

Guilherme Brasil Pintarelli

**TÉCNICAS DE ELETROPORAÇÃO: DISPOSITIVO
ELETRÔNICO E ENSAIOS EM LEVEDURAS**

Dissertação submetido ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica (PPGEEL) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) para a obtenção do Grau de Mestre em Engenharia Elétrica.

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

Florianópolis
2018

Brasil Pintarelli, Guilherme
Técnicas de Eletroporação: Dispositivo Eletrônico e
Ensaio em Leveduras / Guilherme Brasil Pintarelli ;
orientadora, Daniela Ota Hisayasu Suzuki, 2018.
167 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em
Engenharia Elétrica, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

1. Engenharia Elétrica. 2. Eletroporação. 3. Campos
Elétricos. 4. Leveduras. 5. Eletroquimioterapia. I. Ota
Hisayasu Suzuki, Daniela. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Elétrica. III. Título.

Guilherme Brasil Pintarelli

TÉCNICAS DE ELETROPORAÇÃO: DISPOSITIVO ELETRÔNICO E ENSAIOS EM LEVEDURAS

Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre em Engenharia Elétrica” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Santa Catarina.

Florianópolis, 10 de agosto de 2018.

Prof. Bartolomeu Ferreira Uchoa-Filho, Ph.D.
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:

Prof.^a Daniela Ota Hisayasu Suzuki, Dr.^a
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Pedro Xavier de Oliveira, Dr. (por videoconferência)
Universidade Estadual de Campinas

Prof. Bartolomeu Ferreira Uchoa-Filho, Ph.D.
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação
em Engenharia Elétrica - UFSC

Prof. Jefferson Luiz Brum Marques, Ph.D.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Pedro Giassi Junior, Dr.
Instituto Federal de Santa Catarina

À minha família.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço minha família: Aos meus pais, Kátia e Álvaro, por absolutamente tudo, eles são referência para minha vida. À minha avó, Sônia, pela pessoa carinhosa que é. À minha irmã Marina, pela incondicional parceria e domínio dos problemas de engenharia.

Agradeço à minha namorada Nicole, pelo companheirismo.

Agradeço a professora Daniela O. H. Suzuki, pelas oportunidades e confiança desde 2012. A professora Daniela me orientou durante minha graduação e mestrado em engenharia elétrica na UFSC. Nesses momentos aprendi metodologia científica e engenharia, além de inúmeros conselhos de vida.

Agradeço aos professores Jefferson L. B. Marques e José Marino Neto do Instituto de Engenharia Biomédica (IEB-UFSC). Suas aulas e diversos momentos de conversas expandiram minha compreensão de ciência e foram motivadoras.

Ao engenheiro Afrânio A. C. Jr., pelo intercâmbio de ideias ao longo desse trabalho.

Ao professor Márcio Rossi, do Departamento de Microbiologia da UFSC (MIP-UFSC). Seu auxílio e ensinamentos foram admiráveis.

Ao Américo C. Jr. e Gabriel S. Barboza do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME-UFSC) responsáveis pelos procedimentos com microscópio eletrônico.

Agradeço também os meus colegas da pós-graduação Felipe, Mateus e Sandra pela intensa troca de ideias.

Aos meus amigos de Blumenau, Florianópolis, Londres e outros espalhados pelo mundo por propiciarem momentos que me mantiveram afortunado.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) pela estrutura oferecida para o desenvolvimento do trabalho.

A Deus e anjo da guarda.

De alguma forma, ao cosmos que levou tudo a esse exato instante.

“Somewhere, something incredible is waiting to be known.”

(Carl Sagan, 1934 - 1996)

RESUMO

A eletroporação (EP) é o fenômeno do aumento da permeabilidade da membrana celular quando a célula é exposta a campos elétricos de amplitude acima de dezenas de kV/m e durações de nano segundos a segundos. O aumento da permeabilidade é explicado pela formação de poros na membrana celular. Dependendo da configuração do protocolo aplicado, a membrana plasmática pode se fechar, caracterizando EP reversível, ou pode não se recuperar (processo irreversível e morte celular). As aplicações da EP são: tratamento de câncer, transferência genética, extração de material intracelular e pasteurização. Esse trabalho teve como objetivo desenvolvimento de equipamento para tratamentos por campos elétricos pulsados, estudos de viabilidade celular, alteração de propriedades elétricas e de membrana de células. Foram utilizadas leveduras *Saccharomyces Cerevisiae* como modelo de células tumorais e campos elétricos de 200 a 800 kV/m. O equipamento desenvolvido é um gerador de sinais programável e compatível aos protocolos de EP para tratamento de câncer (ESOPE), transferência genética e extração de conteúdo intracelular. O protótipo suporta diferentes configurações de eletrodos, possui saída variável em tensão (até 800 V e corrente máxima de saída de 12 A) e possui módulo de aquisição de sinais (frequência de aquisição de 200 kHz) de tensão (resolução de < 7 V) e corrente (resolução < 50 mA até 5 A ou resolução < 240 mA até 12 A). O estudo com leveduras concluiu perda de viabilidade e perda da integridade da estrutura celular em protocolos superiores a 300 kV/m. Foram detectados indícios de correlação entre alterações de condutividade e perda de viabilidade celular por eletroporação irreversível. Os estudos com microscopia eletrônica forneceram detalhes que não são percebidos em análises de propriedades elétricas macroscópicas.

Palavras-chave: Eletroporação; Campos Elétricos; Leveduras; Eletroquimioterapia.

ABSTRACT

Electroporation (EP) is the phenomenon of increased cell membrane permeability when the cell is exposed to electric fields of amplitude above tens of kV/m and durations of nanoseconds to seconds. The increase in permeability is explained by the formation of pores at the plasma membrane. Depending on the protocol configuration, the plasma membrane may close, characterizing a reversible electroporation, or it may not recover, causing an irreversible electroporation and cell death. The applications of EP are: cancer treatment, genetic transfer, extraction of intracellular material and pasteurization. The objective of this work was the development of equipment for pulsed electric fields treatments, study of cell viability, changes in electrical and cell membrane properties. Saccharomyces Cerevisiae yeast was used as a model of tumor cells and electric fields from 200 to 800 kV/m were applied. The developed equipment is a programmable signal generator compatible with EP protocols for treatment of cancer (ESOPe), gene transfer and intracellular content extraction. The prototype supports different electrode configurations, has variable voltage output (up to 800 V and maximum output current of 12 A) and has a voltage acquisition module (200 kHz acquisition frequency) (< 7 V resolution) and current (resolution < 50 mA up to 5 A or resolution of < 240 mA up to 12 A). Based on the yeast study loss of viability and loss of cellular structure occurs when protocols are over 300 kV/m. Changes in electrical conductivity and loss of cell viability by irreversible electroporation may be correlated. Electron microscopy study provided details that are not observed in the macroscopic analysis of electrical properties.

Keywords: *Electroporation; Electric Fields; Yeasts Electrochemotherapy.*

ARTIGOS PUBLICADOS E SUBMETIDOS

1. **Pintarelli, G. B.** et al. '*Permeabilization of Wistar Rats Liver Tissue Using Monopolar Pulses – Analysis of The Influence of 1 Hz and 1 kHz Repetition Rate on Electroporation*'. Publicado nos anais do XXV CBEB - Edição Outubro 2016, pp. 321–324.
2. Berkenbrock, J. A., **Pintarelli, G. B.**, Antônio, A. Jr. e Suzuki, D. O. H. (2018), '*In Vitro Simulation of Electroporation Using Potato Model*'. Publicado nos anais do *Canadian Medical and Biological Engineering Conference* – Edição 2017 (CMBEC40).
3. Berkenbrock, J. A., **Pintarelli, G. B.**, Antônio, A. Jr. e Suzuki, D. O. H., '*Verification of Electroporation Models Using the Potato Tuber as In Vitro Simulation*'. Publicado no *Journal of Medical and Biological Engineering* em abril de 2018, doi: 10.1007/s40846-018-0408-8.
4. Heyse, A., **Pintarelli, G. B.** e Suzuki, D. O. H. Electric Field '*Distribution and Electroporation in Discontinuous Regions using Vegetal Model: In vitro and In Silico Study*'. Aceito no XXVI CBEB - Edição Outubro 2018.
5. Guedert, R., **Pintarelli, G. B.**, Antonio, A. Jr. e D. O. H. Suzuki. '*Electrical Field Distribution Study and Novel Metric for Evaluation of Electrode Performance in Electrochemotherapy*'. Aceito no XXVI CBEB - Edição Outubro 2018.
6. **Pintarelli, G. B.**, Antônio, A. Jr. e Suzuki, D. O. H. 'Equipamento para Aplicação de Pulsos de Tensão Elétrica de Amplitude, Período e Forma de Onda Variáveis e Análise de Efetividade para Técnicas de Eletroporação na Transfecção Genética e Tratamento de Neoplasias'. Patente requerida em setembro de 2017 (SINOVA UFSC RPI00060).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Sentido de densidade de corrente por condução e deslocamento de cátions \oplus e ânions \ominus em função de gradiente de potencial elétrico.	39
Figura 2 – Sentido de densidade de corrente por difusão e fluxo de difusão (fluxo de cátions \oplus) em função de gradiente de concentração.	40
Figura 3 – Campo elétrico divergente em torno de uma carga q positiva.	41
Figura 4 – Vista em corte representativa da membrana celular. A bicamada lipídica geralmente impede a passagem de moléculas. Os canais e bombas iônicas facilitam o fluxo de moléculas.	48
Figura 5 – Célula animal simplificada, vista em corte. As indicações denotam exemplos de sistemas subcelulares.	49
Figura 6 – Representação da disposição da estrutura de “redes trançadas” da parede celular sobre a membrana celular.	49
Figura 7 – Modelo elétrico da membrana celular. Onde G_j é a condutância da membrana, V_j é a diferença de potencial iônico, C_m é a capacitância da membrana, G_L é a condutância de fuga através da membrana e V_m o potencial transmembrana.	50
Figura 8 – Representação da indução de cargas elétricas (íons) na membrana celular devido campo elétrico externo. Em (a) uma célula está inserida entre eletrodos e não há campo elétrico aplicado. Em (b) a mesma célula está simplificada. Nesta todo o conteúdo intracelular foi modelado por cargas positivas e negativas (íons). Em (c) um campo elétrico externo é aplicado e ocorre deslocamento dessas cargas até a membrana celular, que é eletricamente isolante.	51
Figura 9 – Tópicos relevantes a respeito da eletroporação.	55
Figura 10 – Ocorrências da palavra “ <i>electroporation</i> ” em qualquer parte de trabalhos científicos de 1985 até 2017. Dados retirados do banco de dados do Google Scholar dia 12 de janeiro de 2018 usando ferramenta disponível em repositório online (GITHUB, 2018).	59
Figura 11 – Quatro principais etapas envolvidas no processo de eletroporação de uma membrana de bicamada lipídica.	61
Figura 12 – Representação da alteração da impedância aparente em função da eletroporação. Ao atingir a região da eletroporação a alteração da corrente deixa de apresentar comportamento linear (ôhmico).	63
Figura 13 – Modelo de célula esférica simples.	66
Figura 14 – Dispositivos encontrados na literatura para realização da eletroporação de célula única.	67

Figura 15 – Ponte entre modelo de alteração de condutividade de célula única para suspensão. (i) Célula com condutividade interna (σi) e condutividade da membrana (σm). (ii) Partícula de condutividade homogênea (σp). (iii) transformação de partícula homogênea (σp) e meio extracelular (σe) para suspensão com condutividade equivalente (σeq).	69
Figura 16 – Dispositivo tipo ‘cubeta’ para realização de eletroporação em suspensão celular.	70
Figura 17 – Tipos de eletrodos compreendidos pelo padrão ESOPE. (a) Eletrodo de placas paralelas. (b) Eletrodo de agulhas paralelas. (c) Eletrodos de matriz hexagonal.	72
Figura 18 – Mapa dos efeitos em célula devido aplicação de campos elétricos externos. O mapa mostra resultados em função da duração e amplitude de campo elétrico.	73
Figura 19 – Esquemático representativo dos blocos do eletroporador..	81
Figura 20 – Modelos de regressão linear utilizados para calibração do sistema de aquisição de dados. (a) Modelo aquisição de tensão. (b) Modelo aquisição de corrente (até 5 A). (c) Modelo aquisição de corrente (até 12 A).	84
Figura 21 – Exemplo de estrutura de dados criada no cartão SD do eletroporador.	86
Figura 22 – Eletroporadores observados. À esquerda Neon® Transfection System. À direita VetCP 125®.	90
Figura 23 – Protótipos eletroporador desenvolvidos e montados durante essa dissertação. (a) Eletroporador para aplicações de tensão até 120 Volts com ajuste fino de tensão. (b) Eletroporador para aplicações até 800 Volts sem ajuste fino de tensão.	93
Figura 24 – Demonstração de aplicação de pulso de 100 μs em carga de 46,58 + j.1,43 Ω . A amplitude foi variada de (a) 100 até (h) 800 V em passos de 100 V.	94
Figura 25 – Demonstração de tempos de subida e descida em pulso de 100 μs e 800 Volts em carga de 46,58 + j.1,43 Ω . (a) Tempos de subida t_s e t_s' . (b) Tempos de descida t_d e t_d'	95
Figura 26 – Em (a) pulso com duração de 10 μs (valor mínimo possível). (b) Pulso com duração de 1 ms (valor máximo possível). (c) Trem de oito pulsos de 100 μs (valor máximo possível de acordo com protocolo ESOPE).	96
Figura 27 – (a) Aplicação de 390 Volts em modelo de tecido vegetal (batata). A batata é um modelo visual da eletroporação, as áreas de eletroporação são visualizadas conforme marcado por círculos vermelhos	

em (b). Estudo publicado pelo autor (BERKENBROCK <i>et al.</i> , 2018b).	97
Figura 28 – Estudo de viabilidade celular de células Sertoli <i>in vitro</i> aderentes com marcador Trypan Blue em função da amplitude do protocolo de eletroporação. (a) Células viáveis (sem marcação azul) anteriores da aplicação de protocolo de eletroporação. (b) Aplicação de protocolo de oito pulsos de 70 kV/m e 100 μ s. Nesse caso as células são coradas em azul, portanto não são viáveis de acordo com a metodologia. Observa-se que as imagens não são nas mesmas regiões.	97
Figura 29 – Colônias de levedura <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> (CCT 0761, ATCC 36900) à esquerda. À direita, estas estão inoculadas em meio YPD.	101
Figura 30 – Leveduras preparadas e dispostas em lâmina de microscópio ótico Biofocus (BIO1600BA).	101
Figura 31 – (a) Leveduras controle viáveis. (b) Leveduras foram submetidas ao protocolo de 500 kV/m, essas não estão viáveis (morte celular).	102
Figura 32 – Representação da câmara de Neubauer. As letras A, B, C, D e E indicam as cinco regiões que são utilizadas para contagem. Foi ampliado uma fotografia da região “C”. As dimensões são indicadas na figura.	103
Figura 33 – Processo do experimento de contagem da viabilidade. (A) Solução de ensaio; (B) Solução de ensaio agitada manualmente; (B) 40 μ L retirados da solução de ensaio; (D) Estes 40 μ L são colocados com micropipeta entre os eletrodos; (E) Aplicação de um protocolo de eletroporação; (F) Remoção do conteúdo entre eletrodos; (G) Conteúdo adicionados na câmara de Neubauer. O excedente foi descartado; (H) Aguarda-se 5 minutos e inicia-se a contagem no número de células vivas e mortas.	104
Figura 34 – JEOL® JSM-6390LV do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC.	105
Figura 35 – Amostras preparadas para microscopia eletrônica.	106
Figura 36 – Amostras recobertas em ouro em <i>stubs</i> . Preparação necessária para análise com JEOL® JSM-6390LV.	106
Figura 37 – Protocolo aplicado: oito pulsos de 100 μ s e taxa de repetição de 1 Hz.	106
Figura 38 – À esquerda duas projeções dos eletrodos. Ao centro os eletrodos construídos e medição com paquímetro da abertura da distância entre placas. À direita eletrodos com solução.	108
Figura 39 – Viabilidade celular em função da amplitude do protocolo de eletroporação aplicado (N = 5).	111

Figura 40 – Viabilidade Celular em função do tempo decorrido do experimento (N = 5).....	112
Figura 41 – Compilado de controle e de todos os protocolos de campo elétrico ensaiados.	113
Figura 42 – Compilado idêntico ao da Figura 41. Porém com marcações de regiões de detritos e morte celular em vermelho e outras observações.	114
Figura 43 – Porcentagem de detritos por protocolo. As marcações de regiões de detritos e morte celular são disponíveis na Figura 42 (regiões marcadas em vermelho).	115
Figura 44 – Observação sobre método de preparo da amostra biológica para análise por microscopia eletrônica. (a) Sem remoção do meio YPD. (b) Com remoção do meio YPD (processo de lavagem).....	115
Figura 45 – Outros detalhamentos da aplicação de 250 e 300 kV/m. .	116
Figura 46 – Alteração de temperatura após aplicação de potenciais de eletroporação em meio puro YPD (denotado no eixo x por “YPD”) e meio YPD com leveduras (denotado no eixo x por “LEV”).....	117
Figura 47 – Alteração de impedância antes e depois da aplicação de protocolos de eletroporação em meio YPD puro. Em verde são curvas anteriores a aplicação e em vermelho curvas após a aplicação. As curvas representam 50 % dos dados. (a) Parte real da impedância. (b) Parte imaginária da impedância.	118
Figura 48 – Alteração de impedância antes e depois da aplicação de protocolos de eletroporação em meio YPD com células. Em verde são curvas anteriores a aplicação e em vermelho curvas após a aplicação. As curvas representam 50 % dos dados. (a) Parte real da impedância. (b) Parte imaginária da impedância.	119
Figura 49 – Alterações de impedância antes e depois da aplicação da eletroporação.....	120
Figura 50 – Alteração de corrente normalizada em função do número do pulso. “YPD” denota aplicações com meio YPD puro (sem células) e “LEV” denota meio com células. No eixo “x” é indicado o número do pulso (1 a 8).	121
Figura 51 – Quantificação da alteração de corrente entre primeiro e último pulso, percebida na Figura 50. São mostrados alteração de (a) maneira agrupada (barra), (b) pontos individuais e na (c) sequência experimental (linhas ligando pontos individuais).	123
Figura 52 – Dados de impedância combinados. (a) Meio sem células. (b) Meio com células.	125

Figura 53 – Análise das curvas da Figura 52 por regressão linear. (a) Valor de inclinação da regressão linear. (b) Valor de <i>offset</i> da regressão linear.	125
Figura 54 – Correlação de dados de alteração de corrente (iguais aos da Figura 51) com os de viabilidade celular (iguais aos da Figura 39) em função do campo elétrico.	126
Figura 55 – Tentativa de leitura de potencial transmembrana de levedura.	132
Figura 56 – Resíduo presente em leituras de tensão. Pior caso é de -7,5 V.	159
Figura 57 – Resíduo presente em leituras de corrente. (i) Resíduos para leitura de corrente com escala de até 5 A (pior observação de resíduo foi de 0,048 A); (ii) Resíduos para leitura de corrente com escada de 12 A (pior observação de resíduo foi de 0,250 A).	160
Figura 58 – Pulso de 100 μ s em janela de tempo de 5 ms.	161
Figura 59 – Espectro unilateral do protocolo ESOPE.	162
Figura 60 – Distribuição de potências do protocolo ESOPE para três grupos de frequências.	162
Figura 61 – À esquerda imagem obtida através de microscópio óptico Biofocus (BIO1600BA). À direita resultado da detecção do software projetado. Os círculos azuis demonstram detecção de 783 leveduras.	165
Figura 62 – Histograma do raio médio de leveduras analisadas nessa dissertação. A linha em vermelho indica uma curva compatível aos dados, obtida com Matlab.	166
Figura 63 – <i>Box plot</i> do raio médio de leveduras analisadas nessa dissertação.	166

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Coeficientes a e b do modelo de regressão para calibração das leituras de tensão e corrente.	84
Tabela 2 – Parâmetros para cálculo analítico da temperatura.	109
Tabela 3 – Condutividades nas situações experimentais.	110
Tabela 4 – Teste <i>post-hoc</i> de grupos da Figura 39.	111
Tabela 5 – Teste <i>post-hoc</i> de grupos de “YPD” da Figura 51c.	122
Tabela 6 – Teste <i>post-hoc</i> de grupos de “LEV” da Figura 51c.	122
Tabela 7 – Palavras-chave relacionadas ao presente invento (palavras-chaves utilizadas na busca de anterioridade).	153
Tabela 8 – Busca de anterioridade em bases de patente que influenciem no requisito novidade e/ou que possam ser utilizados como modelo para a descrição do invento proposto.	153

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Sigla	Descrição
SI	Sistema Internacional de Unidades (<i>Système Internationale d'Unités</i>)
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
IEB-UFSC	Instituto de Engenharia Biomédica da UFSC
SINOVA-UFSC	Secretaria de Inovação da UFSC
LCME-UFSC	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
IEC	Comissão Internacional Eletrotécnica (<i>International Electrotechnical Commission</i>)
PEF	Campos Elétricos Pulsados (<i>Pulsed Electric Fields</i>)
PEMF	Campos Eletromagnéticos Pulsados (<i>Pulsed Electromagnetic Fields</i>)
EP	Eletroporação ou Eletropermeabilização
BEP	Eletroporação de Células em Suspensão (<i>Bulk Electroporation</i>)
SCEP	Eletroporação de Célula Única (<i>Single Cell Electroporation</i>)
LSCMEP	Eletroporação Localizada de Membrana de Célula Única (<i>Localized Single Cell Membrane Electroporation</i>)
BLM	Membrana de Bicamada Lipídica (<i>Bilayer Lipid Membrane</i>)
IRE	Ablação Não Térmica ou Eletroporação Irreversível (<i>Irreversible Electroporation</i>)
ECT	Eletroquimioterapia (<i>Electrochemotherapy</i>)
ESOPE	Norma Europeia para Procedimentos de Eletroquimioterapia (<i>European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy</i>)
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DC	Corrente Contínua (<i>Direct Current</i>)
AC	Corrente Alternada (<i>Alternating Current</i>)
HVDC	Alta Tensão Contínua, acima de 100 V (<i>High Voltage Direct Current</i>)
μ C	Microcontrolador
IGBT	Transistor Bipolar de Porta Isolada (<i>Insulated-Gate Bipolar Transistor</i>)
TC	Transformador de Corrente
DBS	Estimulação Cerebral Profunda (<i>Deep Brain Stimulation</i>)
SD	Cartão de Memória tipo <i>Secure Digital</i>
ESD	Descargas Eletrostáticas (<i>Electrostatic Discharge</i>)

EMC

Compatibilidade Eletromagnética (*Electromagnetic
Compatibility*)

EMI

Interferência Eletromagnética (*Electromagnetic Interference*)

ANVISA

Agência Nacional de Vigilância Sanitária

LISTA DE SÍMBOLOS

Símbolo	Descrição	Unidade
q	Carga Elétrica	Coulomb (C)
\vec{F}	Força	Newton (N)
r	Distância (Raio de Célula Esférica)	Metros (m)
Q	Energia	Joule (J)
t	Tempo	Segundos (s)
V	Potencial Elétrico	Volt (V)
I	Corrente Elétrica	Ampère (A)
\vec{E}	Campo Elétrico (Vetorial)	V/m
E	Módulo do Vetor Campo Elétrico	V/m
\vec{H}	Campo Magnético	A/m
μ	Permeabilidade Magnética	Henry/m (H/m)
ε	Permissividade Elétrica	Farad/m (F/m) ou C ² /N.m ²
σ	Condutividade Elétrica	Siemens por metro (S/m)
\vec{D}	Indução Elétrica ou Densidade de Fluxo Elétrico	C/m ²
\vec{J}	Densidade de Corrente Elétrica	A/m ²
ρ	Densidade Volumétrica de Carga	C/m ³
V_m	Tensão diferencial transmembrana	Volt (V)
t_s	Tempo de subida de 10 % a 90 %	s
t_d	Tempo de descida de 10 % a 90 %	s
t'_s	Tempo de subida de 10 % até término de transitório	s
t'_d	Tempo de descida de 10 % até término de transitório	s

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	33
1.1	ESTRUTURA DO TRABALHO	34
1.2	OBJETIVOS	34
1.2.1	Objetivo geral	34
1.2.2	Objetivos específicos	34
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	37
2.1	GRANDEZAS ELETROMAGNÉTICAS APLICÁVEIS	37
2.1.1	Cargas Elétricas	38
2.1.2	Cargas Iônicas	38
2.1.2.1	Eletrólitos	38
2.1.3	Mecanismos de Condução	39
2.1.3.1	Correntes Iônicas.....	39
2.1.4	Campo Elétrico.....	41
2.1.5	Campo Magnético	42
2.1.6	Caracterização de Materiais Biológicos	42
2.1.6.1	Condutividade Elétrica.....	43
2.1.6.2	Permissividade Elétrica.....	43
2.1.6.3	Efeitos Dielétrico do Material Biológico	44
2.1.6.3.1	<i>Polarização e Relaxação.....</i>	<i>44</i>
2.1.6.3.2	<i>Dispersão</i>	<i>45</i>
2.2	EFEITO TÉRMICO DA CORRENTE ELÉTRICA.....	45
2.2.1	Efeito Joule e Aquecimento	45
2.2.1.1	Dano Térmico em Materiais Biológicos	46
2.3	INTERAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS E CÉLULAS BIOLÓGICAS.....	47
2.3.1	A Célula e a Membrana Celular	47
2.3.1.1	Características Elétricas da Membrana Celular.....	50
2.3.2	Célula Imersa em um Campo Elétrico Externo	51

2.3.3	Eletromanipulação de Células	52
2.3.3.1	Efeitos de Indução de Potencial Transmembrana	52
2.3.3.2	Eletrocinética	52
3	ELETROPORAÇÃO.....	55
3.1	DEFINIÇÃO.....	55
3.2	HISTÓRICO.....	56
3.3	FENÔMENO DE FORMAÇÃO DO PORO	59
3.3.1	Considerações da Observação da Eletroporação.....	61
3.4	ALTERAÇÕES DE PROPRIEDADES ELÉTRICAS	62
3.5	NÍVEL DO TRATAMENTO	64
3.5.1	Célula Isolada ou Única.....	64
3.5.1.1	Histórico	65
3.5.1.2	Modelo e Alteração do Potencial Transmembrana	66
3.5.1.3	Dispositivos	67
3.5.2	Pequenas Populações Celulares	67
3.5.2.1	Histórico	68
3.5.2.2	Modelos	68
3.5.2.3	Dispositivos	69
3.5.3	Tecido.....	70
3.5.3.1	Histórico	70
3.5.3.2	Modelos	71
3.5.3.3	Dispositivos	71
3.6	ELETROPORAÇÃO APLICADA.....	72
3.6.1	Transferência Genética	73
3.6.2	Tecnologia <i>Lab on a Chip</i>	74
3.6.3	Tratamento de Câncer.....	75
3.6.3.1	Eletroquimioterapia	75
3.6.3.2	Ablação Não Térmica	76
3.6.4	Pasteurização.....	76

3.6.5	Extração de Materiais Intracelulares.....	77
4	SISTEMA PARA APLICAÇÃO DE PULSOS DE TENSÃO ELÉTRICA PARA TÉCNICAS DE ELETROPORAÇÃO	79
4.1	INTRODUÇÃO	79
4.2	PROJETO ELETRÔNICO ELETROPORADOR	80
4.2.1	Sistema de Aquisição de Sinais	82
4.2.1.1	Condicionamento do Sinal Analógico e Conversão Digital..	82
4.2.1.2	Calibração	83
4.2.1.3	Armazenamento Digital de Dados	85
4.2.2	Segurança em Equipamentos Médicos.....	87
4.2.2.1	Segurança Elétrica.....	87
4.2.2.1.1	<i>Compatibilidade Eletromagnética</i>	<i>88</i>
4.2.2.2	Segurança Sanitária.....	89
4.3	INTERFACE E GABINETE DO PROTÓTIPO.....	89
4.4	RESULTADOS.....	91
4.5	CONCLUSÃO	98
5	ESTUDO DE VIABILIDADE E ALTERAÇÃO DE IMPEDÂNCIA EM LEVEDURAS SACCHAROMYCES CEREVISIAE SOB APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS....	99
5.1	INTRODUÇÃO	99
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS	100
5.2.1	Experimento In Vitro.....	100
5.2.1.1	Preparação da Suspensão de Células.....	100
5.2.1.2	Viabilidade Celular	101
5.2.1.2.1	<i>Contagem Celular</i>	<i>102</i>
5.2.1.2.2	<i>Procedimento Experimental de Viabilidade Celular</i>	<i>103</i>
5.2.1.3	Estudo com Microscopia Eletrônica	104
5.2.1.3.1	<i>Procedimento Experimental de Imagens por Microscopia Eletrônica.....</i>	<i>105</i>
5.2.1.4	Eletroporador	106

5.2.1.5	Estudo de Impedância Elétrica.....	107
5.2.1.5.1	<i>Alteração da Impedância Antes e Após Eletroporação</i>	<i>107</i>
5.2.1.5.2	<i>Alteração da Impedância Durante os Pulsos de Eletroporação</i> <i>107</i>	
5.2.1.6	Eletrodos	107
5.2.1.7	Monitoramento de Variações de Temperatura.....	108
5.2.1.7.1	<i>Cálculo Analítico</i>	<i>109</i>
5.2.1.7.2	<i>Procedimento de Medição Experimental.....</i>	<i>109</i>
5.2.1.8	Diferenciação estatística	109
5.2.1.9	Condutividade da Solução com Leveduras com Condutímetro	110
5.3	RESULTADOS	110
5.3.1	Densidade e Viabilidade Celular	110
5.3.2	Estudo por Microscopia Eletrônica.....	112
5.3.3	Monitoramento de Variações de Temperatura	116
5.3.4	Alteração de Impedância.....	117
5.3.5	Resultados Compilados	126
5.4	DISCUSSÃO	126
5.4.1	Análise de Viabilidade Celular	126
5.4.1.1	Considerações Azul de Metileno	127
5.4.2	Hipóteses de Erros Associados a Densidade Celular	128
5.4.3	Análise de Imagens por Microscopia Eletrônica.....	129
5.4.4	Alteração de Impedância.....	129
5.4.4.1	Análise com Analisador de Impedância.....	129
5.4.4.2	Análise Durante Aplicação de Campo Elétrico	131
5.4.4.3	Estudo da Alteração de Potencial Transmembrana.....	132
5.5	TRABALHOS FUTUROS	133
5.6	CONCLUSÃO.....	133
	REFERÊNCIAS.....	135

APÊNDICE A – Busca por anterioridade do invento....	153
APÊNDICE B –Segurança do Equipamento e Classificação	155
APÊNDICE C – Diagnóstico de Gráficos Básico (Resíduos) no Modelo de Regressão do Sistema de Aquisição	159
APÊNDICE D – Espectro de Frequência Protocolo ESOPE	161
APÊNDICE E – Desenvolvimento Analítico da Equação de Alteração de Temperatura	163
APÊNDICE F – Avaliação Raio Médio Leveduras	165

1 INTRODUÇÃO

É irrefutável a dependência de energia sob forma de eletricidade dos seres humanos e sociedades. O domínio sobre tecnologias de obtenção, armazenamento e conversão desse tipo de energia permitiram que os humanos aumentassem seu conforto, vivessem mais e aumentassem seus números (LAMBERT *et al.*, 2013).

Na área da saúde, a tecnologia é uma peça fundamental para aumentar a qualidade de vida contínua de todas as faixas etárias. A tecnologia é uma ferramenta catalisadora que pode transformar rapidamente a qualidade da saúde e da prática da medicina. Igualmente, qualquer tecnologia para minimizar a perda de vidas humanas e/ou melhorar a qualidade de vida tem um valor inestimável.

Finalmente, o conhecimento da ciência e os estudos atuais de técnicas, processos, métodos, meios e instrumentos definirão as novas tecnologias do futuro. O fenômeno discutido, eletroporação (ou eletropermeabilização), pode ser empregado em áreas de saúde e biotecnologia. A técnica aprimora ou é mais eficiente que técnicas e métodos tradicionais. Por exemplo, na transferência genética, a eletroporação permite aplicação em maior gama de situações (diferentes níveis e características celulares); no tratamento de câncer, a eletroporação combinada com quimioterapia melhora qualidade do tratamento; na pasteurização, a eletroporação permite conservar propriedades dos alimentos, que podem ser alteradas com pasteurização térmica; e em extração de materiais intracelulares, a eletroporação permite extração em menores tempos. Por causa dessas razões, o tema é promissor e com forte impacto social. Estes motivam o desenvolvimento deste trabalho.

A eletroporação ocorre em função de parâmetros do campo elétrico, por exemplo, amplitude. O estudo e aplicação da eletroporação necessita de equipamento eletroporador. O eletroporador é um equipamento com saída de pulsos de tensão na ordem de centenas de Volts e corrente na ordem de dezenas de Amperes. O eletroporador necessita de eletrodos para aplicação de campos elétricos em amostras biológicas. Existem protocolos de eletroporação padronizados, por exemplo, o ESOPE (“*Standard Operating Procedures Of The Electrochemotherapy*”) para tratamentos de câncer por eletroquimioterapia (GEHL *et al.*, 2018; MIR *et al.*, 2006).

A eletroporação geralmente é realizada em meios biológicos. Na prática científica, muitas vezes são necessárias alternativas ao uso de animais ou sistemas complexos, para ensaios de novos métodos e

equipamentos. As leveduras são células de rápido crescimento, baixo custo e fácil manipulação quando comparadas a células animais. Por causa desses motivos, oferecem vantagens para prática científica. As leveduras são utilizadas como células modelo de câncer (MATUO *et al.*, 2012). Além de aplicação no meio científico, as leveduras são importantes em processos industriais, em geral relacionadas com bioprocessos e fermentação.

1.1 ESTRUTURA DO TRABALHO

Essa dissertação de mestrado está dividida em 5 capítulos. O capítulo 2 e 3 são teóricos. Os capítulos 4 e 5 compõem estudos independentes de desenvolvimento de dispositivo eletrônico e sua aplicação.

Capítulo 2: Fundamentação Teórica – Capítulo teórico de fundamentação básica de eletromagnetismo e eletricidade aplicada à estudos com meios biológicos.

Capítulo 3: Eletroporação – Capítulo de revisão da eletroporação.

Capítulo 4: Sistema para Aplicação de Pulsos de Tensão Elétrica para Técnicas de Eletroporação – Capítulo de desenvolvimento do sistema eletroporador utilizado nos ensaios.

Capítulo 5: Estudo de Viabilidade e Alteração de Impedância em Leveduras *Saccharomyces Cerevisiae* sob Aplicação de Campos Elétricos – Capítulo de estudo de eletroporação em *S. Cerevisiae*.

1.2 OBJETIVOS

São listados os seguintes objetivos gerais e específicos.

1.2.1 Objetivo geral

Desenvolver eletroporador compatível aos ensaios de pesquisas em eletroporação da UFSC e realizar testes *in vitro* com células.

1.2.2 Objetivos específicos

Para atingir os objetivos, é necessário a contemplação de alguns objetivos específicos:

- Desenvolver circuito para chaveamento de tensão elétrica em amplitude variável até 800 Volts e de tempo de 100 μ s (compatíveis com padrão ESOPE);
- Desenvolver configuração de eletrodos para produção de campos elétricos da ordem de centenas de quilovolts por metro compatíveis com amostras de suspensões de células (volume na ordem de dezenas de microlitros);
- Desenvolver método e circuito para aquisição de tensão e corrente compatíveis ao circuito de chaveamento desenvolvido;
- Aplicar métodos para análise de propriedades elétricas antes, durante e depois dos tratamentos por eletroporação;
- Preparar amostras biológicas (leveduras *Saccharomyces Cerevisiae*). Listam-se: preparação de meios de cultura, inoculação celular e preparação de suspensões para ensaios (eletroporação e microscopia);
- Realizar ensaios relacionados a integridade celular. Listam-se: ensaio de viabilidade celular (com marcador azul de metileno), contagem celular (com câmara de Neubauer e ensaio de análise de integridade e destruição celular (com técnica de microscopia eletrônica);
- Realizar experimentos, aplicando campos elétricos pulsados em suspensão de células *Saccharomyces Cerevisiae* in vitro.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

A eletroporação ocorre em função da indução de potencial transmembrana¹ celular e este geralmente é alcançado por meio de aplicação de campos elétricos pulsados (ver seção 2.3.2). Campos elétricos (PEF) e eletromagnéticos pulsados (PEMF) podem ser obtidos com variação de tensão elétrica (geralmente pulsada) em eletrodos. A partir dessa reflexão, é evidente a necessidade da compreensão de eletromagnetismo, eletricidade e biologia para pesquisar eletroporação. Por causa disso, foram separados tópicos que dizem a respeito das grandezas eletromagnéticas relacionadas ao trabalho (seção 2.1), efeitos da passagem de corrente elétrica (seção 2.2) e interação de campos elétricos com células biológicas (seção 2.3).

2.1 GRANDEZAS ELETROMAGNÉTICAS APLICÁVEIS

Nessa seção são apresentadas as grandezas do eletromagnetismo bem como discussão da condução de eletricidade em soluções iônicas e meios biológicos (GRIMNES; MARTINSEN, 2014). Ressalta-se:

- As equações de Maxwell descrevem como os campos elétricos e magnéticos existem, ou seja, como se distribuem, que configurações podem assumir e que fenômenos podem dar origem a eles (BASTOS, 2004; “Maxwells Equations”, 2018). Os conceitos de eletromagnetismo são brevemente discutidos nessa dissertação;
- O estudo de características e propriedades elétricas passivas de materiais biológicos é chamado de bioimpedância. Esse tipo de compreensão é necessário para explicar a distribuição de campos eletromagnéticos nesses meios;
- Diferente da maioria dos aparatos tecnológicos, onde a condução de eletricidade é exclusivamente realizada pela circulação de elétrons em semicondutores, nos meios biológicos é comum a existência de condução iônica. Esse mecanismo de condução é diferente dos semicondutores.

¹Potencial transmembrana é a diferença de potencial entre dentro e fora da célula. Em repouso nomeia-se potencial de repouso, que é em torno de -70 mV.

2.1.1 Cargas Elétricas

Primeiramente, a carga elétrica é uma propriedade intrínseca das partículas fundamentais. As cargas elétricas são conservadas em um sistema (conservação da carga elétrica) e podem ser quantizadas em Coulombs (C, SI). As partículas fundamentais são elétrons (negativos), prótons (positivos) e nêutrons (sem carga).

Quando cargas elétricas coexistem, essas estão sujeitas às forças elétricas (forças eletrostáticas), que pode ser de repulsão ou atração. O módulo da força elétrica (N, SI) é descrito pela Lei de Coulomb (equação não presente nesse trabalho).

2.1.2 Cargas Iônicas

Em meios biológicos, como no meio intracelular e extracelular de células biológicas, é comum a existência de íons. Os íons são moléculas ou átomos eletricamente carregados (geralmente devido à perda ou ganho de elétrons). Por exemplo, Na^+ , Cl^- , K^+ , HPO_4^{2-} e SO_4^{2-} (GRIMNES; MARTINSEN, 2014).

Os íons são classificados em dois tipos dependendo de sua carga. Os positivos (número de prótons maior que o de elétrons) são nomeados cátions. Os negativos (número de elétrons maior que o de prótons) são nomeados ânions.

Os íons diluídos em meio aquoso são propensos a se deslocarem de acordo com o campo elétrico (situação comum em meios biológicos). Por conseguinte, podem contribuir para o fluxo de corrente elétrica, ou seja, dá a essa solução aquosa a propriedade de conduzir eletricidade. O mecanismo de condução iônico é diferente dos semicondutores, estes operam com deslocamento de elétrons.

2.1.2.1 Eletrólitos

Os eletrólitos, também chamados “condutores iônicos”, são substâncias, que por dissociação ou ionização, podem conter íons. A mobilidade iônica possibilita condução de eletricidade. Por exemplo, a dissociação de NaCl em meio aquoso origina íons positivos Na^+ e negativos Cl^- (equação 1). Esses íons são comuns em meios biológicos (GRIMNES; MARTINSEN, 2014).



2.1.3 Mecanismos de Condução

O mecanismo de condução em eletrólitos é diferente dos semicondutores (e materiais elétricos). Esses mecanismos ocorrem das seguintes maneiras:

- Nos semicondutores, o princípio de condução inclui deslocamento de elétrons livres em espaços pré-dispostos a recebê-los, chamados de lacunas (*holes*);
- Nos eletrólitos, a condução elétrica ocorre a partir do deslocamento de íons negativos e positivos (corrente de condução iônica).

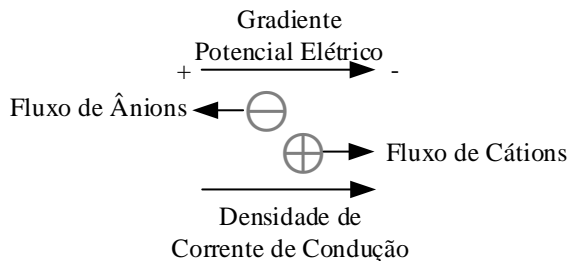
2.1.3.1 Correntes Iônicas

A corrente iônica pode ser composta por duas componentes, são essas:

- Corrente de condução iônica: movimento iônico em função de gradiente de potencial elétrico (ou vetor campo elétrico);
- Corrente de difusão iônica: movimento iônico em função de gradiente de concentração iônico.

A orientação do fluxo iônico por condução é de acordo com o vetor campo elétrico, enquanto o sentido do fluxo depende da polaridade do íon. O fluxo de cátions é no sentido do campo elétrico, já o fluxo de ânions é oposto ao campo. O processo de condução e densidade de corrente é representado na Figura 1. A densidade de corrente é em função da condutividade da solução (discutido na seção 2.1.6.2).

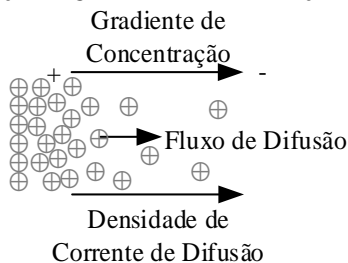
Figura 1 – Sentido de densidade de corrente por condução e deslocamento de cátions \oplus e ânions \ominus em função de gradiente de potencial elétrico.



Fonte: Próprio autor.

O fluxo por difusão tem orientação e o sentido que segue a região de alta concentração para a região de baixa concentração de determinada partícula. Esse fenômeno é decorrência da tendência de homogeneização de concentração do sistema. O fluxo por difusão é em função do gradiente de concentração, que é descrito pela lei de Fick (equação não apresentada nesse trabalho). Partículas carregadas resultam em densidade de corrente de difusão, como na Figura 2. Apesar disso, o fenômeno de difusão pode ocorrer para partículas não carregadas, nesse caso não há corrente de difusão.

Figura 2 – Sentido de densidade de corrente por difusão e fluxo de difusão (fluxo de cátions \oplus) em função de gradiente de concentração.



Fonte: Próprio autor.

Além dos gradientes de potencial elétrico e concentração, a corrente iônica depende de propriedades iônicas (mobilidade, concentração e carga). A densidade de corrente iônica (componentes de condução e difusão) é descrita pela equação de Nernst-Planck (equação não apresentada nesse trabalho). Essa equação pode ser derivada das leis de Ohm e Fick (GRIMNES; MARTINSEN, 2014).

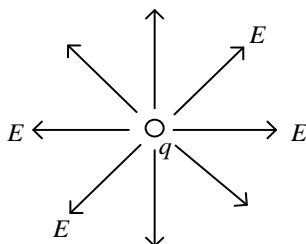
Os fenômenos de condução e difusão são relevantes para a eletroporação. Durante a eletroporação ocorre aumento da permeabilização da membrana celular e da condutividade da amostra. Apesar disso, esses eventos não são completamente correlacionados. A difusão pode explicar o aumento de permeabilização e transporte de moléculas com e sem carga pela membrana, que geralmente é importante para as aplicações da eletroporação. A condução pode explicar o aumento da condutividade da amostra e parte do transporte de moléculas carregadas pela membrana. A alteração de condutividade da amostra acarreta em alterações significativas de distribuição de campo elétrico e é a maneira que um equipamento eletroporador “enxerga” uma amostra,

portanto seus registros e modelos possuem importância (PAVLIN *et al.*, 2005; PAVLIN; LEBEN; MIKLAVČIČ, 2007; SEL *et al.*, 2005).

2.1.4 Campo Elétrico

O campo elétrico é um campo vetorial existente em todos os pontos do espaço, de maneira divergente, em torno de um objeto eletricamente carregado, como informado pela lei de Gauss (primeira equação de Maxwell, equação 2). Por exemplo, o campo elétrico em torno de uma partícula de carga q positiva é divergente, conforme a Figura 3. Se uma carga elétrica ou um íon está inserido em um campo elétrico, essa estará sujeita a uma força elétrica, que pode ser de atração ou repulsão.

Figura 3 – Campo elétrico divergente em torno de uma carga q positiva.



Fonte: Figura adaptada de Bastos (BASTOS, 2004).

$$\nabla \cdot \vec{D} = \rho \quad (2)$$

Onde \vec{D} (C/m^2) é a densidade de fluxo elétrico (ou indução elétrica) e ρ é a densidade de carga volumétrica (C/m^3). A relação \vec{D} com campo elétrico é explanada pela equação 5.

Apesar da unidade do campo elétrico no SI ser Newton por Coulomb (N/C, SI), por conveniência iremos utilizar em todo esse trabalho Volts por metro (V/m). Esta unidade é usual em trabalhos de eletroporação. Além disso, é conveniente, porque o valor aproximado de campos elétricos (ou módulo do campo elétrico) entre eletrodos é a razão da amplitude da tensão elétrica aplicada em Volts, e distância entre eletrodos em metros, conforme equação 3 (PAVLIN; LEBEN; MIKLAVČIČ, 2007; PINTARELLI *et al.*, 2016; VOYER *et al.*, 2018). Nota-se que 1 V/m é igual à 1 N/C.

$$E = \frac{V_{ap}}{d} \quad (3)$$

Onde V_{ap} é a tensão aplicada entre eletrodos, d a distância entre eletrodos e E o módulo do campo elétrico entre eletrodos.

2.1.5 Campo Magnético

O campo magnético (\vec{H}) é um campo vetorial criado por cargas com velocidade de deslocamento. Geralmente esse tipo de situação é visto no deslocamento de elétrons em fios condutores. Compreende-se esse fenômeno utilizando a lei de Ampère (quarta equação de Maxwell, não apresentada nesse trabalho).

O campo magnético também pode ser criado por ímãs permanentes ou variações de campos elétricos (lei de Faraday ou terceira equação de Maxwell, não apresentada nesse trabalho). Destaca-se a dependência de campo magnético e campo elétrico, e pode-se realizar a seguinte interpretação: a variação do campo magnético no tempo dá origem a um campo elétrico, bem como o contrário. A unidade Ampere por metro (A/m, SI) é utilizada para campos magnéticos.

Alguns autores sugerem a aplicação de Campos Eletromagnéticos Pulsados (PEMF) ou estáticos em conjunto ou não com Campos Elétricos Pulsados (PEF). Há indícios que PEMF tem efeitos similares aos PEF. O uso de PEMF, também referido como “magnetoporação”, possui vantagem de não necessitar eletrodos em contato com a amostra. Porém, requer uso de campos magnéticos na ordem de Tesla. Os campos magnéticos decorrentes de campos elétricos aplicados nesse trabalho não produzem efeitos perceptíveis e foram desconsiderados. Esse procedimento é comum na literatura (KARDOS; RABUSSAY, 2012; MARKOVSKAJA *et al.*, 2014; NOVICKIJ *et al.*, 2016).

2.1.6 Caracterização de Materiais Biológicos

Materiais biológicos possuem características condutiva e capacitiva expressivas. Por isso geralmente são caracterizados em dois parâmetros (IVORRA, 2002):

- A condutividade elétrica: proporcional a componente resistiva (real) do material;
- A permissividade elétrica: proporcional a componente reativa (imaginária) do material.

A permeabilidade magnética (μ) não é abordada nesse trabalho, devido a mesma não ser expressiva em dielétricos como materiais biológicos.

Observa-se que no processo de caracterização de materiais biológicos deve-se observar efeitos de dielétricos: polarização, relaxação e dispersão. Esses efeitos podem ser separados com análise em amplo espectro de frequência (DC até centenas de mega-hertz). No caso de tecidos, pode ser observado estruturas não uniformes (heterogeneidade) e propriedades desiguais nas direções (anisotropia).

Os estudos da eletroporação comumente preocupam-se em descrever a alteração de propriedades elétricas (geralmente condutividade) em função de características do protocolo aplicado. Esses podem ser conduzidos para diferentes níveis de aplicação (de membrana celular até tecido celular). A alteração da condutividade em função da eletroporação tem efeito significativo na distribuição de densidade de corrente, que é relacionada diretamente com a distribuição de campo elétrico e estado da membrana celular (BERKENBROCK *et al.*, 2018a; LANGUS *et al.*, 2016; SEL *et al.*, 2005).

2.1.6.1 Condutividade Elétrica

Condutividade elétrica (σ) expressa a facilidade da passagem de correntes elétricas no material. Sua unidade no SI é Siemens por metro (S/m). Esse é um dos parâmetros responsáveis para separação de materiais supercondutores, condutores, semicondutores e isolantes. Os eletrólitos possuem condutividade próxima aos semicondutores (valores na faixa de 10^{-7} a 10 S/m).

Independente do mecanismo de condução, se a condutividade do material for diferente de zero, então um campo elétrico (\vec{E}) aplicado localmente irá induzir uma densidade de corrente elétrica ou condução iônica (\vec{J}). Esse fenômeno é descrito pela lei de Ohm (equação 4). A condutividade em eletrólitos é em função da concentração iônica, dissociação iônica (coeficiente de dissociação), mobilidade iônica e temperatura (GRIMNES; MARTINSEN, 2014).

$$\vec{J} = \sigma \vec{E} \quad (4)$$

2.1.6.2 Permissividade Elétrica

A permissividade elétrica (ϵ) explica como um meio se polariza em função de um campo elétrico, ou seja, a facilidade de formar um

campo elétrico no meio (facilidade de reorientação molecular). Sua relação com o campo elétrico é conforme equação 5. Sua unidade no SI é Farads por metro (F/m).

$$\vec{D} = \epsilon\vec{E} \quad (5)$$

Valores elevados de permissividade elétrica são associados a elementos capacitivos (dielétricos). Situação presente em materiais biológicos, que apresentam permissividade dezenas de vezes superior ao do vácuo.

2.1.6.3 Efeitos Dielétrico do Material Biológico

De maneira simplificada são explicados polarização, relaxação e dispersão em dielétricos.

2.1.6.3.1 Polarização e Relaxação

Define-se polarização como a perturbação induzida pelo campo elétrico na distribuição de cargas. Por exemplo, acúmulo de íons em um eletrodo.

Durante aplicação de um campo elétrico variável no tempo, a polarização não ocorre de maneira instantânea, ou seja, há um atraso no movimento das cargas. Nesse caso nomeia-se relaxação (ou polarização AC). A constante de tempo associada ao atraso no movimento de cargas é chamada de tempo de relaxamento. Pode-se comparar os efeitos da relaxação aos tempos de carga e descarga de elementos capacitivos. Se a frequência de estimulação (corrente na amostra) for baixa, as cargas terão o tempo necessário para mudar sua posição, nesse caso a polarização é máxima. Em frequências elevadas a polarização e relaxação tendem a ser menos expressivas.

Dois ocorrências de polarização e relaxação relevantes para esse trabalho:

- Nas membranas celulares, que é efeito natural imposto pela característica capacitiva da membrana (polarização tipo interfacial);
- Nos eletrodos (interfaces eletrodo-solução), que ocorre durante a passagem de corrente elétrica. O eletrodo sai da condição de equilíbrio devido aplicação de corrente elétrica pelo eletroporador (acumulam-se íons nos eletrodos).

2.1.6.3.2 Dispersão

Define-se dispersão como a variação da condutividade e permissividade em função da frequência. Dispersões podem ser originárias de efeitos de polarização e relaxação. Em 1957, Schwan apresentou os mecanismos de relaxamento de tecidos em três grupos (GRIMNES; MARTINSEN, 2014):

- Faixa de DC a 1kHz (tipo α): relacionado com característica ativa de membranas celulares (descrita por Hodgkin-Huxley) e acúmulo de carga em eletrodos;
- Faixa de 1 kHz a 100 Mhz (tipo β): relacionado com organelas dentro de células, ocorrências no nível de membrana celular (efeito Maxwell-Wagner² e capacitância intrínseca da membrana);
- Faixa de 100 MHz a 100 Ghz (tipo γ): relacionado com relaxamento a nível de íon e efeitos eletro cinéticos.

Observa-se que as faixas de frequências de dispersão podem variar conforme a referência.

2.2 EFEITO TÉRMICO DA CORRENTE ELÉTRICA

Na seção 2.1 foram apresentadas cargas elétricas e iônicas, além da relação mútua entre campos elétricos, magnéticos, corrente elétrica e características do material. Nessa seção será abordado do efeito Joule, fenômeno natural decorrente da passagem de corrente elétrica em qualquer situação. Esse é detalhe pertinente em aplicação de correntes em meios biológicos, uma vez que é de conhecimento que os meios biológicos são sensíveis à temperatura.

2.2.1 Efeito Joule e Aquecimento

A passagem de corrente elétrica em um material provoca geração de calor e aquecimento do mesmo. Ou seja, a energia elétrica é transformada em energia térmica. Esse fenômeno é explicado pela lei de Joule (efeito Joule). A alteração de temperatura ΔT , em grau Celsius ($^{\circ}\text{C}$), de uma amostra após aplicação de protocolo de eletroporação é de acordo com a equação 6 (equacionamento disponível no Apêndice E).

²Efeito Maxwell-Wagner: acúmulo de carga na interface de dois materiais devido diferença de tempos de relaxação destes.

$$\Delta T = \frac{E^2 t \sigma}{c} \quad (6)$$

Onde E é o módulo do campo elétrico aplicado entre eletrodos (V/m), t a duração dos intervalos de aplicação, σ condutividade elétrica da amostra (S/m) e c o calor específico à pressão constante (J/kg°C).

A análise da alteração de temperatura em função do protocolo aplicado em meios biológicos é importante, pois a exposição à temperatura elevadas pode causar danos reversíveis e irreversíveis aos materiais biológicos (THOMSEN; PEARCE, 2011).

2.2.1.1 Dano Térmico em Materiais Biológicos

O dano térmico irreversível inicia-se a partir de temperatura de 42 °C, caso ocorra exposição prolongada (acima de centenas de segundos a horas) (THOMSEN; PEARCE, 2011). Alguns danos térmicos primários são listados:

- Desnaturação de proteínas (THOMSEN; PEARCE, 2011);
- Perda de massa, que pode ser devido a vaporização da água e carbonização (ablação) (THOMSEN; PEARCE, 2011);
- Alterações na condutividade elétrica, devido a condutividade de soluções iônicas (mobilidade iônica) ser dependente da temperatura (DUCK, 1990);
- A membrana celular é sensível à temperatura, e alterações de temperatura pode mudar a rigidez da membrana. Por causa disso, podem ocorrer alterações na permeabilidade, dissociação e ruptura de membrana e morte celular (MADIGAN *et al.*, 2016);
- Em tecidos, destruição de estruturas de colágeno e proteínas. Isso dificulta resposta imunológica e pode formar cicatrizes (DAVALOS; RUBINSKY, 2008)

Nos protocolos de tratamentos por eletroporação, usualmente há passagem de corrente elétrica durante oito intervalos de 100 μ s. Apesar disso, o aumento da temperatura no local da aplicação é conhecido na literatura como algo desprezível para a maioria dos casos (DAVALOS; RUBINSKY, 2008; GRANOT *et al.*, 2009; NOVICKIJ *et al.*, 2016). Ressalva-se casos com utilização de eletrodos de agulhas. Nesse tipo de

situação, podem ocorrer dano térmico na vizinhança das paredes dos eletrodos (regiões distanciadas em até 0.5 mm ao redor das agulhas) (DAVALOS; RUBINSKY, 2008). O aumento da temperatura (da ordem de dezenas de graus) pode ser explicado devido à distribuição de campo elétrico não homogênea e conseqüentemente alta densidade de corrente em algumas regiões (GARCIA; DAVALOS; MIKLAVCIC, 2014). Portanto, o acréscimo de temperatura com eletrodos de agulhas não é homogêneo e é incorreto utilizar a equação 6 para esse fim. Nesse tipo de situação a literatura indica estudo térmico por modelo de análises finitas. Recomenda-se esse estudo em tratamentos próximos à regiões sensíveis (ou tecidos sensíveis a temperatura) (DAVALOS; RUBINSKY, 2008; GARCIA; DAVALOS; MIKLAVCIC, 2014; WAGSTAFF *et al.*, 2015).

2.3 INTERAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS E CÉLULAS BIOLÓGICAS

A interação de campos elétricos com células biológicas é abrangida pelo tópico de bioeletricidade. Este é um tópico extenso que se refere aos fenômenos de correntes elétricas naturais ou induzidos dos processos de vida (GRIMNES; MARTINSEN, 2014).

Nessa seção, primeiramente será introduzido a célula eucariota com ênfase em sua membrana e modelo elétrico simplificado. Em segundo lugar, será explanado a indução de potencial transmembrana devido campo elétrico externo. Por fim, são expostos os tipos de respostas e fenômenos celulares esperados (eletroestimulação e eletroporação) em função da aplicação de campos elétricos externos.

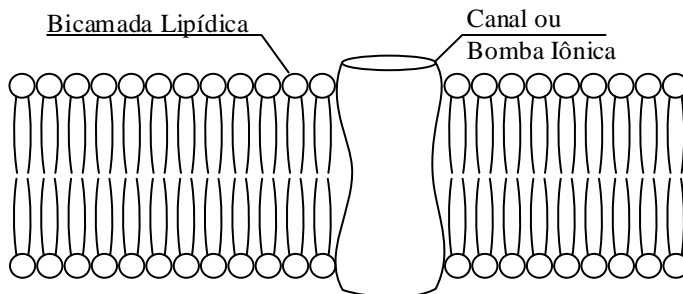
2.3.1 A Célula e a Membrana Celular

Uma célula é a unidade fundamental dos seres vivos. Existem células do tipo procariota e eucariota. Os procariontes incluem os reinos *Bacteria* e *Archaea*, nesses o material genético fica imerso no citoplasma, ou seja, sem núcleo definido. Os eucariotes possuem núcleo definido, esses são algas, protozoários, fungos e células que compõem os animais e plantas. Os eucariotes contêm o núcleo envolvido por membrana e diversas outras organelas também envolvidas por suas membranas (MADIGAN *et al.*, 2016).

Todas as células possuem pelo menos uma barreira que separa o interior da célula do ambiente externo. Essa barreira é chamada de membrana celular (ou membrana citoplasmática). A membrana celular é

formada por uma bicamada lipídica (com espessura variável na ordem de nanômetros) que normalmente impede a passagem de íons e outras moléculas. Partes da membrana possuem complexos proteicos que são facilitadores do transporte de substâncias (canais e bombas iônicas). Essas estruturas podem funcionar por difusão (canais iônicos) ou serem comandadas por sinais elétricos ou químicos com uso de energia (bombas iônicas). A troca de substâncias é necessária para garantir a homeostase celular, ou seja, o equilíbrio de vários fatores que tornam a célula saudável. Na Figura 4 está representado a organização da membrana celular.

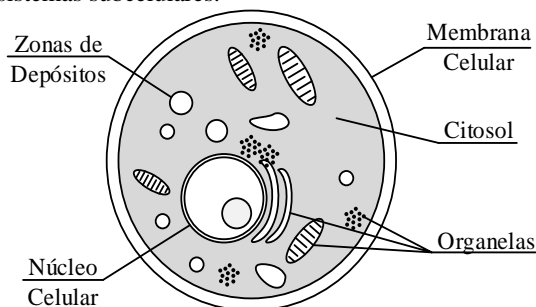
Figura 4 – Vista em corte representativa da membrana celular. A bicamada lipídica geralmente impede a passagem de moléculas. Os canais e bombas iônicas facilitam o fluxo de moléculas.



Fonte: Próprio autor.

O interior da célula é constituído pelo citoplasma que contém organelas, citosol (ou matriz citoplasmática) e zonas de depósito (ou inclusões). O citosol é um fluido que ocupa o espaço entre as organelas e os depósitos, ele contém substâncias como aminoácidos, proteínas, outras macromoléculas, nutrientes energéticos e íons. As organelas são estruturas que realizam atividades vitais, são exemplos de organelas as mitocôndrias, o retículo endoplasmático, o complexo de Golgi, os lisossomos os peroxissomos e o próprio núcleo celular. Os depósitos são geralmente de hidratos de carbono, proteínas, lipídios ou pigmentos. (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). A imagem de uma célula animal simplificada (eucarionte) é ilustrada na Figura 5.

Figura 5 – Célula animal simplificada, vista em corte. As indicações denotam exemplos de sistemas subcelulares.

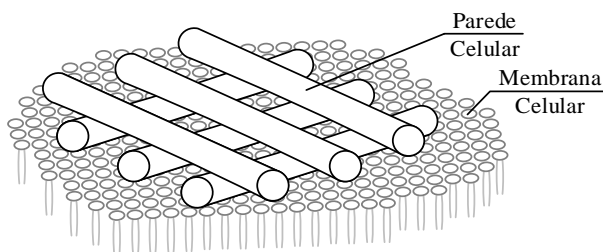


Fonte: Próprio autor.

Além da membrana plasmática, as células de plantas e da maioria dos microrganismos possuem outro invólucro, que é uma parede celular localizada exteriormente à membrana plasmática. Essa característica geralmente não é vista em células animais. A parede celular é uma estrutura permeável (ordem de centenas de nanômetros) e que confere sobretudo resistência estrutural à célula (MADIGAN *et al.*, 2016).

A composição da parede celular depende do tipo do micro-organismo. Por exemplo, complexos de carboidrato e proteína (*peptideoglicano*) formam a maioria da parede celular nas bactérias. Os fungos, como as leveduras, têm parede celular composta principalmente por *quitina*. Já em plantas e algas, a principal substância é a celulose (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Essas substâncias são dispostas formando “redes trançadas”, conforme representado na Figura 6.

Figura 6 – Representação da disposição da estrutura de “redes trançadas” da parede celular sobre a membrana celular



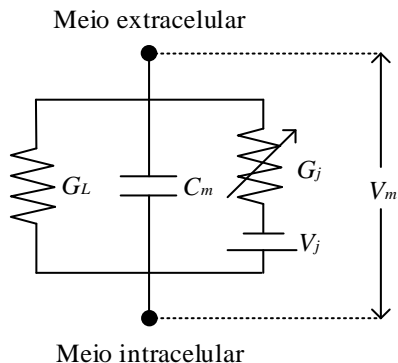
Fonte: Próprio autor.

2.3.1.1 Características Elétricas da Membrana Celular

A membrana pode ser interpretada por circuito equivalente conforme Figura 7. Os esclarecimentos dos componentes do modelo são:

- A bicamada lipídica é representada por condutância de fuga G_L em paralelo com capacitância C_m ;
- Canais e bombas iônicas são representados por condutâncias variáveis G_j em série com fonte V_j (diferença de potencial iônico);
- O meio extracelular é um eletrólito (íons mais expressivos são Na^+ e Cl^-). O meio intracelular é aproximadamente um eletrólito (íons mais expressivos são K^+ , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} e ácidos orgânicos) (GRIMNES; MARTINSEN, 2014).

Figura 7 – Modelo elétrico da membrana celular. Onde G_j é a condutância da membrana, V_j é a diferença de potencial iônico, C_m é a capacitância da membrana, G_L é a condutância de fuga através da membrana e V_m o potencial transmembrana.



Fonte: Adaptado de Grimnes e Martinsen (GRIMNES; MARTINSEN, 2014).

A condutância G_j e fonte V_j podem ser modeladas individualmente para representar correntes iônicas de K^+ , Na^+ e Cl^- (conforme modelo de Hodgkin-Huxley).

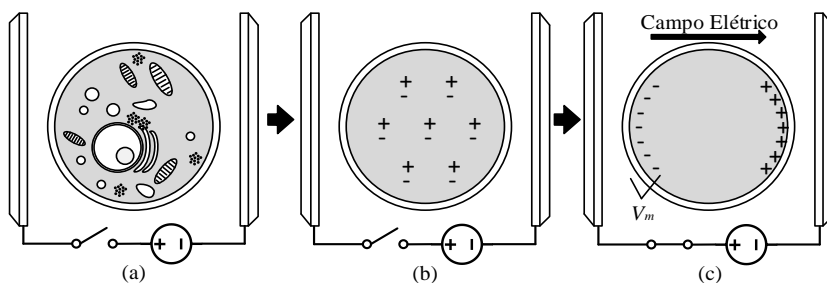
Ressalta-se que o circuito equivalente apresentado elétrico possui algumas limitações: no meio intracelular existem numerosas estruturas, com características elétricas distintas; no caso de existência de parede celular, apesar da sua característica de permeabilidade, sua espessura é da ordem de centenas de vezes superior a membrana celular. Essa estrutura

apresenta interações, por exemplo eletrostáticas, que podem influenciar no trânsito de íons (RAMOS; LIMA, 2012).

2.3.2 Célula Imersa em um Campo Elétrico Externo

A característica capacitiva da membrana celular é de interesse para fenômeno de indução de potencial transmembrana em função de campo elétrico exógeno. Quando a célula é imersa em um campo elétrico exógeno íons se aproximam da membrana celular (no meio extracelular e no meio intracelular). Ou seja, ocorre indução de potencial transmembrana V_m . Esse processo é demonstrado na Figura 8. O tempo de carregamento da membrana é em função das componentes capacitivas e resistivas (C_m e G_L)

Figura 8 – Representação da indução de cargas elétricas (íons) na membrana celular devido campo elétrico externo. Em (a) uma célula está inserida entre eletrodos e não há campo elétrico aplicado. Em (b) a mesma célula está simplificada. Nesta todo o conteúdo intracelular foi modelado por cargas positivas e negativas (íons). Em (c) um campo elétrico externo é aplicado e ocorre deslocamento dessas cargas até a membrana celular, que é eletricamente isolante.



Fonte: Próprio autor.

Observa-se que a mobilidade iônica e indução de potencial transmembrana depende de características do campo aplicado, como: intensidade e frequência (GRIMNES; MARTINSEN, 2014). Para fenômeno de indução de potencial transmembrana geralmente aplica-se campos pulsados com onda quadrada mono/bipolar e exponencial truncada mono/bipolar (BOTTER; MERLETTI, 2016; MARTY *et al.*, 2006; VIANA *et al.*, 2016).

2.3.3 Eletromanipulação de Células

As aplicações de campos elétricos em sistemas biológicos variam de acordo com o nível do sistema (corpo, órgãos, tecidos, células ou moléculas). De maneira geral, algumas famílias de aplicações são: manipulação cinética, estimulação de células excitáveis³ e eletroporabilidade de membranas (ZIMMERMANN; NEIL, 1996).

Observa-se que os efeitos cinéticos, estimulação e eletroporabilidade são fenômenos que podem ocorrer juntos. Esse fato pode ser uma dificuldade na análise individual desses fenômenos. Ainda assim, podem ocorrer alterações químicas e de temperatura que produzam outras respostas celulares e acrescentem erros na análise científica (WEAVER, 2003).

2.3.3.1 Efeitos de Indução de Potencial Transmembrana

A aplicação de campos elétricos externos pode induzir potenciais transmembrana suficientes para provocar estimulação celular e eletroporabilidade (KOTNIK, 2016; KRASSOWSKA; NEU, 1994).

De maneira geral, na estimulação elétrica, objetiva-se respostas fisiológicas e integridade final da célula excitável. A estimulação elétrica é relevante em pesquisas e aplicações clínicas para corrigir arritmias cardíacas (VIANA *et al.*, 2016), transtornos e doenças neurológicas (SCHLENSTEDT *et al.*, 2017), alívio de dor (com uso ou não de técnicas de *Deep Brain Stimulation*, DBS) (LEVY; DEER; HENDERSON, 2010) e diagnóstico de disfunções neuromusculares (como polineuropatia diabética periférica) a partir da estimulação de nervos periféricos e sua resposta (COSSUL *et al.*, 2018).

A indução de potenciais transmembrana supra fisiológicos, possibilita realizar alterações na característica de seletividade da membrana da célula, fenômeno denominado eletroporabilidade ou eletroporabilidade. Esse fenômeno pode ser realizado de maneira reversível ou irreversível e foi estudado na seção 3.

2.3.3.2 Eletrocínética

A área de estudo de tecnologias que possibilitam manipulação cinética, ou seja, manipulação de movimento celular, é denominada de

³Células excitáveis são células que dão respostas específicas (potencial de ação) após um estímulo. Essas são: neurônios, miócitos e células endócrinas.

eletrocinética (*electrokinectics*). As técnicas de eletrocinética (eletroforese e dielectroforese) são baseadas em forças de atração e repulsão de cargas inseridas em campos elétricos. Na eletrocinética utilizam-se campos elétricos que proporcionem mínima perturbação na integridade da amostra.

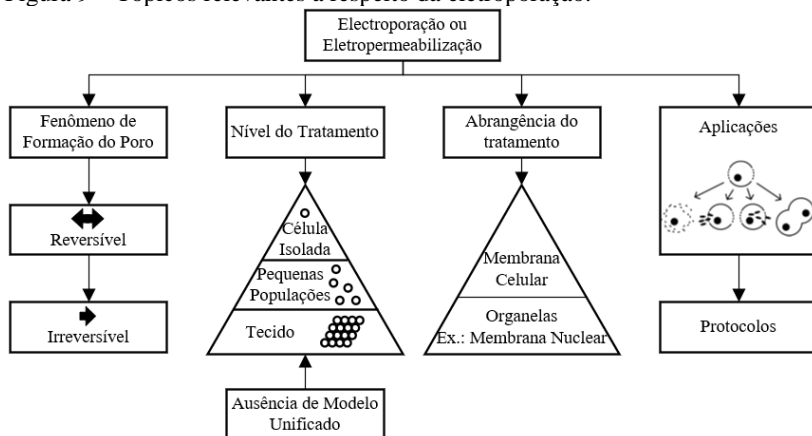
A eletroforese é o movimento (força de atração ou repulsão) de partículas carregadas imersas em um campo elétrico uniforme. Caso a partícula não seja carregada, há possibilidade de uso de campo elétrico não uniforme, fenômeno então nomeado dielectroforese. A força sobre a partícula depende da densidade de carga na partícula e amplitude do campo elétrico externo (ČEMAŽAR; MIKLAVČIČ; KOTNIK, 2013).

A aplicação de técnicas de eletrocinética permite separar e posteriormente detectar e classificar determinadas células de uma amostra heterogênea (ČEMAŽAR; MIKLAVČIČ; KOTNIK, 2013; ÇETIN; LI, 2011; LEE; TSENG; DI, 2017). Esse tipo de tecnologia é útil em pesquisas em nível celular (deslocamento de células) (PARK; BASSAT; YOSSFON, 2014), em aplicações clínicas para detecção de doenças (como separação de células tumorais em *system on a chip*) (ALSHAREEF *et al.*, 2013) e classificação celular por eletrorotação ou eletroorientação (ALIZADEH-HAGHIGHI; JAFARMADAR; KHALILARYA, 2017).

3 ELETROPORAÇÃO

Tópicos relevantes que cercam a eletroporação foram organizados de forma singular no diagrama da Figura 9. Serão apresentados a definição do fenômeno físico de formação do poro, níveis de tratamento, abrangência do tratamento e aplicações. O objetivo desse capítulo é mostrar um panorama da área de estudo e das possibilidades com técnicas de eletroporação.

Figura 9 – Tópicos relevantes a respeito da eletroporação.



Fonte: Próprio autor.

Salienta-se que múltiplos autores realizaram revisões extensas da eletroporação e recomenda-se também a leitura destes aos interessados nessa área de estudo (CHEN *et al.*, 2006; JIANG; DAVALOS; BISCHOF, 2015; MIKLAVČIČ; PUC, 2006; MISHRA, 2008; WEAVER; CHIZMADZHEV, 1996). Além disso, existem livros que contemplam o tema (CHANG, 1992; ESCOBAR-CHÁVEZ *et al.*, 2012; JARM; KRAMAR, 2016; JORDAN; NEUMANN; SOWERS, 1989; PAKHOMOV; MARKOV; MIKLAVČIČ, 2010; RUBINSKY, 2010; ZIMMERMANN; NEIL, 1996).

3.1 DEFINIÇÃO

A eletroporação ou eletropermeabilização (EP) pode ser definida como o fenômeno de aumento da permeabilidade de membranas de dupla camada lipídica, geralmente de células biológicas. O fenômeno ocorre

quando essas são expostas a campos elétricos de amplitude e duração suficientes para indução de potencial transmembrana e reorganização da estrutura da membrana. O aumento da permeabilidade da membrana pode ser explicado pela formação de poros na membrana celular (seção 3.3). Esse fenômeno é típico para campos elétricos acima de dezenas de kV/m e durações de nano-segundos a segundos (GONZALEZ; RUBINSKY, 2010; MIKLAVČIČ; PUC, 2006; WEAVER *et al.*, 2012).

A eletroporação pode ser dividida em dois tipos: reversível e irreversível. Dependendo da configuração do campo elétrico aplicado, a membrana pode se recuperar, caracterizando uma eletroporação reversível, ou pode não se recuperar, causando uma eletroporação irreversível e perda da viabilidade celular (CHEN *et al.*, 2006; JIANG; DAVALOS; BISCHOF, 2015; WEAVER *et al.*, 2012).

3.2 HISTÓRICO

Há registros anteriores ao século XX de fenômenos que possivelmente eram ocorrências de eletroporação. Apesar disso, não existiam explicações baseadas em aumento da permeabilidade ou reorganização da membrana celular. Além disso, haviam incertezas sobre esses fenômenos serem térmicos ou não.

De acordo com os pesquisadores Ivorra e Rubinsky (RUBINSKY, 2010) o provável primeiro registro de eletroporação ocorreu em 1754, quando Nollet percebeu e registrou a formação de marcações vermelhas na pele de humanos e animais em áreas onde eram aplicados centelhamentos elétricos (NOLLET, 1754). Possivelmente nessas regiões ocorria eletroporação irreversível, os geradores estáticos de alta tensão da época eram baseados em esferas friccionadas manualmente (gerador de Otto von Guericke), por causa disso promoviam arcos elétricos de alta tensão por curtos instantes de tempo.

Em 1802, Ritter observou contrações musculares quando correntes elétricas (de alta intensidade) em nervos são interrompidas (RITTER, 1802). Esse fenômeno, nomeado *Ritter's opening tetanus*, foi experimentado e entendido somente em 1951 por Hodgkin. A explanação do fenômeno, segundo Hodgkin (HODGKIN, 1951):

The explanation of the phenomenon may be that the insulating properties of the membrane break down under the influence of the abnormally high potential difference.

Ou seja, ele observou que o ocorrido poderia ser devido a ruptura elétrica da membrana celular, e isso ocorria para potenciais transmembrana

críticos. Essa hipótese, apesar de não ser totalmente correta (devido não tratar da reorganização da membrana), levou à descoberta do fenômeno da eletroporação como é conhecido hoje em dia (RUBINSKY, 2010).

Em 1957, Stämpfli relatou o fenômeno de “ruptura elétrica reversível” nos Anais da Academia Brasileira de Ciências (STÄMPFLI, 1957). Possivelmente, essa é a primeira documentação sobre eletroporação reversível. Stämpfli pesquisava anteriormente o potencial transmembrana celular após o fenômeno de “ruptura elétrica da membrana” (STÄMPFLI; WILLI, 1957), ou seja, eletroporação irreversível.

Em 1967, Sale e Hamilton demonstraram em bactérias e leveduras que o efeito letal de campos elétricos era em função da duração, número de pulsos e amplitude. Ou seja, a morte dos organismos não era efeito de eletrolise e nem de aumento térmico (HAMILTON; SALE, 1967; SALE; HAMILTON, 1967). Os autores também calcularam que o rompimento da membrana celular (lise celular) ocorria para potenciais transmembrana próximos de 1 V em células esféricas, muito próximo do aceito atualmente (WEAVER *et al.*, 2012). E este potencial crítico dependia do tipo da célula e principalmente do seu diâmetro médio (SALE; HAMILTON, 1968).

Em 1972, Neumann e Rosenheck expuseram que a utilização de campos elétricos pulsados causavam alterações de maneira transiente na permeabilidade da membrana celular (NEUMANN; ROSENHECK, 1972). A alteração de permeabilidade celular é atualmente a base da maior parte dos tratamentos por eletroporação, que é discutido na seção 3.6.

Em 1973, foi proposto por Crowley que a ruptura de uma membrana de bicamada lipídica (BLM) ocorria em consequência da compressão eletrostática da membrana e não da ruptura de dielétrico⁴. Nas palavras de Crowley (CROWLEY, 1973):

[...] a mechanism for breakdown is proposed in which rupture occurs as a consequence of electrostatic compression of the elastic membrane. Since this mechanism depends on the mechanical properties of the membrane, it offers additional insight into the structure of the

⁴O fenômeno de compressão eletrostática e reorganização da membrana é diferente do fenômeno de ruptura de dielétrico (*avalanche breakdown*). O primeiro consiste em reorganização molecular; no segundo ocorre liberação de elétrons que são acelerados com o campo elétrico e colidem com outros em efeito dominó. Geralmente esse fenômeno causa dano físico ao dielétrico.

membrane, as well as a criterion for electric breakdown.

O modelo de reorganização molecular de uma membrana BLM foi consolidado em 1979 por uma série de artigos de Abidor (ABIDOR *et al.*, 1979). Os pesquisadores testaram experimentalmente a reorganização e abertura de poros aquosos transientes em membrana artificiais formadas por bicamadas lipídicas. Ainda assim, os autores propuseram que existem regiões pré-dispostas a abrir poros, e a indução de potenciais transmembrana críticos favorecia a abertura destes. Anteriormente a estes relatos, havia dúvidas se a eletroporação ocorria devido a ruptura dielétrica por avalanche de elétrons ou reorganização molecular. A descoberta de 1979 ajudou na compreensão dos resultados experimentais existentes e é a mais aceita atualmente (ver seção 3.3) (JIANG; DAVALOS; BISCHOF, 2015; KOTNIK *et al.*, 2012; VOYER *et al.*, 2018).

Em 1982, Neumann relatou que a aplicação de campos elétricos poderia ser utilizada para transporte de moléculas (DNA) através da membrana, sem danificar suas estruturas (NEUMANN *et al.*, 1982):

Here we report a physical method that leads to an enormous enhancement of DNA transport across cellular membranes. The new technique stems from the observation that biomembranes are made transiently more permeable by the action of short electric impulses above a certain field strength, without damaging the membrane structures.

O transporte molecular transmembrana é uma aplicação da eletroporação reversível e é utilizada atualmente para transferência genética (seção 3.6.1).

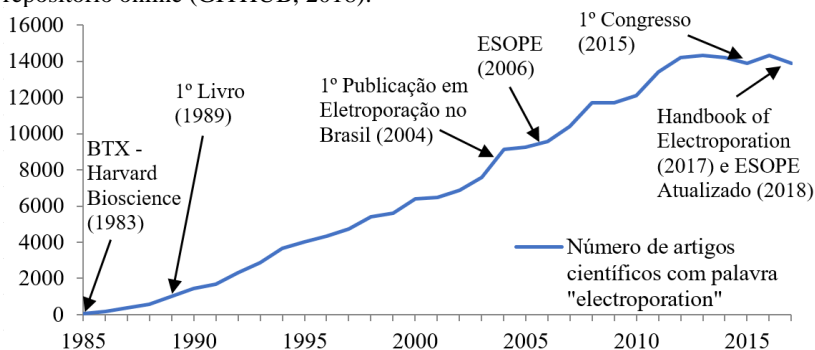
Assim como o DNA, diversos outros tipos de moléculas não permeáveis à membrana podem ser transportados, por exemplo, drogas anticâncer. Em 1987, Okino e Mohri expuseram o potencial da eletroporação em tratamentos de câncer. Estes combinaram aplicação de campos elétricos e bleomicina – um tipo de droga anticâncer –, e mostraram que era possível o uso combinado desses para tratamento de tumores (OKINO; MOHRI, 1987). Atualmente essa técnica é conhecida no meio clínico como eletroquimioterapia (seção 3.6.3.1).

Atualmente, eletroporação é um tópico de pesquisa consolidado e de crescente interesse. Como pode ser percebido pelo acréscimo no número de publicações que citam o tema. O número de aparições da palavra “*electroporation*” em artigos científicos entre 1985 e 2017 é

disponível na Figura 10. Na Figura 10 também são indicados alguns eventos importantes em eletroporação, são esses:

- Em 1983: criação da empresa BTX do grupo Harvard Bioscience. Esta foi a primeira empresa a vender eletroporador comercial para transferência genética;
- Em 1989: primeiro livro sobre eletroporação (JORDAN; NEUMANN; SOWERS, 1989);
- Em 2004: primeiro trabalho no Brasil em eletroporação pelos pesquisadores Airton Ramos e Daniela O. H. Suzuki (RAMOS; SUZUKI; MARQUES, 2004);
- Em 2006: criação da padronização para tratamento de câncer por eletroquimioterapia (ESOPE, “*Standard Operating Procedures Of The Electrochemotherapy*”) (MIR *et al.*, 2006);
- Em 2015: primeiro congresso em eletroporação em Portorož, Slovenia;
- Em 2017: publicação do livro *Handbook of Electroporation* (MIKLAVCIC, 2017);
- Em 2018: atualização do ESOPE (GEHL *et al.*, 2018).

Figura 10 – Ocorrências da palavra “*electroporation*” em qualquer parte de trabalhos científicos de 1985 até 2017. Dados retirados do banco de dados do Google Scholar dia 12 de janeiro de 2018 usando ferramenta disponível em repositório online (GITHUB, 2018).



Fonte: Próprio autor.

3.3 FENÔMENO DE FORMAÇÃO DO PORO

A hipótese atualmente aceita do mecanismo do fenômeno da eletroporação é a formação de poros na membrana. As quatro principais

etapas envolvidas na reorganização transiente da membrana são (representação na Figura 11) (CHEN *et al.*, 2006; KOTNIK *et al.*, 2012; TEISSIE; GOLZIO; ROLS, 2005; WEAVER, 2003):

Etapa i: Membrana íntegra e indução do potencial transmembrana:

A aplicação de campo elétrico externo (1 ns a 1 s) induz aumento do potencial transmembrana. O carregamento da membrana deve-se ao fluxo de íons, conforme representado na Figura 8. Quando o potencial transmembrana (V_m) atinge um valor crítico (superior à 200 mV, e na maioria dos casos pode atingir 1 a 1,5 V em células eucariontes (ZIMMERMANN, 1996)) inicia-se a reorganização molecular da membrana (Etapa ii). Observa-se que o potencial transmembrana é equivalente a um campo elétrico sobre a membrana da ordem de 10^8 V/m (em porção típica de membrana de 5 nm).

Etapa ii: Formação de poros hidrofóbicos (ou pré-poros):

O potencial transmembrana crítico desencadeia uma “explosão” de reorganizações na estrutura molecular da membrana. Nessa situação o campo elétrico entre a membrana dielétrica é superior ao que essa estrutura pode suportar. Esse tipo de poro é instável e desaparece por flutuações naturais da membrana caso seu raio seja menor que o raio crítico⁵ (retorna à Etapa i). Caso ele apresente um raio superior ao raio crítico, ele torna-se um poro hidrofílico (Etapa iii).

Etapa iii: Formação de poros hidrofílicos (reversíveis):

As cabeças das moléculas lipídicas “giram” para o interior da parede dos poros (forma toroidal), isso minimiza o contato das caudas de lipídeos, que são hidrofóbicos as moléculas de água presentes nos meios extra e intracelular. O interior do poro é preenchido com água, esse

⁵O raio crítico é o raio limiar para o poro hidrofóbico tornar-se poro hidrofílico. O sistema se reorganiza na configuração que necessita a menor quantidade de energia para existir. O raio crítico é teórico e observado com auxílio de modelos matemáticos de reorganização da membrana em nível molecular.

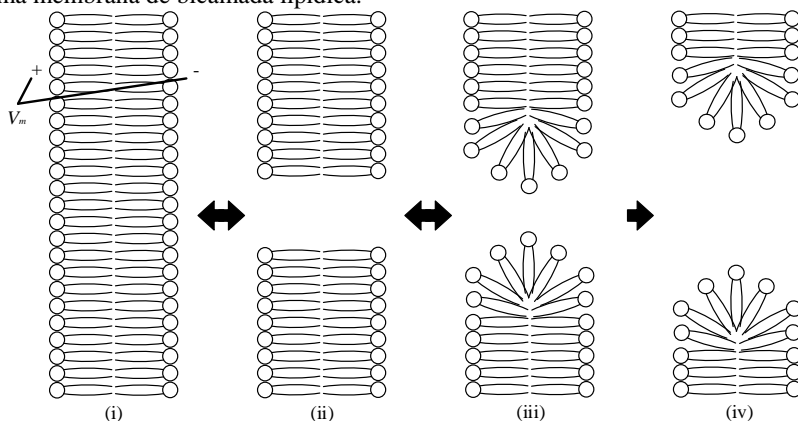
acontecimento permite o transporte de íons e outras moléculas através da membrana.

Etapa iv: **Formação de poros irreversíveis (destruição da membrana):**

Caso a amplitude do campo elétrico aplicado seja muito elevada é criado poros irreversíveis, nesse estado a membrana não é capaz de retornar ao estado inicial “i”. A recuperação (*resealing*) ou não da membrana dependerá da operação reversível ou irreversível da eletroporação, que depende dos parâmetros do campo e condições do sistema biológico.

A densidade e raio dos poros podem depender de condições do sistema biológico (tamanho, formato, tipo e concentração celulares e tipos de tecidos) e parâmetros de eletroporação (amplitude, duração e forma de onda de campo elétrico aplicado) (CHEN *et al.*, 2006; KOTNIK *et al.*, 2012; WEAVER *et al.*, 2012).

Figura 11 – Quatro principais etapas envolvidas no processo de eletroporação de uma membrana de bicamada lipídica.



Fonte: Figura adaptada de Kotnik (KOTNIK *et al.*, 2012).

3.3.1 Considerações da Observação da Eletroporação

O princípio molecular da formação de poros (e transporte molecular através da membrana) ainda não é completamente entendido. Chang em 1990 desenvolveu uma técnica de “de congelamento rápido

após eletroporação” seguido de técnica de microscopia e obteve imagens de estruturas semelhantes aos poros, porém a experimentação não foi reproduzida novamente (CHANG; REESE, 1990; JIANG; DAVALOS; BISCHOF, 2015). As técnicas de microscopia são agressivas e afetam a estrutura de poros. Atualmente, não há técnica experimental definitiva para observação direta da eletroporação (abertura de poros) e há esforços para descoberta de novas metodologias (BATISTA NAPOTNIK; MIKLAVČIČ, 2018). A eletroporação geralmente é estudada baseada em medições indiretas. Na literatura existem três principais categorias de observação da eletroporação:

- Mudanças nas propriedades elétricas (ver seção 3.4);
- Mudanças na integridade ou propriedades relacionadas da membrana (SHIRAKASHI *et al.*, 2004);
- Transporte molecular através da membrana (KINOSITA; TSONG, 1977; NEUMANN *et al.*, 1982).

3.4 ALTERAÇÕES DE PROPRIEDADES ELÉTRICAS

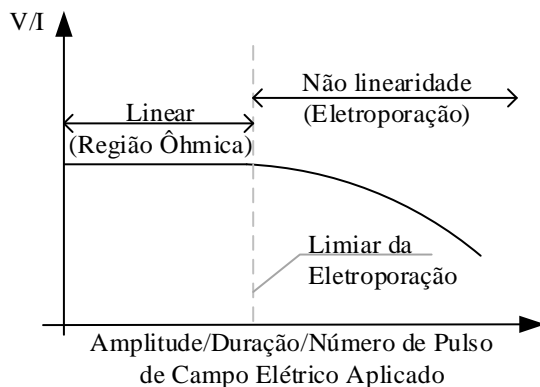
A membrana celular intacta é um bom dielétrico e a abertura de poros ocasiona diminuição da resistência elétrica da membrana. Sendo assim, uma das maneiras de analisar o processo de eletroporação é através de medições indiretas de alterações nas propriedades elétricas antes, durante e/ou depois da aplicação da eletroporação, independentemente do nível de tratamento, ou seja, em célula isolada (BÜRGELE *et al.*, 2015; HUANG; RUBINSKY, 2001), suspensões (PAVLIN; LEBEN; MIKLAVČIČ, 2007; RAMOS; LIMA, 2012; SUZUKI *et al.*, 2011) e tecidos (NEAL *et al.*, 2012; PINTARELLI *et al.*, 2016; SUÁREZ *et al.*, 2014).

As análises de alteração de propriedades elétricas se dividem em: análises durante protocolo de eletroporação e análise comparativa antes/ depois da eletroporação. Essa seção tem objetivo de apresentar os métodos de medição de alteração de propriedades elétricas, bem como relação de compromisso entre eles.

A análise da eletroporação durante aplicação dos protocolos pode ser realizada através da aquisição de dados de tensão e corrente instantâneos na amostra, ou seja, alteração da impedância aparente (ou módulo da impedância V/I). A Figura 12 mostra esse tipo de situação, a impedância diminui de maneira não linear ou não ôhmica em função da ocorrência da eletroporação, ou seja, no acréscimo de amplitude/duração/número de pulso do protocolo de eletroporação. O

decréscimo na impedância ocasiona aumento da corrente elétrica (LANGUS *et al.*, 2016; NEAL *et al.*, 2012; RAMOS; LIMA, 2012; SUZUKI *et al.*, 2011).

Figura 12 – Representação da alteração da impedância aparente em função da eletroporação. Ao atingir a região da eletroporação a alteração da corrente deixa de apresentar comportamento linear (ôhmico).



Fonte: Próprio autor.

Apesar do uso da análise de impedância aparente (V/I), é de conhecimento que existem erros introduzidos por efeitos dispersivos⁶. Esses efeitos estão concentrados em frequências menores que 1 kHz. Os pulsos retangulares utilizados na eletroporação possuem amplo número de componentes de frequência⁷. Portanto, a análise da alteração V/I durante os pulsos deve estar contaminada de efeitos dispersivos, uma vez que não é possível a separação destes por esse método (BHONSLE *et al.*, 2015; GRIMNES; MARTINSEN, 2014; RAMOS; LIMA, 2012).

Uma maneira de reduzir efeitos de dispersão devido elevadas componentes de frequência é a utilização de protocolos com componentes

⁶Principalmente dispersões tipo α , que são: polarização na interface eletrodosolução e interface da membrana (efeitos de atração/repulsão iônica próximos às superfícies da membrana), efeitos de canais iônicos (ativos), estruturas intracelulares, difusão iônica e fugas no dielétrico (GRIMNES; MARTINSEN, 2014).

⁷O protocolo ESOPE possui 25% de sua energia abaixo de 1 kHz e mais de 95% de sua energia concentrada em frequências abaixo de 10 kHz (detalhes no Apêndice D).

de frequência elevados (por exemplo, pulsos de duração de 1 μ s) (BHONSLE *et al.*, 2015) ou combinação de pulsos retangulares com senóides acima de 1 kHz (RAMOS *et al.*, 2012). Porém, nessa dissertação objetivou-se o uso do protocolo ESOPE (*European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy*) de pulsos de duração de 100 μ s (MARTY *et al.*, 2006).

Uma alternativa para análise de eletroporação é o uso de análise por espectro de impedância antes e depois da aplicação. Esse tipo de análise em frequências elevadas pode fornecer dados com menor contaminação de efeitos de dispersão (acima de 1 kHz) (BHONSLE *et al.*, 2015; BÜRCEL *et al.*, 2015; RAMOS; LIMA, 2012). Apesar disso, esse tipo de análise é limitado as alterações após eletroporação, ou seja, não permite acesso ao estado das células durante o processo. Esta informação é desejada em sistemas futuros com monitoramento em tempo real e *feedback* do estado da eletroporação.

3.5 NÍVEL DO TRATAMENTO

Nesta seção, é fornecida orientação sobre os três níveis de tratamento (célula isolada, suspensão de células e tecido).

A eletroporação é uma área de pesquisa ampla e não há modelo único para eletroporação. A categorização de modelos para os três níveis de tratamento pode ser explicada pois as pesquisas são conduzidas de maneira isolada e as características elétricas dos três níveis de tratamento são distintas. Por exemplo, os tecidos podem apresentar heterogeneidade e anisotropia⁸. Prontamente, células em suspensão possuem vizinhança preenchida por solução de características elétricas bem definidas. Apesar disso, observa-se que um modelo único para eletroporação seria importante para observações universais sobre o processo e comportamento de células eletroporadas.

3.5.1 Célula Isolada ou Única

Analisar uma grande quantidade de células ao mesmo tempo pode não fornecer informações suficientes sobre ocorrências celulares durante e após eletroporação. Por exemplo, proliferação, diferenciação,

⁸Heterogeneidade é a característica de complexidade estrutural e anisotropia é a característica de propriedades físicas (como propriedades elétricas) variáveis com a direção. Essas características podem ocorrer devido a morfologia do tecido.

comportamento de organelas e análise do processo físico de reorganização da membrana. Ainda assim, há aplicações que apreciam a entrada de substâncias impermeáveis à membrana em células selecionadas (ou organelas) em ambiente multicelular *in vivo* e *in vitro* (LUNDQVIST *et al.*, 1998; RYTTSÉ *et al.*, 2000; SANTRA; TSENG, 2013). Nesse contexto a eletroporação de célula única (SCEP, “*single cell electroporation*”) é uma técnica de alta resolução espacial que permite estudo detalhado da eletroporação e acesso ao conteúdo intracelular de células individuais.

3.5.1.1 Histórico

O SCEP é pesquisado no meio científico a vinte anos. O primeiro método SCEP foi desenvolvido por Lundqvist em 1998, originalmente nomeado de "versão miniaturizada da eletroporação". Os pesquisadores usaram micro eletrodos de fibra de carbono (diâmetro externo de 5 μm , aproximados de 2-5 μm da célula) para produzir campos elétricos localizados (dezenas de kV/m) em células aderentes individuais. Foi demonstrado a transferência seletiva de solutos impermeáveis a membranas em células individuais usando moléculas fluorescentes e DNA (LUNDQVIST *et al.*, 1998). O grupo de pesquisa de Lundqvist contribuiu no desenvolvimento de diferentes métodos de SCEP em células isoladas e células individuais localizadas em tecidos (NOLKRANTZ *et al.*, 2001, 2002)

Em 2000, Ryttsé combinou a eletroporação com técnicas de *patch clamp* com objetivo de estudos fisiológicos detalhados do fenômeno (RYTTSÉ *et al.*, 2000). Observa-se que o processo de formação do poro (e transporte molecular através da membrana) e relação com o potencial transmembrana ainda não é completamente entendido (KITAMURA *et al.*, 2008).

Em 2001, Haas desenvolveu um método de SCEP para animais *in vivo*. Ele utilizou micropipetas (diâmetro da ponta de 0,6-1 μm) para realizar eletroporação em neurônios e células glia de girinos *Xenopus* (HAAS *et al.*, 2001).

Em 2001, Huang e Rubinsky apresentaram o primeiro dispositivo de silício micro fabricado para SCEP. Além disso, os autores sugeriram o método de medição da corrente elétrica através dos chips SCEP. Esse tipo de medida pode fornecer informações sobre o estado de eletroporação da membrana celular (procedimento detalhado na seção 3.4) (HUANG; RUBINSKY, 2001).

Atualmente, pesquisas e aplicações com SCEP são tendência. Principalmente quando associados a técnicas de micro fluidos, eletrocinética e *lab on a chip* (ver seção 3.6.2).

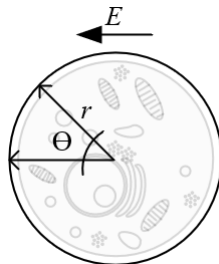
Demais considerações sobre SCEP podem ser consultadas nas publicações de revisão da técnica (FOX *et al.*, 2006; MOVAHED; LI, 2011; OLOFSSON *et al.*, 2003; SANTRA; TSENG, 2013; WANG *et al.*, 2010).

3.5.1.2 Modelo e Alteração do Potencial Transmembrana

A modelagem de célula única é bem aceita e validada com resultados experimentais. O modelo geralmente utilizado é o firmado pelos trabalhos da Krassowka (DEBRUIN; KRASSOWSKA, 1999). Comumente utiliza-se células esféricas sem carga de superfície (Figura 13) para prever a distribuição do potencial transmembrana, alteração da condutividade da membrana, transporte transmembrana, densidade de poros e raio médio dos poros (KOTNIK; BOBANOVIC; MIKLAVCIC, 1997; SUZUKI *et al.*, 2011; VOYER *et al.*, 2018).

Nessa dissertação é apresentado somente o potencial transmembrana (V_m) em função do campo elétrico (E), raio da célula (r) e ângulo em relação à direção do campo elétrico (θ). O modelo é conforme a equação 7. Assume-se que a membrana é isolante ideal e os meios extra e intracelular são condutores ideais.

Figura 13 – Modelo de célula esférica simples.



Fonte: Adaptado de Suzuki (SUZUKI *et al.*, 2011).

$$V_m = 1,5|E| r \cos(\theta) \quad (7)$$

Destaca-se a aproximação da equação 7 pela simplicidade de estimativa de ocorrência ou não da eletroporação. Porquanto conforme apresentado na seção 3.3, quando o potencial transmembrana de uma

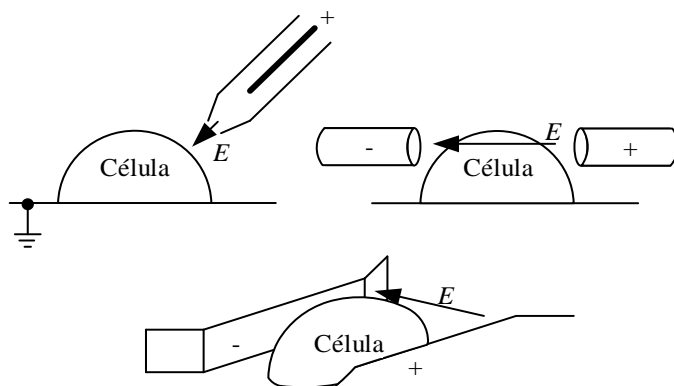
região atinge um valor crítico há ocorrência da eletroporação nessa região.

A derivação da equação 7 não é apresentada nessa dissertação. Ressalva-se que o modelo pode ser utilizado para qualquer geometria de célula, porém esse deve ser resolvido numericamente (PUCIHAR; MIKLAVCIC; KOTNIK, 2009).

3.5.1.3 Dispositivos

Para aplicar campo elétrico localizado em células individuais micro eletrodos podem ser utilizados. Por exemplo, micro eletrodos sólidos de fibra de carbono (LUNDQVIST *et al.*, 1998), capilares preenchidos por eletrólitos (NOLKRANTZ *et al.*, 2001), micropipetas (HAAS *et al.*, 2001) e matriz de eletrodos 2D e 3D micro fabricados conforme padrões de indústria de semicondutores (HUANG; RUBINSKY, 2001). A construção mecânica desses eletrodos é representada na Figura 14. Ressalta-se que tecnologias de micro fabricação também permitem a incorporação de outras funcionalidades no dispositivo (ver seção 3.6.2).

Figura 14 – Dispositivos encontrados na literatura para realização da eletroporação de célula única.



Fonte: Próprio autor.

3.5.2 Pequenas Populações Celulares

O tratamento no nível de pequenas populações celulares, como suspensão celular e células aderidas é um método consolidado para

transferência e extração de moléculas para pequenas populações de células (CHANG, 1989; KANDUŠER; ŠENTJURC; MIKLAVČIČ, 2006; SANTRA; TSENG, 2013), fusão celular (CHANG, 1989) e destruição celular (RUBINSKY *et al.*, 2008; SALE; HAMILTON, 1967).

Além disso, resultados de pequenas populações celulares são importantes no estudo da eletroporação. Esses permitem avaliação da alteração da permeabilidade da membrana, condutividade e viabilidade celular (BRAMBACH *et al.*, 2013; NOVICKIJ *et al.*, 2014; RAMOS; LIMA, 2012). Ainda, assim, resultados com pequenas populações celulares podem ser correlacionados com resultados em célula única (PAVLIN *et al.*, 2005; SUZUKI *et al.*, 2011).

3.5.2.1 Histórico

Historicamente a eletroporação de células em suspensão (BEP, “*Bulk Electroporation*”) e pequenas populações de células aderentes foi essencial para o descobrimento da eletroporação. Seu contexto histórico é paralelo ao da eletroporação desde 1960 (visto na seção 3.2) (HAMILTON; SALE, 1967; KINOSITA; TSONG, 1977; NEUMANN *et al.*, 1982; NEUMANN; ROSENHECK, 1972). Apesar disso, sua análise ainda é relevante para a pesquisa e prática de extração de conteúdo intracelular (ver seção 3.6.5), transferência genética (ver seção 3.6.1) e ponte para modelos de célula única (PAVLIN; MIKLAVČIČ, 2003).

Os eventos mais notórios em BEP são os relacionados as técnicas de transferência genética. Em 1983, foi criada a BTX que foi primeira empresa a vender equipamento eletroporador para transferência genética. Em 1984, Potter publicou método de transferência genética para células em suspensão com uso de cubetas (POTTER; WEIR; LEDER, 1984). Tal procedimento é atualmente usado em equipamentos comerciais e é procedimento comum em laboratórios da área de biotecnologia e microbiologia. Diversos métodos são propriedade intelectual de empresas de biotecnologia (BIO-RAD LABORATORIES INC, 1990; GENETRONICS INC, 1998).

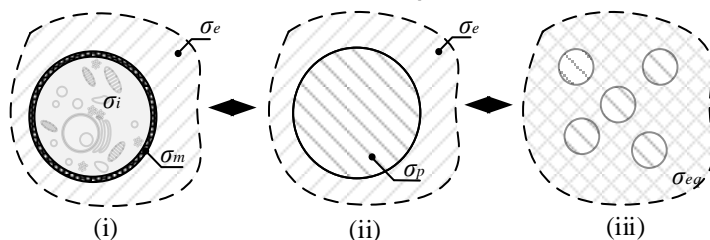
3.5.2.2 Modelos

Observa-se que a análise da alteração da condutividade de suspensão de células pode ser extrapolada para célula única. A transformação pode ser realizada numericamente ou analiticamente. A representação de transformação geralmente empregada na literatura é analítica, conforme mostrado na Figura 15.

A transformação analítica da Figura 15 é feita da seguinte maneira: Uma célula com determinada condutividade interna (σ_i), de membrana (σ_m) e de meio extracelular (σ_e) é transformada em uma célula equivalente com condutividade única (σ_p). Após esse procedimento pode-se usar o equacionamento de Maxwell para posterior transformação em solução com condutividade global de (σ_{eq}). O equacionamento completo e outras considerações, como efeito da concentração celular na solução, não são disponíveis nessa dissertação e são encontrados no livro “*Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields*” (FOSTER; SCHWAN, 1996). Ainda assim, existem referências adicionais sobre essa representação (PAVLIN; MIKLAVČIČ, 2003; RAMOS *et al.*, 2012; SUZUKI *et al.*, 2011).

Adverte-se que no caso de análises de propriedades elétricas de população de células as evidências do fenômeno de eletroporação são macroscópicas e seu resultado é para um grupo de células.

Figura 15 – Ponte entre modelo de alteração de condutividade de célula única para suspensão. (i) Célula com condutividade interna (σ_i) e condutividade da membrana (σ_m). (ii) Partícula de condutividade homogênea (σ_p). (iii) transformação de partícula homogênea (σ_p) e meio extracelular (σ_e) para suspensão com condutividade equivalente (σ_{eq}).



Fonte: Adaptado de Pavlin e Miklavcic (PAVLIN; MIKLAVČIČ, 2003).

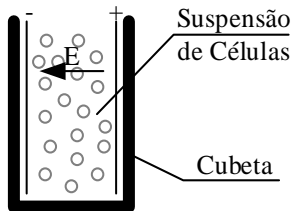
3.5.2.3 Dispositivos

Para eletroporação de pequenas populações celulares, o campo elétrico é aplicado em um certo volume de células por mL ou cm^3 . As moléculas a serem transferidas para o interior da célula devem ser dispostas no meio extracelular. No caso de extração de conteúdo celular, este irá ser encontrado na solução extracelular após eletroporação.

A eletroporação de pequenas populações geralmente é feita utilizando dois eletrodos paralelos separados na ordem de milímetros e aplicado centenas de volts entre eles. No caso de suspensão celular

(ordem de milhões de células por mL), os dispositivos são montados na forma de cubetas, conforme Figura 16 (OLOFSSON *et al.*, 2003; SANTRA; TSENG, 2013). No caso de células aderentes (ordem de centenas de milhares por cm²), os eletrodos podem ser aproximados ao local de deposição (lamínula) (TERUEL; MEYER, 1997; ZHENG; CHANG, 1991).

Figura 16 – Dispositivo tipo ‘cubeta’ para realização de eletroporação em suspensão celular.



Fonte: Próprio autor.

3.5.3 Tecido

Em tecidos, técnicas de eletroporação são usualmente utilizadas para tratamento de câncer. Separam-se ablação não térmica (IRE, seção 3.6.3.2) e eletroquimioterapia (ECT, seção 3.6.3.1).

As pesquisas nesse nível utilizam tecidos *ex vivo* para caracterização e modelagem elétrica em função da eletroporação. Esses modelos podem ser utilizados para previsão de distribuição de campo elétrico em casos clínicos e veterinários (SEL *et al.*, 2005; SUZUKI *et al.*, 2015, 2017; ZUPANIC; KOS; MIKLAVCIC, 2012).

3.5.3.1 Histórico

O uso da eletroporação em tecidos voltado a área médica teve início nos anos 80. Em 1987, Okino, Mohri utilizaram o aumento de permeabilidade provido pela eletroporação para aumentar a eficiência de entrega de agentes citotóxicos (drogas anticâncer) para o interior de células (OKINO; MOHRI, 1987).

Em 1991, Mir *et al.* realizou o primeiro caso clínico de sucesso de eletroporação combinada com agente quimioterápico, nomeado tratamento por eletroquimioterapia (ECT) (MIR *et al.*, 1991b, 1991a).

Em 2006, foi criada padronização para procedimentos de ECT (ESOPE, “Standard Operating Procedures Of The

Electrochemotherapy”) (MIR *et al.*, 2006). Em 2018, foram lançados atualizados para o ESOPE (GEHL *et al.*, 2018). Atualmente a ECT é um tratamento consolidado de câncer local, utilizado para remoção de tumores cutâneos e subcutâneos (ver seção 3.6.3).

3.5.3.2 Modelos

O modelo desenvolvido pelo grupo de pesquisa do professor Miklavcic é geralmente utilizado para computar a alteração de condutividade no tecido e prever a distribuição de campo no tratamento por ECT. O modelo descreve a alteração de condutividade em função sigmoide de um campo elétrico aplicado, ou seja, $\sigma(E)$ (equacionamento disponível em (SEL *et al.*, 2005)). Esse tipo de abordagem utiliza elementos finitos e anatomia macroscópica tridimensional de tecidos. Esse modelo já foi estudado por Suzuki *et al.* em diferentes circunstâncias de tratamento por eletroquimioterapia (SUZUKI *et al.*, 2015, 2017; SUZUKI; MARQUES; RANGEL, 2016).

O modelo de Miklavcic é limitado por ser estático e sua resposta é aproximadamente a condutividade máxima ao final de aplicação de protocolo ESOPE. Uma forma de considerar processos dinâmicos, como processos dispersivos e não lineares, é o método do circuito equivalente do professor Ramos (RAMOS; WEINERT, 2018). Esse método caracteriza o tecido por componentes elétricos discretos (condutâncias e capacitâncias). As ramificações de componentes discretos descrevem a passagem de corrente para diferentes frequências, e o somatório destas descreve a alteração de corrente macroscópica no tecido no domínio da frequência.

O modelo da eletroporação em tecido é independente dos modelos de célula única e suspensão de células. Atualmente há estudos de ponte entre modelos de eletroporação de célula única e tecido. Esses estudos levam em conta a morfologia do tecido (estrutura microscópica). Apesar disso, ainda são necessários novos estudos para consolidar esse tipo de transformação (DERMOL-CERNE; MIKLAVCIC, 2018; DYMEK *et al.*, 2015).

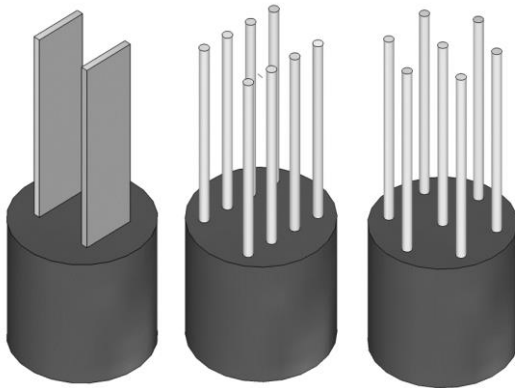
3.5.3.3 Dispositivos

O tratamento por eletroporação em tecidos necessita aplicações de tensão da ordem de quilo Volt. Essas geralmente estão associadas com passagem de correntes na ordem de dezenas de amperes. O protocolo ESOPE especifica a aplicação de campo elétrico (oito pulsos com duração

de 100 μ s, taxa de repetição de 1 Hz a 5 kHz e amplitude de 100 kV/m a 130 kV/m), tipos de eletrodos que devem ser utilizados em função do tumor (três tipos de eletrodos representados na Figura 17) e quimioterápicos compatíveis (MIR *et al.*, 2006). Destaca-se o equipamento comercial IGEA Cliniporator (BERTACCHINI *et al.*, 2010; IGEA, 2018), este é utilizado na Europa para tratamento por ECT em humanos.

Atualmente, pesquisa-se novas configurações de eletrodos e aplicação em diferentes tumores. Principalmente objetivando tratamentos internos de maneira minimamente invasiva (SANO *et al.*, 2018).

Figura 17 – Tipos de eletrodos compreendidos pelo padrão ESOPE. (a) Eletrodo de placas paralelas. (b) Eletrodo de agulhas paralelas. (c) Eletrodos de matriz hexagonal.



Fonte: Próprio autor.

3.6 ELETROPORAÇÃO APLICADA

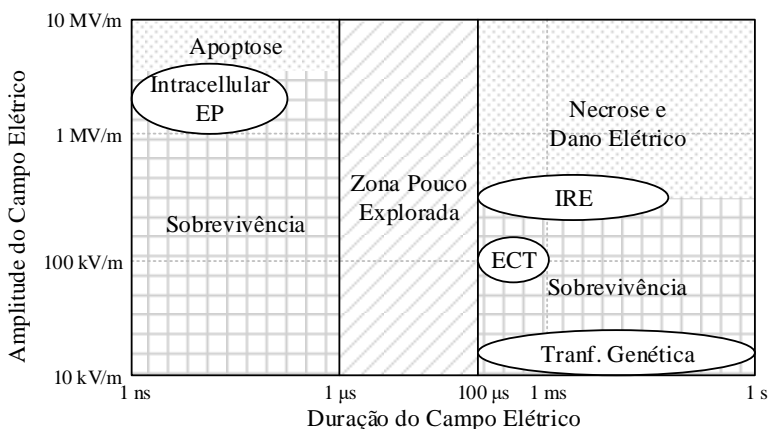
A Figura 18 mostra um mapa sintetizado dos efeitos da aplicação de campos elétricos superiores à 10 kV/m em células biológicas. O mapa apresenta indicações de regiões de ocorrência de eletroporação e morte celular. Esses são em função da amplitude do campo elétrico e duração da aplicação. Estes dois parâmetros são mandatórios no fenômeno de eletroporação (GONZALEZ; RUBINSKY, 2010; MIKLAVČIČ; PUC, 2006; WEAVER *et al.*, 2012). No mapa da Figura 18 também são indicados regiões de principais aplicações da eletroporação:

- Eletroquimioterapia (ECT) (seção 3.6.3.1);
- Ablação não térmica (IRE, “*Irreversible Electroporation*”) (seção 3.6.3.2);

- Transferência genética (seção 3.6.1);
- Eletroporação de organelas (*Intracellular EP*).

Ainda assim, existem regiões de sobrevivência que podem ser aplicáveis em futuras aplicações. A região de necrose e dano elétrico geralmente é evitada, pois o fenômeno de dano não é por eletroporação e sim por destruição térmica (destruição molecular), este tipo de dano é prejudicial para o tecido.

Figura 18 – Mapa dos efeitos em célula devido aplicação de campos elétricos externos. O mapa mostra resultados em função da duração e amplitude de campo elétrico.



Fonte: Adaptado de Weaver (WEAVER *et al.*, 2012).

3.6.1 Transferência Genética

As técnicas de transferência de genes tradicionais, como micro injeção, pistola de genes biológicos, infecção viral, lipofecção e tecnologia transgênica, são usualmente utilizadas para transferência genética (EHRENGRUBER *et al.*, 2001; FENG *et al.*, 2000; MA *et al.*, 2002; O'BRIEN *et al.*, 2001; SAHLY *et al.*, 2003). No entanto, vírus e lipofecção podem ter efeitos tóxicos. E, pistola de genes biológicos e microinjeção podem produzir danos físicos (MURAMATSU *et al.*, 1997).

A transferência genética com técnica de eletroporação não apresenta as características negativas das técnicas tradicionais. Portanto, pode ser aplicado a uma gama mais ampla de situações. Além disso, a

eletroporação pode só depender de eletrodos e pode ser executada com mais facilidade (UESAKA *et al.*, 2009) e rapidez (IVORRA *et al.*, 2009).

O processo de eletroporação é consolidado em laboratório de microbiologia e biotecnologia, e existem diversas fabricantes desse tipo de equipamento. Destacam-se as empresas BTX Molecular Delivery Systems (parte da família de companhias Harvard Bioscience, HBIO) e Invitrogen (parte da Thermo Fisher Scientific Corporation).

3.6.2 Tecnologia *Lab on a Chip*

Dispositivos embarcados com técnicas de eletroporação e outras técnicas de manipulação celular, como eletroforese e técnicas derivadas (dieletroforese, eletrorotação eletroleitação), são candidatos promissores para diagnósticos clínicos e estudos científicos. Esses dispositivos são construídos para trabalhar com nano e micro fluídos e são conhecidos na literatura por “*lab on a chip*” (ALSHAREEF *et al.*, 2013; CHANG *et al.*, 2015; LEE; TSENG; DI, 2017; PARK; BASSAT; YOSSIFON, 2014; SANTRA; TSENG, 2013; WANG *et al.*, 2014).

Enfatiza-se os dispositivos *lab on a chip* são promissores por algumas razões (CHAO; ROS, 2008; FOX *et al.*, 2006; GUO; ZHU, 2016; SANTRA; TSENG, 2013):

- Dimensão compatível com células e organelas únicas. Podendo ser construídos com estruturas da ordem de micro e nano metros;
- Baixo custo de produção, quando compatíveis aos métodos de produção por deposição, conforme padrão na indústria de microchips;
- Baixo consumo de energia;
- Baixa toxicidade e baixa contaminação devido ao tamanho reduzido dos dispositivos. Consequentemente, preservação da viabilidade celular;
- Possibilidade de estudar pequenos volumes de amostra;
- Maior taxa de transferência de material quando comparado à eletroporação em suspensão (IONESCU-ZANETTI; BLATZ; KHINE, 2008).
- Possibilidade de eletroporação de uma parte bem definida da membrana (LSCMEP, “*Localized Single Cell Membrane Electroporation*”) (IONESCU-ZANETTI; BLATZ; KHINE, 2008; SANTRA; TSENG, 2013).

3.6.3 Tratamento de Câncer

A eletroporação é utilizada de duas maneiras no tratamento de câncer. Na primeira, chamada de eletroquimioterapia (EQT), a eletroporação é aplicada em conjunto com quimioterapia. Na segunda, usa-se ablação não térmica por eletroporação irreversível (IRE) (ZUPANIC; KOS; MIKLAVČIC, 2012).

3.6.3.1 Eletroquimioterapia

A ECT consiste em combinar a eletroporação reversível com agentes quimioterápicos (bleomicina e cisplatina) para remoção de tumores. Em 2006 foi criado o padrão ESOPE para procedimentos de ECT (MIR *et al.*, 2006). Atualmente, a ECT é um tratamento de câncer utilizado para tratamento de tumores cutâneos e subcutâneos em clínicas europeias (PUCIHAR; MIR; MIKLAVČIČ, 2002; SUÁREZ *et al.*, 2014) e clínicas veterinárias no Brasil, Argentina e Europa (CALVET *et al.*, 2014; SUZUKI *et al.*, 2015, 2017). A ECT é recomendada para tratamento de melanoma e carcinoma cutâneo e sarcoma subcutâneo⁹ (CANCER RESEARCH UK, 2018; MIR *et al.*, 2006).

A ECT aumenta a eficiência na entrega da droga para a célula quando comparado com a quimioterapia. Essas características são desejadas em tratamentos de tumores em regiões que a margem cirúrgica

⁹Os cânceres são classificados pela sua localização primária (topográfica ou morfológica). É apresentado nesse trabalho a classificação morfológica, que descreve o tipo de célula do tumor (histológico), e pode ser dividido em cinco categorias principais:

- Melanoma: proveniente de transformações de melanócitos. Geralmente ocorre na pele;
- Carcinoma: proveniente de transformações de células epiteliais, estas revestem as superfícies internas e externas do corpo;
- Sarcoma: proveniente de transformações de células de origem mesenquimal, por exemplo, osso esponjoso, cartilagem, gordura e músculo.
- Leucemia: proveniente de transformações de células da medula óssea;
- Linfoma: proveniente de transformações de células linfáticas.

O padrão internacional para a classificação de tumores (topográfica e morfológica) é o *International Classification of Diseases for Oncology (CID-O-3)* da *World Health Organization*. Para classificação clínica (estágio ou extensão da doença) pode ser utilizado o sistema de TNM da *International Union Against Cancer*.

tradicional não é possível ou prejudica a qualidade da vida do paciente, como cabeça, pescoço e mãos (ou patas). Margens de excisão do melanoma cutâneo variam de 10 a 50 mm (WHEATLEY *et al.*, 2016). Devido à seletividade da ECT, as células tumorais são eliminadas enquanto o tecido normal é preservado. Os agentes quimioterápicos podem ser aplicados de maneira intravenosa e a margem de segurança em volta do tumor pode ser garantida. O tratamento pode fornecer segurança e bons resultados estéticos (SNOJ *et al.*, 2007).

Ainda assim, a ECT aumenta a resposta do sistema imunológico, apresenta efeitos anti-hemorrágicos e pode manter procedimentos conservadores em paralelo à ECT, como quimioterapia e/ou remoção cirúrgica (CALVET; MIR, 2016).

3.6.3.2 Ablação Não Térmica

O tratamento de tumores por eletroporação também pode ser realizada de forma irreversível (IRE) por ablação não térmica levando a morte celular devido à excessivas perturbações na estrutura da membrana celular e não devido a inserção de agentes quimioterápicos como a ECT. O excesso de perturbação (permeabilização) na membrana faz com que a célula perca a homeostase devido grande troca de substâncias (como íons) pela membrana, isso ocasiona a morte celular por apoptose (JOURABCHI *et al.*, 2014). A IRE é uma modalidade alternativa à ECT, e é considerada segura e eficaz para tratamento de carcinomas internos (SCHEFFER *et al.*, 2014).

É importante que a ablação não tenha efeito térmico, essa característica facilita respostas imunológicas e evita formação de cicatrizes e necrose do tecido (DAVALOS; RUBINSKY, 2008; GARCIA; DAVALOS; MIKLAVCIC, 2014; JOURABCHI *et al.*, 2014).

Atualmente há separação dos tratamentos de ECT e IRE. Apesar disso, é conhecido por simulações numéricas, que o protocolo ESOPÉ utiliza campos superdimensionados, ou seja, que podem provocar IRE (SUZUKI; MARQUES; RANGEL, 2016).

3.6.4 Pasteurização

Microrganismos vivos realizam a decomposição metabólica de alimentos perecíveis, transformando-os em componentes mais simples, que depreciam as propriedades sensoriais¹⁰ dos alimentos. Esse processo

¹⁰São propriedades sensoriais dos alimentos: cor, textura, aroma e sabor.

de deterioração pode tornar o alimento não comestível para os seres humanos ou reduzir sua qualidade de comestibilidade.

Alguns microrganismos são nocivos e podem ser um problema de saúde pública. Isso causa doenças transmitidas por alimentos que podem ser letais. Por exemplo, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* (LUCERA *et al.*, 2012). A destruição de microrganismos vivos, principalmente bactérias, aumenta a segurança e a qualidade dos alimentos.

O processamento de alimentos por temperatura é um método de preservação de alimentos. Esse processo visa matar os microrganismos patogênicos. Tornando a comida segura para comer e armazenar. No entanto, sabe-se que a pasteurização térmica tem efeitos sobre a composição de nutrientes e propriedades sensoriais dos alimentos. Tais como, aroma, sabor, textura e cor (VEGA-MERCADO *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2015).

Existe interesse por alimentos de baixo processamento, frescos e com longos prazos de validade. O consumo de alimentos naturais e frescos traz benefícios para a saúde (BRANCH, 2012). Manter as propriedades sensoriais originais de alimentos é um fator importante a ser considerado nos processos da indústria de alimentos. A pasteurização por campos elétricos pulsados não-térmicos (PEF) é uma ferramenta promissora que pode aumentar a qualidade da pasteurização. Ela utiliza fenômeno da eletroporação irreversível para inativar microrganismos e pode fornecer alimentos seguros e com aspectos sensoriais mais semelhantes aos não processados.

O PEF consiste em aplicar campos elétricos com magnitude de 100 a 500 kV/m com durações de 1 a 100 μ s em alimentos líquidos, semilíquidos ou sólidos (GOLBERG; FISCHER; RUBINSKY, 2010; PUTRI; SYAMSIANA; HAWA, 2010). Atualmente os processos PEF são de passagem única (ou contínua) e são utilizados em escala industrial (ELEA, 2018; FLISAR *et al.*, 2014; PULSEMASTER, 2018)

Observa-se que a provável primeira aplicação de inativação de microrganismos por PEF foi em 1898 por Fuller. Ele realizou múltiplas descargas de alta tensão (~ 3MV/m) em amostras de água de rio e detectou efeito bactericida que não era devido ao acréscimo de temperatura (de 2 °C) (FULLER, 1898).

3.6.5 Extração de Materiais Intracelulares

A técnica de eletroporação pode ser utilizada para extrair substâncias de microrganismos. Essa técnica apresenta vantagens em

relação as técnicas tradicionais como químicas e mecânicas. Por exemplo, o uso da eletroporação permite extração de material em menor tempo (ordem de microssegundos a milissegundos), com mais eficiência de extração e em geral não necessita de químicos adicionais. Ainda assim, a técnica permite extração com preservação de viabilidade celular (o que não é garantido em técnicas químicas e mecânicas) (HABERL MEGLIC; MAROLT; MIKLAVCIC, 2015).

A técnica de extração de materiais pode ser realizada em pequenas populações de células ou em escala industrial (sistemas de passagem contínua como no caso da pasteurização). Destacam-se algumas extrações:

- Proteínas de bactérias (HABERL MEGLIC; MAROLT; MIKLAVCIC, 2015);
- Lipídios de microalgas (FLISAR *et al.*, 2014);
- Proteínas de microalgas (COUSTETS *et al.*, 2013);
- Proteínas de leveduras (RAMOS; LIMA, 2012; SUGA; HATAKEYAMA, 2009).

4 SISTEMA PARA APLICAÇÃO DE PULSOS DE TENSÃO ELÉTRICA PARA TÉCNICAS DE ELETROPORAÇÃO

O equipamento eletroporador corresponde a um gerador de onda quadrada de tensão elétrica, com amplitude de até ordem de quilo volts e período na ordem de microssegundos a milissegundos. O eletroporador utiliza eletrodos para imposição de campo elétrico pulsado na amostra biológica.

O eletroporador desenvolvido nessa dissertação é propriedade intelectual (patente requerida ao SINOVA-UFSC RPI00060) de título “Equipamento para Aplicação de Pulsos de Tensão Elétrica de Amplitude, Período e Forma de Onda Variáveis e Análise de Efetividade para Técnicas de Eletroporação na Transfecção Genética e Tratamento de Neoplasias”. Foi orientado a não publicação de topologia de hardware e descrição de firmware desenvolvidos até obtenção de número da requisição de propriedade intelectual (patente requerida). Os inventos relacionados são mostrados no Apêndice A.

4.1 INTRODUÇÃO

É de conhecimento que a eletroporação tem relação com amplitude, frequência, forma, número e taxa de repetição do pulso (WEAVER *et al.*, 2012). A combinação de diversas possibilidades paramétricas (amplitude, duração e número de pulsos), inseridas pelo operador do eletroporador, possibilita atingir de maneira reversível ou irreversível os sistemas celulares de células animais e vegetais, seja esses preparados em suspensão de células ou tecido, e *in vivo* ou *in vitro*.

O desenvolvimento de novos protocolos pode ser importante para melhora do tratamento por eletroporação. Por exemplo, alguns pacientes relatam que a eletroquimioterapia provoca sensações desagradáveis durante a aplicação de pulsos elétricos (PUCIHAR; MIR; MIKLAVČIČ, 2002). Isso se deve à baixa taxa de repetição utilizada para o tratamento (ESOPE com taxa de repetição de 1 Hz), conseqüentemente cada um dos oito pulsos do protocolo excita as fibras nervosas localizadas próximas aos eletrodos. Isso resulta em oito contrações musculares dolorosas e que podem alterar o posicionamento dos eletrodos, e causar falha no tratamento. Protocolos com taxa de repetição elevada podem resultar em alterações semelhantes de permeabilidade celular e serem menos desconfortáveis ao paciente (única contração) (PINTARELLI *et al.*, 2016).

Nos tratamentos por eletroquimioterapia, recomenda-se o planejamento do tratamento (pré-tratamento) com simulações numéricas. Essa prática pode aumentar a qualidade e efetividade do tratamento (ZUPANIC; KOS; MIKLAVCIC, 2012). O planejamento requer conhecimento das características elétricas da região tratada e modelo da eletroporação. Posteriormente, pode ser necessário eletrodos customizáveis e eletroporador com protocolo configurável (SUZUKI *et al.*, 2015, 2017; SUZUKI; MARQUES; RANGEL, 2016).

O fenômeno da eletroporação (reversível ou irreversível) ocasiona alterações nas características elétricas do tecido, o que reflete em alterações de corrente durante as aplicações (seção 3.4). A alteração de propriedades elétricas pode ser interpretada como *feedback* de ocorrência de eletroporação ou para pesquisa de novos modelos de alteração de propriedades elétricas da amostra em função da eletroporação. Por causa desses motivos, é desejado que o eletroporador possua capacidade de aquisição de tensão e corrente sobre a amostra durante aplicação de protocolos. A frequência de aquisição deve ser superior a 100 kHz, considerando frequência do protocolo ESOPE de até 10 kHz (Apêndice D), apesar disso é de conhecimento que ondas retangulares possuem espectro de frequência superior a esse valor.

Nesse trabalho foi objetivado desenvolvimento de eletroporador para viabilizar tratamentos customizáveis de eletroporação (reversíveis e irreversíveis), estudar novos protocolos, operar diferentes tipos de amostras biológicas e eletrodos e que realizasse aquisição de sinais de tensão e corrente para modelagem e *feedback* do fenômeno de eletroporação.

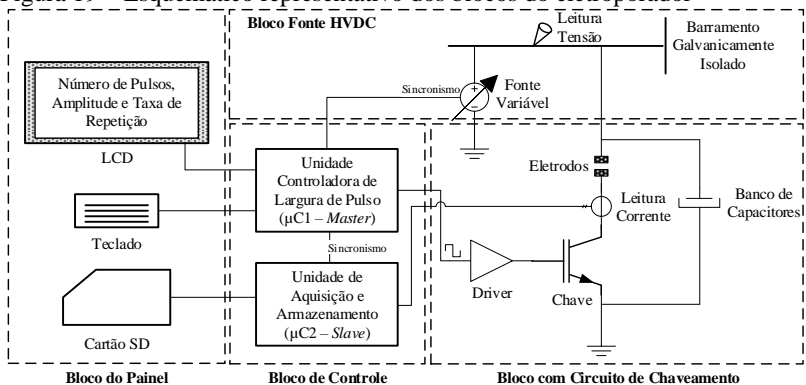
4.2 PROJETO ELETRÔNICO ELETROPORADOR

O projeto eletroporador foi realizado de maneira modular. Os principais módulos dos sistemas são: painel, controle, fonte de alta tensão contínua (HVDC) e circuito de chaveamento. Esses blocos são dispostos na Figura 19. A descrição individual dos módulos do eletroporador é:

- i. Painel: É formado por botões e display tipo LCD. Esse é a maneira de interação do usuário com o eletroporador. Esse permite seleção de protocolos previamente programados por computador (armazenados no micro controlador μ C1). As características do protocolo são mostradas no LCD. Após o tratamento o usuário pode recolher informações de tensão, corrente e instante de

- aplicação (*real-time clock*), essas são armazenadas no cartão SD.
- ii. Controle: São as placas lógicas com os dois microcontroladores, responsáveis por processamento dos pulsos ($\mu C1$) e da aquisição de tensão e corrente ($\mu C2$). Os dois microcontroladores se comunicam através de barramento i2c. Para o funcionamento do sistema limitado à aplicação sem aquisição de dados não é necessário presença do $\mu C2$ (procedimento que diminui o custo do equipamento). A aquisição de corrente é feita com transformador de corrente (TC) projetado (dados não disponíveis nessa dissertação) e a aquisição de tensão é feita divisor resistivo compatível a alta tensão (até 5 kV).
 - iii. Circuito de Chaveamento: Uma chave tipo IGBT é utilizada para chaveamento da fonte de alta tensão isolada. Devido ao comando do IGBT ser incompatível com o $\mu C2$ utiliza-se driver para interface entre esses sistemas. Sugere-se que esse bloco seja remoto e o mais próximo possível do ponto de aplicação (eletrodos).
 - iv. Fonte de Alta Tensão DC (HVDC): Essa fonte apresenta isolamento galvânico da rede elétrica da ordem de milhares de volts. Procedimento necessário para segurança elétrica (compatível com ABNT 60601). A fonte HVDC fonte é variável até 800 Volts e é comercial.

Figura 19 – Esquemático representativo dos blocos do eletroporador



Fonte: Próprio autor.

4.2.1 Sistema de Aquisição de Sinais

4.2.1.1 Condicionamento do Sinal Analógico e Conversão Digital

A leitura de tensão é feita sobre o banco de capacitores (valor HVDC) e a leitura de corrente é feita com um transformador de corrente (TC) com núcleo de ferrite. É conhecido que o TC é um filtro passa alta na ordem de unidade de Hertz. Por causa disso, há perda de informação para frequências nessa ordem. Apesar disso, o TC apresentou resultados mais satisfatórios (melhor tempo de subida) em comparação com sensores comerciais como ACS750 e ACS712 (dados não presentes).

O sistema de condicionamento dos sinais analógicos é composto por estágio de filtro analógico passa baixa do tipo Butterworth de quarta ordem de 100 kHz. Esses têm propósito de evitar sombreamento do sinal¹¹ (*anti aliasing*). Utilizou-se projeto de filtro Butterworth devido a esse apresentar resposta aproximadamente plana na banda passante (até 100 kHz) e alteração de fase ser próxima a zero até uma década antes da frequência de corte, que é 10 kHz.

Durante o condicionamento do sinal analógico não há alteração teórica da forma do sinal até frequência de 10 kHz (essa é a frequência que um pulso de 100 μ s possui mais de 95 % de sua energia, apêndice D) por dois motivos: não há atenuação na banda passante (até 100 kHz) e não há atraso de grupo¹² (*group delay*) de componentes de frequência até 10 kHz. Esse procedimento é recomendado em condicionamento de sinais com diversas componentes de frequências e quando não se deseja perder o formato do sinal (OPPENHEIN; WILLISKY; NAWAB, 1996).

Após condicionado, o sinal é digitalizado por dois conversores analógico-digital (ADC), do μ C2, de 12 bits e frequência de aquisição de 200 kHz (um para tensão e outro para corrente). Os conversores não são sincronizados e há atraso de 2,5 μ s entre leitura de tensão e corrente. Esse atraso não foi considerado um fator limitante devido uso de análise por

¹¹Sombreamento de sinais (*aliasing*) é um fenômeno que impede reconstrução e distinção de sinais após amostragem, se esses forem adquiridos em frequências menores que o conteúdo de frequência do sinal (Teorema de Nyquist). Esse efeito deve ser prevenido com filtros *anti aliasing*.

¹²Atraso de grupo (*group delay*) é a derivada da alteração de fase. Esse tipo de atraso altera a forma de sinais com várias componentes de frequências.

médias durante os pulsos (capítulo 5). Em trabalhos futuros recomenda-se adora aquisição simultânea.

4.2.1.2 Calibração

O modelo de regressão linear utilizado para calibração do sistema de aquisição de dados do eletroporador é de primeira ordem e de acordo com a equação 8. Os parâmetros a e b foram calculados utilizando MATLAB R2014a (função “polyfit”). O valor de significância, coeficientes de determinação e diagnóstico de dispersão foram obtidos com softwares R Studio e R Commander. O cálculo das regressões foi realizado com valores médios de oito repetições de pulsos de 100 μ s.

$$(Valor\ Real\ [V\ ou\ I]) = a \cdot (Valor\ Leitura\ ADC\ [bits]) + b \quad (8)$$

Para calibração de valor de tensão foi adotado o seguinte procedimento: utilizou-se multímetro Fluke 175 como padrão ouro e foram registrados doze intervalos de tensão (de 50 V até 600 V) espaçados em 50 V. O modelo de regressão linear para tensão é de acordo com a Figura 20a.

Foram realizadas calibração para duas faixas de medição de corrente, que são até 5 A e 12 A. A faixa de medição pode ser alterada de acordo com o ganho do sistema de aquisição analógico (este procedimento altera a resolução da aquisição). Para calibração de valor de corrente foi adotado o seguinte procedimento: utilizou-se o analisador de impedância Agilent 4294A para caracterizar a impedância de resistores de potência em 10 kHz. Os valores medidos de impedância dos resistores utilizados são $98,08 + j \cdot 5,30 \Omega$ e $46,58 + j \cdot 1,43 \Omega$ (o primeiro foi utilizado na calibração até 5 A e o segundo até 12 A). A frequência de 10 kHz foi utilizada com base na concentração de energia de sinal de 100 μ s, que em sua maior parte está antes de 10 kHz (Apêndice D). Desconsiderou-se a característica indutiva (parte imaginária) e a lei de Ohm foi aplicada para definir padrão ouro de corrente. Foram utilizados onze intervalos de corrente de 0,5 A até 5,5 A (espaçadas em 0,5 A) e 1 A até 12 A (espaçadas em 1A). Os modelos de regressão linear para corrente são de acordo com a Figura 20b e c, para 5 A e 12 A respectivamente.

Os coeficientes dos modelos de regressão são de acordo com a Tabela 1. O valor de significância dos modelos de regressão linear é menor que 1% ($p < 2,2 \cdot 10^{-6}$) e os coeficientes de determinação (R^2) maior que 0,999. Os resíduos de ambos modelos são apresentados no apêndice C. Com base na análise dos resíduos foi concluído que não há outra

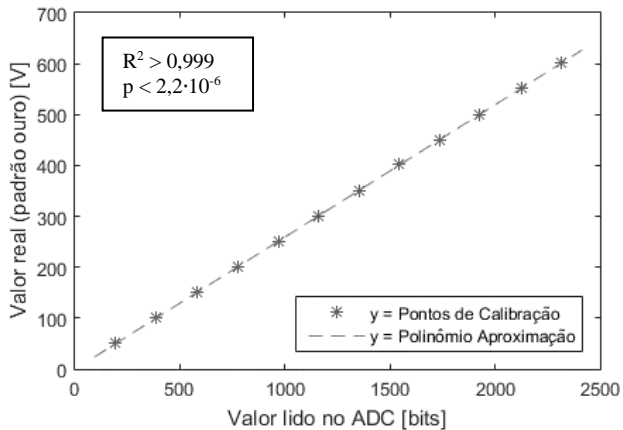
variável interferindo nos dados obtidos. O pior caso da análise de resíduos foi utilizado como valor de resolução esperada do sistema. Nessa estão inseridos erros de quantização do ADC e erros na etapa analógica de condicionamento de sinais. Obteve-se de resolução de 7 V para leitura de tensão, 48 mA na leitura de corrente até 5 A e 240 mA na leitura de corrente até 12 A.

Tabela 1 – Coeficientes a e b do modelo de regressão para calibração das leituras de tensão e corrente.

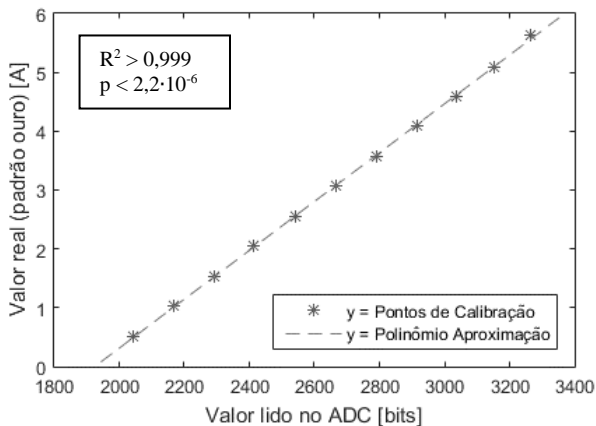
Coeficiente	Aquisição tensão	Aquisição corrente (até 5A)	Aquisição corrente (até 12A)
a	0,2598	$4,150 \cdot 10^3$	$8,759 \cdot 10^3$
b	-0,4596	-7,987	-16,80

Fonte: Próprio autor.

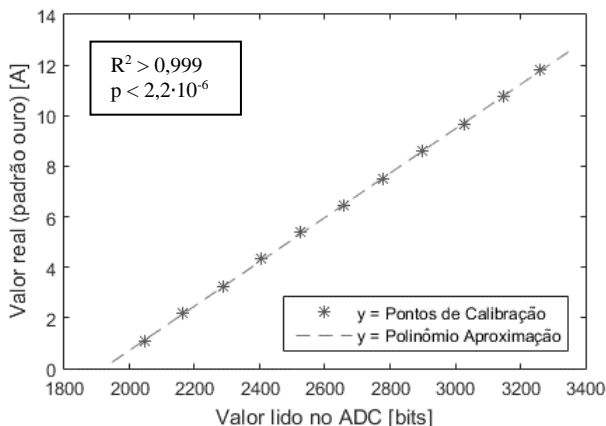
Figura 20 – Modelos de regressão linear utilizados para calibração do sistema de aquisição de dados. (a) Modelo aquisição de tensão. (b) Modelo aquisição de corrente (até 5 A). (c) Modelo aquisição de corrente (até 12 A).



(a)



(b)



(c)

Fonte: Próprio autor.

4.2.1.3 Armazenamento Digital de Dados

Os dados do sistema de aquisição são salvos em pilha em cartão de memória do tipo *micro Secure Digital* (microSD) em sistema de arquivo tipo “*text documents*” separados por vírgulas (.txt/.csv), compatível com Microsoft Excel, MATLAB e outros softwares. Os dados são salvos com cabeçalho (*header*) e matriz que contém especificação do protocolo, base de tempo, valor de tensão e corrente, estados internos das chaves de potência (dados não presentes nessa dissertação) e número do pulso. A estrutura é de acordo com a Figura 21. Nesta figura, o cabeçalho contém as informações de configurações programadas pelo usuário (“Settings:

Protocol: 8X M / 100 μ s”), nesse são informados o número de pulsos (“8X”), tipo (“M” para monopolar e “B” para bipolar¹³) e duração (“100 μ s”). Após o cabeçalho é disponível o número do pulso (“P1”) e uma matriz com cinco colunas. A primeira coluna é respectiva aos tempos de leitura do dado (“Time [μ s]”), a segunda sobre a tensão lida no banco de capacitores (“V”), a terceira sobre a corrente que circula na carga (“I”) e a quarta e quinta sobre os estados internos¹⁴ das chaves tipo IGBT do equipamento (“HV. H e HV. S”).

Figura 21 – Exemplo de estrutura de dados criada no cartão SD do eletroporador.

Time [μ s],	V,	I,	HV. H., HV. S,	
P1 = [
0,	1168,	1903,	0,	0,
5,	1160,	1910,	0,	0,
10,	1167,	1913,	1,	1,
15,	1182,	1920,	1,	1,
20,	1152,	2335,	1,	1,
25,	1162,	2342,	1,	1,
30,	1174,	2323,	1,	1,
35,	1167,	2321,	1,	1,
40,	1163,	2331,	1,	1,
45,	1167,	2312,	1,	1,
50,	1179,	2319,	1,	1,
55,	1155,	2319,	1,	1,
60,	1173,	2304,	1,	1,

Fonte: Próprio autor.

¹³Nomeia-se pulso bipolar aquele que possui inversão de tensão (passagem por zero). O pulso bipolar não é suportado pelo equipamento apresentado nessa dissertação e pode ser suportado por novos equipamentos.

¹⁴Os estados internos são leituras binárias de comando (*gate*) das chaves de potência. O equipamento apresentado possui uma chave IGBT. Se HV. H. e HV. S. são “1” então a chave está acionada e na saída há pulso monopolar. Se HV. H. e HV. S. são “0” a chave está em aberto (alta impedância ou *three-state*). Se HV. H. é “1” e HV. S. são “0” então há inversão de tensão na saída (não suportado pelo equipamento dessa dissertação).

Observa-se que as informações de tensão e corrente salvas no cartão microSD não passam por processamento digital, ou seja, esses valores são os lidos nos registradores do conversor analógico-digital de 12 bits (0 até 4095 bits). Os mesmos devem ser convertidos para tensão e corrente com software para este propósito (valores da regressão disponíveis na Tabela 1). Esse procedimento foi adotado para não demandar esforços computacionais do microcontrolador. O código de processamento em MATLAB é disponível em repositório online atualizado pelo autor: <github.com/gpintarelli/EP_DT_Software>.

4.2.2 Segurança em Equipamentos Médicos

Requisitos de segurança devem ser considerados durante o desenvolvimento, manufatura e uso de um equipamento eletroeletrônico destinado à área médica. Nessa seção é proposto análise preliminar de estudo de caso de uso médico de um equipamento eletroporador em ambiente hospitalar (em humanos). Observa-se que não há norma específica para o uso médico desse equipamento no Brasil, portanto foram destacados critérios básicos e preliminares em relação à segurança elétrica e segurança sanitária. O uso de eletroporador para tratamento de humanos (eletroquimioterapia) somente é permitido na Europa e sua segurança é discutida na literatura (PAKHOMOV; MARKOV; MIKLAVČIČ, 2010)

Observa-se que o protótipo desenvolvido não apresenta certificações e seu objetivo é o uso em pesquisa da eletroporação em laboratório.

Maior detalhamento de classificações de segurança do equipamento eletroporador são disponíveis no Apêndice B.

4.2.2.1 Segurança Elétrica

A norma técnica ABNT/IEC 60601 (norma técnica referentes à equipamentos eletromédicos, dividida em partes) é o padrão técnico de segurança elétrica adotado no Brasil e é derivado de normas internacionais. Essa norma discute os possíveis perigos relacionados ao uso de eletricidade em equipamentos eletromédicos.

O eletroporador é alimentado pela rede elétrica, possui tensão interna de até 800 V e a energia armazenada em banco de capacitores é de 150 Joules. Essas características representam possível risco de choque ao operador e paciente. Por isso, alguns mecanismos de proteção devem ser adotados (PRUTCHI; NORRIS, 2004).

A primeira barreira de proteção contra o choque elétrico é o gabinete (isolação básica). As partes acessíveis do equipamento desenvolvido são todas de plástico isolante (invólucro, botões e LCD). O gabinete também impede acesso a parte viva (rede elétrica), portanto não há caminho para a corrente de choque elétrico nessas partes. E em caso de falha da isolamento básica, foi adotado a isolamento independente por transformador isolador.

O equipamento desenvolvido não possui sinais de entrada e saída e nem conexões com outros equipamentos. Por causa disso, não foi adotado isolamento dos sinais de dados. Observa-se que é necessário abrir o equipamento para acesso aos sinais de dados e programação por computador (programação de novos protocolos), esse procedimento somente deve ser realizado por usuários experientes em ambiente seco e sem conexão com nenhum tipo de eletrodo.

A parte mais crítica do equipamento é a parte aplicada, que são partes metálicas de saídas para os dois eletrodos. Esses podem ser conectados ao paciente. Nesse projeto adotou-se isolamento galvânica¹⁵ por transformador isolador na fonte do equipamento. Essa técnica faz com que todas as partes metálicas do equipamento, no caso, saídas para os eletrodos, fiquem em flutuação em relação a rede elétrica (parte flutuante tipo BF¹⁶).

4.2.2.1.1 *Compatibilidade Eletromagnética*

Os dispositivos eletrônicos em geral devem atender aos requisitos de compatibilidade eletromagnética (EMC)¹⁷. Essa padronização é

¹⁵A isolamento galvânica é o termo que especifica comunicação e/ou troca de energia entre circuitos de referências independentes, sem passagem de corrente direta. Existem: isolamento com transformador isolador (geralmente usado na entrada da fonte de alimentação) e isolamento ótica (geralmente usado para isolar sinais de dados com uso de optoacopladores).

¹⁶Parte BF é uma classificação de parte aplicada da ABNT/IEC 60601 que indica que essa parte aplicada é eletricamente isolada da terra e outras partes do equipamento médico (parte eletricamente flutuante).

¹⁷Requisitos EMC: apresentar imunidade a descargas eletrostáticas (ESD), a campos eletromagnéticos externos, surtos/quedas/variações de tensão. Ainda assim, cumprir com critérios de interferência eletromagnética (EMI), do tipo propagação conduzida – relacionada a perturbações na rede elétrica – e radiada – relacionada a perturbações eletromagnéticas –.

definida pelas ABNT NBR IEC/CISPR 11 e ANBT IEC 61000. Nessa subseção foram feitas observações sobre EMC do eletroporador.

Em relação a EMI, a parte crítica do eletroporador é a fonte chaveada e placas com microcontroladores. Esses podem ser susceptíveis a sofrer ou gerar interferências. O circuito de chaveamento dos eletrodos não produz perturbações ao longo do tempo, portanto não é parte crítica de EMI.

A isolação necessária para segurança elétrica (transformador isolador) proporciona segurança contra ESD, uma vez que não há caminho para a terra nas partes metálicas do equipamento (saída dos eletrodos).

Em relação a oscilações de tensão da rede elétrica, o projeto contempla fonte chaveada. Esse tipo de fonte costuma apresentar imunidade em relação a qualidade da rede elétrica e ampla amplitude de tensão de entrada (*full range power supply*).

Para completa adequação do eletroporador às normas de EMC provavelmente serão necessários: inclusão de filtro EMI na entrada do equipamento, adição de blindagem eletromagnética, alteração no layout das placas com microcontroladores e da fonte chaveada (estudo e separação de planos de terra, disposição de trilhas e componentes), possível alteração da frequência de chaveamento da fonte chaveada e proteção adicional contra oscilações da rede elétrica (uso de supressores de surto). Esses procedimentos podem ser discutidos em estudos futuros.

4.2.2.2 Segurança Sanitária

O tratamento por eletroporação pode ser utilizado em tumores cutâneos e subcutâneos. Esse procedimento é considerado invasivo, já que os eletrodos podem penetrar parcialmente para dentro do corpo. Os eletrodos são usados de maneira transitória somente nos períodos de aplicação com duração de segundos. Os eletrodos podem ser descartáveis. Caso não sejam descartáveis, estarão sujeitos a processo de esterilização, ou seja, devem apresentar material compatível a esse processo. O risco sanitário associado ao uso de equipamento é de acordo com resolução RDC nº 185 de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).

4.3 INTERFACE E GABINETE DO PROTÓTIPO

Nessa seção são discutidos aspectos gerais de interface e gabinete. O público alvo do protótipo desenvolvido são pesquisadores e

profissionais da área médica. Foi considerado que o equipamento será utilizado em geral por adultos, em ambientes fechados em laboratório ou em sala de cirurgia, sujeitos a iluminação artificial e respingos de líquidos. Para determinação desses aspectos foram observados operação de dois equipamentos eletroporadores comerciais. São mostrados na Figura 22 o Neon® Transfection System (a esquerda), que objetiva transferência genética de células em suspensão, e o VetCP 125® (a direita) objetiva tratamentos de eletroquimioterapia veterinário. Baseado em observação de usuários desse tipo de equipamento forma percebidos dois casos:

- Durante o uso clínico veterinário e operação de transferência genética *in vitro*, o eletroporador usualmente não é configurado (são usadas configurações padrões);
- Na prática de pesquisa do IEB-UFSC, o equipamento é constantemente reconfigurado por usuários com experiência em eletrônica.

Figura 22 – Eletroporadores observados. À esquerda Neon® Transfection System. À direita VetCP 125®.



Fonte: Próprio autor.

A fim de atender diferentes situações, por padrão o protótipo é configurado com protocolo ESOPE (8 pulsos, 100 μ s de duração e taxa de repetição de 1 Hz) e protocolo de transferência genética (1 pulso de 1 ms), sendo somente necessário ajustar a tensão. Para ajustes de diferentes protocolos, que geralmente é feito por usuários com conhecimento avançado, pode-se programa-lo por meio de computador.

O equipamento desenvolvido pode ser operado, de forma redundante, por pedal ou pelo seu painel (teclado e display LCD). A operação por pedal é interessante para casos que o usuário quer realizar a aplicação e ao mesmo tempo ter liberdade de posicionar o eletrodo com as duas mãos. Em algumas situações o usuário conta com um assistente que também pode operar o equipamento.

O protótipo foi montado em uma caixa de montagem de poliestireno de alto impacto e com tampa em policarbonato e dimensões 450 x 300 x 200 mm. Devido utilização em ambientes molhados, foi selecionada caixa de montagem com proteção conta poeira e imersão em água (IP 67). A caixa também conta com proteção contra impactos (IK09).

Observa-se que é necessário projeto de interface e gabinete para tornar o protótipo dessa dissertação em produto.

4.4 RESULTADOS

Foram montados dois equipamentos. O primeiro possui fonte de ajuste fino de até 120 V, esse é recomendado para operar células *in vitro* mais susceptíveis à eletroporação e eletrodos de pequenas dimensões (ordem de centenas a milhares de micrometros). E o segundo possui fonte sem ajuste fino de até 800 V. Esse é recomendado para células menos susceptíveis à eletroporação *in vitro*, tratamento de tecidos e eletrodos de dimensões de ordem de milímetros a dezenas de milímetros. A montagem dos protótipos do eletroporador é de acordo com a Figura 23.

Nessa dissertação são apresentados resultados do eletroporador com fonte de 800 V. São dispostos resultados com cargas conhecidas. Para isso, foram utilizados resistores não indutivos de 50 Ω e 50 W, que são resistores padrões comerciais. A impedância da carga conhecida é de $46,58 + j \cdot 1,43 \Omega$ (medida com Agilent 4294A em 10 kHz). Os registros com cargas conhecidas foram feitos utilizados osciloscópio Tektronix TDS2024C com ponta de prova de tensão TPP0100 e ponta de prova de corrente A622. São apresentados:

- Formas de onda de tensão e corrente para pulsos de 100 μ s e amplitudes de 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 e 800 V na Figura 24. Quando a amplitude do pulso é de 800 V, que é o pior caso, a corrente na carga foi de aproximadamente 16 A;
- Tempos de subida e descida de pulso 100 μ s em situação de pior caso (amplitude de 800 V) na Figura 25. Foram feitas medições com duas interpretações, que são: tempo de subida (t_s) e descida (t_d) de 10 % a 90 %, que foram 380 ns e 172 ns respectivamente; e tempo de subida (t'_s) e descida (t'_d) de 10 % até o término do período transitório, que foram 1,03 μ s e 2,74 μ s respectivamente. Observa-se que os transitórios possuem frequências superiores a 1

MHz, portanto, não têm efeito sobre a membrana celular, uma vez que existe atraso no carregamento da membrana (indução de potencial transmembrana) em função de sua característica capacitiva;

- Na Figura 26a e b são apresentados o tempo mínimo e máximo de pulso, que são 10 μ s e 1 ms respectivamente. Não há forma de onda da corrente durante pulso de 10 μ s devido à ponta de prova não apresentar velocidade suficiente para aquisição desse sinal;
- Na Figura 26c é apresentada aplicação de trem de pulsos contém oito pulsos de 100 μ s em nível alto e 100 μ s em nível baixo. Essa configuração caracteriza taxa de repetição de 5kHz.

Baseado nos resultados do projeto eletrônico, listou-se as seguintes especificações finais do projeto:

- Tensão máxima de saída: 800 Vdc;
- Corrente máxima de saída: 16 A;
- Largura de Pulso: 10 μ s – 1 ms;
- Aquisição de tensão média em pulso de 100 μ s com resolução de ± 7 V.
- Aquisição de corrente média no pulso de até 5 A com resolução menor que 50 mA ou até 12 A com resolução menor que 240 mA;
- Taxa de repetição dos pulsos: 1 Hz até 5 kHz;
- Alimentação: 127 ou 220 V (chave seletora) / 60 Hz / 0,15 A (220 V).

O protótipo de eletroporador desenvolvido nessa dissertação está instalado no IEB-UFSC e é utilizado em experimentações relativas a técnicas de eletroporação. Lista-se alguns exemplos de aplicação do eletroporador (dados referentes a trabalhos que não pertencem a essa dissertação):

- Aplicação de 390 V sobre tecido vegetal de batata *in vitro* e marcação de eletroporação (publicado em anais de evento e revista internacional (BERKENBROCK *et al.*, 2018b, 2018a)). Para esse registro foram utilizados osciloscópio Tektronix TDS2024C com ponta de prova de tensão modelo TPP0100. A batata é um modelo visual da eletroporação. Detalhes da experimentação na Figura 27;
- Estudo de viabilidade celular de células Sertoli *in vitro* aderentes com marcador Trypan Blue em função da

amplitude do protocolo de eletroporação. As células são coradas em azul não são viáveis de acordo com a metodologia do trabalho. O trabalho encontra-se em desenvolvimento. Detalhes da experimentação na Figura 28;

- O estudo de viabilidade de leveduras *S. Cerevisiae* é capítulo 5 dessa dissertação.

Figura 23 – Protótipos eletroporador desenvolvidos e montados durante essa dissertação. (a) Eletroporador para aplicações de tensão até 120 Volts com ajuste fino de tensão. (b) Eletroporador para aplicações até 800 Volts sem ajuste fino de tensão.



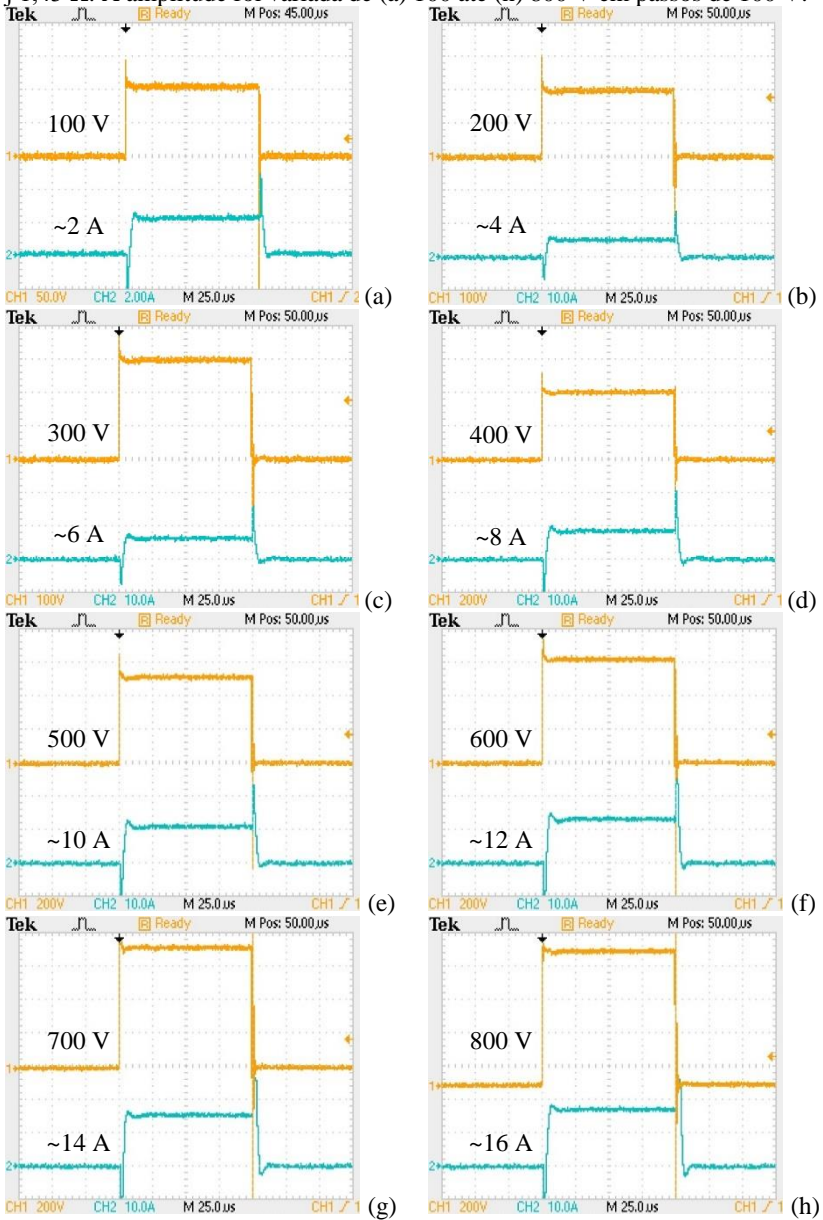
(a)



(b)

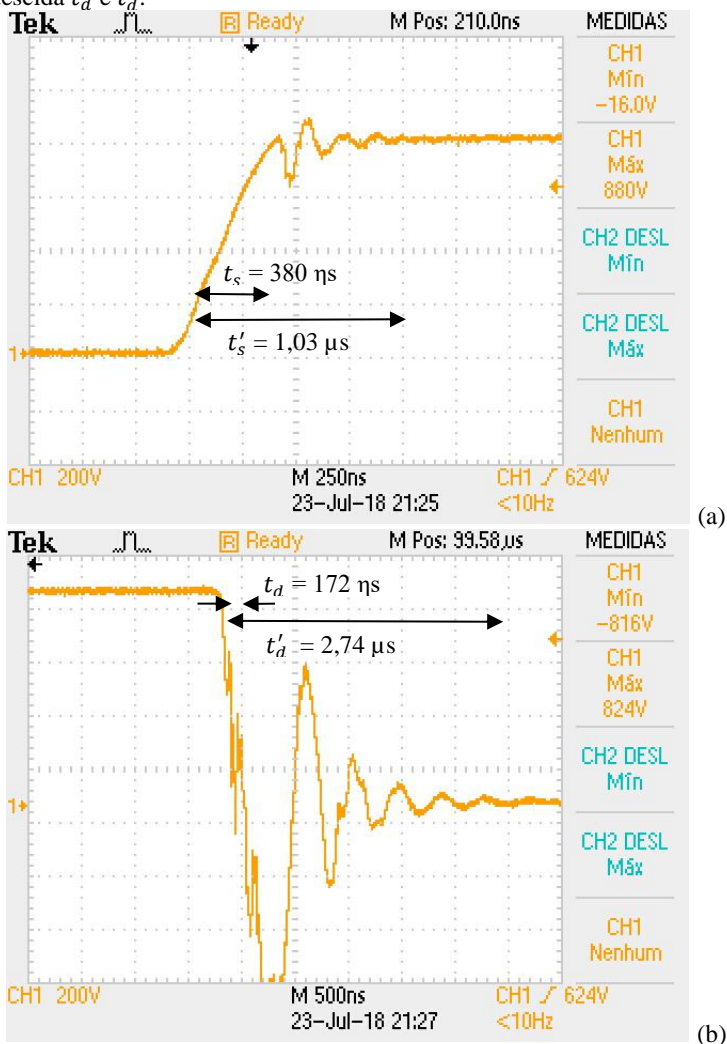
Fonte: Próprio autor.

Figura 24 – Demonstração de aplicação de pulso de $100\ \mu\text{s}$ em carga de $46,58 + j \cdot 1,43\ \Omega$. A amplitude foi variada de (a) 100 até (h) 800 V em passos de 100 V.



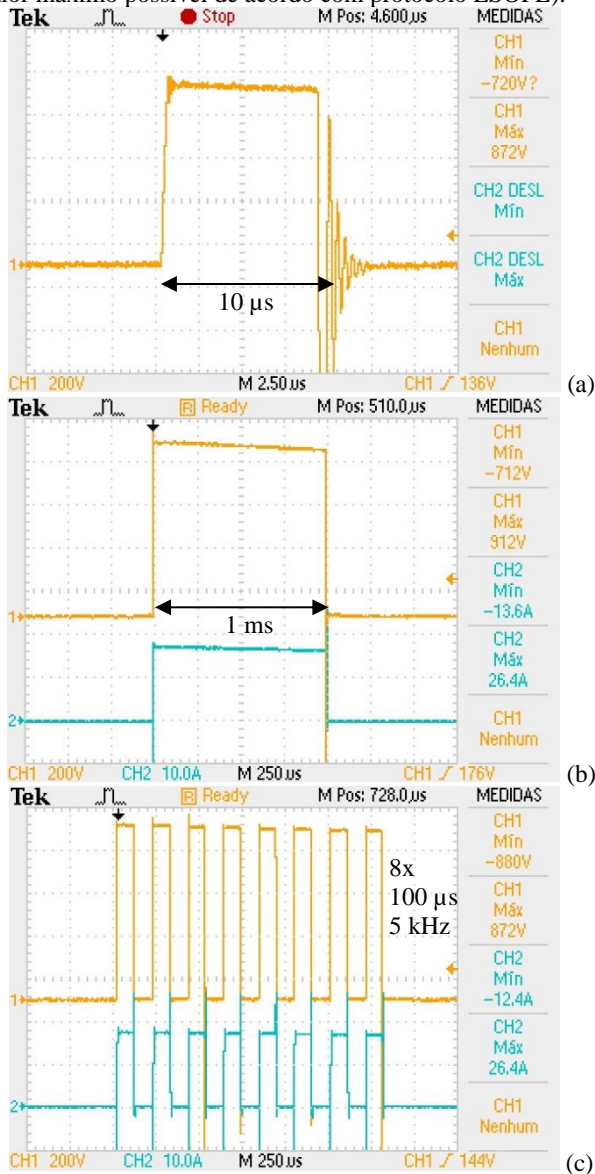
Fonte: Próprio autor.

Figura 25 – Demonstração de tempos de subida e descida em pulso de 100 μs e 800 Volts em carga de $46,58 + j1,43 \Omega$. (a) Tempos de subida t_s e t'_s . (b) Tempos de descida t_d e t'_d .



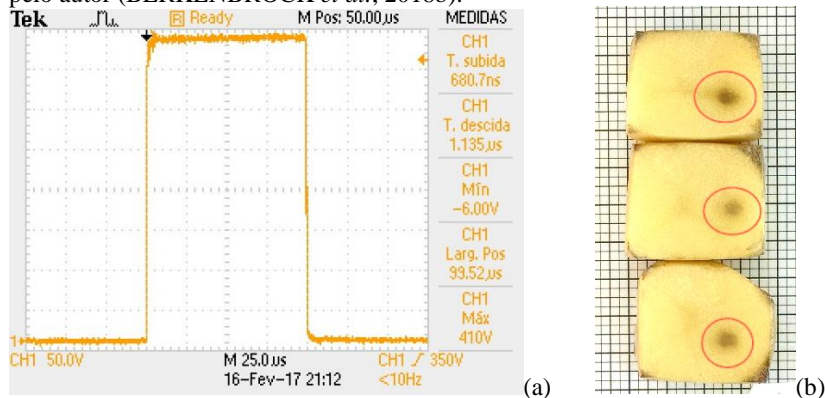
Fonte: Próprio autor.

Figura 26 – Em (a) pulso com duração de 10 μ s (valor mínimo possível). (b) Pulso com duração de 1 ms (valor máximo possível). (c) Trem de oito pulsos de 100 μ s (valor máximo possível de acordo com protocolo ESOPE).



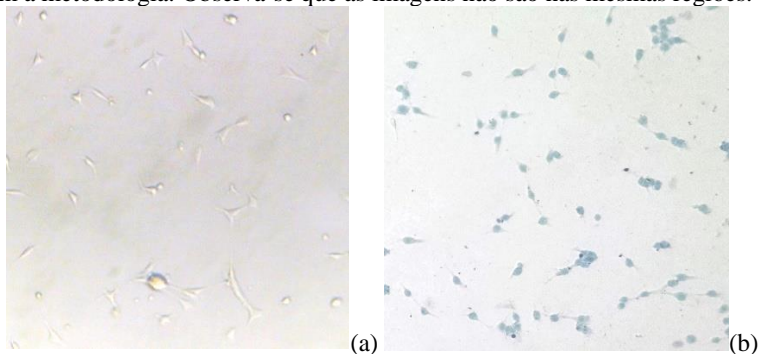
Fonte: Próprio autor.

Figura 27 – (a) Aplicação de 390 Volts em modelo de tecido vegetal (batata). A batata é um modelo visual da eletroporação, as áreas de eletroporação são visualizadas conforme marcado por círculos vermelhos em (b). Estudo publicado pelo autor (BERKENBROCK *et al.*, 2018b).



Fonte: Próprio autor.

Figura 28 – Estudo de viabilidade celular de células Sertoli *in vitro* aderentes com marcador Trypan Blue em função da amplitude do protocolo de eletroporação. (a) Células viáveis (sem marcação azul) anteriores da aplicação de protocolo de eletroporação. (b) Aplicação de protocolo de oito pulsos de 70 kV/m e 100 μs. Nesse caso as células são coradas em azul, portanto não são viáveis de acordo com a metodologia. Observa-se que as imagens não são nas mesmas regiões.



Fonte: Próprio autor.

4.5 CONCLUSÃO

O equipamento desenvolvido é um gerador de ondas quadradas programável e compatível aos protocolos de eletroporação. O protótipo é flexível e versátil porque pode ser combinado com diferentes eletrodos e protocolos podem ser configurados para aplicação de técnicas de eletroporação reversível e irreversível em células únicas, pequenas populações celulares (células aderentes e suspensões) e tecidos. O equipamento possui saída variável em tensão (até 800 V e corrente máxima de saída de 16 A) e possui módulo de aquisição de sinais (frequência de aquisição de 200 kHz) de tensão (resolução de ± 7 V) e corrente (resolução ± 50 mA até 5 A ou resolução de ± 240 mA até 12 A).

O equipamento desenvolvido é um protótipo e são discutidos aspectos para torná-lo um produto. O equipamento desenvolvido é propriedade intelectual requerida da Universidade Federal de Santa Catarina (processo SINOVA-UFSC RPI 00060) e foi utilizado para os ensaios de técnicas de eletroporação deste trabalho, bem como em pesquisas no IEB-UFSC após ano de 2017.

5 ESTUDO DE VIABILIDADE E ALTERAÇÃO DE IMPEDÂNCIA EM LEVEDURAS *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* SOB APLICAÇÃO DE CAMPOS ELÉTRICOS

Esse capítulo teve objetivo de estudo de viabilidade e alteração de impedância em leveduras *Saccharomyces Cerevisiae* sob aplicação de campos elétricos.

5.1 INTRODUÇÃO

De acordo com o capítulo de eletroporação aplicada (seção 3.6), eletroporação é um método utilizado para tratamento de câncer, transferência genética, retirada de conteúdo intracelular e pasteurização. Nessas aplicações é importante o conhecimento da resposta e viabilidade celular em função do campo elétrico aplicado. Ainda assim, é interessante conhecer alterações elétricas celulares para *feedback* da eletroporação e entendimento do fenômeno da eletroporação (seção 3.4).

Na prática científica o uso de leveduras é vantajoso pela facilidade de manipulação e rápido crescimento. Por exemplo, a levedura é utilizada como célula modelo de câncer, a mesma apresenta genes de controle de crescimento celular semelhantes a maioria das células vivas (MATUO *et al.*, 2012). Segundo *Cancer Research UK* (CANCER RESEARCH UK, 2013):

“[...] we (humans and yeast) still share strong similarities with our single-celled distant cousins. Around forty per cent of human genes are also found in yeast, including the fundamental genetic instructions that tell cells when to grow and divide.”

Em processos industriais, as leveduras, como *Saccharomyces Cerevisiae* e gênero *Kluyveromyces*, são utilizadas para produção de proteínas. Algumas proteínas são localizadas no meio intracelular (GANEVA; GALUTZOV; TEISSIÉ, 2003). A técnica de eletroporação tem potencial para extrair substâncias desses microrganismos (ver seção 3.6.5).

Esse trabalho propõe analisar a viabilidade e propriedades elétricas de leveduras *Saccharomyces Cerevisiae* em função da aplicação de protocolo ESOPÉ. Esse protocolo é utilizado em tratamentos de câncer por ECT (ver seção 3.6.3.1). Em novos estudos, a levedura pode ser uma célula modelo no IEB-UFSC para do fenômeno de eletroporação e posterior aplicação desse modelo em células tumorais.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram analisados nessa dissertação: a viabilidade, mudanças na parede celular e mudanças de impedância de leveduras antes, durante e após a aplicação de protocolos de eletroporação. A viabilidade foi mensurada com cinco repetições (N = 5). Alterações na parede da célula (por imagem de microscopia eletrônica) foram obtidas em dualidade (N = 2). A análise de impedância foi realizada com sete repetições (N = 7).

5.2.1 Experimento In Vitro

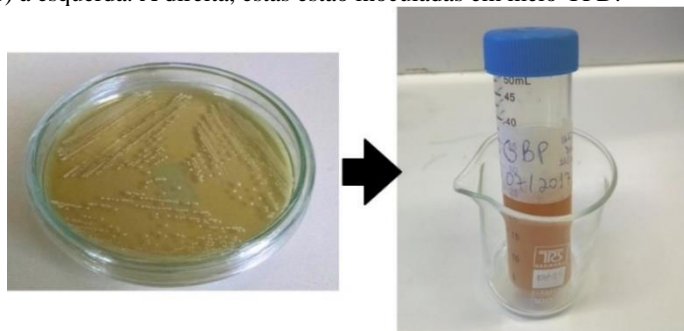
5.2.1.1 Preparação da Suspensão de Células

Leveduras do tipo *Saccharomyces Cerevisiae* (registros CCT 0761 e ATCC 36900) foram inoculadas com auxílio do Laboratório de Bioprocessos (Microbiologia, MIP) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Utilizou-se meio de cultivo “*Yeast Peptone Dextrose*” (peptona bacteriológica 20 g/L, extrato de levedura 10 g/L, d-glicose anidra 20 g/L e diluição em água destilada - YPD). Todos os meios YPD foram separados em porções de 10 mL em recipientes do tipo Falcon 50 mL. Após isso, os meios foram esterilizados em autoclave (120 °C, 1,25 kgf/cm² durante 15 minutos) e armazenados sob refrigeração (6 °C) até o momento do uso. O potencial hidrogeniônico (pH) do meio YPD deve ser aproximadamente 5,5. O meio YPD fabricado nesse trabalho possui PH de 5.74 (medição com Bioclock Scientific® pH meter 99620).

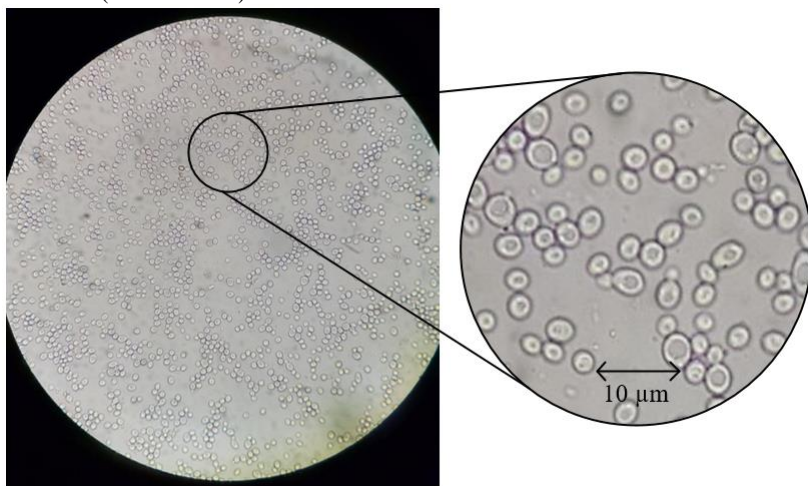
As amostras de leveduras foram inoculadas a partir de colônias em 15 mL de meio YPD e colocadas em estufa (30° C) por 24 horas. Esse intervalo é necessário para reprodução das leveduras. A colônia de leveduras e meio YPD com leveduras inoculadas são mostrados na Figura 29. A suspensão de leveduras vista a partir de microscópio ótico é de acordo com Figura 30. O raio das leveduras é igual a $3,46 \cdot 10^{-6}$ (a determinação do raio foi realizada no apêndice F).

Figura 29 – Colônias de levedura *Saccharomyces Cerevisiae* (CCT 0761, ATCC 36900) à esquerda. À direita, estas estão inoculadas em meio YPD.



Fonte: Próprio autor.

Figura 30 – Leveduras preparadas e dispostas em lâmina de microscópio ótico Biofocus (BIO1600BA).



Fonte: Próprio autor.

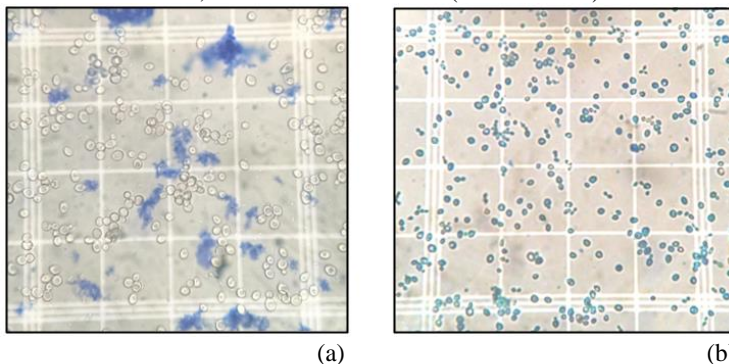
5.2.1.2 Viabilidade Celular

O estudo da viabilidade foi realizado com a substância azul de metileno (*methylene blue*, $C_{16}H_{18}N_3SCl$) diluído à 0,02 % em água destilada. O azul de metileno pode ser utilizado como um indicador para determinar se uma levedura está viva ou não. O azul de metileno penetra em todas as células, se a célula estiver viva o azul de metileno é reduzido em substância incolor por processo enzimático (Figura 31a). Entretanto,

células não viáveis não conseguem reduzir o azul de metileno e são marcadas por coloração azulada (Figura 31b) (KWOLEK-MIREK; ZADRAG-TECZA, 2014; PAINTING; KIRSOP, 1990).

Na experimentação da viabilidade, 600 uL da suspensão de leveduras (Figura 29) foram adicionados à 600 uL de azul metileno (concentração de 0,02 %, diluído em água destilada), ou seja, diluição 1:1. A diluição foi necessária para atingir quantidade celular adequada ao método utilizado. Devem ser contados aproximadamente 50 células por contagem (área de 0,25 x 0,25 mm²) (PAINTING; KIRSOP, 1990). Nesse trabalho a média de contagem foi de 65 células.

Figura 31 – (a) Leveduras controle viáveis. (b) Leveduras foram submetidas ao protocolo de 500 kV/m, essas não estão viáveis (morte celular).

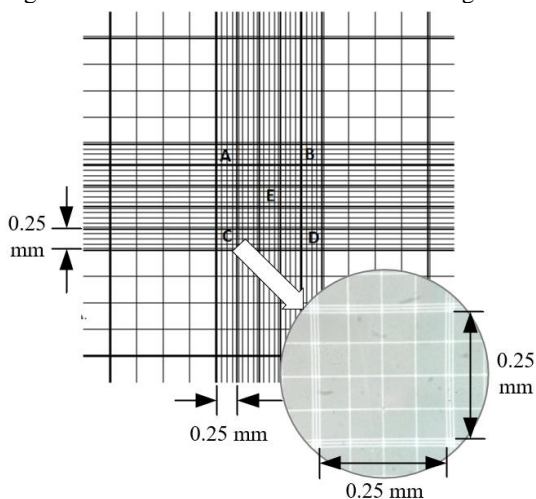


Fonte: Próprio autor.

5.2.1.2.1 Contagem Celular

A contagem celular foi realizada manualmente com câmara de Neubauer. A câmara é demarcada por linhas no fundo que formam a estrutura igual à da Figura 32. Cinco regiões devem ser utilizadas para contagem, essas regiões são indicadas pelas letras A, B, C, D e E (FUENTES, 2018).

Figura 32 – Representação da câmara de Neubauer. As letras A, B, C, D e E indicam as cinco regiões que são utilizadas para contagem. Foi ampliado uma fotografia da região “C”. As dimensões são indicadas na figura.



Fonte: Próprio autor.

5.2.1.2.2 Procedimento Experimental de Viabilidade Celular

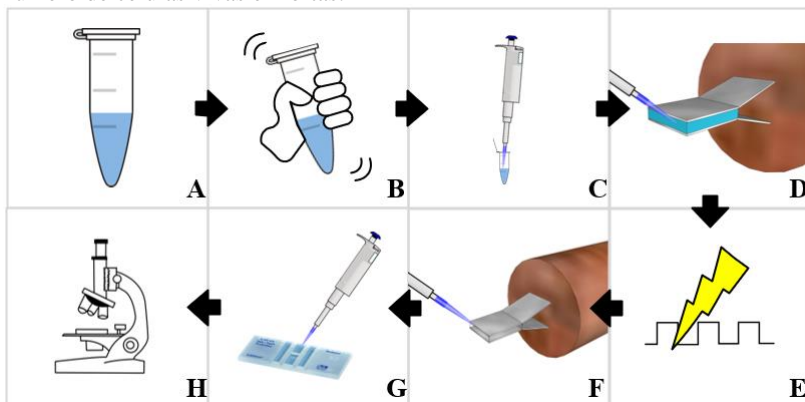
A solução com leveduras foi separada em Eppendorf de 2mL, essa permaneceu à temperatura ambiente (25 °C) durante os ensaios com duração de até 180 minutos.

O método do experimento é conforme a Figura 33. Primeiramente (A) preparar a solução de ensaio, como descrito na subseção 5.2.1.2; (B) Agitar manualmente a solução de ensaio; (C e D) Colocar 40 μ L entre os eletrodos; (E) Aplicar protocolo da eletroporação (ou não, no caso do controle); (F e G) Remover o conteúdo entre os eletrodos e adicionar à câmara de Neubauer. Por fim aguarda-se 5 minutos para sedimentação celular e realiza-se a contagem manual da quantidade de células viáveis e não viáveis, conforme descrito na subseção 5.2.1.2.1. Os eletrodos são limpos e secos com álcool etílico hidratado 70° INPM e o processo era iniciado novamente. O processo completo tem duração de 15 minutos.

Salienta-se que todas as amostras foram submetidas ao mesmo processo (inserção e remoção do sistema de eletrodos), isso incluem as amostras controle. Ainda assim, durante a experimentação leituras de controle e aplicação da eletroporação foram conduzidas de maneira alternada para minimizar a hipótese de dano as leveduras por outros

fatores (tempo, efeitos do azul de metileno e pequenas alterações na temperatura não quantificadas).

Figura 33 – Processo do experimento de contagem da viabilidade. (A) Solução de ensaio; (B) Solução de ensaio agitada manualmente; (C) 40 μL retirados da solução de ensaio; (D) Estes 40 μL são colocados com micropipeta entre os eletrodos; (E) Aplicação de um protocolo de eletroporação; (F) Remoção do conteúdo entre eletrodos; (G) Conteúdo adicionados na câmara de Neubauer. O excedente foi descartado; (H) Aguarda-se 5 minutos e inicia-se a contagem no número de células vivas e mortas.



Fonte: Próprio autor.

5.2.1.3 Estudo com Microscopia Eletrônica

Foi utilizado o microscópio de varredura eletrônica modelo JEOL® JSM-6390LV com auxílio do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC (LCME) para obtenção desse grupo de imagens. O equipamento tem resolução da ordem de nano metros e foi configurado da seguinte maneira: tensão de aceleração de 15 kV, magnificação de 1000x, 6000, e 10000x e modo de baixo vácuo. O equipamento é mostrado na Figura 34.

Figura 34 – JEOL® JSM-6390LV do Laboratório Central de Microscopia Eletrônica da UFSC.



Fonte: Disponível em LCME-UFSC (LCME-UFSC, 2018).

5.2.1.3.1 Procedimento Experimental de Imagens por Microscopia Eletrônica

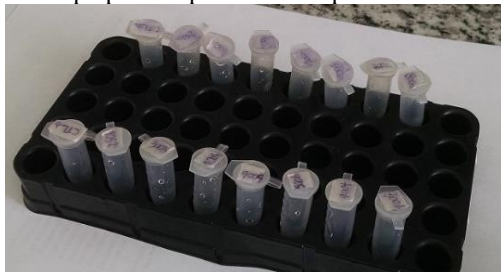
Nesse experimento parcelas de 40 μ L foram retiradas da suspensão de leveduras e adicionadas aos eletrodos para aplicação dos protocolos de eletroporação. Após isso essas amostras eram centrifugadas durante 1 minuto, retirado o excesso do meio YPD e adicionado 40 μ L de água deionizada. Esse processo é denominado de lavagem e foi repetido 3 vezes para cada amostra. O procedimento de lavagem é necessário para remover o meio YPD que gera ruídos na imagem de microscopia eletrônica.

O tempo total de preparo dessas amostras foi de 40 minutos. As amostras foram armazenadas em Eppendorfs de 2 mL (Figura 35) que foram refrigerados à 6° C e deslocados até o LCME (30 minutos de intervalo de deslocamento).

No LCME as amostras foram depositadas em *stubs*, secas no dessecador Marconi MA192 e recobertas em ouro com LEICA EM SCD 500. As amostras prontas para o ensaio com o microscópio eletrônico JEOL® JSM-6390LV são mostradas na Figura 36.

Áreas de presença de detritos e células mortas nas imagens por microscopia eletrônica foram manualmente selecionadas. Essas áreas foram avaliadas com software ImageJ.

Figura 35 – Amostras preparadas para microscopia eletrônica.



Fonte: Próprio autor.

Figura 36 – Amostras recobertas em ouro em *stubs*. Preparação necessária para análise com JEOL® JSM-6390LV.

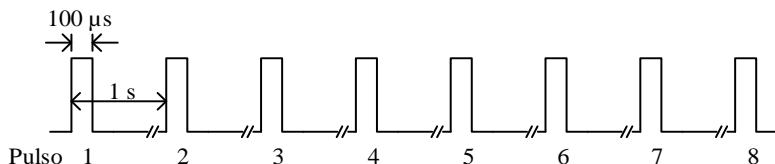


Fonte: Próprio autor.

5.2.1.4 Eletroporador

O equipamento eletroporador desenvolvido nessa dissertação foi utilizado (capítulo 4). Somente as amplitudes dos protocolos foram variadas (saída em tensão do eletroporador). Os demais parâmetros foram fixados em: duração de $100\ \mu\text{s}$ e taxa de repetição de 1 Hz. O protocolo é de acordo com a Figura 37. Este está de acordo com o ESOPE (MIR et al., 2006).

Figura 37 – Protocolo aplicado: oito pulsos de $100\ \mu\text{s}$ e taxa de repetição de 1 Hz.



Fonte: Próprio autor.

5.2.1.5 Estudo de Impedância Elétrica

Os estudos de alteração de impedância antes, durante e após a eletroporação foram conduzidos em sequência de aplicação de 200, 300, 400, 500 e 600 kV/m. A suspensão de leveduras utilizadas foi conforme subseção 5.2.1.1. Observa-se que nessa etapa não há a diluição que ocorre em função de adição de azul de metileno. Portanto esse experimento foi conduzido com a densidade celular dobrada em relação aos experimentos de viabilidade. Foram utilizadas amostras de 20 μL entre eletrodos para essa experimentação.

5.2.1.5.1 Alteração da Impedância Antes e Após Eletroporação

O estudo de impedância elétrica antes e após a eletroporação foi realizado com Agilent 4294A e adaptador Agilent 16047E. O equipamento foi calibrado anteriormente aos ensaios (calibração de circuito aberto, curto circuito e com carga padrão Agilent 04294-61001). O equipamento foi configurado para obtenção de parte real e imaginária da impedância (resistência R e reatância X) de 500 pontos linearmente distribuídos entre as frequências de 40 Hz até 100 kHz.

Segundo literatura, efeitos de polarização de eletrodos são predominantes em frequências até 1 kHz. Existem constatações de diminuição de resistência com leveduras devido eletroporação entre faixa de frequência de 1 kHz a 100 kHz. A abertura de poros facilita a passagem de íons pela membrana celular, o que provoca aumento da condutividade da solução (RAMOS *et al.*, 2012; RAMOS; LIMA, 2012).

5.2.1.5.2 Alteração da Impedância Durante os Pulsos de Eletroporação

Esse estudo foi realizado com sistema de aquisição de dados do equipamento eletroporador desenvolvido (capítulo 4). São realizadas aquisições de tensão e corrente média em cada um dos oito pulsos do protocolo de eletroporação aplicado.

5.2.1.6 Eletrodos

Para aplicação de campo elétrico nas leveduras, foi projetado eletrodos de aço inoxidável ortodônticos biocompatível (AISI 304), conforme Figura 38. Os eletrodos possuem 1 mm de distância (d) e comportam uma amostra de até 42 μL . Os eletrodos são duas placas paralelas de dimensões 6 x 7 mm. Eletrodos na dimensão de milímetros

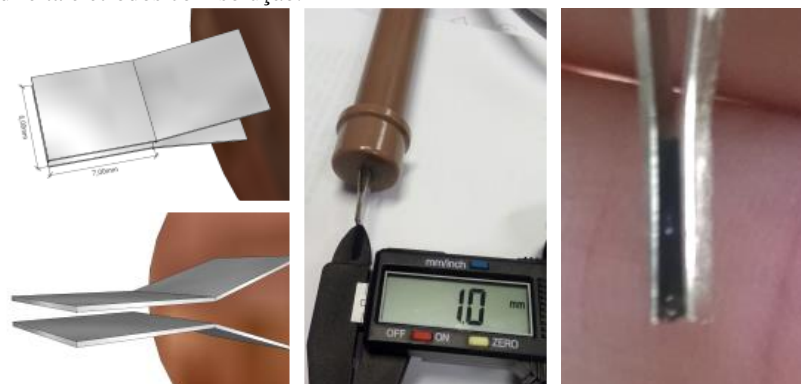
facilitam obtenção de campos elétricos elevados e são compatíveis com a amostra testada. A solução possuir forças intermoleculares suficientes para não extravazar (não necessário cubeta).

Foi utilizado a disposição de placas paralelas para produção de campos elétricos homogêneos entre eletrodos. A superfície dos eletrodos é maior que a superfície de contato entre a suspensão celular e os eletrodos, isso evita difração do campo elétrico.

Procedimentos semelhantes ao utilizados nesse trabalho são descritos na literatura (DERMOL; MIKLAVČIČ, 2015). A relação de amplitude de campo elétrico (E) com a configuração do equipamento (V_{out}) é conforme equação 3 (seção 2.1.4).

Foram aplicados campos de 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700 e 800 kV/m nas amostras, ou seja, a saída do eletroporador foi configurada em 200, 250, 300, 400, 500, 600, 700 e 800 Volts respectivamente.

Figura 38 – À esquerda duas projeções dos eletrodos. Ao centro os eletrodos construídos e medição com paquímetro da abertura da distância entre placas. À direita eletrodos com solução.



Fonte: Próprio autor.

5.2.1.7 Monitoramento de Variações de Temperatura

O monitoramento de variações de temperatura foi realizado em conjunto com os experimentos de alteração de impedância elétrica (subseção 5.2.1.5). Esse procedimento é importante, pois a alteração de temperatura em soluções iônicas pode alterar a condutividade da solução em paralelo à eletroporação (SMITH, 2011).

5.2.1.7.1 Cálculo Analítico

Utilizando a equação de alteração da temperatura na amostra (disponível no Apêndice E) foi calculado as alterações de temperatura por protocolo. Foi realizado hipótese de densidade e calor específico da solução com leveduras igual à da água pura. O valor dos parâmetros é disponível na Tabela 2.

Tabela 2 – Parâmetros para cálculo analítico da temperatura.

Parâmetro	Valor
Tempo de Aplicação	$100 \cdot 10^{-6}$ s
Condutividade Elétrica	0,405 S/m
Calor Específico Volumétrico	4,18 J/(m ³ °C) (em 25°) (CENGEL; GHAJAR, 2015)

Fonte: Próprio autor.

5.2.1.7.2 Procedimento de Medição Experimental

A medição da alteração de temperatura experimental foi realizada antes/após 30 segundos da aplicação sequencial dos protocolos de 100kV/m até 600 kV/m. Foi utilizado termômetro infravermelho Benetech GS320 apontado para a superfície exterior dos eletrodos.

5.2.1.8 Diferenciação estatística

Foram realizados testes estatísticos não pareados e não paramétricos. Esse tipo de teste é compatível aos dados, porque as amostras são independentes (teste não pareado) e não é suposto distribuição gaussiana (não paramétricos). A hipótese de distribuição não gaussiana é uma hipótese de pior caso e adequada para os experimentos que possuem baixo número de repetições. Nestes não é adequado afirmar a maneira que os dados são distribuídos (se a distribuição é normal ou não).

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparação de dois grupos e o teste de Kruskal-Wallis para comparação de mais de dois grupos. O teste *post-hoc* de Dunn corrigido (comparação par a par ou *pairwise comparison*) foi utilizado para descobrir onde está a diferença detectada pelo teste de Kruskal-Wallis.

A probabilidade de significância (valor p) utilizada foi de 5% ($p = 0,05$). Utilizou-se a seguinte notação: “ns” se não há diferença

significante ($p > 0,05$); “*” se há ligeira diferença significativa ($p \leq 0,05$); “**” se há moderada diferença significativa ($p \leq 0,01$); e “***” se há intensa diferença significativa ($p \leq 0,001$).

5.2.1.9 Condutividade da Solução com Leveduras com Condutivímetro

As condutividades da solução (YPD com leveduras) e diluições experimentadas foram medidas com equipamento medidor de condutividade Sanxin SX-650 (a temperatura de 24,5 °C) e diluição foram anotadas na Tabela 3. Observa-se que a fabricante não disponibiliza a frequência de medição, que tipicamente é 1 kHz.

Tabela 3 – Condutividades nas situações experimentais.

Tipo	Valor (S/m)	Observação
YPD com leveduras sem diluição	0,405	Situação experimental no estudo de análise de impedância e microscopia eletrônica
YPD com leveduras e diluição 1:1 em água deionizada com 0,02 % azul de metileno	0,210	Situação experimental no estudo de viabilidade

Fonte: Próprio autor.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Densidade e Viabilidade Celular

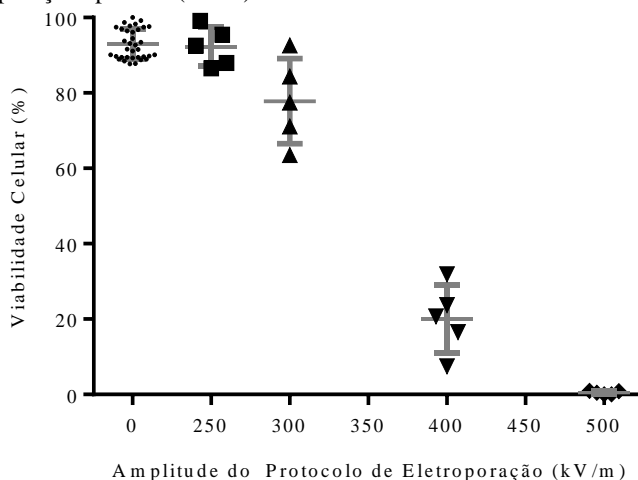
A densidade celular observada nos experimentos de viabilidade (diluição 1:1) foi igual a $12,45 \cdot 10^6$ células por mL, esse valor corresponde a mediana dos dados. O percentil inferior é igual a $6,353 \cdot 10^6$ e percentil superior igual $66,58 \cdot 10^6$ células por mL. No total foram 55 contagens. A densidade não segue a distribuição normal e por isso pode ser utilizado a mediana e percentil para representar esses valores.

Os estudos de análise de impedância e de microscopia eletrônica foram realizados sem diluição de 1:1, ou seja, densidade celular é o dobro. Assim, a mediana da densidade celular é $24,90 \cdot 10^6$ células por mL. Esse valor representa fração volumétrica¹⁸ igual a 0,004320 (considerando as leveduras esféricas com raio igual a $3,46 \cdot 10^{-6}$, a determinação do raio foi realizada no apêndice F).

¹⁸A fração volumétrica é razão de volume ocupado por células em relação ao volume total.

A viabilidade celular em função de protocolos de eletroporação (250, 300, 400 e 500 kV/m) e controle são mostrados na Figura 39. Os dados de protocolos de eletroporação foram realizados em cinco repetições (N = 5). O “controle” indicado na primeira posição (“0”) do eixo x é respectivo à todas as leituras de controle do experimento (durante os 180 minutos de experimento), com trinta e cinco repetições (N = 35). O teste de Kruskal-Wallis detectou diferença significativa ($p < 0,0001$) em um nos dados. Os testes *post-hoc* (controle “0” comparados com todos os protocolos) são mostrado na Tabela 4. Esse teste conclui diferença estatística entre controle e aplicações de 400 e 500 kV/m.

Figura 39 – Viabilidade celular em função da amplitude do protocolo de eletroporação aplicado (N = 5).



Fonte: Próprio autor.

Tabela 4 – Teste *post-hoc* de grupos da Figura 39.

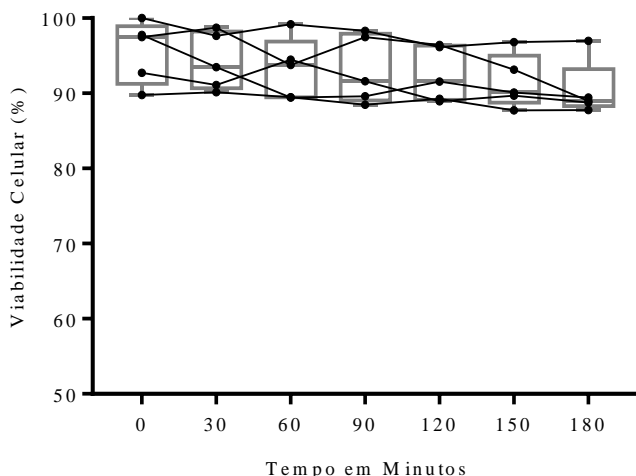
Comparação	Significância	Valor p
0 vs. 250	ns	>0,9999
0 vs. 300	ns	0,1803
0 vs. 400	**	0,0036
0 vs. 500	***	0,0002

Fonte: Próprio autor.

O estudo da viabilidade do controle no tempo (avaliado a cada 30 minutos) em cinco repetições (N = 5) são apresentados na Figura 40. Os dados são conectados por linhas e combinados em *box plot* por grupos de

tempo. O objetivo dessa análise é de minimizar a hipótese de dano as leveduras por outros fatores (tempo, efeitos do azul de metileno, contaminações e pequenas alterações na temperatura não quantificadas). Devido aos experimentos individuais terem inclinação positiva e negativa acredita-se que a viabilidade celular não teve alteração ao longo do experimento. Esse fato também faz não ser adequado comparação estatística entre grupos (tempos), pois isso não representa a situação individual das amostras.

Figura 40 – Viabilidade Celular em função do tempo decorrido do experimento (N = 5).

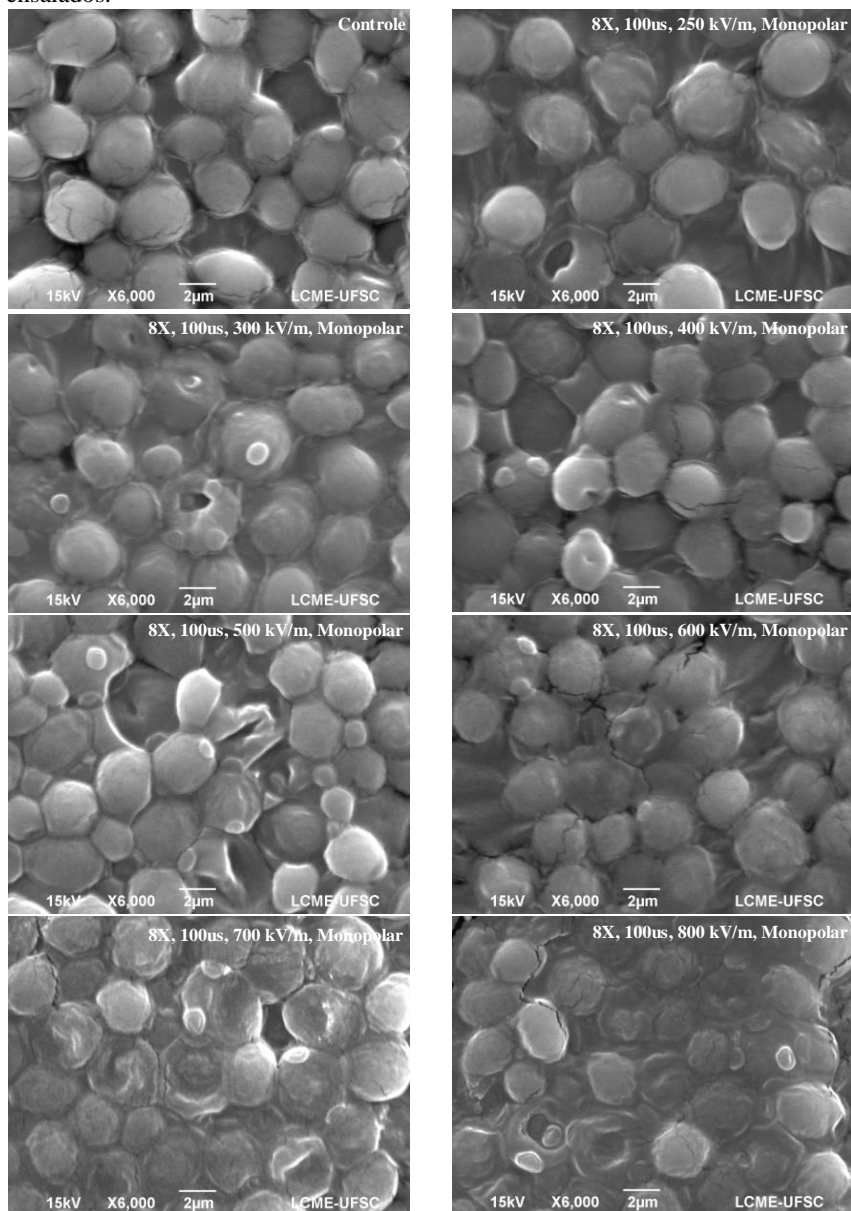


Fonte: Próprio autor.

5.3.2 Estudo por Microscopia Eletrônica

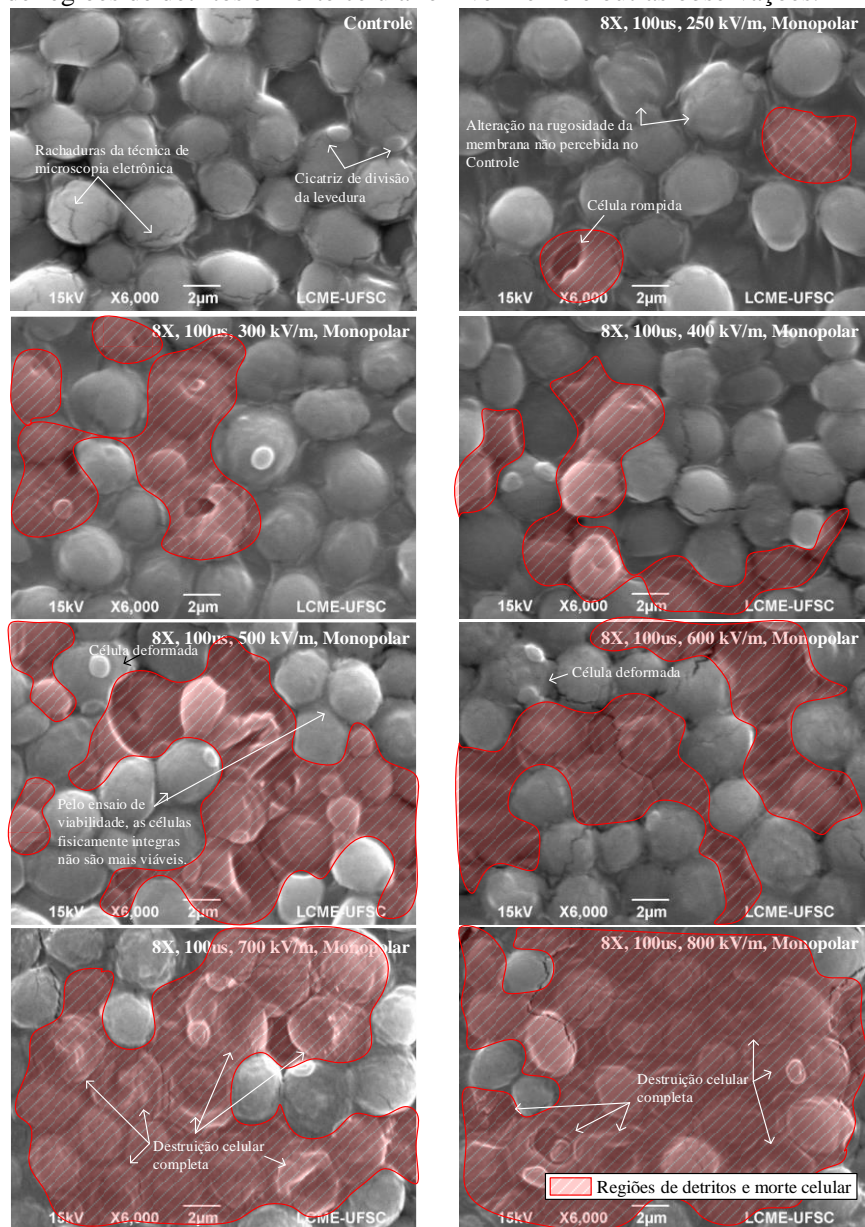
Na Figura 41 é mostrado as fotografias originais de controle e de aplicações de amplitudes de campos de 250 a 800 kV/m em leveduras. As mesmas fotografias são apresentadas na Figura 42 com observações e marcações. Nas imagens por microscopia há acréscimo de área com detritos (pedaços dispersos de células) e leveduras com grave deformidade (consideradas mortas), essas áreas foram manualmente selecionadas e são marcadas em vermelho na Figura 42 (e quantificadas na Figura 43). Na Figura 42 também há observações sobre não idealidades da técnica de microscopia eletrônica, que são ruídos (rachaduras) devido processos de secagem e de passagem de corrente elétrica inerente à técnica de microscopia eletrônica.

Figura 41 – Compilado de controle e de todos os protocolos de campo elétrico ensaiados.



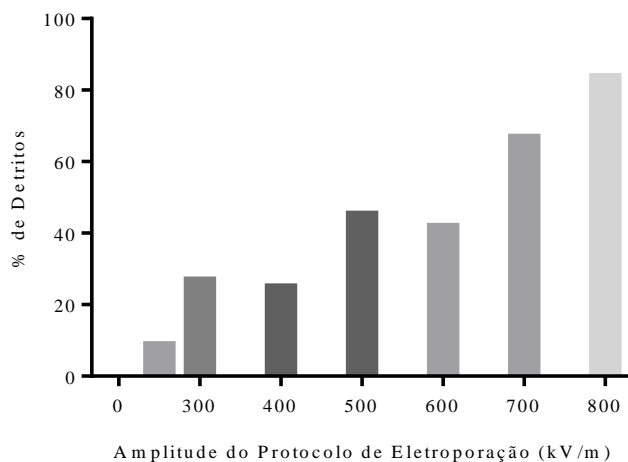
Fonte: Próprio autor.

Figura 42 – Compilado idêntico ao da Figura 41. Porém com marcações de regiões de detritos e morte celular em vermelho e outras observações.



Fonte: Próprio autor.

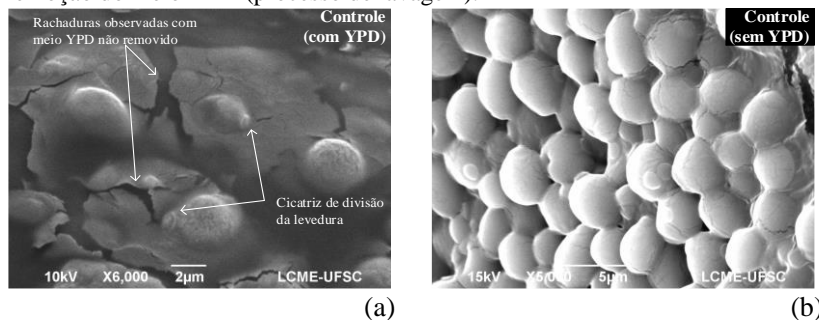
Figura 43 – Porcentagem de detritos por protocolo. As marcações de regiões de detritos e morte celular são disponíveis na Figura 42 (regiões marcadas em vermelho).



Fonte: Próprio autor.

O método de preparo das amostras para análise de microscopia eletrônica incluiu remoção de meio YPD. Esse procedimento foi adotado após experimentação piloto (sem remoção do meio), que não obteve boas imagens. Sem remoção do meio YPD as imagens ficam comprometidas com excessos de ruídos do meio (rachaduras), e, portanto, não são adequadas. Imagens com e sem remoção do meio são expostas Figura 44.

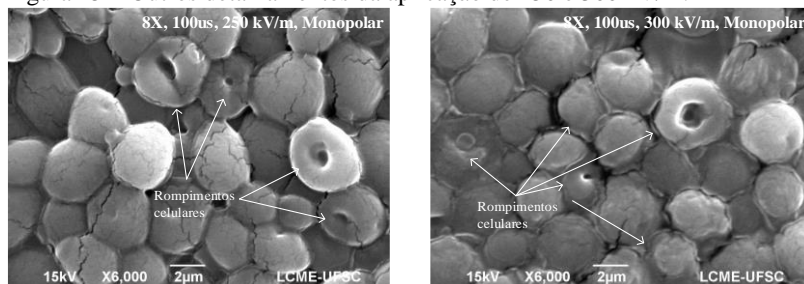
Figura 44 – Observação sobre método de preparo da amostra biológica para análise por microscopia eletrônica. (a) Sem remoção do meio YPD. (b) Com remoção do meio YPD (processo de lavagem).



Fonte: Próprio autor.

Outros detalhes do rompimento celular vistos por microscopia eletrônica após protocolos de 250 kV/m e 300 kV/m são disponíveis na Figura 45. Algumas leveduras apresentam rompimentos circulares em suas paredes celulares. Essas células provavelmente não estão viáveis e representam pequena parcela da amostra.

Figura 45 – Outros detalhes da aplicação de 250 e 300 kV/m.



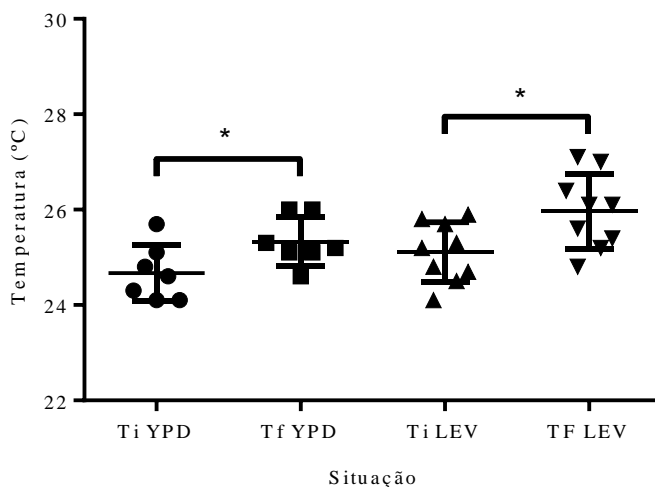
Fonte: Próprio autor.

5.3.3 Monitoramento de Variações de Temperatura

O monitoramento de temperatura mensurada antes/após 30 segundos de aplicação de seqüência de protocolos de eletroporação (100, 200, 300, 400, 500 e 600 kV/m) em meio com e sem células é de acordo com a Figura 46. A seguinte notação foi utilizada: “YPD” para denotar meio puro (sem células) e “LEV” para denotar meio com leveduras. Em todos os experimentos foram observados incrementos de temperatura. Foram encontrados diferenças significativas entre valores de temperatura inicial (T_i) e temperatura final (T_f) com teste de Mann-Whitney em ambas análises.

A alteração de temperatura teórica foi de 3,49 °C. O cálculo foi realizado considerando pulso de 600 kV/m e 100 µs. O cálculo não leva em conta dissipação térmica, que deve ocorrer na ordem de dezenas de segundos, pois se ocorresse de maneira acumulativa a solução teria incrementos da ordem de dezenas de graus, o que não foi observado no experimento prático. Acredita-se que o pior caso de elevação térmica ocorre no instante do término da aplicação e foi da ordem de graus. Essa ordem de acréscimo de temperatura não justifica alterações expressivas no meio biológico ou alterações nas propriedades elétricas devido a temperatura (SMITH, 2011).

Figura 46 – Alteração de temperatura após aplicação de potenciais de eletroporação em meio puro YPD (denotado no eixo x por “YPD”) e meio YPD com leveduras (denotado no eixo x por “LEV”).



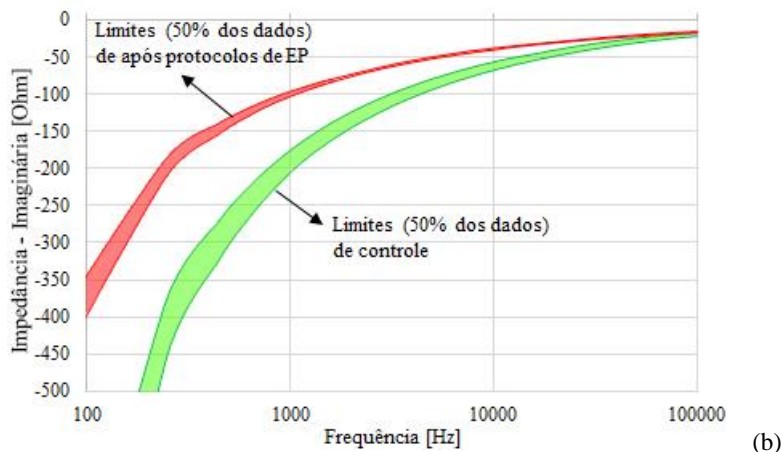
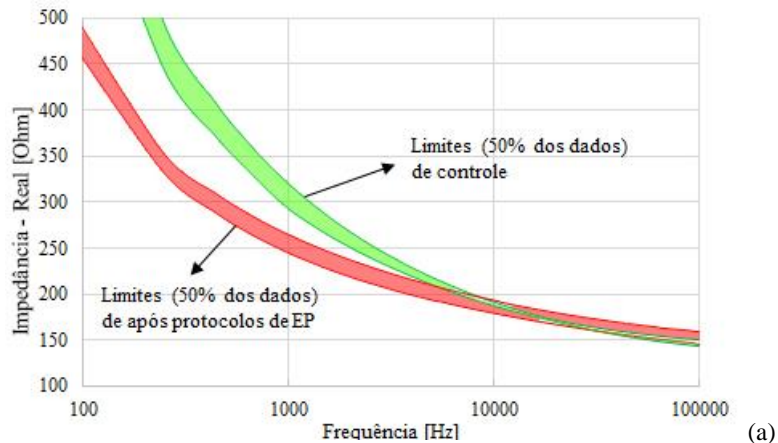
Fonte: Próprio autor.

5.3.4 Alteração de Impedância

As partes reais e imaginárias da impedância avaliadas com analisador de impedância para meio YPD puro (sem células) e meio YPD com leveduras inoculadas são mostradas na Figura 47 e Figura 48 respectivamente. O conteúdo em cada uma das curvas representa 50% dos dados. Com base nesses resultados as alterações de impedância devido a polarização ocorrem principalmente para frequências abaixo de 10 kHz.

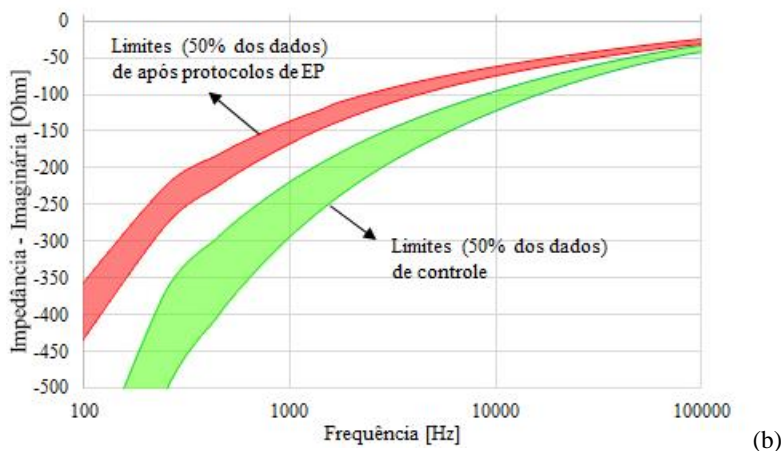
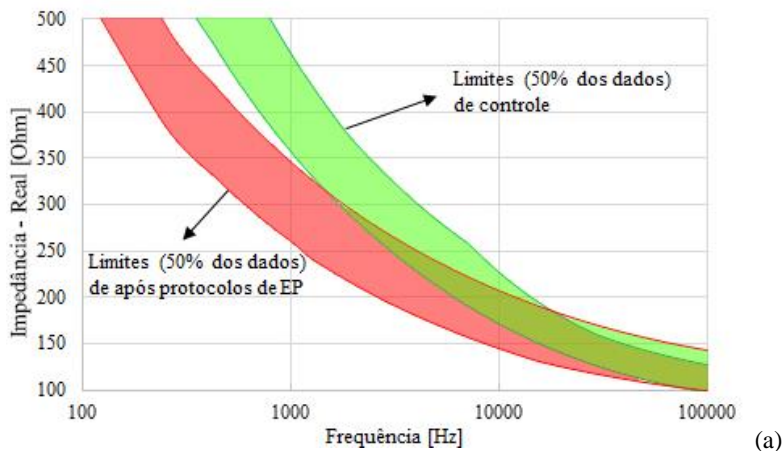
As diferenciações mostradas nas mostradas na Figura 47 e Figura 48 (não entrelaçamento dos dados) foram analisados com método estatístico nas frequências de 1, 10 e 100 kHz. Essa comparação foi feita por pares (antes e depois de protocolos) e é mostrada na Figura 49. A única diferenciação estatística ocorreu na frequência de 100 kHz (destacado por círculo pontilhado na Figura 49). Nessa frequência houve ligeira diferenciação (“*”) do meio puro YPD após aplicação da eletroporação ($p = 0,0262$) que não ocorreu quando há células no meio ($p = 0,0530$). A diferenciação pode ter ocorrido devido efeitos da eletroporação (extração de íons) ou polarização interfacial (acúmulo de íons nas paredes das células).

Figura 47 – Alteração de impedância antes e depois da aplicação de protocolos de eletroporação em meio YPD puro. Em verde são curvas anteriores a aplicação e em vermelho curvas após a aplicação. As curvas representam 50 % dos dados. (a) Parte real da impedância. (b) Parte imaginária da impedância.



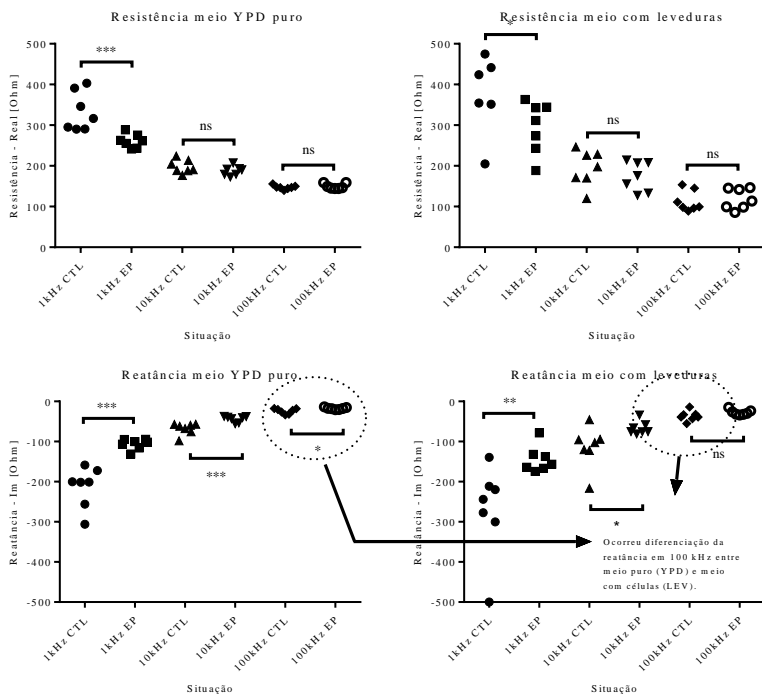
Fonte: Próprio autor.

Figura 48 – Alteração de impedância antes e depois da aplicação de protocolos de eletroporação em meio YPD com células. Em verde são curvas anteriores a aplicação e em vermelho curvas após a aplicação. As curvas representam 50 % dos dados. (a) Parte real da impedância. (b) Parte imaginária da impedância.



Fonte: Próprio autor.

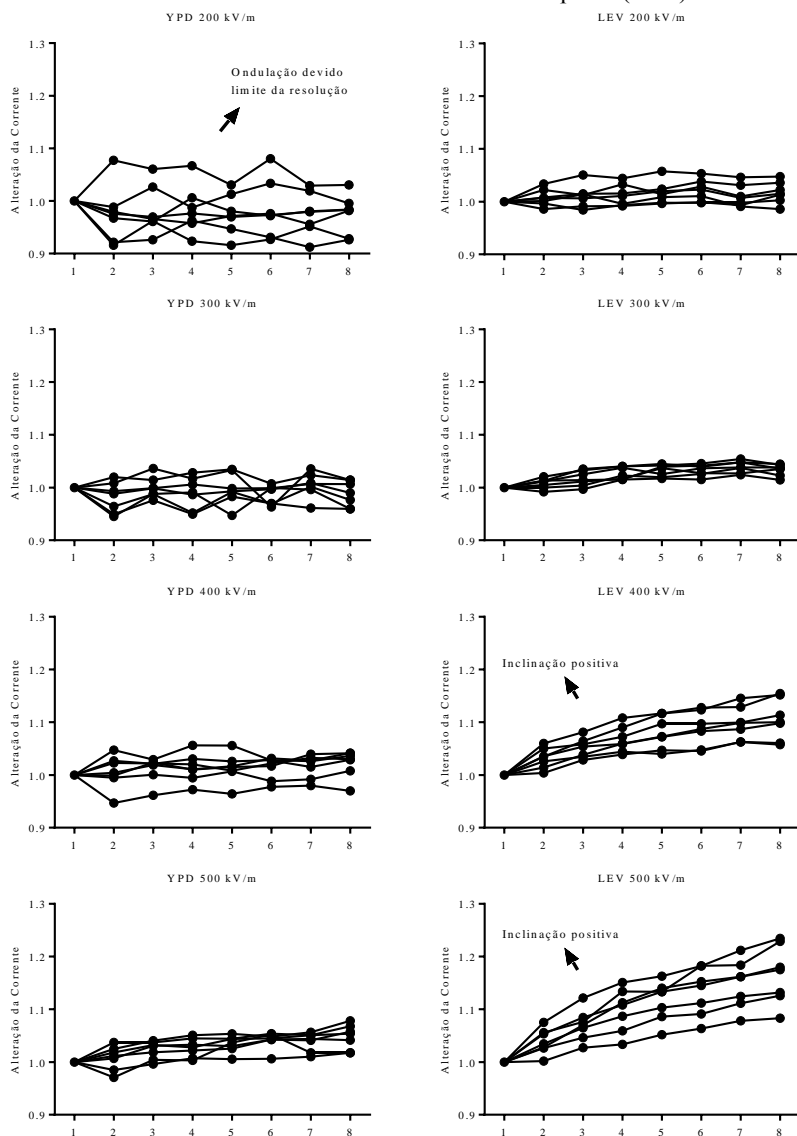
Figura 49 – Alterações de impedância antes e depois da aplicação da eletroporação.



Fonte: Próprio autor.

A alteração de corrente durante aplicação dos pulsos é mostrada na Figura 50. No eixo “x” são separados os oito pulsos do protocolo ESOPE, e o eixo “y” indica correntes normalizadas (divisão do valor de corrente do pulso pelo primeiro pulso). Cada uma das sete linhas denotam as repetições dos ensaios e suas sequências são aleatórias (N = 7). Os gráficos da coluna da esquerda denotam o meio YPD sem células (notação “YPD”) e a direita o meio com leveduras (notação “LEV”). A ondulação percebida na aplicação de 200 kV/m no meio YPD é devido ao limite de resolução da aquisição de dados do eletroporador. Foi percebido inclinação positiva (acréscimo de corrente) entre os pulsos para os protocolos de 400 e 500 kV/m em meio com leveduras.

Figura 50 – Alteração de corrente normalizada em função do número do pulso. “YPD” denota aplicações com meio YPD puro (sem células) e “LEV” denota meio com células. No eixo “x” é indicado o número do pulso (1 a 8).



Fonte: Próprio autor.

O fenômeno de alteração de corrente (“inclinação positiva”) foi quantificado como a diferença da corrente do último para o primeiro pulso. A alteração de corrente da Figura 50 foi quantificada na Figura 51. Nesta os dados foram organizados de diversas maneiras: agrupada (barra), pontos individuais e na sequência experimental (linhas ligando pontos individuais). Foi detectado diferenciação estatística (teste Mann-Whitney) em todas as situações de comparação direta de amplitude de tensão entre meio sem e com células (Figura 51b). Os valores de significância estão inclusos no gráfico.

A comparações de grupo (teste de Kruskal-Wallis) detectou diferença em um dos grupos sem células, “YPD” (“***”, $p = 0.0013$), e em um dos grupos no meio com leveduras, “LEV” (“****”, $p < 0.0001$). Os testes *post-hoc* de meio sem (“YPD”) e com (“LEV”) células são mostrados nas Tabela 5 e Tabela 6 respectivamente. Dessas tabelas observa-se: a comparação “200 kV/m vs. 400 kV/m” em leveduras há diferenciação estatística enquanto no meio puro não; a comparação “200 kV/m vs. 500 kV/m” em leveduras há diferenciação estatística de maior significância do que no meio puro.

Tabela 5 – Teste *post-hoc* de grupos de “YPD” da Figura 51c.

Comparação	Significância	Valor p
200 kV/m vs. 300 kV/m	ns	>0.9999
200 kV/m vs. 400 kV/m	ns	0.2440
200 kV/m vs. 500 kV/m	**	0.0039
300 kV/m vs. 400 kV/m	ns	0.3842
300 kV/m vs. 500 kV/m	**	0.0078
400 kV/m vs. 500 kV/m	ns	>0.9999

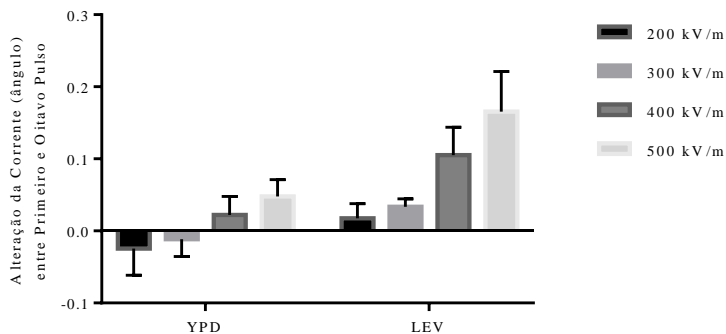
Fonte: Próprio autor.

Tabela 6 – Teste *post-hoc* de grupos de “LEV” da Figura 51c.

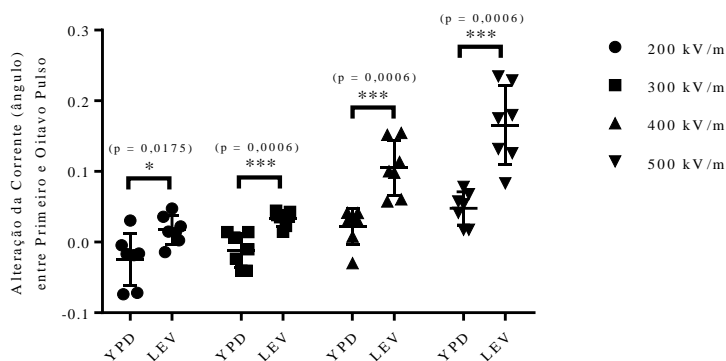
Comparação	Significância	Valor p
200 kV/m vs. 300 kV/m	ns	>0.9999
200 kV/m vs. 400 kV/m	*	0.0121
200 kV/m vs. 500 kV/m	***	0.0003
300 kV/m vs. 400 kV/m	ns	0.1377
300 kV/m vs. 500 kV/m	**	0.0062
400 kV/m vs. 500 kV/m	ns	>0.9999

Fonte: Próprio autor.

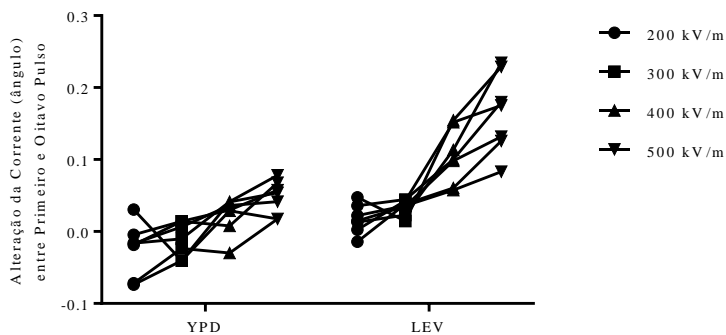
Figura 51 – Quantificação da alteração de corrente entre primeiro e último pulso, percebida na Figura 50. São mostrados alteração de (a) maneira agrupada (barra), (b) pontos individuais e na (c) sequência experimental (linhas ligando pontos individuais).



(a)



(b)



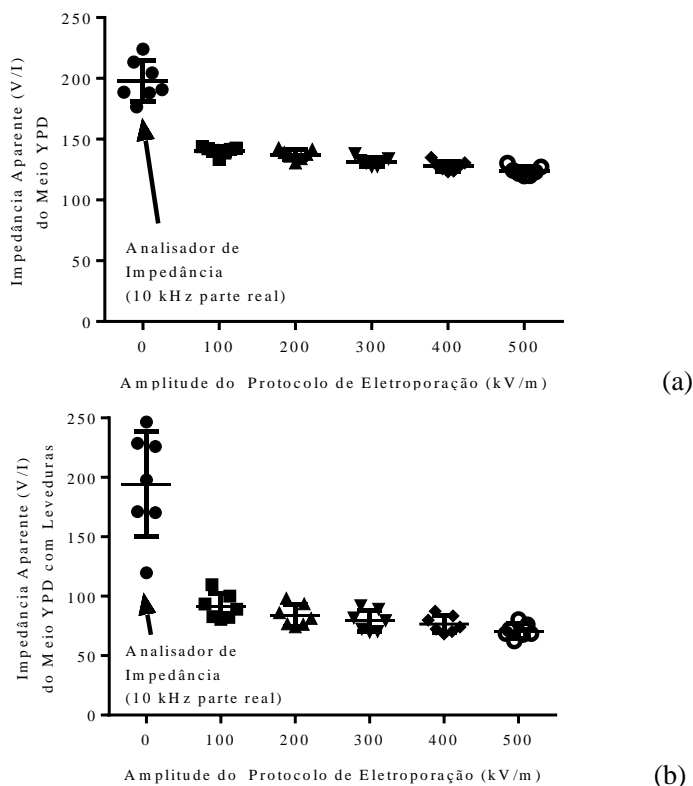
(c)

Fonte: Próprio autor.

A alteração de correntes por número de pulso vista na Figura 50 também foi processada em conjunto com análise de impedância vista pelo analisador de impedância para meio com e sem células. Para isso, foram processados os dados de impedância aparentes (V/I) do conjunto de pulsos (média) em todos os protocolos. O primeiro valor do eixo x é valor extraído do analisador de impedância (parte real na frequência de 10 kHz). Os dados são dispostos na Figura 52. Ressalva-se que essa comparação pode não ser adequada, uma vez que a análise de impedância aparente inclui grande espectro de frequências, ou seja, as medições, embora de mesma grandeza, representam situações diferentes.

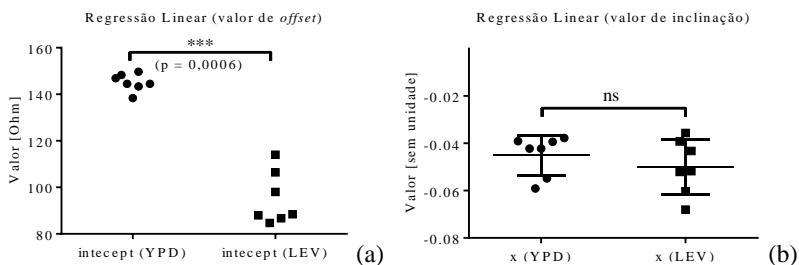
Na Figura 53 é mostrado a análise de curva da Figura 52. Foi feito regressão linear entre os pontos do eixo x de 100 a 600 kV/m. Separaram-se os valores de inclinação e *offset*. Não é percebido alteração significativa entre inclinação das curvas de YPD e LEV. Apesar disso, é percebido alteração significativa entre os *offsets* das duas curvas.

Figura 52 – Dados de impedância combinados. (a) Meio sem células. (b) Meio com células.



Fonte: Próprio autor.

Figura 53 – Análise das curvas da Figura 52 por regressão linear. (a) Valor de inclinação da regressão linear. (b) Valor de *offset* da regressão linear.



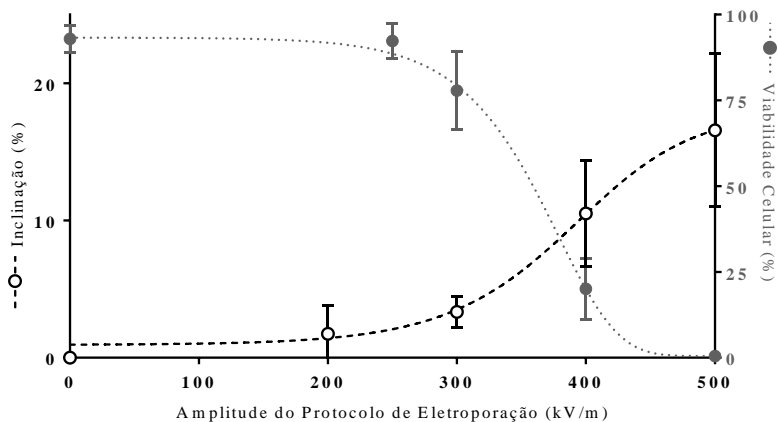
Fonte: Próprio autor.

5.3.5 Resultados Compilados

A análise por impedância (antes/depois) não foi relevante para detecção da eletroporação. Esse tipo de análise somente detectou polarização dos eletrodos (Figura 47 e Figura 48). Mesmo com esse tipo de acontecimento, foi evidente a alteração da condutividade durante os pulsos em meios com células (alterações de corrente da Figura 51). Baseado nos resultados, esse tipo de análise consegue detectar a morte celular, que baseado na metodologia foi devido eletroporação irreversível. Há indícios de correlação dos dados de alteração de corrente (Figura 51) com os de alteração de viabilidade (Figura 39). Ambos foram organizados em conjunto na Figura 54.

Observa-se que as alterações de condutividade macroscópicas não são suficientes para detectar as alterações que a microscopia eletrônica detecta (Figura 41 e Figura 45).

Figura 54 – Correlação de dados de alteração de corrente (iguais aos da Figura 51) com os de viabilidade celular (iguais aos da Figura 39) em função do campo elétrico.



Fonte: Próprio autor.

5.4 DISCUSSÃO

5.4.1 Análise de Viabilidade Celular

De acordo com os estudos desse trabalho a eletroporação irreversível é predominante para campos de amplitude superior a 400 kV/m (Figura 39). A viabilidade celular caiu com o incremento de

amplitude no protocolo (em kV/m) e a redução de viabilidade é significativa se o protocolo é superior à 400 kV/m. A queda de viabilidade para pulsos de dezenas de micro até dezenas de milissegundos e amplitudes de ordem de centenas de kV/m em *Saccharomyces Cerevisiae* também é verificado em outros estudos (GANEVA; GALUTZOV; TEISSIÉ, 2003; GÁŠKOVÁ *et al.*, 1996; RAMOS; LIMA, 2012; WANG *et al.*, 2015). O uso de pulsos com durações menores que dezenas de microssegundos pode exigir campos superiores a MV/m para inativação de *S. Cerevisiae* (OU; NIKOLIC-JARIC; GÄNZLE, 2017), o que não é vantajoso do ponto de vista de design de eletroporadores, pois exige chaveamento de tensões elevadas. Apesar disso, é vantajoso no processamento de alimentos por passagem única ou contínua.

A curva de viabilidade percebida nesse trabalho foi obtida aproximadamente 10 minutos após da aplicação do protocolo de eletroporação. Na literatura a mesma também é obtida após ordem de dezenas de minutos. Acredita-se que a viabilidade celular pode ser menor após intervalos tempos maiores que 10 minutos (GÁŠKOVÁ *et al.*, 1996). Além disso, danos “sub letais” (perda de algumas funcionalidades celulares) poderiam provocar futura morte celular ou incapacidade de multiplicação (KWOLEK-MIREK; ZADRAG-TECZA, 2014; WANG *et al.*, 2015). Como trabalho futuro poderiam ser avaliados no tempo a queda de viabilidade celular e danos sub letais e letais após aplicação de protocolo de eletroporação.

A condutividade da solução e outros parâmetros do pulso, como duração e taxa de repetição, também influenciam na eficácia da eletroporação em *S. Cerevisiae* (GANEVA; GALUTZOV; TEISSIÉ, 2003; GÁŠKOVÁ *et al.*, 1996; OU; NIKOLIC-JARIC; GÄNZLE, 2017; RAMOS; LIMA, 2012), esses parâmetros não foram variados nesse trabalho. Utilizando o mesmo método desse trabalho podem ser variados outros parâmetros e estudar curva de viabilidade em função desses novos parâmetros.

5.4.1.1 Considerações Azul de Metileno

Foi realizada hipótese de que se há azul de metileno dentro da célula a mesma encontra-se morta. Considera-se essa uma boa hipótese por dois motivos:

- O azul de metileno naturalmente entra dentro de todas as células. Esse é reduzido em partículas incolores caso a célula for viável. A eletroporação poderia facilitar a

entrada de mais azul de metileno, porém o mesmo provavelmente será reduzido;

- Os poros de eletroporação são transitórios e não foi observado durante os ensaios coloração azul nas células imediatamente após eletroporação (menos de 1 minuto) (dados não quantificados).

Por causa desses motivos o azul de metileno provavelmente é um marcador adequado para monitoração de viabilidade e eletroporação. Na literatura a eficiência desse é comparados a outras substâncias como iodeto de propídio (KWOLEK-MIREK; ZADRAG-TECZA, 2014). Apesar disso, poderiam ser feitos novos estudos com metodologias alternativas, uma vez que há estudos que relatam falhas em metodologias de avaliação de viabilidade celular e aberturas de poros (TRAN *et al.*, 2011).

5.4.2 Hipóteses de Erros Associados a Densidade Celular

A mediana da densidade celular das experimentações foi de 24,9 milhões de células por mL e percentil inferior e superior igual a 12,7 e 133,16 milhões de células por mL (sem diluição 1:1). Os desvios de densidade celular podem ser explicados por dois motivos: manipulação das suspensões e etapa de crescimento celular.

A manipulação das suspensões de células manual (agitação e retirada com pipeta) pode introduzir variações na densidade celular durante método de preparação das amostras. Isso poderia ser mitigado em estudos futuros com adição de etapa de centrifugação e lavagem. As variações na densidade celular podem introduzir não homogeneidades de distribuição de campo dentro da solução, e, por causa disso, introduzir desvios no gráfico da viabilidade que não foram controlados. Apesar disso, devido ao baixo valor de fração volumétrica (valor da fração volumétrica igual à 0,004320) acredita-se que a densidade celular não introduziu erros significativos no experimento (RAMOS; SUZUKI; MARQUES, 2006).

Observa-se também a possibilidade de erros associados ao crescimento celular devido inconsistências de temperatura na estufa e/ou excesso de tempo na estufa. No caso de *S. Cerevisiae* em crescimento a densidade celular é da ordem de 10^7 células/mL, e quando estacionárias (maduras) a densidade celular é da ordem de 10^8 células/mL. A etapa de crescimento poderia alterar a eficiência da eletroporação reversível e consequentemente a curva de viabilidade. Porque, *S. Cerevisiae* maduras são mais resistentes à aplicação de campos elétricos (GÁŠKOVÁ *et al.*,

1996). Nesse trabalho foram utilizadas células em crescimento que permaneceram por mesmos períodos em estufa, por isso esse tipo de desvio provavelmente não aconteceu nesse trabalho. Apesar disso, o monitoramento da estufa no tempo pode ser incluso em trabalhos futuros.

5.4.3 Análise de Imagens por Microscopia Eletrônica

De acordo com o ensaio de viabilidade, o protocolo de 400 kV/m reduz de maneira significativa a viabilidade celular (Figura 39). As células fisicamente íntegras vistas na imagem por microscopia eletrônica para protocolos de amplitude superior a 400 kV/m provavelmente são somente o resto da parede celular (Figura 42). As imagens de microscopia não é método conclusivo para análise da viabilidade celular.

Apesar de não fornecer informação conclusiva a respeito da viabilidade celular, o estudo por microscopia eletrônica revelou a maneira e valores de campos necessários para completa ruptura celular. Estudos futuros podem avaliar a extração de material intracelular após aplicação de campos de 700 e 800 kV/m. Essas amplitudes provocam destruição celular e aumento no número de detritos (Figura 42 e Figura 43). Conforme discutido na introdução desse capítulo, as leveduras *S. Cerevisiae* são utilizadas em processos industriais e há materiais de interesse localizados no meio intracelular, como proteínas (GANEVA; GALUTZOV; TEISSIÉ, 2003). A técnica de eletroporação também é alternativa para extração de conteúdo intracelular em outras situações (ver seção 3.6.5).

5.4.4 Alteração de Impedância

5.4.4.1 Análise com Analisador de Impedância

A análise com analisador de impedância pode fornecer detalhes sobre alterações após aplicação dos protocolos de campo elétrico. Esse tipo de método também permite separação de fenômenos dispersivos (dispersão em dielétricos).

A alteração de impedância experimentada com analisador de impedância foi feita em meios sem e com células. A caracterização do meio sem células é necessária para compreensão de fenômenos dispersivos que não são decorrentes da presença de células ou fenômeno de eletroporação. O comparativo de alterações nas frequências de 1, 10 e 100 kHz é mostrado na Figura 49. Nesta, a única diferenciação ocorreu na parte imaginária em frequência de 100 kHz. Nessa frequência houve

diferenciação do meio puro YPD após aplicação do campo elétrico. A diferenciação não ocorreu quando há células no meio. Esse tipo de alteração pode ter ocorrido por algum acúmulo iônico (*layers* e polarização) que ocorre de maneira diferente quando há células no meio. Apesar dessa diferenciação obtida com os testes estatísticos, seria necessário aumentar o número de amostras para melhores conclusões.

As alterações de resistência para frequências menores que 1 kHz observada em meios com e sem células é indício de ocorrência de efeito de polarização no eletrodo. Por causa desse motivo, frequências menores que 1 kHz não são parâmetros robustos para análise da eletroporação e podem ser descartadas em novos ensaios. Observa-se que a polarização pode alterar o campo elétrico e esse fenômeno pode ser estudado em ensaios futuros.

A análise de espectro de frequência limitada na ordem de dezenas e centenas de quilohertz objetivou fornecer características a nível de membrana celular. Apesar disso, baseado nos resultados desse trabalho, não foram encontrados fortes indícios de alterações. Foram feitas as seguintes hipóteses:

- A parede celular dificulta o acesso as características elétricas da membrana celular. Que poderia ocorrer devido sua espessura e efeitos eletrostáticos;
- Em trabalhos futuros, alterações no espectro podem ser experimentadas de maneira branda (1 kHz a 100 MHz). Observa-se que componentes de espectro na ordem de mega-hertz podem fornecer detalhes sobre o meio intracelular (GRIMNES; MARTINSEN, 2014; IVORRA, 2002);
- A fração volumétrica baixa (igual a 0,004320) não possibilitou que os efeitos de eletroporação fossem expressivos. Em trabalhos futuros diluição com fração volumétrica maior poderia ser analisada. Observa-se que caso a fração volumétrica seja elevada (maior que 0,3), devem ser feitas compensações no valor de campo elétrico (RAMOS; SUZUKI; MARQUES, 2006). Na literatura existem trabalhos semelhantes que realizam centrifugação e lavagem das amostras (RAMOS *et al.*, 2012; RAMOS; LIMA, 2012).

Os estudos desse trabalho foram realizados em sequência de aplicação de 200, 300, 400, 500 e 600 kV/m. Pode acontecer alterações de efeitos cumulativos. Apesar disso, não foi possível perceber maiores

alterações na análise de impedância antes e depois da aplicação. De qualquer forma, essa metodologia pode ser alterada em futuros ensaios.

5.4.4.2 Análise Durante Aplicação de Campo Elétrico

A alteração de corrente macroscópica, observada durante aplicação de campos elétricos em experimentos de eletroporação (em tecidos e suspensões), é em parte explicada pela facilitação de difusão iônica pelas membranas celulares. O aumento da difusão iônica é consequência da abertura de poros.

Observa-se que apesar do uso da análise de impedância aparente (V/I) durante os pulsos, é de conhecimento que existem erros introduzidos por efeitos dispersivos e mecanismos de relaxação da membrana celular concentrados em frequências menores que 1 kHz conforme exposto na seção 3.4 (BHONSLE et al., 2015; GRIMNES; MARTINSEN, 2014; RAMOS; LIMA, 2012). Os pulsos utilizados de 100 μ s possuem amplo número de componentes de frequência. Portanto, a análise da alteração V/I durante os pulsos deve estar contaminada de efeitos dispersivos. Para minimizar esses fenômenos, foi realizado ensaios com meio puro YPD (sem células) anterior a análise do meio com células.

Na Figura 50 são expostas as alterações correntes médias durante os pulsos. Nessa figura foi percebido alteração da corrente (“inclinação”). Essa inclinação foi quantificada na Figura 51. A inclinação percebida em meios sem células (comparação de grupos “200 kV/m vs. 400 kV/m” de meio sem célula na Figura 51) pode ser explicada devido ocorrência de polarização (carregamento próximo aos eletrodos). A alteração da inclinação de corrente é mais acentuada no meio com células. Dado que a única diferença entre os meios é a presença ou não de células, a eletroporação poderia explicar as diferentes alterações de inclinação. Com testes estatísticos observou-se indícios de alteração de inclinação diferenciada entre meio sem e com células: a comparação de grupos “200 kV/m vs. 400 kV/m” tem diferença significativa com células, enquanto no meio sem células não; a comparação “200 kV/m vs. 500 kV/m” tem diferença mais significativa com células do que sem.

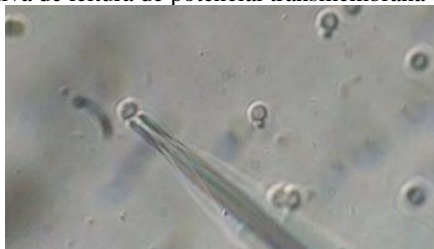
Na Figura 51 não foram percebidas alterações significativas entre grupos “200 kV/m vs. 300 kV/m” com células. Isso pode ser explicado pois nessas amplitudes o campo elétrico não é adequado para eletroporação. A amplitude de 400 kV/m pode ser ponto muito próximo de limiar entre eletroporação reversível e irreversível. Uma vez considerado que há correlação entre alteração de inclinação em 400 kV/m e a queda de viabilidade celular observada em 400 kV/m (Figura 54).

Na Figura 52 foram separados as médias de todos os pulsos do protocolo e foram feitas regressões lineares dessas curvas na Figura 53. A única alteração significativa nesse tipo de análise foi a alteração de *offset*. Dado que a única diferenciação dos meios é a presença ou não de células, essa alteração pode ser indício de eletroporação ou algum mecanismo de transporte iônico facilitado pela presença da célula (efeito de membrana ou parede celular). Não há diferenciação no valor de inclinação das regressões com e sem células. Essa característica provavelmente é devido a polarização e ocorre de maneira semelhante, independente da presença de células

5.4.4.3 Estudo da Alteração de Potencial Transmembrana

Foram realizadas tentativas de análise de potencial transmembrana por *intracellular recording* das células utilizadas nessa dissertação (método brevemente descrito nessa subseção). Foi utilizado estirador de pipetas Sutter Instrument P-1000, pipetas Sutter Instrument BF150-86-10 e microscópio invertido Olympus IX71. As células foram fixadas por método de ágar (não especificado nesse trabalho). Por meio de configuração do estirador é possível alterar dimensões e formato da micropipeta. Possibilidades de configurações de medição intracelular e *patch clamp* foram testadas. Porém, não foi obtido sucesso, uma vez que a dimensão das leveduras era de mesma grandeza que o instrumento de medição (micropipeta). Situação experimental disponível na Figura 55. Nessa figura é mostrado a aproximação do eletrodo de leitura (micropipeta) da levedura.

Figura 55 – Tentativa de leitura de potencial transmembrana de levedura.



Fonte: Próprio autor.

O aumento de potencial transmembrana não é totalmente correlacionado com aumento da permeabilidade da membrana. Esses motivos justificam interesse em mensurar o potencial transmembrana.

5.5 TRABALHOS FUTUROS

Almeja-se em trabalhos futuros:

- Experimentar e quantificar a alteração de permeabilidade em leveduras. Por exemplo, estudos de transporte de agentes anticâncer (MATUO *et al.*, 2012);
- Utilizar a metodologia semelhante para estudo de eletroporação em células tumorais;
- Utilizar metodologia semelhante para processamento de bactérias com foco em processamento de alimentos por eletroporação irreversível (pasteurização);
- Preparar as amostras com processos de centrifugação de lavagem para aumentar a fração volumétrica e repetir os ensaios de análise de impedância;
- Estudo de protocolos com passos intermediários. Por exemplo: 200, 225, 250 ... 375, 400 kV/m;
- Estudo numérico da alteração do potencial transmembrana e condutividade da solução e sua correlação com resultados obtidos;
- Desenvolvimento de equipamento com maior resolução de aquisição de tensão e corrente;
- Desenvolvimento de eletrodos da ordem de micrometros compatíveis ao uso simultâneo com microscópico e ensaio com leveduras;
- Estudo de resultados obtidos (alteração de impedância) com modelos matemáticos da literatura;
- Estudo da alteração de campos elétricos em função de efeitos da polarização dos eletrodos.

5.6 CONCLUSÃO

Esse trabalho usou protocolos que usualmente são utilizados para tratamento de câncer em suspensões de leveduras. A simplificação do meio biológico por leveduras pode acelerar pesquisa científica a respeito do entendimento de eletroporação. Destaca-se o uso de leveduras devido facilidade de manipulação e rápido crescimento. Nesse trabalho foram sugeridos métodos para utilização de leveduras, esses podem ser repetidos em trabalhos futuros.

Foram realizadas variações na amplitude de protocolo ESOPE e mostrado indícios de que eletroporação irreversível é predominante para

campos de amplitude superior a 400 kV/m. Este mesmo campo pode estar próximo do limiar de eletroporação reversível-irreversível.

Foram encontrados indícios de correlação entre eletroporação irreversível e alterações de propriedades elétricas durante a aplicação dos campos elétricos. As alterações de propriedades elétricas foram mensuradas com aquisição de tensão e corrente instantâneas durante eletroporação. Equipamentos futuros podem conter eletrônica embarcada com processamento suficiente para detecção desse tipo de alteração no tratamento por eletroporação.

A análise por impedância (antes/depois) detectou polarização dos eletrodos. Mesmo com esse tipo de acontecimento, foi evidente a alteração da condutividade durante os pulsos em meios com células. As alterações de condutividade macroscópicas não são suficientes para detectar as alterações que a microscopia eletrônica detecta.

A abordagem de viabilidade celular e uso de microscopia indica que, mesmo com uso de eletroporação irreversível, a célula pode permanecer fisicamente intacta, embora não viável.

O método de análise de efeitos de campos elétricos em *Saccharomyces Cerevisiae* pode ser transcrevido para análise de outros tipos de células, como por exemplo células tumorais e células de mamíferos. O estudo com pequenas populações celulares *in vitro* pode ser futuramente extrapolado para tecido. Em novos estudos, a levedura pode ser uma célula modelo no IEB-UFSC para estudo da eletroporação e posterior aplicação desse modelo em células tumorais.

REFERÊNCIAS

- ABIDOR, I. G.; ARAKELYAN, V. B.; CHERNOMORDIK, L. V.; CHIZMADZHEV, Y. A.; PASTUSHENKO, V. F.; TARASEVICH, M. R. Electric breakdown of bilayer lipid membranes: I. The main experimental facts and their qualitative discussion. **Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry**, v. 104, n. 1, p. 37–52, 1 jan. 1979.
- ALIZADEH-HAGHIGHI, E.; JAFARMADAR, S.; KHALILARYA, S. Application of genetic algorithm in extracting cell dielectric characteristics with electrorotation. **Journal of Electrical Bioimpedance**, v. 8, n. 1, p. 34, 8 maio 2017.
- ALSHAREEF, M.; METRAKOS, N.; JUAREZ PEREZ, E.; AZER, F.; YANG, F.; YANG, X.; WANG, G. Separation of tumor cells with c-based microfluidic chip. **Biomicrofluidics**, v. 7, n. 1, p. 011803, 9 jan. 2013.
- BASTOS, J. P. A. **Eletrromagnetismo para Engenharia: Estática e Quase-Estática**. Florianópolis, SC: Editora da UFSC, 2004.
- BATISTA NAPOTNIK, T.; MIKLAVČIČ, D. In vitro electroporation detection methods – An overview. **Bioelectrochemistry**, v. 120, p. 166–182, abr. 2018.
- BERKENBROCK, J. A.; BRASIL PINTARELLI, G.; DE CASTRO ANTÔNIO JÚNIOR, A.; SUZUKI, D. O. H. Verification of Electroporation Models Using the Potato Tuber as In Vitro Simulation. **Journal of Medical and Biological Engineering**, n. 0123456789, p. 5, 28 abr. 2018a.
- BERKENBROCK, J.; PINTARELLI, G.; ANTÔNIO, A.; SUZUKI, D. In Vitro Simulation of Electroporation Using Potato Model. [s.l.]: 2018b,
- BERTACCHINI, C.; MARGOTTI, P. M.; BERGAMINI, E.; RONCHETTI, M.; CADOSSO, R. Irreversible Electroporation Systems for Clinical Use. In: [s.l.]: Springer, Berlin, Heidelberg, 2010. p. 255–272.
- BHONSLE, S. P.; ARENA, C. B.; SWEENEY, D. C.; DAVALOS, R. V. Mitigation of impedance changes due to electroporation therapy using bursts of high-frequency bipolar pulses. **BioMedical Engineering OnLine**, v. 14, n. Suppl 3, p. S3, 2015.
- BIO-RAD LABORATORIES INC. **Electroporation of prokaryotic cells**, 14 mar. 1990. Disponível em:

<<https://patents.google.com/patent/US5186800A/en?q=electroporation+cuvette&oq=electroporation+cuvette>>. Acesso em: 15 mar. 2018

BOTTER, A.; MERLETTI, R. EMG of Electrically Stimulated Muscles. In: **Surface Electromyography : Physiology, Engineering, and Applications**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2016. p. 311–332.

BRAMBACH, B. C.; MICHELS, A.; FRANZKE, J.; KETTLER, R. Current density and conductivity dependent electroporation of *Escherichia coli* C600. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 111, n. 1, p. 46–54, 2013.

BRANCH, D. Pulsed Electric Fields for Food Preservation : An Update on Technological Progress. In: **Progress in Food Preservation**. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, 2012. p. 277–295.

BÜRCEL, S. C.; ESCOBEDO, C.; HAANDBÆK, N.; HIERLEMANN, A. On-chip electroporation and impedance spectroscopy of single-cells. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 210, p. 82–90, abr. 2015.

CALVET, C. Y.; FAMIN, D.; ANDRÉ, F. M.; MIR, L. M. Electrochemotherapy with bleomycin induces hallmarks of immunogenic cell death in murine colon cancer cells. **Oncoimmunology**, v. 3, p. e28131, 2014.

CALVET, C. Y.; MIR, L. M. The promising alliance of anti-cancer electrochemotherapy with immunotherapy. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 35, n. 2, p. 165–177, 2016.

CANCER RESEARCH UK. **From beer to eternity – how yeast is revealing cancer’s secrets**. Disponível em: <<http://scienceblog.cancerresearchuk.org/2013/06/21/from-beer-to-eternity-how-yeast-is-revealing-cancers-secrets/>>. Acesso em: 23 abr. 2018.

CANCER RESEARCH UK. **Electrochemotherapy for cancers affecting the skin**. Disponível em: <www.cancerresearchuk.org/about-cancer/cancer-in-general/treatment/other/photodynamic-therapy>. Acesso em: 7 maio. 2018.

ČEMAŽAR, J.; MIKLAVČIČ, D.; KOTNIK, T. Microfluidic devices for manipulation, modification and characterization of biological cells in electric fields — a review. **Journal of Microelectronics, Electronic Components and Materials**, v. 43, n. 2013, p. 143–161, 2013.

CENGL, Y. A.; GHAJAR, A. J. Property Tables and Charts (SI units). In:

Heat and Mass Transfer: Fundamentals and Applications. 2015. ed. [s.l.]: McGraw-Hill LLC, 2015.

ÇETIN, B.; LI, D. Dielectrophoresis in microfluidics technology. **Electrophoresis**, v. 32, n. 18, p. 2410–2427, set. 2011.

CHANG, D. C. Cell poration and cell fusion using an oscillating electric field. **Biophysical Journal**, v. 56, n. 4, p. 641–652, out. 1989.

CHANG, D. C. **Guide to electroporation and electrofusion.** [s.l.]: Academic Press, 1992.

CHANG, D. C.; REESE, T. S. Changes in membrane structure induced by electroporation as revealed by rapid-freezing electron microscopy. **Biophysical Journal**, v. 58, n. 1, p. 1–12, jul. 1990.

CHANG, L.; GALLEG0-PEREZ, D.; ZHAO, X.; BERTANI, P.; YANG, Z.; CHIANG, C.-L.; MALKOC, V.; SHI, J.; SEN, C. K.; O'DONNELL, L.; YU, J.; LU, W.; LEE, L. J. Dielectrophoresis-assisted 3D nanoelectroporation for non-viral cell transfection in adoptive immunotherapy. **Lab on a Chip**, v. 15, n. 15, p. 3147–3153, 2015.

CHAO, T.-C.; ROS, A. Microfluidic single-cell analysis of intracellular compounds. **Journal of The Royal Society Interface**, v. 5, n. Suppl 2, 2008.

CHEN, C.; SMYER, S. W.; ROBINSON, M. P.; EVANS, J. A. Membrane electroporation theories: a review. **Medical and Biological Engineering and Computing**, v. 44, n. 1–2, p. 5–14, 2006.

COSSUL, S.; FAVRETTO, M. A.; ANDREIS, F. R.; IWATA, D. N. R.; MARQUES, J. L. B. Proposta de um Sistema para Estudos de Condução Nervosa. Uberlandia, 2018,

COUSTETS, M.; AL-KARABLIEH, N.; THOMSEN, C.; TEISSIÉ, J. Flow Process for Electroextraction of Total Proteins from Microalgae. **The Journal of Membrane Biology**, v. 246, n. 10, p. 751–760, 11 out. 2013.

CROWLEY, J. M. Electrical breakdown of bimolecular lipid membranes as an electromechanical instability. **Biophysical journal**, v. 13, n. 7, p. 711–24, jul. 1973.

DAVALOS, R. V.; RUBINSKY, B. Temperature considerations during irreversible electroporation. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 51, n. 23–24, p. 5617–5622, nov. 2008.

DEBRUIN, K. A.; KRASSOWSKA, W. Modeling Electroporation in a Single Cell. I. Effects of Field Strength and Rest Potential. **Biophysical Journal**, v. 77, n. 3, p. 1213–1224, set. 1999.

DERMOL-CERNE, J.; MIKLAVČIČ, D. From Cell to Tissue Properties—Modeling Skin Electroporation With Pore and Local Transport Region Formation. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 65, n. 2, p. 458–468, fev. 2018.

DERMOL, J.; MIKLAVČIČ, D. Mathematical Models Describing Chinese Hamster Ovary Cell Death Due to Electroporation In Vitro. **The Journal of Membrane Biology**, v. 248, n. 5, p. 865–881, 30 out. 2015.

DUCK, F. A. Electrical Properties of Tissue. In: **Physical Properties of Tissues**. [s.l.]: Elsevier, 1990. p. 167–223.

DYMEK, K.; REMS, L.; ZOREC, B.; DEJMEK, P.; GALINDO, F. G.; MIKLAVČIČ, D. Modeling electroporation of the non-treated and vacuum impregnated heterogeneous tissue of spinach leaves. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 29, p. 55–64, maio 2015.

EHRENGRUBER, M. U.; HENNOU, S.; B'ELER, H.; NAIM, H. Y.; D'GLON, N.; LUNDSTROM, K. Gene Transfer into Neurons from Hippocampal Slices: Comparison of Recombinant Semliki Forest Virus, Adenovirus, Adeno-Associated Virus, Lentivirus, and Measles Virus. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 17, n. 5, p. 855–871, maio 2001.

ELEA. **Elea**. Disponível em: <www.elea-technology.de>. Acesso em: 23 abr. 2018.

ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J.; MERINO, V.; VILLEGAS-GONZÁLEZ, A.; AL-QALLAF, B.; RUBINSKY, B.; GONZÁLEZ, C.; DOMÍNGUEZ-DELGADO, C. L.; MARTÍNEZ, D. B.; DAS, D. B.; RODRÍGUEZ-CRUZ, I. M.; ESCOBAR-CHÁVEZ, J. J.; LÓPEZ-CERVANTES, M.; OLATUNJI, O.; DÍAZ-TORRES, R.; MERINO, V. **Current Technologies To Increase The Transdermal Delivery Of Drugs**. [s.l.]: BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, 2012.

FENG, G.; MELLOR, R. H.; BERNSTEIN, M.; KELLER-PECK, C.; NGUYEN, Q. T.; WALLACE, M.; NERBONNE, J. M.; LICHTMAN, J. W.; SANES, J. R. Imaging neuronal subsets in transgenic mice expressing multiple spectral variants of GFP. **Neuron**, v. 28, n. 1, p. 41–51, out. 2000.

FLISAR, K.; MEGLIĆ, S. H.; MORELJ, J.; GOLOB, J.; MIKLAVČIČ, D.

Testing a prototype pulse generator for a continuous flow system and its use for *E. coli* inactivation and microalgae lipid extraction. **Bioelectrochemistry**, v. 100, p. 44–51, dez. 2014.

FOSTER, K. R.; SCHWAN, H. P. Dielectric Properties of Tissues. In: **Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields**. Third Edit ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 1996. p. 25–101.

FOX, M. B.; ESVELD, D. C.; VALERO, A.; LUTTGE, R.; MASTWIJK, H. C.; BARTELS, P. V.; VAN DEN BERG, A.; BOOM, R. M. Electroporation of cells in microfluidic devices: a review. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 385, n. 3, p. 474–485, 14 jun. 2006.

FUENTES, M. **Hemocytometer**. Disponível em: <hemocytometer.org>. Acesso em: 10 jan. 2018.

FULLER, G. W. **Report on the investigations into the purification of the Ohio River water at Louisville, Kentucky**. [s.l.]: New York :, 1898.

GANEVA, V.; GALUTZOV, B.; TEISSIÉ, J. High yield electroextraction of proteins from yeast by a flow process. **Analytical Biochemistry**, v. 315, n. 1, p. 77–84, abr. 2003.

GARCIA, P. A.; DAVALOS, R. V.; MIKLAVCIC, D. A Numerical Investigation of the Electric and Thermal Cell Kill Distributions in Electroporation-Based Therapies in Tissue. **PLoS ONE**, v. 9, n. 8, p. e103083, 12 ago. 2014.

GÁŠKOVÁ, D.; SIGLER, K.; JANDEROVÁ, B.; PLÁŠEK, J. Effect of high-voltage electric pulses on yeast cells: factors influencing the killing efficiency. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 39, n. 2, p. 195–202, mar. 1996.

GEHL, J.; SERSA, G.; MATTHIESSEN, L. W.; MUIR, T.; SODEN, D.; OCCHINI, A.; QUAGLINO, P.; CURATOLO, P.; CAMPANA, L. G.; KUNTE, C.; CLOVER, A. J. P.; BERTINO, G.; FARRICHA, V.; ODILI, J.; DAHLSTROM, K.; BENAZZO, M.; MIR, L. M. Updated standard operating procedures for electrochemotherapy of cutaneous tumours and skin metastases. **Acta Oncologica**, v. 0, n. 0, p. 1–9, 25 mar. 2018.

GENETRONICS INC. **Electroporation apparatus for control of temperature during the process**, 21 out. 1998. Disponível em: <<https://patents.google.com/patent/US6150148A/en?q=electroporation&scholar>>. Acesso em: 15 mar. 2018

GITHUB. **Historic word occurrence in academic papers**. Disponível em: <github.com/Pold87/academic-keyword-occurrence>.

GOLBERG, A.; FISCHER, J.; RUBINSKY, B. The Use of Irreversible Electroporation in Food Preservation. In: [s.l.]: Springer Berlin Heidelberg, 2010. p. 273–312.

GONZALEZ, C. A.; RUBINSKY, B. Electroporation of the Skin. In: **Current Technologies to Increase the Transdermal Delivery of Drugs**. [s.l.]: BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS, 2010. p. 78–95.

GRANOT, Y.; IVORRA, A.; MAOR, E.; RUBINSKY, B. In vivo imaging of irreversible electroporation by means of electrical impedance tomography. **Physics in Medicine and Biology**, v. 54, n. 16, p. 4927–4943, 21 ago. 2009.

GRIMNES, S.; MARTINSEN, O. G. **Bioimpedance and Bioelectricity Basics**. 3rd. ed. [s.l.]: Academic Press, 2014.

GUO, X.; ZHU, R. Controllable in-situ cell electroporation with cell positioning and impedance monitoring using micro electrode array. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 31392, 10 nov. 2016.

HAAS, K.; SIN, W.-C.; JAVAHERIAN, A.; LI, Z.; CLINE, H. T. Single-Cell Electroporation for Gene Transfer In Vivo. **Neuron**, v. 29, n. 3, p. 583–591, 2001.

HABERL MEGLIC, S.; MAROLT, T.; MIKLAVCIC, D. Protein Extraction by Means of Electroporation from E. coli with Preserved Viability. **The Journal of Membrane Biology**, v. 248, n. 5, p. 893–901, 23 out. 2015.

HAMILTON, W. A.; SALE, A. J. H. Effects of high electric fields on microorganisms: II. Mechanism of action of the lethal effect. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 148, n. 3, p. 789–800, 27 dez. 1967.

HODGKIN, A. L. The ionic basis of electrical activity in nerve and muscle. **Biological Reviews**, v. 26, n. 4, p. 339–409, nov. 1951.

HUANG, Y.; RUBINSKY, B. Microfabricated electroporation chip for single cell membrane permeabilization. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 89, n. 3, p. 242–249, 2001.

IGEA. **IGEA Medical**. Disponível em: <www.igeamedical.com>. Acesso em: 10 mar. 2018.

IONESCU-ZANETTI, C.; BLATZ, A.; KHINE, M. Electrophoresis-assisted single-cell electroporation for efficient intracellular delivery. **Biomedical Microdevices**, v. 10, n. 1, p. 113–116, 8 fev. 2008.

IVORRA, A. Bioimpedance Monitoring for physicians: an overview. **Centre Nacional de Miroelectronica**, v. 2002, p. 1–35, 2002.

IVORRA, A.; AL-SAKERE, B.; RUBINSKY, B.; MIR, L. M. In vivo electrical conductivity measurements during and after tumor electroporation: conductivity changes reflect the treatment outcome. **Physics in Medicine and Biology**, v. 54, n. 19, p. 5949–5963, 7 out. 2009.

JARM, T.; KRAMAR, P. (EDS.). **1st World Congress on Electroporation and Pulsed Electric Fields in Biology, Medicine and Food & Environmental Technologies**. Singapore: Springer Singapore, 2016. v. 53,

JIANG, C.; DAVALOS, R. V.; BISCHOF, J. C. A Review of Basic to Clinical Studies of Irreversible Electroporation Therapy. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 62, n. 1, p. 4–20, jan. 2015.

JORDAN, C. A.; NEUMANN, E.; SOWERS, A. E. **Electroporation and Electrofusion in Cell Biology**. 1. ed. Boston, MA: Springer US, 1989.

JOURABCHI, N.; BEROUKHIM, K.; TAFTI, B. A.; KEE, S. T.; LEE, E. W. Irreversible electroporation (NanoKnife) in cancer treatment. **Gastrointestinal Intervention**, v. 3, n. 1, p. 8–18, jun. 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica - Texto e Atlas**. 12. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan LTDA, 2013.

KANDUŠER, M.; ŠENTJURC, M.; MIKLAVČIČ, D. Cell membrane fluidity related to electroporation and resealing. **European Biophysics Journal**, v. 35, n. 3, p. 196–204, 8 fev. 2006.

KARDOS, T. J.; RABUSSAY, D. P. Contactless magneto-permeabilization for intracellular plasmid DNA delivery in-vivo. **Human Vaccines & Immunotherapeutics**, v. 8, n. 11, p. 1707–1713, 24 nov. 2012.

KINOSITA, K.; TSONG, T. Y. Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane. **Nature**, v. 268, n. 5619, p. 438–41, 4 ago. 1977.

KITAMURA, K.; JUDKEWITZ, B.; KANO, M.; DENK, W.; HÄUSSER, M. Targeted patch-clamp recordings and single-cell electroporation of

unlabeled neurons in vivo. **Nature Methods**, v. 5, n. 1, p. 61–67, 23 jan. 2008.

KOTNIK, T. Transmembrane Voltage Induced by Applied Electric Fields. In: **Handbook of Electroporation**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 1–17.

KOTNIK, T.; BOBANOVIC, F.; MIKLAVCIC, D. Sensitivity of transmembrane voltage induced by applied electric fields—A theoretical analysis. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 43, n. 2, p. 285–291, ago. 1997.

KOTNIK, T.; KRAMAR, P.; PUCIHAR, G.; MIKLAVCIC, D.; TAREK, M. Cell membrane electroporation- Part 1: The phenomenon. **IEEE Electrical Insulation Magazine**, v. 28, n. 5, p. 14–23, set. 2012.

KRASSOWSKA, W.; NEU, J. C. Response of a single cell to an external electric field. **Biophysical Journal**, v. 66, n. 6, p. 1768–1776, jun. 1994.

KWOLEK-MIREK, M.; ZADRAG-TECZA, R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. **FEMS Yeast Research**, v. 14, n. 7, p. n/a-n/a, set. 2014.

LAMBERT, J. G.; HALL, C. A. S.; BALOGH, S.; GUPTA, A.; ARNOLD, M. Energy, EROI and quality of life. **Energy Policy**, v. 64, p. 153–167, 2013.

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**, v. 6, n. 1, p. 26409, 23 set. 2016.

LCME-UFSC. **LCME-UFSC**. Disponível em: <lcme.ufsc.br/mev/>.

LEE, W.; TSENG, P.; DI, D. **Microtechnology for Cell Manipulation and Sorting**. Cham: Springer International Publishing, 2017.

LEVY, R.; DEER, T. R.; HENDERSON, J. Intracranial neurostimulation for pain control: a review. **Pain physician**, v. 13, n. 2, p. 157–65, 2010.

LUCERA, A.; COSTA, C.; CONTE, A.; DEL NOBILE, M. A. Food applications of natural antimicrobial compounds. **Frontiers in microbiology**, v. 3, p. 287, 2012.

LUNDQVIST, J. A.; SAHLIN, F.; ÅBERG, M. A. I.; STRMBERG, A.; ERIKSSON, P. S. Altering the biochemical state of individual cultured cells

and organelles with ultramicroelectrodes. **Chemistry**, v. 95, p. 10356–10360, 1998.

MA, H.; ZHU, J.; MARONSKI, M.; KOTZBAUER, P. T.; LEE, V. M.-Y.; DICHTER, M. A.; DIAMOND, S. L. Non-classical nuclear localization signal peptides for high efficiency lipofection of primary neurons and neuronal cell lines. **Neuroscience**, v. 112, n. 1, p. 1–5, 2002.

MADIGAN, M. T.; MARTINKO, J. M.; BENDER, K. S.; BUCKLEY, D. H.; STAHL, DAVID, A. **Microbiologia de Brock**. [s.l.]: Pearson Education, Inc., 2016.

MARKOVSKAJA, S.; NOVICKIJ, V.; GRAINYS, A.; NOVICKIJ, J. Irreversible magnetoporation of micro-organisms in high pulsed magnetic fields. **IET Nanobiotechnology**, v. 8, n. 3, p. 157–162, 1 set. 2014.

MARTY, M.; SERSA, G.; GARBAY, J. R.; GEHL, J.; COLLINS, C. G.; SNOJ, M.; BILLARD, V.; GEERTSEN, P. F.; LARKIN, J. O.; MIKLAVCIC, D.; PAVLOVIC, I.; PAULIN-KOSIR, S. M.; CEMAZAR, M.; MORSLI, N.; SODEN, D. M.; RUDOLF, Z.; ROBERT, C.; O’SULLIVAN, G. C.; MIR, L. M. Electrochemotherapy – An easy, highly effective and safe treatment of cutaneous and subcutaneous metastases: Results of ESOPE (European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy) study. **European Journal of Cancer Supplements**, v. 4, n. 11, p. 3–13, nov. 2006.

MATUO, R.; SOUSA, F. G.; SOARES, D. G.; BONATTO, D.; SAFFI, J.; ESCARGUEIL, A. E.; LARSEN, A. K.; HENRIQUES, J. A. P. *Saccharomyces cerevisiae* as a model system to study the response to anticancer agents. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 70, n. 4, p. 491–502, 1 out. 2012.

Maxwells Equations. Disponível em: <maxwells-equations.com>.

MIKLAVCIC, D. **Handbook of Electroporation**. Cham: Springer International Publishing, 2017.

MIKLAVČIČ, D.; PUC, M. Electroporation. In: **Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering**. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2006.

MIR, L. M.; BELEHRADEK, M.; DOMENGE, C.; ORLOWSKI, S.; PODDEVIN, B.; BELEHRADEK, J.; SCHWAAB, G.; LUBOINSKI, B.; PAOLETTI, C. Electrochemotherapy, a new antitumor treatment: first

clinical trial. **Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie**, v. 313, n. 13, p. 613–8, 1991a.

MIR, L. M.; GEHL, J.; SERSA, G.; COLLINS, C. G.; GARBAY, J.-R.; BILLARD, V.; GEERTSEN, P. F.; RUDOLF, Z.; O'SULLIVAN, G. C.; MARTY, M. 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**, v. 4, n. 11, p. 14–25, nov. 2006.

MIR, L. M.; ORLOWSKI, S.; BELEHRADEK, J.; PAOLETTI, C. Electrochemotherapy potentiation of antitumour effect of bleomycin by local electric pulses. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 27, n. 1, p. 68–72, 1991b.

MISHRA, K. P. Membrane Electroporation and Emerging Biomedical Applications. In: **Handbook of Membrane Separations**. [s.l.]: CRC Press, 2008. p. 741–758.

MOVAHED, S.; LI, D. Microfluidics cell electroporation. **Microfluidics and Nanofluidics**, v. 10, n. 4, p. 703–734, 19 abr. 2011.

MURAMATSU, T.; MIZUTANI, Y.; OHMORI, Y.; OKUMURA, J.-I. Comparison of Three Nonviral Transfection Methods for Foreign Gene Expression in Early Chicken Embryos in Ovo. v. 230, p. 376–380, 1997.

NEAL, R. 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**, v. 59, n. 4, p. 1076–1085, abr. 2012.

NEUMANN, E.; ROSENHECK, K. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. **The Journal of Membrane Biology**, v. 10, n. 1, p. 279–290, dez. 1972.

NEUMANN, E.; SCHAEFER-RIDDER, M.; WANG, Y.; HOFSCHEIDER, P. H. Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. **The EMBO journal**, v. 1, n. 7, p. 841–5, 1982.

NOLKRANTZ, K.; FARRE, C.; BREDERLAU, A.; KARLSSON, R. I. D.; BRENNAN, C.; ERIKSSON, P. S.; WEBER, S. G.; SANDBERG, M.;

ORWAR, O. Electroporation of Single Cells and Tissues with an Electrolyte-filled Capillary. **Analytical Chemistry**, v. 73, n. 18, p. 4469–4477, set. 2001.

NOLKRANTZ, K.; FARRE, C.; HURTIG, K. J.; RYLANDER, P.; ORWAR, O. Functional Screening of Intracellular Proteins in Single Cells and in Patterned Cell Arrays Using Electroporation. **Analytical Chemistry**, v. 74, n. 16, p. 4300–4305, 2002.

NOLLET, J. A. **Recherches sur les causes particulières des phénomènes électriques**. Delatour, Paris: [s.n.].

NOVICKIJ, V.; GRAINYS, A.; LASTAUSKIENĖ, E.; KANANAVIČIŪTĖ, R.; PAMEDYTYTĖ, D.; KALĖDIENĖ, L.; NOVICKIJ, J.; MIKLAVČIČ, D. Pulsed Electromagnetic Field Assisted in vitro Electroporation: A Pilot Study. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 33537, 16 dez. 2016.

NOVICKIJ, V.; GRAINYS, A.; NOVICKIJ, J.; TOLVAISIENE, S.; MARKOVSKAJA, S. Compact Electro-Permeabilization System for Controlled Treatment of Biological Cells and Cell Medium Conductivity Change Measurement. **Measurement Science Review**, v. 14, n. 5, 1 jan. 2014.

O'BRIEN, J. A.; HOLT, M.; WHITESIDE, G.; LUMMIS, S. C. ; HASTINGS, M. H. Modifications to the hand-held Gene Gun: improvements for in vitro Biolistic transfection of organotypic neuronal tissue. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 112, n. 1, p. 57–64, 2001.

OKINO, M.; MOHRI, H. Effects of a high-voltage electrical impulse and an anticancer drug on in vivo growing tumors. **Japanese journal of cancer research : Gann**, v. 78, n. 12, p. 1319–21, dez. 1987.

OLOFSSON, J.; NOLKRANTZ, K.; RYTTSÉN, F.; LAMBIE, B. A.; WEBER, S. G.; ORWAR, O. Single-cell electroporation. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 14, n. 1, p. 29–34, 2003.

OPPENHEIN, A. V.; WILLSKY, A. S.; NAWAB, S. H. **Signals and Systems**. 2. ed. [s.l.]: Pearson, 1996.

OU, Q.-X.; NIKOLIC-JARIC, M.; GÄNZLE, M. Mechanisms of inactivation of *Candida humilis* and *Saccharomyces cerevisiae* by pulsed electric fields. **Bioelectrochemistry**, v. 115, p. 47–55, jun. 2017.

PAINTING, K.; KIRSOP, B. A quick method for estimating the percentage

of viable cells in a yeast population, using methylene blue staining. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 6, n. 3, p. 346–347, set. 1990.

PAKHOMOV, A. G.; MARKOV, M. S.; MIKLAŤIČ, D. **Advanced Electroporation Techniques in Biology and Medicine**. 1. ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2010.

PARK, S.; BASSAT, D. BEN; YOSSFON, G. Individually addressable multi-chamber electroporation platform with dielectrophoresis and alternating-current-electro-osmosis assisted cell positioning. **Biomicrofluidics**, v. 8, n. 2, p. 024117, mar. 2014.

PAVLIN, M.; KANDUŠER, M.; REBERŠEK, M.; PUCIHAR, G.; HART, F. X.; MAGJAREVIĆCACUTE, R.; MIKLAŤIČ, D. Effect of Cell Electroporation on the Conductivity of a Cell Suspension. **Biophysical Journal**, v. 88, n. 6, p. 4378–4390, jun. 2005.

PAVLIN, M.; LEBEN, V.; MIKLAŤIČ, D. Electroporation in dense cell suspension—Theoretical and experimental analysis of ion diffusion and cell permeabilization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1770, n. 1, p. 12–23, jan. 2007.

PAVLIN, M.; MIKLAŤIČ, D. Effective Conductivity of a Suspension of Permeabilized Cells: A Theoretical Analysis. **Biophysical Journal Volume**, v. 85, p. 719–729, 2003.

PINTARELLI, G. B.; NEGREIROS, M.; BERKENBROCK, J. A.; OLIVEIRA, G.; SILVA, F. R. M. B.; SUZUKI, D. O. H. Permeabilization of Wistar Rats Liver Tissue Using Monopolar Pulses – Analysis of The Influence of 1 Hz and 1 kHz Repetition Rate on Electroporation. **Anais do XXV CBEB - Edição 2016**, n. October, p. 321–324, 2016.

POTTER, H.; WEIR, L.; LEDER, P. Enhancer-dependent expression of human Kc immunoglobulin genes introduced into mouse pre-B lymphocytes by electroporation (DNA-mediated transfection/tissue-specific gene expression/B-lymphocyte development/gpt selection). **Genetics**, v. 81, p. 7161–7165, 1984.

PRUTCHI, D.; NORRIS, M. **Design and Development of Medical Electronic Instrumentation: A Practical Perspective of the Design, Construction, and Test of Medical Devices**. New York, United States: John Wiley and Sons Ltd, 2004.

PUCIHAR, G.; MIKLAŤIČ, D.; KOTNIK, T. A Time-Dependent

Numerical Model of Transmembrane Voltage Inducement and Electroporation of Irregularly Shaped Cells. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 56, n. 5, p. 1491–1501, maio 2009.

PUCIHAR, G.; MIR, L. .; MIKLAVČIČ, D. The effect of pulse repetition frequency on the uptake into electropermeabilized cells in vitro with possible applications in electrochemotherapy. **Bioelectrochemistry**, v. 57, n. 2, p. 167–172, set. 2002.

PULSEMASTER. **Pulsemaster - Pulsed electric field (PEF) processing systems**. Disponível em: <www.pulsemaster.us>. Acesso em: 23 abr. 2018.

PUTRI, R. I.; SYAMSIANA, I. N.; HAWA, L. C. Design of High Voltage Pulse Generator for Pasteurization by Pulse Electric Field (PEF). **International Journal of Computer and Electrical Engineering**, v. 2, n. 5, p. 1793–8163, 2010.

RAMOS, A.; LIMA, A. Electroporation of *Kluyveromyces marxianus* and β -D-galactosidase Extraction. In: **Applied Biological Engineering - Principles and Practice**. [s.l.]: InTech, 2012. p. 417–434.

RAMOS, A.; SCHNEIDER, A. L. S.; SUZUKI, D. O. H.; MARQUES, L. B. Sinusoidal Signal Analysis of Electroporation in Biological Cells. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 59, n. 10, p. 2965–2973, out. 2012.

RAMOS, A.; SUZUKI, D. O. H.; MARQUES, J. L. B. Numerical Simulation of Electroporation in Spherical Cells. **Artificial Organs**, v. 28, n. 4, p. 357–361, abr. 2004.

RAMOS, A.; SUZUKI, D. O. H.; MARQUES, J. L. B. Numerical study of the electrical conductivity and polarization in a suspension of spherical cells. **Bioelectrochemistry**, v. 68, n. 2, p. 213–217, maio 2006.

RAMOS, A.; WEINERT, R. L. Mathematical and computational method for electrical analysis of biological tissues. **Journal of Computational Electronics**, v. 17, n. 1, p. 382–391, 11 mar. 2018.

RITTER, J. W. **Beyträge zur nähern Kenntniss des Galvanismus und der Resultate seiner**. Vol. 2 ed. [s.l.]: Physiologie des Electrotonus. Berlin: Hirschwald, 1802.

RUBINSKY, B. **Irreversible Electroporation**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2010.

RUBINSKY, J.; ONIK, G.; MIKUS, P.; RUBINSKY, B. Optimal Parameters for the Destruction of Prostate Cancer Using Irreversible Electroporation. **The Journal of Urology**, v. 180, n. 6, p. 2668–2674, dez. 2008.

RYTTSE, F.; FARRE, C.; BRENNAN, C.; WEBER, S. G.; NOLKRANTZ, K.; JARDEMARK, K.; CHIU, D. T.; ORWAR, O.; RYTTSEN, F.; FARRE, C.; BRENNAN, C.; WEBER, S. G.; NOLKRANTZ, K.; JARDEMARK, K.; CHIU, D. T.; ORWAR, O. Characterization of Single-Cell Electroporation by Using Patch-Clamp and Fluorescence Microscopy. **Biophysical Journal**, v. 79, n. 4, p. 1993–2001, out. 2000.

SAHLY, I.; EREZ, H.; KHOUTORSKY, A.; SHAPIRA, E.; SPIRA, M. E. Effective expression of the green fluorescent fusion proteins in cultured Aplysia neurons. **Journal of neuroscience methods**, v. 126, n. 2, p. 111–7, 30 jun. 2003.

SALE, A. J. H.; HAMILTON, W. A. Effects of high electric fields on microorganisms: I. Killing of bacteria and yeasts. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 148, n. 3, p. 781–788, 27 dez. 1967.

SALE, A. J. H.; HAMILTON, W. A. Effects of high electric fields on microorganisms: III. Lysis of erythrocytes and protoplasts. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 163, n. 1, p. 37–43, 1 ago. 1968.

SANO, M. B.; DEWITT, M. R.; TEETER, S. D.; XING, L. Optimization of a single insertion electrode array for the creation of clinically relevant ablations using high-frequency irreversible electroporation. **Computers in Biology and Medicine**, v. 95, n. February, p. 107–117, abr. 2018.

SANTRA, T.; TSENG, F. Recent Trends on Micro/Nanofluidic Single Cell Electroporation. **Micromachines**, v. 4, n. 3, p. 333–356, 6 set. 2013.

SCHEFFER, H. J.; NIELSEN, K.; DE JONG, M. C.; VAN TILBORG, A. A. J. M.; VIEVEEN, J. M.; BOUWMAN, A. (R. A. .); MEIJER, S.; VAN KUIJK, C.; VAN DEN TOL, P. (M. P. .); MEIJERINK, M. R. Irreversible Electroporation for Nonthermal Tumor Ablation in the Clinical Setting: A Systematic Review of Safety and Efficacy. **Journal of Vascular and Interventional Radiology**, v. 25, n. 7, p. 997–1011, 1 jul. 2014.

SCHLENSTEDT, C.; SHALASH, A.; MUTHURAMAN, M.; FALK, D.; WITT, K.; DEUSCHL, G. Effect of high-frequency subthalamic neurostimulation on gait and freezing of gait in Parkinson's disease: a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Neurology**, v.

24, n. 1, p. 18–26, 1 jan. 2017.

SEL, D.; CUKJATI, D.; BATIUSKAITE, D.; SLIVNIK, T.; MIR, L. M.; MIKLAVCIC, D. Sequential Finite Element Model of Tissue Electroporabilization. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 52, n. 5, p. 816–827, maio 2005.

SHIRAKASHI, R.; SUKHORUKOV, V. L.; TANASAWA, I.; ZIMMERMANN, U. Measurement of the permeability and resealing time constant of the electroporated mammalian cell membranes. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 47, n. 21, p. 4517–4524, 1 out. 2004.

SMITH, K. C. **A unified model of electroporation and molecular transport**. Massachusetts Institute of Technology, 2011.

SNOJ, M.; CEMAZAR, M.; SLEKOVEC KOLAR, B.; SERSA, G. Effective treatment of multiple unresectable skin melanoma metastases by electrochemotherapy. **Croatian medical journal**, v. 48, n. 3, p. 391–5, jun. 2007.

STÄMPFLI, R. **Reversible electrical breakdown of the excitable membrane of a Ranvier node** *Anais Academia Brasileira de Ciências*, 1957. Disponível em: <<http://memoria.bn.br/DocReader/158119/11062>>

STÄMPFLI, R.; WILLI, M. Membrane potential of a ranvier node measured after electrical destruction of its membrane. **Experientia**, v. 13, n. 7, p. 297–298, jul. 1957.

SUÁREZ, C.; SOBA, A.; MAGLIETTI, F.; OLAIZ, N.; MARSHALL, G. The Role of Additional Pulses in Electroporabilization Protocols. **PLoS ONE**, v. 9, n. 12, p. e113413, 1 dez. 2014.

SUGA, M.; HATAKEYAMA, T. Gene transfer and protein release of fission yeast by application of a high voltage electric pulse. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 394, n. 1, p. 13–16, 26 maio 2009.

SUZUKI, D. O. H.; ANSELMO, J.; DE OLIVEIRA, K. D.; FREYTAG, J. O.; RANGEL, M. M. M.; MARQUES, J. L. B.; RAMOS, A. Numerical Model of Dog Mast Cell Tumor Treated by Electrochemotherapy. **Artificial Organs**, v. 39, n. 2, p. 192–197, fev. 2015.

SUZUKI, D. O. H.; BERKENBROCK, J. A.; DE OLIVEIRA, K. D.; FREYTAG, J. O.; RANGEL, M. M. M. Novel application for electrochemotherapy: Immersion of nasal cavity in dog. **Artificial Organs**,

v. 41, n. 8, p. 767–773, 1 ago. 2017.

SUZUKI, D. O. H.; MARQUES, C. M. G.; RANGEL, M. M. M. Conductive Gel Increases the Small Tumor Treatment With Electrochemotherapy Using Needle Electrodes. **Artificial Organs**, v. 40, n. 7, p. 705–711, jul. 2016.

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**, v. 58, n. 12, p. 3310–3318, dez. 2011.

TEISSIE, J.; GOLZIO, M.; ROLS, M. P. Mechanisms of cell membrane electropermeabilization: A minireview of our present (lack of?) knowledge. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1724, n. 3, p. 270–280, ago. 2005.

TERUEL, M. N.; MEYER, T. Electroporation-induced formation of individual calcium entry sites in the cell body and processes of adherent cells. **Biophysical Journal**, v. 73, n. 4, p. 1785–1796, out. 1997.

THOMSEN, S.; PEARCE, J. A. Thermal Damage and Rate Processes in Biologic Tissues. In: WELCH, A. J.; VAN GEMERT, M. J. C. (Eds.). **Optical-Thermal Response of Laser-Irradiated Tissue**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2011. p. 487–549.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10a. ed. [s.l.]: Artmed, 2012.

TRAN, S.-L.; PUHAR, A.; NGO-CAMUS, M.; RAMARAO, N. Trypan Blue Dye Enters Viable Cells Incubated with the Pore-Forming Toxin HlyII of *Bacillus cereus*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 9, p. e22876, 6 set. 2011.

UESAKA, N.; HAYANO, Y.; YAMADA, A.; YAMAMOTO, N. Single Cell Electroporation Method for Mammalian CNS Neurons in Organotypic Slice Cultures. In: NAKAMURA, H. (Ed.). **Electroporation and Sonoporation in Developmental Biology**. 1. ed. Tokyo: Springer Japan, 2009. p. pp 169–177.

VEGA-MERCADO, H.; GONGORA-NIETO, M. M.; BARBOSA-CANOVAS, G. V.; SWANSON, B. G. Pulsed Electric Fields in Food Preservation. In: RAHMAN, M. S. (Ed.). **Handbook of Food Preservation**. Second ed. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2007. p. 783–813.

VIANA, M. A.; BASSANI, R. A.; PETRUCCI, O.; MARQUES, D. A.; BASSANI, J. W. M. System for open-chest, multidirectional electrical defibrillation. **Research on Biomedical Engineering**, v. 32, n. 1, p. 74–84, 12 abr. 2016.

VOYER, D.; SILVE, A.; MIR, L. M.; SCORRETTI, R.; POIGNARD, C. Dynamical modeling of tissue electroporation. **Bioelectrochemistry**, v. 119, p. 98–110, fev. 2018.

WAGSTAFF, P. G. K.; DE BRUIN, D. M.; VAN DEN BOS, W.; INGELS, A.; VAN GEMERT, M. J. C.; ZONDERVAN, P. J.; VERDAASDONK, R. M.; VAN LIENDEN, K. P.; VAN LEEUWEN, T. G.; DE LA ROSETTE, J. J. M. C. H.; LAGUNA PES, M. P. Irreversible electroporation of the porcine kidney: Temperature development and distribution. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 33, n. 4, p. 168.e1-168.e7, abr. 2015.

WANG, C.-H.; LEE, Y.-H.; KUO, H.-T.; LIANG, W.-F.; LI, W.-J.; LEE, G.-B. Dielectrophoretically-assisted electroporation using light-activated virtual microelectrodes for multiple DNA transfection. **Lab Chip**, v. 14, n. 3, p. 592–601, 2014.

WANG, M.-S.; ZENG, X.-A.; SUN, D.-W.; HAN, Z. Quantitative analysis of sublethally injured *Saccharomyces cerevisiae* cells induced by pulsed electric fields. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 672–677, mar. 2015.

WANG, M.; ORWAR, O.; OLOFSSON, J.; WEBER, S. G. Single-cell electroporation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 8, p. 3235–3248, 2010.

WEAVER, J. C. Electroporation of Biological Membranes from Multicellular to Nano Scales. **IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation**, v. 10, n. 5, p. 754–768, 2003.

WEAVER, J. C.; CHIZMADZHEV, Y. A. Theory of electroporation: A review. **Bioelectrochemistry and Bioenergetics**, v. 41, n. 2, p. 135–160, dez. 1996.

WEAVER, J. C.; SMITH, K. C.; ESSER, A. T.; SON, R. S.; GOWRISHANKAR, T. R. A brief overview of electroporation pulse strength–duration space: A region where additional intracellular effects are expected. **Bioelectrochemistry**, v. 87, p. 236–243, out. 2012.

WHEATLEY, K.; WILSON, J. S.; GAUNT, P.; MARSDEN, J. R. Surgical excision margins in primary cutaneous melanoma: A meta-analysis and Bayesian probability evaluation. **Cancer Treatment Reviews**, v. 42, p. 73–81, jan. 2016.

ZHENG, Q. A.; CHANG, D. C. High-efficiency gene transfection by in situ electroporation of cultured cells. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1088, n. 1, p. 104–10, 17 jan. 1991.

ZIMMERMANN, U. The effect of high-intensity electric field pulses on eukaryotic cell membranes: fundamentals and applications. In: ZIMMERMANN, U.; NEIL, G. A. (Eds.). **Electromanipulation of Cells**. [s.l.]: CRC Press, 1996.

ZIMMERMANN, U.; NEIL, G. A. **Electromanipulation of cells**. [s.l.]: CRC Press, 1996.

ZUPANIC, A.; KOS, B.; MIKLAVCIC, D. Treatment planning of electroporation-based medical interventions: electrochemotherapy, gene electrotransfer and irreversible electroporation. **Physics in Medicine and Biology**, v. 57, n. 17, p. 5425–5440, 7 set. 2012.

APÊNDICE A – Busca por anterioridade do invento

Tabela 7 – Palavras-chave relacionadas ao presente invento (palavras-chaves utilizadas na busca de anterioridade).

Português	Inglês
1. Eletroporador	1. Electroporator
2. Eletroquimioterapia	2. Electrochemotherapy
3. Permeabilização Celular	3. Cell Permeabilization
4. Eletroporação Celular	4. Cell Electroporation
5. Eletropermeabilização Celular	4. Cell Electropermeabilization
6. Eletroporação Irreversível	5. Irreversible Electroporation

Fonte: Próprio autor.

Tabela 8 – Busca de anterioridade em bases de patente que influenciem no requisito novidade e/ou que possam ser utilizados como modelo para a descrição do invento proposto.

Título documento de patente	Nº do documento de patente
Processo e Equipamento para Aplicação de Corrente Contínua Monopolar de Baixa Intensidade (Eletroterapia ou Eletrólise Monopolar) Associada ou Não à Quimioterapia (Eletroquimioterapia Monopolar) para o Tratamento de Tumores	PI 0601668-5 A
Equipamento e Processo para Aplicação de Pulsos Elétricos de Alta Voltagem para a Técnica de Eletroquimioterapia por Eletroporação no Tratamento de Neoplasias	PI 0903000-0 A2
Composição Para Induzir Ferimento De Membrana Celular; ... Composição Para Permeabilizar Uma Célula; ... Método Para Matar Uma Célula Cancerosa; ... Método Para Permeabilizar Uma Célula; ...	PI 0517057-5 A
Método e Aparelho para Uso de Envio de Drogas e Genes Mediado a Eletroporação	PI 9806069-4 A
Electroporation System with Voltage Control Feedback for Clinical Applications	US 5,439,440
Apparatus for Addressing Needle Array Electrodes for Electroporation Therapy	US 6,055,453
Electroporation Employing User-Configured Pulsing Scheme	US 6,096,020
Apparatus for Electroporation	US 6,103,084
Electroporation Cell with Arc Prevention/Reduction	US 6,258,592 B1
Cell/Tissue Analysis via Controlled Electroporation	US 6,482,619 B1

Controlled Electroporation and Mass Transfer Across Cell Membranes in Tissue	US 7,053,063 B2
Method and Apparatus for Reducing Electroporation-Mediated Muscle Reaction and Pain Response	US 7,054,685 B2
Constant Current Electroporation Device and Method of Use	US 2005/0052630
Device and Method for Electroporation-Based Delivery of Molecules Into Cells and Dynamic Monitoring of Cell Responses	US 2006/0121446 A1
Programmable Apparatus and Method for Optimizing and Real Time Monitoring of Gene Transfection Based on Used Configured Arbitrary Waveform Pulsing Train	US 2006/0142688 A1
High-Frequency Electroporation for Cancer Therapy	US 2012/0109122 A1
System, Method and Computer Accessible Medium for In-Vivo Tissue Ablation and/or Damage	US 2016/0184003 A1

Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE B –Segurança do Equipamento e Classificação

Nesse apêndice há maior detalhamento sobre a segurança de um equipamento eletroporador na área médica. O conhecimento das classificações do equipamento ajudam na previsão de tempo necessário para certificação de equipamentos com os órgãos competentes.

1) Tipos de partes de um equipamento eletromédico:

Existem quatro tipos de partes de equipamentos eletromédicos (PRUTCHI; NORRIS, 2004). Todas as partes devem apresentar correntes de fuga condizentes em uso normal e em caso de falha única. A corrente de fuga pode ser minimizada com uso de invólucro, separação física (*gap*) e isolamento galvânica.

- i. Parte acessível: são partes que podem ser “tocadas” pelo operador. Por exemplo, o painel do equipamento ou aberturas.
- ii. Parte viva: partes que podem apresentar corrente de fuga para a terra. Geralmente essas correntes são providas da fase ou neutro da rede elétrica.
- iii. Parte de sinais de entrada e saída: geralmente são circuitos de interface entre o equipamento e outro dispositivo que mostra/adquire sinais.
- iv. Parte aplicada: parte de contato físico com o paciente. Essa parte pode proporcionar caminho de corrente pelo paciente e por outras partes do equipamento médico. Por causa dessas razões, ela geralmente é a parte mais crítica de um equipamento médico.

2) Tipos de isolamento:

Existem isolamento básico, duplo, suplementar e reforçado. Esses são aplicados entre as partes de um equipamento eletro médico. O isolamento básico geralmente é o próprio invólucro (gabinete). Dependendo do equipamento pode ser necessário isolamento adicional. Dependendo do grau de isolamento (limites de corrente de fuga em função de características elétricas e geométricas dos materiais utilizados o isolamento é classificado em duplo ou suplementar, duplo ou reforçado e reforçado. Por exemplo, uso de distâncias superior a 12 mm entre partes é um dos requisitos para isolamento dupla ou reforçada (PRUTCHI; NORRIS, 2004).

É sugerido as seguintes classificações para o equipamento desenvolvido:

1) Classificação de acordo com o tipo de proteção contra choque elétrico:

Equipamento de Classe II: “Equipamento no qual a proteção contra choque elétrico não se fundamenta apenas na isolação básica, mas incorpora ainda precauções de segurança adicionais, como isolação dupla ou isolação reforçada, não comportando recursos de aterramento para proteção, nem dependendo de condições de instalação” – ABNT NBR IEC 60601-1:2016.

O eletroporador além do gabinete em plástico PVC também possui isolação galvânica em sua alimentação. Por causa disso ele não depende de recursos de instalações elétricas ou condições de instalação. Observa-se que devem ser respeitadas requerimentos de distâncias entre partes.

2) De acordo com o grau de proteção contra o choque elétrico:

Equipamento tipo BF: “Equipamento que proporciona um grau de proteção especial contra choque elétrico, particularmente quanto à corrente de fuga admissível” e parte aplicada (tipo F), que é “eletricamente isolada da terra e de outras partes do equipamento médico, isto é, eletricamente flutuante¹⁹” – ABNT NBR IEC 60601-1:2016.

O eletroporador apresenta a fonte de alta tensão contínua flutuante. Essa fonte que é conectada aos eletrodos e paciente.

3) De acordo com o grau de proteção contra penetração nociva de água:

O equipamento é montado em gabinete que apresenta, pelo menos, proteção conta poeira e borrifos de água (IP 53). Os botões também

¹⁹Eletricamente flutuante: circuito sem referência a terra. Essa característica impede caminho de corrente de choque elétrico proveniente da rede elétrica.

apresentam proteção compatível. A proteção do display LCD é feita com material acrílico que impede que materiais atinjam o mesmo.

4) De acordo com o grau de segurança em atmosferas explosivas:

O equipamento não deve ser utilizado em atmosferas explosivas, pois existe risco de centelhamento entre os eletrodos.

5) De acordo com o modo de operação:

O equipamento é um equipamento de operação não contínua. Apesar disso, essa restrição é de acordo com o objetivo da utilização e não devido à aumento de temperatura do equipamento.

6) De acordo com classe de Risco Intrínseco à Saúde

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) separa os produtos para saúde em classes e regras de risco. Essas classificações especificam os requisitos para certificação. O eletroporador pode ser considerado um equipamento eletro médico ativo²⁰ não invasivo de classe I. Os eletrodos usados no eletroporador são produtos médicos invasivos (podem penetrar pela pele) de classe II. Os eletrodos são instrumentos cirúrgicos de uso transitório (até 60 minutos de uso contínuo). Os eletrodos podem ser reutilizáveis ou descartáveis.

²⁰Um equipamento ativo depende de energia elétrica para seu funcionamento.

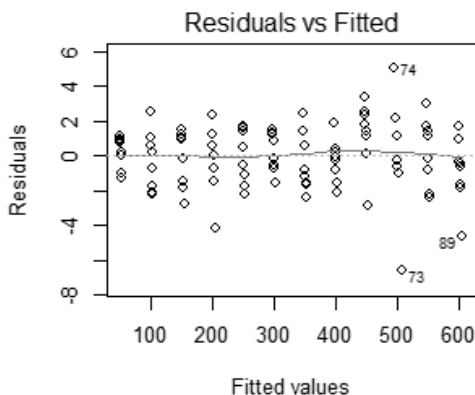
APÊNDICE C – Diagnóstico de Gráficos Básico (Resíduos) no Modelo de Regressão do Sistema de Aquisição

O diagnóstico básico do modelo de regressão do sistema de aquisição (de tensão e corrente) foi realizado a partir da análise dos resíduos. Os resíduos podem ser interpretados como dispersão das coletas em relação ao modelo linear, conforme equação 9.

$$\begin{aligned} \text{Resíduos} = \\ \text{Valor Observado} \\ - \text{Valor Previsto na Regressão} \end{aligned} \quad (9)$$

A Figura 56 mostra os resíduos das amostras de tensão, e a Figura 57a e b mostram os resíduos das amostras corrente com escala de 5 e 12 A respectivamente. Nas figuras a linha pontilhada é a média dos resíduos, essa é utilizada para criação do modelo de regressão linear. A linha sólida indica variância entre os pontos ajustados. Não é percebido mesma variância entre as amostras (suposição da heteroscedasticidade²¹ é obedecida) e nenhuma tendência, ou seja, não há outra variável que interfere nos dados obtidos, como por exemplo não linearidades do sistema de aquisição. Esse tipo de diagnóstico informa que o modelo de regressão linear é adequado para os dados

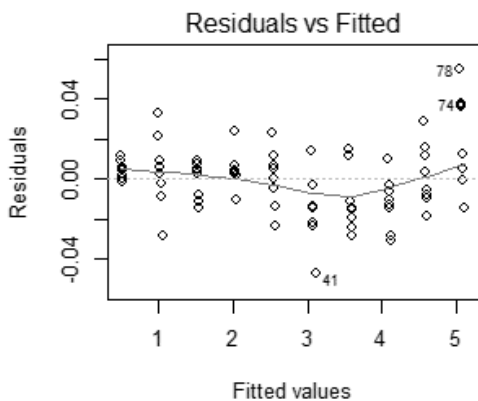
Figura 56 – Resíduo presente em leituras de tensão. Pior caso é de -7,5 V.



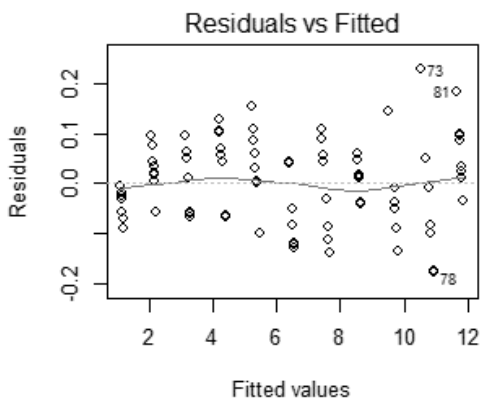
Fonte: Próprio autor.

²¹Heteroscedasticidade: circunstância que variabilidade (dispersão) do conjunto de dados é desigual em toda a faixa de valores.

Figura 57 – Resíduo presente em leituras de corrente. (i) Resíduos para leitura de corrente com escala de até 5 A (pior observação de resíduo foi de 0,048 A); (ii) Resíduos para leitura de corrente com escada de 12 A (pior observação de resíduo foi de 0,250 A).



(i)



(ii)

Fonte: Próprio autor.

APÊNDICE D – Espectro de Frequência Protocolo ESOPE

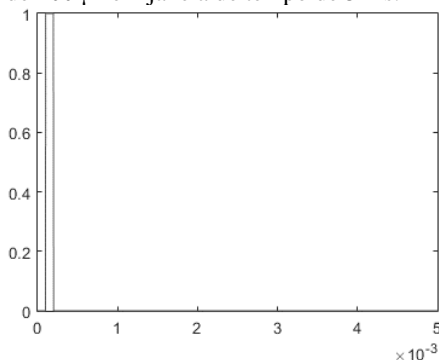
O protocolo definido pelo ESOPE (*Standard operating procedures of the electrochemotherapy*), usual em técnicas de eletroquimioterapia, foi publicado 2006 (MIR *et al.*, 2006). Esse protocolo tem as seguintes características: oito pulsos com duração de 100 μ s, taxa de repetição de 1 Hz a 5 kHz e amplitude de 100 kV/m a 130 kV/m.

Nesse apêndice objetivou-se obtenção aproximada do espectro de frequência do protocolo ESOPE. Para isso, foi simulado um pulso de 100 μ s em janela de tempo de 5 ms e 50 mil pontos (frequência de amostragem f_s igual a 10 MHz), conforme Figura 58. Utilizou-se função “fft” do software MATLAB R2015a 64bits (algoritmo de transformada discreta de Fourier). A distribuição de potência espectral é de acordo com a Figura 59.

Na Figura 60 foram separados três grupos de frequência: até 1 kHz, de 1 kHz até 10 kHz e acima de 10 kHz. Para esses, foram separadas as parcelas de energia representam. Observa-se que 97 % do sinal está presente em frequência até 10 kHz. Frequências acima de 10 kHz representam apenas 3 % da energia desse sinal.

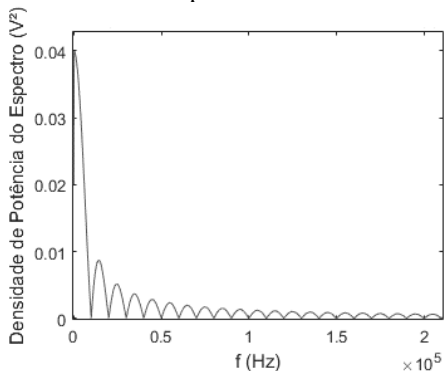
Observa-se que existe conhecimento de erros inerentes desse tipo de transformação. Por exemplo, o algoritmo *Fast Fourier Transform* (FFT) é uma maneira de realização aproximada da transformada discreta de Fourier (DFT), a DFT supõe que o sinal é periódico além do intervalo de observação (e não oito pulsos), as dimensões da janela influenciam na taxa de repetição (ou seja, a janela de 5 ms utilizada impõe taxa de repetição de 200 Hz), e a DFT é uma transformação discreta e na Figura 59 os pontos discretos foram ligados para facilitar observação.

Figura 58 – Pulso de 100 μ s em janela de tempo de 5 ms.



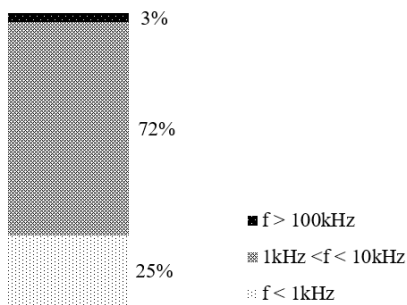
Fonte: Próprio autor.

Figura 59 – Espectro unilateral do protocolo ESOPE.



Fonte: Próprio autor.

Figura 60 – Distribuição de potências do protocolo ESOPE para três grupos de frequências.



Fonte: Próprio autor.

O código para a transformação é disponível em repositório online atualizado pelo autor: <github.com/gpintarelli/EP_protocol_FFT>.

APÊNDICE E – Desenvolvimento Analítico da Equação de Alteração de Temperatura

Nesse apêndice é exposto o desenvolvimento de equação de alteração de temperatura em função da aplicação de protocolos de campo elétrico em certo intervalo de tempo. As suposições necessárias para obter a equação final (equação 18) são sublinhadas.

A lei de Joule (efeito Joule) explica o acréscimo de energia em Joules em um material decorrente da passagem de corrente elétrica, equação 10.

$$\Delta Q = R \int_{t_{\text{inicio}}}^{t_{\text{fim}}} i^2 dt \quad (10)$$

Onde ΔQ é a energia térmica gerada (Joules, SI), R a resistência elétrica do material (Ω , SI) e i é a corrente elétrica que percorre o material durante o intervalo de tempo dt (s, SI).

Para protocolo monopolar de duração t e amostra puramente resistiva, podemos simplificar a equação 10 para a 11.

$$\Delta Q = Ri^2 t = \frac{V^2}{R} t \quad (11)$$

Supondo campo elétrico homogêneo em todo volume entre eletrodos de placas paralelas, podemos estabelecer que o módulo do campo elétrico E (V/m) é proporcional a razão de tensão V (V, SI) aplicada entre eletrodos e distância d entre eletrodos (m, SI), conforme equação 12.

$$E = \frac{V}{d} \quad (12)$$

Além disso a resistência da amostra puramente resistiva R é em função somente de condutividade σ (S/m, SI) e área A única de contato da amostra com eletrodos (m^2 , SI), conforme equação 13.

$$R = \frac{d}{\sigma A} \quad (13)$$

Substituindo na equação 11 os parâmetros V e R é encontrado a equação 14. Essa representa a energia em Joules transferida para amostra após protocolo de eletroporação.

$$\Delta Q = E^2 t \sigma A d \quad (14)$$

Se toda a amostra estiver entre o volume de eletrodos (Vol), então o volume abrangido é de acordo com equação 15.

$$Vol = A d \quad (15)$$

Se toda energia transferida ao material se converter em energia térmica somente no volume do material de maneira homogênea, o acréscimo de temperatura ΔT (K, SI) é conforme equação 16.

$$\Delta T = \frac{\Delta Q}{m c} \quad (16)$$

Onde c é o calor específico à pressão constante ($J/m^3 \text{ } ^\circ C$) e m a massa do material (kg).

A alteração de temperatura ΔT ($^\circ C$) de uma amostra após aplicação de protocolo de eletroporação é de acordo com a equação 17.

$$\Delta T = \frac{E^2 t \sigma Vol}{m c} \quad (17)$$

Se a densidade da solução for de 1 kg/L (como água e boa aproximação para soluções iônicas com eletrólito de água), então o volume (Vol) é igual a massa (m). Por fim, a alteração de temperatura ($^\circ C$) de uma amostra após aplicação de protocolo de eletroporação é de acordo com a equação 18.

$$\Delta T = \frac{E^2 t \sigma}{c} \quad (18)$$

A equação 18 foi encontrada na literatura (SMITH, 2011), porém dedução não é apresentada. Essa equação não apresenta igualdade de unidade, que ocorre devido hipótese de igualdade densidade, ou seja, igualdade unidade de massa (kg) com unidade de volume (L).

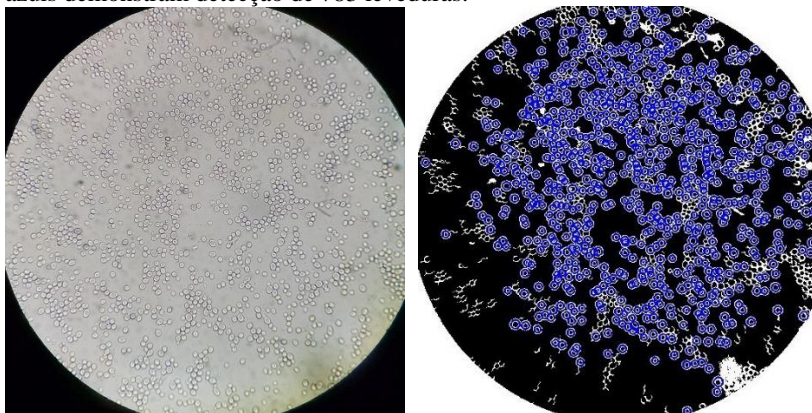
APÊNDICE F – Avaliação Raio Médio Leveduras

Saccharomyces cerevisiae (CCT 0761, ATCC 36900) foram preparadas conforme seção 5.2.1.1. A Figura 61 mostra a imagem de leveduras preparadas e dispostas em lâmina de microscópio ótico (*input* do software) e o resultado de detecção das 783 amostras de leveduras.

Código em MATLAB compatível foi desenvolvido com propósito de obter o raio médio de leveduras em imagem de microscópio ótico. O código é disponível em repositório online atualizado pelo autor: <github.com/gpintarelli/yeast_radius_count>.

O processo de calibração foi realizado adotando câmara de Neubauer como padrão outro (nesse trabalho 1 pixel é equivalente a 189,4 nm).

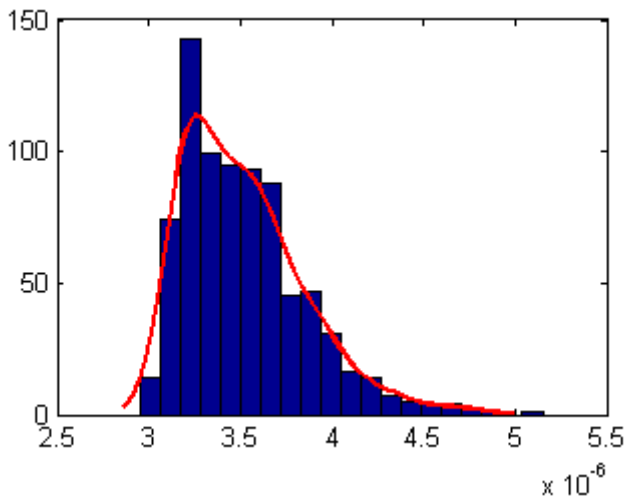
Figura 61 – À esquerda imagem obtida através de microscópio óptico Biofocus (BIO1600BA). À direita resultado da detecção do software projetado. Os círculos azuis demonstram detecção de 783 leveduras.



Fonte: Próprio autor.

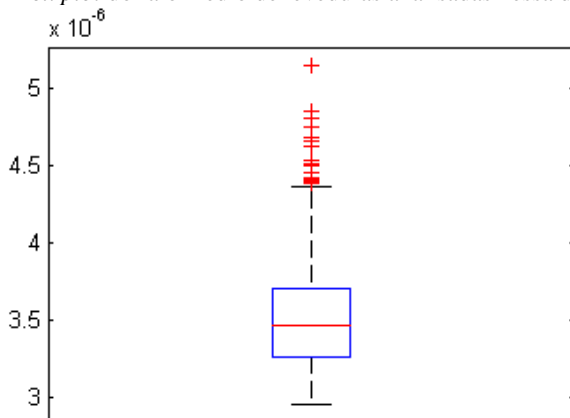
O histograma dos resultados de raio médio e *box plox* são disponíveis na Figura 62 e Figura 63 respectivamente. Desses dados conclui-se que a distribuição de raio médio de levedura *Saccharomyces cerevisiae* (CCT 0761, ATCC 36900) não segue distribuição normal. Pois, não apresenta histograma normal e não apresenta *box plot* simétrico. Já que o raio médio não segue a distribuição normal pode ser utilizado a mediana e percentil (5 e 95 %) para representar esses valores. Obteve-se o raio médio de 3.46 μm , percentil inferior igual à 3.10 μm e percentil superior igual à 4.14 μm .

Figura 62 – Histograma do raio médio de leveduras analisadas nessa dissertação. A linha em vermelho indica uma curva compatível aos dados, obtida com Matlab.



Fonte: Próprio autor.

Figura 63 – *Box plot* do raio médio de leveduras analisadas nessa dissertação.



Fonte: Próprio autor.

