permissividade do polo de dispersão.

Fonte: Produzido pelo autor.

2.2 ELETROPORAÇÃO EM CÉLULAS

A membrana celular é uma barreira capaz de opor-se ao natural deslocamento de cargas elétricas e concentrações químicas causadas por difusão e osmose. Através de um complexo sistema de canais de entrada e saída, ela é responsável por manter o equilíbrio homeostático, condição essencial para manutenção da vida (6). Há, naturalmente, uma diferença de potencial sobre a membrana – a qual denominamos potencial transmembrana (ou TMP, da sigla em inglês) – causada pela diferença de concentração de íons no meio intra e extra celulares. Usualmente o valor do TMP permanece na faixa de -40 mV à -70 mV para células eucarióticas quando referenciado ao ambiente extra celular (6). A membrana é capaz de suportar esse potencial até um determinado limiar fisiológico, mas a indução de potenciais supra-fisiológicos pode causar mudanças em sua estrutura (31).

A eletroporação ocorre quando o potencial transmembrana atinge níveis supra-fisiológicos (> 200 mV) devido ao estímulo de um campo elétrico externo. Embora o fenômeno não seja visualmente observável devido as dimensões e intervalos de tempo para sua ocorrência serem extremamente reduzidos, uma possibilidade discutida na literatura é de que o TMP supra-fisiológico induza uma entortamento do fosfolípídeo, ocasionando uma falha na membrana de característica hidrofóbica, por vezes denominada de pré-poro. Em escala temporal, a abertura dos pré-poros ocorre nos primeiros nanosegundos após o estímulo elétrico, aumentando rapidamente a condutividade da membrana (3, 66, 67, 68, 69). Com a persistência do estímulo, os fosfolípídios adjacentes à falha acabam se reorganizando por processos elétricos e químicos, criando poros de característica hidrofílica. Esse processo ocorre na escala de microssegundos,

aumentando a permeabilidade (seleção de substâncias que entram e saem da célula) da membrana, o que também resulta em um novo acréscimo na condutividade (3, 67, 68, 69, 70). Com o cessar do estímulo, a membrana inicia um processo de recuperação, onde a condutividade e a permeabilidade apresentam uma queda inicial brusca (microsegundos para condutividade e milissegundos para permeabilidade), estabilizando em um determinado valor que ainda permite a difusão de íons e moléculas (3, 67, 69, 71). A membrana, então, gradualmente recupera seu nível fisiológico de permeabilidade nos próximos segundos à minutos (a menos que o dano seja irreversível, causando a perda da viabilidade celular) (3, 69, 72, 73, 74, 75). Mesmo após o completo fechamento dos poros, a célula ainda pode exibir alterações em suas funções fisiológicas, até finalmente retornar completamente ao seu estado normal (3, 76, 77).

Os processos descritos anteriormente são geralmente separados em cinco fases: iniciação, com a abertura dos pré-poros; expansão, com a criação dos poros hidrofílicos; recuperação parcial, que ocorre assim que o estímulo é interrompido; selamento, com o fechamento total dos poros; e memória, com efeitos fisiológicos que podem durar horas. O estudo em células isoladas busca modelar esse processo dinâmico da abertura dos poros. Como observar diretamente a abertura dos poros não é possível, a eletroporação é geralmente avaliada pelos seus efeitos, principalmente no aumento da condutividade da membrana. Modelos matemáticos ajudam a entender o fenômeno e explicar os resultados experimentais (31).

2.2.1 Modelo cinético de eletroporação celular

O modelo cinético é especialmente útil para prever parâmetros elétricos e de difusão em escala celular (31). Sua formulação utiliza quatro passos cinéticos para modelar o problema, de acordo com a relação abaixo



onde o estado C corresponde a célula estável, C_1 corresponde ao estado de entortamento dos fosfolipídios pelo estímulo elétrico, P_1 é o estado de ruptura inicial da membrana e P_2 o estado de formação final dos poros. Os coeficientes k_1 , k_2 e k_3 são denominados coeficientes de formação do poro. k_{-1} , k_{-2} e k_{-3} são os coeficientes de fechamento dos poros.

As relações diferenciais de taxa de variação para cada passo cinético apresentado na Equação 2.30 são dadas por (78)

$$\frac{d [C(\vec{r}, t)]}{dt} = -k_1 [C(\vec{r}, t)] + k_{-1} [C_1(\vec{r}, t)] \quad 2.31$$

$$\frac{d [C_1(\vec{r}, t)]}{dt} = -k_2 [C_1(\vec{r}, t)] - k_{-1} [C_1(\vec{r}, t)] + k_1 [C(\vec{r}, t)] + k_{-2} [P_1(\vec{r}, t)] \quad 2.32$$

$$\frac{d [P_1(\vec{r}, t)]}{dt} = -k_3 [P_1(\vec{r}, t)] - k_{-2} [P_1(\vec{r}, t)] + k_2 [C_1(\vec{r}, t)] + k_{-3} [P_2(\vec{r}, t)] \quad 2.33$$

$$\frac{d [P_2(\vec{r}, t)]}{dt} = -k_{-3} [P_2(\vec{r}, t)] + k_3 [P_1(\vec{r}, t)] \quad 2.34$$

onde t representa o tempo e \vec{r} é um vetor representando a posição na membrana. $[C]$, $[C_1]$, $[P_1]$ e $[P_2]$ representam a distribuição normalizada de cada estado da membrana em relação ao valor inicial com todos os poros fechados ($[C(\vec{r}, 0)]$).

Os coeficientes k_1 , k_2 e k_3 dependem do tempo e posição na membrana, dessa forma, são coeficientes dependentes da intensidade de campo elétrico e tempo de estímulo. Já os coeficientes k_{-1} , k_{-2} e k_{-3} são considerados constantes (73).

$[C(\vec{r}, 0)] = [C_0]$ é um valor constante para o sistema celular que está sendo analisado e independe da intensidade e magnitude do campo elétrico aplicado (73). É possível também definir que no instante de tempo inicial, considerando que a célula estava em repouso, a seguinte relação é verdadeira (78)

$$[C_1(\vec{r}, 0)] = [P_1(\vec{r}, 0)] = [P_2(\vec{r}, 0)] = 0 \quad 2.35$$

Também é possível definir o aumento da condutividade da membrana a partir das distribuições normalizadas de cada estado, de forma que (78)

$$\sigma_m(\vec{r}, t) = \sigma_{m_0} + \sigma_{C_1} [C_1(\vec{r}, t)] + \sigma_{P_1} [P_1(\vec{r}, t)] + \sigma_{P_2} [P_2(\vec{r}, t)] \quad 2.36$$

como o simples entortamento dos lipídios sem a ruptura da membrana (representada pelo estado $[C_1(\vec{r}, t)]$) não fornece aumento da condutividade, consideramos $\sigma_{C_1} = 0$, resultando na simplificação da equação anterior para (78)

$$\sigma_m(\vec{r}, t) = \sigma_{m_0} + \sigma_{P_1} [P_1(\vec{r}, t)] + \sigma_{P_2} [P_2(\vec{r}, t)] \quad 2.37$$

onde σ_{m_0} é a condutividade inicial da membrana (em repouso), σ_{P_1} é o aumento da condutividade relacionada ao estado de abertura de poros hidrofóbicos e σ_{P_2} é o aumento da condutividade relacionada ao estado de abertura de poros hidrofílicos.

A Equação 2.36 também pode ser adaptada para representar a permeabilidade² de membrana para determinada substância, conforme a relação abaixo (78)

$$M_m(\vec{r}, t) = M_{m_0} + M_{P_1} [P_1(\vec{r}, t)] + M_{P_2} [P_2(\vec{r}, t)] \quad 2.38$$

onde M_{m_0} representa a permeabilidade natural da membrana para a estrutura (e.g. no caso da bleomicina $M_{m_0} = 0$ (79)), M_{P_1} o aumento da permeabilidade devido a abertura de poros hidrofóbicos e M_{P_2} o aumento da permeabilidade devido a abertura de poros hidrofílicos.

² Nesse caso, a permeabilidade denota a capacidade de determinado material passar pela membrana, é importante não confundir com permeabilidade magnética (μ).

2.2.2 Efeito da eletroporação em tecidos

Quando estudamos eletroporação em tecidos, a estrutura da célula não é diretamente considerada. Dessa forma, perde-se a possibilidade de avaliar as componentes de posição. Assim, os estudos precisam modelar as etapas cinéticas da eletroporação sem considerar a componente posicional, isto é, avaliando o efeito médio. Além disso, o estado do poro geralmente é calculado dependendo da TMP em modelos para células. Em contra partida, essa dependência é geralmente modificada para a magnitude local do campo elétrico (E) no modelo macroscópico de tecidos, visto que a TMP é relacionada ao campo elétrico e a espessura da membrana.

Alguns trabalhos observaram os efeitos da eletroporação diretamente na dispersão biológica (14, 80). As espectroscopias de impedância antes e após a estimulação por PEF revelam um acréscimo na condutividade do tecido ao longo de todo o espectro. A permissividade também é afetada, mas em menor intensidade. A variação das características elétricas do tecido devido ao fenômeno da eletroporação é um tema recorrente de estudo na literatura. Para que os resultados simulados sejam confiáveis, torna-se necessária a modelagem das alterações nas propriedades elétricas dos tecidos devido a eletroporação. Diversos modelos foram sugeridos no decorrer das últimas décadas. Podemos separá-los, essencialmente, no domínio em que se deseja estudar, sendo eles o estático e o dinâmico (temporal). Nas seções seguintes, apresentaremos como os efeitos da eletroporação são modelados em ambos os domínios.

2.3 MODELOS ESTÁTICOS DE ELETROPORAÇÃO

Um modelo estático representa um instante de tempo fixo nos protocolos de eletroporação. De maneira geral, o modelo é construído baseado na corrente e tensão do último pulso do protocolo, onde pressupõe-se que o tecido já está em um nível saturado de eletroporação para aquele estímulo (81). O modelo é realizado pelo mapeamento da condutividade dependendo da magnitude do campo elétrico em que o tecido é exposto, o que reflete o nível de eletroporação causado no tecido.

Em termos físicos, ao desprezarmos a componente temporal, deixamos de considerar os fenômenos de polarização dinâmicos e, portanto, a corrente de deslocamento prevista nas equações de Maxwell. Dessa forma, a representação é baseada apenas na corrente de condução, representada pela condutividade do material. Com isso, a dispersão do tecido discutida no início do capítulo passa a ser resumida em um valor de condutividade aparente. Já a dinâmica da eletroporação passa a ser incorporada adicionando-se a dependência dessa condutividade ao campo elétrico.

O primeiro modelo de variação de condutividade em tecido devido a eletroporação foi proposto por Sel *et al.* (37), sendo amplamente utilizado em simulações clínicas para eletroquimioterapia e servindo como base para modelos de outras aplicações. O

conjunto de equações a seguir apresenta o modelo.

$$\sigma(E) = \sigma_0 + \frac{\sigma_1 - \sigma_0}{1 + De^{-\frac{E-A}{B}}} \quad 2.39$$

$$A = \frac{(E_1 + E_0)}{2} \quad B = \frac{(E_1 - E_0)}{C}$$

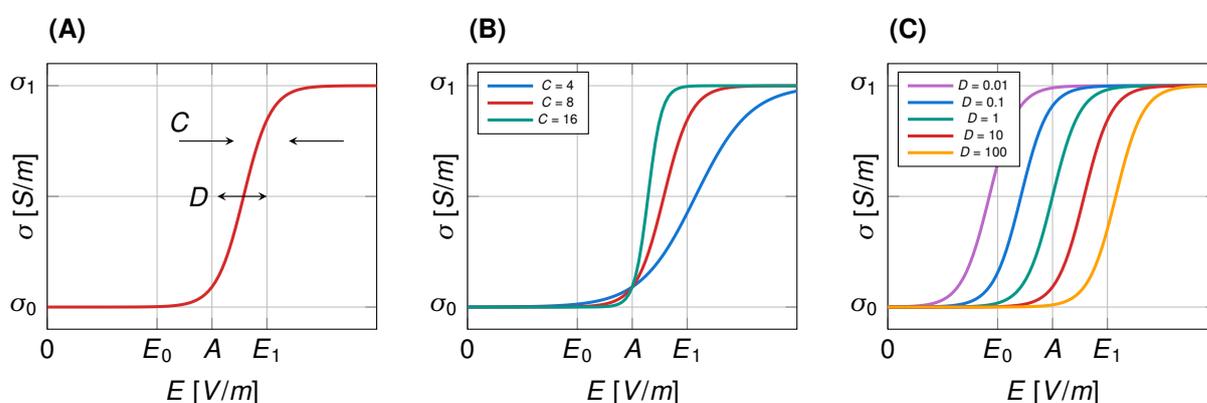
onde σ representa a condutividade do tecido e E é a magnitude do campo elétrico. σ_0 e σ_1 representam respectivamente a condutividade do tecido sem sofrer eletroporação e a condutividade máxima que pode ser atingida. E_0 e E_1 são os limiares de campo elétrico necessários para ocorrência eletroporação. D e C são parâmetros que ajustam a forma da função.

O formato da função representa uma sigmoide com valor inicial em σ_0 , a medida que o tecido é estimulado por campos elétricos de intensidade maior que o limiar E_0 , sua condutividade aumenta devido a abertura dos poros. Uma condutividade máxima, definida como σ_1 é atingida devido a morte celular por eletroporação irreversível, causada em intensidades maiores que E_1 . Essa condutividade máxima pode ser entendida como a limitação ocasionada pela condutividade do eletrólito que envolve a célula. A Figura 9A mostra o gráfico da Equação 2.39 considerando $C = 8$ e $D = 10$.

Os valores de C e, conseqüentemente, de B alteram o aclave da função, B e C são inversamente proporcionais, quanto maior o valor de C (e, portanto, menor o valor de B), mais acentuada é a curva. É possível observar os efeitos da alteração de C na Figura 9B.

A constante A representa o valor central da função sigmoide, onde o parâmetro D realiza um deslocamento desse centro. Quanto maior D , mais a direita a curva é deslocada. Quanto menor D , mais a esquerda a curva é deslocada. Quando $D = 1$ a curva fica centrada no valor de A . A Figura 9C exemplifica esse deslocamento com

Figura 9 – Gráfico do modelo estático de eletroporação em tecidos



C e D são parâmetros de ajuste do modelo. σ_0 e σ_1 são os valores inicial e máximo da condutividade. E_0 e E_1 são os limiares de eletroporação.

Fonte: Modelo proposto por Sel *et al.* (37). Gráficos produzidos pelo autor.

diferentes valores de D . Note que o valor de deslocamento causado por D está ligado ao valor de C . Quanto menor C , maior será o deslocamento causado por D . Se D for mantido fixo e C for variado, as curvas sempre terão o mesmo valor no ponto A .

A definição dos parâmetros σ_0 , σ_1 , E_0 , E_1 , C e D para cada tecido é realizada através da parametrização de dados experimentais. Para isso, o tecido de interesse é submetido a um protocolo específico de eletroporação variando o nível de campo elétrico (usualmente iniciando em 10 kV/m e terminando em 100 kV/m com passos de 10 kV/m). O valor da condutividade aparente é estimado pela relação de corrente-tensão direta. Por fim, a curva experimental é parametrizada com o modelo matemático sigmoidal. O protocolo de eletroporação utilizado nos modelos estáticos normalmente corresponde ao protocolo unipolar do ESOPE, com oito pulsos retangulares de 100 μ s e 1 Hz de frequência de repetição.

Outros autores desenvolveram modelos estáticos com formas sigmoides semelhante ao modelo proposto por Sel *et al.* Pode-se destacar, por exemplo, o modelo de eletroporação em tubérculo (*Solanum tuberosum*) desenvolvido por Ivorra *et al.* que utiliza a função de Gompertz para parametrizar a forma sigmoide (82). O modelo em tubérculo permitiu uma verificação visual ao efeito da eletroporação, visto que esse vegetal apresenta uma alteração na coloração algumas horas após exposto ao estímulo. A alteração na cor ocorre devido a oxidação ocasionada pela abertura dos poros. A utilização de tubérculos para uma resposta visual da eletroporação permite avaliar a confiabilidade do modelo, visto que é possível comparar visualmente os resultados simulados e experimentais. A utilização de tubérculos também é benéfica no desenvolvimento de novas topologias de eletrodos, bem como avaliação das topologias atuais, permitindo avaliar e entender a sua distribuição de campo elétrico (25, 26).

Também existem modelos adaptados para outros tratamentos baseados em eletroporação, como o modelo de Garcia *et al.* (83) para ablação não-térmica utilizando eletroporação irreversível. O modelo incorpora uma ideia similar ao de Sel *et al.*, mas considera também o aumento da condutividade pelo aumento da temperatura, que embora pequena (unidades de $^{\circ}$ C) não pode ser totalmente desconsiderada em aplicações de eletroporação irreversível.

É importante salientar que os modelos estáticos possuem limitações em sua definição relacionadas principalmente aos parâmetros temporais do protocolo de pulsos aplicado (84). Os modelos não incorporam a dependência da condutividade em mudanças na forma, duração e tempo de repetição dos pulsos. As diferentes aplicações de tecnologias baseadas em eletroporação (*e.g.*, eletroquimioterapia, ablação, transferência genética, vacinas) possuem diferentes protocolos de estímulo, o que pode impossibilitar a compatibilidade dos modelos estáticos para esses casos.

Embora existam estudos com relação a eficácia da eletroporação e suas aplicações para diferentes protocolos (40, 41, 42, 43, 44, 45), a confiabilidade de modelos es-

táticos para protocolos diferentes daqueles em quem foram concebidos não é testada. No decorrer dessa tese, testaremos essa hipótese através de um estudo prático avaliando se os modelos desenvolvidos com frequência da repetição de 1 Hz permanecem válidos em aplicações com frequência de repetição de 5 kHz. Uma forma de contornar essa possível limitação dos modelos estáticos está no desenvolvimento de modelos dinâmicos, que incorporem a dependência tanto da dispersão do tecido, quanto das dinâmicas da eletroporação. Na seção seguinte, apresentamos três modelos dinâmicos propostos no decorrer da última década.

2.4 MODELOS DINÂMICOS DE ELETROPORAÇÃO

Apesar das primeiras modelagens dinâmicas de eletroporação em tecidos datarem da mesma época em que os modelos estáticos foram desenvolvidos (85), a alta complexidade computacional foi uma barreira para sua implementação, principalmente em simulações clínicas. Na última década, três grupos de pesquisa de diferentes partes do mundo publicaram propostas de modelos dinâmicos de eletroporação.

2.4.1 Modelo de Langus *et al.*

Langus *et al.* (47) apresentaram, em 2016, um modelo dinâmico de aumento de condutividade devido a eletroporação. O modelo é composto por três contribuições principais: a condutividade do tecido sem eletroporação (σ_0), o aumento da condutividade devido a eletroporação (σ_{por}) e o aumento da condutividade devido a efeitos térmicos (σ_T). As Equações 2.40 – 2.46 apresentam o modelo.

$$\sigma = (\sigma_0 + \sigma_{por}) (\sigma_T) \quad 2.40$$

$$\sigma_{por} = (\sigma_1 - \sigma_0) \rho_{por} \left(1 - \alpha_\sigma e^{-\left(\frac{\theta_\sigma}{\tau_\sigma}\right)} \right) \quad 2.41$$

$$\rho_{por} = \max \left(\frac{E - E_0}{E_1 - E_0}, \rho_{por}^{t-1} e^{-\left(\frac{\Delta t}{\tau_{por}}\right)} \right) \quad 2.42$$

$$\theta_\sigma = \alpha_{\theta_\sigma} E \Delta t + \theta_\sigma^{t-1} e^{-\left(\frac{\Delta t}{\tau_{por}}\right)} \quad 2.43$$

$$\sigma_T = 1 + \alpha_T \log(1 + \theta_T) \quad 2.44$$

$$\theta_T = \alpha_{\theta_T} E \Delta t + \theta_T^{t-1} e^{-\left(\frac{\Delta t}{\tau_T}\right)} \quad 2.45$$

$$\vec{J}_C = \frac{\alpha_C}{R_C} (\vec{E} - \vec{E}^{t-1}) e^{-\left(\frac{\Delta t}{R_C C}\right)} \quad 2.46$$

Onde ρ_{por}^{t-1} , θ_{σ}^{t-1} , e θ_T^{t-1} são os valores das respectivas funções no passo de tempo anterior. \vec{E}^{t-1} é o valor do campo elétrico no passo de tempo anterior. \vec{J}_C é a densidade de corrente elétrica capacitiva. A descrição dos demais parâmetros é apresentada na Tabela 2.

A inclusão dos modelos no simulador por elementos finitos é realizada considerando a lei de conservação de cargas elétricas. O termo da corrente de deslocamento é considerado nulo e a densidade de cargas é igualada a densidade de corrente capacitiva apresentada na Equação 2.46, constituindo a seguinte relação

$$\vec{\nabla} \cdot (\sigma \vec{E}) = \frac{\alpha_C}{R_C} (\vec{E} - \vec{E}^{t-1}) e^{-\left(\frac{\Delta t}{R_C C}\right)} \quad 2.47$$

onde σ corresponde a condutividade do tecido apresentado na Equação 2.40.

Não há desenvolvimento algébrico ou explicações físicas sobre as razões que levaram a escolha dessas funções em particular para explicar o fenômeno. Os autores argumentam que equações similares são encontradas em outros modelos biológicos.

Nos anos seguintes, duas novas propostas foram apresentadas para explicar a dinâmica de eletroporação em tecidos. Tanto o modelo de Voyer *et al.* (48) quanto o modelo de Ramos e Weinert (49) são baseados em circuitos elétricos equivalentes,

Tabela 2 – Descrição dos parâmetros das funções do modelo proposto por Langus *et al.* (47)

Parâmetro	Descrição	Unidade
σ_0	Condutividade inicial do tecido	S/m
σ_1	Condutividade final do tecido	S/m
E_0	Limite mínimo de magnitude do campo elétrico no modelo de condutividade linear	V/m
E_1	Limite máximo de magnitude do campo elétrico no modelo de condutividade linear	V/m
α_{σ}	Amplitude do modelo de crescimento de poros	1
$\alpha_{\theta_{\sigma}}$	Amplitude do modelo de dano da eletroporação	m/V
α_T	Amplitude do modelo térmico	1
α_{θ_T}	Amplitude do modelo de dano térmico	m/V
α_C	Amplitude do modelo capacitivo	1/m ²
τ_{σ}	Tempo específico do modelo de crescimento de poros	s
τ_{por}	Tempo específico de relaxamento da eletroporação	s
τ_T	Tempo específico de difusão térmica	s
R_C	Resistência no modelo capacitivo	Ω
C	Capacitância no modelo capacitivo	F
Δt	Passo de tempo da simulação	s

Fonte: Adaptado de (47).

conectados a modelos de eletroporação para células.

2.4.2 Modelo de Voyer *et al.*

O modelo de Voyer *et al.* (48) utiliza um circuito elétrico equivalente derivado de um modelo de célula única. O circuito é constituído de dois ambientes resistivos ideais representando os eletrólitos dos meios intra e extra-celulares, e a membrana celular como um capacitor não ideal. A Figura 10 mostra o circuito elétrico equivalente.

A partir das Leis de Kirchhoff, é possível calcular a corrente i como a somatória das componentes i_{cel} e i_{ec} , construindo a seguinte relação

$$\left(1 + \frac{R_{ic}}{R_m}\right) i_{cel} + C_m R_{ic} \frac{di_{cel}}{dt} = R_{ec} C_m \frac{di_{ec}}{dt} + \frac{R_{ec}}{R_m} i_{ec} \quad 2.48$$

$$i_{ec} = R_{ec} V$$

A transformação da Equação 2.48 para ambiente volumétrico pode ser realizada utilizando as as relações apresentadas no conjunto de Equações 2.49

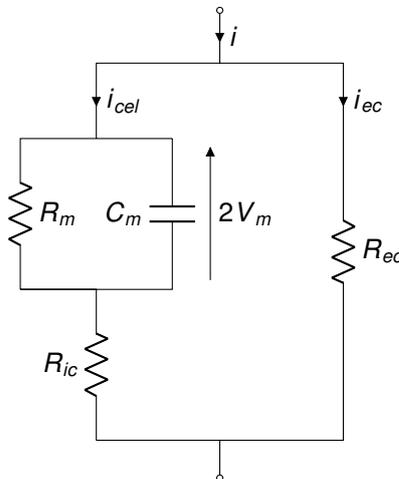
$$\vec{J} = \frac{i}{S} \quad \nabla\varphi = \vec{E} = \frac{V}{l} \quad R = \frac{l}{\sigma S} \quad G = \frac{1}{R} \quad C = \frac{\epsilon S}{l} \quad 2.49$$

Substituindo essas relações em 2.48, tem-se

$$(\sigma_{ic} + \sigma_m) \vec{J}_{cel} + \epsilon_m \frac{d\vec{J}_{cel}}{dt} = \sigma_{ic} \sigma_m \nabla\varphi + \sigma_{ic} \epsilon_m \frac{d\nabla\varphi}{dt} \quad 2.50$$

$$\vec{J}_{ec} = \sigma_{ec} \nabla\varphi$$

Figura 10 – Circuito elétrico equivalente utilizado por Voyer *et al.* para o desenvolvimento do modelo dinâmico



Fonte: Adaptado de (48).

A inserção do efeito da eletroporação é feita diretamente sobre a condutividade da membrana celular (σ_m). O modelo utiliza uma aproximação do aumento de condutividade da membrana proposto por Leguèbe *et al.* (79), apresentado no conjunto de equações a seguir.

$$\sigma_m(t, V_m) = \sigma_{m0} + \sigma_{m1}P_1 + \sigma_{m2}P_2 \quad 2.51$$

$$\frac{dP_1}{dt} = \begin{cases} \frac{\beta_1(V_m) - P_1}{\tau_1} & \text{se } \beta_1(V_m) > P_1 \\ 0 & \text{caso contrário} \end{cases} \quad 2.52$$

$$\frac{dP_2}{dt} = \begin{cases} \frac{\beta_2(P_1) - P_2}{\tau_2} & \text{se } \beta_2(P_1) > P_2 \\ 0 & \text{caso contrário} \end{cases} \quad 2.53$$

$$\beta_1(V_m) = \frac{1}{2} \left[1 + \tanh \left(k_1 \left(\frac{V_m^2}{V_{th}^2} - 1 \right) \right) \right] \quad 2.54$$

$$V_m = d_c \left| \frac{1}{2} \left(\nabla \varphi - \frac{\vec{J}_{cel}}{\sigma_{ic}} \right) \right| \quad 2.55$$

$$\beta_2(P_1) = \frac{1}{2} \left[1 + \tanh \left(k_2 \left(\frac{P_1^2}{X_{th}^2} - 1 \right) \right) \right] \quad 2.56$$

A Equação 2.51 mostra a relação de dependência da condutividade da membrana baseada na condutividade inicial (σ_0) e da primeira ($\sigma_{m1}P_1$) e segunda ($\sigma_{m2}P_2$) dinâmicas da eletroporação, que podem ser interpretadas respectivamente como a criação dos poros e a mudança no lipídios da membrana (expansão dos poros). As Equações 2.52 e 2.53 apresentam a equação diferencial no tempo de ambas as dinâmicas, onde τ_1 e τ_2 são as constantes de tempo características para a abertura e expansão dos poros, respectivamente. A Equação 2.54 é uma função sigmoideal que conecta a magnitude do campo elétrico e a ocorrência da eletroporação, onde k_1 é uma constante do modelo e V_{th} é o limiar de TMP para ocorrência da eletroporação. A conexão entre campo elétrico e TMP é realizada através da Equação 2.55, que descreve uma forma simplificada de calcular o TMP baseado no diâmetro da célula (d_c), a magnitude do campo elétrico, a densidade de corrente elétrica da célula e a condutividade do meio intra-celular. A Equação 2.56 é uma função sigmoideal conectando a criação dos poros e a mudança nos lipídios da membrana, onde k_2 e X_{th} são parâmetros do modelo.

2.4.3 Modelo de Ramos e Weinert

O Modelo de Ramos e Weinert (49) adota a dispersão elétrica como modelagem básica dos tecidos biológicos, adicionando o aumento da condutividade da membrana

na condutividade estática do tecido. A implementação do modelo dispersivo, no entanto, não é realizada através de método de elementos finitos. Os autores desenvolveram um software próprio, que utiliza conceitos de circuitos elétricos equivalentes como aproximação de cálculo em malhas (86). A Figura 11 mostra o circuito elétrico equivalente da dispersão biológica utilizado no desenvolvimento do modelo de Ramos e Weinert.

A fim de incluir os efeitos de eletroporação na condutividade do tecido, Ramos e Weinert utilizaram a aproximação proposta por Neu e Krassowska para cálculo da densidade de poros em uma célula (87). O modelo de Neu e Krassowska assume que todos os poros possuem o mesmo tamanho (mesmo raio) e, portanto, a mesma condutância. Dessa forma, o aumento da condutância da membrana pode ser calculada em termos da densidade de poros. A conexão da escala tecidual com o modelo de célula foi desenvolvida empiricamente, com adição de novos parâmetros. As Equações 2.57 – 2.59 apresentam o modelo proposto.

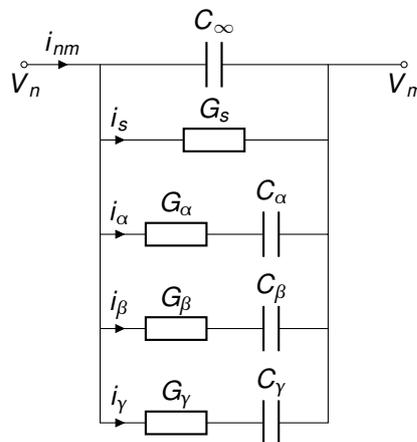
$$\sigma = \sigma_s + \sigma_p \tag{2.57}$$

$$\frac{d\sigma_p}{dt} = \frac{\sigma_{eq} - \sigma_p}{\tau_{min} + \tau_p e^{-(E/E_{p2})^2 [\sigma_t / (\sigma_t + \sigma_p)]^2}} \tag{2.58}$$

$$\sigma_{eq} = \frac{\sigma_0 \sigma_t}{\sigma_0 + \sigma_t e^{-(E/E_{p1})^2 [\sigma_t / (\sigma_t + \sigma_p)]^2}} \tag{2.59}$$

A Equação 2.57 mostra a condutividade do tecido em termo das condutividades estática (σ_s) e da eletroporação (σ_p). A Equação 2.58 apresenta a equação diferencial para calcular σ_p , onde τ_{min} e τ_p são tempos de relaxação, E é o campo elétrico aplicado e E_{p2} é um limiar de campo elétrico. A Equação 2.59 mostra a relação entre a

Figura 11 – Circuito elétrico equivalente utilizado por Ramos e Weinert para simular os efeitos dispersivos em tecidos biológicos



As componentes α, β, γ representam cada uma das bandas de dispersão de Cole-Cole.
 Fonte: Adaptado de (49).

condutividade da membrana inicial (σ_0) e máxima (σ_t), onde E_{p1} é um limiar de campo elétrico.

O modelo foi aprimorado por duas vezes nos anos seguintes à sua publicação. A primeira melhoria foi incluir efeitos de memória, permitindo ao modelo prever um trem de pulsos em vez de um único pulso (50). A inclusão foi possível alterando dinamicamente σ_t e E_{p2} após o pulso inicial. Em seu último trabalho, os autores avaliaram o desempenho do modelo em tecidos de coelhos, inclusive comparando os resultados do seu próprio software de circuitos equivalentes com o COMSOL (51). Entretanto, a dispersão do tecido não foi adicionada ao software de elementos finitos, o que levou a erros em frequências de repetição elevadas.

2.4.4 Discussão sobre os modelos

Em termos da corrente elétrica, os três modelos explicam dinamicamente a eletroporação em escala tecidual. Pela comparação entre os dados experimentais e simulados, aparentemente os modelos podem ser validados. Entretanto, aspectos na construção e validação precisam ser discutidos.

O modelo de Langus *et al.* foi construído inteiramente de forma empírica, sem contextos físicos que levaram a escolha das funções utilizadas. Por exemplo, o efeito térmico associado ao aumento da condutividade não foi construído utilizando uma equação de difusão térmica e efeito Joule conforme prática recorrente na literatura (88). Pelo contrário, o efeito térmico foi adicionado através de uma conexão direta entre a magnitude do campo elétrico e um termo de tempo de relaxação (Equação 2.44), o que é repetido por outros autores.

Além disso, o modelo é baseado em um tempo discretizado, tornando-o primariamente dependente do passo de tempo de simulação, o que pode levar a erros se o passo de tempo não for escolhido com cuidado. Outro fator preocupante da construção do modelo de Langus *et al.* é o tecido animal utilizado. O fígado utilizado foi comprado em um açougue local, não houve controle sobre o tempo de morte do animal, temperaturas de armazenamento ou outros fatores que podem danificar a estrutura do tecido e conflitar com os efeitos da eletroporação.

O modelo de Voyer *et al.* utiliza uma versão simplificada do modelo de célula isolada de Leguèbe *et al.* para fazer a conexão entre o tecido e o efeito de eletroporação em células. É possível notar que as Equações 2.52 e 2.53 são estritamente crescentes uma vez que as derivadas no tempo de P_1 e P_2 não assumem valores negativos por condição imposta. Essa propriedade torna o modelo não adequado para prever a relaxação entre os pulsos no caso de um estímulo de trem de pulsos, ficando restrito a análises de estímulo por degrau unitário. A limitação foi citada pelos autores do trabalho, indicando que novas propostas poderiam ser feitas no futuro para lidar com o efeito de relaxamento. No entanto, nenhuma proposta foi realizada até o momento de

escrita dessa tese.

É importante notar que o circuito equivalente utilizado na modelagem de Voyer *et al.* não é uma representação completa do efeito dispersivo em tecidos biológicos discutidos no início do capítulo. Apesar da presença de um elemento capacitivo introduzir uma dispersão em frequência, este é relacionado apenas a banda β , ainda de forma incompleta devido a falta da superposição das demais bandas de dispersão. O circuito equivalente proposto por Voyer *et al.* é derivado diretamente de um modelo de célula única, porém é necessária cautela ao extrapolar para uma escala tecidual, visto que a complexidade do tecido pode inviabilizar a equivalência.

Por outro lado, a dispersão completa dos tecidos foi estudada por Ramos e Weinert, sendo implementada através de um software próprio para cálculo das densidades de corrente e campo elétrico. Os autores citam que ignoraram as bandas α e γ na versão final implementada no software pois não observaram relevância significativa para ambas as bandas. No entanto, é reportado que cerca de 90% da potência do sinal de eletroporação encontra-se na faixa da banda α (84). Ignorar essa faixa de frequência pode ter influenciado no resultado do modelo, sendo necessário incluir as variações relativas a dispersão no próprio modelo de eletroporação do tecido.

O modelo de eletroporação de Ramos e Weinert também utilizou um modelo de eletroporação de célula isolada, criando uma conexão entre a célula e o efeito de eletroporação em tecidos. A conexão foi criada de forma empírica, uma vez que o modelo utilizado de Neu e Krassowska foi criado para prever a densidade de poros na membrana, não a dinâmica do aumento da condutividade. Os autores precisaram incluir novos parâmetros para que as curvas de corrente elétrica simuladas pudessem ser igualadas as experimentais. Apesar do trabalho inicial utilizar um estímulo de único pulso, um segundo estudo (50) foi publicado com ajustes dinâmicos de parâmetros para lidar com o efeito de relaxação. No entanto, os ajustes parecem ter sido removidos num terceiro estudo (51), onde o modelo foi testado em diferentes tecidos de coelho.

Conforme comentado na apresentação do modelo, Ramos e Weinert utilizaram um software próprio para simulação dos efeitos dispersivos no tecido. Infelizmente o software não é abertamente disponibilizado para a comunidade acadêmica, o que impossibilita que outros grupos de pesquisa realizem as simulações. No último trabalho publicado sobre o modelo (51), os autores incluíram uma comparação de resultados utilizando também o software comercial COMSOL Multiphysics, porém sem a inserção dos efeitos dispersivos. O software comercial apresentou erros significativos em protocolos com taxas de repetição elevados, atribuídos pelos autores a falta da inclusão de dispersão.

É importante salientar que os três modelos propostos possuem alterações significativas de parâmetros com base nas variações de dependências de entrada. Não está claro quais valores de parâmetros devem ser usados em uma geometria de eletrodo

ou tecido diferente, bem como em tensões de entrada diferentes daquelas usadas na construção do modelo. Embora os modelos de Voyer *et al.* e Ramos e Weinert tragam ideias promissoras na modelagem dinâmica da eletroporação em tecidos, entendemos que os modelos possuem limitações em sua concepção. O modelo de Voyer *et al.* não considera os efeitos dispersivos de tecido, e o modelo de célula extrapolado para escala tecidual consegue prever a corrente em apenas um pulso. O modelo de Ramos e Weinert, embora considere os efeitos dispersivos, ignora a faixa de frequência relativa a banda α , além de possuir mudanças significativas em parâmetros dependendo da tensão aplicada ou tipo de eletrodo utilizado, além disso, utiliza um software próprio que não está disponibilizado para a comunidade acadêmica.

No decorrer dessa tese, utilizaremos conceitos e ideias proposta pelos modelos dinâmicos já publicados para propor um novo modelo dinâmico, construído com base na dispersão biológica. Para sua ampla disponibilidade, todos os métodos serão desenvolvidos com um simulador comercial, com a descrição de todos os passos necessários para sua implementação.

3 DEFINIÇÕES METODOLÓGICAS: SIMULAÇÃO E ESTATÍSTICA

Neste capítulo, definimos algumas metodologias que são comuns aos três estudos que serão apresentados, como as definições do simulador e dos testes estatísticos. As metodologias particulares para cada estudo encontram-se em seus respectivos capítulos.

3.1 SIMULAÇÕES NUMÉRICAS

A escolha de um software comercial possui uma série de vantagens em relação a soluções customizadas. O software comercial possui uma curva de aprendizado menor, permite facilmente alterações em parâmetros de entrada como geometrias e malhas e é otimizado para trabalhar com modelos de alta complexidade. No âmbito da eletroporação, o software comercial COMSOL Multiphysics é amplamente utilizado. O COMSOL é uma suíte de simulações físicas por método de elementos finitos (FEM – *Finite Element Method*) e fluidodinâmica computacional (CFD – *Computational Fluid Dynamics*). Essa suíte possui diversos módulos com físicas pré-programadas (elétrica, acústica, óptica, transferência térmica, deslocamento de partículas, etc) para simulações em domínios estáticos, temporais e em frequência.

No âmbito dessa tese, as simulações foram realizadas utilizando as físicas presentes no módulo de elétrica (AC/DC) para cálculo de campos elétricos e correntes elétricas (*Electric fields and currents*), utilizando a biblioteca de correntes elétricas (*Electric Currents*). Os três domínios foram utilizados: estático, dependente do tempo e dependente da frequência. As simulações fornecem como resultado a distribuição dos campos elétricos e das densidades de corrente elétrica. Dessa forma, é possível utilizar os valores simulados e compará-los com os resultados experimentais para otimizar os modelos e, após validados, utilizar esses modelos pra predição de resultados.

3.1.1 Equacionamento

O módulo AC/DC utiliza as equações de Maxwell para resolver problemas em elementos finitos (30). A biblioteca *Electric Currents* resolve Equação de Continuidade (ou conservação local) apresentada na Equação 3.1.

$$\vec{\nabla} \cdot \vec{J} = -\frac{\partial \rho}{\partial t} \quad 3.1$$

onde \vec{J} corresponde a densidade de corrente elétrica e ρ é a densidade total de carga.

As componentes da densidade de corrente elétrica (\vec{J}) são obtidas pela equação de Maxwell-Ampère. Caso o domínio seja temporal, \vec{J} é definida por

$$\vec{J} = \sigma \vec{E} + \frac{\partial \vec{D}}{\partial t} + \vec{J}_e \quad 3.2$$

onde $\sigma \vec{E}$ é definida como a corrente de condução, com σ sendo a condutividade do meio. \vec{J}_e uma corrente externa arbitrária, sendo zero por padrão, mas podendo ser alterada pelo usuário. $\frac{\partial \vec{D}}{\partial t}$ é a corrente de deslocamento (ou indução), que pode ser definida de diferentes maneiras dependendo da escolha do usuário, por padrão \vec{D} é descrito por

$$\vec{D} = \varepsilon_0 \varepsilon_r \vec{E} \quad 3.3$$

onde ε_0 representa a permissividade elétrica do vácuo e ε_r a permissividade relativa do meio.

No caso de domínio de frequência, a Equação 3.2 é transformada para

$$\vec{J} = \sigma \vec{E} + j\omega \vec{D} + \vec{J}_e \quad 3.4$$

com $j\omega$ sendo a frequência angular complexa. \vec{D} é definido da mesma forma que o domínio temporal, conforme Equação 3.3.

Se considerarmos que estamos trabalhando com frequências baixas e desprezarmos o acoplamento dos campos elétrico e magnético, podemos usar a relação entre campo elétrico e diferença de potencial

$$\vec{E} = -\nabla \varphi \quad 3.5$$

onde φ é a diferença de potencial elétrico.

No caso de simulações estáticas (independentes do tempo), é possível simplificar as equações apresentadas anteriormente. Como o tempo deixa ser variável, as derivadas temporais são nulas. Assumindo que $\frac{\partial \rho}{\partial t}$ e $\frac{\partial \vec{D}}{\partial t}$ são nulos para domínio estático e substituindo 3.2 em 3.1, temos

$$\vec{\nabla} \cdot (\sigma \vec{E} + \vec{J}_e) = 0 \quad 3.6$$

Assumindo que o usuário não adotou nenhuma corrente elétrica arbitrária ($\vec{J}_e = 0$), e substituindo a relação da Equação 3.5 em 3.6

$$-\vec{\nabla} \cdot (\sigma \nabla \varphi) = 0 \quad 3.7$$

definindo assim a equação de continuidade estática.

3.1.2 Condições de Contorno

Em problemas geométricos de duas e três dimensões, duas condições de contorno são adicionadas para estabelecer os limites do universo da simulação, sendo um procedimento padrão no simulador. As superfícies externas são consideradas isolantes, ou seja, a componente normal da densidade de corrente elétrica nas superfícies externas é nula. O que corresponde a condição de contorno de Neumann.

$$\vec{J} \cdot \hat{n} = 0 \quad 3.8$$

As superfícies de contato entre os eletrodos (terminais) e os domínios adjacentes são modeladas pela condição de contorno de Dirichlet. Assim, o valor de tensão nas superfícies de contato entre o eletrodo e os domínios adjacentes é igual ao valor definido pelo usuário como entrada do modelo.

$$V = V_a \quad 3.9$$

3.1.3 Geração do Pulso Quadrado no Tempo

Os PEF utilizados na eletroporação são geralmente trem de pulsos quadrados. A geração desse tipo de sinal deve ser criada com cuidado particular em simulações no tempo.

Conforme demonstrado na Equação 3.2, existem componentes dependentes da derivada no tempo do campo elétrico, este relacionado a diferença de potencial (aplicada como condição de contorno na superfície dos eletrodos) pela Equação 3.5. Portanto, é importante garantir que o sinal de entrada possua derivada contínua para todo instante de tempo. Esse tipo de precaução facilita a convergência da simulação, evitando erros por problemas nos parâmetros de entrada, e não no modelo simulado em si.

O COMSOL possui uma opção para geração de sinais quadrados, definindo o tempo de transição (tempos de subida e descida) e a quantidade de derivadas contínuas da função. Definimos, na realização dos estudos dessa tese, a função quadrada como tendo duas derivadas contínuas no tempo. Para geração desse sinal quadrado, o COMSOL utiliza uma função denominada *flc2hs*. A função *flc2hs* é definida como uma função de degrau suavizada (*smoothed Heaviside function*) com segunda derivada contínua e sem *overshoot*. A definição da função *flc2hs* é dada a seguir.

$$flc2hs(t,s) = \begin{cases} 0 & \text{se } t \leq -s \\ 1 & \text{se } t \geq s \\ 0.5 + 0.9375 \left(\frac{t}{s}\right) - 0.625 \left(\frac{t}{s}\right)^3 + 0.1875 \left(\frac{t}{s}\right)^5 & \text{caso contrário} \end{cases} \quad 3.10$$

Assim, para definir um pulso quadrado suavizado em um tempo de transição t_{ts} de duração entre os instantes a e b , podemos escrever

$$flc2hs(t - a, 0.5t_{ts}) - flc2hs(t - b, 0.5t_{ts}) \quad 3.11$$

3.1.4 Geometria e Malha

A geometria é construída baseada no problema a ser simulado. No geral, as geometrias foram criadas utilizando as próprias ferramentas disponíveis no COMSOL. As ferramentas permitem definir as dimensões do ambiente e criar formas geométricas básicas, como blocos, esferas, cones, cilindros, etc.

Cada forma geométrica inserida no modelo recebe uma definição, agrupando uma ou mais formas em domínios específicos. Cada domínio é então relacionado a um material, contendo as propriedades elétricas, como condutividade e permissividade.

Por fim, a malha é gerada utilizando o algoritmo do próprio software, especificando a biblioteca física utilizada. A geração da malha é criada de forma inteligente, aumentando a quantidade de elementos em regiões críticas, como o contato entre diferentes domínios. É possível especificar a resolução da malha em valores pré-definidos. As simulações estáticas utilizaram a resolução *Finer*, enquanto simulações no domínio do tempo e da frequência adotaram a resolução *Fine*.

3.1.5 Cálculo da corrente elétrica injetada pelos terminais

O simulador fornece como resultado a distribuição do campo elétrico e da densidade de corrente elétrica. O valor de corrente elétrica injetada pelos terminais (I) pode ser calculada definindo uma superfície de integração sobre os terminais e integrando o valor de densidade de corrente elétrica nessa superfície, conforme Equação 3.12.

$$I = \oint_S \vec{J} \cdot dS \quad 3.12$$

3.2 ESTATÍSTICA

Como padrão, optou-se pela definição de um intervalo de confiança (IC) de 95% e um nível de significância de 5% ($\alpha = 0,05$), dessa forma, o limiar de rejeição da hipótese nula (p-valor) é 0,05.

Primeiramente, os grupos de dados foram submetidos a testes de normalidade através do teste de Shapiro-Wilk, recomendado para espaços amostrais com menos de 50 amostras ($n < 50$). O teste de Shapiro-Wilk possui a hipótese nula (H_0) de normalidade dos dados, *i.e.*, caso p-valor $> 0,05$ aceita-se H_0 (os dados são normais).

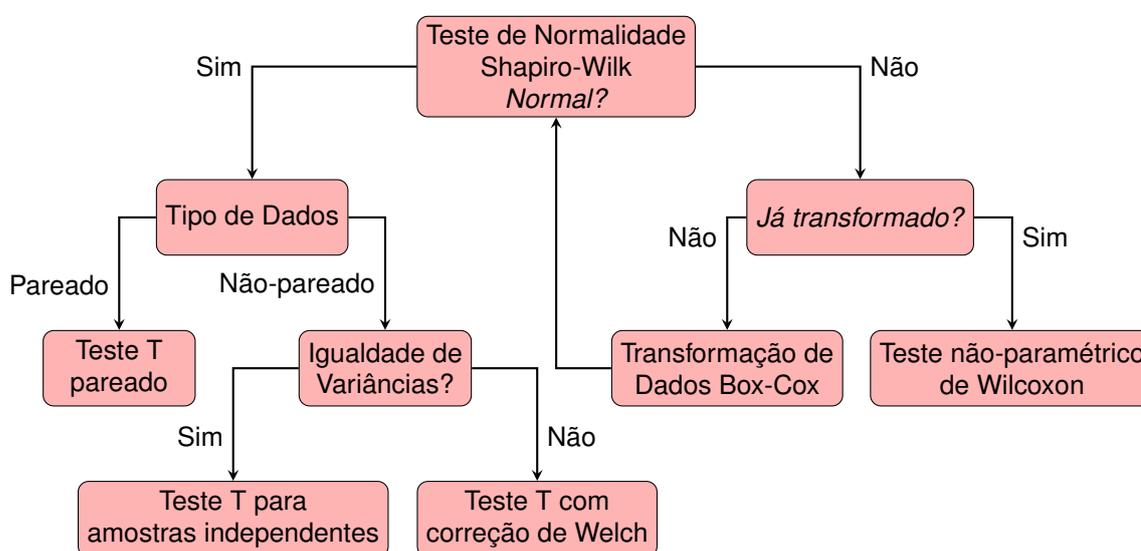
Em caso de normalidade dos dados, o teste padrão de diferenciação estatística adotado foi o teste T de Student para médias de duas amostras. Em caso de dados não-pareados, foi utilizado o teste T para amostras independentes (*two sample t-test*), observando-se também a necessidade do teste de variância para a adequação do teste T (correção de Welch). Já no caso de dados pareados, foi utilizado o teste T pareado (*paired t-test*). A definição das hipóteses testadas é por padrão a verificação por

qualquer diferença (teste bicaudal). Como todos os testes foram de comparação entre dois grupos, não houve necessidade de aplicação da análise de variância (ANOVA).

Para dados sem normalidade, tenta-se atingir a normalidade através da transformação de dados Box-Cox e posterior novo teste de normalidade Shapiro-Wilk, utilizando os dados transformados para os testes estatísticos caso a normalidade tenha sido verificada. Caso não seja possível garantir a normalidade com a transformação dos dados, foi definida a utilização do teste não paramétrico de Wilcoxon.

O diagrama apresentado na Figura 12 sintetiza os processos da metodologia estatística deste trabalho.

Figura 12 – Diagrama síntese da metodologia estatística



Fonte: Produzido pelo autor.

Os testes estatísticos foram realizados em linguagem de programação R (The R Foundation, www.r-project.org) com a biblioteca R Commander (cran.r-project.org/web/packages/Rcmdr). Os cálculos de erros percentuais entre modelos e dados experimentais foram realizados utilizando o Excel, presente na suíte Microsoft Office (Microsoft, www.microsoft.com).

3.3 EQUIPAMENTO UTILIZADO

O eletroporador utilizado durante os experimentos foi desenvolvido durante a dissertação de mestrado de Pintarelli (89). O eletroporador fornece pulsos elétricos quadrados unipolares em diferentes frequências de repetição (entre 1 Hz e 5 kHz). A amplitude dos pulsos é definida por uma fonte externa, variando entre 0 V e 650 V. A corrente máxima nominal dos transistores de potência utilizados no equipamento é de 20 A. A corrente nominal do equipamento não foi excedida em nenhum experimento realizado no decorrer da tese.

Simulações, tratamento dos dados experimentais e testes estatísticos foram realizados utilizando um computador pessoal com processador AMD Ryzen 3800X, 8 *cores* / 16 *threads* à 4,2 GHz, placa gráfica AMD Radeon 5700XT, 16 GB de memória RAM, rodando o sistema Operacional Windows 11. Simulações utilizaram a versão 5.1 do COMSOL Multiphysics. Cálculos dos testes estatísticos utilizaram a versão 4.0.2 do R.

4 EFEITOS DA FREQUÊNCIA DE REPETIÇÃO NA CORRENTE ELÉTRICA E A VALIDADE DE MODELOS ESTÁTICOS

Os resultados e imagens presentes nesse capítulo fazem parte do artigo publicado na revista **Bioelectrochemistry** intitulado “**Effects of pulse repetition rate in static electrochemotherapy models**” em co-autoria com os professores Guilherme Brasil Pintarelli, Fátima Regina Mena Barreto Silva e Daniela Ota Hisayasu Suzuki. A utilização dos resultados ou imagens é permitida, desde que referenciados ao artigo original conforme política de privacidade e uso de dados da Elsevier. Para acessar o artigo, utilize o link <https://doi.org/10.1016/j.bioelechem.2023.108499>.

Conforme introduzido no Capítulo 2, os modelos estáticos são desenvolvidos considerando um instante de tempo fixo ao final de um protocolo de eletroporação. Na eletroquimioterapia, padronizada pelo ESOPE, esses modelos são desenvolvidos estimando-se a dependência da condutividade do tecido com o campo elétrico no oitavo (último) pulso. É esperado que a eletroporação já tenha atingido um nível saturado no final do protocolo, permitindo ao modelo avaliar o desfecho final da aplicação.

Os modelos de eletroporação são geralmente desenvolvidos utilizando o protocolo com a frequência de repetição de 1 Hz na definição dos parâmetros, mas os procedimentos passaram a adotar principalmente a frequência de repetição de 5 kHz. Com a mudança prática do protocolo, esses modelos passaram a ser empregados em estudos para ambas as frequências de repetição sem uma avaliação que comprovasse a validade dos modelos para um protocolo com diferente característica temporal.

Neste capítulo, desenvolvemos um estudo experimental comparando o valor de corrente elétrica ao final do protocolo unipolar do ESOPE com frequências de repetição de 1 Hz e 5 kHz, afim de estudar o impacto do uso da frequência de repetição de 5 kHz nos modelos desenvolvidos em 1 Hz. Os modelos foram avaliados através de resultados experimentais e simulados com três modelos estáticos de tecidos desenvolvidos com 1 Hz de frequência de repetição: fígado (37), mucosa oral (38) e músculo (39). A Tabela 3 apresenta os parâmetros de cada modelo testado no decorrer do capítulo.

Tabela 3 – Parâmetros de Eletroporação para modelos estáticos de fígado, mucosa oral e músculo

Tecido	σ_0 [S/m]	σ_1 [S/m]	E_0 [kV/m]	E_1 [kV/m]	C	D
Fígado	0,067	0,241	46	70	8	10
Mucosa Oral	0,23	0,8	20	80	8	10
Músculo (transversal)	0,135	0,34	20	80	8	10

Para os dados de músculo, C e D foram considerados de acordo com o valor do artigo de desenvolvimento do modelo (37) já que a referência para os dados do tecido (39) não indica seus valores.

Fonte: Fígado (37), Mucosa Oral (38), Músculo (39).

4.1 EXPERIMENTAÇÃO

Ratos albinos da linhagem Winstar com 50–55 dias de idade e pesando entre 180 e 210 g foram eutanasiados utilizando dióxido de carbono (CO₂). Fígado, mucosa oral e músculo foram cuidadosamente extraídos ou expostos utilizando instrumentos cirúrgicos.

Para a aplicação dos pulsos de eletroporação, um eletrodo de agulhas foi desenvolvido utilizando duas agulhas hipodérmicas comerciais (0,7 mm de diâmetro, 0,35 mm de diâmetro interno, 1,5 mm de comprimento do bisel conforme Figura 13C) posicionadas a 4,5 mm de distância (de borda interna à borda interna) fixadas com resina isolante num conector plástico. Cada uma das agulhas foi eletricamente conectada ao terminal do um gerador de pulsos elétricos (eletroporador) desenvolvido pelo grupo de pesquisa no Instituto de Engenharia Biomédica (IEB) da UFSC (89). As agulhas foram inseridas paralelamente no tecido para o estímulo elétrico. A inserção no tecido foi de 5 mm para o fígado, 3 mm para a mucosa oral e 10 mm para o músculo (transversalmente à direção da fibra). Dois protocolos de eletroporação foram utilizados nos experimentos (ver Seção 4.1.1). A Figura 13A mostra uma peça de fígado com as agulhas inseridas.

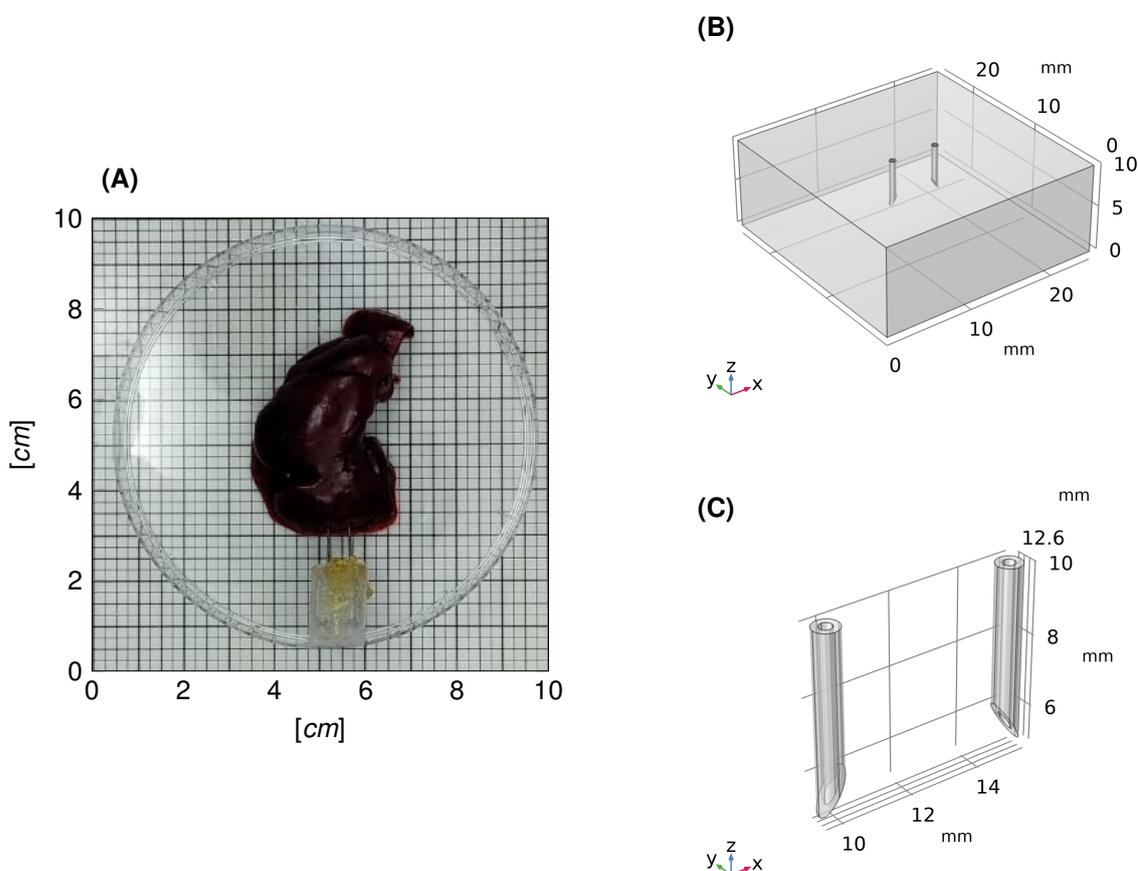
Toda a manipulação e experimentação foi realizada em menos de quatro horas após a eutanásia do animal para evitar mudanças nas propriedades elétricas pela necrose do tecido (90). Os experimentos foram realizados em temperatura controlada a 20 °C. Os experimentos seguiram os protocolos da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) (Protocolo CEUA-UFSC 2119-2803/17).

4.1.1 Protocolos de Eletroporação

Dois protocolos de aplicação de eletroporação foram desenvolvidos para a experimentação animal. Ambos os protocolos seguiram as recomendações do ESOPE com um trem de oito pulsos unipolares de 100 μs e tensão para geração de uma relação tensão-distância de 100 kV/m (21, 22, 23), o que corresponde a 450 V devido a separação de 4,5 mm entre as agulhas. Os protocolos diferem na maneira como os dados foram obtidos.

- Protocolo não-pareado: As agulhas são inseridas no tecido e um único trem de pulsos é aplicado. Após o estímulo, as agulhas são removidas e re-inseridas em uma região intacta do tecido para uma nova aquisição.
- Protocolo pareado: As agulhas são inseridas no tecido e dois trens de pulsos são aplicados. Cada trem possui diferentes frequências de repetição. A ordem da frequência de repetição é alternada entre cada amostra. Amostras com números pares recebem um acréscimo na frequência de repetição

Figura 13 – (A) Peça de fígado com eletrodo de agulhas posicionado e (B, C) geometria inserida no simulador



Fonte: Produzido pelo autor.

(frequência baixa primeiro), enquanto amostras ímpares recebem um decréscimo na frequência de repetição (frequência alta primeiro). O tempo de aplicação entre os protocolos foi de aproximadamente 30 s, correspondente ao tempo para salvar os dados, alterar a configuração do eletroporador e aplicar o protocolo subsequente.

O fígado recebeu ambos os protocolos. O protocolo não-pareado foi utilizado para aquisição da corrente em frequências de repetição de 1 Hz e 5 kHz ($n = 25$). No caso do protocolo pareado, as mesmas frequências (1 Hz e 5 kHz) foram estudadas para o fígado ($n = 33$), a mucosa oral ($n = 25$) e o músculo ($n = 28$).

Os dados foram adquiridos utilizando um osciloscópio Tektronix DPO2012B (Tektronix Inc., www.tek.com). Tensão e corrente foram medidas utilizando as ponteiras Tektronix TPP0100 e Tektronix A622, respectivamente. Um *script* em Python (Python Software Foundation, www.python.org) foi desenvolvido para calcular a corrente média no último pulso do protocolo. O cálculo considera 90% do tempo sobre o pulso, desconsiderando os 5% iniciais e finais para evitar as regiões de transição.

4.1.2 Simulação Numérica

A configuração do simulador seguiu a metodologia apresentada na Seção 3.1, com o simulador configurado para o domínio estático. A geometria do modelo foi construída para representar a experimentação animal. O tecido foi inserido como um bloco de 25x25x10 mm. As agulhas foram criadas da forma mais realista possível. O modelo consiste em duas agulhas com 0,7 mm de diâmetro separadas por 4,5 mm entre as bordas internas. Um cilindro com metade do diâmetro (0,35 mm) foi subtraído da porção interior das agulhas para criar um formato tubular. Por fim, a base da agulha foi cortada diagonalmente para formar o comprimento do bisel de 1,5 mm. A altura da agulha foi baseada na experimentação animal (5 mm para o fígado, 3 mm para a mucosa oral e 10 mm para o músculo). A Figura 13B mostra o modelo geométrico com agulha de 5 mm de altura. A condutividade dos tecidos foi inserida conforme apresentado na Equação 2.39 e parâmetros da Tabela 3 (modelos definidos utilizando frequência de repetição de 1 Hz). A condutividade do eletrodo foi definida como 1,75 MS/m.

4.2 RESULTADOS

O resumo dos resultados de experimentação pode ser observado na Figura 14. Os pontos pretos indicam o valor simulado. Os dados experimentais são apresentados em um digrama *boxplot* (valor mínimo, primeiro quartil, mediana, terceiro quartil e valor máximo). Os dados de medidas com protocolo pareado também foram adicionados, com cada par conectado por linhas coloridas. As linhas azuis representam amostras com frequência de repetição decrescente, enquanto as linhas vermelhas representam amostras com frequência de repetição crescente. No caso do protocolo não-pareado, apenas o diagrama *boxplot* é mostrado.

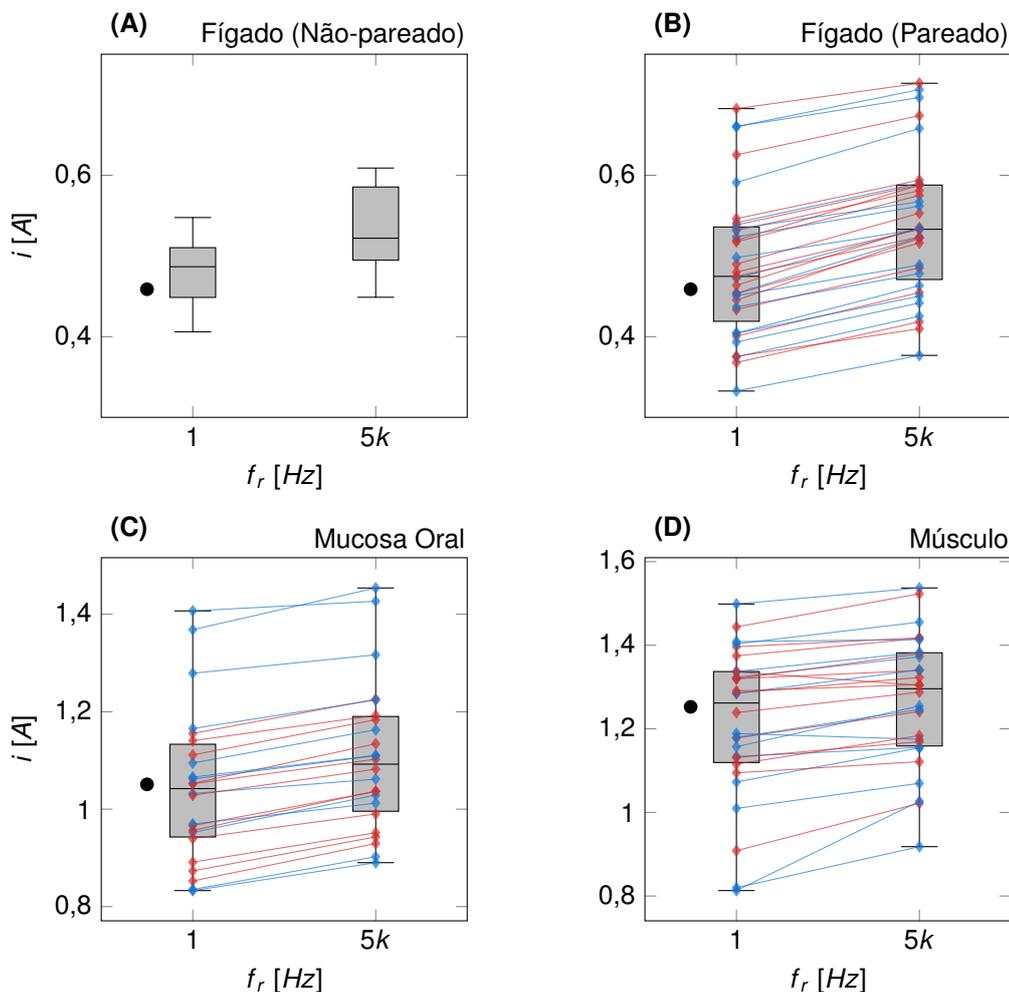
Os grupos foram testados para averiguar sua normalidade, a Tabela 4 mostra os p-valores de cada um dos testes. Todos os grupos possuem distribuição normal de acordo com o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. A Tabela 5 traz os resultados dos testes de diferença estatística entre frequências de repetição para cada tecido. Todos os testes revelaram que existe diferença significativa entre as correntes utilizando frequência de repetição de 1 Hz e 5 kHz.

O aumento percentual da corrente elétrica entre as duas frequências de repetição para o protocolo pareado foi de 10,8% para fígado, 5,8% para mucosa oral e 4,7% para músculo. No caso do protocolo não-pareado, o aumento percentual para o fígado foi de 11,2%, similar ao protocolo pareado.

4.3 DISCUSSÃO

A experimentação com tecidos animais mostrou alteração significativa na corrente elétrica entre os grupos de frequência de repetição de 1 Hz e 5 kHz (conforme

Figura 14 – Resumo dos resultados da experimentação animal



(A) Fígado com protocolo não-pareado, (B) Fígado com protocolo pareado, (C) Mucosa Oral e (D) Músculo, ambos com protocolo pareado. Os pontos pretos representam o valor simulado.
 Fonte: Produzido pelo autor.

Tabela 4 – Resultados do teste de normalidade de Shapiro-Wilk para os protocolos

Grupo de Frequência	p-valor	Normalidade	n
Fígado não-pareado 1 Hz	0,6441	Sim	25
Fígado não-pareado 5 kHz	0,0835	Sim	25
Fígado pareado 1 Hz	0,2616	Sim	33
Fígado pareado 5 kHz	0,3900	Sim	33
Mucosa Oral pareado 1 Hz	0,1518	Sim	25
Mucosa Oral pareado 5 kHz	0,2024	Sim	25
Músculo pareado 1 Hz	0,1185	Sim	28
Músculo pareado 5 kHz	0,8013	Sim	28

P-valor acima de 0,05 indica normalidade dos dados. A coluna n indica o número de amostras do grupo.
 Fonte: Produzido pelo autor.

Tabela 5 – Resultados dos testes de comparação entre diferentes grupos

Diferença Testada	Teste	p-valor	Diferença Significativa	Razão
Fígado não-pareado (5 kHz para 1 Hz)	Não-pareado	< 0,0001	Sim	1,112
Fígado não-pareado vs Pareado (1 Hz)	Não-pareado	0,7109	Não	-
Fígado não-pareado vs Pareado (5 kHz)	Não-pareado	0,8435	Não	-
Fígado pareado (5 kHz para 1 Hz)	Pareado	< 0,0001	Sim	1,108
Mucosa Oral pareado (5 kHz para 1 Hz)	Pareado	< 0,0001	Sim	1,058
Músculo pareado (5 kHz para 1 Hz)	Pareado	< 0,0001	Sim	1,047

Razão corresponde ao aumento relativo entre as médias de cada grupo. P-valor menor que 0,05 indica diferença significativa.

Fonte: Produzido pelo autor.

apresentado na Tabela 5). Apesar do acréscimo de corrente elétrica de 10,8% no fígado, a mucosa oral e o músculo apresentaram mudanças na casa dos 5%. Os resultados estatísticos se baseiam pela definição do método pareado, que reduz diferenças de medidas devido à inserção da agulha no tecido e anisotropia. Como a eletroporação apresenta efeitos de memória (52) e nós aplicamos dois protocolos na mesma região, foi necessário testar a possibilidade de enviesamento dos dados. Assim, comparamos os resultados dos dados pareados com um experimento não-pareado para o tecido de fígado. A análise estatística revelou que não há diferença significativa entre os grupos pareado e não-pareado para cada frequência de repetição (linhas 3 e 4 da Tabela 5). Dessa forma, assumimos que o método pareado não enviesa as medidas. Para mitigar ainda mais um possível enviesamento, também alternamos a frequência de repetição da primeira e segunda aplicação, garantindo assim uma alteração mínima nos resultados dependente da memória da eletroporação durante as medidas.

Existem três parâmetros que determinam a corrente que flui através de um tecido sob efeito da eletroporação: a dispersão dielétrica do tecido, a dinâmica da eletroporação, e o aumento da temperatura por efeito Joule. Consideramos que cada um desses parâmetros influenciam no motivo para observarmos correntes elétricas maiores em frequências de repetição elevadas.

Os PEF utilizados no protocolo de eletroquimioterapia possuem uma densidade espectral de potência ampla. A mudança na frequência de repetição altera a frequência fundamental do trem de pulsos e, portanto, sua frequência harmônica e distribuição espectral. A Tabela 6 mostra os resultados em faixas de frequência para o protocolo unipolar com frequências de repetição de 1 Hz e 5 kHz (veja os Apêndices A e B para detalhes do cálculo). Nos modelos estáticos, o efeito dispersivo é sumarizado na condutividade inicial (σ_0 na Equação 2.39). A frequência de repetição de 5 kHz desvia a densidade espectral para frequências mais altas, o que pode resultar em uma condutividade inicial maior para o modelo.

Tabela 6 – Percentual de potência do sinal do protocolo unipolar do ESOPE para cada intervalo de frequência

f_r	0 – 5	5 – 10	10 – 20	20 – 30	30 – 40	40 – 50	50 – 100	Acima de 100
1 Hz	77,77%	12,98%	4,74%	1,66%	0,84%	0,51%	1,01%	0,51%
5 kHz	42,24%	40,41%	9,25%	2,86%	1,58%	0,90%	1,87%	0,95%

f_r é a frequência de repetição. Os intervalos em frequência para os cálculos percentuais estão em kHz.

Fonte: Produzido pelo autor.

Outro fator que pode influenciar nas diferenças observadas nos experimentos é a dinâmica da eletroporação. No intervalo entre os pulsos, os poros iniciam as fases de recuperação e selamento. Durante o protocolo do ESOPE, os campos pulsados promovem as dinâmicas de abertura e fechamento dos poros oito vezes. Apesar do aumento na frequência de repetição não refletir em um aumento no tempo para formação dos poros (os pulsos possuem a mesma duração), a diferença de tempo entre os pulsos altera o tempo de recuperação e selamento. Assim, a intensidade da formação dos poros é maior em frequências de repetição elevadas, resultando em condutividades maiores no final do protocolo. No modelo estático, o aumento da condutividade durante a eletroporação depende da condutividade final do tecido (σ_1 na Equação 2.39), dos limiares de campo elétrico (E_0 e E_1 na Equação 2.39), e dos parâmetros de ajuste (C e D na Equação 2.39).

O efeito térmico é geralmente estudado para técnica de ablação por eletroporação irreversível (88), mas considerado negligenciável nos protocolos de eletroquimioterapia por causa do menor número de pulsos. O aumento da temperatura também causa o aumento da condutividade do tecido, uma vez que a dispersão biológica é dependente da temperatura (91). O aumento de temperatura foi reportado como menos expressivo na frequência de repetição de 1 Hz (45). O tempo mais espaçado entre os pulsos permite a dissipação de calor, resultando em temperaturas menores no último pulso. Apesar do aumento da temperatura ser considerado baixo para ambas as frequências de repetição, é importante notar que o modelo estático não possui dependência explícita na temperatura. Dessa forma, essa dependência está incluída nas condutividades inicial e final do tecido (σ_0 e σ_1 na Equação 2.39).

Modelos estáticos de eletroporação em tecidos foram validados ao decorrer da última década e utilizados em estudos para desenvolvimento de novas tecnologias e garantia de sucesso de tratamento. De fato, os modelos estáticos conseguiram prever a corrente elétrica para a frequência de repetição de 1 Hz em nossos experimentos, conforme mostrado na Figura 14, o que comprova sua validade quando utilizados para o mesmo protocolo em que foram desenvolvidos.

Uma possibilidade levantada para corrigir a diferença dos valores simulados de corrente elétrica em frequências de repetição elevadas seria a inclusão de um

fator de correção ao modelo, forçando um aumento percentual da condutividade. A implementação de um fator de correção é capaz de reduzir os erros para menos de 1% ao multiplicar os modelos de fígado, mucosa oral e músculo por, respectivamente, 1,165, 1,04 e 1,035 (detalhes no Apêndice C). No entanto, esse fator de correção é uma solução de adaptação para o ajuste da corrente elétrica, sem uma explicação física comprovada para sua implementação. Além disso, estes valores não seguem uma regra geral. Portanto, outras adaptações necessitam novos experimentos. É importante notar que não há qualquer ponderação em relação aos efeitos de dispersão e dinâmica da eletroporação em sua concepção, podendo gerar conclusões erradas em estudos que o utilizem. Não há garantias que o fator ajustaria as simulações para outros protocolos, com outras frequências de repetição ou mudanças no formato dos pulsos.

Guo *et al.* (92) propõe uma forma de implementar a dispersão do tecido mantendo os modelos de eletroporação estáticos. A implementação sugerida incorpora no simulador dois polos de Debye no domínio do tempo representando a beta β . Embora auxilie numa definição mais assertiva em relação aos efeitos dispersivos, a manutenção do modelo de eletroporação estático não explica as variações de condutividade causadas pelos efeitos dinâmicos do fenômeno, como abertura e selamento dos poros.

A utilização de modelos dinâmicos de eletroporação baseados na dispersão tecidual é o caminho lógico para aperfeiçoar as simulações numéricas de eletroporação em tecidos para diferentes protocolos, permitindo a implementação e discussão de todas as dinâmicas envolvidas. No próximo Capítulo, iniciaremos o desenvolvimento de um modelo dinâmico de eletroporação em tecidos a partir da inserção da dispersão de tecidos biológicos no simulador comercial.

5 IMPLEMENTAÇÃO DAS PROPRIEDADES ELÉTRICAS DE TECIDOS EM MÉTODO DE ELEMENTOS FINITOS NO DOMÍNIO DO TEMPO

Os resultados e imagens presentes nesse capítulo fazem parte do artigo publicado na revista **Scientific Reports** intitulado “**Biological dispersion in the time domain using finite element method software**” em co-autoria com a doutoranda Daniella de Lourdes Luna Santana de Andrade e os professores Guilherme Brasil Pintarelli e Daniela Ota Hisayasu Suzuki. A utilização dos resultados ou imagens é permitida, desde que referenciados ao artigo original conforme política de privacidade e uso de dados da Nature Portfolio. Para acessar o artigo, utilize o link <https://doi.org/10.1038/s41598-023-49828-1>.

O primeiro passo para o desenvolvimento de um modelo dinâmico de eletroporação em tecidos é a inclusão das propriedades elétricas do tecido no simulador. No Capítulo 2, apresentamos as funções para parametrizar os dados experimentais das propriedades elétricas em frequência. Apesar de análises em frequência serem úteis em diversos campos de análises elétricas, elas não permitem observar os efeitos transitórios no material estimulado. O modelo de eletroporação está intrinsecamente relacionado a fenômenos transitórios na membrana. Dessa forma, é necessário calcular e utilizar as propriedades elétricas do tecido no domínio do tempo.

A transformada de Fourier inversa da dispersão de Cole-Cole, amplamente utilizada para parametrização de tecidos biológicos, introduz derivadas não-inteiras, tornando sua implementação trabalhosa no domínio do tempo (61, 93, 94, 95). No entanto, uma dispersão contínua sempre pode ser representada como um somatório de dispersões de primeira ordem (95, 96, 97, 98). Dessa forma, podemos realizar a parametrização dos dados experimentais de tecidos diretamente com a dispersão de multipolos de Debye e então implementar no simulador em domínio temporal. Existem três métodos principais que permitem a adição da dispersão de Debye no domínio do tempo: a convolução recursiva, o método por equações diferenciais auxiliares (EDA) e a transformada-Z (61, 92, 99, 100, 101, 102, 103). Apesar da transformada-Z ser frequentemente descrita como uma metodologia simples e efetiva, sua implementação exige operações discretas que não são performáticas nem facilmente implementáveis no COMSOL, uma vez que não possuímos acesso as variáveis internas utilizadas pelo simulador. Por outro lado, o COMSOL permite ao usuário a possibilidade de incorporar equações diferenciais ordinárias (EDO) na simulação. Por esse motivo, escolhemos o método de EDA para realizar a transformação e implementação.

A parametrização da dispersão em multi-polos de Debye pode ser realizada através de um algoritmo para otimizar os melhores valores para os parâmetros da função. Diversas técnicas são discutidas na literatura para realizar a parametrização em multi-polos de Debye, como, por exemplo, otimização de mínimos quadrados para

enxame de partículas (94), eliminação iterativa e substituição reversa (97), método de ajuste de mínimos quadrados ponderados (104), estimativa dos parâmetros utilizando técnicas de projetos de filtros (105) e aproximação de mínimos por algoritmos genéticos (106, 107). No âmbito desta tese, a técnica escolhida foi a aproximação utilizando algoritmos genéticos.

No decorrer desse capítulo, apresentaremos o método de EDA e uma forma otimizada de implementá-lo no COMSOL. Em seguida, implementamos um algoritmo genético para parametrização da propriedades elétricas de materiais biológicos. Por fim, parametrizamos as propriedades elétricas de batata inglesa (*Solanum tuberosum*) e testamos as implementações propostas através de estudos simulados e experimentais.

5.1 IMPLEMENTANDO A DISPERSÃO DE DEBYE NO DOMÍNIO DO TEMPO

Conforme introduzido no Capítulo 2, a dispersão de Debye é dada por

$$\varepsilon_r^*(\omega) = \frac{\sigma_s}{j\omega\varepsilon_0} + \varepsilon_\infty + \sum_{k=1}^N \frac{\Delta\varepsilon_k}{1 + j\omega\tau_k} \quad 5.1$$

Para realizar a transformação pelo método de EDA (99), tomamos a Lei de Maxwell-Ampère no domínio da frequência e substituímos a dispersão de Debye, inicialmente considerando um único polo

$$\vec{J}(\omega) = j\omega\varepsilon_0 \left(\frac{\sigma_s}{j\omega\varepsilon_0} + \varepsilon_\infty + \frac{\Delta\varepsilon}{1 + j\omega\tau} \right) \vec{E}(\omega) \quad 5.2$$

Realizando a distributiva

$$\vec{J}(\omega) = \sigma_s \vec{E}(\omega) + j\omega\varepsilon_0 \varepsilon_\infty \vec{E}(\omega) + j\omega\varepsilon_0 \frac{\Delta\varepsilon}{1 + j\omega\tau} \vec{E}(\omega) \quad 5.3$$

Note que as componentes $\sigma_s \vec{E}(\omega)$ e $j\omega\varepsilon_0 \varepsilon_\infty \vec{E}(\omega)$ representam um material com polarização instantânea, denotados por uma única permissividade ε_∞ e condutividade σ_s , sendo facilmente transformadas para domínio do tempo.

Por outro lado, a componente $j\omega\varepsilon_0 \frac{\Delta\varepsilon}{1 + j\omega\tau} \vec{E}(\omega)$ pode ser entendida como uma densidade de corrente causada pela polarização não instantânea do material. Podemos definir $\vec{J}_n(\omega)$ de forma que

$$\vec{J}_n(\omega) = j\omega\varepsilon_0 \frac{\Delta\varepsilon}{1 + j\omega\tau} \vec{E}(\omega) \quad 5.4$$

Agora, multiplicando ambos os lados da equação por $(1 + j\omega\tau)$ e realizando a distributiva, temos

$$\vec{J}_n(\omega) + j\omega\tau \vec{J}_n(\omega) = j\omega\varepsilon_0 \Delta\varepsilon \vec{E}(\omega) \quad 5.5$$

Podemos, então, realizar a transformada inversa de Fourier ($\mathcal{F}^{-1}(\vec{J}_n(\omega)) = \vec{J}_n(t)$), chegando a EDA para cálculo da densidade de corrente elétrica devido a polarização não instantânea

$$\vec{J}_n(t) + \tau \frac{d\vec{J}_n(t)}{dt} = \epsilon_0 \Delta \epsilon \frac{d\vec{E}(t)}{dt} \quad 5.6$$

Dessa forma, a transformada completa de todas as componentes da densidade de corrente do material, representada na Equação 5.3, pode ser descrita como

$$\vec{J}(t) = \sigma_s \vec{E}(t) + \epsilon_0 \epsilon_\infty \frac{d\vec{E}(t)}{dt} + \vec{J}_n(t) \quad 5.7$$

onde $\vec{J}_n(t)$ é calculada conforme Equação 5.6.

Embora o equacionamento anterior considere apenas um polo de dispersão de Debye, é possível extrapolar as equações para um número N de polos (veja o Apêndice E), de forma que o resultado final será

$$\vec{J}(t) = \sigma_s \vec{E}(t) + \epsilon_0 \epsilon_\infty \frac{d\vec{E}(t)}{dt} + \sum_{k=1}^N \vec{J}_k(t) \quad 5.8$$

onde cada uma das componentes \vec{J}_k corresponde a um polo de dispersão de Debye definida pela equação

$$\tau_k \frac{\partial \vec{J}_k}{\partial t} + \vec{J}_k = \epsilon_0 \Delta \epsilon_k \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \quad 5.9$$

Por conveniência, podemos adotar um campo auxiliar \vec{e}_k de forma que a seguinte relação seja constituída (30)

$$\vec{J}_k \equiv \epsilon_0 \Delta \epsilon_k \frac{\partial \vec{e}_k}{\partial t} \quad 5.10$$

Substituindo 5.10 em 5.9, temos

$$\tau_k \epsilon_0 \Delta \epsilon_k \frac{\partial^2 \vec{e}_k}{\partial t^2} + \epsilon_0 \Delta \epsilon_k \frac{\partial \vec{e}_k}{\partial t} = \epsilon_0 \Delta \epsilon_k \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \quad 5.11$$

Simplificando a equação pelo termo comum ($\epsilon_0 \Delta \epsilon_k$) e integrando uma vez em relação ao tempo considerando que os campos iniciais são nulos (portanto a constante é nula)

$$\tau_k \int \frac{\partial^2 \vec{e}_k}{\partial t^2} dt + \int \frac{\partial \vec{e}_k}{\partial t} dt = \int \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} dt \quad 5.12$$

a equação então é simplificada para a equação diferencial ordinária (EDO) a seguir

$$\tau_k \frac{\partial \vec{e}_k}{\partial t} + \vec{e}_k = \vec{E} \quad 5.13$$

Reorganizando a equação de forma a isolar o termo da derivada parcial, obtemos a seguinte relação

$$\frac{\partial \vec{e}_k}{\partial t} = \frac{(\vec{E} - \vec{e}_k)}{\tau_k} \quad 5.14$$

Retornando para a definição inicial da somatória das correntes de polarização apresentada na Equação 5.8, podemos calcular o somatório de \vec{J}_k pela definição da Equação 5.10, resultando em

$$\sum_{k=1}^N \vec{J}_k = \sum_{k=1}^N \epsilon_0 \Delta \epsilon_k \frac{\partial \vec{e}_k}{\partial t} \quad 5.15$$

Substituindo agora a relação apresentada em 5.14, temos o seguinte equacionamento para a corrente de polarização

$$\sum_{k=1}^N \vec{J}_k = \sum_{k=1}^N \frac{\epsilon_0 \Delta \epsilon_k}{\tau_k} (\vec{E} - \vec{e}_k) \quad 5.16$$

Dessa forma, para introduzir cada uma das dispersões de Debye no modelo simulado, basta resolver a EDO apresentada na Equação 5.14 para cada componente k . A somatória de correntes de polarização \vec{J}_k apresentada na Equação 5.16 pode ser incluída como uma densidade de corrente arbitrária dentro do simulador (\vec{J}_e apresentado na Equação 3.2).

É importante notar que a densidade de corrente de polarização \vec{J}_k , o campo elétrico \vec{E} e o campo auxiliar \vec{e}_k são vetores, sendo definidos para cada uma das dimensões do problema analisado. A adição da EDO deve ser aplicada para cada uma dessas dimensões, sendo utilizada uma equação matricial conforme apresentado abaixo.

$$\begin{bmatrix} \tau_k & 0 & 0 \\ 0 & \tau_k & 0 \\ 0 & 0 & \tau_k \end{bmatrix} \frac{\partial}{\partial t} \begin{bmatrix} e_{k_x} \\ e_{k_y} \\ e_{k_z} \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_{k_x} \\ e_{k_y} \\ e_{k_z} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} E_x \\ E_y \\ E_z \end{bmatrix} \quad 5.17$$

Note que os vetores são decompostos com base nas dimensões do problema, nesse caso em coordenadas cartesianas x , y e z . A matriz de tempos de relaxamento é diagonal pois considera-se que não há contribuições entre os eixos do sistema. Dessa forma, cada polo de Debye pode representar até três equações diferenciais no domínio do tempo. O custo computacional está diretamente relacionado ao número de EDOs. Manter o número de polos no menor possível pode diminuir o custo computacional do modelo.

5.2 ALGORÍTMO GENÉTICO PARA PARAMETRIZAÇÃO EM MULTI-POLOS DE DEBYE

Um algoritmo genético (AG) é uma técnica de otimização poderosa, especialmente na busca de soluções onde os parâmetros podem assumir uma grande gama de valores (108). De maneira geral, o funcionamento do AG inicia com definição de uma população de possíveis soluções. Cada uma das soluções é testada através de uma função de custo definida pelo usuário. Parâmetros de diferentes soluções são avaliados aleatoriamente em grupos e os que produzirem os melhores resultados são selecionados como parâmetros pais. Os parâmetros pais são então combinados (cruzados) para criação de novos parâmetros, denominados filhos. A criação dos parâmetros filhos é realizada combinando aleatoriamente um percentual de cada um dos parâmetros pais. Por fim, há uma última etapa de mutação com probabilidade de ocorrência definida pelo usuário. A mutação realiza uma pequena alteração aleatória nos valores dos parâmetros filhos. O novo conjunto de população gerado através de todo o processo repete os passos descritos anteriormente criando um algoritmo iterativo, onde cada iteração recebe o nome de geração (106).

Para realização do ajuste das curvas experimentais com multi-polos de Debye, utilizamos os parâmetros sugeridos por Clegg e Robinson (106). O tamanho da população foi definido em 1000. O tamanho do grupo de seleção de parâmetros pais foi definido como 20. A probabilidade de ocorrência de mutação foi definida como 0,1 (10%). O número máximo de gerações foi definido como 2000.

Os parâmetros a serem otimizados pelo algoritmo são a condutividade estática (σ_s), a permissividade para altas frequências (ϵ_∞) e as componentes para cada polo de dispersão ($\Delta\epsilon_k$ e τ_k). Um fator importante no uso de AGs é a inserção de intervalos possíveis de soluções, isto é, indicar para o algoritmo os valores máximos e mínimos que cada parâmetro pode assumir. Além de auxiliar na convergência, isso evita principalmente que inconsistências físicas sejam resultados possíveis (e.g., a definição de um $\epsilon_\infty < 1$ ou um $\tau < 0$). No caso de dispersões em tecidos biológicos, os valores de permissividade, condutividade e constantes de tempo de relaxação possuem um intervalo de valores extremamente elevado em escala linear. A permissividade, por exemplo, pode variar de centenas de milhares em frequências próximas de zero à poucas unidades em frequências na faixa de GHz. Por esse motivo, é importante denotar os seus valores em escala logarítmica. A Equação 5.18 mostra o intervalo de valores possíveis sugeridos por Clegg e Robinson (106) dos parâmetros de dispersão de Debye inseridos no AG para frequências até GHz.

$$\log_{10} \Delta\epsilon_k \in (-3; 8) \tag{5.18}$$

$$\log_{10} \tau_k \in (-12; 1)$$

$$\log_{10} \sigma_s \in (-4; 0)$$

$$\log_{10} \varepsilon_\infty \geq 0$$

Apesar da definição dos intervalos de valores, não há qualquer condicionamento em relação aos valores exatos que cada polo pode ou deve assumir, sendo sua determinação um resultado da própria otimização. Assim, não estamos particionando a dispersão em bandas α , β , δ e γ , mas considerando uma dispersão contínua em todo o espectro, onde o próprio AG definirá o melhor conjunto de polos possível.

A Equação 5.19 mostra a forma como o modelo de Debye é implementado considerando a escala logarítmica e frequência em Hz.

$$\varepsilon_r^*(f) = \frac{10^{\log_{10} \sigma_s}}{j(2\pi f)\varepsilon_0} + 10^{\log_{10} \varepsilon_\infty} + \sum_{k=1}^N \frac{10^{\log_{10} \Delta \varepsilon_k}}{1 + (j(2\pi f)10^{\log_{10} \tau_k})} \quad 5.19$$

A função de custo foi definida conforme sugerido por Krewer e O'Halloran (107), também na escala logarítmica. A Equação 5.20 mostra a função de custo utilizada.

$$C_{AG} = \sum_f (\log_{10} E_r(f) - \log_{10} D_r(f))^2 + (\log_{10} E_i(f) - \log_{10} D_i(f))^2 \quad 5.20$$

onde \sum_f representa a soma de todo o espectro de interesse, $E_r(f)$ e $E_i(f)$ representam respectivamente a parte real e imaginária do dado experimental condicionado à representação de Debye. $D_r(f)$ e $D_i(f)$ representam respectivamente a parte real e imaginária da dispersão de Debye.

O algoritmo foi implementado utilizando o MATLAB 2018a (MathWorks, www.mathworks.com), o código completo encontra-se no Apêndice F.

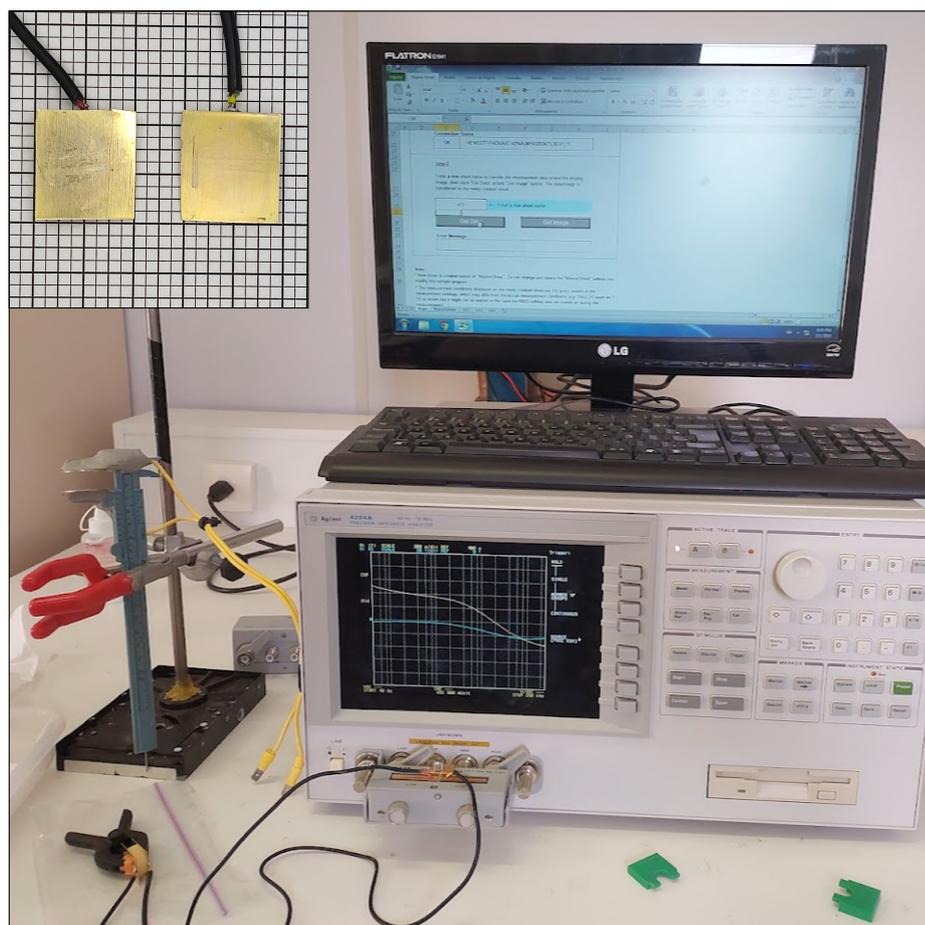
5.2.1 Dispersão biológica de *Solanum tuberosum* parametrizada em multi-polos de Debye

Para realização dos estudos experimentais e simulados, realizamos a parametrização dos dados experimentais de tecido de batata inglesa (*Solanum tuberosum*). Os tubérculos foram adquiridos de produtores locais (Caore Orgânicos, Rio Grande do Sul). O produtor é certificado para cultivo de produtos orgânicos pelos Organismos Participativos de Avaliação da Conformidade Orgânica (OPAC), registrados sob o Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA). Os espécimes pesavam em torno de 100 g e não possuíam brotos. As batatas foram lavadas e cortadas ao meio utilizando uma faca de aço inoxidável. Uma incisão cilíndrica foi realizada em cada metade utilizando um removedor circular de aço inoxidável com 18,50 mm de diâmetro. Os fragmentos cilíndricos foram então cortados em amostras de 5 mm ($\pm 0,2$ mm) de altura. Essas amostras foram armazenadas envoltas em papel toalha para mantê-las secas e reduzir o processo natural de oxidação. A temperatura do laboratório foi controlada em 20 °C.

As amostras foram posicionadas entre duas placas quadradas folheadas à ouro e cuidadosamente fixadas com um grampo plástico. Cada amostra foi submetida à avaliação das propriedades dielétricas por varredura em frequência. Os eletrodos foram conectados ao analisador de impedâncias Agilent 4294A *Precision Impedance Analyzer* (Agilent Technologies, www.agilent.com). A Figura 15 mostra o aparato experimental utilizado. O analisador realizou a medição em frequência da condutância e susceptância de cada amostra entre 40 Hz e 10 MHz, 20 pontos por década. Essa faixa de frequência está nos limites operacionais do equipamento e eletrodo utilizados. Os dados foram armazenados em planilhas e então processados. O tempo máximo entre o corte das amostras e a varredura em frequência foi de 30 min. No total, 15 amostras foram submetidas à varredura em frequência ($n = 15$). Os dados foram sumarizados em média e intervalo de confiança (IC = 95 %). Durante a parametrização, os valores de referência utilizados pelo AG foram as médias experimentais.

Ao realizarmos a medição com o analisador de impedâncias, obtemos os dados

Figura 15 – Aparato experimental para varredura em frequência das propriedades elétricas de *Solanum tuberosum*



Os eletrodos são mostrados em destaque no quadro superior esquerdo.
Fonte: Produzido pelo autor.

experimentais de admitância (Y), constituída pela condutância (G) e susceptância do material (B). Esses dados estão relacionados geometricamente à condutividade e permissividade de acordo com as Equações 5.21 e 5.22.

$$\sigma(\omega) = G(\omega) \frac{\ell}{A} \quad 5.21$$

$$\varepsilon_r(\omega) = \frac{B(\omega) \ell}{\omega \varepsilon_0 A} \quad 5.22$$

onde ℓ e A são o comprimento e a área da seção transversal da amostra.

A dispersão de Debye é constituída pela representação das características dielétricas de um material através de uma função de permissividade relativa complexa. Dessa forma, antes de comparar os dados experimentais e parametrizados, é necessário condicioná-los a uma mesma representação física. As contribuições de condutividade e permissividade da dispersão de Debye foram apresentadas na Equação 2.23. Dessa forma, podemos relacionar os dados experimentais de acordo com as equações abaixo.

$$\sigma(\omega) = \omega \varepsilon_0 \varepsilon'' \implies \Im(\varepsilon_r^*(\omega)) = -\frac{\sigma(\omega)}{\omega \varepsilon_0} = -\frac{G(\omega) \ell}{\omega \varepsilon_0 A} \quad 5.23$$

$$\varepsilon_r(\omega) = \varepsilon' \implies \Re(\varepsilon_r^*(\omega)) = \varepsilon_r(\omega) = \frac{B(\omega) \ell}{\omega \varepsilon_0 A} \quad 5.24$$

Após o condicionamento dos dados, a parametrização foi realizada utilizando de 1 à 8 polos de Debye. A Tabela 7 apresenta os resultados da parametrização para 2, 4 e 6 polos de Debye. A Figura 16 mostra graficamente esses mesmos resultados. Embora mostramos apenas três resultados para a melhor visualização, os resultados para os demais números polos podem ser encontrados no Apêndice G.

A curva experimental das propriedades dielétricas de *Solanum tuberosum*, mostradas na Figura 16 demonstram a presença das duas primeiras bandas de dispersão apresentadas no Capítulo 2 (bandas α e β). Essas bandas são mais evidentes no gráfico de permissividade (Figura 16A), já que a condutividade é pouco afetada pela banda de dispersão α . Por outro lado, a condutividade é fortemente afetada pela banda β . Isso ocorre principalmente pelo fato de células vegetais possuírem, além da membrana, uma parede celular. A parede celular atua como uma segunda camada não-condutiva em baixas frequências (109).

A presença das bandas de dispersão também pode ser confirmada pelo resultado de definições de polos do AG. A frequência dos polos foram determinadas pelo AG em 82 Hz e 380 kHz no caso de otimização com 2 polos, 42 Hz, 6,8 kHz, 158 kHz e 960 kHz para 4 polos, e 31 Hz, 446 Hz, 6,4 kHz, 42 kHz, 264 kHz e 1,1 MHz para 6 polos. Note que, mesmo sem um condicionamento explícito para alocação dos polos,

Tabela 7 – Resultado da parametrização da dispersão dielétrica de *Solanum tuberosum* para 2, 4 e 6 polos de Debye

Parâmetro	N = 2	N = 4	N = 6
CF Valor Mín	1,750	$5,174 \times 10^{-2}$	$9,006 \times 10^{-3}$
ϵ_{∞}	$3,463 \times 10^2$	$1,747 \times 10^2$	$1,621 \times 10^2$
σ_s	$2,508 \times 10^{-2}$	$2,159 \times 10^{-2}$	$2,087 \times 10^{-2}$
$\Delta\epsilon_1$	$1,104 \times 10^6$	$2,251 \times 10^6$	$3,198 \times 10^6$
τ_1 (s)	$1,932 \times 10^{-3}$	$3,783 \times 10^{-3}$	$5,067 \times 10^{-3}$
$\Delta\epsilon_2$	$3,308 \times 10^4$	$2,918 \times 10^4$	$3,321 \times 10^4$
τ_2 (s)	$4,181 \times 10^{-7}$	$2,309 \times 10^{-5}$	$3,563 \times 10^{-4}$
$\Delta\epsilon_3$		$1,836 \times 10^4$	$1,968 \times 10^4$
τ_3		$1,005 \times 10^{-6}$	$2,495 \times 10^{-5}$
$\Delta\epsilon_4$		$1,053 \times 10^4$	$1,048 \times 10^4$
τ_4 (s)		$1,658 \times 10^{-7}$	$3,775 \times 10^{-6}$
$\Delta\epsilon_5$			$1,548 \times 10^4$
τ_5 (s)			$6,013 \times 10^{-7}$
$\Delta\epsilon_6$			$7,628 \times 10^3$
τ_6 (s)			$1,403 \times 10^{-7}$

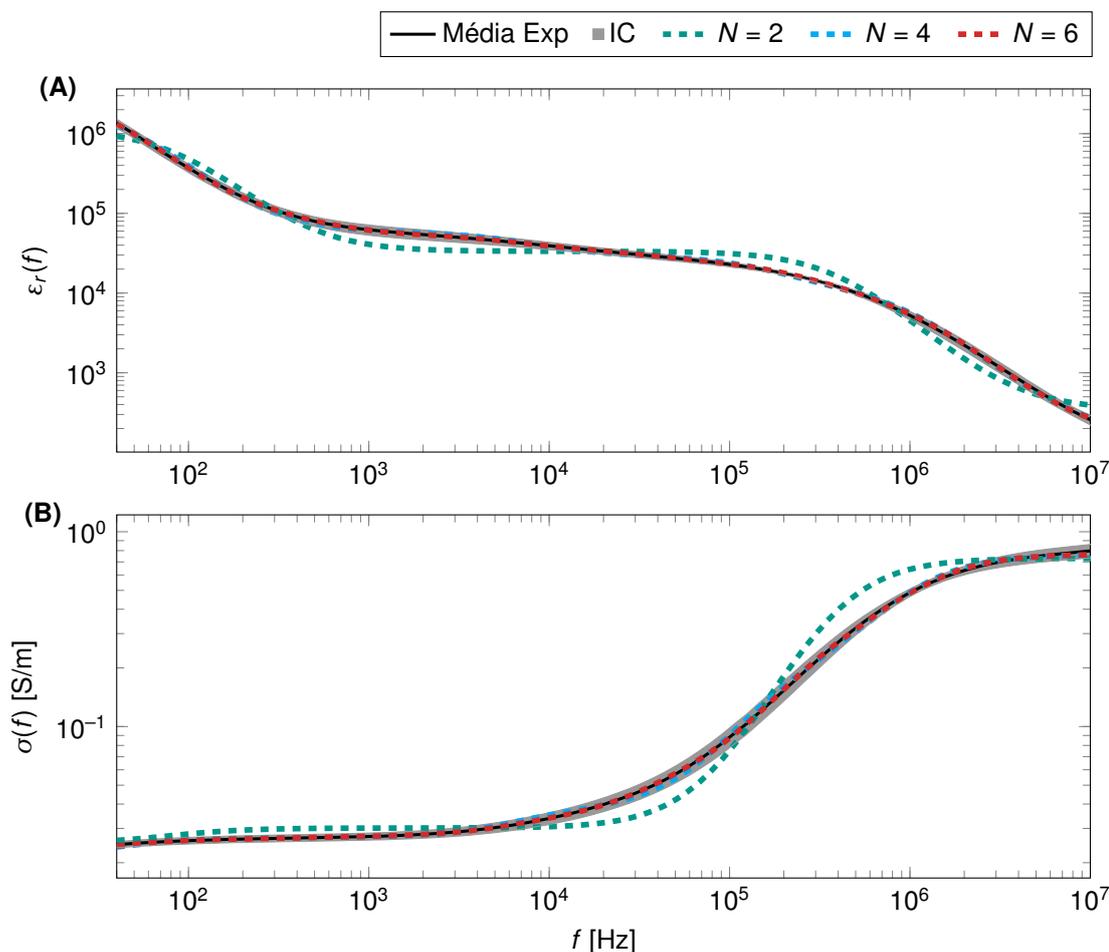
CF Valor Mín é o valor mínimo atingido pela função de custo. N corresponde ao número de polos utilizado na parametrização.

Fonte: Produzido pelo autor.

o AG encontrou o melhor resultado sempre com metade dos polos em cada banda de dispersão (α e β).

Em relação a qualidade de parametrização, é possível que a partir de 4 polos de Debye os dados parametrizados já estão completamente contidos no intervalo de confiança dos dados experimentais. Na seção seguinte iremos discutir como implementar a dispersão de Debye no domínio do tempo, o que levará a implementação de equações diferenciais para cada polo de dispersão. É importante manter a parametrização com o menor número de polos possível. Como forma de avaliar a qualidade da parametrização, definimos que um modelo está satisfatoriamente parametrizado se o resultado da parametrização estiver contido dentro do intervalo de confiança do dado experimental. Com essa condição, a parametrização dos dados dispersivos de batatas entre 40 Hz e 10 MHz está satisfatoriamente parametrizada com 4 polos de dispersão de Debye, conforme demonstrado na Figura 16.

Figura 16 – Resultado gráfico da parametrização da dispersão dielétrica de *Solanum tuberosum* para 2, 4 e 6 polos de Debye



(A) Permissividade. (B) Condutividade. Média Exp é a média dos dados experimentais. IC é o intervalo de confiança (95%).

Fonte: Produzido pelo autor.

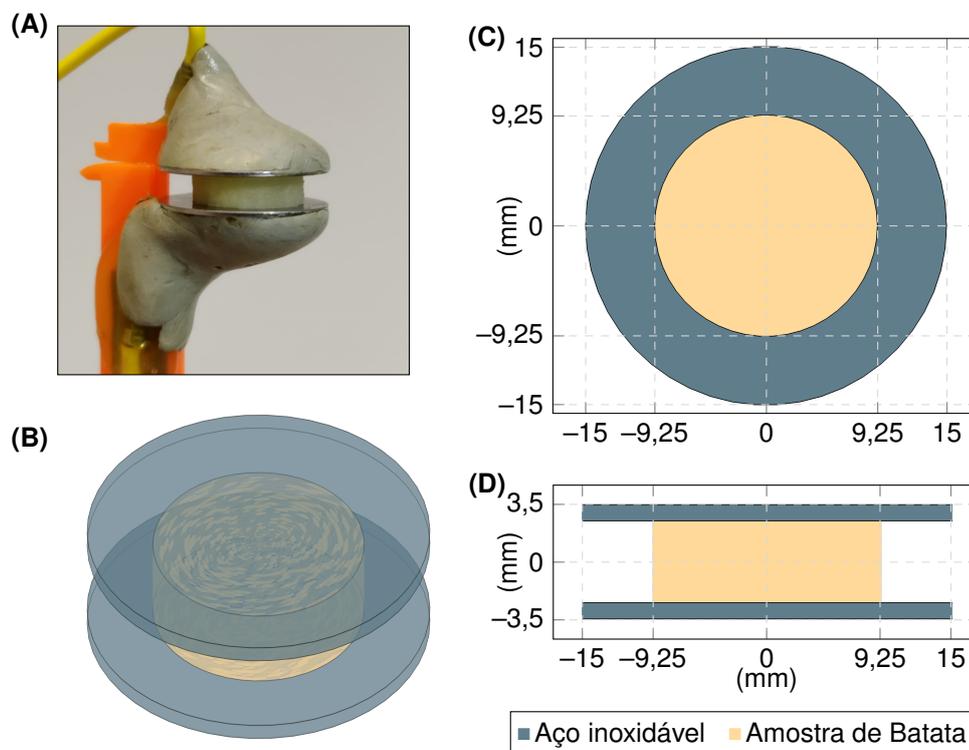
5.3 EXPERIMENTAÇÃO E SIMULAÇÃO DOS EFEITOS DISPERSIVOS NOS DOMÍNIOS DA FREQUÊNCIA E DO TEMPO

Testamos a implementação proposta no decorrer do capítulo através de dois estudos. O primeiro estudo testa diretamente a conversão entre domínios da frequência e do tempo, para isso simulamos a dispersão parametrizada no domínio da frequência e comparamos os resultados com sinais senoidais simulados no domínio do tempo. Em um segundo teste, realizamos experimentos com pulsos quadrados em amostras de tubérculo e comparamos os resultados experimentais com simulações no domínio do tempo.

A geometria da amostra utilizada para ambos os estudos segue o mesmo padrão da utilizada na parametrização, a qual consiste em amostras cilíndricas com 18,5 mm de diâmetro e 5 mm de altura. O eletrodo, nesse caso, são discos de aço inoxidável com 30 mm de diâmetro e 1 mm de espessura fixados em um paquímetro. A amostra

foi posicionada entre os eletrodos para aplicação dos campos pulsados. A Figura 17A mostra o arranjo experimental.

Figura 17 – Amostra e geometria gerada a partir da rotação do modelo axi-simétrico 2D para simulação de amostras de batata (*Solanum tuberosum*)



(A) Amostra experimental. (B) Representação tridimensional (3D). (C) Vista transversal no centro da amostra. (D) Vista frontal no centro da amostra.

Fonte: Produzido pelo autor.

No simulador, podemos implementar um modelo axi-simétrico 2D devido a simetria geométrica em coordenadas polares da amostra. No modelo axi-simétrico, a amostra pode ser representada por um retângulo com 9,25 mm de comprimento e 5 mm de altura rotacionado em 360° . Da mesma forma, os eletrodos podem ser representados por retângulos com 15 mm de comprimento e 1 mm de altura, posicionados na parte superior e inferior da amostra. A Figura 17 mostra a geometria após rotação do modelo axi-simétrico 2D.

As propriedades elétricas foram inseridas conforme os modelos apresentados durante o Capítulo. No domínio da frequência, o modelo de Debye apresentado na Equação 5.1 pode ser implementado de maneira direta. No domínio do tempo, foram seguidas as Equações 5.16 e 5.14 através do método de EDA. Em ambos os domínios, a implementação utilizou os dados de parametrização com 4 polos de Debye, conforme apresentado na Tabela 7. Para o eletrodo (aço-inoxidável 316L), a condutividade foi definida como 1,75 MS/m e a permissividade relativa como 1. No caso das simulações no domínio do tempo, o passo de tempo utilizado foi definido dinamicamente através do

método α -generalizado (*Generalized- α method*) com passos de tempo do solucionador intermediários. Isso significa que o algoritmo pode diminuir o passo de tempo para atingir a convergência, mas nunca aumentá-lo. O passo de tempo máximo foi definido para cada estudo conforme apresentado abaixo.

O primeiro estudo foi realizado apenas por simulações, afim de comparar os resultados de magnitude e fase em ambos os domínios. Definimos a amplitude do sinal em 50 V, correspondente a uma amplitude de campo de 10 kV/m, onde não são esperados danos ao tecido (82). No domínio da frequência, a frequência foi varrida entre 40 Hz e 10 MHz, 100 pontos por década. No domínio do tempo, simulamos cinco períodos de sinais senoidais com frequência de 1 kHz, 100 kHz e 1 MHz. O valor máximo do passo de tempo foi definido como um centésimo do período do sinal.

No estudo com pulsos quadrados, uma sequência de oito pulsos com 100 μ s repetidos a cada 200 μ s (5 kHz de frequência de repetição) foi aplicada nas amostras de tubérculo. Amostras receberam pulsos com amplitude de 50 V ($n = 12$) e 100 V ($n = 12$). Os dados foram adquiridos utilizando um osciloscópio Tektronix DPO2012B (Tektronix Inc., www.tek.com). Tensão e corrente foram medidas utilizando as ponteiras Tektronix TPP0100 e Tektronix A622, respectivamente. Os valores de média e intervalo de confiança (95 %) foram calculados através de um *script* em Python (Python Software Foundation, www.python.org).

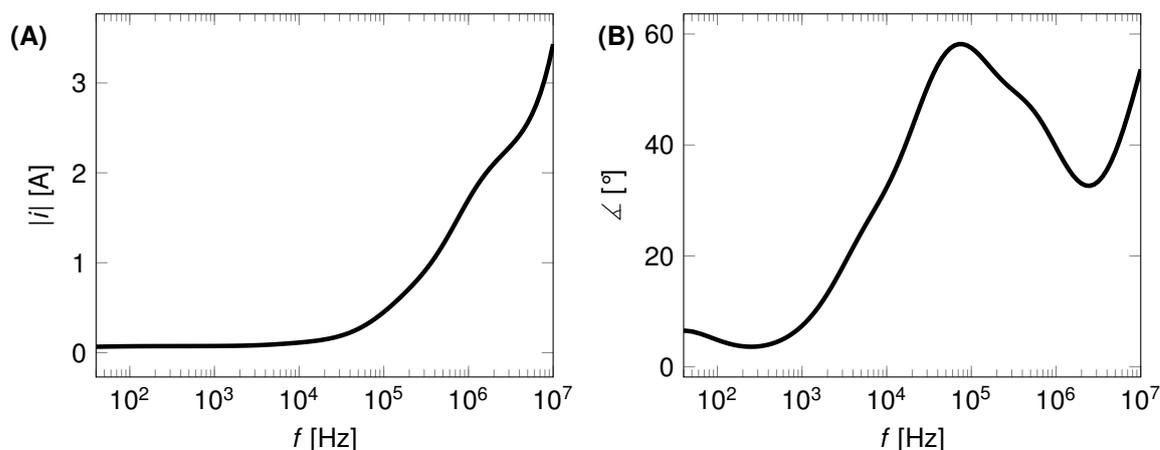
Para a simulação, o sinal de entrada foi implementado com tempo de transição (tempo de subida e descida em cada pulso) de 8 μ s. Para fins de comparação, também foram simulados casos onde a dispersão não é implementada, considerando a condutividade constante e igual a condutividade estática. O valor máximo do passo de tempo foi definido em 0,1 μ s nos momentos de transição do pulso e 1 μ s nos momentos sobre os pulsos e intervalos entre pulsos.

5.3.1 Simulação da Dispersão na Frequência e no Tempo

As Figuras 18 e 19 mostram os resultados para simulação no domínio da frequência e do tempo, respectivamente. A Figura 19 também mostra o valor da magnitude encontrada no domínio da frequência para facilitar a comparação. A Tabela 8 mostra a resposta em magnitude e fase para os sinais de 1 kHz, 100 kHz e 1 MHz nos domínios da frequência e do tempo.

As simulações em magnitude e fase podem ser comparadas se o sinal no domínio do tempo atinge o regime permanente senoidal. Podemos ver na Figura 19 que o sinal senoidal atinge o regime permanente após um ou dois períodos. A Tabela 8 permite observar que tanto a magnitude do sinal quanto sua fase seguem valores próximos em ambos os domínios simulados. Os erros máximos foram de $\pm 0,01$ na magnitude e $\pm 1,5$ na fase. Os erros entre os valores simulados em cada domínio podem estar relacionados as aproximações numéricas utilizadas pelo simulador. Acreditamos que a

Figura 18 – Simulação no domínio da frequência da dispersão dielétrica de *Solanum tuberosum* parametrizada com 4 polos de Debye



(A) Magnitude da Corrente Elétrica. (B) Fase da Corrente Elétrica.
Fonte: Produzido pelo autor.

Tabela 8 – Resultados da simulação para magnitude e fase nos domínios da frequência e do tempo em 1 kHz, 100 kHz e 1 MHz

Frequência	Domínio da Frequência		Domínio do Tempo	
	Magnitude (A)	Fase (°)	Magnitude (A)	Fase (°)
1 kHz	0,073	7,395	0,073	6,000
100 kHz	0,451	57,494	0,452	57,600
1 MHz	1,703	39,535	1,706	39,600

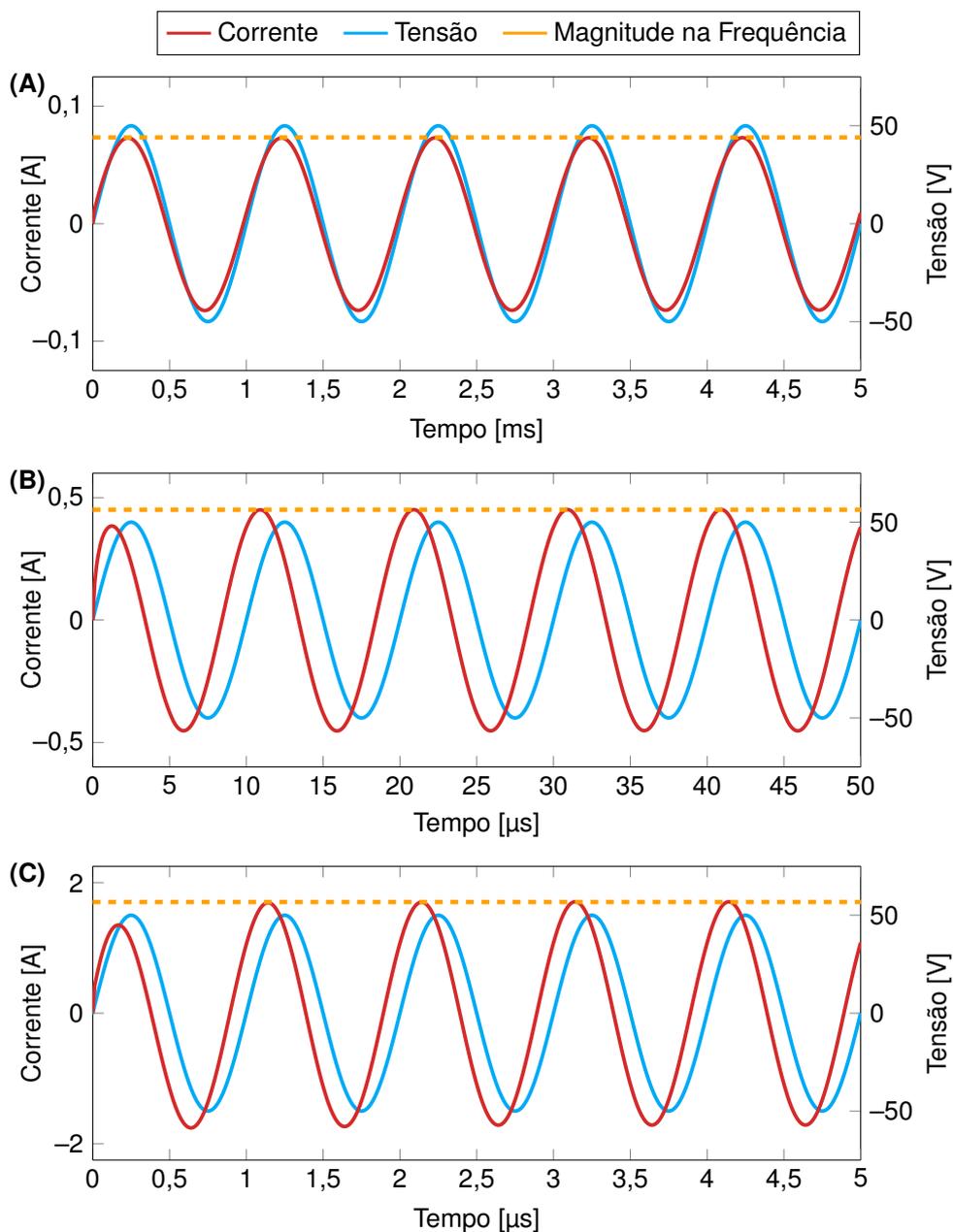
Fonte: Produzido pelo autor.

convergência entre os resultados é uma primeira verificação da viabilidade do modelo proposto no decorrer do capítulo, confirmando que o método de EDA é adequado para transformação entre o domínio da frequência e do tempo.

5.3.2 Experimentação e Simulação com Trem de Pulsos Quadrados

A Figura 20 apresenta o resultado para o experimento com os pulsos quadrados. Os dados experimentais foram sumarizados em média e intervalo de confiança (IC = 95%). A precisão da simulação é uma segunda verificação da viabilidade do modelo proposto. Apesar de diferenças nos momentos de transição do pulso (em 0 μ s e 100 μ s e assim sucessivamente), a simulação com a dispersão implementada segue a média dos dados experimentais. As diferenças nos momentos de transição podem ser explicadas, em parte, pelas indutâncias e capacitâncias parasitas do aparato experimental e acoplamento das ponteiros de tensão e corrente. Dessa forma, os picos de sinal em direção oposta (negativo na subida e positivo na descida) não ocorrem devido a dispersão do tecido, mas são um efeito parasita do aparato experimental.

Figura 19 – Simulação no domínio do tempo da dispersão dielétrica de *Solanum tuberosum* parametrizada com 4 polos de Debye

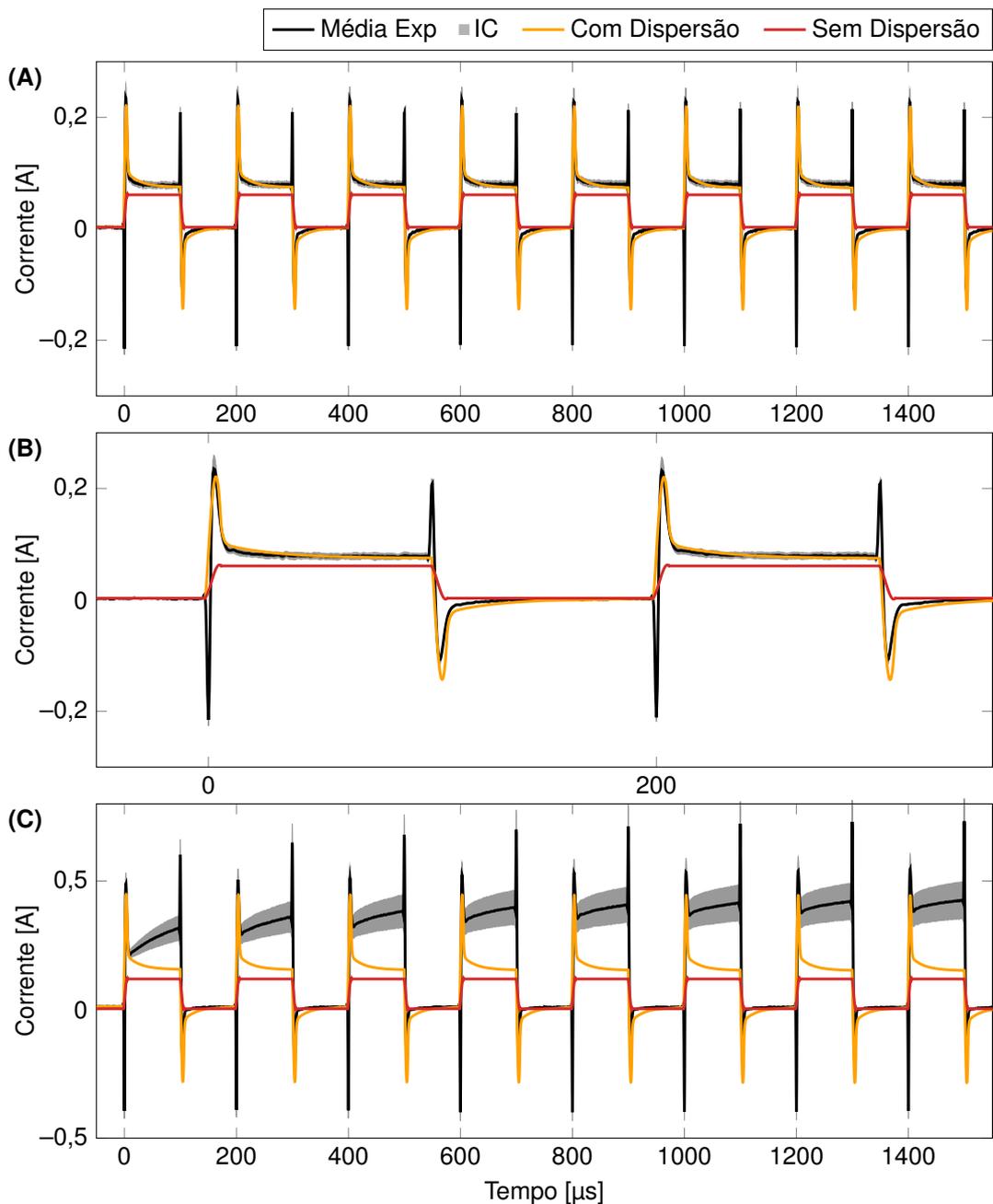


Tensão senoidal com frequência de (A) 1 kHz, (B) 100 kHz e (C) 1 MHz. As fases correspondem a (A) $6,0^\circ$, (B) $57,6^\circ$ e (C) $39,6^\circ$.
Fonte: Produzido pelo autor.

Os resultados também permitem observar que ao remover a dispersão e considerar a condutividade constante (igual a condutividade estática), não apenas a magnitude da corrente elétrica é subestimada, como o formato de onda difere do observado na prática.

Em relação ao sinal com amplitude de 100 V (Figura 20C), é possível observar um comportamento diferente da corrente elétrica. Ivorra *et al.* (82) indicam que o limiar para ocorrência da eletroporação em *Solanum tuberosum* está em torno de 20 kV/m.

Figura 20 – Simulação no domínio do tempo com pulsos quadrados da dispersão dielétrica de *Solanum tuberosum* parametrizada com 4 polos de Debye



Protocolo completo com oito pulsos com amplitude de (A) 50 V e (C) 100 V. (B) Ampliação dos dois primeiros pulsos para amplitude de 50 V. Em 100 V há ocorrência de eletroporação. Média Exp é a média experimental. IC é o intervalo de confiança (IC = 95%). Os picos de sinal em direção oposta (negativo na subida e positivo na descida) não ocorrem devido a dispersão do tecido, mas são um efeito parasita do aparato experimental.

Fonte: Produzido pelo autor.

Como a amostra possui 5 mm de espessura, o campo elétrico equivalente para 100 V é de 20 kV/m. Ao contrário da experimentação com tensão menor, a corrente tem tendência de crescimento sob o pulso e ao decorrer deles. Esse fenômeno está relacionado à ocorrência de eletroporação. O modelo dispersivo, portanto, consegue explicar fiel-

mente a corrente até um determinado limiar de tensão (e conseqüentemente campo elétrico). Para explicar o fenômeno que ocorre quando o tecido é estimulado com campos elétricos acima de determinado limiar, precisamos incorporar ao modelo os efeitos de eletroporação.

6 MODELO DINÂMICO DE ELETROPORAÇÃO BASEADO NA DISPERSÃO BIOLÓGICA

A partir da implementação das propriedades elétricas do tecido discutida no Capítulo 5, podemos implementar os acréscimos de condutividade por ocorrência da eletroporação. Conforme apresentado no Capítulo 2, a dinâmica da eletroporação é normalmente estudada em nível celular. Por esse motivo, assim como proposto pelos modelos dinâmicos de Voyer *et al.* (48) e Ramos e Weinert (49), definimos as dinâmicas da eletroporação em tecidos extrapolando um modelo dinâmico de células.

6.1 MODELO DE ELETROPORAÇÃO EM TECIDOS

Leguèbe *et al.* (79) propuseram um modelo capaz de prever a concentração de poros e a expansão da permeabilidade dinamicamente. O estudo traz comprovações experimentais dos cálculos realizados. Esse modelo é o mesmo utilizado por Voyer *et al.* (48) na sua formulação do modelo de eletroporação em tecidos, embora desconsideradas as parcelas de selamento dos poros, o que limita o modelo a prever um único pulso.

Descrevemos o modelo dinâmico de eletroporação em tecidos baseados em uma modificação do modelo proposto por Leguèbe *et al.* (79). Modelamos a eletroporação no tecido utilizando três estados dinâmicos: pré-poros (P_0), poros iniciais (P_1) e poros expandidos (P_2). Cada estado contribui de forma específica para o aumento da condutividade. Conforme proposto por Leguèbe *et al.*, todas as concentrações crescem e decrescem exponencialmente. No modelo tecidual, P_0 e P_1 são função da magnitude do campo elétrico e P_2 é função de P_1 . As Equações 6.1 – 6.3 apresentam o modelo proposto. As notações entre chaves indicam a concentração dos estados de poros.

$$\frac{d[P_0]}{dt} = \frac{\beta_0(E) - [P_0]}{\tau_0} \quad 6.1$$

$$\frac{d[P_1]}{dt} = \frac{\beta_1(E) - [P_1]}{\tau_1} \quad 6.2$$

$$\frac{d[P_2]}{dt} = \frac{[P_1] - [P_2]}{\tau_2} \quad 6.3$$

τ_0 é uma constante de tempo. Os tempos característicos τ_1 e τ_2 dependem se a função está em fase crescente ou decrescente, conforme as condições apresentadas nas Equações 6.4 e 6.5. β_0 e β_1 são apresentadas nas Equações 6.6 e 6.7, as funções descrevem os valores máximos que as concentrações dos estados P_0 e P_1 podem atingir dependendo da magnitude do campo elétrico. Isso significa que ambas as funções podem variar entre zero e um. Zero significa que nenhum pré-poro (β_0) ou poro (β_1) é formado. Um significa que o tecido atingiu a saturação para cada fenômeno.

A saturação não significa necessariamente que novos pré-poros ou poros não serão formados, mas que a partir de um determinado limiar, não há contribuição significativa no aumento da condutividade do tecido. O número máximo de poros ainda é um tema discutido em eletroporação de células isoladas. O modelo assintótico (87), por exemplo, não define um valor limite para a densidade de poros.

$$\tau_1 = \begin{cases} \tau_{1G}(1 - 0,5[P_0]) & \text{se } \beta_1(E) - [P_1] \geq 0 \\ \tau_{1D} & \text{caso contrário} \end{cases} \quad 6.4$$

$$\tau_2 = \begin{cases} \tau_{2G} & \text{se } [P_1] - [P_2] \geq 0 \\ \tau_{2D} & \text{caso contrário} \end{cases} \quad 6.5$$

$$\beta_0(E) = \frac{1}{1 + e^{-(|E| - E_0)/\Delta E_0}} \quad 6.6$$

$$\beta_1(E) = \frac{1}{1 + e^{-(|E| - E_1)/\Delta E_1}} \quad 6.7$$

onde E_0 e E_1 são os valores centrais das funções logísticas. ΔE_0 e ΔE_1 moldam o aclave de cada função. τ_{1G} e τ_{2G} são os tempos característicos para crescimento dos estados $[P_1]$ e $[P_2]$. τ_{1D} e τ_{2D} são os tempos de relaxação para decaimento dos estados $[P_1]$ e $[P_2]$.

O acréscimo no número de poros (P_1) deveria diminuir o número de pré-poros (P_0), já que os pré-poros migram para o próximo estado ($P_0 \rightarrow P_1$). O mesmo deveria ocorrer entre as formações final e inicial ($P_1 \rightarrow P_2$). Decidimos não incluir esse efeito no modelo pois estamos calculando concentrações ao invés de números absolutos. Não é esperado que todos os pré-poros deem origem a um poro e que todos os poros expandam. De acordo com (110), apenas 2% dos poros devem expandir. É difícil definir a relação proporcional de transição entre cada estado. Acreditamos que a implementação do efeito de transição traria pouca influência no resultado final do modelo, ao mesmo tempo que aumentaria o número de parâmetros.

6.1.1 Eletroporação na Dispersão Biológica

As espectroscopias de impedância antes e após a estimulação por PEF revelam um acréscimo na condutividade do tecido ao longo de todo o espectro (14, 80). A permissividade também é afetada, mas em menor intensidade. Mais estudos são necessários para compreender exatamente como cada uma das propriedades é alterada pela eletroporação. Por questões de complexidade de implementação, consideramos a alteração apenas na componente de condutividade no desenvolvimento do modelo dessa tese. Para aumentar a condutividade ao longo do espectro, podemos alterar a condutividade estática da dispersão (σ_s) de acordo com a Equação 6.8.

$$\sigma_P = \sigma_S + \sigma_{P_0}[P_0] + \sigma_{P_1}[P_1] + \sigma_{P_2}[P_2] \quad 6.8$$

onde σ_S é a condutividade estática obtida através da análise da dispersão biológica. σ_{P_0} , σ_{P_1} , e σ_{P_2} são, respectivamente, os coeficientes de acréscimo de condutividade para os estados de eletroporação P_0 , P_1 e P_2 . As concentrações $[P_0]$, $[P_1]$ e $[P_2]$ são calculadas através das Equações 6.2 – 6.3.

6.1.2 Análise Térmica

A condutividade de tecidos biológicos aumenta com a temperatura (91). A corrente elétrica que flui através do tecido gera calor devido ao efeito Joule. Por esse motivo, incluímos simulações de aumento de temperatura na amostra durante o trem de pulsos. A equação para a difusão térmica com efeito Joule é apresentada na Equação 6.9 (111)

$$\rho c_p \frac{\partial T}{\partial t} - \nabla \cdot (k \nabla T) = \vec{J} \cdot \vec{E} \quad 6.9$$

onde T é a temperatura, ρ é a densidade do material, c_p é o calor específico do material em pressão constante e k é a condutividade térmica (a dependência da condutividade térmica com a temperatura não foi considerada). \vec{J} e \vec{E} são os vetores de densidade de corrente elétrica e campo elétrico calculados através das Equações 3.1 e 3.2 apresentadas no Capítulo 3.

As propriedades termo-físicas da batata (*Solanum tuberosum*) (112) e do eletrodo utilizado no experimento (aço inoxidável 316L) (113) são apresentadas na Tabela 9. A influência na condutividade foi implementada na condutividade da eletroporação, pois os efeitos térmicos alteram a propriedade de todos os componentes do tecido. O coeficiente condutividade-temperatura foi definido como $\chi = 1,7 \times 10^{-2}$ [1/K] (88). Logo, a condutividade é adaptada conforme Equação 6.10.

$$\sigma_T = \sigma_P (1 + \chi(T - T_0)) \quad 6.10$$

onde T_0 é a temperatura inicial.

Tabela 9 – Propriedades termo-físicas à 20 °C (293,15 K) dos materiais utilizados no estudo

Material	ρ [kg/m ³]	C_p [J/(kg K)]	k [W/(m K)]
<i>Solanum tuberosum</i>	1053	4410	0,56
Aço Inox 316L	8000	480	13,50

Fonte: *Solanum tuberosum* (112). Aço Inox 316L (113).

Após incluir os efeitos térmicos e de eletroporação, a Equação 5.8 é adaptada para Equação 6.11 e utilizada para descrever a condutividade no simulador. As demais componentes são calculadas conforme apresentado no Capítulo 5.

$$\vec{J}(t) = \sigma_T \vec{E}(t) + \epsilon_0 \epsilon_\infty \frac{\partial \vec{E}(t)}{\partial t} + \sum_{k=1}^N \vec{J}_{e_k}(t) \quad 6.11$$

6.2 MODELO DINÂMICO DE ELETROPORAÇÃO DE *SOLANUM TUBEROSUM*

Para avaliar a qualidade e viabilidade do modelo proposto, realizamos experimentações com tecido de *Solanum tuberosum*. A metodologia para preparação das amostras seguiu a mesma proposta apresentada no Capítulo 5, com amostras cilíndricas de 18,50 mm de diâmetro e 5 mm de altura. As amostras foram posicionadas entre dois eletrodos de aço inoxidável de 30 mm de diâmetro e cuidadosamente fixadas utilizando um grampo plástico (Figura 17A). Cada amostra foi submetida a um único protocolo de PEF de acordo com o ESOPÉ com frequência de repetição de 5 kHz e então substituída. Foram aplicados campos elétricos com amplitude de 50 V à 250 V (50 V de passo) e de 300 V à 500 V (100 V de passo). Devido ao espaçamento entre os eletrodos ser 5 mm, essas tensões representam campos elétricos de 10 kV/m à 50 kV/m (10 kV/m de passo) e de 60 kV/m à 100 kV/m (20 kV/m de passo). Cada tensão (e respectivo campo elétrico) foi avaliada em 10 amostras ($n = 10$). Os dados foram adquiridos utilizando um osciloscópio Tektronix DPO2012B (Tektronix Inc., www.tek.com). Tensão e corrente foram medidas utilizando as ponteiras Tektronix TPP0100 e Tektronix A622, respectivamente. Os dados coletados foram sumarizados em média, intervalo de confiança (95 %) e desvio padrão, calculados através de um *script* em Python (Python Software Foundation, www.python.org).

Assim como nas simulações realizadas no Capítulo 5, utilizamos a simetria da amostra para realizar a simulação em 2D axi-simétrico. Nessa configuração, a amostra pode ser representada por um retângulo de 9,25 mm de comprimento e 5 mm de altura e o eletrodo por um retângulo de 15 mm de comprimento e 1 mm de altura, ambos rotacionados em 360° (veja na Figura 17B, C e D). A dispersão biológica foi implementada conforme Equações 5.16 e 5.14. Utilizamos novamente os dados de parametrização com 4 polos de Debye, conforme apresentado na Tabela 7, mas substituindo a componente de condutividade estática pela relação apresentada na Equação 6.10. Para o eletrodo, a condutividade foi definida como 1,75 MS/m e a permissividade relativa como 1. No caso do cálculo numérico da difusão térmica, as superfícies externas do problema foram consideradas isolantes térmicas (sem irradiação para o meio externo) e todos os componentes (tecido e eletrodos) foram considerados como fontes de calor causado pelo efeito Joule. A temperatura inicial do modelo foi definida como 293,15 K (20 °C).

O sinal de entrada nas simulações foi implementado conforme o sinal experimental. Os tempos de transição do pulso (tempo de subida e descida em cada pulso) foram fixados em $8 \mu\text{s}$. Os passos de tempo da simulação foram definidos através do método α -generalizado (*Generalized- α method*) com passos de tempo do solucionador intermediários. Isso significa que o algoritmo pode diminuir o passo de tempo para atingir a convergência, mas nunca aumentá-lo. Com isso, definimos os limites máximos de passo de tempo como $1 \mu\text{s}$ com em sinal em baixa ou alta e $0,1 \mu\text{s}$ nos momentos de transição do pulso.

6.2.1 Resultados

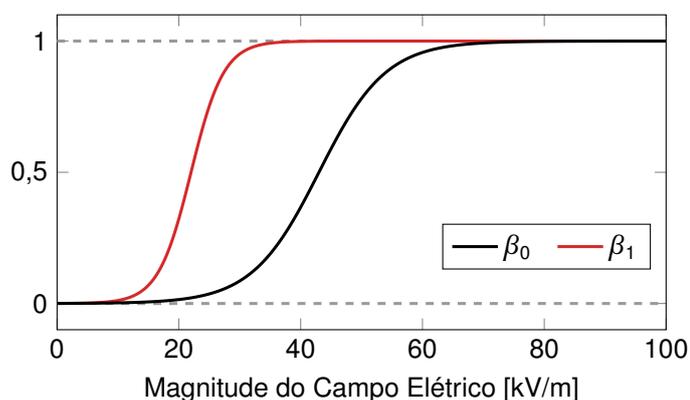
Os parâmetros do modelo dinâmico de eletroporação de *Solanum tuberosum* são apresentados na Tabela 10. A Figura 21 apresenta graficamente as funções β_0 e β_1 . A determinação dos parâmetros do modelo foram inicialmente estimadas através de uma análise dos resultados experimentais (detalhes no Apêndice H) e posteriormente otimizadas por simulações. Durante a otimização por simulações, buscou-se melhorar as estimativas iniciais através de mudanças nos valores estimados por tentativa e erro para minimizar os erros simulados em relação aos dados experimentais.

Tabela 10 – Parâmetros do modelo dinâmico de eletroporação para *Solanum tuberosum*

Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor	Parâmetro	Valor
E_0	43 kV/m	τ_0	$0,5 \mu\text{s}$	σ_{P_1}	0,11 S/m
ΔE_0	5,5 kV/m	σ_{P_0}	0,375 S/m	τ_{2G}	$500 \mu\text{s}$
E_1	22 kV/m	τ_{1G}	$40 \mu\text{s}$	τ_{2D}	1 s
ΔE_1	2,7 kV/m	τ_{1D}	$150 \mu\text{s}$	σ_{P_2}	0,04 S/m

Fonte: Produzido pelo autor.

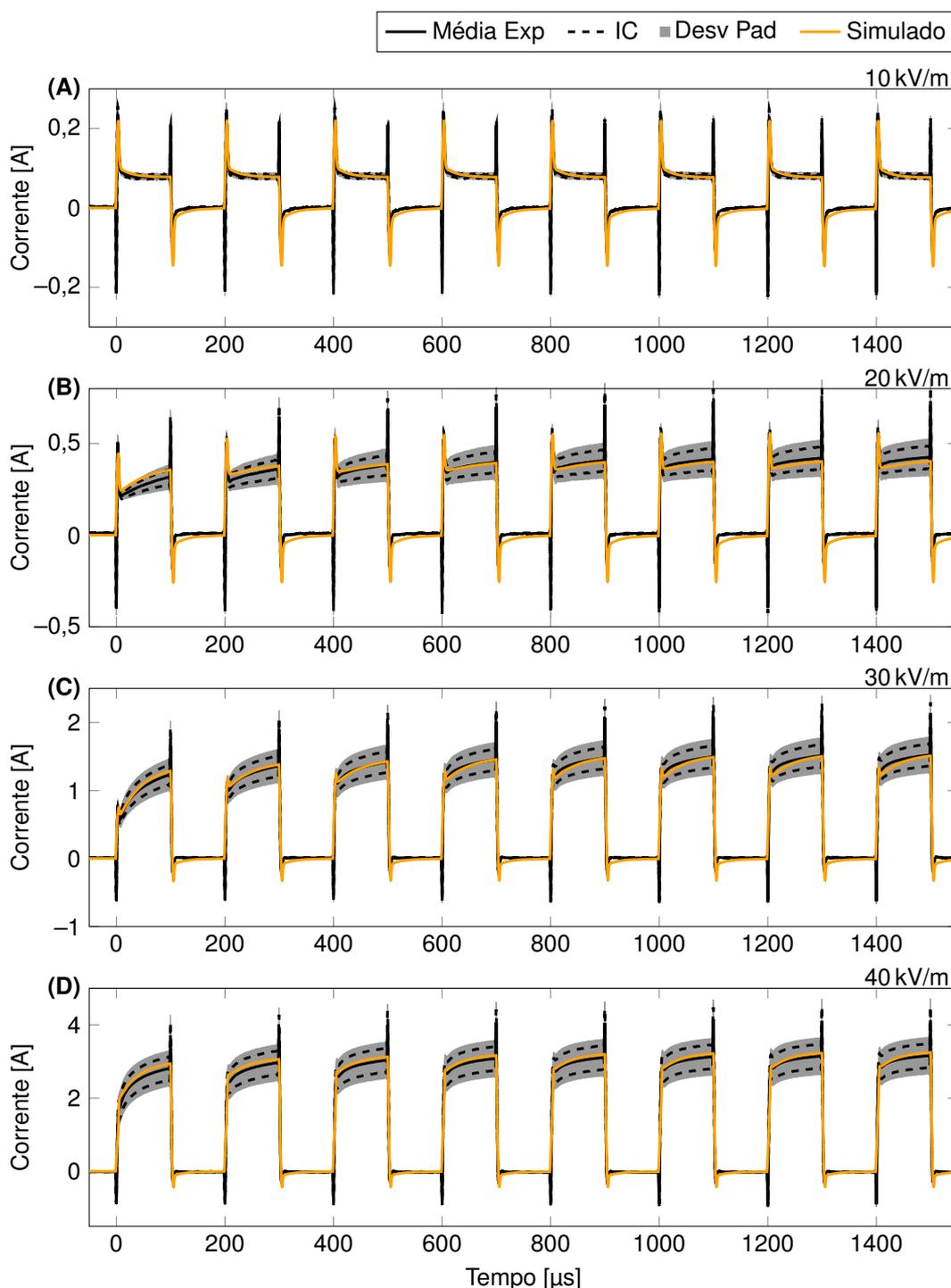
Figura 21 – Forma sigmoidal das funções β_0 e β_1



Fonte: Produzido pelo autor.

As Figuras 22 e 23 mostram os resultados experimentais e simulados para todos os campos elétricos (10 à 100 kV/m). Os dados experimentais foram sumarizados em média, intervalo de confiança (95%) e desvio padrão.

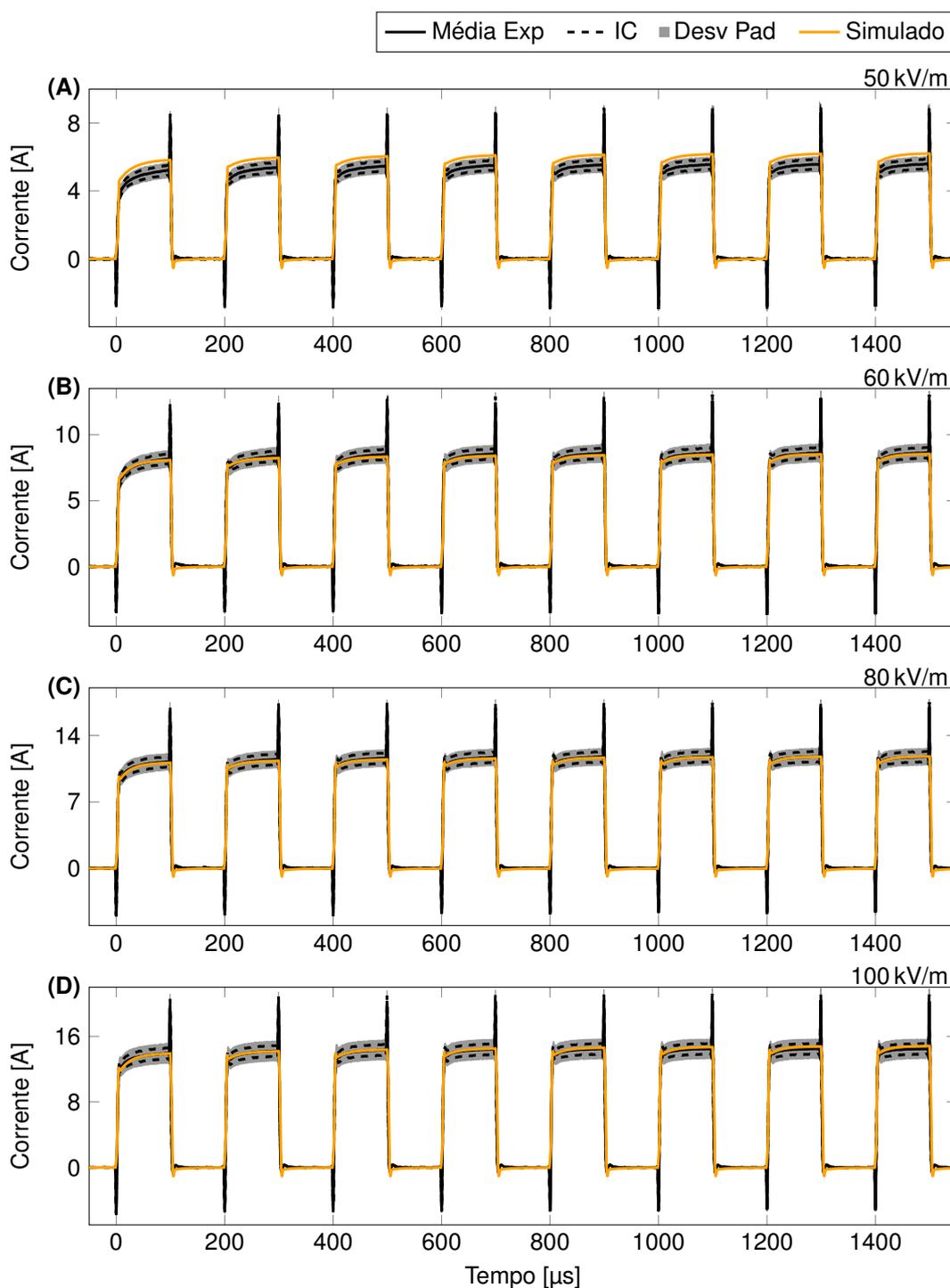
Figura 22 – Correntes elétricas experimentais e simuladas de eletroporação em *Solanum tuberosum* para magnitude de campo elétrico entre 10 kV/m e 40 kV/m



Magnitude do campo elétrico do PEF de (A) 10 kV/m, (B) 20 kV/m, (C) 30 kV/m e (D) 40 kV/m. Média Exp é a média experimental, IC é o intervalo de confiança (95%), Desv Pad é o desvio padrão.

Fonte: Produzido pelo autor.

Figura 23 – Correntes elétricas experimentais e simuladas de eletroporação em *Solanum tuberosum* para magnitude de campo elétrico entre 50 kV/m e 100 kV/m



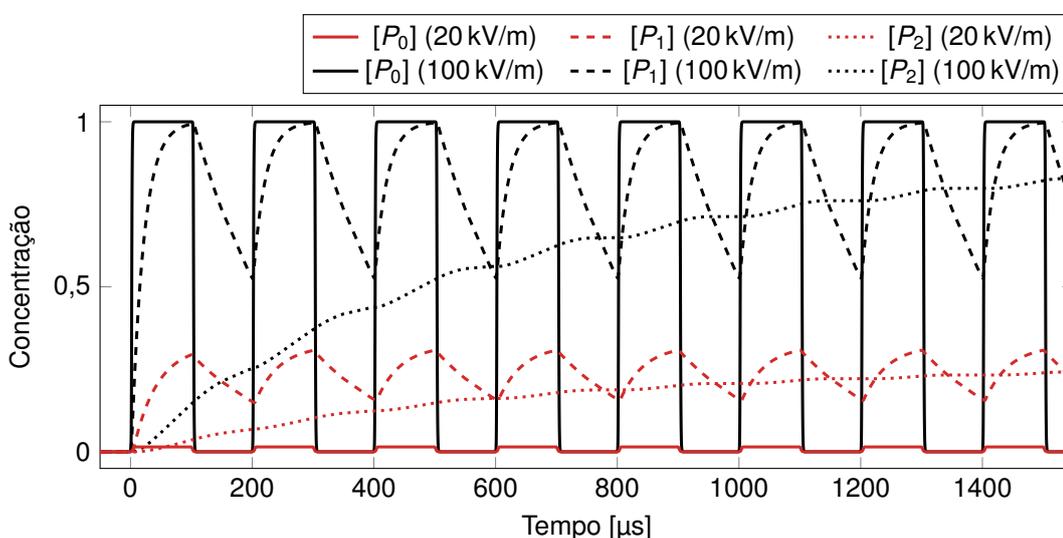
Magnitude do campo elétrico do PEF de (A) 50 kV/m, (B) 60 kV/m, (C) 80 kV/m e (D) 100 kV/m. Média Exp é a média experimental, IC é o intervalo de confiança (95%), Desv Pad é o desvio padrão.

Fonte: Produzido pelo autor.

Para analisar o modelo, avaliamos a evolução dos estados dinâmicos da eletroporação e do aumento térmico no centro da amostra. A evolução dos estados dinâmicos $[P_0]$, $[P_1]$ e $[P_2]$ para 20 kV/m e 100 kV/m são apresentadas na Figura 24 (para outros campos elétricos, veja o Apêndice I). O gráfico mostra um aumento maior na concentração das dinâmicas P_1 e P_2 em relação à P_0 para o limiar de 20 kV/m. Por outro lado, os estados tendem à saturação em 100 kV/m.

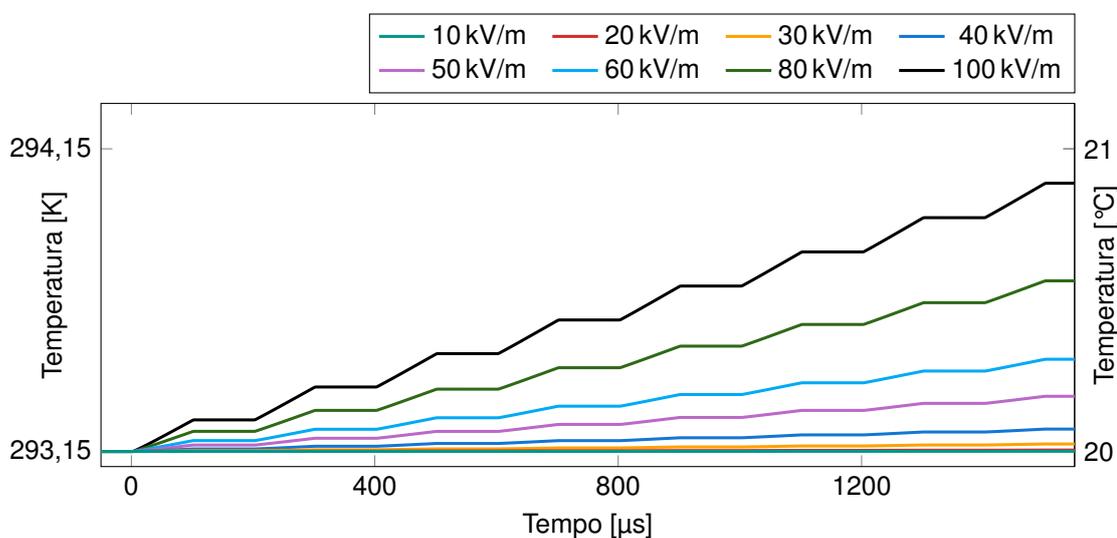
O aumento da temperatura para todas as tensões (consequentemente para todos os campos elétricos) é mostrado na Figura 25. O aumento da temperatura

Figura 24 – Concentração dos estados dinâmicos da eletroporação para 20 kV/m e 100 kV/m no centro da amostra



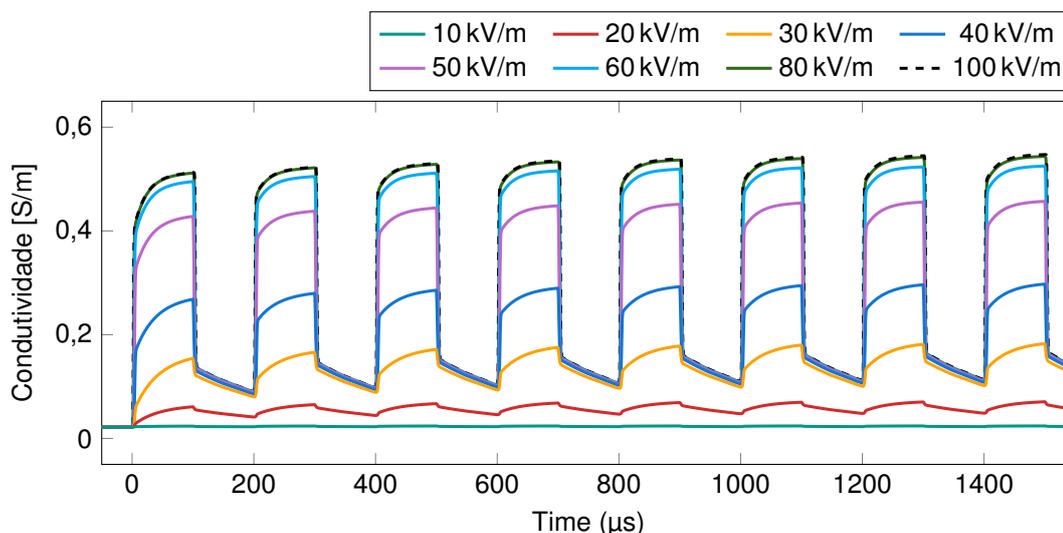
$[P_0]$, $[P_1]$ e $[P_2]$ são as concentrações de cada estado dinâmico da eletroporação.
Fonte: Produzido pelo autor.

Figura 25 – Aumento da temperatura por efeito Joule no centro da amostra



Fonte: Produzido pelo autor.

Figura 26 – Condutividade estática com influências da eletroporação e do aumento da temperatura no centro da amostra



Fonte: Produzido pelo autor.

($\Delta T = T - T_0$) após os oito pulsos foi de 0 K, 0,004 K, 0,025 K, 0,074 K, 0,1822 K, 0,3046 K, 0,5647 K e 0,8862 K para, respectivamente, 10 kV/m, 20 kV/m, 30 kV/m, 40 kV/m, 50 kV/m, 60 kV/m, 80 kV/m e 100 kV/m. A variação máxima de temperatura (0,8862 K) representa um acréscimo de condutividade na ordem de 1,5%.

A Figura 26 apresenta a evolução da condutividade estática para todos os campos elétricos no centro da amostra. A curva é calculada através da Equação 6.10, onde as contribuições de cada estado da eletroporação e aumento da temperatura são consideradas. Para estímulos até 30 kV/m o aumento da condutividade é causado principalmente pelo aumento da concentração do estado P_1 . Já para campos acima de 30 kV/m, P_0 é responsável pela maior parcela de acréscimo da condutividade.

A Tabela 11 mostra o erro percentual médio da corrente em cada pulso. O cálculo do erro percentual médio considera o desvio do sinal simulado em relação à média do sinal experimental. O cálculo foi realizado sob cada pulso, considerando 90% do tempo do pulso (descontamos os 5% iniciais e finais para evitar enviesamento devido as regiões de transição). Note que consideramos apenas o desvio em relação a média, não considerando o desvio padrão ou intervalo de confiança.

6.3 DISCUSSÃO

Modelar sistemas biológicos complexos é uma tarefa desafiadora devido a interações complexas, dinâmica não linear, demanda computacional e incertezas inerentes a esses sistemas. Uma das dificuldades está em abordar parâmetros que se correlacionam com os processos microfísicos. Estudos em células isoladas possibilitam o cálculo dos efeitos diretamente sobre a estrutura da membrana celular. Por outro lado,

Tabela 11 – Erro percentual médio da corrente elétrica simulada para cada pulso

E	Pulso 1	Pulso 2	Pulso 3	Pulso 4	Pulso 5	Pulso 6	Pulso 7	Pulso 8
10 kV/m	3,65%	2,92%	2,42%	1,87%	1,23%	0,83%	0,56%	0,34%
20 kV/m	14,60%	7,39%	2,45%	-0,58%	-2,36%	-3,71%	-4,91%	-5,79%
30 kV/m	3,21%	1,52%	-0,39%	-1,39%	-1,98%	-2,42%	-2,89%	-3,28%
40 kV/m	4,67%	4,22%	3,24%	2,75%	2,51%	2,26%	2,03%	1,89%
50 kV/m	13,25%	12,17%	11,60%	11,39%	11,25%	11,27%	11,28%	11,35%
60 kV/m	0,15%	-0,51%	-1,19%	-1,09%	-1,04%	-0,95%	-0,80%	-0,71%
80 kV/m	-0,72%	-0,62%	-0,80%	-0,71%	-0,57%	-0,36%	-0,18%	0,15%
100 kV/m	-0,64%	0,12%	0,26%	0,55%	0,85%	1,24%	1,57%	1,95%

E é o campo elétrico aplicado.

Fonte: Produzido pelo autor.

estudos em escala tecidual conseguem calcular apenas efeitos macroscópicos. Na eletroporação, o aumento na condutividade da membrana (e conseqüentemente na condutividade do tecido) é um dos principais efeitos observados. O modelo dinâmico proposto divide a complexa dinâmica da eletroporação em três estados principais: P_0 , P_1 e P_2 , que se correlacionam com hipóteses de criação e expansão de poros em nível celular. Evidências encontradas em estudos de células isoladas também sugerem a existência de três estados de eletroporação. Esses estados diferem entre o tempo característico e de relaxação, a contribuição no acréscimo da condutividade e a dependência com o campo elétrico aplicado (114, 115). Apesar do modelo ter sido construído com base no modelo de células de Leguèbe *et al.* (79), nossa proposta traz uma abordagem diferente. Conforme comentado, nosso modelo é dividido em três estados ao invés das duas originalmente propostas. Na nossa definição, P_0 considera o aumento instantâneo da condutividade associado à rápida abertura de poros hidrofóbicos (chamados de pré-poros), P_1 considera a formação inicial dos poros hidrofílicos (chamados de poros iniciais) e P_2 a formação final dos poros. Por esse motivo, a relação entre os estados também é diferente do proposto no modelo de células. P_0 e P_1 dependem da magnitude do campo elétrico e P_2 depende diretamente de P_1 .

É importante ressaltar que as dinâmicas da eletroporação não são completamente compreendidas (116), e existem diversas teorias de como o fenômeno de fato ocorre (110, 117, 118, 119, 120). Em escala tecidual, possuímos os resultados de efeitos médios, o que limita nossa capacidade de realizar conclusões sobre efeitos na membrana. Apesar de considerarmos que cada estado é explicado principalmente pelas razões acima, pode ocorrer uma sobreposição dos efeitos em cada um dos estados. Por exemplo, a formação de poros também pode ocorrer durante o estado P_2 , o mesmo vale para a expansão do poro durante o estado P_1 . Estudos futuros devem ser

realizados para validar as correlações entre efeitos de tecido e membrana para cada estado.

As diferenças entre as curvas na Figura 21 mostram que a saturação de β_1 ocorre em limiares de campos elétricos menores que os limiares de β_0 . Acreditamos que β_1 é saturado em limiares menores devido à distribuição espacial da formação dos poros iniciais e finais na membrana celular. Pré-poros são menos estáveis e necessitam menor energia para formar. Poros, por outro lado, demandam mais energia para serem formados. Dessa forma, poros possuem maior probabilidade de ocorrer nas regiões da célula onde o campo elétrico atinge perpendicularmente a estrutura (4, 110). Em estímulos elétricos de baixa intensidade, tanto pré-poros quanto poros possuem maior probabilidade de se formarem nessas regiões. Sob essas condições, a razão de formação de poros tende a ser maior, e uma pequena quantidade de pré-poros é suficiente para saturar o número de poros iniciais. Aumentar a intensidade do campo elétrico leva a um conseqüente aumento no número de pré-poros ao longo da célula. No entanto, a diferença de limiar energético necessário para o poro se formar dificulta sua concepção ao longo da estrutura celular. Isso poderia explicar por que aumentar a magnitude do campo elétrico após um determinado limiar continua aumentando a condutividade no início do pulso, mas não afeta o acréscimo ao decorrer do mesmo. Como mencionado anteriormente, as mecânicas da eletroporação celular ainda não são completamente compreendidas e as conclusões sobre sua causa são especulativas, especialmente analisando-as em escala tecidual.

Os poros finais causam individualmente falhas maiores na membrana do que os pré-poros ou poros iniciais. Como a membrana é um material pouco condutivo, é natural esperarmos que pré-poros sejam menos condutivos que poros iniciais e finais. De fato, estudos em suspensões celulares indicam um aumento temporal na condutividade elétrica da membrana durante o estímulo, o que é consistente com o aumento da condutividade relacionado aos poros finais (121). Existem poucas informações na literatura sobre a condutividade anterior à formação dos poros. Pré-poros acontecem espontaneamente, mesmo com a célula em repouso de potencial elétrico (114). No entanto, nosso modelo considera a concentração de cada estado ao invés de valores absolutos. Essa consideração explica o motivo do coeficiente de condutividade dos estados de pré-poros (σ_{P_0}) ser maior do que a condutividade dos estados de poros iniciais (σ_{P_1}) e sua formação final (σ_{P_2}). Em números absolutos, podemos esperar que a quantidade de pré-poros é muito superior a de poros ($P_0 \gg P_1 \gg P_2$), mas a análise por concentração normaliza essas quantidades. Dessa forma, o aumento médio na condutividade é refletido em um valor superior para o coeficiente de condutividade dos pré-poros (σ_{P_0}) em relação aos poros iniciais (σ_{P_1}) e finais (σ_{P_2}).

Um maior número de pré-poros formados nos instantes iniciais do pulso aceleram a formação dos poros iniciais. Esse efeito pode estar relacionado à teorias de que

poros podem ser formados a partir da convalescença de pré-poros (122, 123). Dessa forma, uma alta concentração de P_0 levaria a um acréscimo rápido de P_1 , conforme introduzido pela Equação 6.4. Também observamos uma dependência direta entre os estados P_1 e P_2 . Nesse caso, estamos considerando que a expansão dos poros está proporcionalmente relacionada à concentração de poros iniciais. A diferença é que os poros finais demoram mais para expandir e fechar. O tempo de abertura e fechamento dos poros também é um tema incorporado ao modelo. Existem diferenças nos mecanismos para abertura e fechamento (124). O mecanismo de fechamento dos poros é usualmente mais lento que o de abertura. As Equações 6.4 e 6.5 ajustam o tempo característico dos estados P_1 e P_2 dependendo se a função é crescente (formação) ou decrescente (fechamento).

As Figuras 22 e 23 mostram que o modelo proposto consegue descrever a dinâmica da corrente elétrica durante a eletroporação para todas as tensões aplicadas. A fundação sólida da dispersão biológica pode ser observada quando 10 kV/m (50 V) é aplicado (Figura 22A). Nesse nível de estímulo, as influências da eletroporação são pequenas, então a corrente elétrica é explicada principalmente pela dispersão (não há acréscimo de condutividade conforme mostrado na Figura 26). Essa qualidade da implementação da dispersão já havia sido verificada no decorrer do Capítulo 5. O fenômeno da eletroporação começa a ser observado em campos acima de 20 kV/m (Figura 22B), quando a corrente elétrica desvia da forma natural da dispersão. Esse limiar para ocorrência de eletroporação em *Solanum tuberosum* pode ser visualizado nos *plots* da Figura 21. A curva β_0 é similar ao modelo estático proposto por Ivorra *et al.* (82). Os autores desenvolveram o modelo aplicando um pulso de 400 μ s e avaliando a condutividade instantânea em 100 μ s. A similaridade observada entre β_0 e o modelo estático é consistente, uma vez que P_0 é o estado mais influente no acréscimo da condutividade do tecido.

Os resultados da simulação térmica mostrados na Figura 25 mostram que o protocolo ESOPE possui efeitos térmicos mínimos. Mesmo na maior intensidade de campo elétrico, o acréscimo de temperatura foi de apenas 0,88 °C, o que reflete uma mudança de aproximadamente 1,5% na condutividade do tecido. Apesar de não possuímos dados práticos do aumento da temperatura, os resultados vão ao encontro dos resultados de outros estudos para os primeiros oito pulsos (45, 125, 126).

A Figura 24 mostra a evolução da dinâmica da eletroporação para três níveis de estímulo. É possível observar que as concentrações dos estados P_1 e P_2 possuem crescimento significativo a partir de 20 kV/m. Como assumimos que P_1 e P_2 são estados de formação de poros hidrofílicos, é esperado que esses estados possuam uma maior influência da permeabilidade do tecido para grandes moléculas. Dessa forma, a permeabilidade da célula possui aumento significativo já para limiares iniciais, onde os efeitos da eletroporação não estão completamente saturados. Esse resultado vai ao

encontro às conclusões em estudos de pré-tratamento de eletroquimioterapia de que o aumento de citotoxicidade é alcançado com eficiência similar a partir de um certo limiar de campo elétrico (chamado de limiar de eletroporação reversível) (127, 128, 129, 130, 131). Em trabalhos futuros, pode-se avaliar a relação entre os estados dinâmicos e a permeabilidade dos tecidos à determinadas moléculas.

O aumento da condutividade estática do tecido causado pela dinâmica de abertura dos poros é mostrado na Figura 26. Através dos gráficos, é possível observar uma maior influência de P_1 e P_2 no aumento de condutividade para limiares até 30 kV/m, enquanto P_0 passa a influenciar no aumento de condutividade significativamente para limiares acima de 40 kV/m. Conforme discutido anteriormente, esse fenômeno pode estar relacionado à formação de pré-poros ao longo da estrutura celular que não possuem energia suficiente para formação de um poro final em estímulos de maior intensidade. Dessa forma, os estados P_1 e P_2 determinam o aumento da condutividade para limiares abaixo de 30 kV/m, enquanto P_0 possui maior influência para estímulos a partir de 40 kV/m.

Em nossa busca pelos melhores parâmetros, encontramos valores para os tempos característicos das duas primeiras dinâmicas similar ao encontrado por Voyer *et al.* (48). Conforme comentado no Capítulo 2, o modelo de Voyer *et al.* analisa a corrente elétrica apenas durante o primeiro pulso, utilizando um conjunto de equações similares para descrever as duas primeiras dinâmicas. Como apenas um pulso foi analisado, eles não implementaram o tempo de relaxação entre os pulsos ou a terceira dinâmica, limitando o modelo para análises de degrau unitário. Em termos de acréscimo de condutividade, nossos valores estão na mesma magnitude dos valores encontrados por Ivorra *et al.* (82) no modelo estático de *Solanum tuberosum* e por Weinert *et al.* (51) no modelo dinâmico em tecidos de coelho. Weinert *et al.* condensaram todas as dinâmicas da eletroporação em uma única equação diferencial. Suspeitamos que essa condensação resultou na necessidade de ajustes de parâmetros do modelo para variações de tensão de entrada. Aliás, conforme discutido no Capítulo 2, um fator comum entre os três modelos dinâmicos propostos até hoje é o ajuste de parâmetros dependendo de variações de entrada (47, 48, 49, 50, 51). Nesse sentido, nosso modelo consegue descrever de maneira fidedigna a corrente elétrica para uma gama de tensões de entrada com um mesmo conjunto de parâmetros.

As principais diferenças entre a média experimental e os resultados simulados ocorrem em 20 kV/m (Fig. 22B) e 50 kV/m (Fig. 23A). A diferença em 20 kV/m ocorre pois o acréscimo de condutividade simulado está mais rápido que o observado experimentalmente. É possível implementar uma nova função para o tempo característico de P_1 para ajustar essa dependência. No entanto, essa função iria introduzir novos parâmetros para ajustar a curva em apenas dois pulsos de uma tensão aplicada. Por simplicidade, decidimos não incluir essa consideração no modelo. A diferença em 50

kV/m ocorre por uma superestimação do valor de β_0 para esse campo elétrico. Em 50 kV/m, a curva de β_0 está numa região de transição, onde pequenas alterações nos parâmetros resultam em diferenças significativas. É possível melhorar o ajuste em 50 kV/m, o que desviaria o resultado em outros campos elétricos. Como o resultado em 50 kV/m está próximo do limiar superior do desvio padrão e a simulação para os outros campos elétricos está próxima da média experimental, consideramos que os parâmetros escolhidos fornecem o melhor resultado. Os erros percentuais apresentados na Tabela 11 demonstram a qualidade do modelo para previsão da corrente elétrica no tecido. Apesar dos erros mais expressivos para 20 e 50 kV/m, todos os demais campos elétricos possuem erros $\leq 5\%$. Vale ressaltar que o percentual de variação do intervalo de confiança (IC = 95%) está próximo de $\pm 10\%$. Dessa forma, o próprio desvio experimental é um fator importante a ser considerado. As curvas simuladas encontram-se, na maior parte dos pulsos, dentro dos intervalos de confiança experimentais.

É importante notar que nessa primeira avaliação do modelo dinâmico, avaliamos a corrente elétrica utilizando apenas a taxa de repetição de 5 kHz. Isso dificultou nossa definição para o tempo de relaxação de P_2 , uma vez que não conseguimos avaliar experimentalmente o decaimento do efeito. Assim, definimos o tempo de relaxação de P_2 de acordo com Leguèbe *et al.* (79). Análises futuras com frequências de repetição mais baixas podem auxiliar num ajuste ótimo para esse parâmetro.

7 CONCLUSÃO

No decorrer dessa tese, avaliamos, compreendemos e implementamos diversos aspectos da modelagem de tecidos biológicos e dinâmica da eletroporação com foco na utilização de elementos finitos no domínio do tempo.

O primeiro estudo permitiu observar que os modelos estáticos de eletroporação são limitados aos protocolos em que eles foram desenvolvidos. Utilizar aspectos temporais diferentes daqueles utilizados no desenvolvimento do modelo introduz erros, podendo inviabilizar o modelo e, assim, a simulação como um todo. Essa limitação motivou o desenvolvimento de um modelo dinâmico da eletroporação, iniciando através da inclusão dos efeitos dispersivos dos tecidos no domínio do tempo.

A inclusão dos efeitos da dispersão biológica no domínio do tempo foi realizada através do método de equações diferenciais auxiliares, que transforma dispersões de primeira ordem do domínio da frequência para o tempo. A necessidade de parametrizar os dados de espectroscopia do tecido em modelos de primeira ordem foi superada ao utilizar um algoritmo genético, sendo possível representar com fidelidade a dispersão de *Solanum tuberosum* de 40 Hz à 10 MHz com quatro polos de Debye. A implementação da polarização no domínio do tempo foi validada através de comparações com simulações no domínio da frequência.

O modelo de eletroporação proposto foi desenvolvido utilizando a base do modelo de dispersão dielétrica do tecido. Um modelo cinético para células foi utilizado para explicar as três principais dinâmicas da eletroporação: a abertura de pré-poros, a formação inicial dos poros e a sua formação final, refletidas no aumento de condutividade da membrana celular e, conseqüentemente, do tecido. A inserção do aumento da condutividade foi realizada na dispersão do tecido, alterando a condutividade em todo o espectro.

Os resultados práticos exemplificam a qualidade do modelo, sendo possível prever com fidelidade diversas tensões de entrada para o mesmo conjunto de parâmetros. A análise térmica permitiu avaliar e comprovar que os protocolos de eletroquimioterapia possuem efeitos térmicos mínimos. Consideramos que o modelo apresenta um avanço importante em relação aos modelos já publicados na literatura. O modelo proposto ainda não está completamente finalizado, e deve continuar sendo aprimorado em trabalhos futuros.

7.1 TRABALHOS FUTUROS

A primeira abordagem com o modelo dinâmico proposto demonstra que as três dinâmicas conseguem explicar a evolução da corrente elétrica em um tecido vegetal submetido à eletroporação. O modelo utiliza apenas um grupo de parâmetros, sem necessidade de ajustes para corrigir variações da tensão de entrada. Entretanto, outros

pontos podem ser aprimorados no futuro, visto que o modelo permite que avanços continuem sendo incorporados. Entre as possibilidades de estudos futuros, sugere-se:

- Validação do modelo para outros tipos de eletrodos (especialmente eletrodos de agulha).
- Desenvolvimento de análises para relacionar os estados P_1 e P_2 com a ocorrência de eletroporação irreversível.
- Desenvolvimento de análises para relacionar os estados P_1 e P_2 com o aumento de permeabilidade do tecido.
- Estudar a relação da dispersão biológica com a ocorrência da eletroporação.
- Definição dos parâmetros de eletroporação para tecidos de origem animal.
- Avaliação do modelo para diferentes protocolos de PEF (bipolares, alternados, e diferentes taxas de repetição).
- Avaliação do modelo para outras técnicas de eletroporação, como eletroporação irreversível e transferência genética.

REFERÊNCIAS

- 1 IVORRA, Antoni. Tissue Electroporation as a Bioelectric Phenomenon: Basic Concepts. *In: IRREVERSIBLE Electroporation*. [S.l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2010. P. 23–61.
- 2 PAKHOMOV, Andrei G.; MIKLAVČIČ, Damijan; MARKOV, Marko S. **Advanced Electroporation Techniques in Biology and Medicine**. [S.l.]: CRC Press, jun. 2010.
- 3 KOTNIK, Tadej; REMS, Lea; TAREK, Mounir; MIKLAVČIČ, Damijan. Membrane Electroporation and Electropermeabilization: Mechanisms and Models. **Annual Review of Biophysics**, Annual Reviews, v. 48, n. 1, p. 63–91, mai. 2019.
- 4 SUZUKI, Daniela Ota Hisayasu. **Estudo da condutividade elétrica de suspensões de eritrócitos de ratos durante aplicação de campos elétricos intensos: teoria, modelagem e experimentação**. 2009. F. 103. Doutorado em Engenharia Elétrica – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- 5 ANDRADE, Daniella L. L. S. de. **Avaliação da eletroquimioterapia pela deflexão das agulhas do eletrodo de matriz linear: Estudo in silico e in vitro e avaliação do modelo de condutividade elétrica para eletroporação**. 2020. F. 87. Mestrado em Engenharia Elétrica – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- 6 ALBERTS, Bruce; HOPKIN, Karen; JOHNSON, Alexander; MORGAN, David; RAFF, Martin; ROBERTS, Keith; WALTER, Peter. **Essential Cell Biology**. [S.l.: s.n.], ago. 2022. ISBN 9780393680362.
- 7 KRANJC, Matej; MIKLAVČIČ, Damijan. Electric Field Distribution and Electroporation Threshold. *In: HANDBOOK of Electroporation*. [S.l.]: Springer International Publishing, 2017. P. 1043–1058.
- 8 BLOQUEL, Carole; FABRE, Emmanuelle; BUREAU, Michel Francis; SCHERMAN, Daniel. Plasmid DNA electrotransfer for intracellular and secreted proteins expression: new methodological developments and applications. **The Journal of Gene Medicine**, Wiley, v. 6, S1, s11–s23, fev. 2004.

- 9 RANGEL, Marcelo M.M.; LUZ, Jean C.S.; OLIVEIRA, Krishna D.; OJEDA, Javier; FREYTAG, Jennifer O.; SUZUKI, Daniela O. Electrochemotherapy in the treatment of neoplasms in dogs and cats. **Austral journal of veterinary sciences**, SciELO Agencia Nacional de Investigacion y Desarrollo (ANID), v. 51, n. 2, p. 45–51, mai. 2019.
- 10 RUBINSKY, Boris; ONIK, Gary; MIKUS, Paul. Irreversible Electroporation: A New Ablation Modality – Clinical Implications. **Technology in Cancer Research & Treatment**, SAGE Publications, v. 6, n. 1, p. 37–48, fev. 2007.
- 11 JIANG, Chunlan; DAVALOS, Rafael V.; BISCHOF, John C. A Review of Basic to Clinical Studies of Irreversible Electroporation Therapy. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, Institute of Electrical e Electronics Engineers (IEEE), v. 62, n. 1, p. 4–20, jan. 2015.
- 12 GOLBERG, Alex; FISCHER, Judith; RUBINSKY, Boris. The Use of Irreversible Electroporation in Food Preservation. *In: IRREVERSIBLE Electroporation*. [S.l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2010. P. 273–312.
- 13 PINTARELLI, Guilherme B.; RAMOS, C. T. S.; SILVA, J. R. da; ROSSI, M. J.; SUZUKI, D. O. H. Sensing of Yeast Inactivation by Electroporation. **IEEE Sensors Journal**, Institute of Electrical e Electronics Engineers (IEEE), v. 21, n. 10, p. 12027–12035, mai. 2021.
- 14 PINTARELLI, Guilherme B.; SILVA, Jessica R. da; YANG, Wuqiang; SUZUKI, Daniela O. H. Dielectric Dispersion Modulated Sensing of Yeast Suspension Electroporation. **Sensors**, MDPI AG, v. 22, n. 5, p. 1811, fev. 2022.
- 15 MIR, Lluís M.; ORLOWSKI, Stéphane; BELEHRADEK, Jean; PAOLETTI, Claude. Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses. **European Journal of Cancer and Clinical Oncology**, Elsevier BV, v. 27, n. 1, p. 68–72, jan. 1991.
- 16 MICHEL, Olga; KULBACKA, Julita; SACZKO, Jolanta; MACZYNSKA, Justyna; BLASIAK, Piotr; ROSSOWSKA, Joanna; RZETCHONEK, Adam. Electroporation with Cisplatin against Metastatic Pancreatic Cancer: In Vitro Study on Human Primary Cell Culture. **BioMed Research International**, Hindawi Limited, v. 2018, p. 1–12, 2018.

- 17 SIKIC, Branimir Ivan; ROZENCWEIG, Marcel; CARTER, Stephen K. **Bleomycin Chemotherapy**. [S.l.: s.n.], ago. 1985. ISBN 9780126431605.
- 18 KOS, Bor; ZUPANIC, Anze; KOTNIK, Tadej; SNOJ, Marko; SERSA, Gregor; MIKLAVCIC, Damijan. Robustness of Treatment Planning for Electrochemotherapy of Deep-Seated Tumors. **The Journal of Membrane Biology**, Springer Science e Business Media LLC, v. 236, n. 1, p. 147–153, jul. 2010.
- 19 MIKLAVCIC, Damijan; MALI, Barbara; KOS, Bor; HELLER, Richard; SERSA, Gregor. Electrochemotherapy: from the drawing board into medical practice. **BioMedical Engineering OnLine**, Springer Science e Business Media LLC, v. 13, n. 1, p. 29, 2014.
- 20 SUZUKI, Daniela O.H.; ANSELMO, Jânio; OLIVEIRA, Krishna D. de; FREYTAG, Jennifer O.; RANGEL, Marcelo M.M.; MARQUES, Jefferson L.B.; RAMOS, Airton. Numerical Model of Dog Mast Cell Tumor Treated by Electrochemotherapy. **Artificial Organs**, Wiley, v. 39, n. 2, p. 192–197, jul. 2014.
- 21 MIR, Lluís 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 Supplements**, Elsevier BV, v. 4, n. 11, p. 14–25, nov. 2006.
- 22 GEHL, Julie *et al.* Updated standard operating procedures for electrochemotherapy of cutaneous tumours and skin metastases. **Acta Oncologica**, Informa UK Limited, v. 57, n. 7, p. 874–882, mar. 2018.
- 23 BERTACCHINI, Claudio. Cliniporator: Medical Electroporation of Tumors. *In*: HANDBOOK of Electroporation. [S.l.]: Springer International Publishing, 2017. P. 1–36. ISBN 9783319267791.
- 24 TAQUES, Maurício Martins; GUEDERT, Raul; MORENO, Kleber; RANGEL, Marcelo Monte Mor; SUZUKI, Daniela Ota Hisayasu. Adjuvant electrochemotherapy after debulking in canine bone osteosarcoma infiltration. **Artificial Organs**, Wiley, v. 45, n. 3, p. 309–315, out. 2020.

- 25 ANDRADE, Daniella L. L. S.; GUEDERT, Raul; PINTARELLI, Guilherme B.; RANGEL, Marcelo M. M.; OLIVEIRA, Krishna D.; QUADROS, Priscila G.; SUZUKI, Daniela O. H. Electrochemotherapy treatment safety under parallel needle deflection. **Scientific Reports**, Springer Science e Business Media LLC, v. 12, n. 1, fev. 2022.
- 26 LOPES, Lucas Bertinetti; PINTARELLI, Guilherme Brasil; SANTOS, Carla Sales Ferreira dos; SUZUKI, Daniela Ota Hisayasu. Computer optimization of conductive gels for electrochemotherapy. **Medical Engineering & Physics**, Elsevier BV, v. 98, p. 133–139, dez. 2021.
- 27 NEAL, Robert E.; GARCIA, P. A.; ROBERTSON, J. L.; DAVALOS, R. V. Experimental Characterization and Numerical Modeling of Tissue Electrical Conductivity during Pulsed Electric Fields for Irreversible Electroporation Treatment Planning. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, Institute of Electrical e Electronics Engineers (IEEE), v. 59, n. 4, p. 1076–1085, abr. 2012.
- 28 MARQUET-RIVERA, Rodrigo Arturo; URRIOLAGOITIA-SOSA, Guillermo; HERNÁNDEZ-VÁZQUEZ, Rosa Alicia; ROMERO-ÁNGELES, Beatriz; MASTACHE-MIRANDA, Octavio Alejandro; URRIOLAGOITIA-CALDERÓN, Guillermo. High Biofidelity 3D Biomodel Reconstruction from Soft and Hard Tissues (Knee), FEM, and 3D Printing: A Three-Dimensional Methodological Proposal. Edição: Lei Zhang. **BioMed Research International**, Hindawi Limited, v. 2021, p. 1–10, abr. 2021.
- 29 AKBARI, Amir; GIANNACOPOULOS, Dennis D. Efficient Solver for a Simplified Model of the Multi-Physics Heat Transfer Problem in Radio Frequency Ablation of Hepatic Tumors. **IEEE Transactions on Magnetics**, Institute of Electrical e Electronics Engineers (IEEE), v. 57, n. 6, p. 1–4, jun. 2021.
- 30 COMSOL Documentation. [S./], 2021. Disponível em: <https://doc.comsol.com/6.0/docserver/>.
- 31 SILVA, Jéssica R. da; GUEDERT, Raul; PINTARELLI, Guilherme B.; SUZUKI, Daniela O. H. A Short Review of Membrane Models for Cells Electroporation. *In: IFMBE Proceedings*. [S./]: Springer Singapore, 2020. P. 67–74.

- 32 RAMOS, A.; SUZUKI, D.O.H.; MARQUES, J.L.B. Numerical study of the electrical conductivity and polarization in a suspension of spherical cells. **Bioelectrochemistry**, Elsevier BV, v. 68, n. 2, p. 213–217, mai. 2006.
- 33 SUZUKI, D. O. H.; RAMOS, A.; RIBEIRO, M. C. M.; CAZAROLLI, L. H.; SILVA, F. R. M. B.; LEITE, L. D.; MARQUES, J. L. B. Theoretical and Experimental Analysis of Electroporated Membrane Conductance in Cell Suspension. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, Institute of Electrical e Electronics Engineers (IEEE), v. 58, n. 12, p. 3310–3318, dez. 2011.
- 34 SUZUKI, D. O. H.; RAMOS, A.; CAZAROLLI, L. H.; SILVA, F. R. M. B.; MARQUES, J. L. B. The Dynamic of Electroporation in Dilute Cell Suspension: A Numerical and Experimental Study. *In: V Latin American Congress on Biomedical Engineering CLAIB 2011 May 16-21, 2011, Habana, Cuba. [S.l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2013. P. 25–28.*
- 35 SUZUKI, Daniela O.H.; BERKENBROCK, José A.; OLIVEIRA, Krishna D. de; FREYTAG, Jennifer O.; RANGEL, Marcelo M.M. Novel application for electrochemotherapy: Immersion of nasal cavity in dog. **Artificial Organs**, Wiley, v. 41, n. 8, p. 767–773, dez. 2016.
- 36 BERKENBROCK, J. A.; RANGEL, M. M. M.; SUZUKI, D. O. H. Numerical Study for Needle Electrode in Treatment of Cutaneous Tumor Model. *In: IFMBE Proceedings. [S.l.]: Springer Singapore, 2016. P. 433–436.*
- 37 SEL, D.; CUKJATI, D.; BATIUSKAITE, D.; SLIVNIK, T.; MIR, L.M.; MIKLAVCIC, D. Sequential Finite Element Model of Tissue Electropermeabilization. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 52, p. 816–827, 5 mai. 2005. ISSN 0018-9294.
- 38 SUZUKI, Daniela O. H.; BERKENBROCK, José A.; FREDERICO, Marisa J. S.; SILVA, Fátima R. M. B.; RANGEL, Marcelo M. M. Oral Mucosa Model for Electrochemotherapy Treatment of Dog Mouth Cancer: Ex Vivo, In Silico, and In Vivo Experiments. **Artificial Organs**, v. 42, p. 297–304, 3 mar. 2018. ISSN 0160564X.
- 39 COROVIC, Selma; LACKOVIC, Igor; SUSTARIC, Primož; SUSTAR, Tomaz; RODIC, Tomaz; MIKLAVCIC, Damijan. Modeling of electric field distribution in

- tissues during electroporation. **BioMedical Engineering OnLine**, Springer Science e Business Media LLC, v. 12, n. 1, fev. 2013.
- 40 ZUPANIC, Anze; RIBARIC, S; MIKLAVCIC, Damijan. Increasing the repetition frequency of electric pulse delivery reduces unpleasant sensations that occur in electrochemotherapy. **Neoplasma**, v. 54, p. 246–50, fev. 2007.
- 41 LOWE, R.; GAVAZZA, A.; IMPELLIZERI, J. A.; SODEN, D. M.; LUBAS, G. The treatment of canine mast cell tumours with electrochemotherapy with or without surgical excision. **Veterinary and Comparative Oncology**, Wiley, v. 15, n. 3, p. 775–784, mar. 2016.
- 42 MATTHIESSEN, Louise Wichmann *et al.* Electrochemotherapy for Breast Cancer—Results From the INSPECT Database. **Clinical Breast Cancer**, Elsevier BV, v. 18, n. 5, e909–e917, out. 2018.
- 43 CVETKOSKA, Aleksandra; MAČEK-LEBAR, Alenka; TRDINA, Peter; MIKLAVČIČ, Damijan; REBERŠEK, Matej. Muscle contractions and pain sensation accompanying high-frequency electroporation pulses. **Scientific Reports**, Springer Science e Business Media LLC, v. 12, n. 1, mai. 2022.
- 44 SERSA, G.; KRANJC, S.; SCANCAR, J.; KRZAN, M.; CEMAZAR, M. Electrochemotherapy of Mouse Sarcoma Tumors Using Electric Pulse Trains with Repetition Frequencies of 1 Hz and 5 kHz. **The Journal of Membrane Biology**, Springer Science e Business Media LLC, v. 236, n. 1, p. 155–162, jul. 2010.
- 45 LACKOVIĆ, Igor; MAGJAREVIĆ, R.; MIKLAVČIČ, D. A Multiphysics Model for Studying the Influence of Pulse Repetition Frequency on Tissue Heating During Electrochemotherapy. *In*: IFMBE Proceedings. [S.l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2009. P. 2609–2613.
- 46 GARCÍA-SÁNCHEZ, Tomás; AZAN, Antoine; LERAY, Isabelle; ROSELL-FERRER, Javier; BRAGÓS, Ramon; MIR, LLuis M. Interpulse multifrequency electrical impedance measurements during electroporation of adherent differentiated myotubes. **Bioelectrochemistry**, Elsevier BV, v. 105, p. 123–135, ago. 2015. ISSN 1567-5394.
- 47 LANGUS, J.; KRANJC, M.; KOS, B.; ŠUŠTAR, T.; MIKLAVČIČ, D. Dynamic finite-element model for efficient modelling of electric currents in electroporated

- tissue. **Scientific Reports**, Nature Publishing Group, v. 6, mai. 2016. ISSN 20452322.
- 48 VOYER, Damien; SILVE, Aude; MIR, Lluís M.; SCORRETTI, Riccardo; POIGNARD, Clair. Dynamical modeling of tissue electroporation. **Bioelectrochemistry**, Elsevier B.V., v. 119, p. 98–110, fev. 2018. ISSN 1878562X.
- 49 RAMOS, Airton; WEINERT, Rodolfo Lauro. Mathematical and computational method for electrical analysis of biological tissues. **Journal of Computational Electronics**, v. 17, p. 382–391, 1 mar. 2018. ISSN 1569-8025.
- 50 WEINERT, Rodolfo; PEREIRA, Eduardo; RAMOS, Airton. Inclusion of memory effects in a dynamic model of electroporation in biological tissues. **Artificial Organs**, v. 43, p. 688–693, 7 jul. 2019. ISSN 0160-564X.
- 51 WEINERT, Rodolfo Lauro; KNABBEN, Marcel Augusto; PEREIRA, Eduardo Manoel; GARCIA, Christian Evangelista; RAMOS, Airton. Dynamic Electroporation Model Evaluation on Rabbit Tissues. **Annals of Biomedical Engineering**, Springer, v. 49, p. 2503–2512, 9 set. 2021. ISSN 15739686.
- 52 WEINERT, Rodolfo Lauro; RAMOS, Airton. Electroporation threshold, conductivity and memory effect in rat liver. **Biomedical Signal Processing and Control**, Elsevier BV, v. 64, p. 102275, fev. 2021.
- 53 GABRIEL, S; LAU, R W; GABRIEL, C. The dielectric properties of biological tissues: II. Measurements in the frequency range 10 Hz to 20 GHz. **Physics in Medicine and Biology**, IOP Publishing, v. 41, n. 11, p. 2251–2269, nov. 1996.
- 54 GABRIEL, S; LAU, R W; GABRIEL, C. The dielectric properties of biological tissues: III. Parametric models for the dielectric spectrum of tissues. **Physics in Medicine and Biology**, IOP Publishing, v. 41, n. 11, p. 2271–2293, nov. 1996.
- 55 GRIMNES, Sverre; MARTINSEN, Ørjan G. **Bioimpedance and Bioelectricity Basics**. [S.l.]: Elsevier, 2015.
- 56 SCHWAN, Herman P. Electrical Properties of Tissue and Cell Suspensions. *In*: **ADVANCES in Biological and Medical Physics**. [S.l.]: Elsevier, 1957. P. 147–209.

- 57 SCHWAN, H.P. Electrical properties of tissues and cell suspensions: mechanisms and models. *In: PROCEEDINGS of 16th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. [S.l.]: IEEE, 1994.
- 58 HEILEMAN, Khalil; DAOUD, Jamal; TABRIZIAN, Maryam. Dielectric spectroscopy as a viable biosensing tool for cell and tissue characterization and analysis. **Biosensors and Bioelectronics**, Elsevier BV, v. 49, p. 348–359, nov. 2013.
- 59 KONTOGEORGIS, Georgios M.; MARIBO-MOGENSEN, Bjørn; THOMSEN, Kaj. The Debye-Hückel theory and its importance in modeling electrolyte solutions. **Fluid Phase Equilibria**, Elsevier BV, v. 462, p. 130–152, abr. 2018. ISSN 0378-3812.
- 60 JONSCHER, Andrew K. Dielectric relaxation in solids. **Journal of Physics D: Applied Physics**, IOP Publishing, v. 32, n. 14, r57–r70, jan. 1999.
- 61 ZHOU, Tianbo; BIDAN, Pierre; LAUDEBAT, Lionel; LOCATELLI, Marie-Laure. Time domain simulation of insulating dielectric materials with non-instantaneous polarization. *In: COMSOL CONFERENCE 2020 EUROPE*. Grenoble (virtual), France: [s.n.], out. 2020.
- 62 ROBERT, René. Teoria fenomenológica do processo de relaxação dielétrica. **Revista Brasileira de Ensino de Física**, FapUNIFESP (SciELO), v. 26, n. 3, p. 237–240, 2004.
- 63 DEBYE, Peter Josef William. **Polar molecules**. [S.l.]: [New York] Dover Publications [c1929], 1929.
- 64 COLE, Kenneth S.; COLE, Robert H. Dispersion and Absorption in Dielectrics I. Alternating Current Characteristics. **The Journal of Chemical Physics**, AIP Publishing, v. 9, n. 4, p. 341–351, abr. 1941.
- 65 COLE, Kenneth S.; COLE, Robert H. Dispersion and Absorption in Dielectrics II. Direct Current Characteristics. **The Journal of Chemical Physics**, AIP Publishing, v. 10, n. 2, p. 98–105, fev. 1942.

- 66 FREY, W.; WHITE, J.A.; PRICE, R.O.; BLACKMORE, P.F.; JOSHI, R.P.; NUCCITELLI, R.; BEEBE, S.J.; SCHOENBACH, K.H.; KOLB, J.F. Plasma Membrane Voltage Changes during Nanosecond Pulsed Electric Field Exposure. **Biophysical Journal**, Elsevier BV, v. 90, n. 10, p. 3608–3615, mai. 2006.
- 67 HIBINO, M.; ITOH, H.; KINOSITA, K. Time courses of cell electroporation as revealed by submicrosecond imaging of transmembrane potential. **Biophysical Journal**, Elsevier BV, v. 64, n. 6, p. 1789–1800, jun. 1993.
- 68 HIBINO, M.; SHIGEMORI, M.; ITOH, H.; NAGAYAMA, K.; KINOSITA, K. Membrane conductance of an electroporated cell analyzed by submicrosecond imaging of transmembrane potential. **Biophysical Journal**, Elsevier BV, v. 59, n. 1, p. 209–220, jan. 1991.
- 69 PUCIHAR, Gorazd; KOTNIK, Tadej; MIKLAVCIC, Damijan; TEISSIÉ, Justin. Kinetics of Transmembrane Transport of Small Molecules into Electroporated Cells. **Biophysical Journal**, Elsevier BV, v. 95, n. 6, p. 2837–2848, set. 2008.
- 70 PAVLIN, Mojca; LEBEN, Vilko; MIKLAVCIC, Damijan. Electroporation in dense cell suspension – Theoretical and experimental analysis of ion diffusion and cell permeabilization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, Elsevier BV, v. 1770, n. 1, p. 12–23, jan. 2007.
- 71 PRAUSNITZ, M.R.; CORBETT, J.D.; GIMM, J.A.; GOLAN, D.E.; LANGER, R.; WEAVER, J.C. Millisecond measurement of transport during and after an electroporation pulse. **Biophysical Journal**, Elsevier BV, v. 68, n. 5, p. 1864–1870, mai. 1995.
- 72 LOPEZ, A.; ROLS, M. P.; TEISSIE, J. Phosphorus-31 NMR analysis of membrane phospholipid organization in viable, reversibly electroporated Chinese hamster ovary cells. **Biochemistry**, American Chemical Society (ACS), v. 27, n. 4, p. 1222–1228, fev. 1988.
- 73 NEUMANN, E.; TOENSING, K.; KAKORIN, S.; BUDDE, P.; FREY, J. Mechanism of Electroporative Dye Uptake by Mouse B Cells. **Biophysical Journal**, Elsevier BV, v. 74, n. 1, p. 98–108, jan. 1998.

- 74 ROLS, Marie-Pierre; TEISSIE, Justin. Electroporabilization of Mammalian Cells to Macromolecules: Control by Pulse Duration. **Biophysical Journal**, Elsevier BV, v. 75, n. 3, p. 1415–1423, set. 1998.
- 75 SHIRAKASHI, Ryo; SUKHORUKOV, Vladimir L.; TANASAWA, Ichiro; ZIMMERMANN, Ulrich. Measurement of the permeability and resealing time constant of the electroporated mammalian cell membranes. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, Elsevier BV, v. 47, n. 21, p. 4517–4524, out. 2004.
- 76 GABRIEL, Bruno; TEISSIE, Justin. Control by electrical parameters of short- and long-term cell death resulting from electroporabilization of Chinese hamster ovary cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, Elsevier BV, v. 1266, n. 2, p. 171–178, abr. 1995.
- 77 ROLS, Marie-Pierre; TEISSIE, Justin. Experimental evidence for the involvement of the cytoskeleton in mammalian cell electroporabilization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, Elsevier BV, v. 1111, n. 1, p. 45–50, out. 1992.
- 78 MIKLAVCIC, Damijan; TOWHIDI, Leila. Model of Cell Membrane Electroporation and Transmembrane Molecular Transport. *In*: PAKHOMOV, Andrei G.; MIKLAVCIC, Damijan; MARKOV, Marko S. (Ed.). **Advanced Electroporation Techniques in Biology and Medicine**. Boca Raton, USA: CRC Press, 2010. P. 540.
- 79 LEGUÈBE, M.; SILVE, A.; MIR, L.M.; POIGNARD, C. Conducting and permeable states of cell membrane submitted to high voltage pulses: Mathematical and numerical studies validated by the experiments. **Journal of Theoretical Biology**, Elsevier BV, v. 360, p. 83–94, nov. 2014.
- 80 YAO, Chenguo; ZHAO, Yajun; LIU, Hongmei; DONG, Shoulong; LV, Yanpeng; MA, Jianhao. Dielectric variations of potato induced by irreversible electroporation under different pulses based on the cole-cole model. **IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation**, Institute of Electrical and Electronics Engineers (IEEE), v. 24, n. 4, p. 2225–2233, 2017.
- 81 GARCÍA-SÁNCHEZ, Tomás; LERAY, Isabelle; RONCHETTI, Mattia; CADOSSO, Ruggero; MIR, Lluís M. Impact of the number of electric pulses on

- cell electrochemotherapy in vitro: Limits of linearity and saturation. **Bioelectrochemistry**, Elsevier BV, v. 129, p. 218–227, ago. 2019. ISSN 1567-5394.
- 82 IVORRA, A.; MIR, L. M.; RUBINSKY, B. Electric Field Redistribution due to Conductivity Changes during Tissue Electroporation: Experiments with a Simple Vegetal Model. *In*: DÖSSEL, Olaf; SCHLEGEL, Wolfgang C. (Ed.). **World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, September 7 - 12, 2009, Munich, Germany**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010. P. 59–62.
- 83 GARCIA, Paulo A.; ROSSMEISL, John H.; NEAL, Robert E.; ELLIS, Thomas L.; OLSON, John D.; HENAO-GUERRERO, Natalia; ROBERTSON, John; DAVALOS, Rafael V. Intracranial Nonthermal Irreversible Electroporation: In Vivo Analysis. **The Journal of Membrane Biology**, v. 236, p. 127–136, 1 jul. 2010. ISSN 0022-2631.
- 84 GUEDERT, Raul; BRASIL PINTARELLI, Guilherme; MENA BARRETO SILVA, Fátima Regina; OTA HISAYASU SUZUKI, Daniela. Effects of pulse repetition rate in static electrochemotherapy models. **Bioelectrochemistry**, Elsevier BV, v. 153, p. 108499, ago. 2023. ISSN 1567-5394.
- 85 ESSER, Axel T.; SMITH, Kyle C.; GOWRISHANKAR, Thiruvallur R.; WEAVER, James C. Towards Solid Tumor Treatment by Irreversible Electroporation: Intrinsic Redistribution of Fields and Currents in Tissue. **Technology in Cancer Research & Treatment**, SAGE Publications, v. 6, n. 4, p. 261–273, ago. 2007.
- 86 RAMOS, Airton. Improved numerical approach for electrical modeling of biological cell clusters. **Medical & Biological Engineering & Computing**, Springer Science e Business Media LLC, v. 48, n. 4, p. 311–319, mar. 2010.
- 87 NEU, John C.; KRASSOWSKA, Wanda. Asymptotic model of electroporation. **Phys. Rev. E**, American Physical Society, v. 59, p. 3471–3482, 3 mar. 1999.
- 88 NEAL II, Robert E.; GARCIA, Paulo A.; ROBERTSON, John L.; DAVALOS, Rafael V. Experimental Characterization and Numerical Modeling of Tissue Electrical Conductivity during Pulsed Electric Fields for Irreversible

- Electroporation Treatment Planning. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 59, n. 4, p. 1076–1085, abr. 2012. ISSN 1558-2531.
- 89 PINTARELLI, Guilherme Brasil. **Técnicas de eletroporação: dispositivo eletrônico e ensaios em leveduras**. 2018. F. 169. Mestrado em Engenharia Elétrica – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.
- 90 SUROWIEC, A; STUCHLY, S S; SWARUP, A. Radiofrequency dielectric properties of animal tissues as a function of time following death. **Physics in Medicine and Biology**, IOP Publishing, v. 30, n. 10, p. 1131–1141, out. 1985.
- 91 BRACE, Christopher L. Temperature-dependent dielectric properties of liver tissue measured during thermal ablation: Toward an improved numerical model. *In: 2008 30th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*. [S.l.]: IEEE, ago. 2008.
- 92 GUO, Fei; DENG, Hao; QIAN, Kun; LI, Xin. Characterization of dispersion and anisotropic-conductivity in tissue model during electroporation pulses. **Bioelectrochemistry**, Elsevier BV, v. 144, p. 108029, abr. 2022.
- 93 LAUDEBAT, L.; BIDAN, P.; MONTSENY, G. Modeling and Optimal Identification of Pseudodifferential Electrical Dynamics by Means of Diffusive Representation—Part I: Modeling. **IEEE Transactions on Circuits and Systems I: Regular Papers**, Institute of Electrical e Electronics Engineers (IEEE), v. 51, n. 9, p. 1801–1813, set. 2004.
- 94 KELLEY, David F.; DESTAN, Timothy J.; LUEBBERS, Raymond J. Debye Function Expansions of Complex Permittivity Using a Hybrid Particle Swarm-Least Squares Optimization Approach. **IEEE Transactions on Antennas and Propagation**, Institute of Electrical e Electronics Engineers (IEEE), v. 55, n. 7, p. 1999–2005, jul. 2007.
- 95 DIMA, Roberto; BUONANNO, Giovanni; COSTANZO, Sandra; SOLIMENE, Raffaele. Robustness for the Starting Point of Two Iterative Methods for Fitting Debye or Cole-Cole Models to a Dielectric Permittivity Spectrum. **Applied Sciences**, MDPI AG, v. 12, n. 11, p. 5698, jun. 2022.

- 96 BÖTTCHER, C. J. F.; BELLE, O. C. van; BORDEWIJK, P.; RIP, A.; YUE, David D. Theory of Electric Polarization. **Journal of The Electrochemical Society**, The Electrochemical Society, v. 121, n. 6, p. 211c, 1974.
- 97 HURT, William D. Multiterm Debye Dispersion Relations for Permittivity of Muscle. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, Institute of Electrical e Electronics Engineers (IEEE), BME-32, n. 1, p. 60–64, jan. 1985.
- 98 LEPELAARS, E. S. A. M. Electromagnetic pulse distortion in living tissue. **Medical & Biological Engineering & Computing**, Springer Science e Business Media LLC, v. 34, n. 3, p. 213–220, mai. 1996.
- 99 STOYKOV, N.S.; KUIKEN, T.A.; LOWERY, M.M.; TAFLOVE, A. Finite-element time-domain algorithms for modeling linear debye and lorentz dielectric dispersions at low frequencies. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, Institute of Electrical e Electronics Engineers (IEEE), v. 50, n. 9, p. 1100–1107, set. 2003.
- 100 AKBARZADEH-SHARBAF, Ali; GIANNACOPOULOS, Dennis D. Finite-Element Time-Domain Solution of the Vector Wave Equation in Doubly Dispersive Media Using Möbius Transformation Technique. **IEEE Transactions on Antennas and Propagation**, Institute of Electrical e Electronics Engineers (IEEE), v. 61, n. 8, p. 4158–4166, ago. 2013.
- 101 ABRAHAM, David S.; GIANNACOPOULOS, Dennis D. A Convolution-Free Mixed Finite-Element Time-Domain Method for General Nonlinear Dispersive Media. **IEEE Transactions on Antennas and Propagation**, Institute of Electrical e Electronics Engineers (IEEE), v. 67, n. 1, p. 324–334, jan. 2019.
- 102 LI, Linqian; WEI, Bing; YANG, Qian; GE, Debiao. Piecewise linear recursive convolution finite element time domain method for electromagnetic analysis of dispersive media. **Optik**, Elsevier BV, v. 198, p. 163196, dez. 2019.
- 103 LI, Linqian; WEI, Bing; YANG, Qian; GE, Debiao. Auxiliary differential equation finite-element time-domain method for electromagnetic analysis of dispersive media. **Optik**, Elsevier BV, v. 184, p. 189–196, mai. 2019.
- 104 FUJII, Masafumi. Maximum Frequency Range Limit of Multi-Pole Debye Models of Human Body Tissues. **IEEE Microwave and Wireless Components Letters**,

- Institute of Electrical e Electronics Engineers (IEEE), v. 22, n. 2, p. 73–75, fev. 2012.
- 105 MROZOWSKI, M.; STUCHLY, M.A. Parameterization of media dispersive properties for FDTD. **IEEE Transactions on Antennas and Propagation**, Institute of Electrical e Electronics Engineers (IEEE), v. 45, n. 9, p. 1438–1439, 1997.
- 106 CLEGG, J; ROBINSON, M P. A genetic algorithm for optimizing multi-pole Debye models of tissue dielectric properties. **Physics in Medicine and Biology**, IOP Publishing, v. 57, n. 19, p. 6227–6243, set. 2012.
- 107 KREWER, Finn; MORGAN, Fearghal; O'HALLORAN, Martin. DEVELOPMENT OF ACCURATE MULTI-POLE DEBYE FUNCTIONS FOR ELECTROMAGNETIC TISSUE MODELLING USING A GENETIC ALGORITHM. **Progress In Electromagnetics Research Letters**, The Electromagnetics Academy, v. 43, p. 137–147, 2013.
- 108 HOLLAND, John H. **Adaptation in natural and artificial systems**. Cambridge, MA: Bradford Books, jun. 2019. (Complex Adaptive Systems).
- 109 RICHTER, Conrad; DAINITY, Jack. Ion behaviour in plant cell walls. III. Measurement of the mean charge separation distance and the linear charge density parameter in delignified Sphagnum russowii cell walls. **Canadian Journal of Botany**, Canadian Science Publishing, v. 68, n. 4, p. 768–772, abr. 1990. ISSN 0008-4026.
- 110 KRASSOWSKA, Wanda; FILEV, Petar D. Modeling electroporation in a single cell. **Biophysical journal**, Elsevier, v. 92, n. 2, p. 404–417, 2007.
- 111 AGNASS, Pierre *et al.* Mathematical modeling of the thermal effects of irreversible electroporation for in vitro, in vivo, and clinical use: a systematic review. **International Journal of Hyperthermia**, Informa UK Limited, v. 37, n. 1, p. 486–505, jan. 2020. ISSN 1464-5157.
- 112 KUMAR, Pavitra Krishna; BHUNIA, Kanishka; TANG, Juming; RASCO, Barbara A.; TAKHAR, Pawan S.; SABLANI, Shyam S. Thermal transition and thermo-physical properties of potato (*Solanum tuberosum* L.) var.

- Russet brown. **Journal of Food Measurement and Characterization**, Springer Science e Business Media LLC, v. 12, n. 3, p. 1572–1580, mar. 2018.
- 113 TREJOS-TABORDA, Juan; REYES-OSORIO, Luis; GARZA, Carlos; CARMEN ZAMBRANO-ROBLEDO, Patricia del; LOPEZ-BOTELLO, Omar. Finite element modeling of melt pool dynamics in laser powder bed fusion of 316L stainless steel. **The International Journal of Advanced Manufacturing Technology**, Springer Science e Business Media LLC, v. 120, n. 5-6, p. 3947–3961, mar. 2022.
- 114 WEAVER, James C; CHIZMADZHEV, Yu A. Theory of electroporation: a review. **Bioelectrochemistry and bioenergetics**, Elsevier, v. 41, n. 2, p. 135–160, 1996.
- 115 GLASER, Ralf W; LEIKIN, Sergei L; CHERNOMORDIK, Leonid V; PASTUSHENKO, Vasili F; SOKIRKO, Artjom I. Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, Elsevier, v. 940, n. 2, p. 275–287, 1988.
- 116 SCUDERI, Maria; DERMOL-ČERNE, Janja; SILVA, Clarissa Amaral da; MURALIDHARAN, Aswin; BOUKANY, Pouyan E.; REMS, Lea. Models of electroporation and the associated transmembrane molecular transport should be revisited. **Bioelectrochemistry**, Elsevier BV, v. 147, p. 108216, ago. 2022.
- 117 BARNETT, Alan; WEAVER, James C. Electroporation: a unified, quantitative theory of reversible electrical breakdown and mechanical rupture in artificial planar bilayer membranes. **Bioelectrochemistry and bioenergetics**, Elsevier, v. 25, n. 2, p. 163–182, 1991.
- 118 SAULIS, Gintautas. Cell electroporation: Part 3. Theoretical investigation of the appearance of asymmetric distribution of pores on the cell and their further evolution. **Bioelectrochemistry and bioenergetics**, Elsevier, v. 32, n. 3, p. 249–265, 1993.
- 119 DAVALOS, Rafael V; RUBINSKY, Boris; OTTEN, David M. A feasibility study for electrical impedance tomography as a means to monitor tissue electroporation for molecular medicine. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, IEEE, v. 49, n. 4, p. 400–403, 2002.

- 120 MI, Yan; WU, Xiao; XU, Jin; ZHENG, Wei; MA, Chi; CHEN, Wenjuan; ZHANG, Qin. Effect of the mechanical properties of the cell membrane on the transition energy barrier of electroporation. **Journal of Applied Physics**, AIP Publishing, v. 131, n. 8, fev. 2022.
- 121 SUZUKI, Daniela OH; RAMOS, Airton; RIBEIRO, Maria CM; CAZAROLLI, Luisa H; SILVA, Fátima RMB; LEITE, Laura D; MARQUES, Jefferson LB. Theoretical and experimental analysis of electroporated membrane conductance in cell suspension. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, IEEE, v. 58, n. 12, p. 3310–3318, 2010.
- 122 SUGAR, Istvan P; FÖRSTER, Walter; NEUMANN, Eberhard. Model of cell electrofusion: membrane electroporation, pore coalescence and percolation. **Biophysical chemistry**, Elsevier, v. 26, n. 2-3, p. 321–335, 1987.
- 123 FREEMAN, Scott A; WANG, Michele A; WEAVER, James C. Theory of electroporation of planar bilayer membranes: predictions of the aqueous area, change in capacitance, and pore-pore separation. **Biophysical journal**, Elsevier, v. 67, n. 1, p. 42–56, 1994.
- 124 YAO, Chenguo; LIU, Hongmei; ZHAO, Yajun; MI, Yan; DONG, Shoulong; LV, Yanpeng. Analysis of dynamic processes in single-cell electroporation and their effects on parameter selection based on the finite-element model. **IEEE Transactions on Plasma Science**, IEEE, v. 45, n. 5, p. 889–900, 2017.
- 125 SUÁREZ, Cecilia; SOBA, Alejandro; MAGLIETTI, Felipe; OLAIZ, Nahuel; MARSHALL, Guillermo. The Role of Additional Pulses in Electropermeabilization Protocols. Edição: Boris Rubinsky. **PLoS ONE**, Public Library of Science (PLoS), v. 9, n. 12, e113413, dez. 2014.
- 126 ZHAO, Yajun; ZHENG, Shuang; BEITEL-WHITE, Natalie; LIU, Hongmei; YAO, Chenguo; DAVALOS, Rafael V. Development of a Multi-Pulse Conductivity Model for Liver Tissue Treated With Pulsed Electric Fields. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, Frontiers Media SA, v. 8, mai. 2020.
- 127 ORLOWSKI, Stéphane; BELEHRADEK, Jean; PAOLETTI, Claude; MIR, Lluís M. Transient electropermeabilization of cells in culture. **Biochemical Pharmacology**, Elsevier BV, v. 37, n. 24, p. 4727–4733, dez. 1988.

- 128 ROLS, M.P.; TEISSIÉ, J. Electropermeabilization of mammalian cells. Quantitative analysis of the phenomenon. **Biophysical Journal**, Elsevier BV, v. 58, n. 5, p. 1089–1098, nov. 1990.
- 129 MAHMOOD, Faisal; GEHL, Julie. Optimizing clinical performance and geometrical robustness of a new electrode device for intracranial tumor electroporation. **Bioelectrochemistry**, Elsevier BV, v. 81, n. 1, p. 10–16, abr. 2011.
- 130 BOC, Nina *et al.* Ultrasonographic changes in the liver tumors as indicators of adequate tumor coverage with electric field for effective electrochemotherapy. **Radiology and Oncology**, Walter de Gruyter GmbH, v. 52, n. 4, p. 383–391, out. 2018.
- 131 CINDRIC, Helena; GASLJEVIC, Gorana; EDHEMOVIC, Ibrahim; BRECELJ, Erik; ZMUC, Jan; CEMAZAR, Maja; SELISKAR, Alenka; MIKLAVCIC, Damijan; KOS, Bor. Numerical mesoscale tissue model of electrochemotherapy in liver based on histological findings. **Scientific Reports**, Springer Science e Business Media LLC, v. 12, n. 1, abr. 2022.

Apêndices

APÊNDICE A – ESPECTRO EM FREQUÊNCIA DO PULSO MONOPOLAR

A função quadrada em um período T pode ser definida como

$$x(t) = \begin{cases} A & \text{para } -t_p/2 \leq t \leq t_p/2 \\ 0 & \text{caso contrário} \end{cases} \quad \text{A.1}$$

onde A é a amplitude do pulso e t_p é a largura do pulso.

Se $x(t)$ é periódica em T , podemos calcular a série de Fourier de $x(t)$, encontrando os seguintes coeficientes

$$\begin{aligned} a_0 &= Ad \\ a_k &= \frac{2A}{k\pi} \sin(k\pi d) \\ b_k &= 0 \end{aligned} \quad \text{A.2}$$

onde d é o percentual de ciclo ativo da função quadrada definido por

$$d = \frac{t_p}{T} = t_p f_r \quad \text{A.3}$$

e f_r é a frequência de repetição.

$x(t)$ pode então ser definida em termos da série de Fourier como

$$x(t) = Ad + \sum_{k=1}^{\infty} \frac{2A}{k\pi} \sin(k\pi t_p f_r) \cos(2\pi f_r t k) \quad \text{A.4}$$

Podemos então realizar a transformada de Fourier do sinal $x(t)$ no domínio do tempo ($\mathcal{F}(x(t)) = X(f)$). No domínio da frequência, a função quadrada é definida como uma série de pulsos harmônicos cuja frequência harmônica é igual a frequência de repetição da função quadrada.

$$X(f) = 2\pi A \left(d\delta(f) + \sum_{k=1}^{\infty} \frac{2}{k\pi} \sin(k\pi t_p f_r) (\delta(f - kf_r) + \delta(f + kf_r)) \right) \quad \text{A.5}$$

No entanto, o protocolo de eletroquimioterapia não é periódico uma vez que o mesmo possui um número limitado de pulsos. A limitação no número de pulsos pode ser incluída no desenvolvimento analítico multiplicando-se o sinal $x(t)$ por uma função retangular com largura igual ao tempo total do protocolo.

$$y(t) = \text{rect} \left(\frac{t}{\tau} \right) x(t) \quad \text{A.6}$$

com τ sendo a duração da função retangular.

A função retangular tem transformada de Fourier igual a função *sinus cardinalis* (*sinc*). Então, $Y(f)$ pode ser definida como a convolução da função *sinc* com a série de pulsos harmônicos de $X(f)$ apresentado na Equação A.5.

$$Y(f) = \tau \cdot \text{sinc}(f\tau) * 2\pi A \left(t_p f_r \delta(f) + \sum_{k=1}^{\infty} \frac{2}{k\pi} \sin(k\pi t_p f_r) (\delta(f - kf_r) + \delta(f + kf_r)) \right) \quad \text{A.7}$$

Considerando que o trem de pulsos está centrado em $t = 0$ e que a frequência de repetição é 5 kHz, os pulsos estão contidos entre $t = -800 \mu\text{s}$ e $t = 800 \mu\text{s}$, com isso define-se $\tau = 800 \mu\text{s}$. A frequência de repetição é 5 kHz e o tempo do pulso $100 \mu\text{s}$, dessa forma podemos substituir os valores na Equação A.7 e encontrar a densidade espectral do protocolo de eletroporação. Da mesma forma, para o protocolo de frequência de repetição de 1 Hz, podemos definir $\tau = 4 \text{ s}$, $f_r = 1 \text{ Hz}$ e $t_p = 100 \mu\text{s}$.

A Figura 27 mostra a densidade espectral do sinal periódico $x(t)$, da função retangular utilizada para realizar o truncamento do sinal e o espectro resultante $Y(f)$ para o protocolo utilizando $f_r = 5 \text{ kHz}$.

A Tabela 12 mostra o percentual de potência dos sinais para cada intervalo de frequência. Os cálculos foram realizados utilizando o MATLAB 2018a (MathWorks, www.mathworks.com). O código encontra-se disponível no Apêndice D.

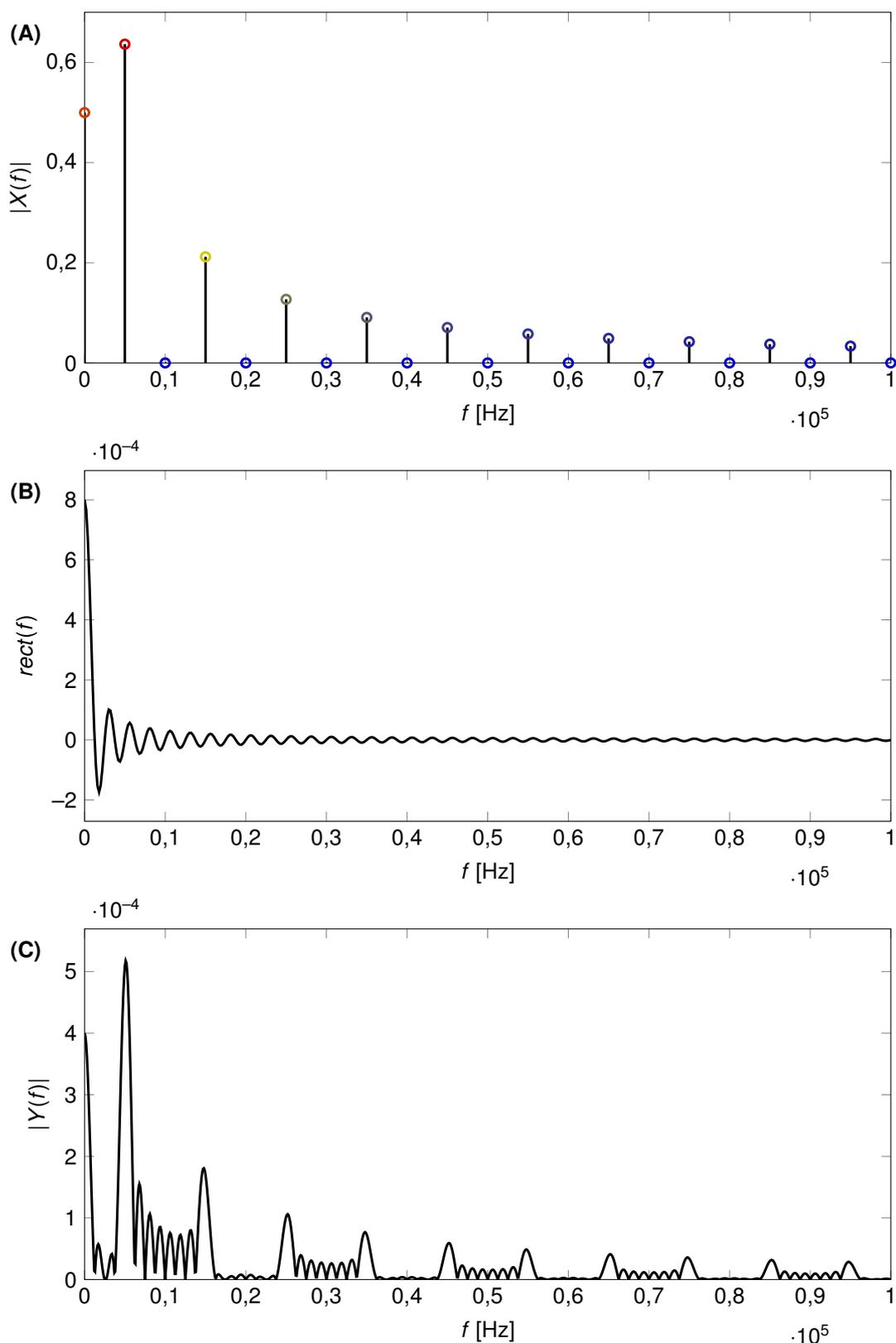
Tabela 12 – Percentual de potência do sinal para cada intervalo de frequência

f_r	0 – 5	5 – 10	10 – 20	20 – 30	30 – 40	40 – 50	50 – 100	Acima de 100
1 Hz	77,77%	12,98%	4,74%	1,66%	0,84%	0,51%	1,01%	0,51%
5 kHz	42,24%	40,41%	9,25%	2,86%	1,58%	0,90%	1,87%	0,95%

Os intervalos em frequência estão em kHz.

Fonte: Produzido pelo autor.

Figura 27 – Espectro do protocolo de eletroporação com pulso unipolar de 100 μ s e frequência de repetição de 5 kHz



(A) Espectro do trem de pulsos quadrado periódico. (B) Espectro do sinal retangular para truncamento do sinal periódico. (C) Espectro resultante do protocolo de eletroporação.

Fonte: Produzido pelo autor.

APÊNDICE B – ESPECTRO EM FREQUÊNCIA DO PULSO BIPOLAR

A função bipolar em um período T pode ser definida como

$$x(t) = \begin{cases} -A & \text{para } -t_p/2 \leq t \leq 0 \\ A & \text{para } 0 \leq t \leq t_p/2 \\ 0 & \text{caso contrário} \end{cases} \quad \text{B.1}$$

onde A é a amplitude do pulso e t_p é a largura do pulso.

Se $x(t)$ é periódica em T , podemos calcular a série de Fourier de $x(t)$, encontrando os seguintes coeficientes

$$\begin{aligned} a_0 &= 0 \\ a_k &= 0 \\ b_k &= \frac{2A}{k\pi} [1 - \cos(k\pi d)] \end{aligned} \quad \text{B.2}$$

onde d é o percentual de ciclo ativo da função bipolar definido por

$$d = \frac{t_p}{T} = t_p f_r \quad \text{B.3}$$

e f_r é a frequência de repetição.

$x(t)$ pode então ser definida em termos da série de Fourier como

$$x(t) = \sum_{k=1}^{\infty} \frac{2A}{k\pi} [1 - \cos(k\pi t_p f_r)] \sin(2\pi t k f_r) \quad \text{B.4}$$

Podemos então realizar a transformada de Fourier do sinal $x(t)$ no domínio do tempo ($\mathcal{F}(x(t)) = X(f)$). No domínio da frequência, a função bipolar é definida como uma série de pulsos harmônicos complexos cuja frequência harmônica é igual a frequência de repetição da função quadrada.

$$X(f) = 2\pi A \left(\sum_{k=1}^{\infty} \frac{2}{k\pi} [1 - \cos(k\pi t_p f_r)] j(\delta(f + k f_r) - \delta(f - k f_r)) \right) \quad \text{B.5}$$

No entanto, o protocolo de eletroquimioterapia não é periódico uma vez que o mesmo possui um número limitado de pulsos. A limitação no número de pulsos pode ser incluída no desenvolvimento analítico multiplicando-se o sinal $x(t)$ por uma função retangular com largura igual ao tempo total do protocolo.

$$y(t) = \text{rect} \left(\frac{t}{\tau} \right) x(t) \quad \text{B.6}$$

com τ sendo a largura da função retangular.

A função retangular tem transformada de Fourier igual a função *sinus cardinalis* (*sinc*). Então, $Y(f)$ pode ser definida como a convolução da função *sinc* com a série de pulsos harmônicos de $X(f)$ apresentado na Equação B.5.

$$Y(f) = \tau \cdot \text{sinc}(f\tau) * 2\pi A \left(\sum_{k=1}^{\infty} \frac{2}{k\pi} [1 - \cos(k\pi t_p f_r)] j(\delta(f + kf_r) - \delta(f - kf_r)) \right) \quad \text{B.7}$$

Considerando $t_p = 100 \mu\text{s}$, $\tau = 800 \mu\text{s}$, $f_r = 5 \text{ kHz}$ e substituindo os valores na Equação B.7, encontramos a densidade espectral do protocolo de eletroporação bipolar. A Figura 28 mostra o módulo do espectro da série de Fourier $X(f)$ e o resultado final do espectro de oito trem de pulsos bipolar. O espectro do sinal retangular é o mesmo encontrado na Figura 27B.

De maneira similar, calculamos a densidade de potência em intervalos de frequência, a Tabela 13 mostra o percentual de potência dos sinais unipolar e bipolar para frequência de repetição de 5 kHz.

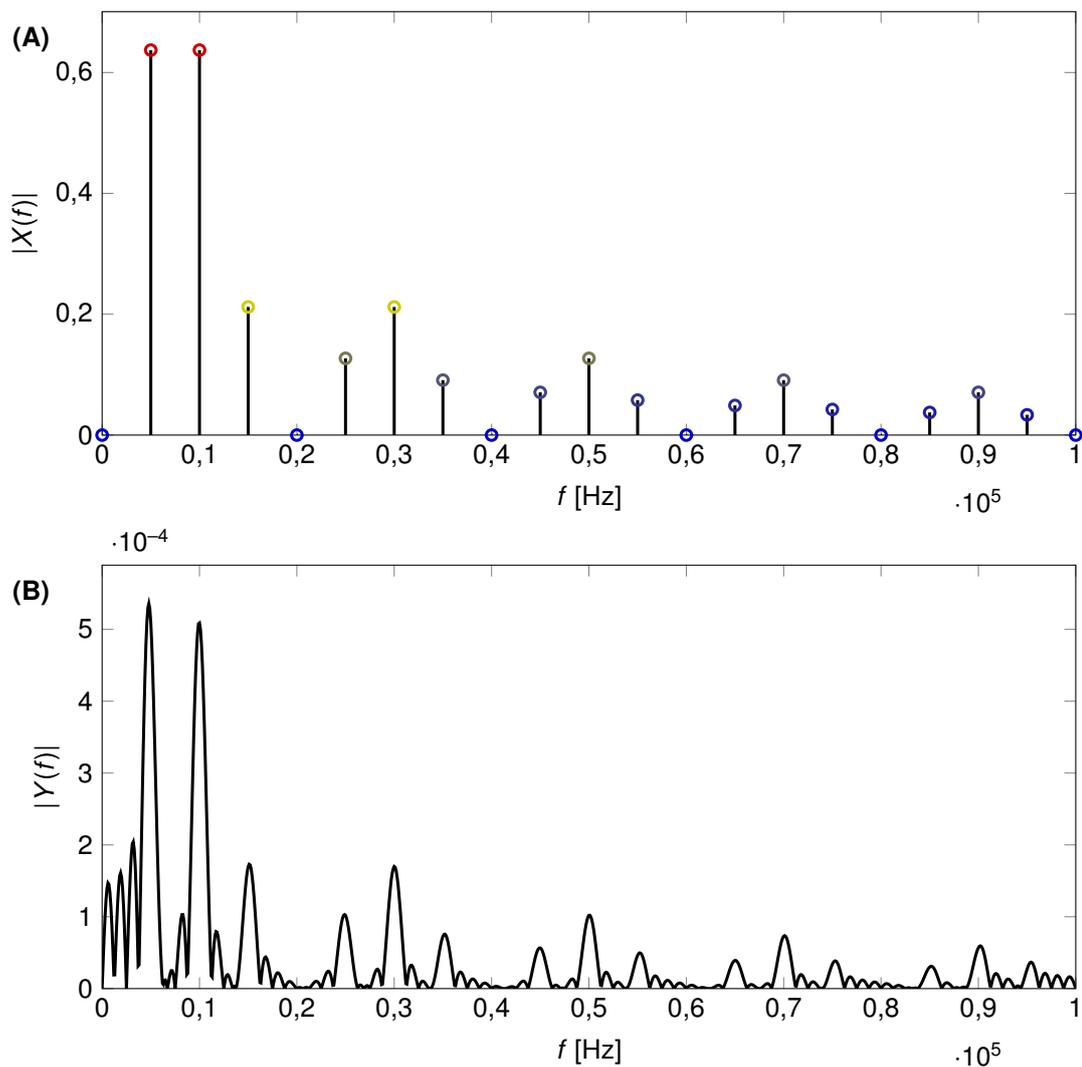
Tabela 13 – Percentual de potência do sinal para trem de pulso unipolar e bipolar com frequência de repetição de 5 kHz

Pulso	0 – 5	5 – 10	10 – 20	20 – 30	30 – 40	40 – 50	50 – 100	Acima de 100
Unipolar	42,24%	40,41%	9,25%	2,86%	1,58%	0,90%	1,87%	0,95%
Bipolar	34,50%	36,46%	23,45%	3,79%	3,06%	1,25%	3,05%	1,55%

Os intervalos em frequência estão em kHz.

Fonte: Produzido pelo autor.

Figura 28 – Espectro do protocolo de eletroporação com pulso bipolar de 100 μs e frequência de repetição de 5 kHz



(A) Espectro do trem de pulsos quadrado periódico. (B) Espectro resultante do protocolo de eletroporação com oito pulsos.

Fonte: Produzido pelo autor.

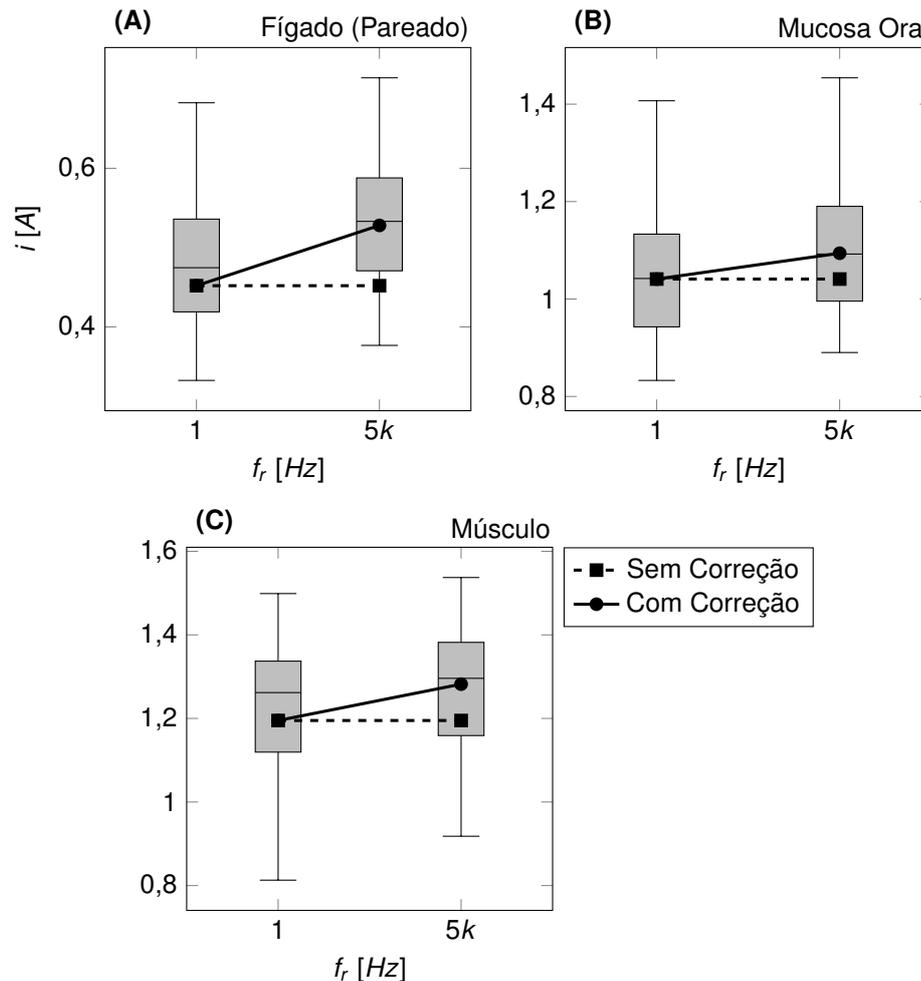
APÊNDICE C – FATOR DE CORREÇÃO PARA MODELOS ESTÁTICOS

Introduzimos um fator de correção (k) multiplicando todo o modelo estático. A Equação C.1 mostra o modelo com o fator de correção.

$$\sigma(E) = k \left(\sigma_0 + \frac{\sigma_1 - \sigma_0}{1 + De^{-\frac{E-A}{B}}} \right) \quad \text{C.1}$$

O valor de k foi determinado numericamente para cada tecido por simulações numéricas. Primeiro, testamos k entre 1 e 1,2 com passos de 0,025. Após achar o melhor intervalo, realizamos uma segunda etapa de otimização com passos de 0,005 para obter a melhor aproximação. O melhor resultado foi obtido com k igual a 1,165 para o fígado, 1,04 para a mucosa oral e 1,035 para o músculo. A Figura 29 mostra os resultados simulados com e sem fator de correção, o diagrama boxplot foi mantido na imagem para comparação com os dados experimentais.

Figura 29 – Resultado das correntes elétricas experimentais e simuladas com e sem o fator de correção para (A) fígado, (B) mucosa oral e (C) músculo



Fonte: Produzido pelo autor.

A adoção do fator de correção permitiu reduzir o erro entre simulação e experimento. O erro sem e com aplicação do fator de correção diminuiu de 13,94% para 0,26% no fígado, de 3,79% para 0,15% na mucosa oral e de 3,34% para 0,03% no músculo. É importante notar que o fator de correção é aproximadamente determinado pelo valor da razão na Tabela 5. A diferença entre os dois valores ocorre pois nosso método também compensou pequenos erros do modelo original, conforme pode ser observado na Figura 29.

O fator de correção é um método simplificado para evitar a subestimação da corrente elétrica simulada. O fator de correção não leva em conta as variações dos efeitos dispersivos e de eletroporação que podem resultar da mudança da frequência de repetição.

APÊNDICE D – CÓDIGO PARA CÁLCULO DO ESPECTRO DE POTÊNCIA DO PROTOCOLO DE ELETROPORAÇÃO

```

1  clc; clear variables;
2
3  step = 1; % 1 is necessary foi f_p = 1 Hz
4  t_p = 100e-6; % Pulse time
5  f_p = 5e3; % Repetition Frequency
6  T_p = 1/f_p; % Repetition Period
7  n = 8; % Number of pulses
8
9  tau = n*T_p/2;
10
11 freq = 200e3;
12
13 f = (-freq:step:freq);
14 f_zero = find(f==0);
15
16 x = zeros(1,length(f));
17
18 for k = 1:(freq/f_p)
19     x(f_zero - (k*f_p/step)) = 2/(k*pi)*sin(k*pi*t_p*f_p);
20     x(f_zero + (k*f_p/step)) = 2/(k*pi)*sin(k*pi*t_p*f_p);
21 end
22 x(f_zero) = t_p*f_p;
23
24 y = tau*sinc(f*tau);
25
26 out = conv(x, y, 'same');
27
28 out_2 = out(f_zero:length(f));
29 f_2 = f(f_zero:length(f));
30
31 plot(f_2,abs(out_2));
32 %% Power Percentage Calculation
33
34 f_min = 0e3;
35 f_max = 5e3;
36

```

```
37 p_total = sum(abs(out_2).^2);
38 f_range_min = find(f_2==f_min);
39 f_range_max = find(f_2==f_max);
40 p_range = sum(abs(out_2(f_range_min:f_range_max)).^2);
41 p_percentage = p_range/p_total;
42
43 disp(p_percentage);
```

APÊNDICE E – EXPANSÃO DO MÉTODO EDA PARA MULTI-POLOS DE DEBYE

A dispersão de Debye é dada por

$$\varepsilon_r^*(\omega) = \frac{\sigma_s}{j\omega\varepsilon_0} + \varepsilon_\infty + \sum_{k=1}^N \frac{\Delta\varepsilon_k}{1 + j\omega\tau_k} \quad \text{E.1}$$

Implementando o multi-polo na equação de Maxwell-Ampère no domínio da frequência, temos

$$\vec{J}(\omega) = j\omega\varepsilon_0 \left(\frac{\sigma_s}{j\omega\varepsilon_0} + \varepsilon_\infty + \sum_{k=1}^N \frac{\Delta\varepsilon_k}{1 + j\omega\tau_k} \right) \vec{E}(\omega) \quad \text{E.2}$$

Realizando a distributiva

$$\vec{J}(\omega) = \sigma_s \vec{E}(\omega) + j\omega\varepsilon_0 \varepsilon_\infty \vec{E}(\omega) + j\omega\varepsilon_0 \sum_{k=1}^N \frac{\Delta\varepsilon_k}{1 + j\omega\tau_k} \vec{E}(\omega) \quad \text{E.3}$$

Podemos expandir o somatório para N polos

$$\begin{aligned} \vec{J}(\omega) = & \sigma_s \vec{E}(\omega) + j\omega\varepsilon_0 \varepsilon_\infty \vec{E}(\omega) + j\omega\varepsilon_0 \frac{\Delta\varepsilon_1}{1 + j\omega\tau_1} \vec{E}(\omega) + \\ & j\omega\varepsilon_0 \frac{\Delta\varepsilon_2}{1 + j\omega\tau_2} \vec{E}(\omega) + \dots + j\omega\varepsilon_0 \frac{\Delta\varepsilon_N}{1 + j\omega\tau_N} \vec{E}(\omega) \end{aligned} \quad \text{E.4}$$

Dessa forma, cada uma das componentes pode ser definida como uma densidade de corrente elétrica arbitrária

$$\begin{aligned} \vec{J}_1 &= j\omega\varepsilon_0 \frac{\Delta\varepsilon_1}{1 + j\omega\tau_1} \vec{E}(\omega) \\ \vec{J}_2 &= j\omega\varepsilon_0 \frac{\Delta\varepsilon_2}{1 + j\omega\tau_2} \vec{E}(\omega) \\ &\dots \\ \vec{J}_N &= j\omega\varepsilon_0 \frac{\Delta\varepsilon_N}{1 + j\omega\tau_N} \vec{E}(\omega) \end{aligned} \quad \text{E.5}$$

Realizando os mesmos passos descritos no decorrer do Capítulo 5, encontramos as EDAs para cada polo de dispersão

$$\begin{aligned} \vec{J}_1(t) + \tau_1 \frac{d\vec{J}_1(t)}{dt} &= \varepsilon_0 \Delta\varepsilon_1 \frac{d\vec{E}(t)}{dt} \\ \vec{J}_2(t) + \tau_2 \frac{d\vec{J}_2(t)}{dt} &= \varepsilon_0 \Delta\varepsilon_2 \frac{d\vec{E}(t)}{dt} \\ &\dots \\ \vec{J}_N(t) + \tau_N \frac{d\vec{J}_N(t)}{dt} &= \varepsilon_0 \Delta\varepsilon_N \frac{d\vec{E}(t)}{dt} \end{aligned} \quad \text{E.6}$$

Dessa forma, a contribuição total de todos os polos da dispersão é o somatório de cada uma dessas correntes

$$\sum_{k=1}^N \vec{J}_k(t) = \vec{J}_1 + \vec{J}_2 + \cdots + \vec{J}_N \quad \text{E.7}$$

Onde cada componente é definida por uma EDA

$$\tau_k \frac{\partial \vec{J}_k}{\partial t} + \vec{J}_k = \varepsilon_0 \Delta \varepsilon_k \frac{\partial \vec{E}}{\partial t} \quad \text{E.8}$$

Por fim, a equação de Maxwell-Ampère no domínio do tempo, considerando as componentes dispersivas, é dada por

$$\vec{J}(t) = \sigma_s \vec{E}(t) + \varepsilon_0 \varepsilon_\infty \frac{d\vec{E}(t)}{dt} + \sum_{k=1}^N \vec{J}_k(t) \quad \text{E.9}$$

APÊNDICE F – ALGORITMO GENÉTICO

Algoritmo genético utilizado para encontrar os melhores parâmetros da dispersão de Debye para tecidos biológicos.

```

1 % Experimental data load
2 experimental = readtable('directory_to_experimental_data');
3 experimental = table2array(experimental);
4
5 % -- Experimental data conditioning
6 frequency = experimental(:,1)';
7 experimental_cond = experimental(:,2)';
8 experimental_perm = experimental(:,3)';
9
10 %% Genetic Algorithim Code
11
12 % Number of poles of Debye dispersion
13 n_debye_poles = 6;
14
15 % Constant declaration
16 epsilon_0 = 8.854187817e-12;
17
18 % Frequency conversion
19 f = frequency;
20 w = 2*pi*f;
21
22 % Parameter Limits
23 delta_epsilon_upper_limit = 8;
24 delta_epsilon_lower_limit = -3;
25 tau_upper_limit = -1;
26 tau_lower_limit = -12;
27 epsilon_inf_upper_limit = 10; % Ideally inf, but 10 already
    works
28 epsilon_inf_lower_limit = 0;
29 sigma_s_upper_limit = 0;
30 sigma_s_lower_limit = -4;
31
32 % Multipole Debye dispersion model declaration
33 debye_func = @(epsilon_inf, sigma_s, delta_epsilon, tau)...
34     10^epsilon_inf + 10^sigma_s./(1j*w*epsilon_0) + ...

```

```
35     sum((10.^delta_epsilon)./(1 + (1j*w.*10.^tau)));
36
37 % Conversion of Experimental to Debye Real and Imaginary
38 experimental_real = experimental_perm;
39 experimental_imag = (-1)*experimental_cond./(epsilon_0*w);
40 experimental_func = experimental_real + 1i*experimental_imag;
41
42 % Number of variables of the Debye parameterization
43 n_variables = 2 + 2*n_debye_poles;
44
45 % Parameter limits vector initialization
46 lb = zeros(1, n_variables);
47 ub = zeros(1, n_variables,1);
48
49 % Parameter limits vectorization
50 % -- Lower limits
51 lb(1) = epsilon_inf_lower_limit;
52 lb(2) = sigma_s_lower_limit;
53 lb(3:(n_debye_poles + 2)) = delta_epsilon_lower_limit;
54 lb((n_debye_poles + 3):n_variables) = tau_lower_limit;
55 % -- Upper limits
56 ub(1) = epsilon_inf_upper_limit;
57 ub(2) = sigma_s_upper_limit;
58 ub(3:(n_debye_poles + 2)) = delta_epsilon_upper_limit;
59 ub((n_debye_poles + 3):n_variables) = tau_upper_limit;
60
61 % Genetic Algorithm declaration
62 ga_options_log = optimoptions('ga', ...
63     'PlotFcn', @gaplotbestf2, ...
64     'UseParallel', true, ...
65     'MaxGenerations', 2e3,...
66     'MaxStallGenerations', 500,...
67     'PopulationSize', 1e3, ...
68     'SelectionFcn', @selectiontournament, ...
69     'MutationFcn', @mutationadaptfeasible);
70
71 % Vectorization of parameterization variables
72 % -- The 'p' vector is used in the next functions. The vector
    contains the
```

```
73 % -- results of the parameters, which are organized according
    to the
74 % -- following structure
75 % -- p(1) = epsilon_inf
76 % -- p(2) = sigma_s
77 % -- p(3) = delta_epsilon_1
78 % -- p(4) = delta_epsilon_2
79 % -- ...
80 % -- p(n_debye_poles + 2) = delta_epsilon_n
81 % -- p(n_debye_poles + 3) = tau_1
82 % -- p(n_debye_poles + 4) = tau_2
83 % -- ...
84
85 % Auxiliary function to handle the p vector
86 debye_to_fit = @(p)debye_func(p(1), p(2), p(3:(n_debye_poles
    + 2))',...
87     p((n_debye_poles + 3):n_variables)');
88
89 % Cost function declaration
90 log_cf = @(p)sum(...
91     (log10(real(experimental_func)) - log10(real(debye_to_fit
    (p))))).^2 + ...
92     (log10(imag(experimental_func)) - log10(imag(debye_to_fit
    (p))))).^2 ...
93 );
94
95 % Parameterization process
96 [sol_log, fval_log] = ...
97     ga(log_cf, n_variables, [], [], [], [], lb, ub, [],
    ga_options_log);
98
99 % Generate Plot to visual inspection
100 % -- Extracting conductivity and permittivity from the
    parameterized curve
101 cond_debye_solution = epsilon_0*(w).*imag(debye_to_fit(
    sol_log))*(-1);
102 perm_debye_solution = real(debye_to_fit(sol_log));
103 % -- Plot
104 figure(2);
```

```
105 subplot(2, 1, 1);
106 loglog(f,[experimental_perm; perm_debye_solution]);
107 subplot(2, 1, 2);
108 loglog(f,[experimental_cond; cond_debye_solution]);
109
110 % Print parameters
111 fprintf('%s\n',10^sol_log(1));
112 fprintf('%s\n',10^sol_log(2));
113 for i = 1:(n_debye_poles)
114     fprintf('%s\n',10^sol_log(2 + i));
115     fprintf('%s\n', 10^sol_log(n_debye_poles + 2 + i));
116 end
117
118 % Function to observe the CF during parametrization process
119 function state = gaplotbestf2(options,state,flag)
120 %GAPLOTBESTF Plots the best score and the mean score.
121 % STATE = GAPLOTBESTF(OPTIONS,STATE,FLAG) plots the best
    score as well
122 % as the mean of the scores.
123 %
124 % Example:
125 % Create an options structure that will use GAPLOTBESTF
126 % as the plot function
127 % options = optimoptions('ga','PlotFcn',@gaplotbestf);
128 % Copyright 2003-2016 The MathWorks, Inc.
129 state.Score = real(state.Score);
130 if size(state.Score,2) > 1
131     msg = getString(message('globaloptim:gaplotcommon:
        PlotFcnUnavailable','gaplotbestf'));
132     title(msg,'interp','none');
133     return;
134 end
135 switch flag
136     case 'init'
137         figure(1);
138         hold on;
139         set(gca,'xlim',[0,options.MaxGenerations]);
140         xlabel('Generation','interp','none');
141         ylabel('Fitness value','interp','none');
```

```
142     plotBest = plot(state.Generation, min(state.Score), '.k
    ');
143     set(plotBest, 'Tag', 'gaplotbestf');
144 %     plotMean = plot(state.Generation, meanf(state.Score)
    ', '.b');
145 %     set(plotMean, 'Tag', 'gaplotmean');
146     title('Best: ', 'interp', 'none')
147     case 'iter'
148         best = min(state.Score);
149 %         m     = meanf(state.Score);
150         plotBest = findobj(get(gca, 'Children'), 'Tag', '
gaplotbestf');
151 %         plotMean = findobj(get(gca, 'Children'), 'Tag', '
gaplotmean');
152         newX = [get(plotBest, 'Xdata') state.Generation];
153         newY = [get(plotBest, 'Ydata') best];
154         set(plotBest, 'Xdata', newX, 'Ydata', newY);
155 %         newY = [get(plotMean, 'Ydata') m];
156 %         set(plotMean, 'Xdata', newX, 'Ydata', newY);
157         set(get(gca, 'Title'), 'String', sprintf('Best: %g', best
    ));
158     case 'done'
159         LegnD = legend('Best fitness');
160         set(LegnD, 'FontSize', 8);
161         hold off;
162 end
163 end
```

APÊNDICE G – DISPERSÃO DE *SOLANUM TUBEROSUM* PARAMETRIZADA

Tabela 14 – Resultado da parametrização da dispersão dielétrica de *Solanum tuberosum* de 1 à 4 polos de Debye

Parâmetro	N = 1	N = 2	N = 3	N = 4
CF Valor Mín	$6,245 \times 10^1$	1,750	$2,908 \times 10^{-1}$	$5,174 \times 10^{-2}$
ε_∞	$1,093 \times 10^3$	$3,463 \times 10^2$	$2,352 \times 10^2$	$1,747 \times 10^2$
σ_s	$3,015 \times 10^{-2}$	$2,508 \times 10^{-2}$	$2,208 \times 10^{-2}$	$2,159 \times 10^{-2}$
$\Delta\varepsilon_1$	$5,041 \times 10^2$	$1,104 \times 10^6$	$1,753 \times 10^6$	$2,251 \times 10^6$
τ_1 (s)	$5,214 \times 10^{-6}$	$1,932 \times 10^{-3}$	$3,071 \times 10^{-3}$	$3,783 \times 10^{-3}$
$\Delta\varepsilon_2$		$3,308 \times 10^4$	$3,004 \times 10^4$	$2,918 \times 10^4$
τ_2 (s)		$4,181 \times 10^{-7}$	$6,431 \times 10^{-6}$	$2,309 \times 10^{-5}$
$\Delta\varepsilon_3$			$1,919 \times 10^4$	$1,836 \times 10^4$
τ_3			$2,530 \times 10^{-7}$	$1,005 \times 10^{-6}$
$\Delta\varepsilon_4$				$1,053 \times 10^4$
τ_4 (s)				$1,658 \times 10^{-7}$

CF Valor Mín é o valor mínimo atingido pela função de custo.

Fonte: Produzido pelo autor.

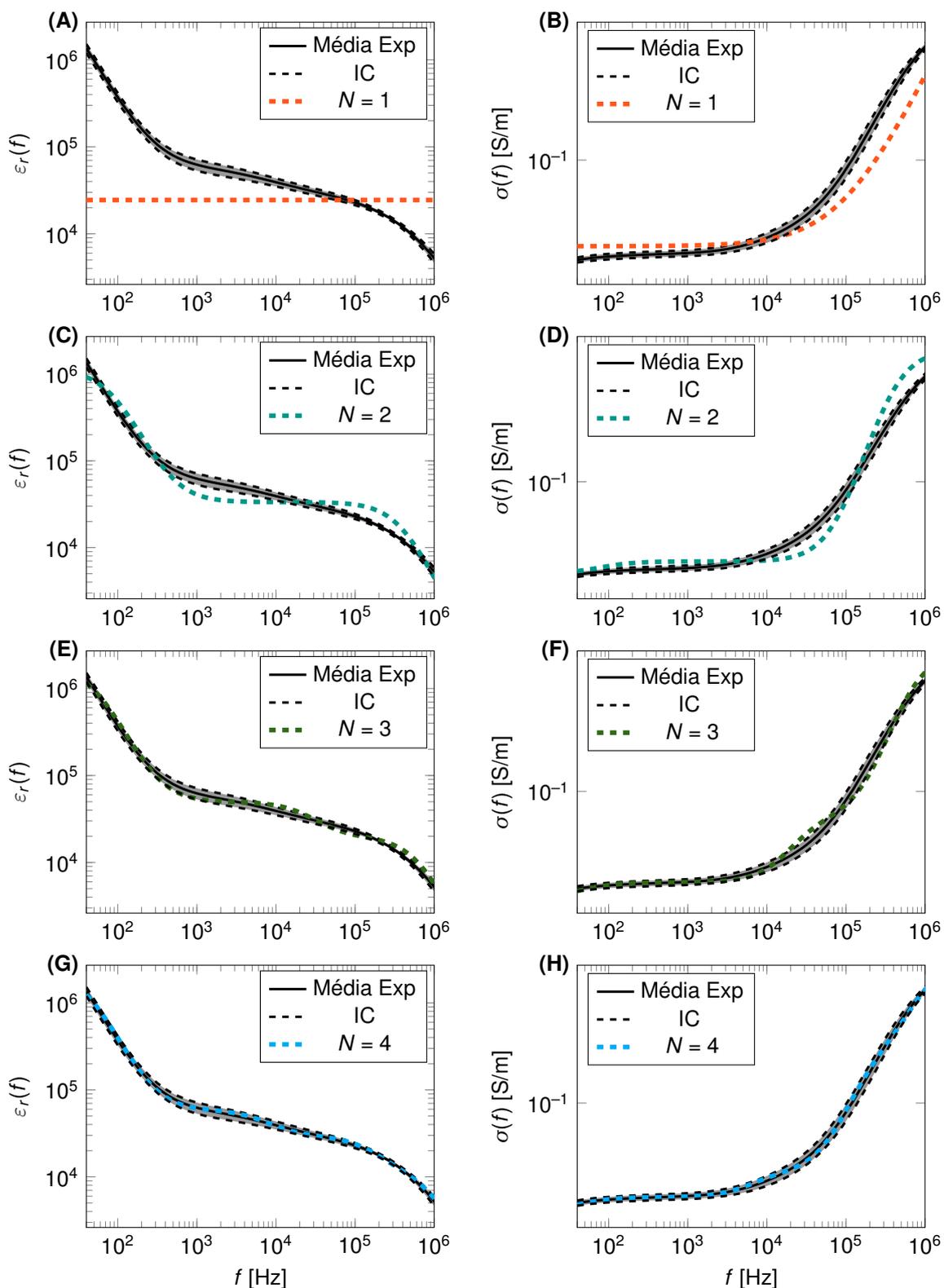
Tabela 15 – Resultado da parametrização da dispersão dielétrica de *Solanum tuberosum* de 1 à 8 polos de Debye

Parameter	N = 5	N = 6	N = 7	N = 8
CF Valor Mín	$2,287 \times 10^{-2}$	$9,006 \times 10^{-3}$	$5,583 \times 10^{-3}$	$4,358 \times 10^{-3}$
ε_{∞}	$1,765 \times 10^2$	$1,621 \times 10^2$	$1,495 \times 10^2$	$1,354 \times 10^2$
σ_s	$2,124 \times 10^{-2}$	$2,087 \times 10^{-2}$	$2,061 \times 10^{-2}$	$2,074 \times 10^{-2}$
$\Delta\varepsilon_1$	$2,683 \times 10^6$	$3,198 \times 10^6$	$3,604 \times 10^6$	$3,129 \times 10^6$
τ_1 (s)	$4,407 \times 10^{-3}$	$5,067 \times 10^{-3}$	$5,543 \times 10^{-3}$	$5,183 \times 10^{-3}$
$\Delta\varepsilon_2$	$2,458 \times 10^4$	$3,321 \times 10^4$	$1,863 \times 10^4$	$2,983 \times 10^5$
τ_2 (s)	$1,376 \times 10^{-4}$	$3,563 \times 10^{-4}$	$8,438 \times 10^{-4}$	$7,310 \times 10^{-3}$
$\Delta\varepsilon_3$	$1,950 \times 10^4$	$1,968 \times 10^4$	$2,868 \times 10^4$	$3,674 \times 10^4$
τ_3	$1,097 \times 10^{-5}$	$2,495 \times 10^{-5}$	$3,763 \times 10^{-4}$	$3,873 \times 10^{-4}$
$\Delta\varepsilon_4$	$1,654 \times 10^4$	$1,048 \times 10^4$	$1,993 \times 10^4$	$2,116 \times 10^4$
τ_4 (s)	$8,483 \times 10^{-7}$	$3,775 \times 10^{-6}$	$2,733 \times 10^{-5}$	$2,340 \times 10^{-5}$
$\Delta\varepsilon_5$	$1,005 \times 10^4$	$1,548 \times 10^4$	$1,182 \times 10^4$	$1,243 \times 10^4$
τ_5 (s)	$1,636 \times 10^{-7}$	$6,013 \times 10^{-7}$	$3,684 \times 10^{-6}$	$2,509 \times 10^{-6}$
$\Delta\varepsilon_6$		$7,628 \times 10^3$	$1,649 \times 10^4$	$1,607 \times 10^4$
τ_6 (s)		$1,403 \times 10^{-7}$	$5,100 \times 10^{-7}$	$3,869 \times 10^{-7}$
$\Delta\varepsilon_7$			$5,830 \times 10^3$	$6,852 \times 10^2$
τ_7 (s)			$1,215 \times 10^{-7}$	$1,205 \times 10^{-7}$
$\Delta\varepsilon_8$				$2,993 \times 10^3$
τ_8 (s)				$9,330 \times 10^{-8}$

CF Valor Mín é o valor mínimo atingido pela função de custo.

Fonte: Produzido pelo autor.

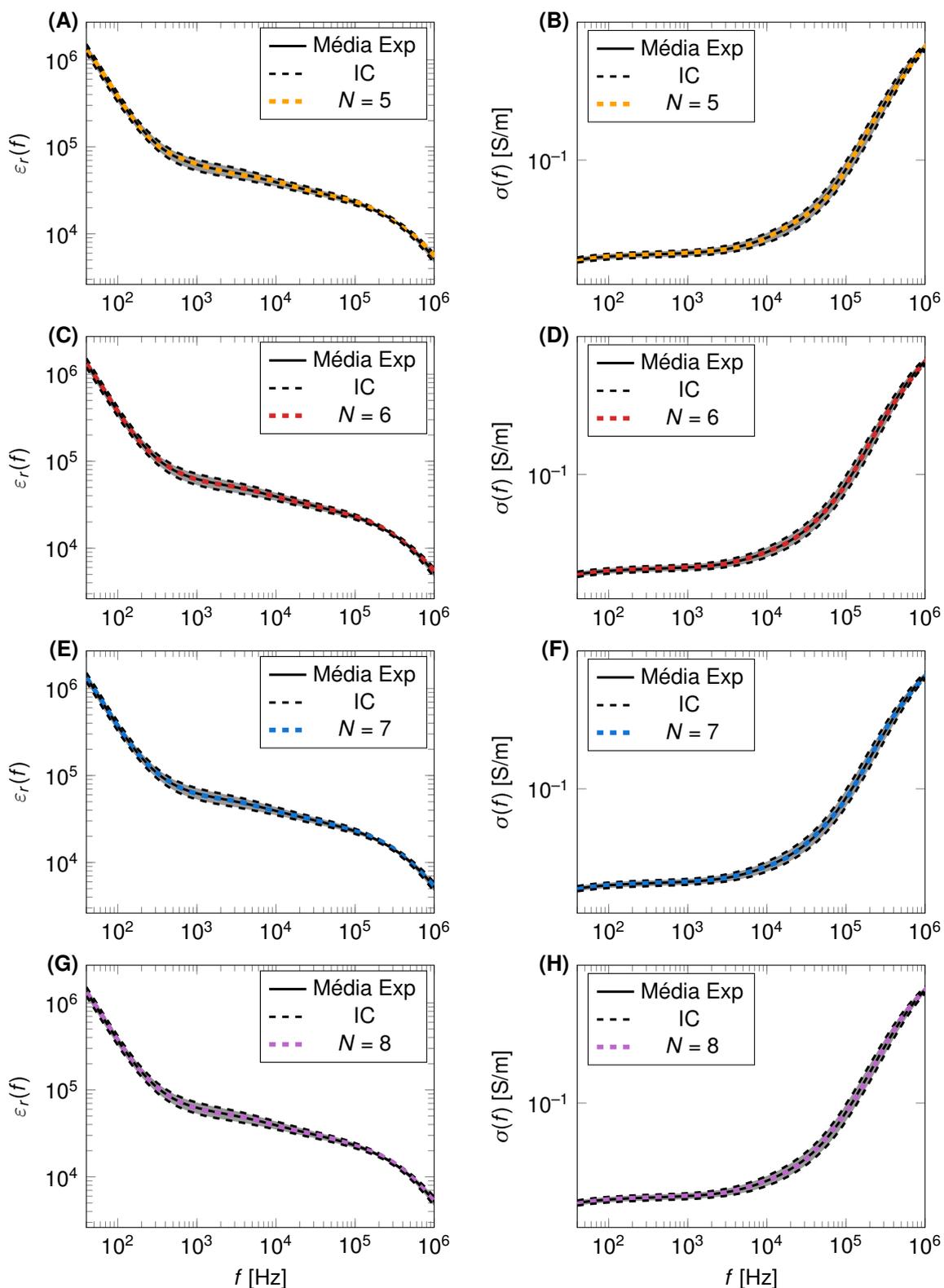
Figura 30 – Resultado gráfico da parametrização da dispersão dielétrica de *Solanum tuberosum* para (A, B) 1, (C, D) 2, (E, F) 3 e (G, H) 4 polos de Debye



(A, C, E, G) Permissividade Relativa. (B, D, F, H) Condutividade. Média Exp é a média dos dados experimentais. IC é o intervalo de confiança (95%).

Fonte: Produzido pelo autor.

Figura 31 – Resultado gráfico da parametrização da dispersão dielétrica de *Solanum tuberosum* para (A, B) 5, (C, D) 6, (E, F) 7 e (G, H) 8 polos de Debye



(A, C, E, G) Permissividade Relativa. (B, D, F, H) Condutividade. Média Exp é a média dos dados experimentais. IC é o intervalo de confiança (95%).

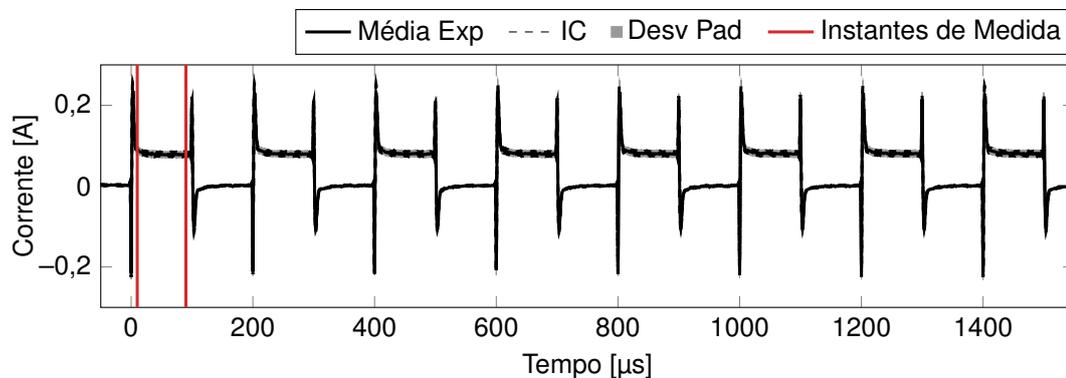
Fonte: Produzido pelo autor.

APÊNDICE H – DETERMINAÇÃO INICIAL DOS PARÂMETROS DO MODELO DINÂMICO DE *SOLANUM TUBEROSUM*

As três dinâmicas propostas no desenvolvimento do modelo dinâmico explicam o aumento da condutividade do tecido em diferentes escalas temporais. Dessa forma, podemos utilizar instantes de tempo distintos para uma primeira estimativa dos parâmetros de cada uma das dinâmicas. A primeira dinâmica (P_0) representa a abertura dos pre-poros, com escala temporal de nanossegundos. Dessa forma, espera-se que seu efeito ocorra já no instante inicial do pulso. A segunda dinâmica (P_1) representa a formação dos poros iniciais, com escala temporal de microssegundos. Com isso, a sua contribuição deve ocorrer ao longo do primeiro pulso.

A primeira definição dos parâmetros de P_0 (consequentemente β_0) e P_1 (consequentemente β_1) foi calculada por análises de condutividade instantânea nos momentos iniciais e finais (10 μs e 90 μs) do primeiro pulso. Para isso, mapeamos o valor de condutividade instantânea nesses instantes para todas as magnitudes de campo elétrico utilizadas (entre 10 kV/m e 100 kV/m). A Figura 32 mostra os momentos onde a condutividade instantânea foi calculada a partir dos dados experimentais de 10 kV/m.

Figura 32 – Instantes de tempo para medição da condutividade instantânea



Fonte: Produzido pelo autor.

A condutividade aparente foi calculada utilizando a relação tensão-corrente. As condutividades calculadas em 10 kV/m foram utilizados como referência para os valores dos demais campos, uma vez que a ocorrência de eletroporação não é esperada para esse limiar de campo elétrico. A Tabela 16 apresenta os valores de condutividade instantânea nos instantes inicial e final do primeiro pulso relativos às condutividades medidas em 10 kV/m. Também é apresentado a variação da condutividade sobre o primeiro pulso (Final - Inicial).

No instante inicial, a dinâmica de abertura dos pré-poros (P_0) é preponderante. Ao analisarmos graficamente os dados de acréscimo da condutividade no instante inicial, observamos uma dependência sigmoideal da condutividade em relação ao campo elétrico. Assim, podemos estimar os valores dos parâmetros da função β_0 através da

Tabela 16 – Acréscimo da condutividade instantânea nos instantes inicial e final do primeiro pulso relativo às medidas em 10 kV/m

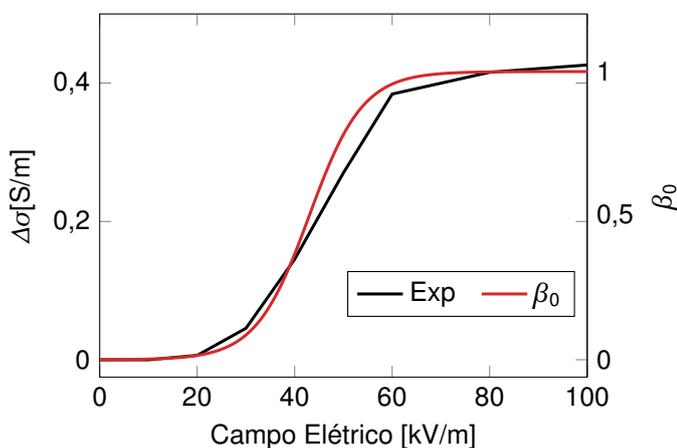
E	10 kV/m	20 kV/m	30 kV/m	40 kV/m	50 kV/m	60 kV/m	80 kV/m	100 kV/m
Inicial	0,00	0,006	0,046	0,145	0,270	0,384	0,416	0,426
Final	0,00	0,025	0,117	0,226	0,352	0,472	0,487	0,485
Final - Inicial	0,00	0,019	0,071	0,081	0,082	0,088	0,075	0,059

E é a magnitude do campo elétrico.

Fonte: Produzido pelo autor.

superposição dos gráficos. A Figura 33 apresenta a curva de acréscimo de condutividade instantânea experimental no instante inicial do primeiro pulso sobreposta pela função β_0 estimada com $E_0 = 43$ kV/m e $\Delta E_0 = 5,5$ kV/m.

Figura 33 – Acréscimo da condutividade do tecido dependente da magnitude do campo elétrico no primeiro instante do primeiro pulso



$\Delta\sigma$ é o acréscimo de condutividade relativo ao campo de 10 kV/m, onde não há eletroporação. Exp é o valor experimental.

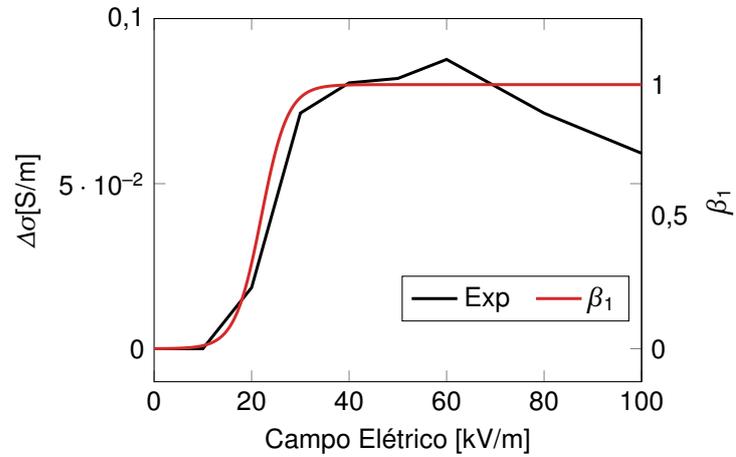
Fonte: Produzido pelo autor.

Do mesmo modo, ao decorrer do primeiro pulso, a dinâmica de abertura dos poros iniciais (P_1) é preponderante. Observando agora a variação apenas sobre o primeiro pulso (condutividade no instante final menos inicial), podemos avaliar os parâmetros da função β_1 através da superposição dos gráficos. A Figura 34 apresenta a curva de acréscimo de condutividade instantânea experimental sobre o primeiro pulso sobreposta pela função β_1 estimada com $E_1 = 22$ kV/m e $\Delta E_1 = 2,7$ kV/m.

Além da definição dos parâmetros das funções sigmoidais β_0 e β_1 , os dados de acréscimo de condutividade instantânea permitem auxiliar na definição dos coeficientes de condutividade σ_{P_0} e σ_{P_1} . Dessa forma, σ_{P_0} e σ_{P_1} foram inicialmente definidos pelos valores máximos dos acréscimos apresentados nos gráficos das Figuras 33 e 34, sendo $\sigma_{P_0} = 0,426$ S/m e $\sigma_{P_1} = 0,088$ S/m.

Como os modelos possuem interações entre suas dinâmicas, a análise através de condutividade instantânea permite apenas uma determinação inicial. As estimativas iniciais foram otimizadas com o auxílio de simulações. Durante a otimização, o

Figura 34 – Acréscimo da condutividade do tecido dependente da magnitude do campo elétrico durante o primeiro pulso



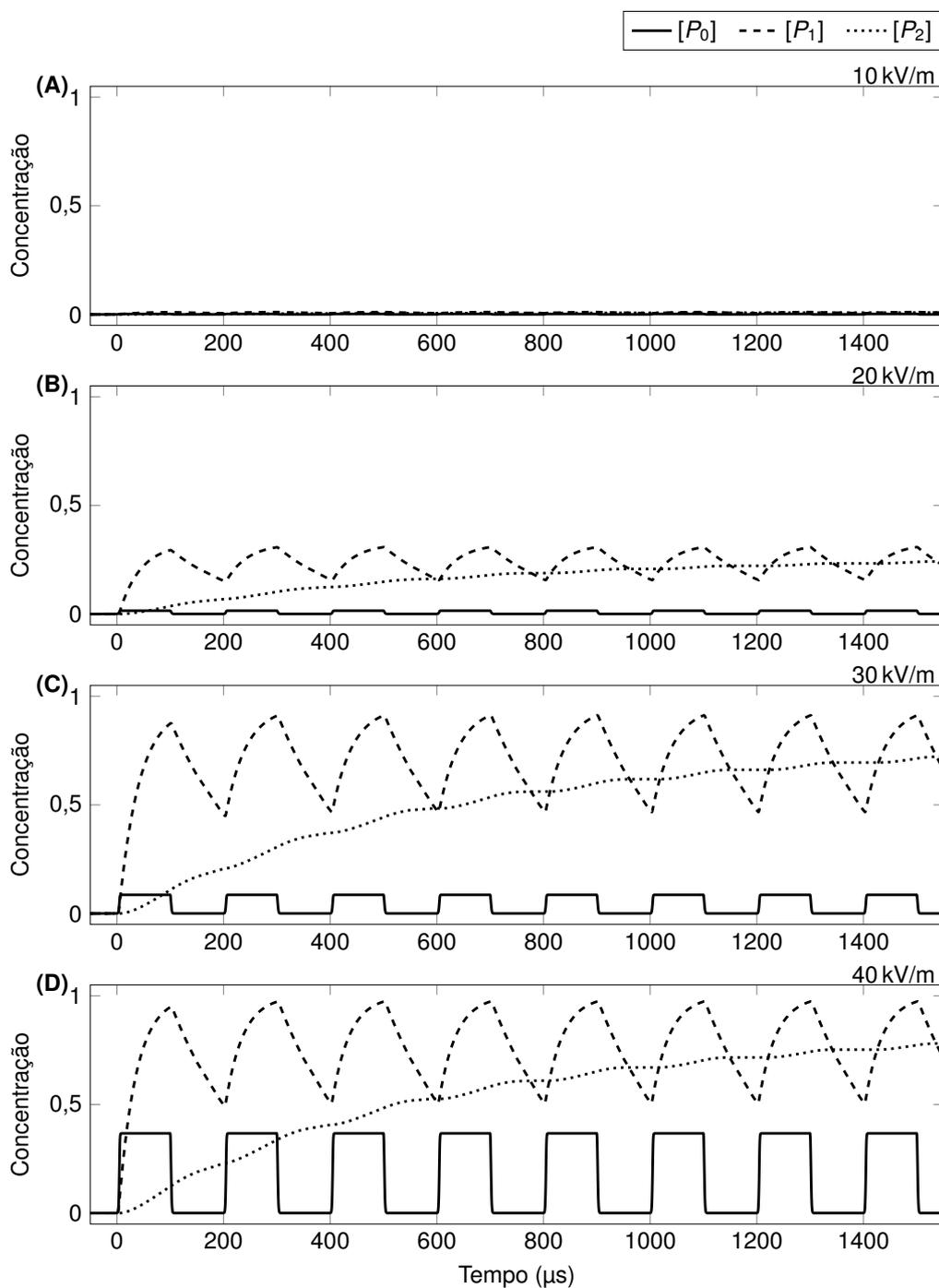
$\Delta\sigma$ é o acréscimo de condutividade no decorrer do primeiro pulso (condutividade instantânea inicial menos final). Exp é o valor experimental.

Fonte: Produzido pelo autor.

modelo foi testado para campos elétricos de 20 kV/m, 40 kV/m e 100 kV/m. As propriedades foram alteradas por tentativa e erro até encontrar o conjunto de parâmetros que resultassem no menor erro percentual médio em relação aos valores experimentais.

APÊNDICE I – CONCENTRAÇÃO DAS DINÂMICAS DA ELETROPORAÇÃO

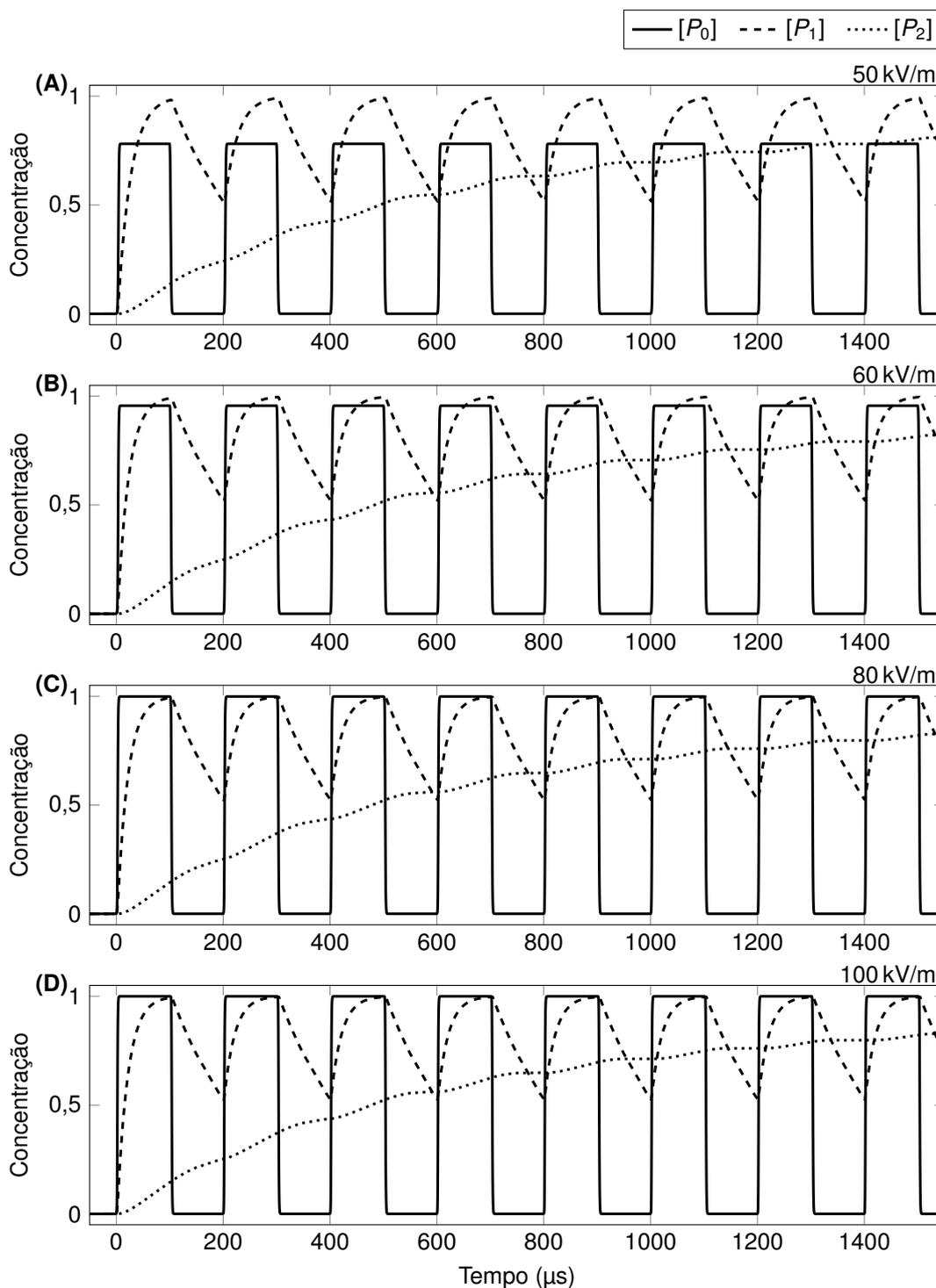
Figura 35 – Concentração das dinâmicas da eletroporação P_0 , P_1 e P_2 no centro da amostra



(A) 10 kV/m. (B) 20 kV/m. (C) 30 kV/m. (D) 40 kV/m.

Fonte: Produzido pelo autor.

Figura 36 – Concentração das dinâmicas da eletroporação P_0 , P_1 e P_2 no centro da amostra



(A) 50 kV/m. (B) 60 kV/m. (C) 80 kV/m. (D) 100 kV/m.

Fonte: Produzido pelo autor.

Anexos

**ANEXO A – CERTIFICADO DE TERCEIRO COLOCADO NO CONGRESSO
BRASILEIRO DE ENGENHARIA BIOMÉDICA**



SBEB

A **Sociedade Brasileira de Engenharia Biomédica** confere a

Raul Guedert

o 3º lugar do

Prêmio Cândido Pinto de Melo

pela apresentação do trabalho intitulado

**In Silico Study on Electric Current Density in the Brain During
Electrochemotherapy Treatment Planning of a Dog's Head Osteosarcoma**

em coautoria com Maurício Martins Taques, Isabela Berndt Paro, Marcelo Monte
Mór Rangel e Daniela Ota Hisayasu Suzuki, durante o

XXVII Congresso Brasileiro de Engenharia Biomédica

realizado de 26 a 30 de outubro de 2020.

Rio de Janeiro, 28 de outubro de 2020

*Rodrigo Pereira Baretto da
Costa-Félix*

Rodrigo Pereira Baretto da
Costa-Félix
PRESIDENTE DA SBEB

Adriano de Oliveira Andrade

Adriano de Oliveira Andrade
COORDENADOR GERAL DO
PROCESSO DE AVALIAÇÃO