



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS FLORIANÓPOLIS PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA
ELÉTRICA

Afrânio de Castro Antonio Júnior

**DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS MINIMAMENTE INVASIVOS PARA
ELETROQUIMIOTERAPIA NO TRATAMENTOS DE CÂNCERES: ESTUDO *IN
SILICO E IN VITRO***

FLORIANÓPOLIS

2022

Afrânio de Castro Antonio Júnior

**DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS MINIMAMENTE INVASIVOS PARA
ELETROQUIMIOTERAPIA NO TRATAMENTOS DE CÂNCERES: ESTUDO *IN
SILICO E IN VITRO***

Dissertação/Tese submetida ao Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade
Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de
Doutor em Engenharia Elétrica
Orientador: Daniela Ota Hisayasu Suzuki, Dra.

FLORIANÓPOLIS

2022

Ficha de identificação da obra

Antonio Júnior, Afrânio de Castro

Desenvolvimento de eletrodos minimamente invasivos para eletroquimioterapia no tratamentos de cânceres: estudo in silico e in vitro : Desenvolvimento de eletrodos minimamente invasivos para eletroquimioterapia no tratamentos de cânceres: estudo in silico e in vitro / Afrânio de Castro Antonio Júnior ; orientadora, Daniela Ota Hisayasu Suzuki, 2022.

251 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

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

Afrânio de Castro Antonio Jr

**DESENVOLVIMENTO DE ELETRODOS MINIMAMENTE INVASIVOS PARA
ELETROQUIMIOTERAPIA NO TRATAMENTOS DE CÂNCERES: ESTUDO *IN
SILICO E IN VITRO***

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

Prof. Marcelo Monte Mór Rangel, Dr.
VetCâncer Oncologia e Patologia Animal

Prof. Paulo José Abatti, Dr.
Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR

Prof. Euler de Vilhena Garcia, Dr.
Universidade de Brasília – UnB

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

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

Profª. Daniela Ota Hisayasu Suzuki, Dra.
Orientadora

Florianópolis, 2022.

Este trabalho é dedicado aos meus colegas de equipe e em especial a minha orientadora. Deus, liberdade, família e pátria!

AGRADECIMENTOS

Agradecimentos cordiais para os amigos:

Aline Pignaton Antonio
André Sebastião de Andrade
Antonio Pacheco
Clara Teresa de Souza Ramos
Daniella de Lourdes Luna Santana de Andrade
Diego Botelho
Eduardo Gabriel Christmann
Eduardo Valmir de Souza
Felipe Rettore Andreis
Felix Antonio
Guilherme Brasil Pintarelli
Heitor Hemerson
Jéssica Rodrigues
Jorge Loureiro
Juliana Vincoletto Rosa
Karina Zendronda Cunha
Lucenara Pereira
Marcos José Jacoboski
Mateus André Favretto
Pedro José Teixeira Pagano
Raul Guedert
Ricardo Spyriders Boabaid Pimentel Gonçalves
Ronny Gieseler
Sandra Cossul
Taila Becker
Vinícius Botelho

[...] o ser humano
Não tolera muita realidade.
T. S. ELIOT

PRODUÇÃO ACADÊMICA

HISAYASU SUZUKI, DANIELA OTA; PINDARELLI, G. B.; GUEDERT, RAUL; ANDRADE, D. L. L. S.; ANTONIO JUNIOR, AFRÂNIO DE CASTRO; SILVA, J. R.; LOPES, L. B.; RAMOS, C. T. S.; GALLINARO, J. V.; PAGANO, P. J. T. Dispositivo de Aplicação de Campos Elétricos em Cavidade e Método de Uso. 2021, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: 2021061078000928, título: "Dispositivo de Aplicação de Campos Elétricos em Cavidade e Método de Uso", Instituição de registro: SINOVA-Secretaria de Inovação da UFSC. Depósito: 11/06/2021.

BRASIL PINTARELLI, GUILHERME; DE CASTRO ANTÔNIO JÚNIOR, AFRÂNIO; SUZUKI, DANIELA 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. 2019, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020190180978, 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", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 30/08/2019.

BERKENBROCK, JOSÉ ALVIM; BRASIL PINTARELLI, GUILHERME; DE CASTRO ANTONIO JÚNIOR, AFRÂNIO; SUZUKI, DANIELA OTA HISAYASU. Verification of Electroporation Models Using the Potato Tuber as *in vitro* Simulation. Journal of Medical and Biological Engineering, v. 39, p. 224-229, 2019. DOI: 10.1007/s40846-018-0408-8.

PINTARELLI, G. B.; GUEDERT, R.; DE CASTRO ANTÔNIO JÚNIOR, AFRÂNIO; Suzuki, Daniela O. H. Electrochemotherapy Effectiveness Calculation V1.0. 2019. Patente: Programa de Computador. Número do registro: BR512019000032-3, data de registro: 03/01/2019, título: "Electrochemotherapy Effectiveness Calculation V1.0", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

RESUMO

No tratamento por eletroquimioterapia em regiões de significantes extensões neoplásicas, o presente estudo propõe uma família de três eletrodos, um eletroporador e uma metodologia de análise quantitativa para a avaliação de eletrodos. A eletroporação é um fenômeno relacionado ao aumento da permeabilidade da membrana celular quando submetida a campos elétricos na ordem de kV/m . Quando associada a devida dosagem de quimioterápicos, é denominada de eletroquimioterapia – EQT. Para que os eletrodos satisfaçam a distribuição satisfatória de campo elétrico em regiões de tecidos vivos, os parâmetros construtivos foram aprimorados por simulações computacionais (COMSOL Multiphysics®) e testados em tubérculos de batata (*Solanum tuberosum*), para a aquisição das correntes elétricas e das áreas totais eletroporadas destacadas por um marcador vermelho. Cada um dos três eletrodos foram construídos com dois ou mais polos, com até cinco polaridades independentes, que podem ser comutadas automaticamente pelo eletroporador. Esta técnica permitiu otimizar a eficácia da eletroquimioterapia para esta proposta de eletrodos. A revisão sistemática na literatura científica não identificou similaridade dos benefícios destes eletrodos para a EQT. A partir das informações literárias dos dados teóricos e experimentais obtidos foi possível desenvolver uma metodologia quantitativa com potencial de avaliar eletrodos, com resultados padronizados, sem a utilização de cobaias animais. As simulações computacionais demonstram que, devido a imposição de campo elétrico pelos polos dos eletrodos em contato com os tecidos vivos, há possíveis tratamentos em profundidades próximas de 5 cm e áreas, entre 3 cm² até 20 cm² (secção longitudinal). As simulações também são importantes na obtenção dos valores de corrente elétrica, que atingem algumas dezenas de Ampères, viabiliza informações para o planejamento do tratamento e, principalmente, se o eletroporador possui capacidade operacional para cada caso. Este trabalho contribui com melhorias práticas em EQT, dado o projeto e construção do eletroporador de elevadas tensões e da família de três eletrodos, além de oferecer uma metodologia para a padronização de eletrodos e consequente avaliação destes.

Palavras-chave: Eletroporação; Eletroquimioterapia; Eletrodos; *in vitro*; *in silico*.

ABSTRACT

In the treatment of neoplasms by electrochemotherapy in regions with significant extensions for this technique, the present study proposes a family of three electrodes, an electroporator and a quantitative analysis methodology for the evaluation of electrodes. Electroporation is a phenomenon related to the increase in cell membrane permeability when subjected to electric fields that can reach kV/m . When associated with the proper dosage of chemotherapy, it is called electrochemotherapy – EQT. In order for the electrodes to reach the desired electric field distribution in living tissue regions, the constructive parameters were improved by computer simulations (COMSOL Multiphysics®) and tested on potato tubers (*Solanum tuberosum*) for the acquisition of electrical currents and total electroporated areas, highlighted by a red marker. Each one of the three electrodes was built with two or more poles, with up to five independent polarities, which can be automatically switched by the electroporator. This technique allowed to optimize the effectiveness of electrochemotherapy for the proposed electrodes. A systematic review of scientific literature did not identify similar benefits to these electrodes for EQT. Based on literary information, theoretical and experimental data obtained in this study, it was possible to develop a quantitative methodology with the potential to evaluate electrodes, presenting standardized results, without the use of animal testing. Computer simulations demonstrate that, due to the imposition of an electric field by the electrode poles in contact with living tissue, there are possible treatments close to 5 *cm* deep and areas, between 3 cm^2 to 20 cm^2 (longitudinal section). Simulations are also important in obtaining electrical current values, that can reach tens of Amperes, providing information for treatment planning as well as if the electroporator has operational capacity for each case.

Keywords: Electroporation; Electrochemotherapy; Electrodes; *in vitro*; *in silico*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama esquemático do sistema de aplicação de campos elétricos de elevada intensidade. Este dispositivo dispõe de <i>firmware</i> para a geração de pulsos de acordo com o protocolo ESOPE.....	23
Figura 2 - Representação do gráfico de uma sigmóide, dado pela equação (3), adequada ao estudo da EQT em tecidos vegetais.....	26
Figura 3 - Representação do gráfico de uma sigmóide, dado pela equação (4), adequada ao estudo da EQT em tecidos animais.....	27
Figura 4 - A amostra de <i>Solanum tuberosum</i> eletroporado escurece após 12 horas. Os valores de condutividade a 100 μ s de alta tensão, 8 pulsos, 1 Hz e a função sigmóide usada para modelar esses valores.	29
Figura 5 - Escala de cores para o limite da magnitude do campo elétrico, E , local...	30
Figura 6 - Imersão de 24 das amostras de <i>Solanum tuberosum</i> em solução para a marcação das regiões EP.	31
Figura 7 – Fluxograma dos critérios decisórios e a quantidade de trabalhos julgados.	37
Figura 8 - Arranjo de eletrodos propostos, a proposta de aplicação em função das geometrias a serem tratadas e a conotação para as partes eletricamente condutoras e isolantes; a-) Eletrodo de placa em forma de disco com até quatro eletrodos parcialmente isolados distribuídos no centro e a cada 120° no raio médio da placa; b-) Eletrodo de placa com tampa semiesférica com eletrodo parcialmente isolado de inserção superior ou lateral; c-) Eletrodo de placa em forma de disco com haste central isolada com extremidade esférica condutora.....	40
Figura 9 - Pulso bipolar de tensão em um eletrodo de dois polos e sua respectiva corrente elétrica.	42
Figura 10 - Fluxograma a respeito dos testes para a obtenção da normalidade e significância dos conjuntos de amostras dos ensaios.	44
Figura 11 - Hierarquia considerada para a citação dos termos ao longo deste estudo.	45
Figura 12 - Organização das correlações quanto a natureza dos ensaios.....	48
Figura 13 - Eletrodo de placa em forma de disco com até quatro eletrodos parcialmente isolados, distribuídos no centro e a cada 120° no raio médio da placa - dimensões dos polos.	53

Figura 14 - Protótipo de eletrodo para neoplásicos próximos a superfícies planas do corpo.....	54
Figura 15 – As três situações básicas a serem observadas no eletrodo de disco com distribuição dos polos em forma de hastes, no centro e a cada 120° no disco.....	55
Figura 16 - Placa de eletrodo de calota semiesférica e eletrodo inserção superior ou lateral - dimensões dos polos.....	56
Figura 17- Protótipo de eletrodos para tratar tecidos doentes com protuberância externa.....	57
Figura 18 – Utilização do eletrodo com a finalidade de contemplar a maior região possível.....	58
Figura 19 - Eletrodo de chapa em forma de disco com haste isolada com extremidade esférica condutora - dimensões dos polos.....	58
Figura 20 - Protótipo de eletrodos para tratar tecidos neoplásicos em cavidades.....	59
Figura 21 – Modos de utilização previstos para o eletrodo em forma de disco e eletrodo central dotado de polo central no formato esférico.....	60
Figura 22 – Sequência definida para os experimentos e seus respectivos conjuntos de ensaios.....	61
Figura 23 - Experimento 01– Simulação computacional e amostra experimental – <i>Solanum tuberosum</i> : ESOPE: 8 pulsos, 100 μ s, 1 Hz – haste no centro e outra haste na borda do toróide.....	62
Figura 24 – Experimento 01 – pulsos entre toróide e haste central – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas em função da tensão aplicada.....	63
Figura 25 – Experimento 01T – tecido animal - pulsos entre toróide e haste central – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas em função da tensão aplicada.....	64
Figura 26 – Experimento 02 – pulsos de 1,5 kV – simulação computacional e na amostra experimental – <i>Solanum tuberosum</i> : ESOPE: 8 pulsos, 100 μ s, 1 Hz – haste no centro e na borda do toróide.....	65
Figura 27 – Experimento 02 – pulsos entre a haste no centro e uma haste na borda do toróide – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da	

corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.....	66
Figura 28 - Experimento 02T – tecido animal – pulsos entre a haste no centro e uma haste na borda do toroide – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.....	67
Figura 29 – Experimento 03 – Simulação computacional e na amostra experimental – <i>Solanum tuberosum</i> : ESOPE: 8 pulsos, 100 μ s, 1 Hz – haste em furações consecutivas na borda do toróide.....	68
Figura 30 – Experimento 03 – pulsos em um par de hastes nas bordas do toróide – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.	69
Figura 31 - Experimento 03T – tecido animal – pulsos em um par de hastes nas bordas do toróide – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.....	69
Figura 32 – Simulação computacional e na amostra experimental – <i>Solanum tuberosum</i> : ESOPE: 8 pulsos, 100 μ s, 1 Hz.	70
Figura 33 – Experimento 04 – pulsos entre a calota e haste vertical no topo da calota – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.	71
Figura 34 - Experimento 04T – tecido animal – pulsos entre a calota e haste vertical no topo da calota – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.....	71
Figura 35 – Experimento 05 – Simulação computacional e na amostra experimental – <i>Solanum tuberosum</i> : ESOPE: 8 pulsos, 100 μ s, 1 Hz.	72
Figura 36 – Experimento 05 – pulsos entre a calota e haste lateral inclinada – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.	73

Figura 37 - Experimento 05T – tecido animal - pulsos entre a calota e haste lateral inclinada – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.....	73
Figura 38 – Experimento 06 – Simulação computacional e na amostra experimental – <i>Solanum tuberosum</i> – ESOPE: 8 pulsos, 100 μ s, 1 Hz.	74
Figura 39 – Experimento 06 – pulsos entre placa circular e esfera, sem placas laterais – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.	75
Figura 40 - Experimento 06T – tecido animal - pulsos entre placa circular e esfera, sem placas laterais – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.....	75
Figura 41 – Experimento 07 em visão frontal – Simulação computacional e na amostra experimental – <i>Solanum tuberosum</i> – ESOPE: 8 pulsos, 100 μ s, 1 Hz. As setas vermelhas indicam regiões de expansão de campo decorrente das placas condutoras, este efeito ocorre sem que as placas estejam conectadas ao pólo negativo do eletroporador.	77
Figura 42 – Experimento 07 – pulsos entre placa circular e esfera, e placas laterais desconectadas – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.....	78
Figura 43 – Experimento 07. (A) Desenho esquemático da montagem do eletrodo e polaridades, as placas laterais não estão conectadas a nenhuma polaridade. Pulsos de 1,2 kV na simulação do experimento são apresentados em corte na posição da haste para as B -) vista yz de polaridade positiva, C-) vista na simulação computacional, a seta tracejada indica a posição de corte para D-) a vista yz da amostra experimental. Na amostra <i>Solanum tuberosum</i> foi aplicado o protocolo ESOPE de 8 pulsos, 100 μ s, 1 Hz, a linha tracejada indica o local em que a placa foi posicionada.	79
Figura 44 - Experimento 07T – tecido animal - pulsos entre placa circular e esfera, e placas laterais desconectadas – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.....	80

Figura 45 – Experimento 08 – Simulação computacional e na amostra experimental – <i>Solanum tuberosum</i> : ESOPE: 8 pulsos, 100 μ s, 1 Hz.	81
Figura 46 – Experimento 08 – pulsos entre placa circular e esfera, e placas laterais conectadas à placa circular – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.....	82
Figura 47 - Experimento 08T – tecido animal - pulsos entre placa circular e esfera, e placas laterais conectadas à placa circular – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.....	83
Figura 48 - Distribuição das amostras experimentais das correntes elétricas e seu valor simulado computacionalmente para cada ensaio proposto com amostras de <i>Solanum tuberosum</i> e seus parâmetros – representações amostrais em box-plot, sobrepostos aos pontos das amostras e do valor simulado.	90
Figura 49 - Comparação dos experimentos C01, C02 e C03.....	91
Figura 50 - Comparação dos experimentos C04 e C05.....	92
Figura 51 - Comparação dos experimentos C06 e C07.....	93
Figura 52 - Distribuição das amostras experimentais das áreas eletroporadas e seu valor simulado computacionalmente para cada ensaio proposto com <i>Solanum tuberosum</i> e seus parâmetros – representações amostrais em box-plot, sobrepostos aos pontos das amostras e do valor simulado.	97
Figura 53 - Comparação dos ensaios A06, A07 e A08.	100
Figura 54 - Visualização do valor das correlações (setas) dos conjuntos das amostras simuladas e experimentais e suas respectivas naturezas, dentro do contexto de correntes elétricas (I) e áreas totais (A) eletroporadas.	103
Figura 55 - Aplicação do comando 3 no eletrodo de placa toroidal, com três agulhas ao redor, distribuídas em 120°.....	105
Figura 56 - Aplicação do comando 6 no eletrodo de placa toroidal, com três agulhas ao redor, distribuídas em 120°.....	106
Figura 57 - Conexões adequadas aos polos dos eletrodos.....	137
Figura 58- Duas unidades do eletroporador.	138
Figura 59 - Painel do eletroporador.....	139
Figura 60 - Fonte de tensões elevadas ajustáveis.....	139

Figura 61 - Placa principal do eletroporador, com fonte auxiliar, microcontrolador e as primeiras versões dos drivers para os IGBTs.	140
Figura 62 - Protótipo do eletroporador e <i>setup</i> experimental em andamento.	141
Figura 63 - Tratamento do sinal de disparo vindo do microcontrolador, de maneiras a seguir para a etapa de criação do tempo morto.	142
Figura 64 - Criação do tempo morto para os IGBTs em ponte.	142
Figura 65 - Driver para IGBTs, acionado em tensão positiva, e desligando em tensão negativa, em repouso com tensão nula.	143
Figura 66 - Exemplo de um conjunto de IGBTs para dois eletrodos independentes. A cada par de IGBTs, uma meia ponte, é possível obter mais um eletrodo independente.	144
Figura 67 – Imagens ilustrativas a respeito da coloração nas regiões eletroporadas para tubérculos de batata sem e com o corante vermelho.	146
Figura 68 - Marcador vermelho, frasco comercializado.	147
Figura 69 - Intensidade do campo elétrico aplicado, E , e a largura de pulso – eletroporação irreversível, ablação térmica – IRE, eletroporação irreversível, procedimento de ablação não-térmica – IRE, e eletroquimioterapia, procedimento de ablação não-térmica – EQT (RITTER <i>et al.</i> , 2018).	150
Figura 70 – Características de tensão elétrica e período de	151
Figura 71 – Dado um tecido homogêneo para suporte, a malha gerada para o eletrodo de placa e três polos distribuídos ao redor do disco a cada 120° e um polo central.....	205
Figura 72 - Malha gerada para o eletrodo de calota semiesférica com haste em ângulo reto no topo da calota.....	206
Figura 73 - Malha gerada para o eletrodo de calota com haste lateral em 45°	207
Figura 74 - Eletrodo de placa em forma de disco e eletrodo central fixo com esfera, em suas configurações.....	208
Figura 75 - Curvas das condutividades elétricas dependentes do campo elétrico local para cada um dos tecidos vivos.	210
Figura 76 - Escala de cores para as simulações de EQT (SUZUKI <i>et al.</i> , 2018).....	211
Figura 77 - Experimento 01T - pulsos entre toróide e haste central – tecido tumoral.	212
Figura 78 - Experimento 02T - pulsos entre haste central e haste da borda – tecido tumoral.....	213

Figura 79 - Experimento 03T - pulsos entre um par de hastes na borda do toróide – tecido tumoral.....	214
Figura 80 - Experimento 04T - pulsos entre calota e haste central vertical – tecido tumoral.....	215
Figura 81 - Experimento 05T - pulsos entre calota e haste lateral inclinada – tecido tumoral.....	216
Figura 82 - Experimento 06T - pulsos entre placa circular e esfera, sem placas laterais – tecido tumoral.....	217
Figura 83 - Experimento 07T - pulsos entre placa circular e esfera, e placas laterais desconectadas – tecido tumoral.....	218
Figura 84 - Experimento 08T - pulsos entre placa circular e esfera, e placas laterais conectadas – tecido tumoral.....	219
Figura 85 - Simulação com os parâmetros do tecido hepático, comando 2, pulsos bipolares – visão frontal.....	221
Figura 86 - Simulação com os parâmetros do tecido hepático, comando 2, pulsos bipolares – visão lateral.....	222
Figura 87 - Simulação com os parâmetros do tecido hepático, comando 4, pulsos monopulares – visão lateral.....	223
Figura 88 - Simulação com os parâmetros do tecido hepático, comando 1, pulsos bipolares.....	224
Figura 89 - Simulação com os parâmetros do tecido hepático, comando 3, pulsos monopulares.....	225
Figura 90 - Simulação com os parâmetros do tecido epidérmico e sc, dérmico e adiposo, muscular, e ósseo, comando 4, pulsos monopulares – corte longitudinal na haste central.....	226
Figura 91 - Simulação com os parâmetros do tecido epidérmico e sc, dérmico e adiposo, muscular, e ósseo, comando 4, pulsos monopulares – corte longitudinal nas hastes anteriores a haste central.....	227
Figura 92 - Simulação com os parâmetros do tecido epidérmico e sc, dérmico e adiposo, muscular, e ósseo, comando 4, pulsos monopulares – corte longitudinal nas hastes central e com uma das laterais.....	228
Figura 93 - Simulação com os parâmetros dos tecidos tumoral, epidérmico e sc, dérmico e adiposo, muscular, e ósseo, comando 3, pulsos monopulares.....	229

Figura 94 - Simulação com os parâmetros dos tecidos tumoral, epidérmico e sc, dérmico e adiposo, muscular, e ósseo, comando 3, pulsos bipolares.....	230
Figura 95 - Simulação com os parâmetros dos tecidos tumoral, epidérmico e sc, dérmico e adiposo, muscular, e ósseo, comando 3, pulsos bipolares.....	231
Figura 96 - Simulação com os parâmetros dos tecidos tumoral, epidérmico e sc, dérmico e adiposo, muscular, e ósseo, comando 4, pulsos monopolares.....	232
Figura 97 - Simulação com os parâmetros dos tecidos tumoral, epidérmico e sc, dérmico e adiposo, muscular, e ósseo, comando 4, pulsos monopolares.....	233
Figura 98 - Simulação com os parâmetros dos tecidos tumoral, epidérmico e sc, dérmico e adiposo, muscular, e ósseo, comando 4, pulsos monopolares.....	234
Figura 99 - Tumor (neoplasia) parcialmente envolvido por calota e haste a 45° – simulação com os parâmetros dos tecidos tumoral, epidérmico e sc, dérmico e adiposo, muscular, e ósseo - comando 2, pulsos bipolares.....	235
Figura 100 - Tumor (neoplasia) parcialmente envolvido por calota e haste central – simulação com os parâmetros dos tecidos tumoral, epidérmico e sc, dérmico e adiposo, muscular, e ósseo - comando 2, pulsos bipolares.....	236
Figura 101 - Pulsos entre placa circular e esfera, sem placas laterais – simulação com os parâmetros dos tecidos gengivais - comando 2, pulsos bipolares – visão frontal.....	237
Figura 102 - Pulsos entre placa circular e esfera, e placas laterais conectadas– simulação com os parâmetros dos tecidos gengivais - comando 2, pulsos bipolares – visão frontal e lateral.....	238
Figura 103 - Aquisição relativa aos experimentos 01, 02, 03 e 04 do capítulo de resultados.....	239
Figura 104- Aquisição relativa aos experimentos 05, 06, 07 e 08 do capítulo de resultados.....	240
Figura 105 - Particularidades do experimento 08 devido as recorrentes rupturas do dielético do tecido vivo quando exposto e tensões elevadas.....	241

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Parâmetros de condutividade elétrica para as simulações computacionais (BERKENBROCK <i>et al.</i> , 2019; COROVIC <i>et al.</i> , 2013; RITTER <i>et al.</i> , 2018; SUZUKI; MARQUES; RANGEL, 2016).	28
Tabela 2 – Relação da quantidade de trabalhos encontrados nas devidas bases de dados.	35
Tabela 3 - Características dos eletrodos propostos que os fazem originais.	39
Tabela 4 - Arranjos das amostras para as correlações.	47
Tabela 5 - Resumo representativo dos eletrodos apresentados pela literatura.	52
Tabela 6 - Dados obtidos a partir da simulação com parâmetros de <i>Solanum tuberosum</i> . ΔA_{irrev} é a taxa de crescimento da área eletroporação irreversível por incremento de 100 V ao redor do patamar da tensão aplicada nos experimentos, $A_{\text{irrev}}/A_{\text{TOT}}$ o percentual da área eletroporada irreversivelmente em relação a área total eletroporada, V_{app} e I_{app} são patamares da tensão e corrente nos pulsos retangulares aplicados nas amostras, respectivamente.	87
Tabela 7 - Experimentos de corrente elétrica – onde o erro relativo percentual é dado pelo valor simulado subtraído da média experimental, em relação ao valor simulado.	88
Tabela 8 - Testes de normalidade e significância das correntes elétricas.	89
Tabela 9 – Resumo dos eletrodos, V_{app} é a tensão aplicada e I_{max} é a respectiva corrente máxima do eletrodo.	94
Tabela 10 - Ensaio de área eletroporada compara valores simulados e experimentais em <i>Solanum tuberosum</i> . O erro relativo percentual é o valor simulado subtraído da média experimental, em relação ao valor simulado.	95
Tabela 11 - Resultado dos testes de normalidade e significância dos ensaios de área.	96
Tabela 12 - Comparativo de valores segundo o eletrodo de disco com haste isolada de esfera na extremidade.	99
Tabela 13 - Amostras dos experimentos organizadas em quatro grupos correlacionáveis.	102
Tabela 14 - Rótulo dos terminais para os polos do eletrodo em uso.	136
Tabela 15 – Comandos para aplicações definidas para os três eletrodos propostos, além dos eletrodos tradicionais de agulhas e de placas.	137
Tabela 16 - Resultado dos testes de normalidade para cada par de amostragens - correlação α	201

Tabela 17 - Resultado dos testes de normalidade para cada par de amostragens - correlação β	201
Tabela 18 - Resultado dos testes de normalidade para cada par de amostragens - correlação γ	201
Tabela 19 - Resultado dos testes de normalidade para cada par de amostragens - correlação δ	202
Tabela 20 – Comandos no RStudio para efetuar as correlações de Pearson do estudo de padronização.	203
Tabela 21 - Listagem dos parâmetros de acordo com os tecidos normalmente adotados nos estudos de EQT.....	209

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EP	Eletroporação, poração devido a sensibilização por campo elétrico
EQT	Eletroquimioterapia
ESOPE	<i>European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy</i>
IGBT	Insulated-Gate Bipolar Transistor
∇	Operador divergência, Nabla
σ	Condutividade elétrica – [S/m]
V	Potencial elétrico, tensão elétrica – [V]
I	Corrente elétrica – [A]
IRE	Eletroporação Irreversível
E ou \vec{E}	Vetor campo elétrico – [V/m]
E_0	Magnitude inicial do campo elétrico – [V/m]
E	Magnitude do campo elétrico – [V/m]
E_{rev}	Faixa de magnitude do campo elétrico relacionada a EP reversível – [kV/m]
E_{irrev}	Faixa de magnitude do campo elétrico relacionada a EP irreversível – [kV/m]
ρ	Densidade de massa do tecido <i>in vivo</i> ou <i>ex vivo</i> – [$\frac{kg}{m^3}$]
c_p	Calor específico do tecido <i>in vivo</i> ou <i>ex vivo</i> – [$\frac{J}{K.kg}$]
K	Condutividade térmica do tecido <i>in vivo</i> ou <i>ex vivo</i> – [$\frac{W}{m.k}$]
T	Temperatura – [°C]
q	Fonte de calor – [W/m ³] ou [$\frac{VA}{m^3}$]
Q_p	Calor por perfusão – [W/m ³]
Q_m	Calor devido ao metabolismo – [W/m ³]
H-FIRE	Eletroporação irreversível de alta frequência
J ou \vec{J}	Vetor densidade de corrente elétrica – [A/m ²]
J	Magnitude da ensidade de corrente elétrica – [A/m ²]
t_{pulso}	Período do pulso em elevada tensão, para EP
FEM	Método dos Elementos Finitos

$\sigma(E)_{vegetal}$	Condutividade elétrica segundo o modelo matemático para tecidos vegetais – $[S/m]$
$\sigma(E)_{animal}$	Condutividade elétrica segundo o modelo matemático para tecidos animais – $[S/m]$
σ_0	Condutividade elétrica inicial – $[S/m]$
σ_{max}	Condutividade elétrica máxima – $[S/m]$
E_{rev} ou E_{rev}	Magnitude do campo elétrico para eletroporação reversível – $[kV/m]$
E_{irrev} ou E_{irrev}	Magnitude do campo elétrico para eletroporação irreversível – $[kV/m]$
n	Unidade do vetor normal
ΔA_{irrev}	Taxa de crescimento da área eletroporação irreversível por incremento de 100 V ao redor do patamar da tensão aplicada nos experimentos – $[cm^2/V]$
$\frac{A_{irrev}}{A_{TOT}}$	Percentual da área eletroporada irreversivelmente em relação a área total eletroporada
V_{app}	Patamares da tensão nos pulsos retangulares aplicados nas amostras – $[V]$
I_{app}	Patamares da corrente nos pulsos retangulares aplicados nas amostras – $[A]$
IEB – UFSC	Instituto de Engenharia Biomédica – Universidade Federal de Santa Catarina
SC	Referente a estrato córneo – é a camada mais externa da epiderme.

SUMÁRIO

1	Introdução	16
2	Objetivos	21
2.1.1	Objetivos Específicos	21
3	Metodologia	22
3.1	Eletroporador	22
3.2	Princípios físicos da eletroporação	24
3.3	Modelagem matemática adotada para a eletroporação	26
3.4	Condutividade elétrica dependente do campo elétrico aplicado.....	28
3.5	Procedimentos e métodos nas práticas laboratoriais	31
3.6	Visão geral sobre os eletrodos encontrados na literatura.....	32
3.7	Metodologia da revisão sistemática.....	33
3.7.1	Estratégia de pesquisa aos bancos de dados.....	34
3.7.2	Trabalhos selecionados a partir dos bancos de dados.....	34
3.8	A Família de eletrodos.....	39
3.9	Aquisição dos dados das práticas laboratoriais	41
3.10	Análise estatística dos dados	44
4	Resultados.....	50
4.1	A Família de eletrodos.....	51
4.1.1	Eletrodo de placa em forma de disco com até quatro eletrodos parcialmente isolados distribuídos no centro e a cada 120° no raio médio da placa.....	53
4.1.2	Eletrodo de calota semiesférica com eletrodo parcialmente isolado de inserção superior ou lateral	56
4.1.3	Eletrodo de placa em forma de disco com haste isolada e extremidade esférica condutora	58
4.2	Sequência de experimentos.....	61
4.2.1	Experimento 01	62

4.2.2	Experimento 02	65
4.2.3	Experimento 03	67
4.2.4	Experimento 04	70
4.2.5	Experimento 05	72
4.2.6	Experimento 06	74
4.2.7	Experimento 07	76
4.2.8	Experimento 08	81
4.3	Análise estatística dos experimentos.....	84
4.4	Análise dos experimentos	86
4.4.1	Ensaio de corrente elétrica	88
4.4.2	Ensaio das áreas eletroporadas	95
4.5	Proposta de padronização de eletrodos para a EQT.	101
4.5.1	Correlações	101
4.5.2	Exemplificação do tratamento com EQT por imagens de simulações	104
5	Discussão	107
5.1	Projeto de eletrodos	108
5.2	Análise estatística	113
5.3	Análise quantitativa	114
6	Conclusão	117
6.1	Trabalhos em desenvolvimento	118
6.2	Trabalhos futuros	118
7	Perspectivas	120
	REFERÊNCIAS	121
	APÊNDICE A – Equipamento eletroporador desenvolvido utilizado neste trabalho	135
	Recursos e propriedades gerais do equipamento eletroporador	135
	Esquemático essencial do equipamento eletroporador	142

APÊNDICE B – Marcador vermelho	145
APÊNDICE C – Considerações quanto aos efeitos térmicos da passagem de corrente elétrica em um meio condutor biológico	148
APÊNDICE D – Exemplos representativos de eletrodos encontrados na análise bibliométrica da revisão sistemática	152
APÊNDICE E – Entendimentos sobre a correlação de Pearson.....	197
APÊNDICE F – Os critérios das simulações pelo método FEM por meio do <i>software</i> COMSOL Multiphysics.....	204
Eletrodo de placa em forma de disco com até quatro eletrodos parcialmente isolados distribuídos no centro e a cerca de 120° no raio médio da placa....	205
APÊNDICE G – Alguns resultados extras simulados com os eletrodos propostos.....	209
APÊNDICE H – Aquisição das formas de ondas das tensões e correntes elétricas dos oito experimentos realizados em laboratório	239

1 INTRODUÇÃO

O câncer, também conhecido como neoplasia maligna, pode ser definido como alterações no comportamento celular, ou seja, alterações na estrutura do DNA que produzem crescimento incontrolável e um incontido acúmulo desordenado de células. O organismo humano é composto por células dispostas de forma organizada e interativa na formação de tecidos. A maioria das células se renova constantemente em um processo altamente organizado, sempre dependente do código genético pré-estabelecido, que determina sua capacidade de crescer, diferenciar-se, funcionar, reproduzir-se e morrer. Por consequência, conjuntos de ações coordenadas regulam as funções bioquímicas de todas as células, de maneiras a provir o controle de quando e como se reproduzir e crescer (FUCHS; STELLER, 2011).

Mundialmente, a incidência de câncer tem aumentado de maneira independente do crescimento demográfico. Apesar do aumento de mortalidades devido a doença ter seguido em elevação em países ricos e pobres, as análises das tendências atuais indicam que as transições econômica e social em curso, em diversos países de baixa e média renda, estão relacionados a mudança de padrões alimentares e ao aumento da exposição a fatores hormonais (GUERRA *et al.*, 2017).

Atualmente, existem várias terapias para o tratamento do câncer, onde as principais são citadas a seguir:

A cirurgia oncológica é a terapia mais antiga no tratamento local do câncer, e atualmente de vasto uso quando a doença é detectada no estágio inicial. É adotada desde procedimentos simples de biópsias, até os casos de remoção de metástases (DA SILVA, 2016).

O tratamento quimioterápico é um tratamento sistêmico, com incidência sobre células doentes e saudáveis, que geralmente utiliza aplicação por via venosa. A quimioterapia pode ser curativa (para a obtenção do controle completo do carcinoma), adjuvante (complemento a cirurgias, e em algumas outras técnicas, como prevenção quanto a eliminação de células doentes remanescentes, aplacamento da incidência de recidiva), neoadjuvante (com o propósito de reduzir o tamanho do carcinoma, com posterior intervenção cirúrgica), e paliativa (apenas na melhoria da qualidade de vida do paciente, devido a impossibilidade de cura) (WAGNER *et al.*, 2017).

A radioterapia busca destruir ou inibir células anormais propensas a se tornarem carcinomas. Com recorrência, esta metodologia de tratamento é utilizada como tratamento local principal. Com esse intuito, são utilizadas radiações ionizantes, geralmente Raios X, Raios

Gama e feixe de elétrons provenientes de aceleradores lineares de alta energia. Na radioterapia, há um cuidadoso planejamento para poupar o tecido saudável em detrimento ao tecido neoplásico. Embora as células saudáveis possam ser danificadas neste tratamento, frequentemente elas podem se reparar, o que não ocorre com as células adocidas e carcinomatosas. De acordo com a avaliação médica, o melhor método de radioterapia pode ser escolhido entre: radioterapia de intensidade modulada (IMRT), radioterapia externa, radioterapia conformacional 3D, radiocirurgia estereotáxica (*Gamma Knife*) e braquiterapia. Da mesma forma que a quimioterapia, os tratamentos são classificados como adjuvante, neoadjuvante e paliativo (BASKAR *et al.*, 2012).

A hormonioterapia consiste em uma terapia que busca impedir a ação dos hormônios em células tumorais sensíveis, com receptores específicos para hormônios como o estrogênio e a progesterona. Esses hormônios são responsáveis pelo desenvolvimento e proliferação de células cancerígenas, na mama e na próstata respectivamente. Portanto a hormonioterapia é uma forma sistêmica de tratamento, por ocasionar a redução do nível de hormônios ou seu bloqueio nas células carcinomatosas e é utilizada com outras terapias ou de forma isolada (STERNBERG, 2016).

A terapia alvo é um tratamento sistêmico que utiliza medicamentos alvo moleculares que atacam preferencialmente elementos encontrados nas superfícies ou no interior das células carcinomatosas. Em geral, esses elementos podem ser inseridos artificialmente no local específico a ser tratado (GRAY-SCHOPFER; WELLBROCK; MARAIS, 2007).

A imunoterapia é uma terapia sistêmica com objetivo de potencializar o sistema imunológico. É um tratamento biológico e utiliza anticorpos produzidos em laboratório ou pelo próprio paciente. Assim, a resposta imune é potencializada, de maneiras a sensibilizar as células do organismo para o reconhecimento do tecido neoplásico como um agressor (DINE *et al.*, 2017).

O transplante de medula óssea é uma terapia contra o câncer que utiliza as células tronco da medula óssea de um doador (ou do próprio paciente) para buscar reestabelecer a formação saudável dos componentes do sangue. É uma terapia naturalmente associada a quimioterapia e a radioterapia (BOUZAS, 2000).

A terapia por crioblação é um sistema local de congelamento para a destruição de carcinomas, utiliza temperaturas ao redor de -140°C por meio do *crioprobe* (um tipo de agulha) no interior do tumor, onde são injetados gases inertes sob temperaturas adequadas para

o resfriamento e posteriormente para o descongelamento (NEEL; KETCHAM; HAMMOND, 1971).

Implementada pelo Professor Mir e colaboradores no início da década de 1990, a técnica de eletroquimioterapia (EQT) surgiu como alternativa aos tratamentos locais de cânceres (MIR *et al.*, 1991). O princípio de funcionamento é o mesmo da eletroporação: um processo permeabilização do tecido vivo devido a abertura de poros por exposição a uma determinada faixa de magnitude do campo elétrico. De modo refinado, a EQT consiste na aplicação de pulsos elétricos de curta duração nos polos de determinado eletrodo aplicados em pelo menos dois pontos de um tecido celular. Com a imposição de um elevado campo elétrico entre os polos do eletrodo, ocorre naturalmente o fenômeno de permeabilização celular, evento facilitador da entrada das há o transporte de moléculas de quimioterápicos por difusão através da abertura de poros hidrófilos na membrana plasmática. As drogas quimioterápicas normalmente administradas são a bleomicina e a cisplatina (MIR *et al.*, 2006).

Os primeiros eletrodos introduzidos na aplicação em humanos foram de agulhas paralelas e hexagonal (COROVIC; ZUPANIC; MIKLAVCIC, 2008), placas paralelas (ČOROVIĆ *et al.*, 2008) e cavidade orofaringe (CAMPANA *et al.*, 2014b). No entanto, estes eletrodos não possibilitavam tratamentos em certas localidades anatômicas como cérebro (MAHMOOD; GEHL, 2011) e intranasal (MAGLIETTI *et al.*, 2017). Além destas limitações as lesões tumorais por extensas áreas são preocupações dos trabalhos apresentados por (CAMPANA *et al.*, 2016b) e (ONGARO *et al.*, 2016).

A EQT é aplicada em pelo menos 100 centros de tratamentos de cânceres, ultrapassando a quantidade de 13 mil pacientes humanos tratados (CALVET *et al.*, 2014). Amplamente adotado como tratamento anticâncer em clínicas da área veterinária, inclusive no Brasil, a EQT é empregada no tratamento de tumores cutâneos e subcutâneos em animais de variados portes físicos (RANGEL *et al.*, 2019; SUZUKI *et al.*, 2018; SUZUKI; MARQUES; RANGEL, 2016) e internos (RANGEL *et al.*, 2018). Em relação as outras técnicas, suas principais vantagens estão associadas a tratamentos com reduzido número de sessões e a frequente descarte do processo cirúrgico quando os tumores são acessíveis pelos eletrodos (SUZUKI *et al.*, 2018).

O avanço das tecnologias computacionais e *softwares* de simulações numéricas contribuíram na descrição e evolução das dinâmicas de modelos matemáticos propostos para a abertura de poros em células vivas. Resultou nos variados estudos do comportamento da condutividade elétrica em tecidos, decorrentes dos processos graduais e não lineares relativos

a eletroporação (EP). A evolução destes modelos, normalmente envolve experimentos *in silico*, *in vivo* e *ex vivo*, com o estudo de correntes elétricas em função da aplicação de tensão por períodos ao redor das centenas de microssegundos. Atualmente, os resultados observados podem ser adequadamente representados por equações sigmóides, ou aproximações da tangente hiperbólica, passíveis de implementação em algoritmos iterativos, para a obtenção das soluções da distribuição de campo elétrico segundo as características dos tecidos biológicos e eletrodos que alimentam o modelo matemático (MIKLAVCIC *et al.*, 2006a).

Em alternativa ao estudo direto em tecidos animais, é possível utilizar tecidos vegetais, em especial o tubérculo de batata – *Solanum tuberosum*, na condição de *tissue-mimicking phantom* para o estudo das características gerais elétricas dos tecidos animais. Este conceito é pertinente ao Programa 3Rs (*Reduction, Refinement, Replacement*) para redução e substituição dos testes com animais (COUNCIL; BARBEE; JOSEPH, 2010). Devido a características de heterogeneidade, anisotropia e dispersão dielétrica, o referido tecido vegetal é utilizado de modo recorrente em variados estudos de EP e testes com eletrodos da eletroquimioterapia (MAGLIETTI *et al.*, 2017), (TELLADO *et al.*, 2020) e (MAGLIETTI *et al.*, 2020). Os experimentos no tubérculo de batata obtiveram suficiente relevância pois a região eletroporada exhibe escurecimento de enzimas pelo contato com o oxigênio molecular atmosférico (BERKENBROCK *et al.*, 2018a; CASTELLVÍ; BANÚS; IVORRA, 2016; IVORRA; MIR; RUBINSKY, 2009; IVORRA; RUBINSKY; MIR, 2010) . Da mesma maneira, quando eletroporado e imerso em solução com marcador colorido, exhibe a cor do marcador nas células acessadas devido a difusão. Por ocasião da similaridade com os quimioterápicos aplicados no tecido animal, embora a marcação seja uma medida indireta da EP, comumente utilizada na validação de propostas de modelos de condutividade e testes com eletrodos e equipamentos (CASTELLVÍ; BANÚS; IVORRA, 2016).

A eficiência no tratamento por EQT em regiões de tecidos neoplásicos é garantida quando há o uso adequado de quimioterápicos e a devida exposição a campos elétricos suficientes à poração das membranas celulares na região sob tratamento. A depender das dimensões abrangidas pelo campo elétrico a partir das superfícies polarizadas do eletrodo, em geral, são necessárias múltiplas repetições do protocolo de EP, deve-se preencher toda a extensão afetada por tecidos neoplásicos adicionada de uma margem de segurança, por meio do repetitivo reposicionamento do eletrodo juntamente à aplicação dos ciclos de pulsos em elevadas tensões elétricas (BELEHRADEK *et al.*, 1991)(MARTY *et al.*, 2006)(GEHL *et al.*, 2018)(MIKLAVCIC *et al.*, 2006a).

De forma a lançar mão dos recursos computacionais na utilização das modelagens matemáticas de tecidos animais e vegetais e experimentos com os tecidos vegetais modelados na literatura, são propostos eletrodos de características familiares entre si, na busca de satisfazer de modo eficiente o tratamento de EQT em regiões de dimensões físicas maiores e pouco ainda exploradas nos trabalhos científicos pesquisados de um modo geral.

Uma característica importante da família dos três eletrodos propostos é – juntamente com a possibilidade de tratamentos em porções relevantes de tecido em relação aos eletrodos tradicionais – a praticidade em impor campos elétricos em múltiplos sentidos e direções tornando-se algo prático clinicamente: uma vez fixado o polo de maior superfície (denotado por placa, disco ou de superfície côncava), há configurações de uso opcional da quantidade de hastes a serem fixadas, cujas polaridades são comutadas pelo eletroporador. Há configurações para inserções de hastes ao redor ou no centro do polo de placa côncava. E também há configurações que dispensam perfurar o tecido vivo, sem prejuízo ao efeito do campo elétrico nos tecidos por meio da fixação tópica de placas metálicas lisas, passíveis de reposicionamento antes de cada deliberação de pulsos. Na literatura pesquisada, é notável que estes modos versáteis associados aos significantes volumes passíveis de eletroporação ganham um posicionamento inédito e oferecem características inovadoras frente a eficácia do tratamento quanto a natureza anisotrópica dos tecidos vivos ou das suas variadas sobreposições.

2 OBJETIVOS

A ideia geral deste trabalho é propor e apresentar uma família de três eletrodos e, através das simulações computacionais e ensaios laboratoriais, desenvolver a análise dos efeitos causados pela eletroporação. Através desse estudo pretende-se contribuir com três novos eletrodos para a eletroquimioterapia e uma proposta de padronização de eletrodos.

2.1.1 Objetivos Específicos

- Apresentar uma família de três novos eletrodos com geometrias complementares sem anterioridade na literatura científica pesquisada, dedicado a eletroquimioterapia em volumes superiores a 1 cm^3 ;
- Projetar e construir o eletroporador utilizado neste trabalho a partir da identificação das demandas em sustentar os campos elétricos no tratamento de tecidos vivos por meio dos eletrodos propostos;
- Apresentar a utilização do marcador vermelho para regiões poradas nos phantoms de *Solanum tuberosum*;
- Apresentar os eletrodos segundo exemplificações de tratamentos simulados e experimentais, de maneira a explorar as possibilidades dos usos de diferentes configurações, apresentar os efeitos do campo elétrico, mostrar os valores da medição de correntes elétricas e das áreas eletroporadas, apresentar a análise estatística regularmente utilizada na literatura;
- Propor uma padronização de eletrodos para eletroquimioterapia com metodologia quantitativa.

3 METODOLOGIA

Inicialmente foram realizadas buscas nas bases de dados para a verificação de anterioridades quanto a família dos três eletrodos. Estes eletrodos oferecem melhorias no tratamento por eletroquimioterapia à volumes representativos de tecidos vivos. Para desenvolver os experimentos deste trabalho foi necessário projetar e construir um eletroporador de propriedades suficientes para sustentar a amplitude do campo elétrico ($\sim 100 \text{ kV/m}$) com cargas não lineares (*phantoms* de tubérculo de batata durante a eletroporação).

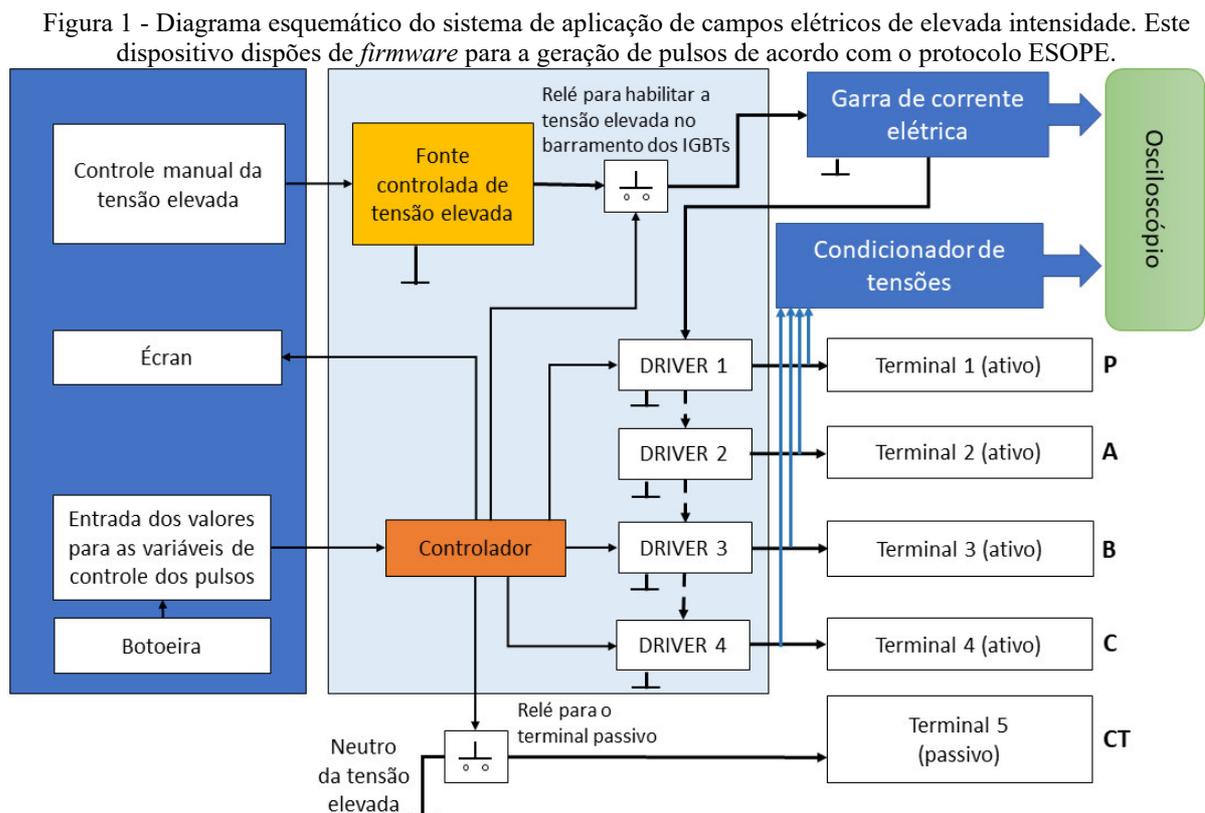
Para evidenciar os resultados laboratoriais no tecido vegetal, foi utilizada uma técnica de coloração das regiões eletroporadas, para a posterior contabilização e comparação com os resultados simulados. A partir desta etapa do trabalho, todos os dados teóricos e práticos já haviam sido obtidos. Então, foram realizadas análises estatísticas para melhor explorar as amostragens, de forma semelhante ao que se verificou nas buscas de trabalho sobre eletrodos com afinidades à EQT. Constatada a ausência de padrões das informações relativas aos eletrodos nos diversos trabalhos da literatura, foi proposta uma metodologia para a padronização. Esta proposta apresenta respostas quantitativas às análises de qualquer eletrodo, ou uma família deles, que possa ser utilizado em práticas laboratoriais com tecidos vegetais e simulações computacionais com tecidos vegetais e animais. Assim, existe a expectativa de obter uma metodologia que a partir de simulações computacionais e experimentos com tubérculo de batata conduza a propostas refinadas sobre a utilização de eletrodos em tecidos animais. Isto seria o mais próximo que se pode alcançar para o tratamento de tecidos animais, sem propriamente utilizar tecidos animais.

3.1 ELETROPORADOR

O diagrama de blocos do eletroporador é apresentado na Figura 1. Com um controlador dotado de *firmware* para diversos comandos adaptados ao protocolo ESOPE – *European Standard Operating Procedures of Electrochemotherapy* (MIR *et al.*, 2006; NEVES *et al.*, 2014; SERSA, 2006). A listagem dos comandos é dada no APÊNDICE A, dividida em pulsos monopolares e bipolares, disparados em um trem de oito pulsos, cada pulso de amplitude previamente ajustada, com patamares de $100 \mu\text{s}$ em intervalos de 1 segundo.

Na configuração utilizada neste trabalho, o eletroporador gera tensões ajustáveis entre 900 V e 4200 V, que alimenta o banco de capacitores conectados ao barramento dos IGBTs. Os drivers dos IGBTs utilizam a topologia *half-bridge*, com chaves combinadas em série e em paralelo. Cada semicondutor de potência suporta tensões de 1700 V e corrente de 75 A. Desta forma, os drivers e os IGBTs podem suportar até 5100 V e 150 A.

Para os experimentos laboratoriais foram utilizados somente pulsos bipolares, com oito disparos em intervalos de 1 segundo, em patamares positivo e negativo simétricos, cuja amplitude de tensão é dada pelo módulo do valor a partir de zero Volts. O eletroporador é capaz de pulsar elevadas tensões de forma independente em quatro dos seus canais ativos, P, A, B, C. O quinto canal, de natureza passiva e denominado de CT, é chaveado por um relé, e é capaz de garantir o estado de alta impedância ou conexão com o nível terra (comum ou zero Volts) da fonte de tensões elevadas.



Estas características dos terminais do eletroporador, Figura 1, são importantes para orientar e delimitar as especificações dos ensaios com os eletrodos propostos. Detalhes da

programação, especificações técnicas e limitações do eletroporador estão disponíveis no APÊNDICE A.

Todas as medidas de tensão foram obtidas com o uso do osciloscópio digital Tektronix TDS 2004C (Tektronix Inc., Estados Unidos) e a frequência de amostragem foi definida para 1 GHz (máximo), segundo o manual de instruções. O condicionador de tensões, Figura 1, são divisores resistivos na razão de 100:1 com 1% de tolerância, e os canais do osciloscópio fizeram a multiplicação pelo fator 100, configurado para a escala de 1 kV por divisão. Para a leitura das tensões foram disponibilizados os canais CH1, CH2 e CH3.

As medições de corrente foram obtidas pela ponteira de corrente Tektronix A622 (Tektronix Inc., Estados Unidos) e osciloscópio digital Tektronix TDS 2004C (Tektronix Inc., Estados Unidos), sempre em 100 mA/V conectada no canal CH4 do mesmo osciloscópio. Este canal foi configurado com fator multiplicativo variado, de maneira que o osciloscópio apresentasse as leituras de corrente nas escalas de 5 A, 10 A e 20 A. Esta foi a forma considerada adequada às correntes que retornavam pelo eletrodo CT no caso de vários eletrodos ativos ou em um dos eletrodos quando somente dois ativos eram utilizados.

3.2 PRINCÍPIOS FÍSICOS DA ELETROPORAÇÃO

A partir da idealização do tecido como uma porção homogênea, seu comportamento elétrico pode ser determinado pela resolução da equação de Laplace, equação (1).

$$-\nabla \cdot (\sigma \nabla V) = 0 \quad (1)$$

onde a condutividade elétrica é representada por σ em S/m, e a tensão elétrica V representa o potencial elétrico promotor do campo elétrico necessário ao fenômeno associado à abertura de poros, poração ou eletroporação (GEHL; SKOVSGAARD; MIR, 1998; MARTY *et al.*, 2006b).

A solução da equação de Laplace representa a distribuição do potencial elétrico em uma porção do tecido. Portanto, o campo elétrico é o gradiente do potencial elétrico V (LANGUS *et al.*, 2016), como apresentado na equação (2). A partir deste conceito, os trabalhos sobre eletroporação são performados (FINI *et al.*, 2013; IVORRA; RUBINSKY, 2007a; MIKLAVČIČ *et al.*, 2012; SUZUKI *et al.*, 2011).

$$\mathbf{E} = -\nabla V \quad [V/m] \quad (2)$$

Neste trabalho, as perdas térmicas e seus efeitos na EQT são desconsiderados (WEAVER *et al.*, 2012) e (RITTER *et al.*, 2018). No entanto, os efeitos gerais da passagem de corrente elétrica em um meio biológico são apresentados no APÊNDICE C.

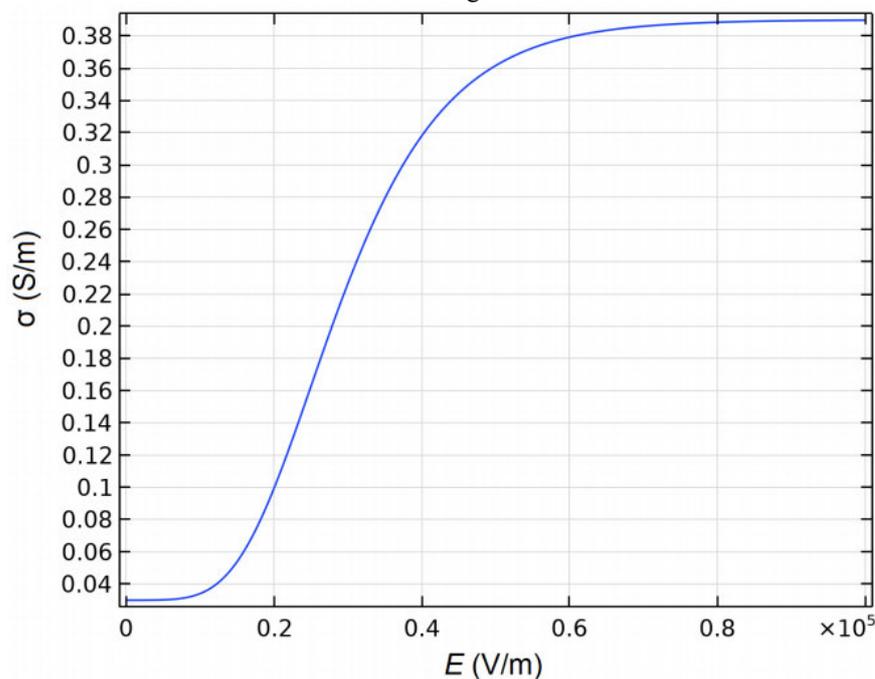
3.3 MODELAGEM MATEMÁTICA ADOTADA PARA A ELETROPORAÇÃO

A distribuição de campos elétricos nas simulações computacionais foi implementada pelo Método dos Elementos Finitos (FEM). O FEM consiste na discretização matemática dos meios materiais em malhas tridimensionais (DAMIANI, 2017). As soluções foram obtidas a partir da aplicação de equações diferenciais em cada elemento (LOTTI *et al.*, 2006). Estes elementos são parâmetros inseridos no módulo AC/DC do COMSOL Multiphysics modules (COMSOL AB, Sweden), APÊNDICE F. O processamento se deu em um servidor cluster (Intel Xeon Gold 6126 @ 2,60 GHz, 20 núcleos, 300 GB RAM) de sistema operacional Ubuntu Linux (x64, Canonical Ltd. Reino Unido).

Desprezadas eventuais não homogeneidades, a equação (3) descreve satisfatoriamente as mudanças de condutividade do tecido do tubérculo de batata sob exposição de campo elétrico. Esta equação representa uma função sigmoide, cujo gráfico é representado na Figura 2 (BERKENBROCK *et al.*, 2018) e (IVORRA; MIR; RUBINSKY, 2009).

$$\sigma(E)_{vegetal} = 0,03 + 0,35 e^{-e^{-0,01(|E|-250)}} \quad [S/m] \quad (3)$$

Figura 2 - Representação do gráfico de uma sigmóide, dado pela equação (3), adequada ao estudo da EQT em tecidos vegetais.



Na equação (3), $\sigma(E)_{vegetal}$ representa a condutividade do tecido do tubérculo de batata em função da magnitude E do campo elétrico aplicado em uma amostra.

Para o caso das simulações da condutividade elétrica do tecido animal $\sigma(E)_{animal}$, o modelo adequado é apresentado pela equação (4), cuja a curva sigmoide é representada no gráfico da Figura 8. As variáveis desta equação são respectivamente apresentadas pelos termos A e B , as contantes por C e D (SUZUKI *et al.*, 2015).

$$\sigma(E)_{animal} = \sigma_0 + \frac{\sigma_{max} - \sigma_0}{1 + d \cdot e^{-\left(\frac{E-A}{B}\right)}} \quad [S/m] \quad (4)$$

$$A = \frac{E_{irrev} + E_{rev}}{2}$$

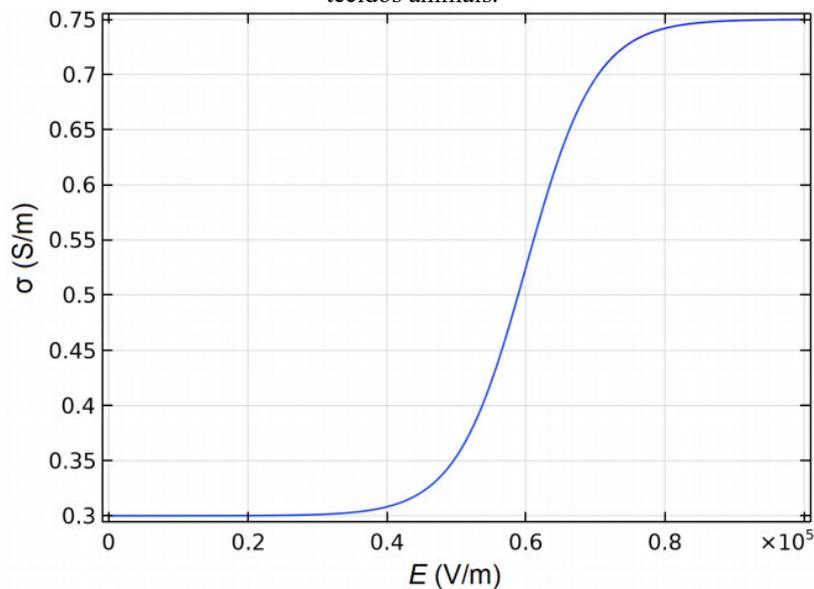
$$B = \frac{E_{irrev} - E_{rev}}{C}$$

$$C = 8$$

$$D = 10$$

O campo elétrico, E , é compreendido como irreversível, E_{irrev} , quando leva a abertura de poros na membrana celular que não podem se regenerar, o que representa a destruição do tecido sensibilizado. O campo elétrico reversível, E_{rev} , leva a abertura de poros permeáveis e passíveis de regeneração, não motivando a morte celular. O tecido exposto a campo de magnitude inferior a E_{rev} é entendido como livre dos efeitos da poração nas suas células.

Figura 3 - Representação do gráfico de uma sigmóide, dado pela equação (4), adequada ao estudo da EQT em tecidos animais.



3.4 CONDUTIVIDADE ELÉTRICA DEPENDENTE DO CAMPO ELÉTRICO APLICADO

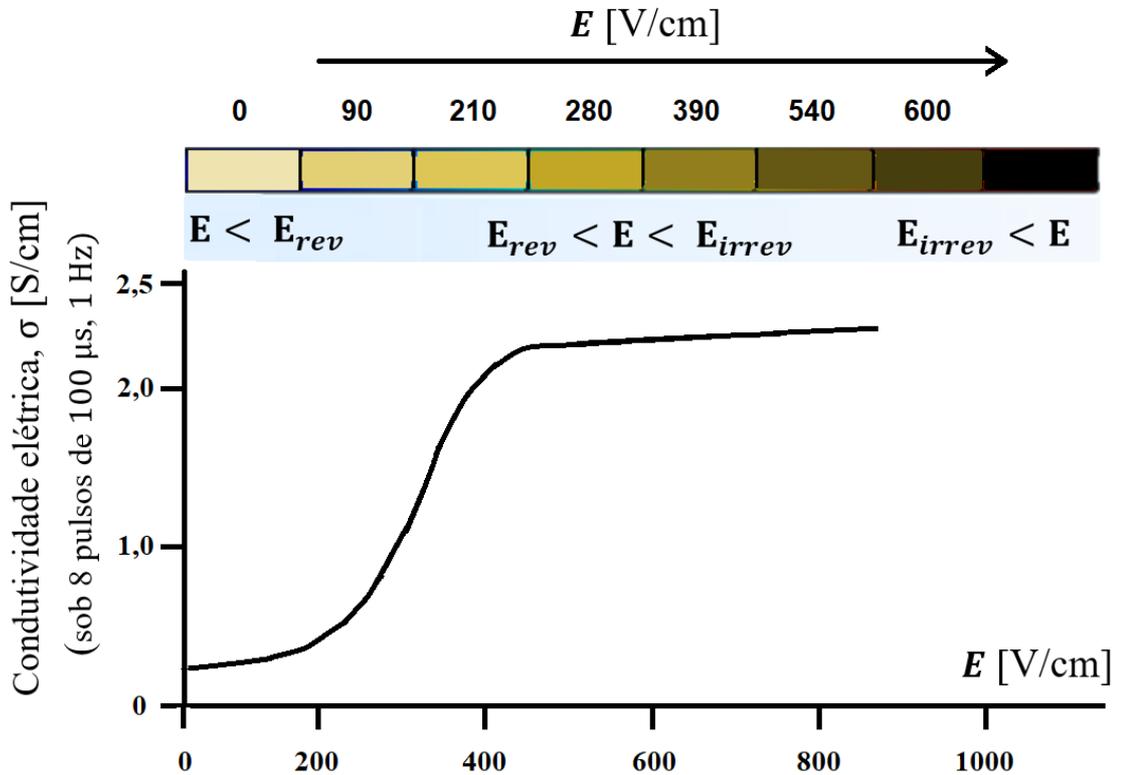
Valores realísticos para σ_0 – condutividade elétrica inicial, σ_{max} – condutividade elétrica máxima, E_{rev} – campo elétrico para eletroporação reversível, e E_{irrev} – campo elétrico para eletroporação irreversível são exemplificados na Tabela 1. Para a função sigmoideal, os parâmetros utilizados são $C = 8$ e $D = 10$ (BERKENBROCK *et al.*, 2019; SEL *et al.*, 2005a; SUZUKI; MARQUES; RANGEL, 2016).

Tabela 1 - Parâmetros de condutividade elétrica para as simulações computacionais (BERKENBROCK *et al.*, 2019; COROVIC *et al.*, 2013; RITTER *et al.*, 2018; SUZUKI; MARQUES; RANGEL, 2016).

Material	Condutividade elétrica inicial (σ_0) [S/m]	Condutividade elétrica máxima (σ_{max}) [S/m]	E_{rev} [kV/m]	E_{irrev} [kV/m]
Tubérculo de batata (<i>Solanum tuberosum</i>)	0,03	0,20	20	60
Tumor	0,300	0,750	40	80
Partes condutoras dos eletrodos em aço AISI 304	$1,74 \times 10^9$	$1,74 \times 10^9$	-	-
Partes isolantes dos eletrodos	10^{-12}	10^{-12}	-	-

A evolução das condutividades elétricas em tecidos vivos é relacionadas à intensidade do campo elétrico anteriormente aplicado e pode ser exemplificada com o tecido de *Solanum tuberosum*, Figura 4 (IVORRA; MIR; RUBINSKY, 2009).

Figura 4 - A amostra de *Solanum tuberosum* eletroporado escurece após 12 horas. Os valores de condutividade a 100 μs de alta tensão, 8 pulsos, 1 Hz e a função sigmóide usada para modelar esses valores.

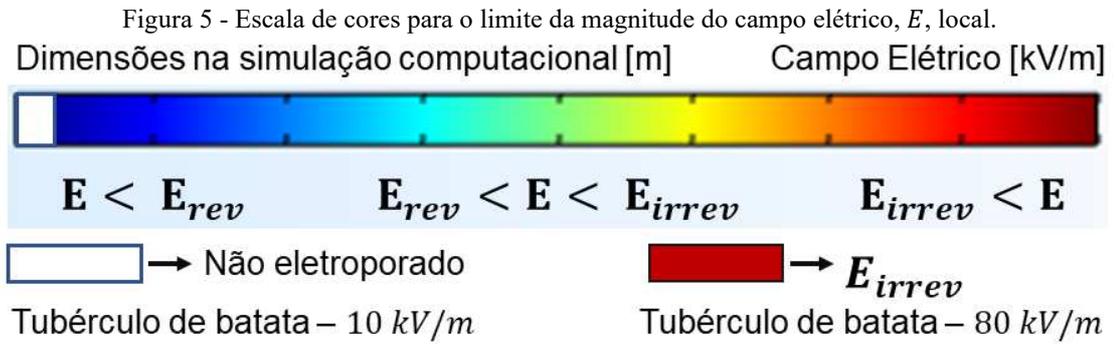


Fonte: adaptado de (IVORRA; MIR; RUBINSKY, 2009).

O fenômeno da eletroporação é observado quando em uma determinada região o campo elétrico excede o limiar E_{rev} , que naturalmente incrementa a condutividade elétrica, de σ_0 até σ_{max} . Quando o campo elétrico está aquém de E_{rev} , geralmente o tecido não sofre uma alteração elétrica notável. Para alcançar um tratamento eficaz, o campo elétrico deve ser estabelecido dentro da faixa $E_{rev} < E < E_{irrev}$.

Assim, na análise das simulações computacionais de elementos finitos, o resultado da distribuição do campo elétrico é representado por regiões coloridas, de acordo com a intensidade do campo elétrico imposto. A interpretação dessa escala de cores leva a limites parametrizados na Tabela 1. De fato, a conclusão sobre o procedimento de eletroporação permanece em limites satisfatórios, contemplados na escala representada pela Figura 5. Nesta figura há uma escala de cores correspondente ao valor local do limite da magnitude do campo elétrico, E , nas simulações computacionais. A correspondência é feita inicialmente pela cor branca, correspondente ao campo elétrico "fora de escala" devido a baixa ou nenhuma magnitude. Em seguida, as cores azuis até as cores vermelhas representam as magnitudes contempladas pela escala dos níveis de eletroporação. Assim, para qualquer simulação

computacional deste trabalho, as cores diferentes de branco indicam a ocorrência da eletroporação. Caso a cor alcance o tom vermelho escuro, a eletroporação é considerada irreversível.



3.5 PROCEDIMENTOS E MÉTODOS NAS PRÁTICAS LABORATORIAIS

Após a aplicação dos pulsos, cada amostra de *Solanum tuberosum* recebia uma numeração e o devido corte para expor a região da eletroporação à solução com o corante. As amostras foram armazenadas dentro de um recipiente aberto com dez gotas do corante para cada litro de água obtida da rede pública de abastecimento. Passado o período de 24 horas em imersão e sob temperatura ambiente de 25°C, Figura 6, uma das partes de cada amostra de *Solanum tuberosum* era escolhida como amostra válida somente se as suas duas partes fossem visualmente semelhantes. Assim, as imagens das amostras foram feitas sob um sistema de iluminação controlada, com a câmera digital de 10 MP, f/2.4, 24 mm, autofocus, Sony DSC-W390 digital camera.

Para estudar as regiões onde a aplicação do campo elétrico permitiu a livre passagem de substâncias por diferença de concentração entre os meios intra e extracelulares, foi utilizado o corante como o marcador capaz de colorir as células eletroporadas. Desta forma, dada a aparência das simulações previamente realizadas, foi revelada em coloração vermelha a região de eletroporação efetiva, onde se previu a passagem das linhas de campo elétrico. Nas demais regiões do corte, onde não era prevista semelhante exposição ao campo elétrico, houve a preservação da coloração amarelada do tubérculo, também verificado nos grupos controle.

Figura 6 - Imersão de 24 das amostras de *Solanum tuberosum* em solução para a marcação das regiões EP.



O corante adotado neste trabalho é comercializado no mesmo mercado onde os tubérculos de batatas foram adquiridos. Seu uso é relacionado à coloração de alimentos, comercialmente denominado de anilina vermelha. Na química, a tetraiodofluoresceína é o nome deste marcador de cor vermelha (ou rosa-cereja) contido no recipiente rotulado por anilina vermelha. Este corante alimentício tem sua apresentação comercial em frasco e composição química apresentada no APÊNDICE B.

3.6 VISÃO GERAL SOBRE OS ELETRODOS ENCONTRADOS NA LITERATURA

O principal destaque sobre a efetividade dos eletrodos propostos é devido a um polo de extensa superfície, como uma placa, e demais polos em forma de hastes com isolamento elétrico anterior ao seu seguimento condutor elétrico de alcance profundo no tecido. Embora tenham sido chamados de hastes, são agulhas calibrosas e de significativo comprimento. Desta maneira, suas partes condutoras apresentam superfícies tipicamente maiores quando comparadas aos eletrodos de (finas) agulhas largamente encontradas na literatura científica verificada.

Outra vantagem importante das grandes dimensões físicas dos eletrodos em questão está na tendência de evitar a influência de fatores térmicos durante a aplicações dos pulsos de elevadas tensões elétricas. Grandes superfícies de contato elétrico com tecidos vivos podem representar mínimas densidades de corrente elétrica local, para a prevenção de danos térmicos ao tecido tratado (estudado no APÊNDICE C), quando comparado com uma diminuta superfície condutora por onde flui a mesma intensidade de corrente elétrica.

Neste trabalho, a visão geral a respeito de um tratamento minimamente invasivo está ligada a vantagem do método em tratar volumes significativos de tecidos, geralmente com apenas uma inserção do eletrodo, dado que as perfurações com uma ou mais agulhas/hastes são significativamente distanciadas uma das outras, na contemplação de profundidades de até 50 *mm* (comprimento da agulha/haste adotadas). Para uma noção geral dos eletrodos encontrados na literatura, é possível consultar aqueles considerados relevantes ao presente estudo no APÊNDICE D.

Os tratamentos de EQT com eletrodos convencionais normalmente requerem sucessivas aplicações para tratar uma determinada superfície afetada por tecidos não saudáveis. Devido as limitadas profundidades alcançadas, há comum recorrência aos meios cirúrgicos para o tratamento completo de alguma dada região profunda e de difícil acesso. Neste contexto, a

proposta dos eletrodos se mostrará suficiente para contemplar estes casos. Por exemplo, onde há tecidos para serem retirados, a cirurgia é o ideal e o tratamento por EQT pode ser aplicado na região estimada como margem cirúrgica.

Com eletrodos para tratamentos de regiões abrangentes, foi necessário propor um eletroporador de características elétricas e tecnológicas adequadas: capaz de sustentar elevadas tensões ajustáveis e oferecer comandos para automatizar a aplicação dos pulsos em permuta automática de polaridades elétricas nos polos dos eletrodos.

3.7 METODOLOGIA DA REVISÃO SISTEMÁTICA

Com a finalidade de criar os alicerces para o desenvolvimento de eletrodos inéditos dedicados a EQT e verificar se existem eletrodos com similaridades relativas às quantidades da superfície e do volume de tecidos tratados, bem como geometria das partes mecânicas, materiais construtivos e tensões operacionais, além da efetiva necessidade de eletrodos para grandes regiões e quais as dificuldades neste sentido, foi realizada uma investigação da literatura científica em busca de evidências a respeito de alguma possível inovação, ou de quanto inédito possam ser os efeitos das geometrias então desenhadas e simuladas pelo autor e a respectiva equipe do IEB - UFSC.

O passo inicial da busca investigativa quanto a existência de precedentes é construir uma revisão sistemática dos eletrodos relacionados à EQT *in vivo*, *in vitro* ou *in silico*, e se possível, com evidências das distribuições de campo elétrico. Em uma etapa posterior, foram reunidos os variados resultados das buscas, com destaque àquelas com parâmetros relativos à quantidade de tecido tratado por aplicação. Na prática, a pesquisa exigiu a verificação criteriosa de cada publicação devido a constante falta de uniformidade ou critérios específicos das informações referentes aos eletrodos para EQT.

Embasado no método de revisão sistemática para encontrar trabalhos científicos e feita a coleta dos trabalhos relevantes ao tema, foi compreendido não haver nenhum trabalho publicado sobre a proposta de eletrodos contidos neste trabalho ou semelhantes em geometria e utilidade.

Para a revisão sistemática foram realizadas buscas nos bancos de dados Web Of Science, SCOPUS e no Google Scholar para investigar a existência prévia de alguma revisão que reúna informações sobre eletrodos utilizados na eletroporação e sua distribuição de campo elétrico em algum artigo. Foram considerados artigos publicados a partir do ano de 2006, ano

em que o protocolo ESOPE foi estabelecido (MARTY *et al.*, 2006; SERSA, 2006). Destas pesquisas, até dezembro de 2019, não foi encontrado nenhum artigo de revisão a respeito de alguma coletânea de diferentes tipos de eletrodos (adequados à eletroporação) com a distribuição de campo elétrico especificada nas bases Web Of Science, SCOPUS e Google Scholar com as palavras chaves “Electroporation AND Review AND Electric Field”.

3.7.1 Estratégia de pesquisa aos bancos de dados

Uma busca sistemática foi feita em quatro bancos de dados para a obtenção de artigos sobre eletrodos utilizados na eletroporação de tecidos: Web Of Science, SCOPUS, Science Direct e IEEE Xplore. Os termos de busca usados foram “Electroporation AND Tissue AND Electrodes” referente ao período entre 2006 e 2020. As buscas abrangeram somente publicações no idioma inglês. Na revisão sistemática se buscou agregar o máximo possível de tipos e arranjos de eletrodos já simulados e testados para a eletroquimioterapia *in vivo*, *in vitro* ou *in silico* em um único documento, com o objetivo de compilar e facilitar o acesso a estas informações, antes dispersas em diversos artigos e diferentes plataformas. Dessa forma, a coleta e separação dos dados ocorreu até outubro de 2020.

3.7.2 Trabalhos selecionados a partir dos bancos de dados

- i. Foram incluídos trabalhos que:
 - Possuam no seu texto especificações dos eletrodos utilizados em experimentos onde ocorreu a eletroporação *in vivo*, *in vitro* ou *in silico*;
 - Contemplem a EQT, pois é adequado a eletroporação reversível;
 - Apresentem eletrodos com geometrias correspondentes às distribuições de campo elétrico passíveis de reprodução diferentes escalas;
 - Utilizem, preferencialmente, eletrodos com múltiplos polos;
 - Incluam artigos que não utilizam tecido vivo, no entanto, possuem arranjos de eletrodos;
 - Possuam eletrodos e que dissertem sobre eletroporação, seja ela reversível ou irreversível, desde que apresentem a distribuição de campo elétrico dos eletrodos.

Então, os artigos obtidos com os critérios mencionados acima foram considerados relevantes, ainda que trabalhassem com outros assuntos, tal como ablação por efeito joule.

ii. Foram excluídos trabalhos:

- Que não apresentam minimamente os eletrodos, apenas citam o uso;
- Trabalhos com eletrodos que não contribuam com sugestões de geometrias da sua mecânica ou das distribuições de campo elétrico;
- Eletrodos em processo de desenvolvimento, ainda sem testes realizados;
- Artigos sobre eletroporação em terapia gênica e transferência genética;
- Capítulos de livros.

Na Tabela 2 está a relação de trabalhos encontrados considerando os critérios estipulados.

Tabela 2 – Relação da quantidade de trabalhos encontrados nas devidas bases de dados.

Base de dados para as buscas	Trabalhos Resultantes	Trabalhos Relevantes
Science Direct	44	17
SCOPUS	112	33
Web Of Science	156	68
IEEE Xplore	27	4

A partir desses dados, verificou-se os trabalhos duplicados em cada uma das bases e chegou-se ao resultado final de 87 trabalhos selecionados (a partir dos 122 considerados relevantes, Tabela 2). Destes 87 trabalhos, foram considerados 44 com contribuições de relevância na elaboração dos três eletrodos apresentados neste trabalho. E a partir das muitas leituras dos diversos trabalhos pesquisados, houve o apazimento de que um dado trabalho sobre algum eletrodo deveria conter as seguintes informações:

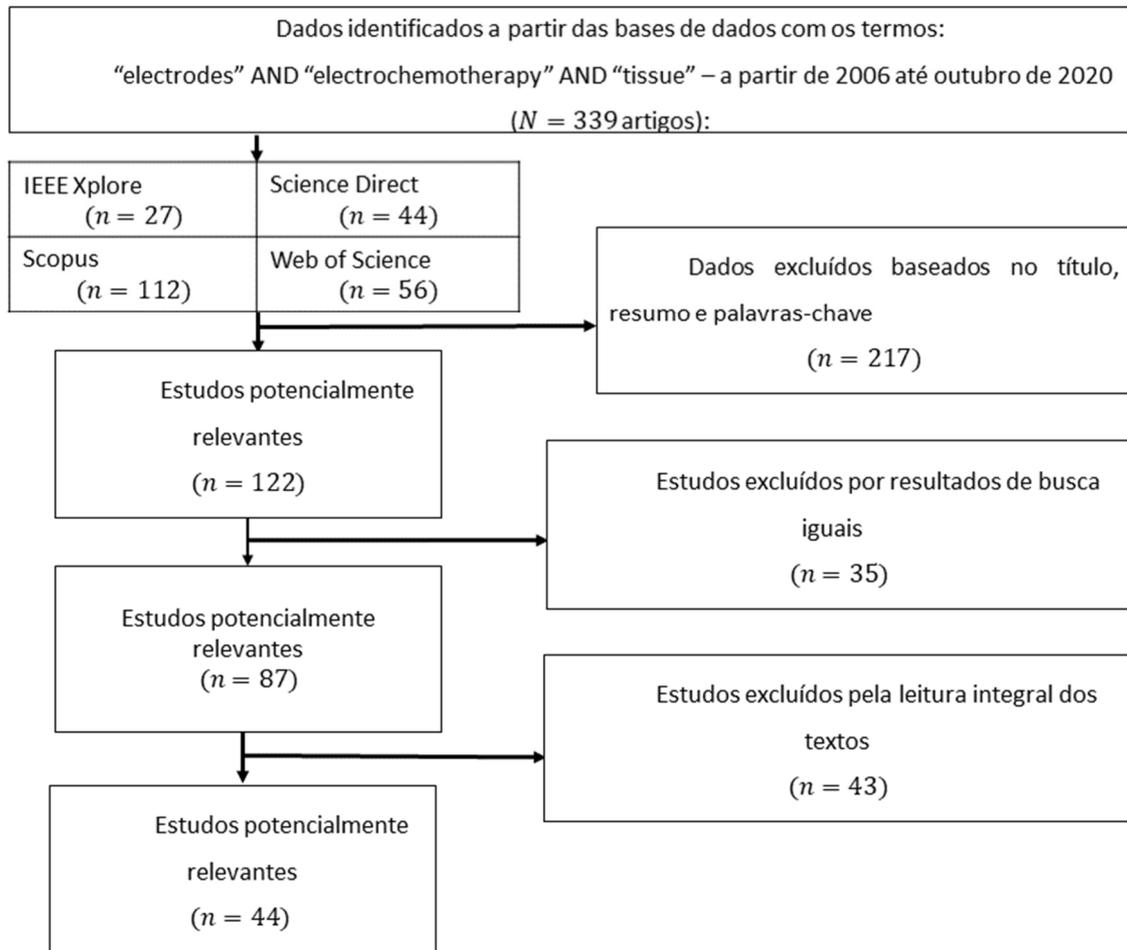
- Aplicação típica;

- Local de tratamento típico;
- Número de partes condutoras (polos);
- Comprimento;
- Diâmetro ou largura (no caso de placas);
- Distância dos isolamentos elétricos entre polos;
- Tensão de trabalho;
- Região (superfície ou volume) eletroporado.

Caso tais informações estivessem ausentes no texto pesquisado, o trabalho seria excluído. Caso houvesse dúvidas com relação ao conteúdo, o trabalho seria separado e revisto para então decidir sobre sua exclusão ou inclusão. Contudo, mesmo em artigos com um tópico em comum, havia discrepância com relação aos dados disponíveis nas pesquisas. Mesmo entre artigos similares é comum não serem disponibilizados os dados suficientes para o preenchimento dos requisitos pré-estabelecidos, ou seja, diversos trabalhos deixavam lacunas nas informações para comparações entre topologias de eletrodos.

Utilizando os resultados da revisão sistemática realizada até o momento, foi construído o fluxograma da Figura 7.

Figura 7 – Fluxograma dos critérios decisórios e a quantidade de trabalhos julgados.



De acordo com a busca de anterioridades na literatura científica citada, essencialmente os eletrodos finalistas utilizam:

- Par de placas paralelas;
- Hastes com isolamento para a separação de regiões condutoras elétricas que configuram dois polos distintos;
- Matriz de semiesferas ou de agulhas paralelas, distribuídos em um plano isolante, onde formavam triângulos ou hexágonos;
- Arranjos de hastes de superfícies totalmente condutoras (sem segmento eletricamente isolado);
- Raramente foram encontrados eletrodos impressos em material isolante, como vidro ou acetato;

- Eletrodos de extremidade com múltiplas agulhas longas e finas, organizadas como as cerdas de um pincel, cujo distanciamento é dado por um ajuste inicial fixo, capaz de variar suas distâncias relativas na medida que são inseridos no tecido.

Os artigos considerados pertinentes foram geralmente aqueles que contemplam regiões com superfícies próximas a 1 cm^2 , ou volumes com ao redor de 1 cm^3 a cada aplicação de um protocolo de pulsos. Além deste critério de área ou volume aplicados de forma abrangente quanto aos eletrodos de utilizações análogas à EQT, foram aceitos artigos cuja modificação em escala física possa eventualmente contribuir com o tratamento de grandes regiões.

3.8 A FAMÍLIA DE ELETRODOS

A proposta da família de três eletrodos compartilha as características apresentadas na Tabela 3 e Figura 8.

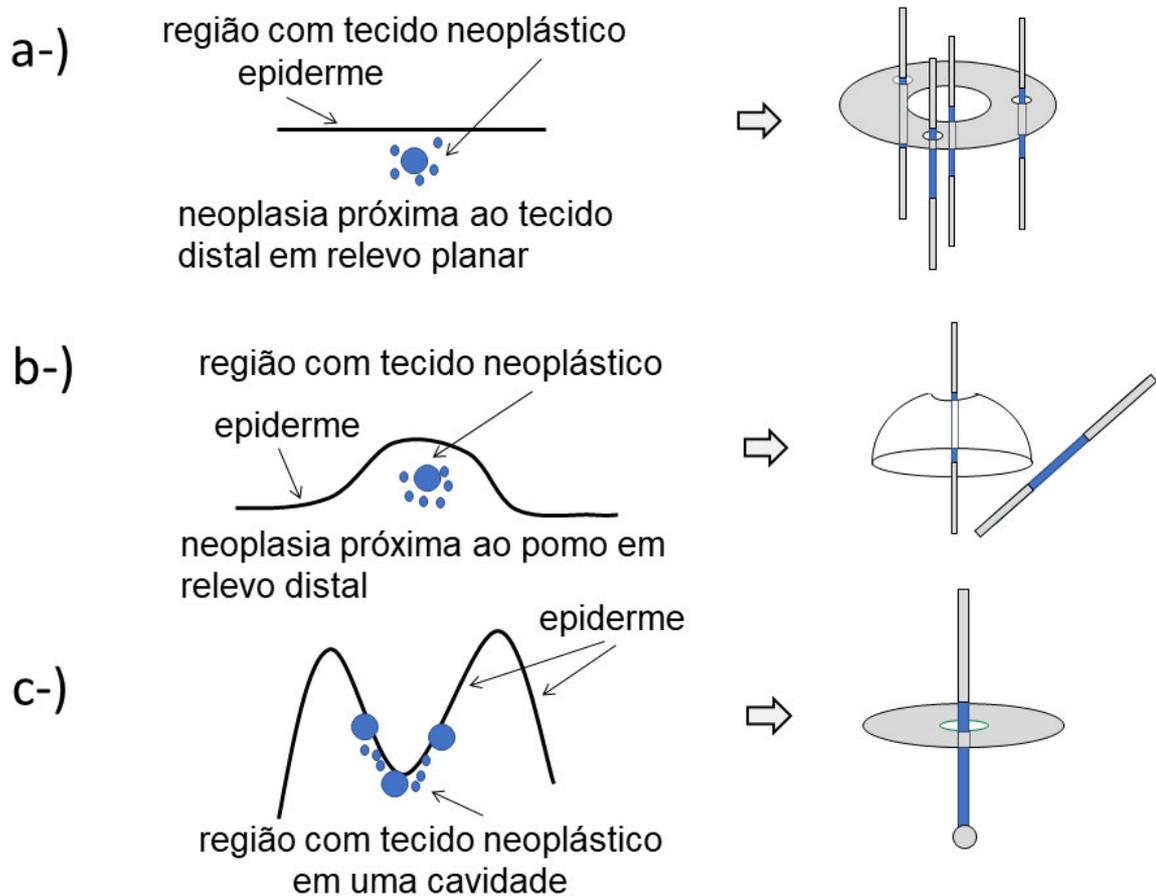
Tabela 3 - Características dos eletrodos propostos que os fazem originais.

item	Características efetivas relacionada aos eletrodos propostos
1°	Um polo com extensa superfície de contato elétrico associado a um ou mais polos independentes, com a parte condutora dedicada à cobertura das extremidades da superfície de aplicação.
2°	Aplicação pela mesma face da região em tratamento. Não há previsão para transfixação nesta metodologia.
3°	Tendência a distribuição de campo elétrico sem falhas internas ao volume tratado, com preenchimento completo na região adjacente ao foco da aplicação (margem de segurança), e manutenção de baixa densidade de corrente elétrica em porções bastante representativas do volume, APÊNDICE C, apesar de possíveis ocorrências de regiões com eletroporação irreversível.

Na Tabela 3, as três características unidas tendem a formar uma proposta original em termos de eletrodos adequado a EQT.

Na Figura 8 são exemplificados os nichos de aplicação em função da geometria a ser tratada: a-) tecido neoplásico próximo a um tecido superficial plano; b-) tecido neoplásico próximo ao pomo em relevo; c-) tecido neoplásico em uma cavidade.

Figura 8 - Arranjo de eletrodos propostos, a proposta de aplicação em função das geometrias a serem tratadas e a conotação para as partes eletricamente condutoras e isolantes; a-) Eletrodo de placa em forma de disco com até quatro eletrodos parcialmente isolados distribuídos no centro e a cada 120° no raio médio da placa; b-) Eletrodo de placa com tampa semiesférica com eletrodo parcialmente isolado de inserção superior ou lateral; c-) Eletrodo de placa em forma de disco com haste central isolada com extremidade esférica condutora.



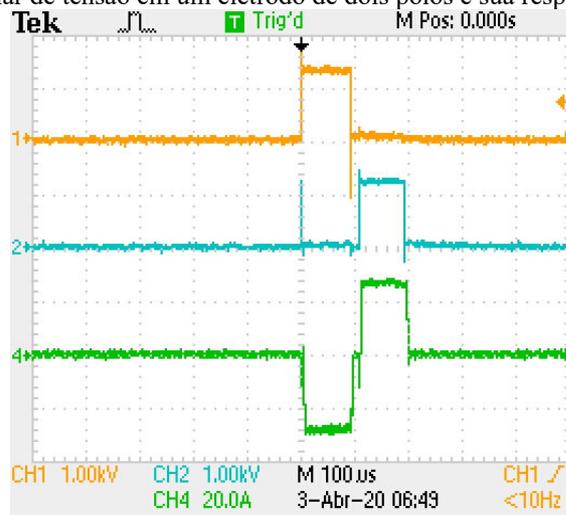
Em uma avaliação criteriosa, restrita a busca aos eletrodos com as três características da Tabela 3 de forma concomitantes, não ocorre nenhum eletrodo capaz de satisfazer a combinação das características citadas. Sequer duas dessas características combinadas foram encontradas nas tipologias pesquisadas para a aplicação da eletroquimioterapia.

3.9 AQUISIÇÃO DOS DADOS DAS PRÁTICAS LABORATORIAIS

Os resultados práticos dependem dos valores das amostras referentes a cada um dos oito experimentos, cada qual com as respectivas N amostras trabalhadas adequadamente para a medição das correntes elétricas e posterior contabilização das áreas totais eletroporadas. Os experimentos 01, 02 e 03 são a respeito do eletrodo de placa em forma de disco (toróide) com até quatro polos parcialmente isolados distribuídos no centro e a cada 120° no raio médio da placa. Os experimentos 04 e 05 são a respeito do eletrodo de placa com tampa, ou calota, semiesférica com polo parcialmente isolado, de inserção superior ou lateral. Os experimentos 06, 07 e 08 são a respeito do eletrodo de placa em forma de disco com polo em haste fixa central, de corpo isolado e de extremidade esférica condutora elétrica.

A Figura 9 apresenta a imagem da tela do osciloscópio na aquisição das tensões e correntes elétricas, cujas características dos aparatos utilizados são citadas no item 3.1. Para os experimentos deste trabalho, as aquisições de tela do osciloscópio são encontradas no APÊNDICE H. A visualização das ondas de tensão é útil para o acompanhamento em tempo real da ocorrência de cada um dos pulsos. Embora o patamar da corrente elétrica seja levemente incrementado pelo aumento de condutividade no decorrer dos pulsos de tensão (devido ao fenômeno da eletroporação), geralmente é adotado o critério de coletar a média das tensões e das correntes no último pulso do protocolo ESOPE. Este procedimento é assim estabelecido por ser o critério normalmente utilizado no desenvolvimento de modelos sequenciais da EP, úteis para dimensionar o volume de tratamentos por EQT (SEL *et al.*, 2005b) e (SUZUKI *et al.*, 2018) no oitavo (último) pulso do protocolo ESOPE (LV *et al.*, 2020) e (NEAL *et al.*, 2012), $100 \mu s$ em alta tensão a cada período de 1 segundo (BERKENBROCK *et al.*, 2019; NEVES *et al.*, 2014).

Figura 9 - Pulso bipolar de tensão em um eletrodo de dois polos e sua respectiva corrente elétrica.



Devido as variadas combinações possíveis no uso dos integrantes da família dos eletrodos, foram ensaiadas as configurações elementares, cujas combinações possam propiciar os tratamentos com abrangência representativa do volumétrica de tecido.

As áreas eletroporadas são contabilizadas na superfície do corte transversal às linhas de campo elétrico definidas como representativas à EP. E devem estar de acordo com a coloração absorvida pelas células permeabilizadas, segundo o previsto em simulação. Assim, no presente trabalho, a região total contemplada pela eletroporação é representada pela soma das áreas das porções reversíveis e irreversíveis. Em se mantendo as mesmas amostras experimentais para as correntes e áreas, foram obtidas as amostras para (as correntes de) C01, C02 até C07, e para as amostras (das áreas de) A01, A02 até A07. As amostras de correntes e áreas de C08 e A08 foram obtidas de modo deficitário pelo fato deste experimento submeter o eletroporador à danos físicos de modo recorrente, e por motivos ainda não claros. Portanto, quando conveniente, os resultados relacionados a C08 e A08 são citados para o efeito de exemplificação de algum detalhe adequado ao entendimento geral.

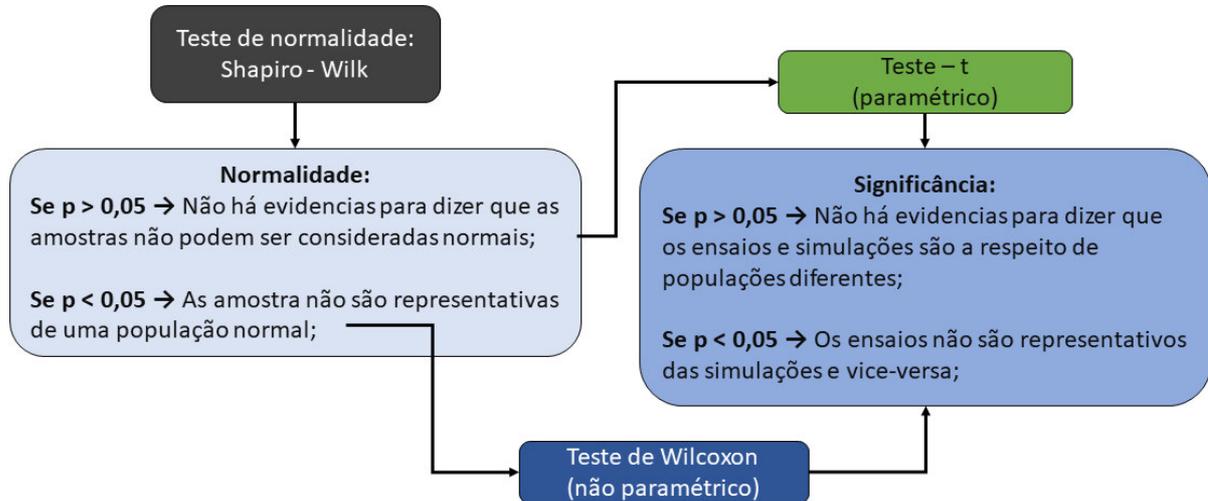
Para o cálculo da região eletroporada, as amostras foram obtidas da superfície do corte no volume eletroporado, para a respectiva contabilização da área tratada. O método de marcação utiliza um corante vermelho, necessário para indicar a região tratada reversível e irreversivelmente em cor única, bastante distinta do restante não afetado pela eletroporação. As áreas experimentais foram contabilizadas por meio do *software* de processamento de imagens *ImageJ* (University of Wisconsin, Estados Unidos). Então, estas áreas experimentais e suas médias são comparadas com os resultados teóricos das simulações computacionais.

A partir das amostragens de correntes e áreas totais eletroporadas e seus recíprocos valores simulados, foram estabelecidos gráficos de pontos sobrepostos a respectiva representação em box-plot. Sua utilidade é apresentar todas as amostras e simulações em um mesmo plano, para a percepção das variadas magnitudes, dispersões e variações quanto a distribuição normal.

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

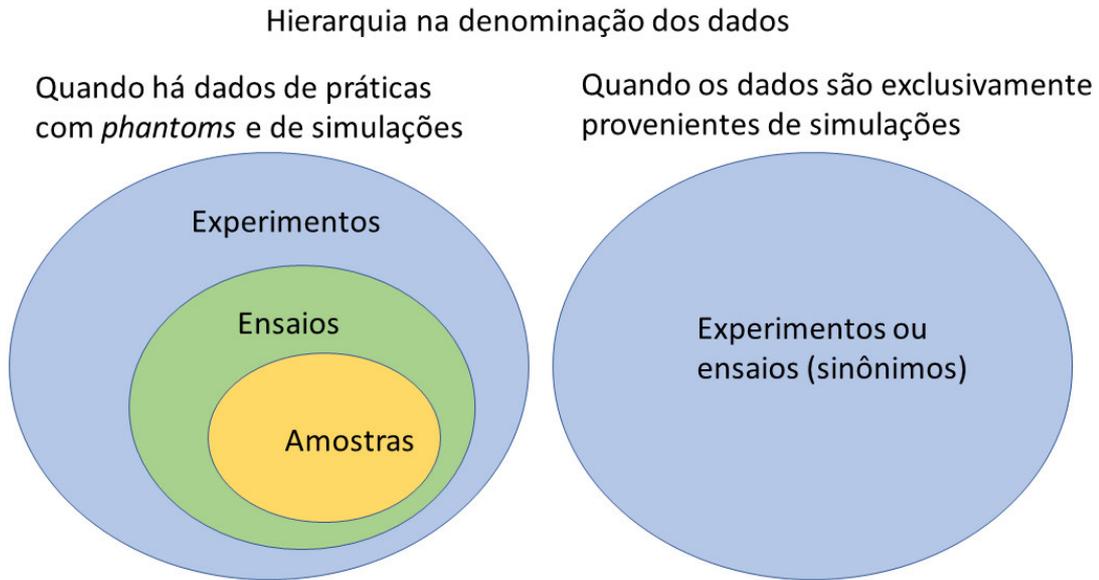
No nível de significância $p = 0,05$, deve ser realizado o teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) para avaliar se cada uma das amostragens possui distribuição normal. Caso uma amostragem apresente distribuição considerada normal, $p > 0,05$, é feito o teste – t para rejeitar ou não uma hipótese nula, que corresponde a não existência de relação entre amostragens. Caso uma amostragem não seja considerada normal pelo teste de Shapiro-Wilk, $p \leq 0,05$, será utilizado o teste paramétrico de Wilcoxon (BLAIR; HIGGINS, 1980; DEXTER, 2013) para amostragens independentes, quando não é possível assumir a distribuição normal para a amostragem, Figura 10. Para esse teste, a hipótese nula se refere a amostragem conter amostras com funções de distribuição iguais, e sua hipótese alternativa, de que ao menos um par de amostras possuem funções de distribuições diferentes. Assim, o intervalo de confiança será apregoadado somente nas amostragens consideradas de distribuição normal.

Figura 10 - Fluxograma a respeito dos testes para a obtenção da normalidade e significância dos conjuntos de amostras dos ensaios.



Foram realizados oito experimentos, cada um com seus ensaios na obtenção das amostras das grandezas frente ao estudo da família dos três eletrodos. Desta forma, a hierarquia para a obtenção dos dados no desenvolvimento deste trabalho é apresentada como na Figura 11.

Figura 11 - Hierarquia considerada para a citação dos termos ao longo deste estudo.



Como podem existir diferentes configurações para cada um dos eletrodos, foram escolhidas um total de oito que se diferenciam ao ponto da complementariedade em práticas laboratoriais, o que vislumbra casos realísticos devido às combinações confinarem muitas possibilidades de tratamentos. Cada uma das oito configurações representaria uma análise independente para alimentar os processos da metodologia utilizada.

A princípio, cada um dos oito experimentos busca valores simulados e experimentais com as áreas e correntes elétricas para:

- Os ensaios de A01 até A08 são relativos às áreas obtidas por simulações computacionais com os parâmetros da amostra de *Solanum tuberosum*, nas tensões adequadas à condutividade elétrica e aos eletrodos e suas configurações;
- Os ensaios de C01 até C08 são relativos às correntes elétricas obtidas por simulações computacionais, de maneira a lançar mão dos parâmetros referentes ao tubérculo de batata, nas tensões adequadas à condutividade elétrica e aos eletrodos nas mesmas configurações dos respectivos ensaios de corrente elétrica;

Junto aos resultados obtidos com práticas laboratoriais, foram realizados mais oito experimentos simulados (exclusivamente teóricos), onde foi considerado um tecido de elevada condutividade elétrica. Os parâmetros deste tecido são compatíveis a um tecido animal

relacionado às neoplasias (tumores), e alimenta o modelo no simulador. Assim, as simulações fornecem valores de áreas e correntes elétricas para:

- Os ensaios de 01T até 07T apresentam os valores de áreas e correntes elétricas, respectivamente dos oito experimentos teóricos, cada qual com as áreas e correntes elétricas em um só gráfico.

A Tabela 4 é alimentada com cada um dos resultados obtidos nas práticas laboratoriais e nas simulações, organizada com as amostras de correntes elétricas e áreas. O objetivo é avaliar separadamente a correlação das correntes elétricas e áreas, práticas e teóricas em baixas tensões, aplicadas no tecido do *Solanum tuberosum*. Em seguida, verificar se essas mesmas correntes elétricas e áreas teóricas possuem significantes correlações com os valores simulados no tecido de elevada condutividade elétrica, sob pulsos de tensões compatíveis aos parâmetros elétricos do referido tecido ou material em estudo, Tabela 1.

Tabela 4 - Arranjos das amostras para as correlações.

Corrente elétrica		Corrente elétrica		Área		Área	
Tubérculo de batata		Tecido animal		Tubérculo de batata		Tecido animal	
Simulada	Experimental	Simulada	Simulada	Simulada	Experimental	Simulada	Simulada
$C01_{1500V}^{Simul}$	$C01_{1500V}^{Exper}$	$C01_{1500V}^{Simul}$	$01T_{3000V}^{Corrente}$	$A01_{1500V}^{Simul}$	$A01_{1500V}^{Exper}$	$A01_{1500V}^{Simul}$	$01T_{3000V}^{Área}$
$C02_{1500V}^{Simul}$	$C02_{1500V}^{Exper}$	$C02_{1500V}^{Simul}$	$02T_{3000V}^{Corrente}$	$A02_{1500V}^{Simul}$	$A02_{1500V}^{Exper}$	$A02_{1500V}^{Simul}$	$02T_{3000V}^{Área}$
$C03_{1500V}^{Simul}$	$C03_{1500V}^{Exper}$	$C03_{1500V}^{Simul}$	$03T_{3000V}^{Corrente}$	$A03_{1500V}^{Simul}$	$A03_{1500V}^{Exper}$	$A03_{1500V}^{Simul}$	$03T_{3000V}^{Área}$
$C04_{1500V}^{Simul}$	$C04_{1500V}^{Exper}$	$C04_{1500V}^{Simul}$	$04T_{3000V}^{Corrente}$	$A04_{1500V}^{Simul}$	$A04_{1500V}^{Exper}$	$A04_{1500V}^{Simul}$	$04T_{3000V}^{Área}$
$C05_{1500V}^{Simul}$	$C05_{1500V}^{Exper}$	$C05_{1500V}^{Simul}$	$05T_{3000V}^{Corrente}$	$A05_{1500V}^{Simul}$	$A05_{1500V}^{Exper}$	$A05_{1500V}^{Simul}$	$05T_{3000V}^{Área}$
$C06_{1200V}^{Simul}$	$C06_{1200V}^{Exper}$	$C06_{1200V}^{Simul}$	$06T_{2700V}^{Corrente}$	$A06_{1200V}^{Simul}$	$A06_{1200V}^{Exper}$	$A06_{1200V}^{Simul}$	$06T_{2700V}^{Área}$
$C07_{1200V}^{Simul}$	$C07_{1200V}^{Exper}$	$C07_{1200V}^{Simul}$	$07T_{2700V}^{Corrente}$	$A07_{1200V}^{Simul}$	$A07_{1200V}^{Exper}$	$A07_{1200V}^{Simul}$	$07T_{2700V}^{Área}$
Correlação α $Corrente_{batata(Simul)}^{batata(Simul)}$ $batata(Exper)$		Correlação β $Corrente_{batata(Simul)}^{animal(Simul)}$ $batata(Simul)$		Correlação γ $Área_{batata(Simul)}^{batata(Simul)}$ $batata(Exper)$		Correlação δ $Área_{batata(Simul)}^{animal(Simul)}$ $batata(Simul)$	
Correlação α		Correlação β		Correlação γ		Correlação δ	
<p><i>Exper</i> – Valor adquirido experimentalmente;</p> <p><i>Simul</i> – Valor obtido em simulação computacional;</p> <p><i>A</i> – Referente a <i>Exper</i> e <i>Simul</i> de área [cm^2];</p> <p><i>C</i> – Referente a <i>Exper</i> e <i>Simul</i> de corrente elétrica [A];</p> <p>T – Referente aos ensaios em tensão compatível com o tecido animal adotado. Em todos os demais ensaios foram adotadas tensões compatíveis com o tubérculo de batata. O valor do módulo das tensões utilizadas são os valores que acompanham as respectivas variáveis, em unidade de Volt [V].</p>							

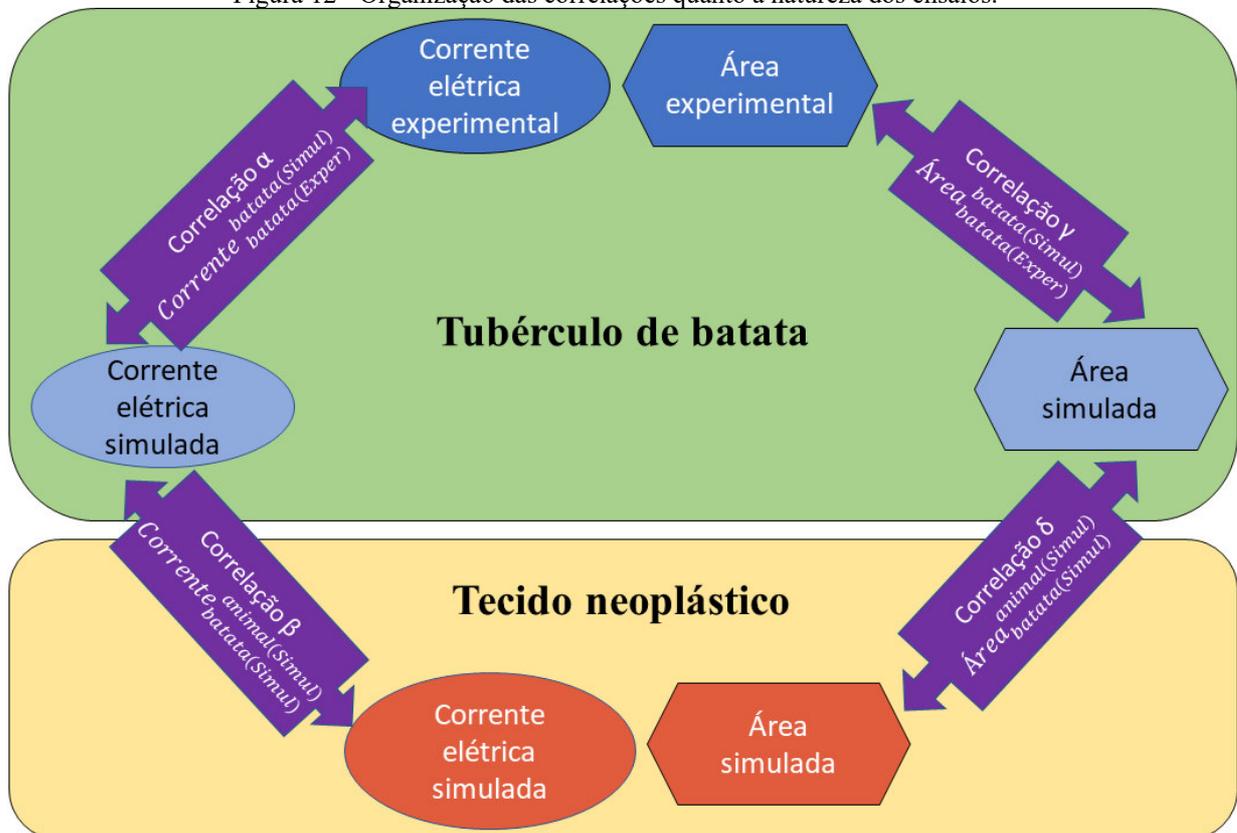
As correlações são planejadas entre ensaios de áreas separadamente dos ensaios de corrente elétrica, como esquematizado na Figura 12. A organização apresenta o mesmo conteúdo da Tabela 4, e corresponde ao organograma para as correlações aplicadas no estudo quantitativo. As letras gregas α , β , γ , e δ são o resultado das correlações de Pearson, APÊNDICE E.

Como neste trabalho não é previsto o uso do eletroporador em tumores ou tecidos animais, foram feitas correlações para a correspondência dos valores experimentados em tubérculos de batatas e nas simulações de tumores. Assim, mesmo que os tecidos do *Solanum tuberosum* e do tumor possuam parametrizações distintas, são esperadas correlações

significantes. Esta é a essência do estudo quantitativo para uma proposta metodológica de padronização de eletrodos para EQT.

O valor elevado da correlação de Pearson indicaria que há tendência quanto a correspondência entre os modelos computacionais adotados (distintos para vegetais e animais), dos eletrodos propostos não apresentarem significativas distorções não lineares na utilização em meios cujas condutividades elétricas são bastante distintas, bem como das boas práticas laboratoriais adotadas. A consequência está quantitativamente relacionada a viabilidade em extrapolar resultados de vegetais em animais.

Figura 12 - Organização das correlações quanto a natureza dos ensaios.



É entendido que o estudo quantitativo como uma proposta metodológica deve colaborar para a classificação de eletrodos específicos à EQT. De maneira clara e direta, é relevante apresentar as informações que remetam o eletrodo proponente a uma classificação promissora quanto ao uso clínico. Então, esta proposta de padronização concentra a essência dos resultados como segue:

- Os percentuais das correlações α , β , γ , δ ;

- Ao menos uma figura da simulação com as cotas das partes de cada polo em milímetros;
- Informações acessórias sobre os patamares de tensão aplicada na sequência ordenada de polos, descrição do trem de pulsos de tensão e corrente elétrica do último patamar do último trem de pulsos.

4 RESULTADOS

Nesta secção são apresentados os resultados devido a aplicação da Metodologia (Capítulo 3). A apresentação dos resultados está distribuída de maneira compatível a sequência:

1. A apresentação dos eletrodos:

- Dimensões físicas dos respectivos protótipos;
- Tabela com um resumo finalista dos eletrodos apurados na revisão sistemática.

Apresentação dos experimentos:

- Área eletroporada dos cortes nas simulações e dos respectivos similares práticos;
- Média das correntes práticas e respectivo valor simulado;
- Gráficos com previsões teóricas das áreas e correntes em tubérculos de batata;
- Gráficos com previsões teóricas das áreas e correntes em tecido neoplásico.

2. Estatística dos experimentos:

- Validação do modelo para a área, seguido da validação do modelo para a corrente elétrica total eletroporada;
- Validação quantitativa dos critérios para efetivar as correlações dos resultados do tecido vegetal com o tecido neoplásico.

3. Reconstituição gráfica de um tratamento representativo da proposta da família de eletrodos:

- Devido a quantidade e versatilidade nas configurações dos polos, o primeiro eletrodo da família, apresentado na Figura 8 b-), foi utilizado para exemplificar a perspectiva esperada a respeito da região tratada pela execução sobreposta dos comandos 3 e 6 do eletroporador, Tabela 15, APÊNDICE A.

4.1 A FAMÍLIA DE ELETRODOS

A oportunidade de elaboração de novos eletrodos para tratamentos de EQT foi construída a partir da busca sistemática resultante na seleção de 87 trabalhos finalistas, dos quais 44 ofereceram as contribuições mais consistentes a respeito de eletrodos aplicáveis no tratamento de superfícies localmente planas, convexas ou contidas em orifícios. Juntamente às configurações assumidas devido o modo como os polos em forma de hastes e acessórios em forma de placas metálicas planas podem ser posicionados. O conceito da família dos eletrodos corresponde ao uso de um polo com superfície maior que os demais, havendo, por consequência, tendências à melhor distribuição do campo elétrico e algum valor pequeno e, portanto, desconsiderado, de densidade de corrente elétrica entre cada polo e tecido vivo.

A Tabela 5 apresenta um resumo dos eletrodos apresentados pela literatura. Os detalhes dos eletrodos da revisão são exibidos no APÊNDICE D. Os critérios de inclusão foram: geometrias fixas, superfície e volume tratado, uma aplicação de EQT, tensão de trabalho e campo elétrico aplicado. Os critérios de exclusão foram a não apresentação nos artigos de informações suficientes para avaliação analítica da área e da profundidade que os campos elétricos aplicados pelos eletrodos possam ser avaliados.

Tabela 5 - Resumo representativo dos eletrodos apresentados pela literatura.

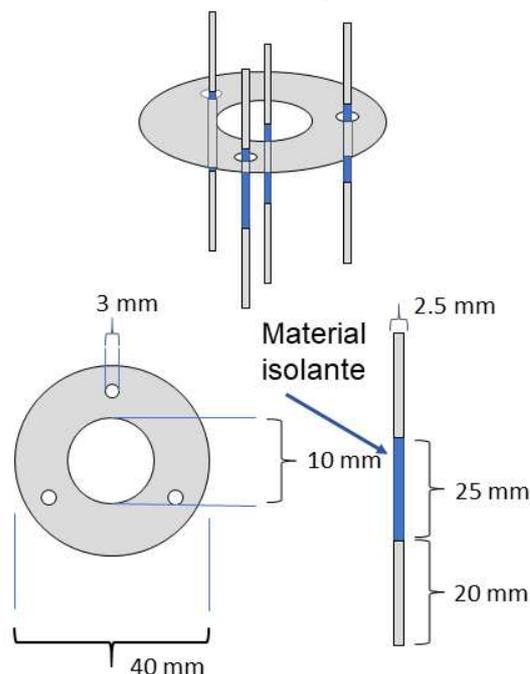
Referência	Descrição dos eletrodos	Área da EQT eficiente	Profundidade do campo elétrico	$ \vec{E} $ em [V/m]
(MIKLAVČIČ <i>et al.</i> , 2006b) e (ŽUPANIČ; ČOROVIČ; MIKLAVČIČ, 2008)	Agulhas paralelas	Ao redor de $0,5 \text{ mm}^2$.	Entre $0,5 \text{ mm}$ e $1,0 \text{ mm}$.	Entre 40 kV/m e 90 kV/m .
(SELMA; PAVLIN; MIKLAV, 2007) e (ŽUPANIČ; ČOROVIČ; MIKLAVČIČ, 2008)	Agulhas em arranjos hexagonais	Ao redor de 4 cm^2 .	Similar a profundidade das agulhas, 15 mm .	Entre 50 kV/m e 115 kV/m .
(ČOROVIČ <i>et al.</i> , 2008),	Placas paralelas	Geralmente inferior a 1 cm^2 .	Entre 1 mm e 4 mm abaixo da superfície de aplicação.	De 3 kV/m até 150 kV/m .
(ČOROVIČ <i>et al.</i> , 2008) e (CAMPANA <i>et al.</i> , 2014b)	Cavidade orofaringe	Somente entre o par de placas do eletrodo: espessura de $0,7 \text{ mm}$ e largura da placa de 10 mm .	Somente entre o par de placas do eletrodo: $0,7 \text{ cm}^2$.	Entre 40 kV/m e 150 kV/m .
(MAHMOOD; GEHL, 2011)	Intracerebral	Diâmetro de até 30 mm (7 cm^2).	Similar a profundidade das agulhas, 5 mm .	Entre 35 kV/m e 120 kV/m .
(MAZÈRES <i>et al.</i> , 2009)	Eletrodo de cubetas	Ao redor de $0,6 \text{ cm}^2$.	Inferior a 1 mm .	Ao redor de 40 kV/m .
(NEAL <i>et al.</i> , 2010), (GARCIA; DAVALOS; MIKLAVČIČ, 2014) e (BONAKDAR <i>et al.</i> , 2015)	Monopolar	Diâmetro de até 12 mm ($1,1 \text{ cm}^2$).	22 mm .	Entre 46 kV/m e 70 kV/m .
(BOMMAKANTI <i>et al.</i> , 2011)	Microarray de 24 eletrodos	Ao redor de $1,44 \text{ cm}^2$.	–	Entre 25 kV/m e 180 kV/m .
(CAMPANA <i>et al.</i> , 2016b)	Eletrodo flexível com 67 agulhas	Geralmente inferior a 225 cm^2 .	Similar a profundidade das agulhas, 10 mm .	Valor não citado. (Tratamento para epiderme e derme).
(ONGARO <i>et al.</i> , 2016)	Grade de eletrodos com 13-52 agulhas	Ao redor de 2 cm^2 .	Similar a profundidade das agulhas, 10 mm .	100 V/m (estimado na maior parte do volume).
(RITTER <i>et al.</i> , 2018)	Eletrodos curvados	Ao redor de $1,8 \text{ cm}^2$.	6 mm .	Entre 30 kV/m e 130 kV/m .

Os protótipos de eletrodos foram construídos em aço AISI 304 e resina acrílica auto polimerizante (material para próteses dentárias), adequados a esterilização por autoclavagem, o que possibilitou o desenvolvimento a partir de materiais mais próximos à finalidade médica (B. MAINIER, 2013). Na suposição de um tratamento clínico, caso existam irregularidades nas superfícies do tecido a ser tratado, onde o uso auxiliar de gel condutor poderá ser empregado entre o contato elétrico do polo com o tecido (DAMIANI, 2017; DEAN, 2003; IVORRA; RUBINSKY, 2007b; SUZUKI *et al.*, 2018).

4.1.1 Eletrodo de placa em forma de disco com até quatro eletrodos parcialmente isolados distribuídos no centro e a cada 120° no raio médio da placa

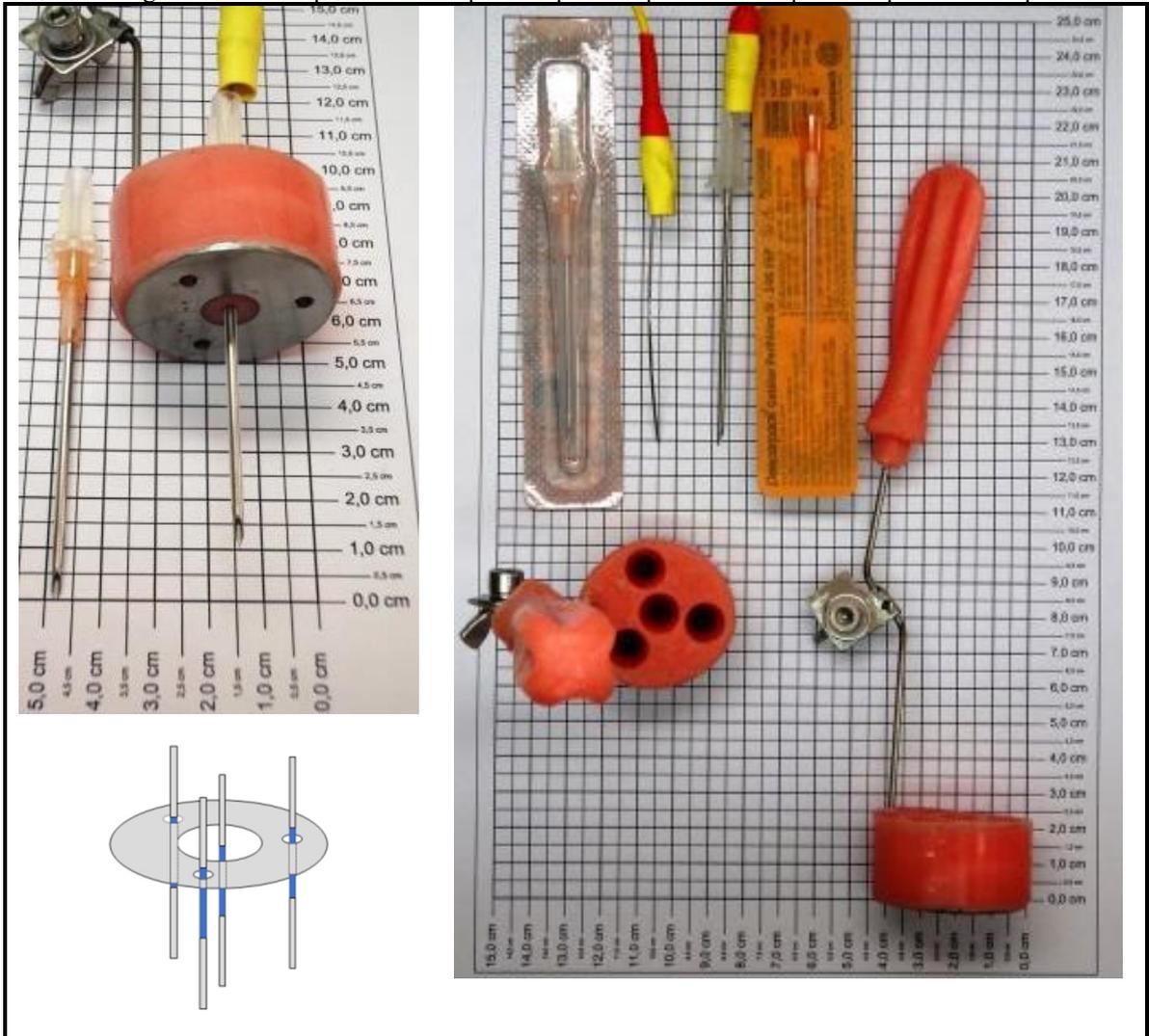
O eletrodo adequado no tratamento sobre regiões de superfície plana tem suas partes dimensionadas segundo a Figura 13.

Figura 13 - Eletrodo de placa em forma de disco com até quatro eletrodos parcialmente isolados, distribuídos no centro e a cada 120° no raio médio da placa - dimensões dos polos.



Este eletrodo de placa oferece usos plausíveis para o tratamento de tecidos não saudáveis localizados em superfícies predominantemente planas, Figura 14, (MIKLAVČIČ *et al.*, 2010; MIKLAVČIČ *et al.*, 2012). É adequado para regiões com até 50 mm de profundidade da superfície de contato com o polo em forma disco (toroidal).

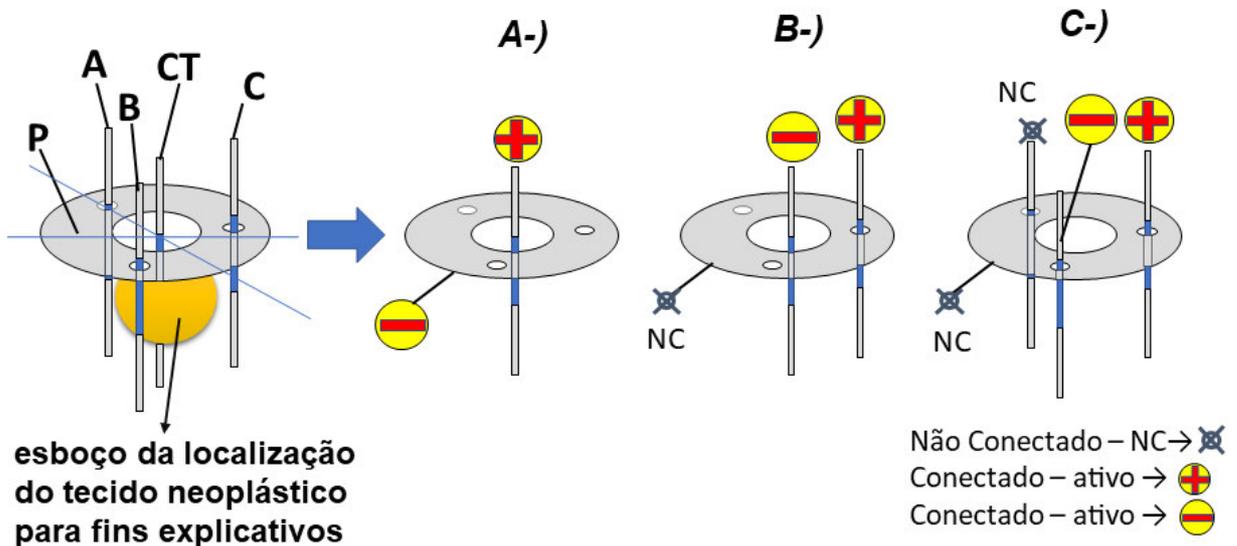
Figura 14 - Protótipo de eletrodo para neoplásias próximas a superfícies planas do corpo.



A estruturação deste eletrodo recebeu influência de conceitos da mecânica observados, em termos das placas (REBERŠEK *et al.*, 2008), (ŽUPANIČ; ČOROVIĆ; MIKLAVČIČ, 2008) e (CAMPANA *et al.*, 2014a), no que se refere às hastes (NEAL *et al.*, 2010), (KOS *et al.*, 2010), (MAHMOOD; GEHL, 2011), (ADEYANJU; AL-ANGARI; SAHAKIAN, 2012), (BLAGUS *et al.*, 2013), (NICKFARJAM; FIROOZABADI, 2014), (GARCIA; DAVALOS; MIKLAVCIC, 2014), (DENZI *et al.*, 2015), (GROSELJ *et al.*, 2015), (BONAKDAR *et al.*, 2015), (ROSSMEISL *et al.*, 2015), (GASBARRINI *et al.*, 2015), (MAGLIETTI *et al.*, 2017), (RITTER *et al.*, 2018), (GONZÁLEZ *et al.*, 2018), (PINTAR *et al.*, 2018) e (CALZADO *et al.*, 2019) e principalmente a respeito da distribuição de campo em (MIKLAVCIC *et al.*, 2006a), (SELMA; PAVLIN; MIKLAV, 2007) e (KURATA; NOMURA; TAKAMATSU, 2014).

Nos experimentos realizados com este eletrodo, são consideradas as três situações básicas, apresentadas na Figura 15. São apresentados os modos “A-), “B-)” e “C-)” de utilização para os quais há um par de polos que devem ser conectados ao eletroporador. As polaridades positivas [+] e negativa [-] representam haver aplicação de potenciais elétricos entre os polos.

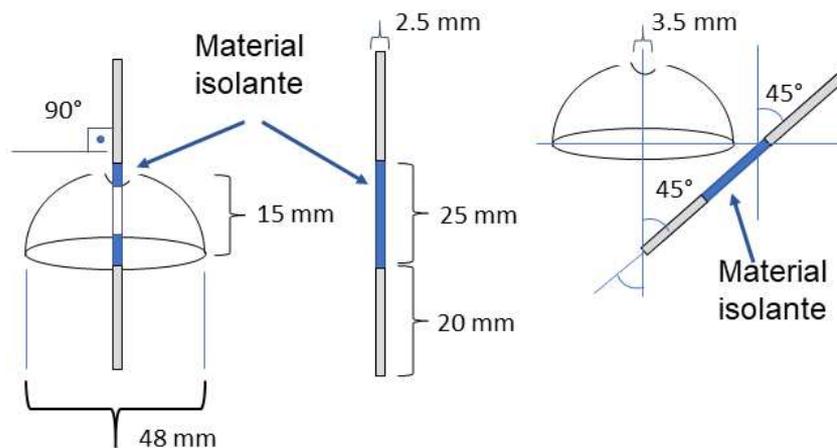
Figura 15 – As três situações básicas a serem observadas no eletrodo de disco com distribuição dos polos em forma de hastes, no centro e a cada 120° no disco.



4.1.2 Eletrodo de calota semiesférica com eletrodo parcialmente isolado de inserção superior ou lateral

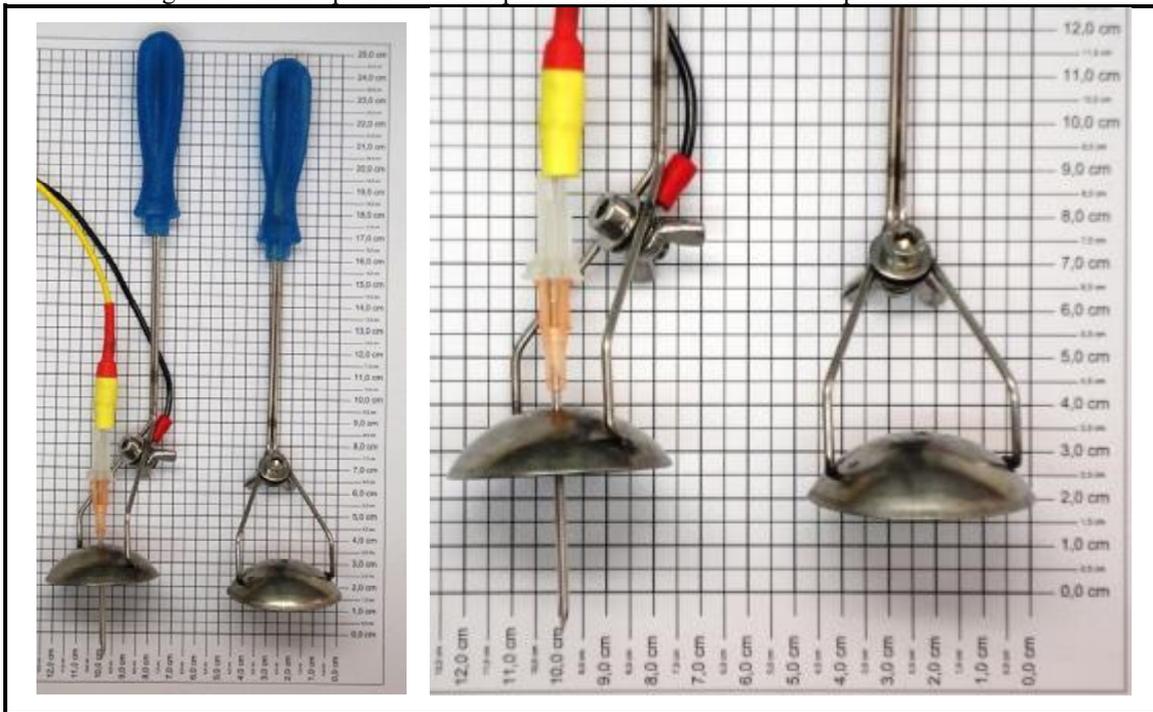
Este eletrodo é adequado para o tratamento tecidos neoplásicos cutâneos (concentram-se projetados para o exterior da superfície do órgão ou tecidos). O eletrodo tem seus polos dimensionados como na Figura 16.

Figura 16 - Placa de eletrodo de calota semiesférica e eletrodo inserção superior ou lateral - dimensões dos polos.



A placa do eletrodo é uma calota semiesférica com um orifício superior. A haste parcialmente isolada pode ser de inserção superior ou lateral. Para essa composição, o uso mais plausível é no tratamento de tecidos neoplásicos localizados em protuberâncias, Figura 17.

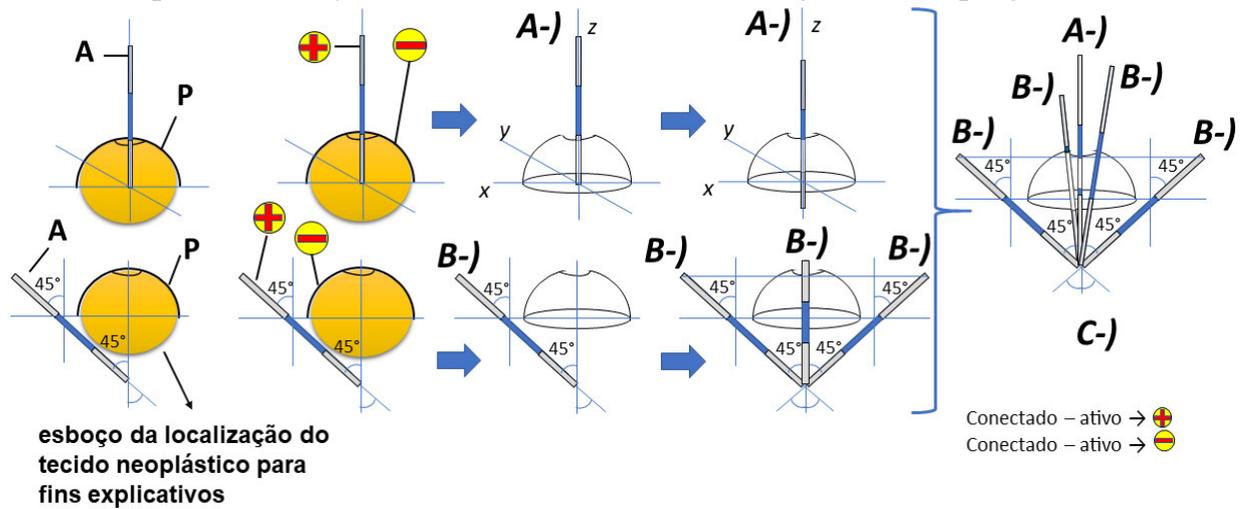
Figura 17- Protótipo de eletrodos para tratar tecidos doentes com protuberância externa.



Na Figura 18 são apresentados os modos “A-)” e “B-)” de utilização, e suas diversas combinações como o modo “C-”, o que resulta no tratamento com a aplicação de campo elétrico em direções distintas, para o tratamento da região abaixo de onde a calota semiesférica está apoiada.

A forma de aplicação recebeu influência de conceitos em termos das placas observados (IVORRA *et al.*, 2008) e (AGORAMURTHY; CAMPANA; SUNDARARAJAN, 2011), no que diz respeito as hastes (KOS *et al.*, 2010), (DENZI *et al.*, 2015) e (BONAKDAR *et al.*, 2015) e principalmente a respeito da distribuição de campo em (MAHNIČ-KALAMIZA; KOTNIK; MIKLAVČIČ, 2012) e (SUZUKI *et al.*, 2018).

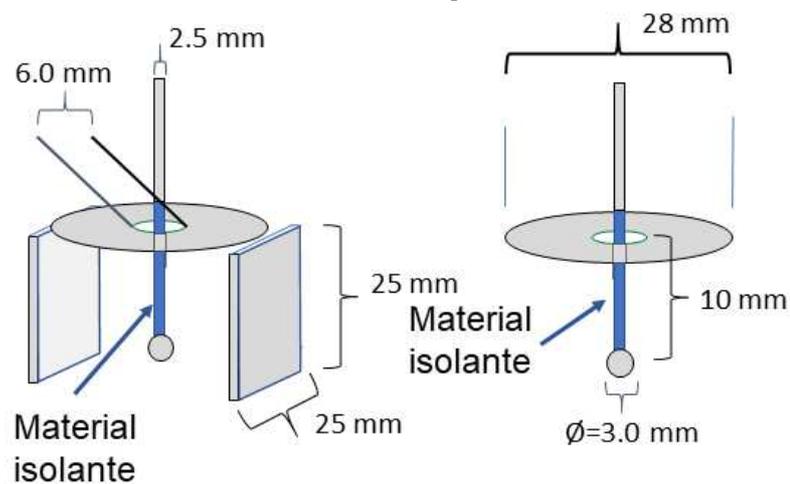
Figura 18 – Utilização do eletrodo com a finalidade de contemplar a maior região possível.



4.1.3 Eletrodo de placa em forma de disco com haste isolada e extremidade esférica condutora

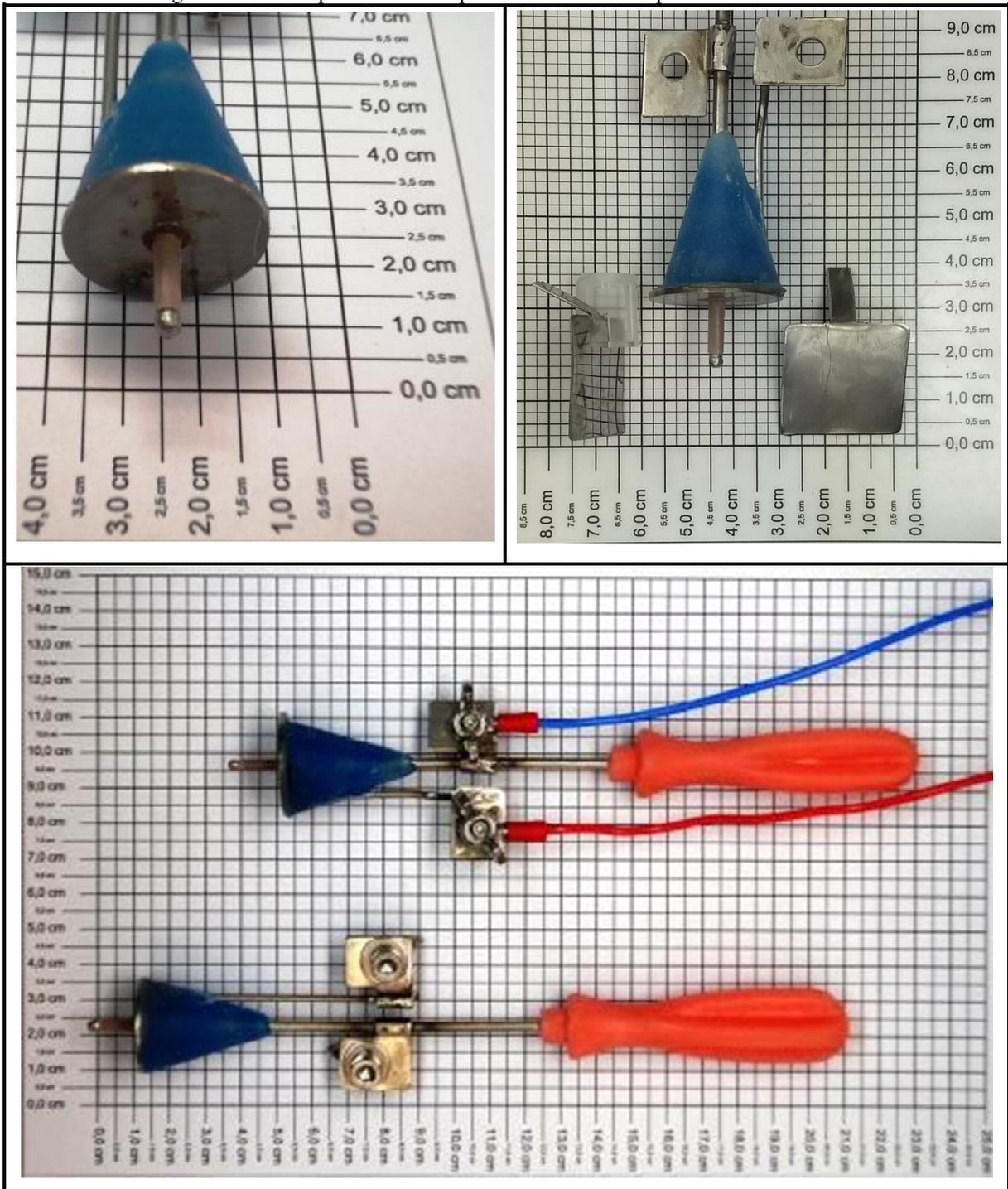
Este eletrodo é adequado no tratamento de regiões côncavas a partir da superfície mais externa, onde a extremidade do polo central é esférica. O eletrodo tem seus polos dimensionados como na Figura 19.

Figura 19 - Eletrodo de chapa em forma de disco com haste isolada com extremidade esférica condutora - dimensões dos polos.



O eletrodo de placa, Figura 20, tem seu uso plausível em tecidos neoplásicos localizados em cavidades, por exemplo, na base de alvéolos dentários ou em tecido pulmonar, este que não permite perfuração.

Figura 20 - Protótipo de eletrodos para tratar tecidos neoplásicos em cavidades.

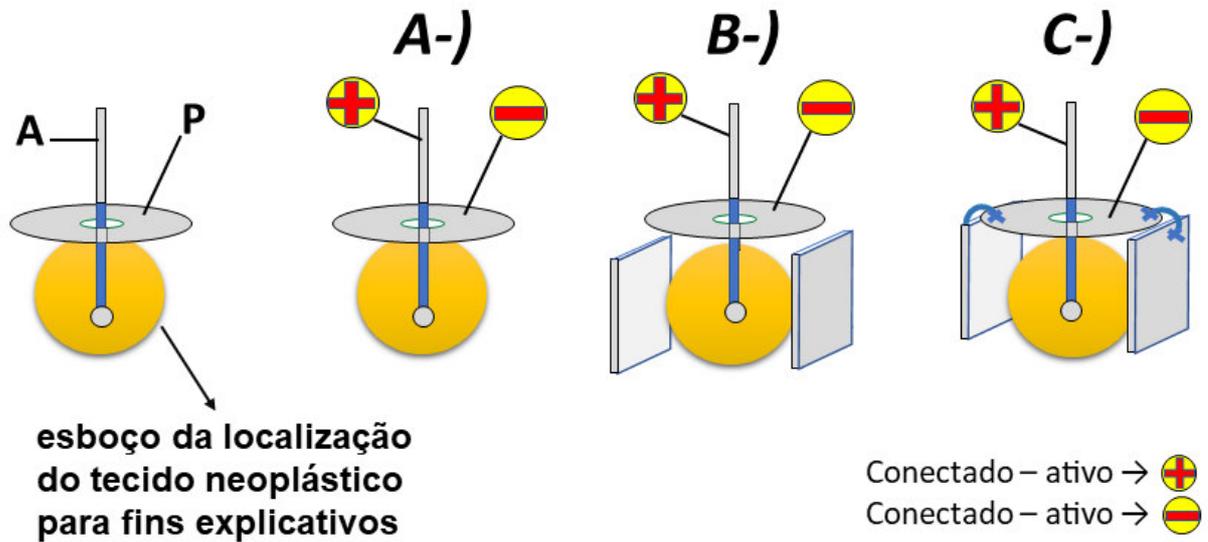


Na Figura 21 são apresentados os modos “A-), “B-)” e “C-)” de utilização para o eletrodo.

A forma de aplicação recebeu influência de conceitos em termos das placas circular observados (IVORRA *et al.*, 2008) e (MAZÈRES *et al.*, 2009), no que concerne as hastes (NEAL *et al.*, 2010), (MAGLIETTI *et al.*, 2017) e (CAMPANA *et al.*, 2019b), placas laterais

(SODEN *et al.*, 2006), (ČOROVIĆ *et al.*, 2008), (ŽUPANIČ; ČOROVIĆ; MIKLAVČIČ, 2008), (AGORAMURTHY; CAMPANA; SUNDARARAJAN, 2011), (DERMOL; MIKLAVČIČ, 2015) e (HOULIHAN *et al.*, 2017), e principalmente a respeito da distribuição de campo em (BOMMAKANTI *et al.*, 2011), (MAHNIČ-KALAMIZA; KOTNIK; MIKLAVČIČ, 2012), (NICKFARJAM; FIROOZABADI, 2014), (LEKNER, 2014) e (CAMPANA *et al.*, 2019a).

Figura 21 – Modos de utilização previstos para o eletrodo em forma de disco e eletrodo central dotado de polo central no formato esférico.



4.2 SEQUÊNCIA DE EXPERIMENTOS

A sequência dos experimentos é apresentada na ordem da Figura 22.

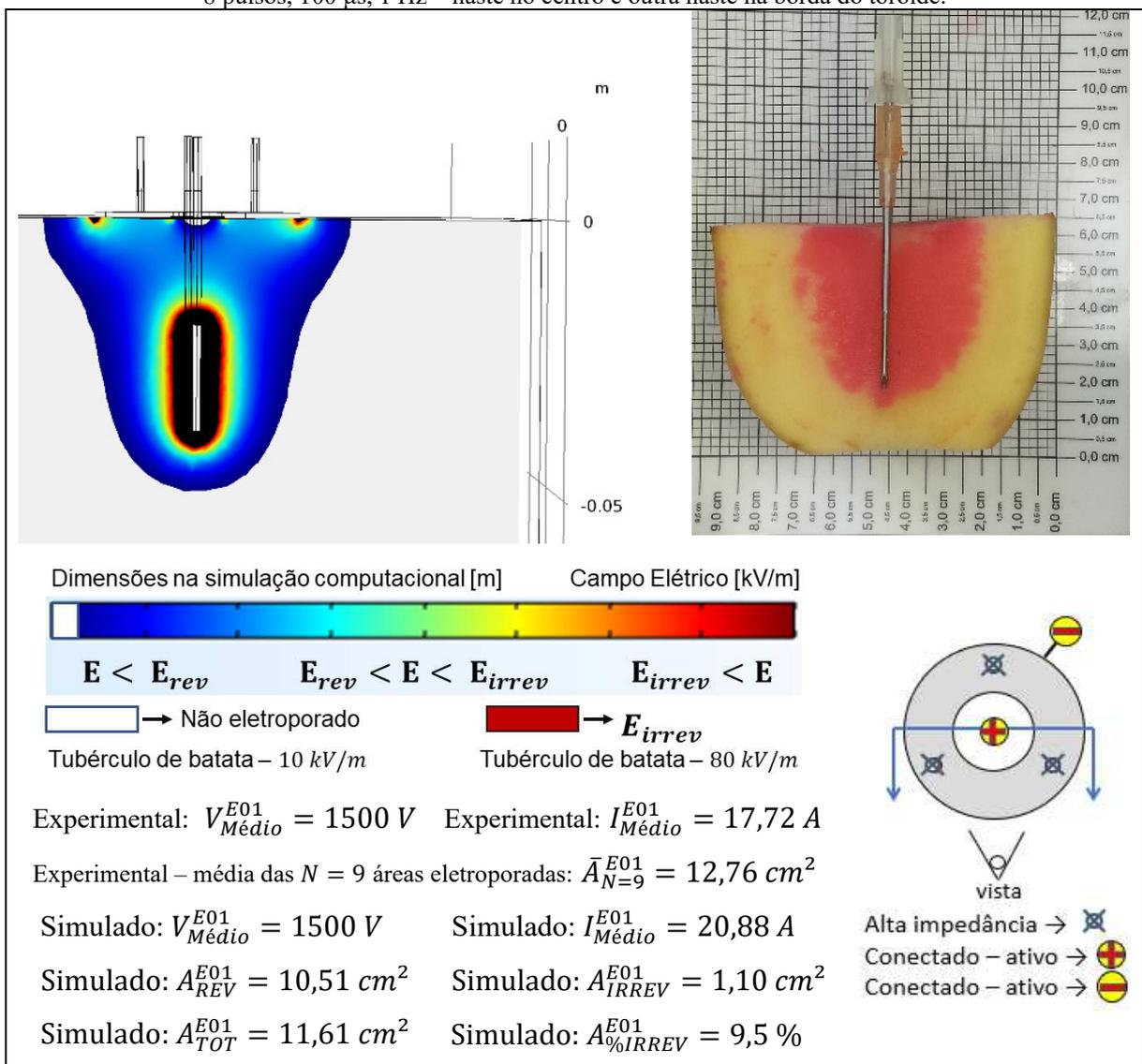
Figura 22 – Sequência definida para os experimentos e seus respectivos conjuntos de ensaios.

	<p>Experimento 01 - Pulsos entre toróide e haste central Ensaio C01 – 1500 V; experimental e simulado das correntes elétricas (tuberculo); Ensaio A01 – 1500 V; experimental e simulado das áreas (tuberculo); Ensaio 01T – 3000 V; Simulação das áreas e correntes (tecido animal).</p>
	<p>Experimento 02 - Pulsos entre haste central e haste da borda Ensaio C02 – 1500 V; experimental e simulado das correntes elétricas (tuberculo); Ensaio A02 – 1500 V; experimental e simulado das áreas (tuberculo); Ensaio 02T – 3000 V; Simulação das áreas e correntes (tecido animal).</p>
	<p>Experimento 03 - Pulsos entre um par de hastes na borda do toróide Ensaio C03 – 1500 V; experimental e simulado das correntes elétricas (tuberculo); Ensaio A03 – 1500 V; experimental e simulado das áreas (tuberculo); Ensaio 03T – 3000 V; Simulação das áreas e correntes (tecido animal).</p>
	<p>Experimento 04 - Pulsos entre calota e haste central vertical Ensaio C04 – 1500 V; experimental e simulado das correntes elétricas (tuberculo); Ensaio A04 – 1500 V; experimental e simulado das áreas (tuberculo); Ensaio 04T – 3000 V; Simulação das áreas e correntes (tecido animal).</p>
	<p>Experimento 05 - Pulsos entre calota e haste lateral inclinada Ensaio C05 – 1500 V; experimental e simulado das correntes elétricas (tuberculo); Ensaio A05 – 1500 V; experimental e simulado das áreas (tuberculo); Ensaio 05T – 3000 V; Simulação das áreas e correntes (tecido animal).</p>
	<p>Experimento 06 - Pulsos entre placa circular e esfera, sem placas laterais Ensaio C06 – 1200 V; experimental e simulado das correntes elétricas (tuberculo); Ensaio A06 – 1200 V; experimental e simulado das áreas (tuberculo); Ensaio 06T – 2700 V; Simulação das áreas e correntes (tecido animal).</p>
	<p>Experimento 07 - Pulsos entre placa circular e esfera, e placas laterais desconectadas Ensaio C07 – 1200 V; experimental e simulado das correntes elétricas (tuberculo); Ensaio A07 – 1200 V; experimental e simulado das áreas (tuberculo); Ensaio 07T – 2700 V; Simulação das áreas e correntes (tecido animal).</p>
	<p>Experimento 08 - Pulsos entre placa circular e esfera, e placas laterais conectadas Ensaio C08 – 1200 V; experimental e simulado das correntes elétricas (tuberculo); Ensaio A08 – 1200 V; experimental e simulado das áreas (tuberculo); Ensaio 08T – 2700 V; Simulação das áreas e correntes (tecido animal).</p>

4.2.1 Experimento 01

A Figura 23 concentra as informações obtidas no experimento 01. É possível observar o uso do eletrodo e o resultado visual da simulação em uma das amostras de *Solanum tuberosum* cuja região eletroporada apresenta a coloração vermelha. Os resultados quantitativos a respeito das correntes elétricas e das áreas são apresentados.

Figura 23 - Experimento 01– Simulação computacional e amostra experimental – *Solanum tuberosum*: ESOPe: 8 pulsos, 100 μ s, 1 Hz – haste no centro e outra haste na borda do toróide.

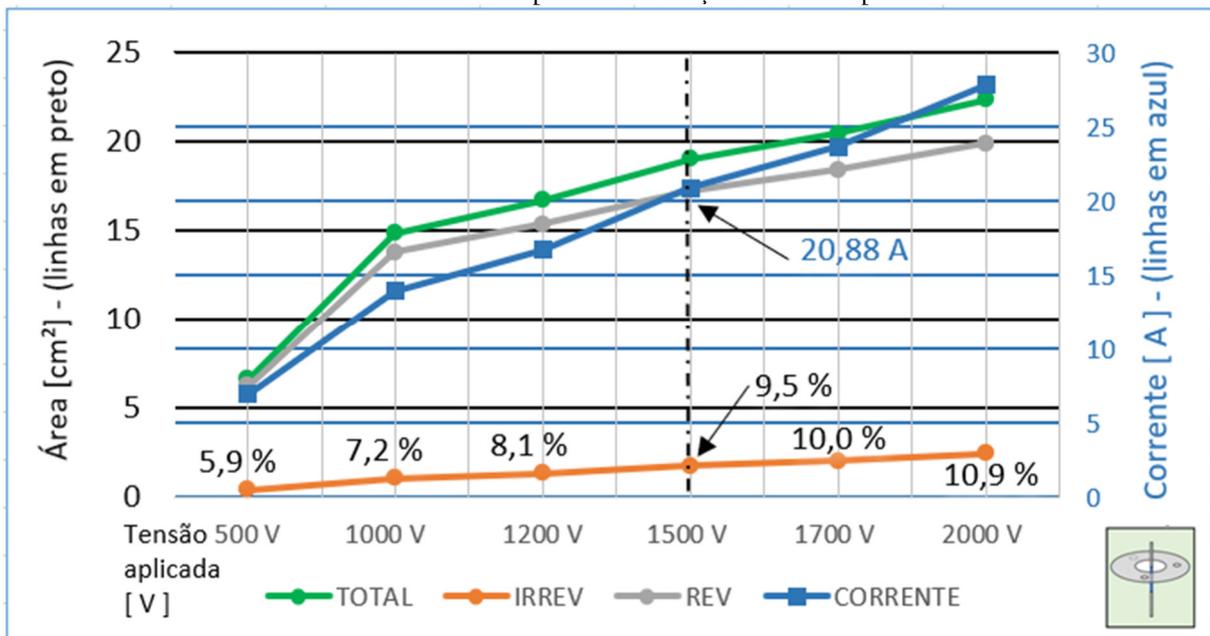


No experimento 01 são utilizados pulsos bipolares de 1500 V. As áreas de eletroporação reversível, irreversível e o total eletroporado são $A_{REV}^{E01} = 10,51 cm^2$, $A_{IRREV}^{E01} = 1,10 cm^2$, $A_{TOT}^{E01} = 11,61 cm^2$, respectivamente. Assim, a percentagem de área

eletroporação irreversível é de $A_{\%IRREV}^{E01} = 9,5\%$ da área total eletroporada. As tensões e correntes experimentais são, $V_{Médio}^{E01} = 1500\text{ V}$ e $I_{Médio}^{E01} = 17,72\text{ A}$, respectivamente. A corrente $I_{Médio}^{E01}$ representada pela média das correntes das nove amostras do experimento. As áreas A_{REV}^{E01} , A_{IRREV}^{E01} , A_{TOT}^{E01} foram obtidas das simulações computacionais. Os pulsos bipolares aplicados nos ensaios laboratoriais são semelhantes ao verificado no APÊNDICE H. Os campos elétricos podem ser observados no corte do volume simulado, segundo a magnitude, representada por cores com o respaldo da legenda.

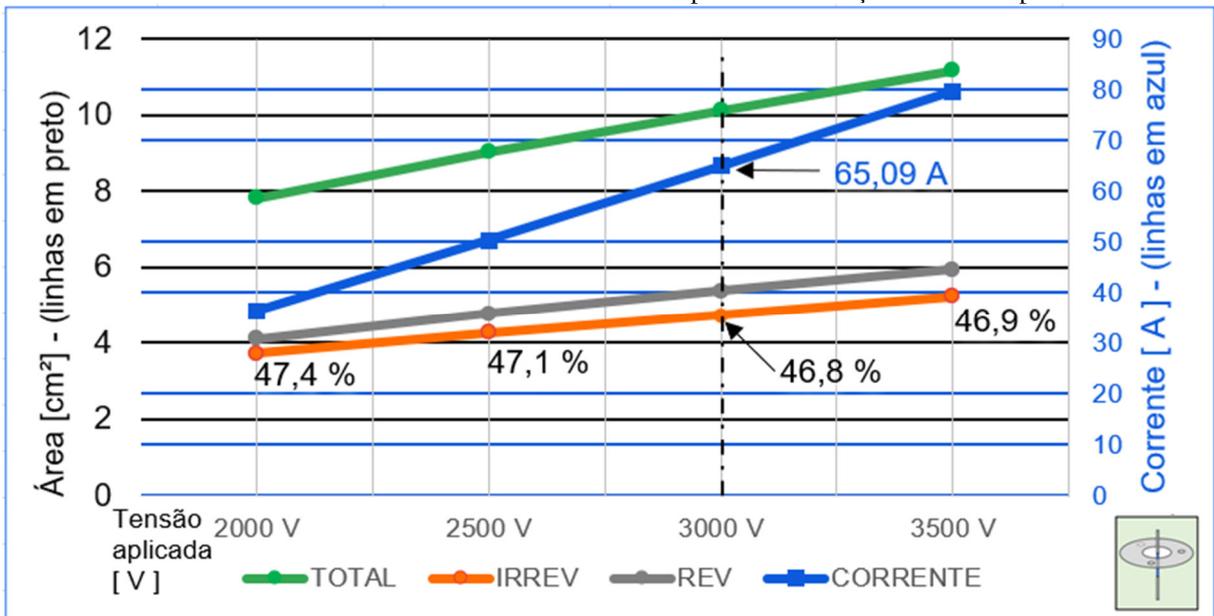
A Figura 24 representa os ensaios simulados com os passos de tensão elétrica adequados aos parâmetros do tubérculo de batata. Em analogia ao experimento laboratorial, é apresentada a corrente elétrica na tensão do ensaio para a formação da área eletroporada total, proveniente da soma das regiões eletroporadas reversível e irreversivelmente.

Figura 24 – Experimento 01 – pulsos entre toróide e haste central – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas em função da tensão aplicada.



De maneira análoga, a Figura 25 apresenta os ensaios simulados da evolução de resultados de acordo com o incremento da tensão elétrica. São apresentados resultados simulados para o tecido animal, com o parâmetro de condutividade elétrica correspondente ao tumor, Tabela 1.

Figura 25 – Experimento 01T – tecido animal - pulsos entre toróide e haste central – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas em função da tensão aplicada.

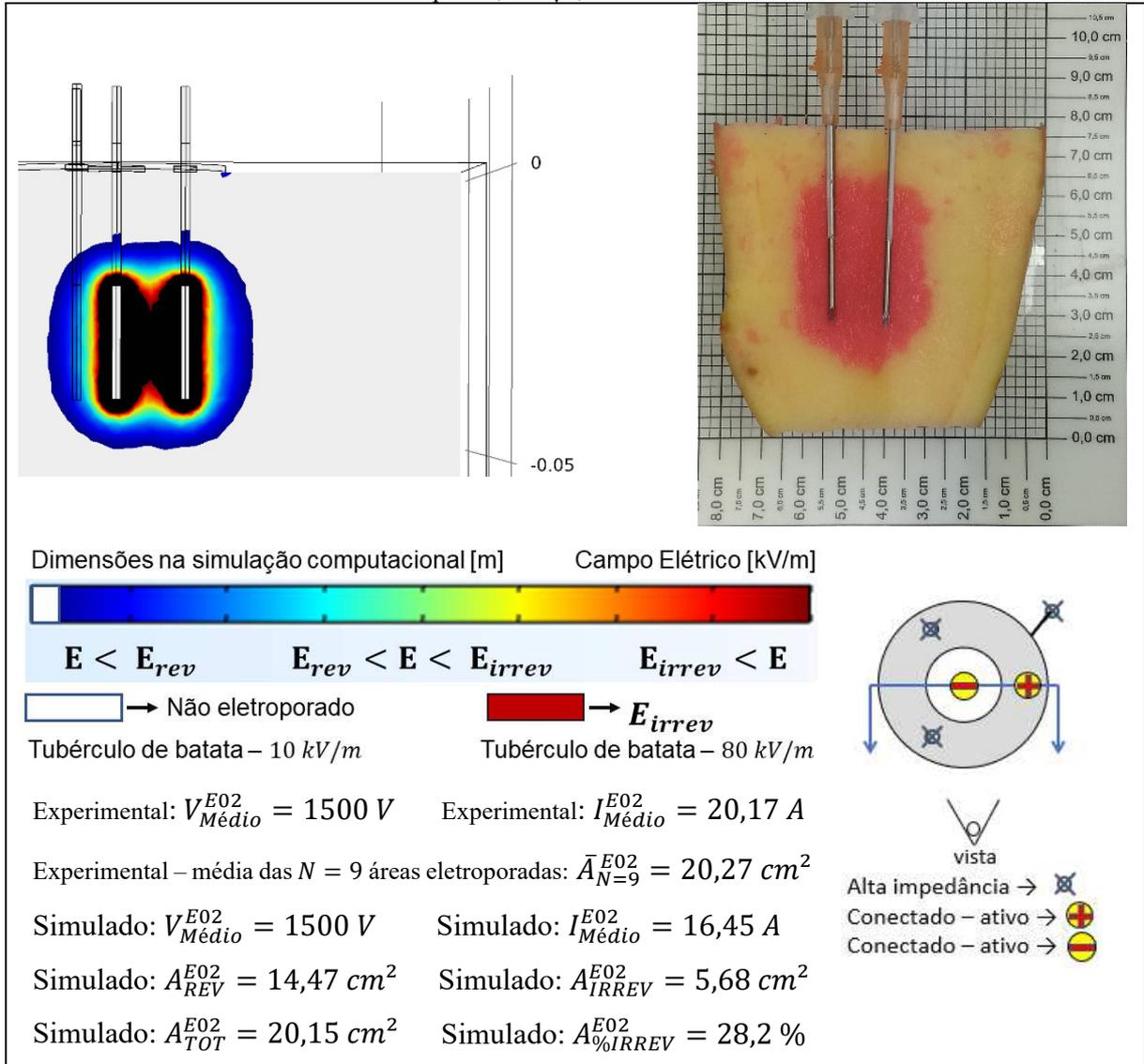


Para citar os casos similares a apresentação deste primeiro experimento, a seguir, são apresentados os sete experimentos restantes, de entendimento análogo a este primeiro. Assim, as explicações serão concentradas apenas nos termos específicos.

4.2.2 Experimento 02

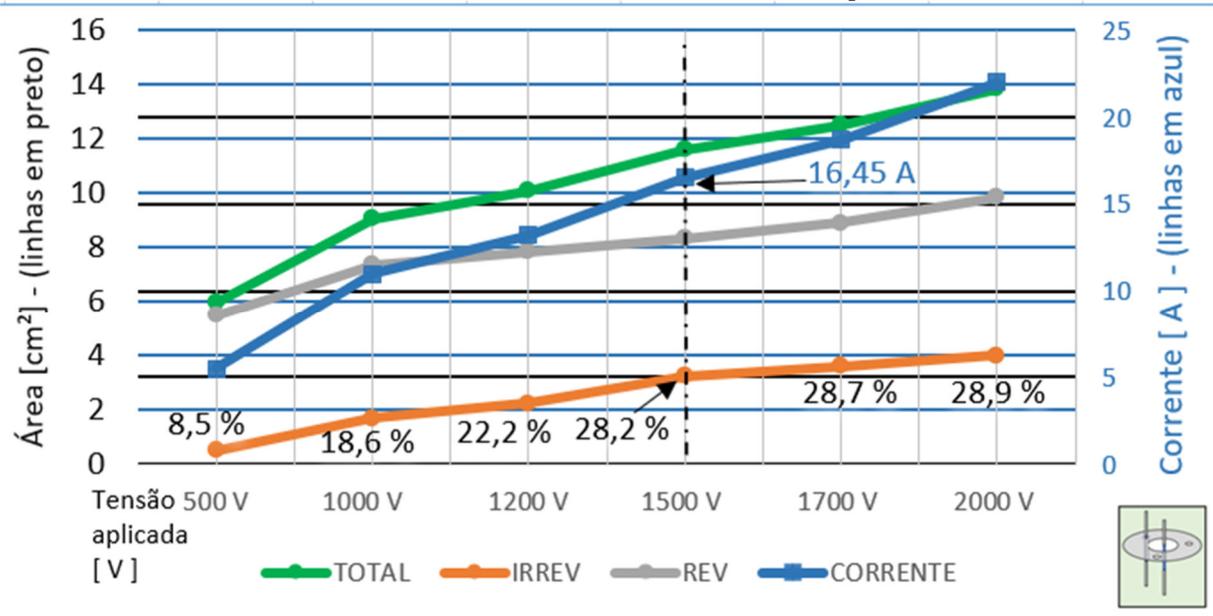
A Figura 26 concentra as informações obtidas no experimento 02. É possível observar o uso do eletrodo e o resultado visual da simulação em uma das amostras de *Solanum tuberosum*, cuja região eletroporada apresenta a coloração vermelha.

Figura 26 – Experimento 02 – pulsos de 1,5 kV – simulação computacional e na amostra experimental – *Solanum tuberosum*: ESOPE: 8 pulsos, 100 μ s, 1 Hz – haste no centro e na borda do toróide.



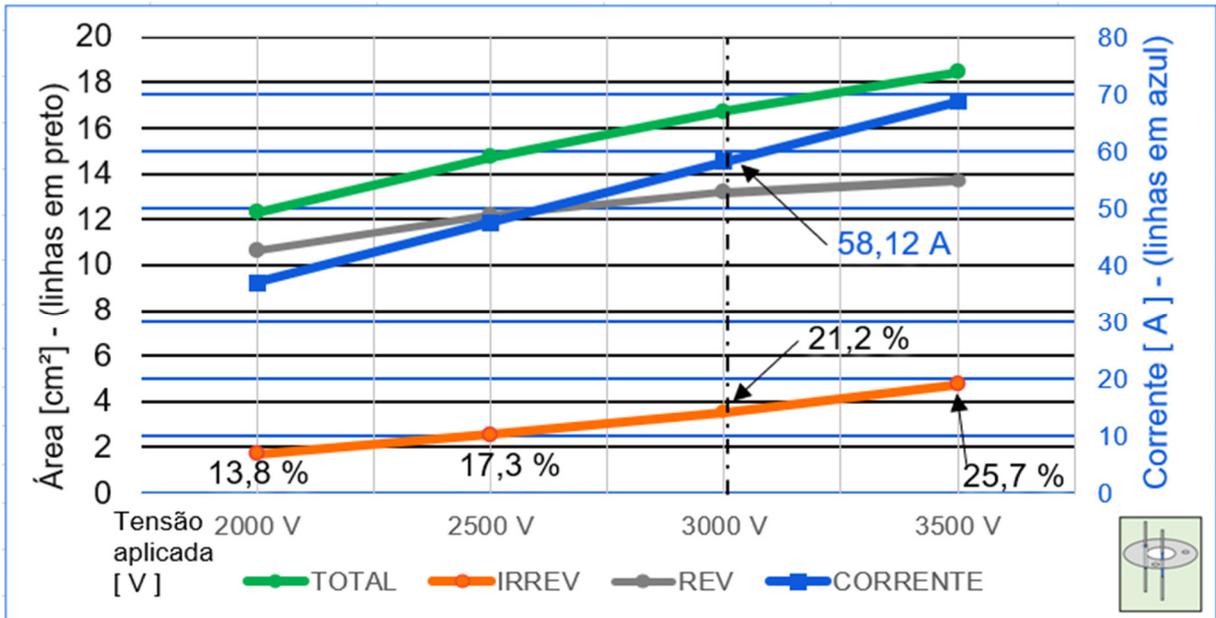
Em analogia ao experimento laboratorial, a Figura 27 representa os ensaios simulados com os passos de tensão elétrica adequados aos parâmetros de *Solanum tuberosum*.

Figura 27 – Experimento 02 – pulsos entre a haste no centro e uma haste na borda do toróide – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.



De forma análoga, a Figura 28 apresenta os ensaios simulados sobre a evolução dos resultados de acordo com o incremento de tensão elétrica. São apresentados resultados simulados para o tecido animal, com o parâmetro de condutividade elétrica correspondente ao tumor, Tabela 1.

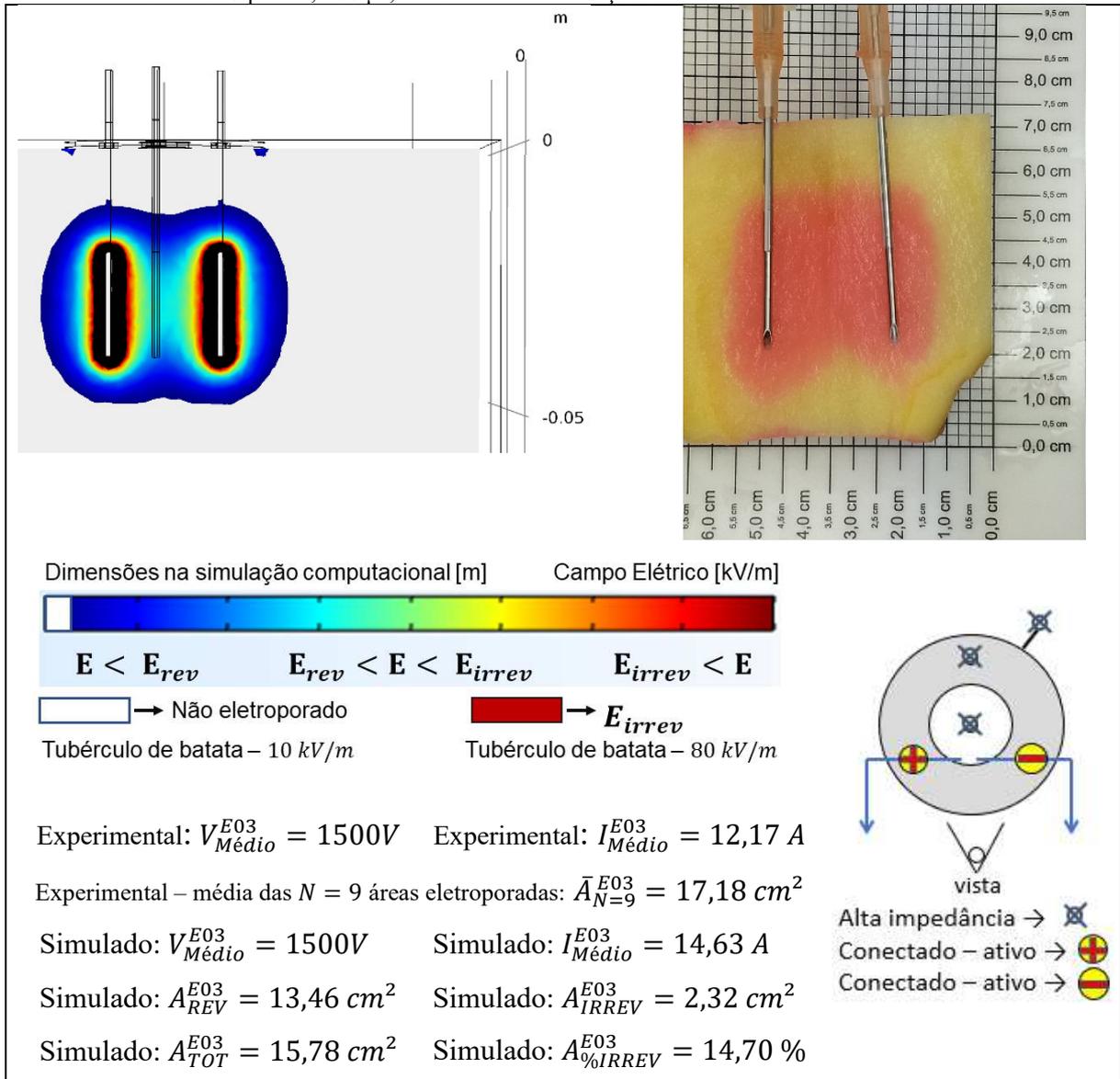
Figura 28 - Experimento 02T – tecido animal – pulsos entre a haste no centro e uma haste na borda do toroide – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.



4.2.3 Experimento 03

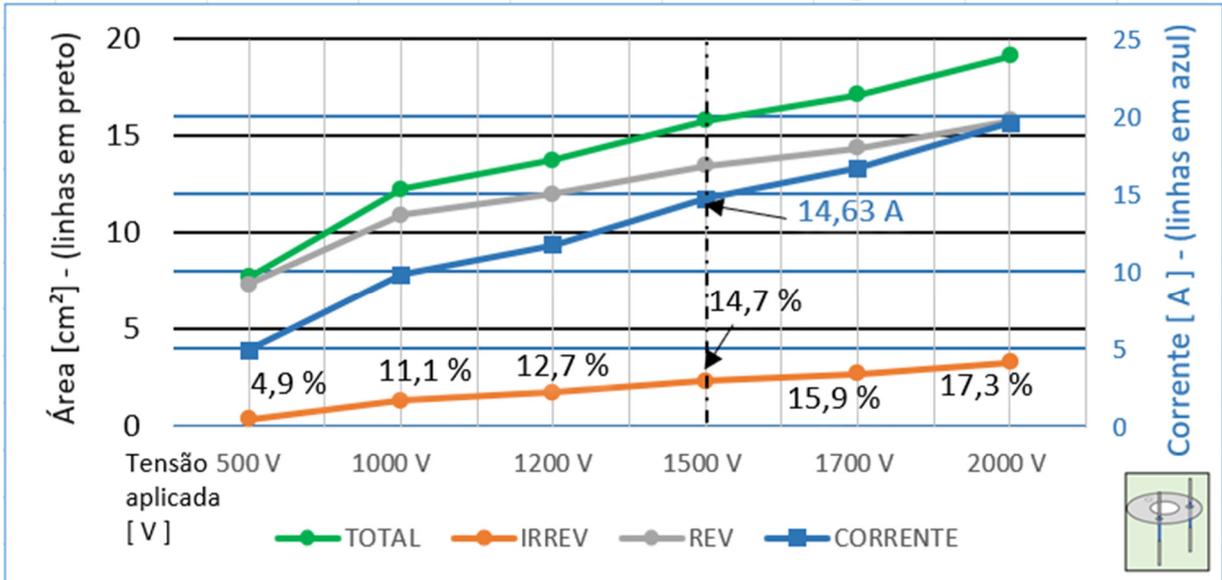
A Figura 29 concentra as informações obtidas no experimento 03. É possível observar o uso do eletrodo e o resultado visual da simulação em uma das amostras de *Solanum tuberosum*, cuja região eletroporada apresenta a coloração vermelha.

Figura 29 – Experimento 03 – Simulação computacional e na amostra experimental – *Solanum tuberosum*: ESOPE: 8 pulsos, 100 μ s, 1 Hz – haste em furações consecutivas na borda do toróide.



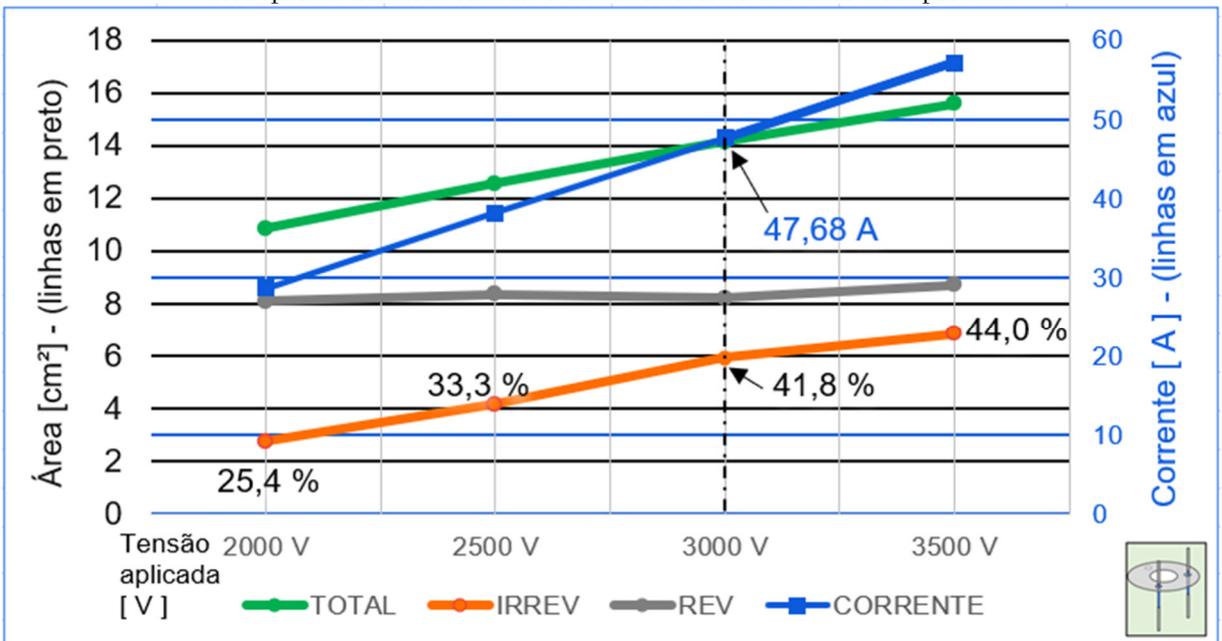
Na Figura 30, o gráfico apresenta dados do experimento 03 em simulação do modelo computacional para pulsos retangulares de 1500 V. Neste experimento a região eletroporada está abaixo de 15% da região total tratada. Este número é considerado adequado, desde que a região de eletroporação irreversível não afete estruturas consideradas vitais.

Figura 30 – Experimento 03 – pulsos em um par de hastas nas bordas do toróide – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.



A Figura 31 apresenta os ensaios simulados sobre a evolução dos resultados de acordo com o incremento de tensão elétrica. São apresentados resultados simulados para o tecido animal, com o parâmetro de condutividade elétrica correspondente ao tumor, Tabela 1.

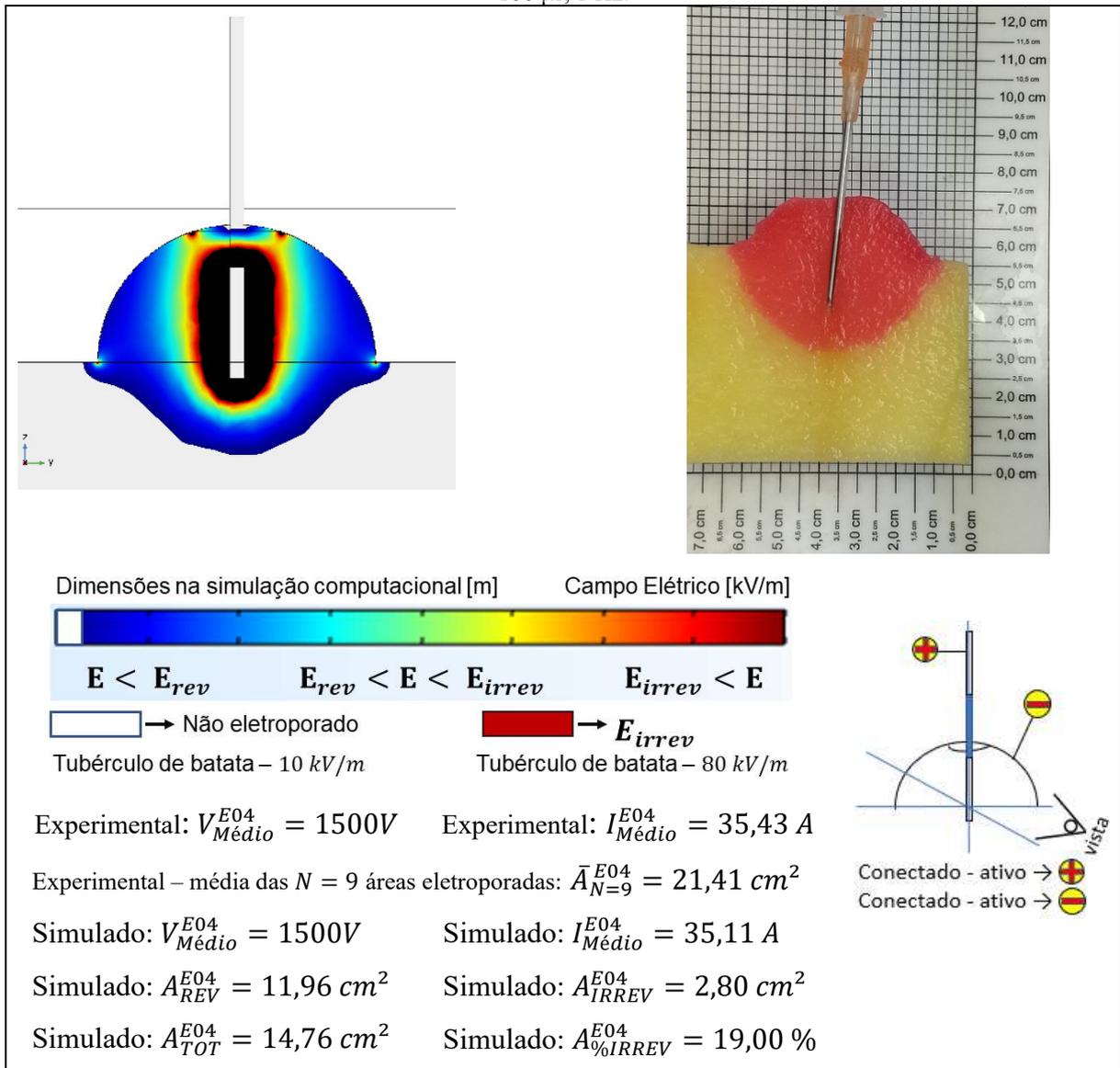
Figura 31 - Experimento 03T – tecido animal – pulsos em um par de hastas nas bordas do toróide – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.



4.2.4 Experimento 04

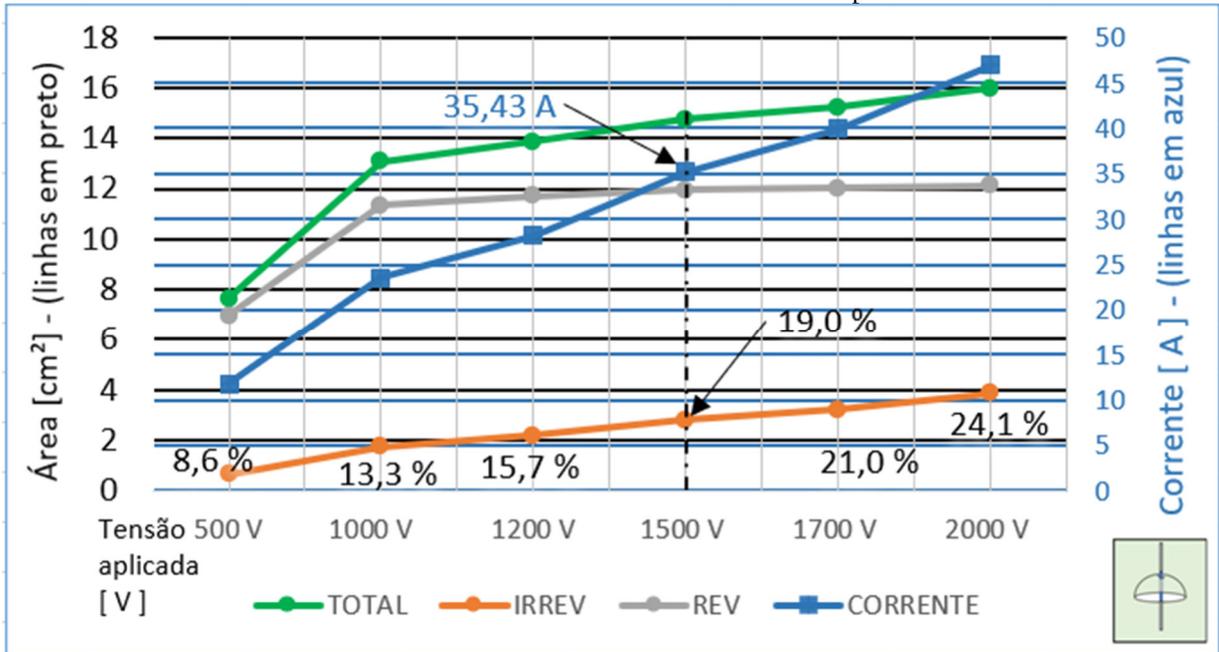
A Figura 32 concentra as informações obtidas no experimento 04. É possível observar o uso do eletrodo e o resultado visual da simulação em uma das amostras de *Solanum tuberosum* cuja região eletroporada apresenta a coloração vermelha.

Figura 32 – Simulação computacional e na amostra experimental – *Solanum tuberosum*: ESOPE: 8 pulsos, 100 μ s, 1 Hz.



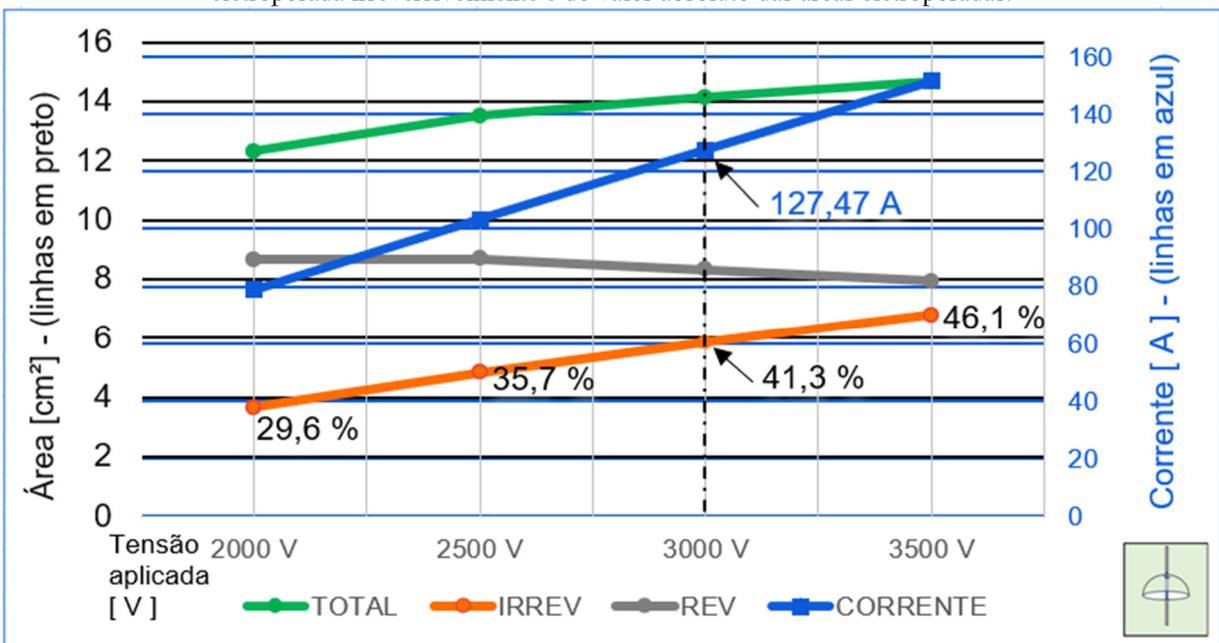
Na Figura 33, foi realizada a comparação dos valores das correntes elétricas e das áreas obtidas tanto na simulação quanto na etapa experimental.

Figura 33 – Experimento 04 – pulsos entre a calota e haste vertical no topo da calota – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.



Na Figura 34, é apresentada a sequência referente a um pulso bipolar de tensão e a respectiva corrente.

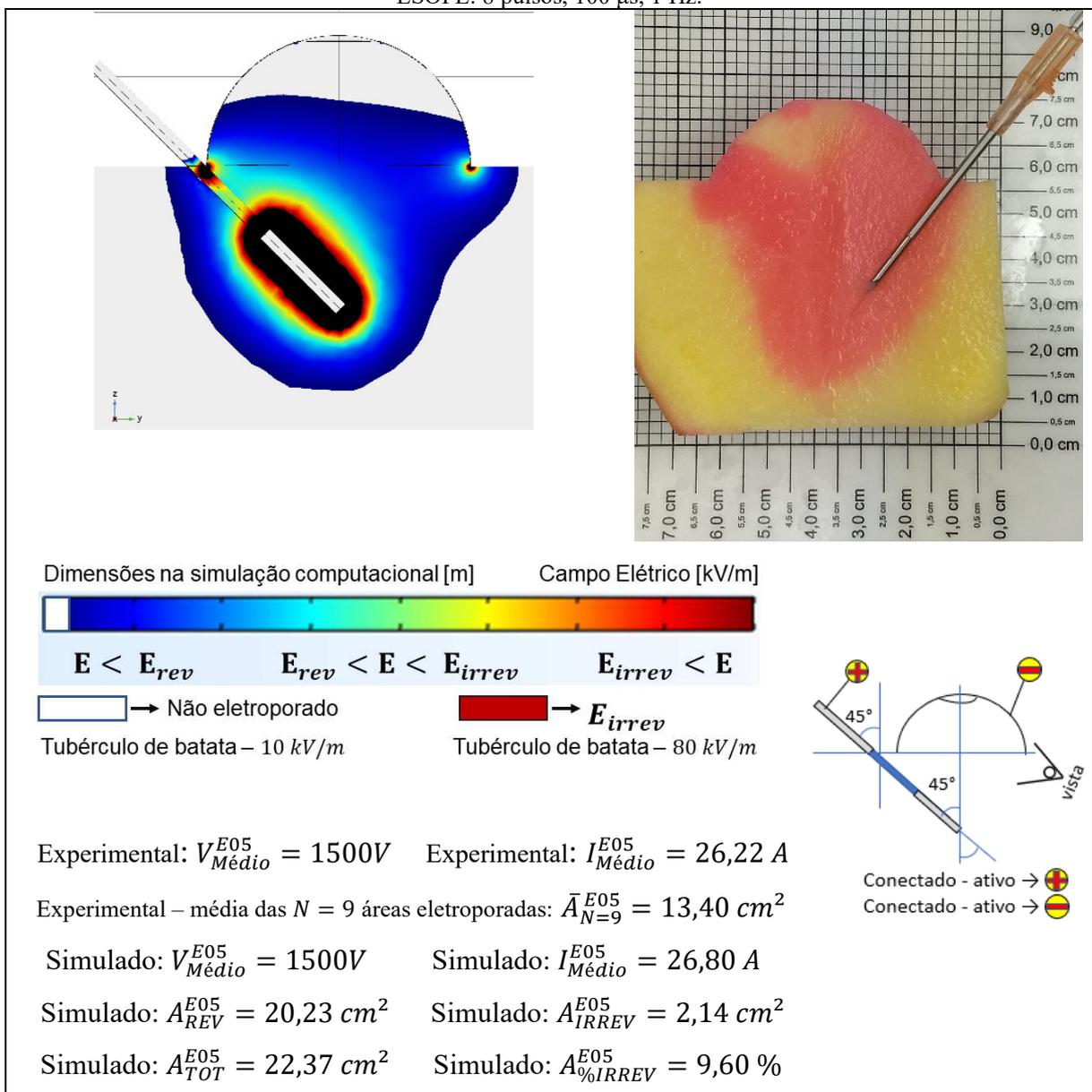
Figura 34 - Experimento 04T – tecido animal – pulsos entre a calota e haste vertical no topo da calota – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.



4.2.5 Experimento 05

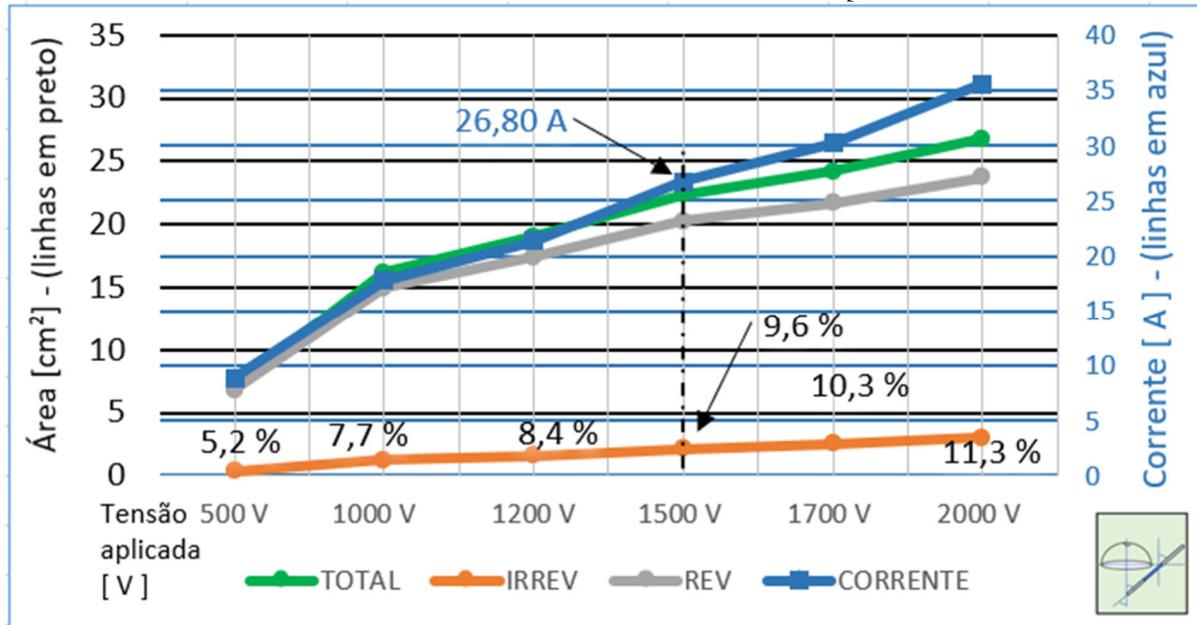
A Figura 35 concentra as informações obtidas no experimento 05. É possível observar o uso do eletrodo e o resultado visual da simulação em uma das amostras de *Solanum tuberosum* cuja região eletroporada apresenta a coloração vermelha.

Figura 35 – Experimento 05 – Simulação computacional e na amostra experimental – *Solanum tuberosum*:
ESOPE: 8 pulsos, 100 μ s, 1 Hz.



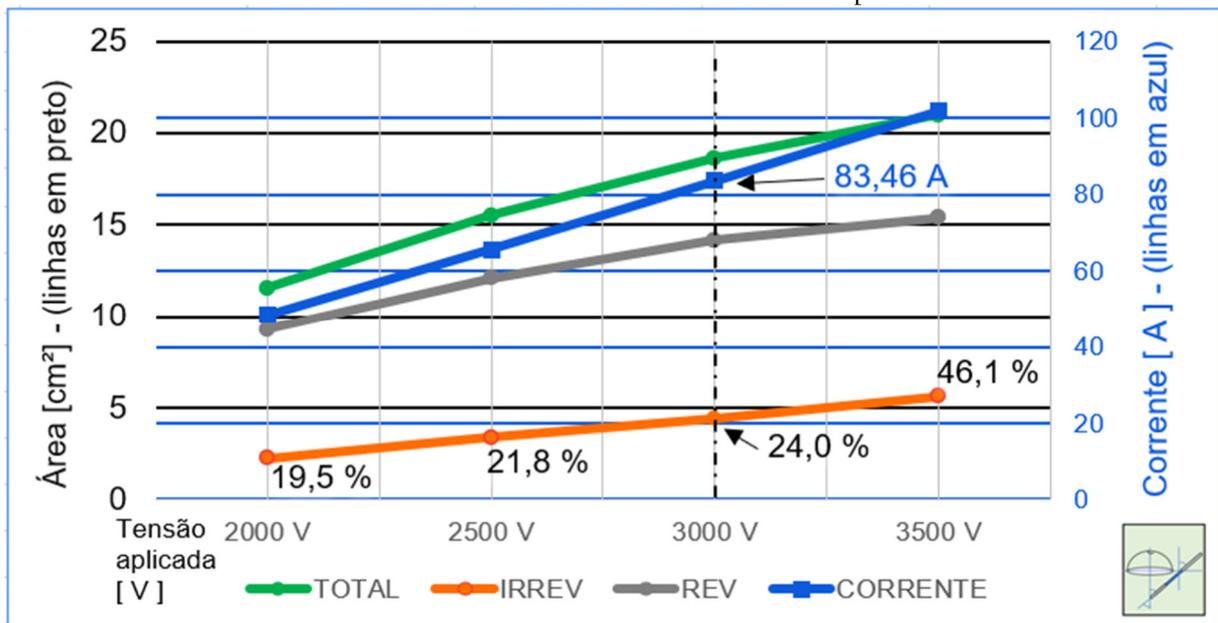
Na Figura 36, foi realizada a comparação entre os valores das correntes elétricas e das áreas obtidas na simulação e na etapa experimental.

Figura 36 – Experimento 05 – pulsos entre a calota e haste lateral inclinada – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.



Na Figura 37, é apresentada a sequência referente a um pulso bipolar de tensão e a respectiva corrente.

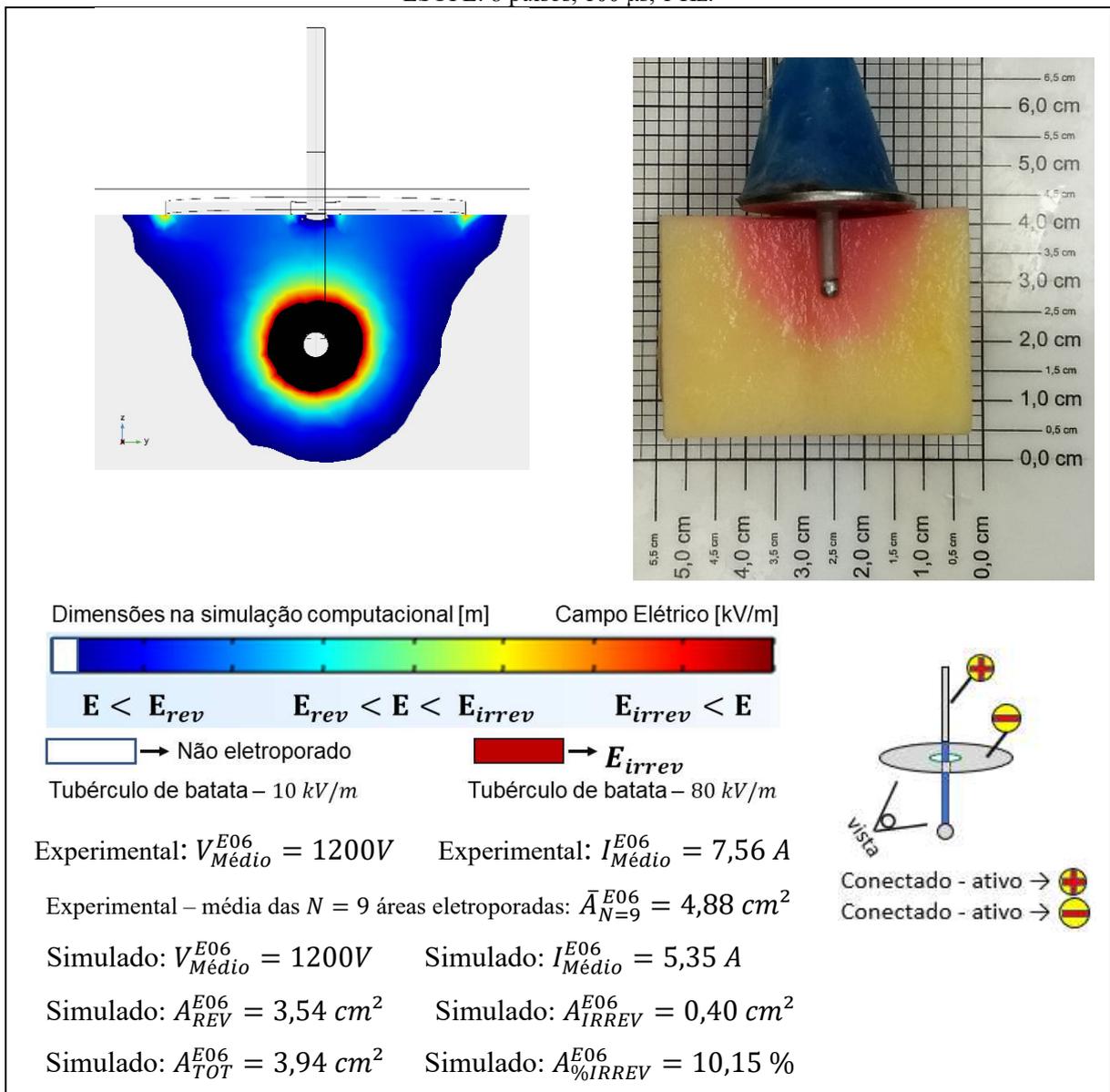
Figura 37 - Experimento 05T – tecido animal - pulsos entre a calota e haste lateral inclinada – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.



4.2.6 Experimento 06

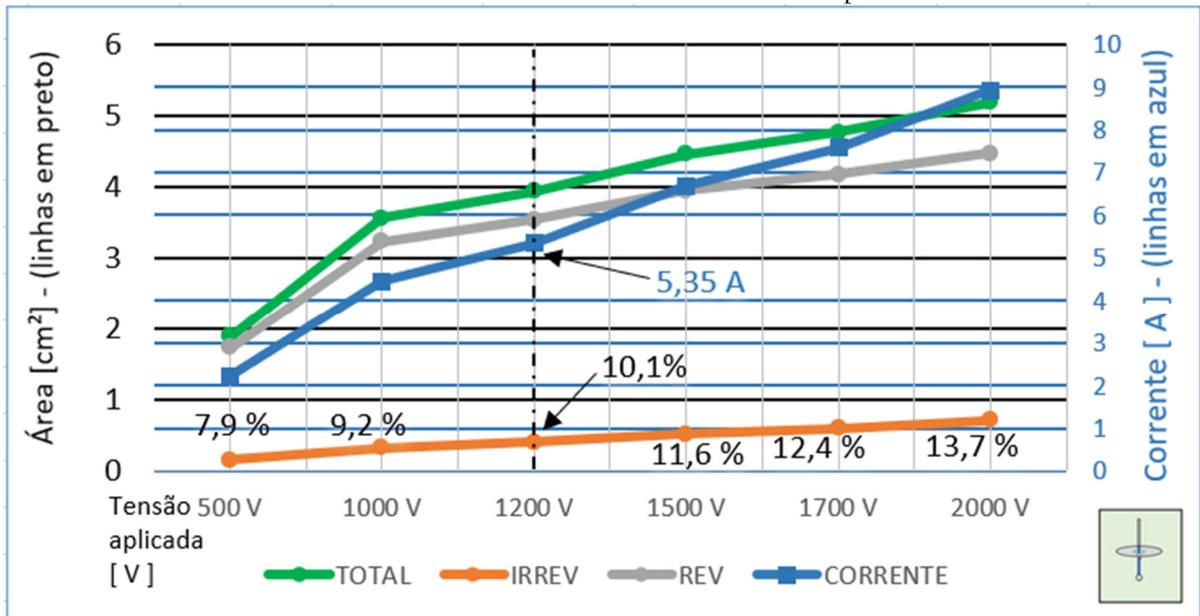
A Figura 38 concentra as informações obtidas no experimento 06. É possível observar o uso do eletrodo específico e o resultado visual da simulação em uma das amostras de *Solanum tuberosum*, cuja região eletroporada apresenta a coloração vermelha.

Figura 38 – Experimento 06 – Simulação computacional e na amostra experimental – *Solanum tuberosum* – ESOPE: 8 pulsos, 100 μ s, 1 Hz.



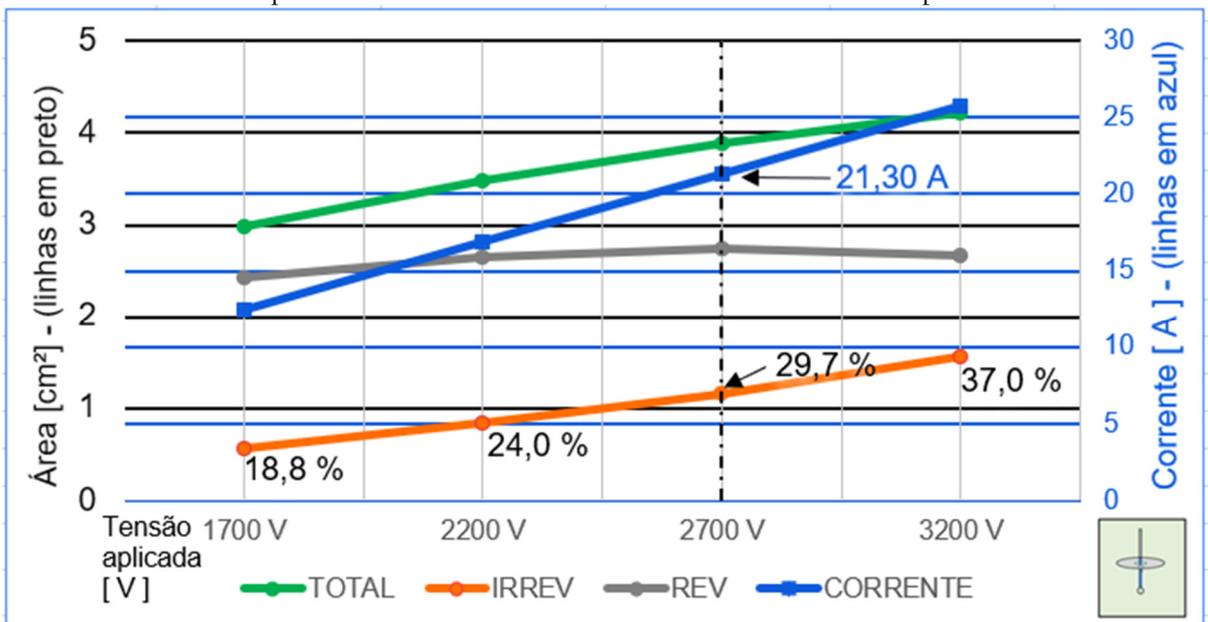
Na Figura 39, foi realizada a comparação entre os valores das correntes elétricas e entre as áreas obtidas na simulação e na etapa experimental.

Figura 39 – Experimento 06 – pulsos entre placa circular e esfera, sem placas laterais – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.



Na Figura 40, é apresentada a sequência referente a um pulso bipolar de tensão e a respectiva corrente.

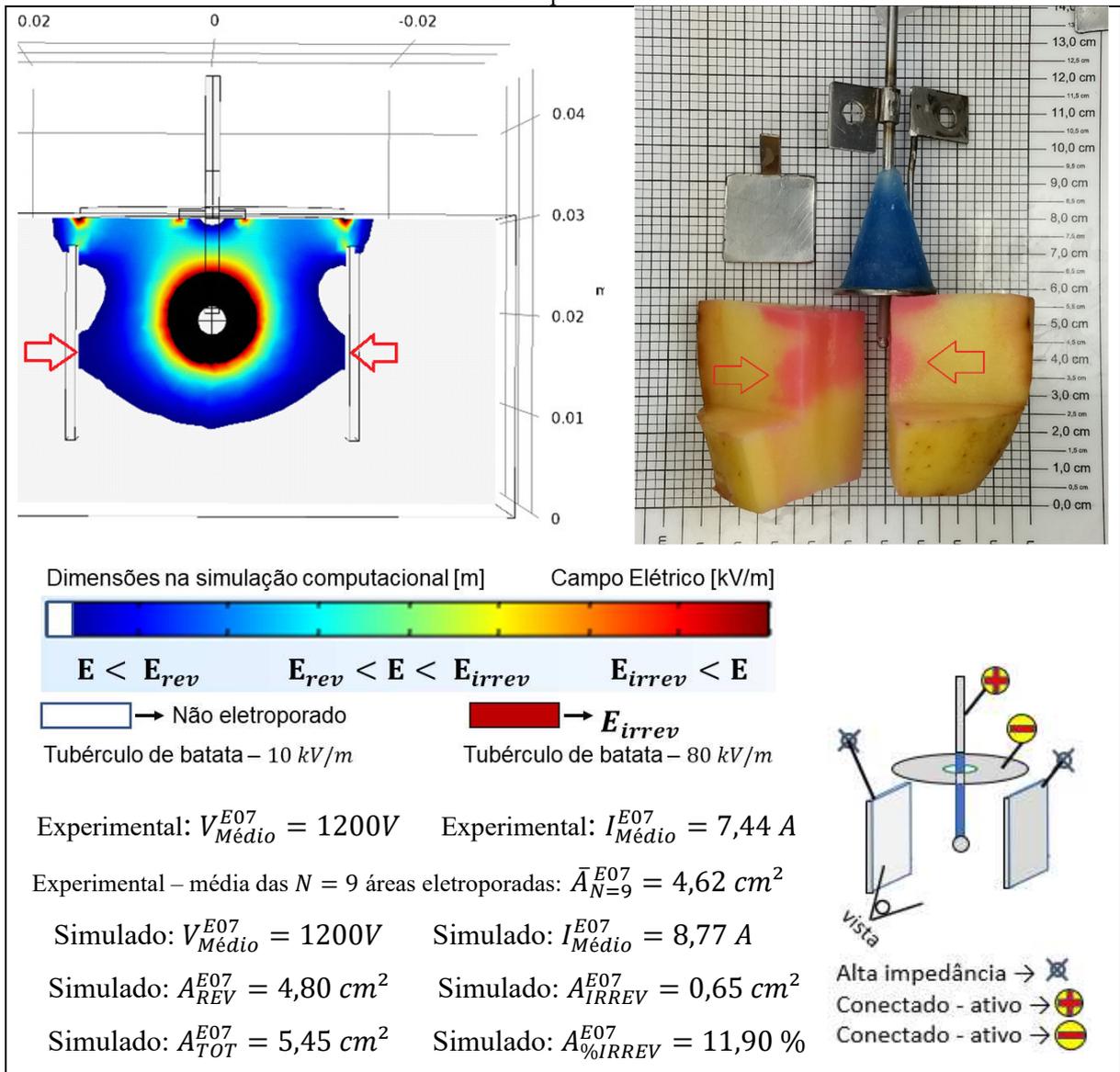
Figura 40 - Experimento 06T – tecido animal - pulsos entre placa circular e esfera, sem placas laterais – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.



4.2.7 Experimento 07

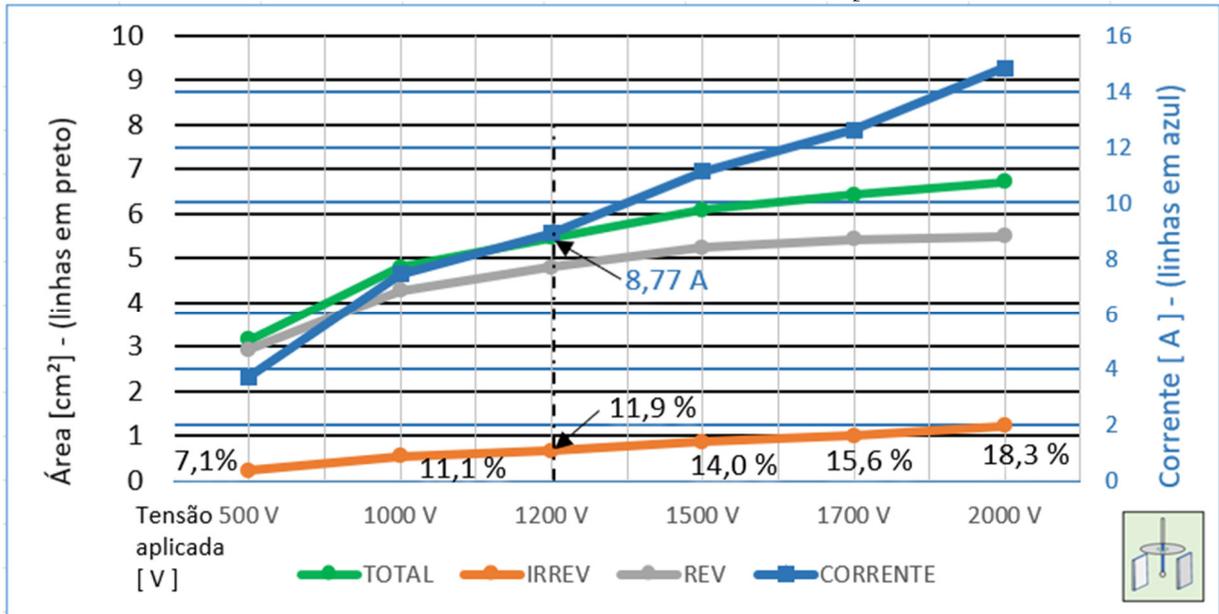
No experimento 07, Figura 41, as áreas experimentais e simuladas foram obtidas segundo o corte com vista frontal, ou seja, um corte ortogonal às placas inseridas nas laterais das amostras de *Solanum tuberosum*. É possível observar o uso do eletrodo e o resultado visual da simulação em uma das amostras cuja região eletroporada apresenta a coloração vermelha.

Figura 41 – Experimento 07 em visão frontal – Simulação computacional e na amostra experimental – *Solanum tuberosum* – ESOPe: 8 pulsos, 100 μ s, 1 Hz. As setas vermelhas indicam regiões de expansão de campo decorrente das placas condutoras, este efeito ocorre sem que as placas estejam conectadas ao pólo negativo do eletroporador.



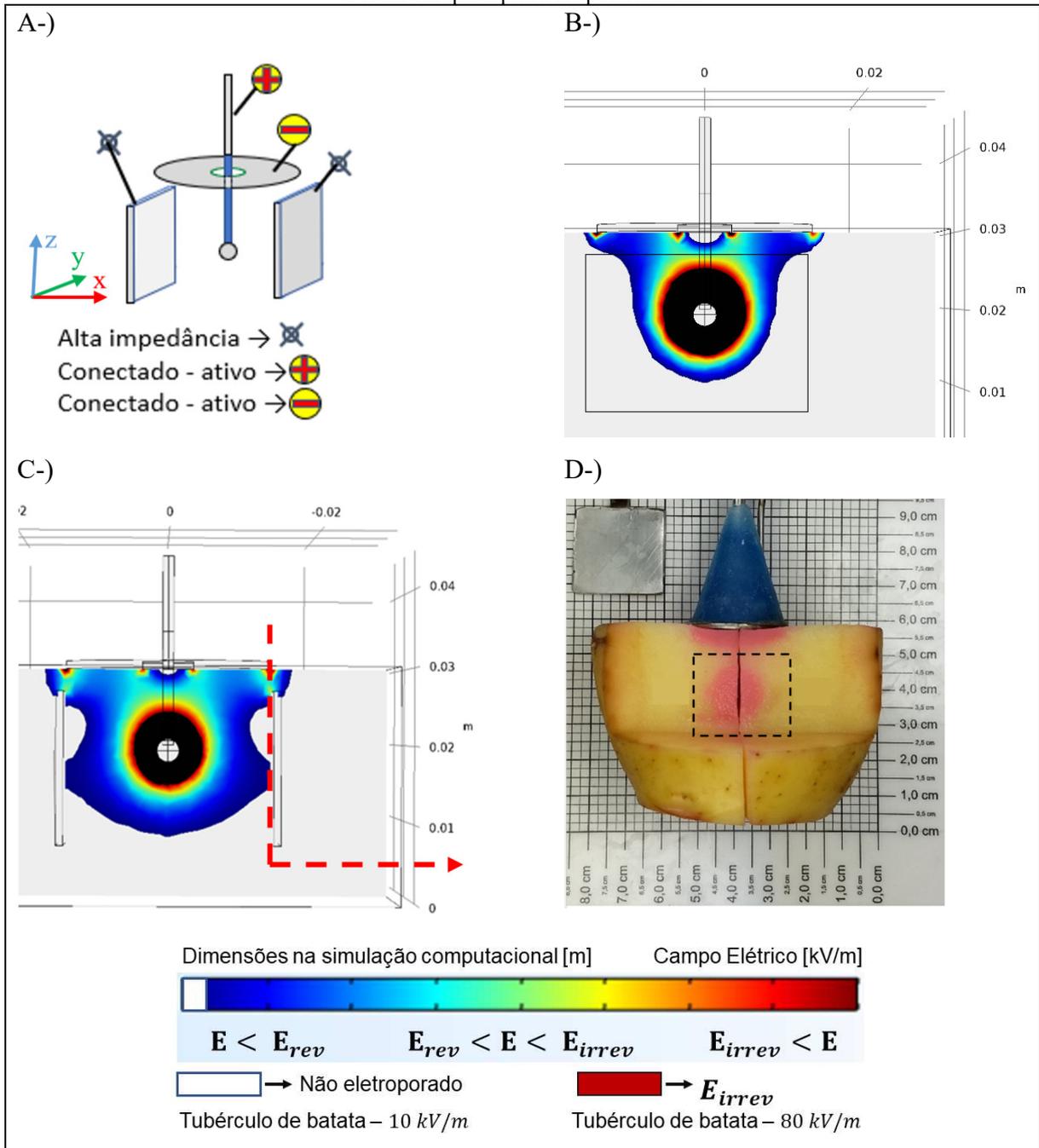
Na Figura 42, foi realizada a comparação dos valores das correntes elétricas e entre as áreas obtidas na simulação e na etapa experimental com *Solanum tuberosum*.

Figura 42 – Experimento 07 – pulsos entre placa circular e esfera, e placas laterais desconectadas – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.



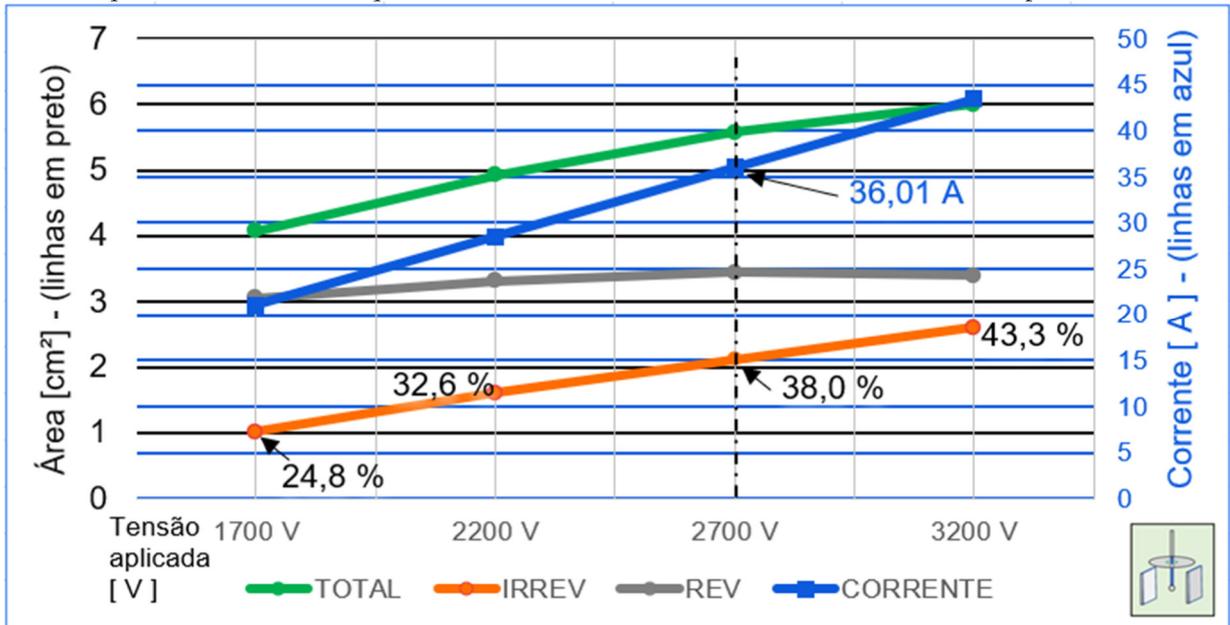
Embora não contabilizada, a área resultante da eletroporação na face onde as placas metálicas foram aderidas são detalhadas na Figura 43, o que possibilita a comparação com o seu equivalente experimental.

Figura 43 – Experimento 07. (A) Desenho esquemático da montagem do eletrodo e polaridades, as placas laterais não estão conectadas a nenhuma polaridade. Pulsos de 1,2 kV na simulação do experimento são apresentados em corte na posição da haste para B-) vista yz de polaridade positiva, C-) vista na simulação computacional, a seta tracejada indica a posição de corte para D-) a vista yz da amostra experimental. Na amostra *Solanum tuberosum* foi aplicado o protocolo ESOPE de 8 pulsos, 100 μ s, 1 Hz, a linha tracejada indica o local em que a placa foi posicionada.



Na Figura 44 é realizada a comparação dos valores das correntes elétricas e entre as áreas obtidas na simulação e na etapa experimental.

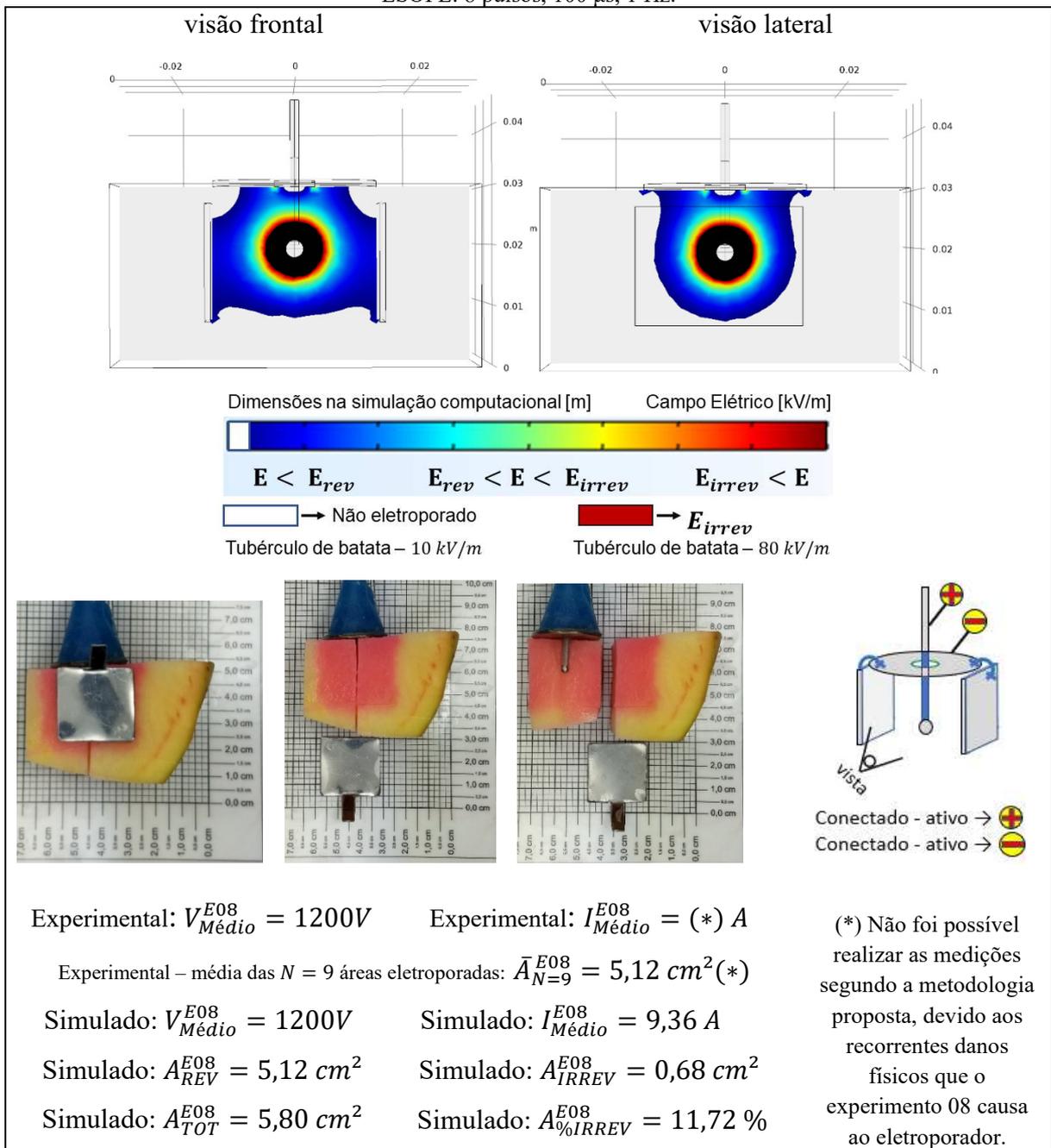
Figura 44 - Experimento 07T – tecido animal - pulsos entre placa circular e esfera, e placas laterais desconectadas – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.



4.2.8 Experimento 08

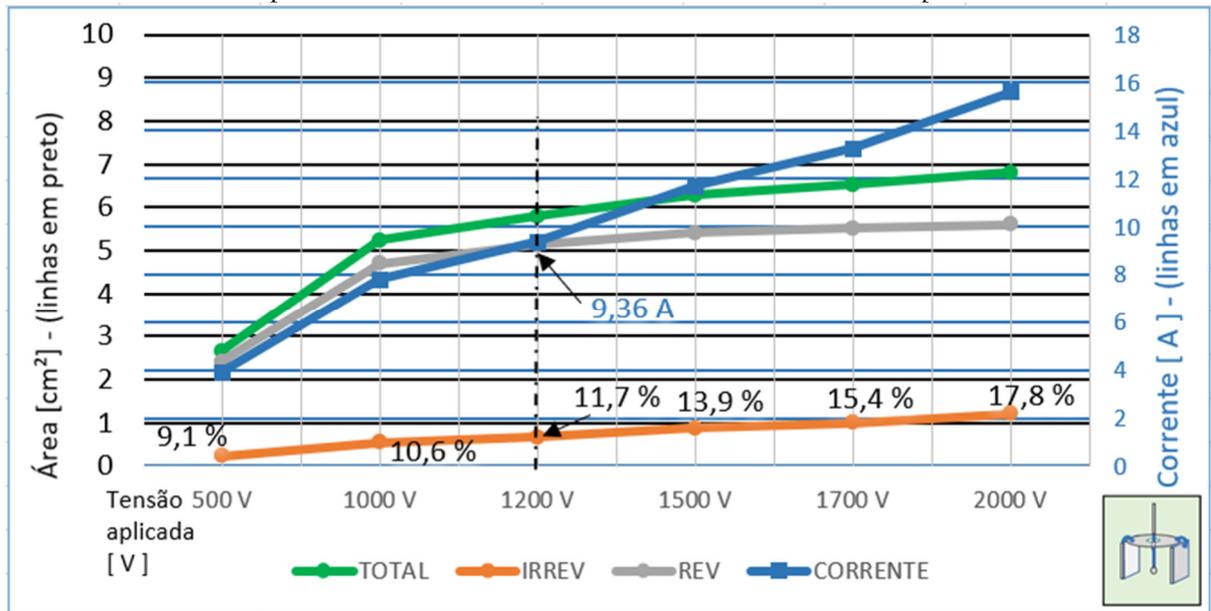
No experimento 08, Figura 45, as placas laterais são aplicadas com conexão elétrica à placa toroidal do eletrodo. As áreas experimentais e simuladas foram obtidas segundo o corte de vista frontal, ou seja, figura de corte ortogonal às placas inseridas nas laterais do tubérculo de batata. É possível observar o uso do eletrodo e o resultado visual da simulação em uma das amostras do tubérculo de batata, cuja região eletroporada apresenta a coloração vermelha.

Figura 45 – Experimento 08 – Simulação computacional e na amostra experimental – *Solanum tuberosum*:
ESOPE: 8 pulsos, 100 μ s, 1 Hz.



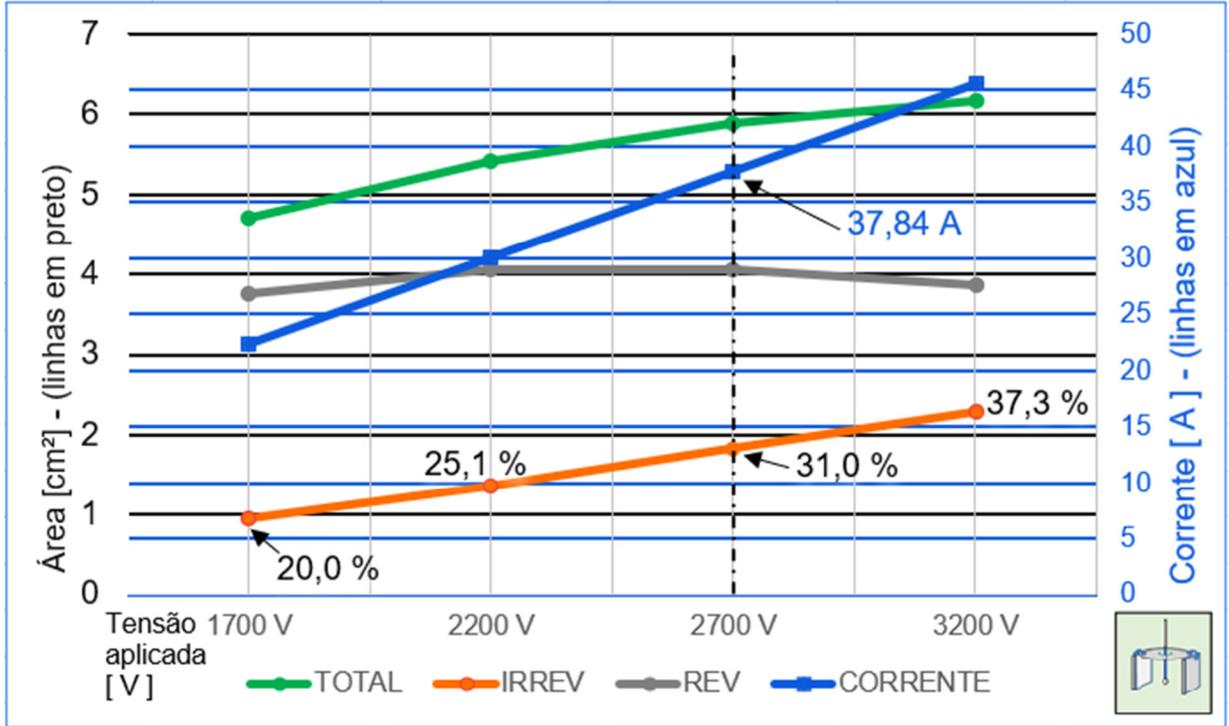
Na Figura 46, foi realizada a comparação dos valores das correntes elétricas e entre as áreas obtidas na simulação e na etapa experimental.

Figura 46 – Experimento 08 – pulsos entre placa circular e esfera, e placas laterais conectadas à placa circular – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.



A leitura experimental da corrente elétrica foi superior daquela prevista *in silico*, Figura 47, provocou deformidades nos pulsos retangulares de tensão. A aquisição evidencia um comportamento danoso aos braços de IGBTs envolvidos. Este problema ocorreu somente nas tentativas de realizar o experimento 08, quando comumente ocorria uma faísca capaz de iluminar o tubérculo de dentro para fora. O fenômeno ocorre com a emissão de estampidos sincronizados com os pulsos de tensão. Não foi possível caracterizar o fenômeno senão pelo rompimento dielétrico e abertura de um arco voltaico.

Figura 47 - Experimento 08T – tecido animal - pulsos entre placa circular e esfera, e placas laterais conectadas à placa circular – representação dos pontos simulados para a visualização do desenvolvimento da corrente, do percentual de área eletroporada irreversivelmente e do valor absoluto das áreas eletroporadas.



4.3 ANÁLISE ESTADÍSTICA DOS EXPERIMENTOS

Os resultados foram obtidos com o uso de dois polos dos eletrodos, segundo as configurações já apresentadas para este estudo. Com base nas sequências automatizadas no *firmware* do eletroporador, APÊNDICE A, foi utilizado o comando 2 de pulsos bipolares.

Neste trabalho, o número de amostras por ensaio foi de $N = 9$, capaz de proporcionar o desvio padrão em pelo menos uma ordem de grandeza abaixo das suas médias, o que colabora na contenção de elevadas dispersões. Essa amostragem se mostrou suficiente para os testes de normalidade e significância dos dados das áreas eletroporadas experimentais. Estas que obtiveram os maiores desvios padrão e erros padrão quando comparados com os respectivos resultados para as correntes elétricas. Ainda assim, as correntes elétricas de C01, C02 e C04 não foram considerados normais segundo o teste de Shapiro-Wilk. No entanto, por meio do teste – t ou do teste de Wilcoxon, todos as amostragens das áreas e das correntes puderam ser consideradas com significância de 95 %.

Para o entendimento dos resultados, são apresentados os valores pertinentes ao estudo estatístico inicial: valor simulado (teórico ou de referência), média dos $N = 9$ valores experimentais, desvio padrão, erro padrão e o erro relativo percentual (cem vezes a razão da soma do valor simulado com a média experimental, pelo valor simulado).

Para as amostras independentes (não pareadas) os testes foram adequados às amostras experimentais. Também foram utilizados testes não paramétricos quando na suposição de distribuição não gaussiana (BOX, G.E.P., HUNTER, W.G. AND HUNTER, 1978; MANDEL, 1964). Considerado o nível de significância $p = 0,05$, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk (SHAPIRO; WILK, 1965) para avaliar se uma amostragem possui distribuição normal. Caso uma amostragem apresente distribuição considerada normal, $p > 0,05$, é feito o teste – t para rejeitar ou não uma hipótese nula, que corresponde a não existência de relação entre amostragens. Caso uma amostragem não seja considerada normal pelo teste de Shapiro-Wilk, $p \leq 0,05$, é utilizado o teste paramétrico de Wilcoxon para amostragens independentes, quando não é possível assumir a distribuição normal para a amostragem. Para esse teste, a hipótese nula se refere a amostragem conter alguns de seus elementos com funções de distribuição similares entre si, e sua hipótese alternativa, de que ao menos um par de amostras possuem funções de distribuições consideradas diferentes (BLAIR; HIGGINS, 1980; DEXTER, 2013). Assim, o intervalo de confiança foi apresentado somente nas amostragens consideradas de distribuição

normal. Além desses critérios, foram calculados o erro relativo, para os quais é estimada a confiabilidade associada ao eletroporador e aos equipamentos de medição na faixa de 95 %.

4.4 ANÁLISE DOS EXPERIMENTOS

Dada a diversidade dos eletrodos e suas configurações adotadas nos experimentos, houve esforços em se manter a constância dos parâmetros:

- Taxa de crescimento da área EP irreversível por incremento de 100 V, na medida que se aproxima da tensão nominal nos experimentos;
- Percentual da área eletroporada irreversivelmente em relação a área total eletroporada.

Estes parâmetros foram obtidos por simulações e organizados na Tabela 6, onde as tensões elétricas se mostraram suficientes para contemplar uma dada porção de área total EP de acordo com a proposta dos eletrodos. Ainda que alguns destes dois parâmetros sejam (parcialmente) violados, foi entendido que manter tensões semelhantes entre os diferentes eletrodos, ou suas configurações, é importante para o critério referencial sobre os resultados obtidos na prática e nas respectivas simulações. Além disso, ajustar uma única tensão no eletroporador facilita na economia de tempo do procedimento clínico.

Tabela 6 - Dados obtidos a partir da simulação com parâmetros de *Solanum tuberosum*. ΔA_{irrev} é a taxa de crescimento da área eletroporação irreversível por incremento de 100 V ao redor do patamar da tensão aplicada nos experimentos, $A_{\text{irrev}}/A_{\text{TOT}}$ o percentual da área eletroporada irreversivelmente em relação a área total eletroporada, V_{app} e I_{app} são patamares da tensão e corrente nos pulsos retangulares aplicados nas amostras, respectivamente.

	Configuração do eletrodo	ΔA_{irrev}	$A_{\text{irrev}}/A_{\text{TOT}}$	V_{app}	I_{app}
Experimento 01		0,4%	9,5%	1500 V	20,88 A
Experimento 02		0,4%	28,2%	1500 V	16,45 A
Experimento 03		0,6%	14,7%	1500 V	14,63 A
Experimento 04		1,0%	19,0%	1500 V	35,43 A
Experimento 05		0,4%	9,6%	1500 V	26,80 A
Experimento 06		0,7%	10,2%	1200 V	5,35 A
Experimento 07		1,1%	11,9%	1200 V	8,77 A
Experimento 08		1,1%	11,7%	1200 V	9,36 A

Assim, na tentativa de pelo menos um parâmetro fixo, foram mantidas as mesmas tensões para as configurações dos eletrodos, exceto para os últimos três experimentos. Isto se justifica devido aos moderados volumes tratados quando comparado com os cinco primeiros experimentos.

Definidas as tensões para os oito experimentos, foi alcançado um conjunto aceitável de valores de corrente elétrica, taxa de crescimento da área eletroporação irreversível e percentual da área eletroporada irreversivelmente. Como os intervalos de interesse do modelo matemático é de natureza exponencial, as variações para as duas primeiras colunas da Tabela 6 são aceitáveis (IVORRA; MIR; RUBINSKY, 2009; SEL *et al.*, 2005a).

4.4.1 Ensaios de corrente elétrica

A Tabela 7 apresenta os valores obtidos nas simulações e as médias dos nove valores práticos de cada experimento.

Tabela 7 - Experimentos de corrente elétrica – onde o erro relativo percentual é dado pelo valor simulado subtraído da média experimental, em relação ao valor simulado.

	Valor Simulado [A]	Média (N=9) exper. [A]	Intervalo de confiança – 95% [A]	Desvio padrão - s [A]	Erro padrão [A]	Erro relativo percentual
Experimento C01	20,88	17,72	-	0,50	±0,17	15,13 %
Experimento C02	16,45	20,17	-	1,05	±0,35	-22,61 %
Experimento C03	14,63	12,17	14,46 - 15,30	0,55	±0,18	16,81 %
Experimento C04	35,43	35,11	-	1,05	±0,35	0,90 %
Experimento C05	26,8	26,22	25,71 – 27,50	1,17	±0,39	2,16 %
Experimento C06	5,35	7,56	5,73 – 6,48	0,49	±0,16	-41,31 %
Experimento C07	8,77	7,44	8,25 – 8,85	0,39	±0,13	15,17 %

A Tabela 7 ainda apresenta o intervalo de confiança de 95 %, o desvio padrão e erro padrão para as amostras trabalhadas em laboratório. A última coluna da referida tabela mostra o erro relativo percentual da média dos valores obtidos nas práticas laboratoriais e o valor simulado. Neste caso, quando o erro percentual é um valor negativo, significa que a simulação computacional apresentou considerável valor numérico da grandeza em estudo quando comparado com a média dos resultados práticos.

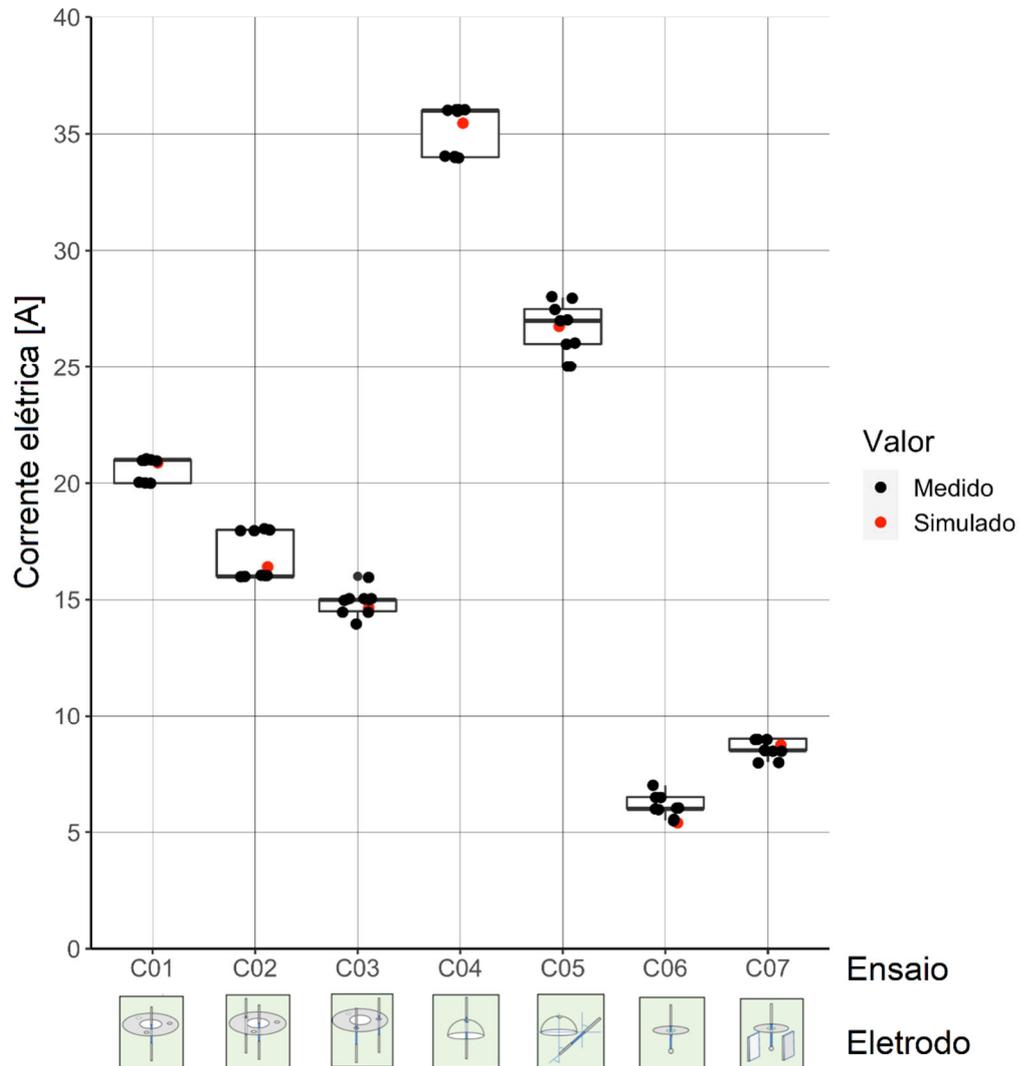
Para complementar a Tabela 7 são apresentados os resultados dos testes de normalidade e intervalo de significância em 95 % das nove amostras de cada experimento. Para isto, os critérios dos testes são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Testes de normalidade e significância das correntes elétricas.

	Shapiro-wilk	Normalidade segundo Shapiro- wilk	Test - t	Wilcoxon	Significância
Ensaio C01	0,0001	0,0001 < p Não é considerado normal	-	9,00E-01	9,00E-01 > p Sim , ensaio e simulação são compatíveis
Ensaio C02	4,00E-04	4,00E-04 < p Não é considerado normal	-	3,94E-01	3,94E-01 > p Sim , ensaio e simulação são compatíveis
Ensaio C03	1,10E-01	1,10E-01 > p Sim , é considerado normal	1,93E-01	-	1,93E-01 > p Sim , ensaio e simulação são compatíveis
Ensaio C04	4,00E-04	4,00E-04 < p Não é considerado normal	-	3,94E-01	3,94E-01 > p Sim , ensaio e simulação são compatíveis
Ensaio C05	2,54E-01	2,54E-01 > p Sim , é considerado normal	6,40E-01	-	6,40E-01 > p Sim , ensaio e simulação são compatíveis
Ensaio C06	2,73E-01	2,73E-01 > p Sim , é considerado normal	1,54E-03	-	1,54E-03 > p Sim , ensaio e simulação são compatíveis
Ensaio C07	5,49E-02	5,49E-02 > p Sim , é considerado normal		1,38E-01	1,38E-01 > p Sim , ensaio e simulação são compatíveis

Para todos os ensaios de corrente elétrica, o gráfico da Figura 48 apresenta a distribuição dos valores experimentais e teóricos (simulados) obtidos com o tubérculo de batata e seus parâmetros de modelagem, respectivamente. De acordo com as configurações dos eletrodos estudadas neste trabalho, o gráfico da Figura 48 apresenta os valores das correntes elétricas devido o campo elétrico imposto em cada amostra laboratorial (valores medidos), frente aos respectivos resultados computacionais (valores simulados).

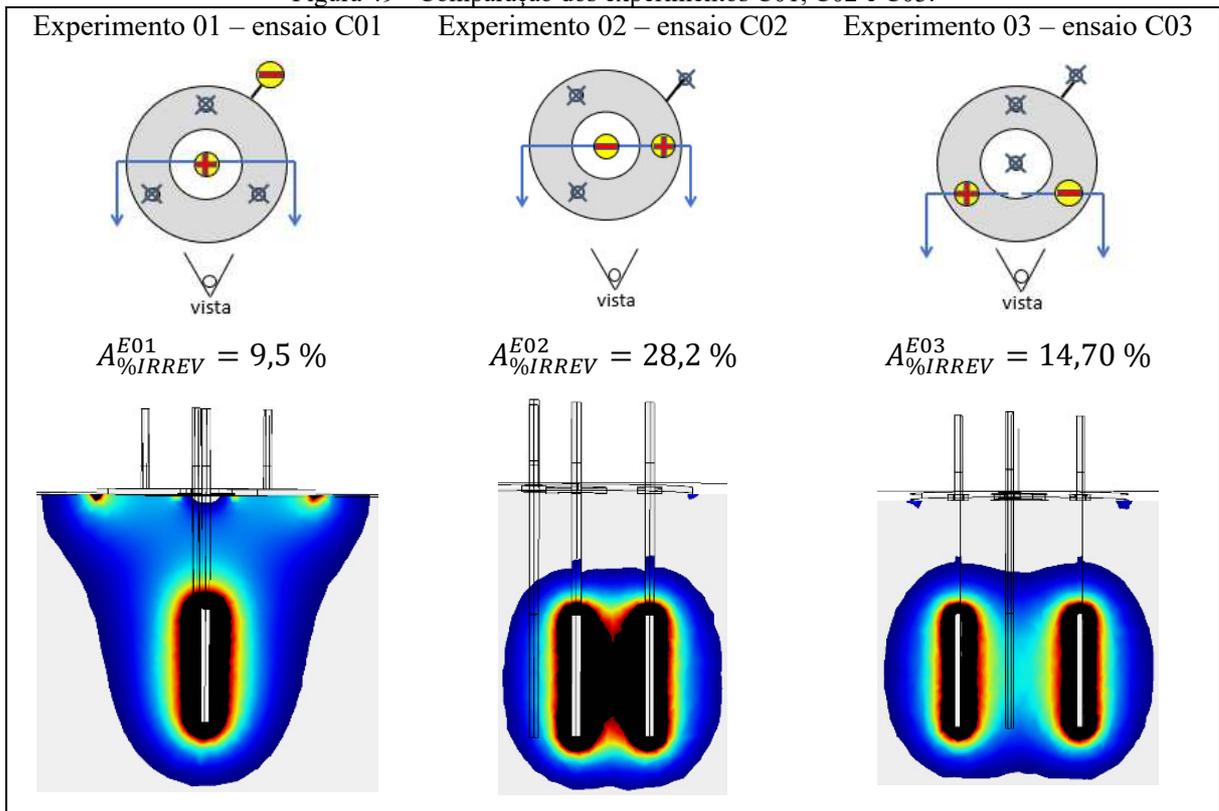
Figura 48 - Distribuição das amostras experimentais das correntes elétricas e seu valor simulado computacionalmente para cada ensaio proposto com amostras de *Solanum tuberosum* e seus parâmetros – representações amostrais em box-plot, sobrepostos aos pontos das amostras e do valor simulado.



Para a corrente elétrica, segundo a Tabela 7, tomado o valor simulado como referência, o erro relativo percentual tenderá um número positivo quando o montante de eletroporação experimental estiver aquém daquele obtido em simulação. Assim, com exceção do experimento C02 e C06, todos as demais correntes poderiam ser maiores para as práticas laboratoriais.

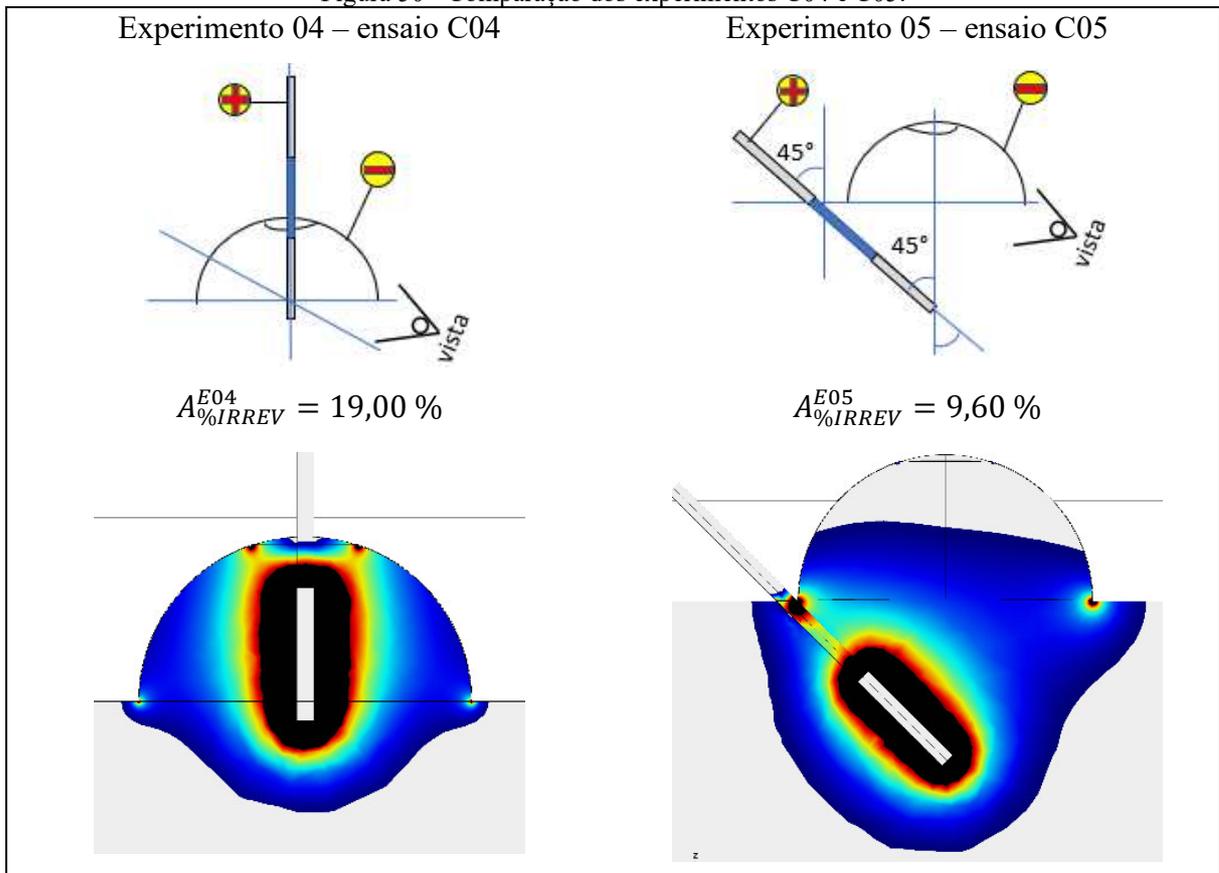
A possível explicação para o experimento C02 apresentar erro positivo é a encurtada aproximação do par de polos do eletrodo na aplicação dos pulsos (com o mesmo potencial elétrico dos experimentos C01 e C03). Por consequência, dentre C01, C02 e C03, foi justamente o ensaio C02 foi quem apresentou a maior porção de tecido eletroporado irreversivelmente em relação a porção de eletroporação reversível, $A_{\%IRREV}^{E02} = 28,2 \%$, Figura 49.

Figura 49 - Comparação dos experimentos C01, C02 e C03.



Sobre o eletrodo com um polo no formato de calota, experimentos C04 e C05, e as devidas hastes parcialmente isoladas e posicionadas respectivamente em ângulo reto e ângulo de 45°, são verificados os menores erros de corrente elétrica dentre todos os experimentos, 0,90 % e 2,16 %, respectivamente. Apesar de C04 e C05 apresentarem os menores erros para as correntes, os percentuais das áreas com eletroporação irreversível foram $A_{\%IRREV}^{E04} = 19,00 \%$ e $A_{\%IRREV}^{E05} = 9,60 \%$, Figura 50. A partir do mesmo potencial elétrico aplicado em C04 e C05, ocorrerá um percentual de eletroporação irreversível tão impactante quanto mais internamente o polo de haste estiver envolvido pela concavidade: na ocorrência de um campo elétrico intenso.

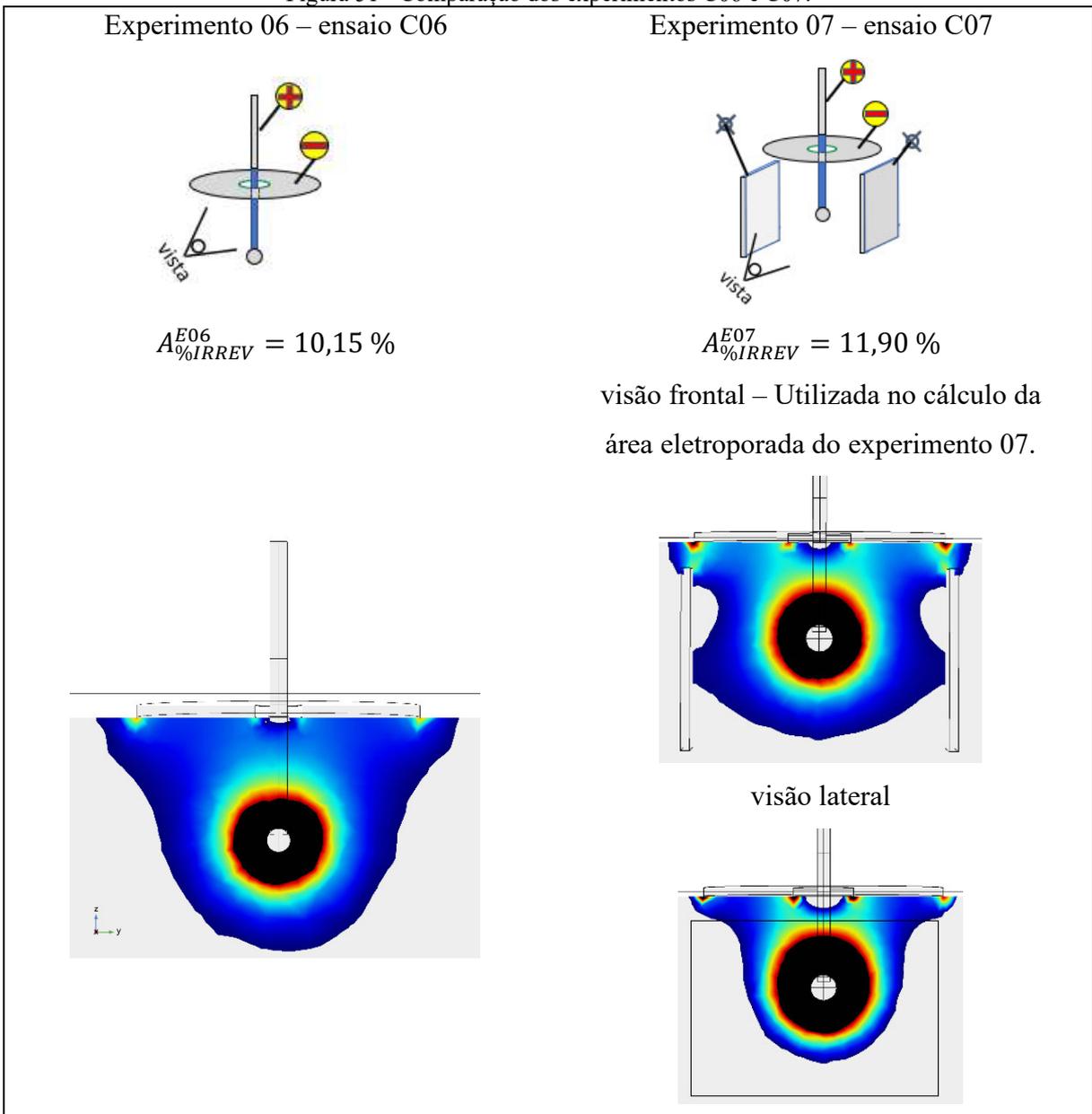
Figura 50 - Comparação dos experimentos C04 e C05.



Sobre o eletrodo de disco com um polo esférico, os experimentos C06 e C07 se destacam com relevantes erros percentuais. Para o ensaio C07, de erro 15,17%, há pelo menos dois fatores impeditivos da comparação com C06 (e C08), cujo erro de C06 é $-41,31\%$. Assim, em uma primeira análise, os ensaios C06 e C07 poderiam indicar significantes diferenças nas regiões de EP irreversível. No entanto, são áreas bastante semelhantes: $A_{%IRREV}^{E06} = 10,15\%$ e $A_{%IRREV}^{E07} = 11,90\%$. A partir do mesmo potencial elétrico, C06 conta com uma superfície do tubérculo de batata mais ampla quando comparada ao C07 (e C08), restritos pelo corte para o encaixe das placas metálicas, Figura 51.

Assim, a concentração elevada de campo ao redor do polo esférico em C06 remete a um erro percentual negativo ($-41,31\%$), como em C02, $-22,61\%$, provavelmente devido a pequena distância entre os polos energizados em relação a tensão aplicada pelos pulsos. No entanto, em C07 o campo é melhor distribuído com a adição das placas laterais, o que conduz a um erro percentual no valor de 15,17%. Isto será abordado nas explicações da Figura 53.

Figura 51 - Comparação dos experimentos C06 e C07.



visão frontal – Utilizada no cálculo da área eletroporada do experimento 07.

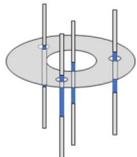
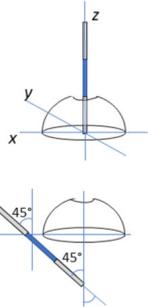
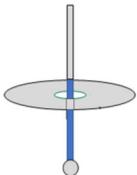
O experimento C08 foi de execução inviável. Embora a simulação indique corrente inferior a 10 A, foi imperativo evitar esta configuração, pois foram recorrentes as aberturas de arco voltaico por dentro do tubérculo quando um trem de pulsos do protocolo ESOPE era aplicado.

É importante destacar que esses erros percentuais de corrente entre a simulação e a respectiva média das nove amostras laboratoriais é uma indicação indireta sobre o excesso ou falta da tensão definida para o experimento.

Os menores erros percentuais foram respectivamente 0,90 % e 2,16 %, obtidos nos experimentos C04 e C05, os únicos a utilizarem calotas como polos do eletrodo. O maior erro foi de -41,31 % no experimento C06, sinalizando que a tensão aplicada poderia ser reduzida para a obtenção da mesma área eletroporada. Diferente de C06, foi o experimento C07, realizado com a mesma tensão que o C06, porém, na adoção das placas metálicas laterais houve uma distribuição do campo elétrico com tendências de uniformidade.

A partir dos resultados obtidos nos experimentos é possível exercer a elaboração da Tabela 9, onde alguns resultados das comutações dos eletrodos podem ser apresentados através da síntese de experimentos. Esta é uma maneira de viabilizar comparações com eletrodos da literatura pesquisada, por exemplo, com aqueles representados na Tabela 5.

Tabela 9 – Resumo dos eletrodos, V_{app} é a tensão aplicada e $I_{m\acute{a}x}$ é a respectiva corrente máxima do eletrodo.

Configuração dos eletrodos	Resultado das comutações dos eletrodos: experimentos	Área da EQT eficiente	Profundidade do campo elétrico	V_{app} $I_{m\acute{a}x}$
	01+02+03	Ao redor de 13 cm^2	Ao redor de 5 cm	1500 V 20 A
	04+05	Ao redor de 21 cm^2	Ao redor de 4 cm	1500 V 35 A
	06	Ao redor de 5 cm^2	Ao redor de 2 cm	1200 V 8 A

4.4.2 Ensaios das áreas eletroporadas

A Tabela 10 apresenta os valores simulados e as médias dos valores obtidos nas práticas laboratoriais das áreas eletroporadas a partir dos sete experimentos válidos (aqueles que fornecerem $N = 9$ amostras) para o presente estudo. O conteúdo da Tabela 10 também contempla os resultados para a avaliação dos intervalos de confiança, desvio padrão, erro padrão e o erro relativo percentual de cada um dos ensaios.

Tabela 10 - Ensaios de área eletroporada compara valores simulados e experimentais em *Solanum tuberosum*. O erro relativo percentual é o valor simulado subtraído da média experimental, em relação ao valor simulado.

	Valor Simulado [cm²]	Média (N=9) exper. [cm²]	Intervalo de confiança – 95% [cm²]	Desvio padrão - s [cm²]	Erro padrão [cm²]	Erro relativo percentual
Experimento A01	11,61	12,76	10,88 – 14,63	2,44	±0,81	-9,91 %
Experimento A02	20,15	20,27	18,07 – 22,46	2,86	±0,95	-0,60 %
Experimento A03	15,78	17,18	15,86 – 18,49	1,71	±0,57	-8,87 %
Experimento A04	14,76	13,40	11,78 – 15,02	2,11	±0,70	9,21 %
Experimento A05	22,37	21,41	25,71 – 27,50	2,22	±0,74	4,29 %
Experimento A06	3,94	4,88	5,73 – 6,48	0,81	±0,27	-23,86 %
Experimento A07	5,45	4,62	8,25 – 8,85	0,58	±0,19	15,23 %

O intervalo de confiança em 95 % foi verificado para as amostragens aprovadas quanto a normalidade segundo o teste de Shapiro-Wilk, Tabela 11. Quando o erro percentual entre o valor simulado e a média dos valores práticos é um valor positivo, significa que as áreas obtidas nas simulações apresentam maiores valores simulados (teóricos) do que as médias dos nove resultados práticos de cada experimento.

Quando o erro percentual resulta em um número negativo, o montante de eletroporação irreversível experimental tenderá a ser maior do que o simulado, provavelmente prestes a

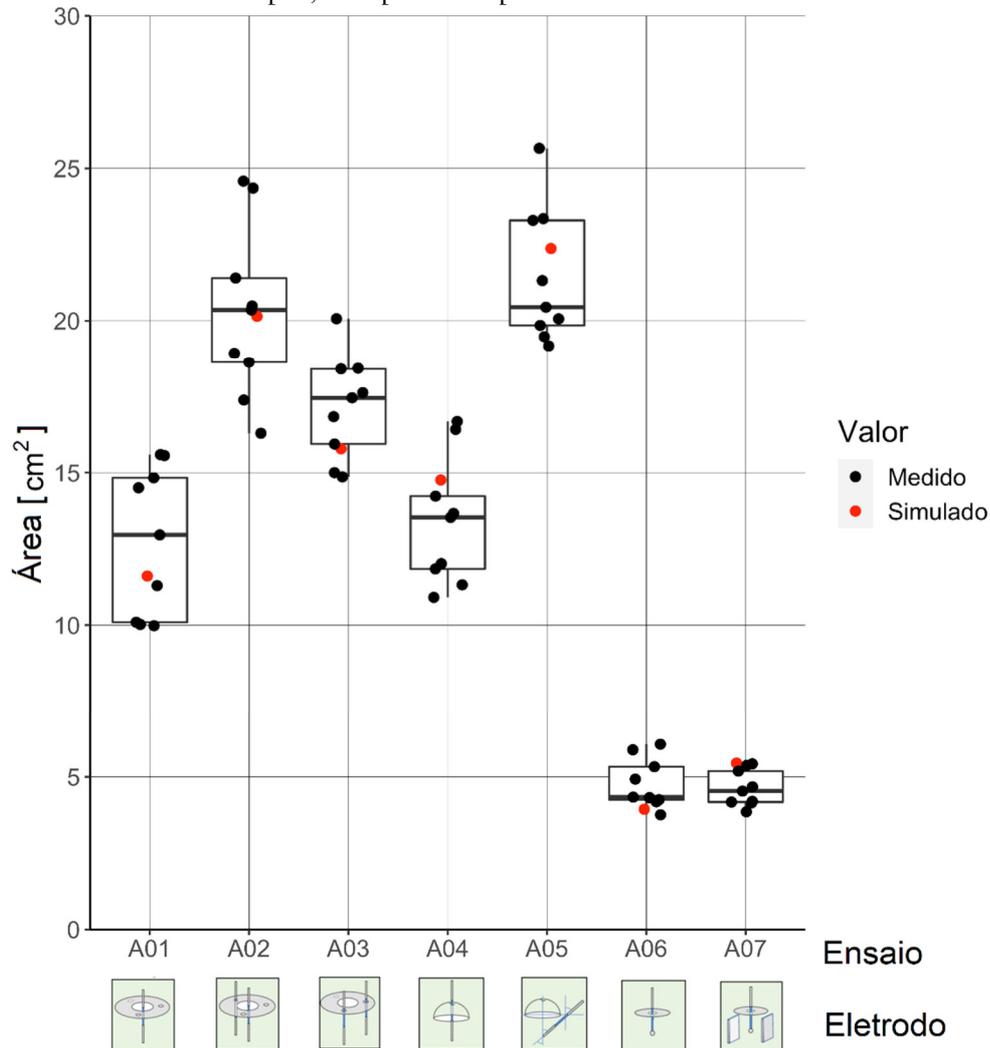
alcançar os limites da modelagem matemática adotada. Assim, de uma forma geral, algum decréscimo de campo elétrico poderia ser ajustado para o valor experimental alcançar o valor simulado. No entanto, em termos clínicos, algum excesso de campo elétrico colabora na garantia da eliminação do tecido neoplásico naquele volume tratado (VALERIO *et al.*, 2017) e (WAGSTAFF *et al.*, 2016).

Tabela 11 - Resultado dos testes de normalidade e significância dos ensaios de área.

	Shapiro-wilk	Normalidade segundo Shapiro- wilk	Test – t	Significância
Ensaio A01	6,29E-02	6,29E-02 > p Sim , é considerado normal	1,95E-01	1,95E-01 > p Sim , ensaio e simulação são compatíveis
Ensaio A02	5,98E-01	5,98E-01 > p Sim , é considerado normal	9,04E-01	9,04E-01 > p Sim , ensaio e simulação são compatíveis
Ensaio A03	7,76E-01	7,76E-01 > p Sim , é considerado normal	0,03991	0,03991 > p Sim , ensaio e simulação são compatíveis
Ensaio A04	3,05E-01	3,05E-01 > p Sim , é considerado normal	8,90E-02	8,90E-02 > p Sim , ensaio e simulação são compatíveis
Ensaio A05	2,54E-01	2,54E-01 > p Sim , é considerado normal	6,40E-01	6,40E-01 > p Sim , ensaio e simulação são compatíveis
Ensaio A06	2,73E-01	2,73E-01 > p Sim , é considerado normal	1,54E-03	1,54E-03 > p Sim , ensaio e simulação são compatíveis
Ensaio A07	5,49E-02	5,49E-02 > p Sim , é considerado normal	1,38E-01	1,38E-01 > p Sim , ensaio e simulação são compatíveis

Para todos os experimentos de áreas, o gráfico da Figura 52 apresenta a distribuição dos valores de áreas experimentais e teóricos (simulados).

Figura 52 - Distribuição das amostras experimentais das áreas eletroporadas e seu valor simulado computacionalmente para cada ensaio proposto com *Solanum tuberosum* e seus parâmetros – representações amostrais em box-plot, sobrepostos aos pontos das amostras e do valor simulado.



Na análise dos erros percentuais em A01, A02 e A03 é notado que as áreas eletroporadas simuladas são levemente inferiores às obtidas com a média dos $N = 9$ valores experimentais em amostras de *Solanum tuberosum*. O erro em A02 é praticamente nulo, em A01 e A03 são inferiores a 10 %, em módulo. Então, segundo o modelo matemático, para as áreas de eletroporação irreversíveis, $A_{\%IRREV}^{E01} = 9,5 \%$, $A_{\%IRREV}^{E02} = 28,2 \%$ e $A_{\%IRREV}^{E03} = 14,70 \%$, e os respectivos erros relativos percentuais de $-9,91 \%$, $-0,60 \%$ e $-8,87 \%$, há uma notável disparidade na elevada percentagem de área eletroporada irreversível em A02 e o diminuto erro relativo percentual no total da área eletroporada no mesmo A02. E apesar do pequeno erro relativo percentual entre o simulado e o prático, na Figura 52 é observada uma considerável dispersão das áreas neste experimento.

Os desvios observados nos experimento *in vitro* e no modelo computacional podem ser explicados pelos fatores: 1- anisotropia do tecido; 2- o modelo computacional da literatura; 3- o modelo desenvolvido pela literatura usou amostras que variam das amostra utilizadas *in vitro* (existem alguns tipos de *Solanum tuberosum* (REEVE; TIMM; WEAVER, 1973); 4- Devido a presença de outras estruturas (além do parênquima) o tecido não é homogêneo (HIELKO E.GROMMERS; DO A.VAN DER KROGT, 2009).

De imediato, não se pode atribuir essas discrepâncias entre os erros relativos percentuais exclusivamente ao modelo matemático, pois a não homogeneidade dos tubérculos de batata e as geometrias das três diferentes configurações do eletrodo podem impactar com afinidades distintas frente ao modelo matemático adotado (GEHL *et al.*, 2018), (BERKENBROCK *et al.*, 2019) e (REEVE; TIMM; WEAVER, 1973). Na prática clínica, também existirão fatores análogos a estes, de forma a interferir nos resultados práticos quando comparados às simulações preparatórias de um eventual procedimento.

Nas configurações do eletrodo em A01, A02 e A03, o erro relativo percentual das correntes de C02 (-22,61 %) é o maior em módulo, e em módulo, o menor de todos é -0,60 %.

Nos ensaios A04 e A05, os erros percentuais das áreas são -9,21 % e -4,29 %, e os erros percentuais das correntes em C04 e C05 são 0,90 % e 2,16 %.

Devido aos erros relativos percentuais das áreas serem negativos, as áreas de EP simuladas são maiores que as médias obtidas nas práticas laboratoriais. As áreas eletroporadas simuladas são $14,76 \text{ cm}^2$ e $22,37 \text{ cm}^2$ e as médias das áreas práticas são $13,40 \text{ cm}^2$ e $21,41 \text{ cm}^2$, respectivamente para A04 e A05. Quanto a A06, A07 (e A08), pouco se altera no valor simulado das áreas EP irreversível, no entanto, há tendência no aumento da área total EP nas simulações, Tabela 12.

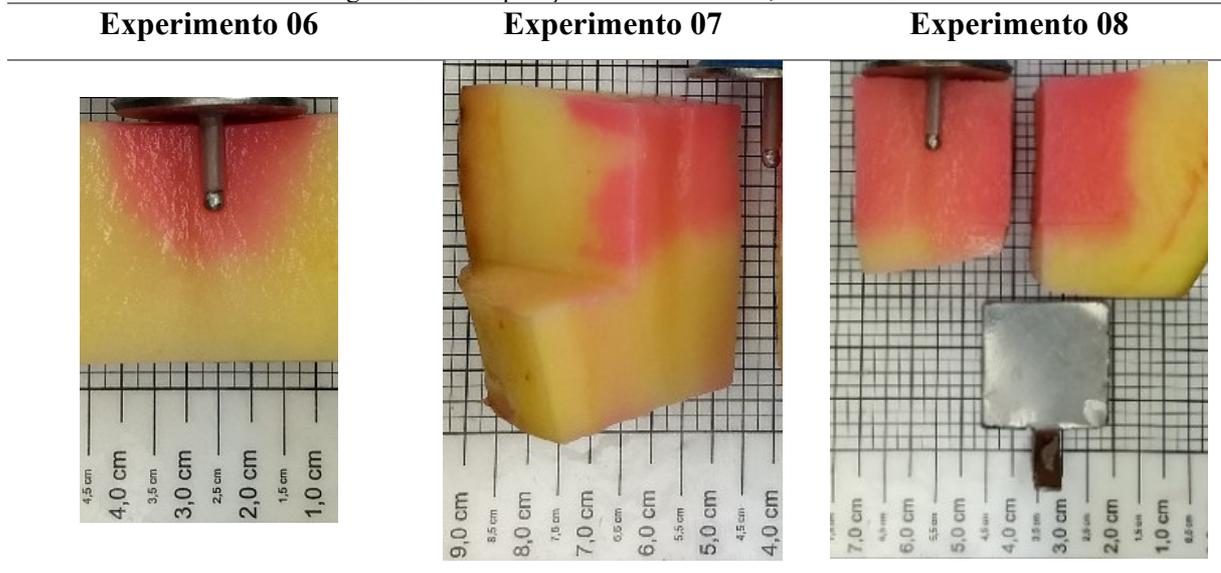
Tabela 12 - Comparativo de valores segundo o eletrodo de disco com haste isolada de esfera na extremidade.

Valores	A06	A07	A08
Média das amostras (prático)	$\bar{A}_{N=9}^{E06} = 4,88 \text{ cm}^2$	$\bar{A}_{N=9}^{E07} = 4,62 \text{ cm}^2$	$\bar{A}_{N=*}^{E08} = 5,12 \text{ cm}^2$
Área total EP (simulado)	$A_{TOT}^{E06} = 3,94 \text{ cm}^2$	$A_{TOT}^{E07} = 5,45 \text{ cm}^2$	$A_{TOT}^{E08} = 5,80 \text{ cm}^2$
Área EP irreversível (simulado)	$A_{\%IRREV}^{E06} = 10,15 \%$	$A_{\%IRREV}^{E07} = 11,90 \%$	$A_{\%IRREV}^{E08} = 11,72 \%$

(*) onde foi inviável obter $N = 9$ amostras devido a excessiva corrente elétrica que de forma recorrente danificava o driver do equipamento eletroporador, em geral antes de completar os oito pulsos do protocolo ESOPE.

Desta forma, há uma aparente tendência de o campo elétrico ser melhor distribuído pelo uso de um par de placas metálicas em A07 e A08. As placas são posicionadas lateralmente e não são eletricamente conectadas em A07. Em A08, as placas são eletricamente conectadas no polo em formato de disco. Para os ensaios A06 e A07, cujos erros relativos percentuais são $-23,86 \%$ e $15,23 \%$, os erros relativos percentuais das correntes em C06 e C07 são $-41,31 \%$ e $15,17 \%$. Assim, somente no experimento 07 foi possível obter o menor erro relativo percentual entre área eletroporada total e o erro relativo percentual entre correntes elétricas. Uma diferença de $0,06 \%$, justamente para arranjo de polos menos usual na literatura pesquisada, Figura 53.

Figura 53 - Comparação dos ensaios A06, A07 e A08.



Como pode ser observado até o presente momento, existem dificuldades em projetar eletrodos (propriedades geométricas) para a EQT com distribuição de campo complexa por meio de modelos computacionais, foi observado que os modelos matemáticos para EQT geralmente são utilizados para a predição de campos de reduzida complexidade (*i.e.* campos gerados por eletrodos de par de placas ou segmentos paralelos de agulhas) e (SUZUKI *et al.*, 2018).

Em teoria, os erros relativos levam à validação do modelo matemático utilizado no simulador computacional quando os resultados são confrontados àqueles obtidos por práticas. No caso deste trabalho, apesar do modelo já definido e utilizado em diversos outros estudos, alguns fatores contribuem na dificuldade em validar o modelo pré-existente. Se há alguma dissintonia para cada modelo matemático de EP em função do eletrodo, não se pode padronizar características particulares do eletrodo com erros relativos significantes. Se há necessidade de criar uma modelagem matemática para EP para todo eletrodo com características particulares, novamente, não se pode padronizar o eletrodo de modo compatível com os demais já existentes.

Neste trabalho, os variados erros relativos de áreas e correntes elétricas são úteis em indicar a necessidade de padronizar eletrodos para EQT com o que já existe de modelos matemáticos, mesmo que ofereçam erros relativos devido a possível inadequação dos eletrodos adotados. A questão está em evitar a interferência dos erros relativos na metodologia de padronização de eletrodos para a EQT.

4.5 PROPOSTA DE PADRONIZAÇÃO DE ELETRODOS PARA A EQT.

A partir dos resultados provenientes das simulações e das práticas laboratoriais, será apresentada uma proposta de padronização de eletrodos para o uso clínico. Nesta proposta os resultados a serem obtidos sobre os eletrodos são quantitativos. Assim, a partir dos testes de normalidade e significância das $N = 9$ ensaios práticos e dos resultados teóricos (simulados), será proposta metodológica para a validação quantitativa de eletrodos para a EQT.

4.5.1 Correlações

Em termos práticos, com o uso da correlação de Pearson é possível obter um valor sobre o grau de relacionamento entre:

- Os valores simulados e as médias experimentais, ambos de tubérculos de batata;
- Os valores simulados de tubérculos de batata e os valores simulados de tecidos animais.

O critério para aplicar a correlação de Pearson está tecnicamente detalhado no APÊNDICE E. Entretanto, dada a independência dos conjuntos das amostras e a respectiva normalidade, valores de correlação acima de 70 % são considerados fortes (KOZAK, 2009) e (KOZAK; KRZANOWSKI; TARTANUS, 2012).

Desta forma, o método das correlações de Pearson pode oferecer a base de uma metodologia para a compreensão a respeito do quanto é escalável utilizar os eletrodos propostos em tubérculos de batata, para logo em seguida expandir os resultados a tecidos animais.

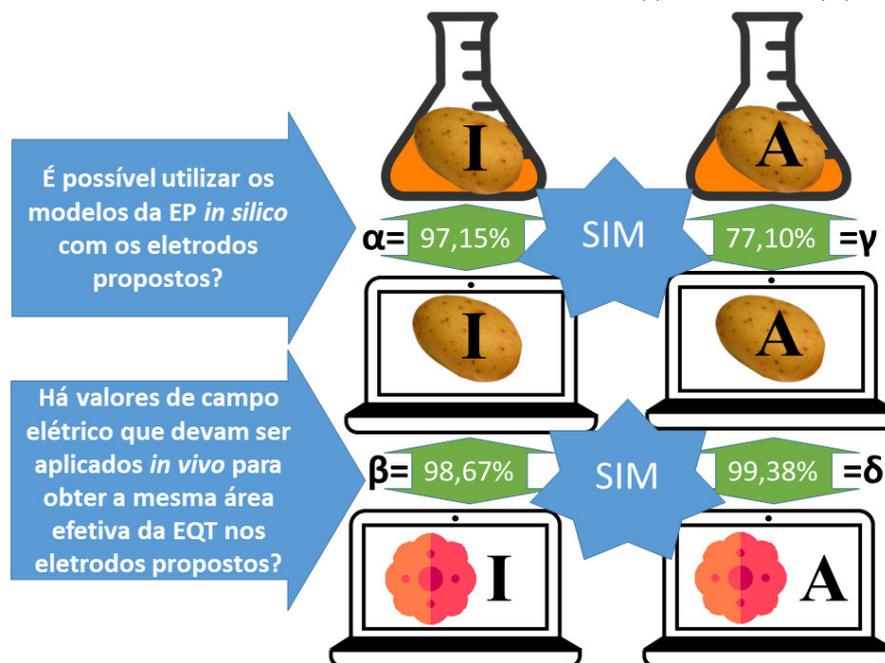
Os testes de normalidade para os conjuntos de amostras a serem correlacionadas estão no APÊNDICE E. Os testes apresentaram valor positivo para o teste de normalidade Shapiro-Wilk, e para efeito de redundância, foram novamente testados e aprovados quanto a normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Deste modo, realizadas as devidas correlações, os resultados são apresentados na Tabela 13.

Tabela 13 - Amostras dos experimentos organizadas em quatro grupos correlacionáveis.

Corrente elétrica		Corrente elétrica		Área		Área	
Tubérculo de batata		Tecido animal		Tubérculo de batata		Tecido animal	
Simulada	Experimental	Simulada	Simulada	Simulada	Experimental	Simulada	Simulada
$C01_{1500V}^{Simul}$	$C01_{1500V}^{Exper}$	$C01_{1500V}^{Simul}$	$01T_{3000V}^{Corrente}$	$A01_{1500V}^{Simul}$	$A01_{1500V}^{Exper}$	$A01_{1500V}^{Simul}$	$01T_{3000V}^{Área}$
$C02_{1500V}^{Simul}$	$C02_{1500V}^{Exper}$	$C02_{1500V}^{Simul}$	$02T_{3000V}^{Corrente}$	$A02_{1500V}^{Simul}$	$A02_{1500V}^{Exper}$	$A02_{1500V}^{Simul}$	$02T_{3000V}^{Área}$
$C03_{1500V}^{Simul}$	$C03_{1500V}^{Exper}$	$C03_{1500V}^{Simul}$	$03T_{3000V}^{Corrente}$	$A03_{1500V}^{Simul}$	$A03_{1500V}^{Exper}$	$A03_{1500V}^{Simul}$	$03T_{3000V}^{Área}$
$C04_{1500V}^{Simul}$	$C04_{1500V}^{Exper}$	$C04_{1500V}^{Simul}$	$04T_{3000V}^{Corrente}$	$A04_{1500V}^{Simul}$	$A04_{1500V}^{Exper}$	$A04_{1500V}^{Simul}$	$04T_{3000V}^{Área}$
$C05_{1500V}^{Simul}$	$C05_{1500V}^{Exper}$	$C05_{1500V}^{Simul}$	$05T_{3000V}^{Corrente}$	$A05_{1500V}^{Simul}$	$A05_{1500V}^{Exper}$	$A05_{1500V}^{Simul}$	$05T_{3000V}^{Área}$
$C06_{1200V}^{Simul}$	$C06_{1200V}^{Exper}$	$C06_{1200V}^{Simul}$	$06T_{2700V}^{Corrente}$	$A06_{1200V}^{Simul}$	$A06_{1200V}^{Exper}$	$A06_{1200V}^{Simul}$	$06T_{2700V}^{Área}$
$C07_{1200V}^{Simul}$	$C07_{1200V}^{Exper}$	$C07_{1200V}^{Simul}$	$07T_{2700V}^{Corrente}$	$A07_{1200V}^{Simul}$	$A07_{1200V}^{Exper}$	$A07_{1200V}^{Simul}$	$07T_{2700V}^{Área}$
Correlação α		Correlação β		Correlação γ		Correlação δ	
$Corrente_{batata(Simul)}^{batata(Exper)}$		$Corrente_{batata(Simul)}^{animal(Simul)}$		$Área_{batata(Exper)}^{batata(Simul)}$		$Área_{batata(Simul)}^{animal(Simul)}$	
Correlação $\alpha = 97,15\%$		Correlação $\beta = 98,67\%$		Correlação $\gamma = 77,10\%$		Correlação $\delta = 99,38\%$	
<p><i>Exper</i> – Valor adquirido experimentalmente;</p> <p><i>Simul</i> – Valor obtido em simulação computacional;</p> <p><i>A</i> – Referente a <i>Exper</i> e <i>Simul</i> de área [cm^2];</p> <p><i>C</i> – Referente a <i>Exper</i> e <i>Simul</i> de corrente elétrica [A];</p> <p>T – Referente aos ensaios em tensão compatível com o tecido animal adotado. Em todos os demais ensaios foram adotadas tensões compatíveis com o tubérculo de batata. O valor do módulo das tensões utilizadas são os valores que acompanham as respectivas variáveis, em unidade de Volt, [V].</p>							

O mesmo processo indicado na Tabela 13 está representado na Figura 54 de forma a facilitar a compreensão dos processos e respectivos resultados das correlações de Pearson.

Figura 54 - Visualização do valor das correlações (setas) dos conjuntos das amostras simuladas e experimentais e suas respectivas naturezas, dentro do contexto de correntes elétricas (I) e áreas totais (A) eletroporadas.



4.5.2 Exemplificação do tratamento com EQT por imagens de simulações

Para a visualização do resultado a respeito da aplicação de pulsos em um tratamento de EQT, foi realizada a simulação com parâmetros de um determinado tecido animal. De acordo com a Tabela 1, são obtidos os parâmetros do tecido tumoral (neoplasia) de condutividade inicial $\sigma_0 = 0,300 S/m$ e condutividade final $\sigma_{m\acute{a}x} = 0,750 S/m$, segundo o modelo proposto por (SUZUKI *et al.*, 2015).

De forma a representar um possível tratamento de tumor esférico subcutâneo foi adotado o eletrodo de disco com hastes distribuídas a cada 120° e ao centro.

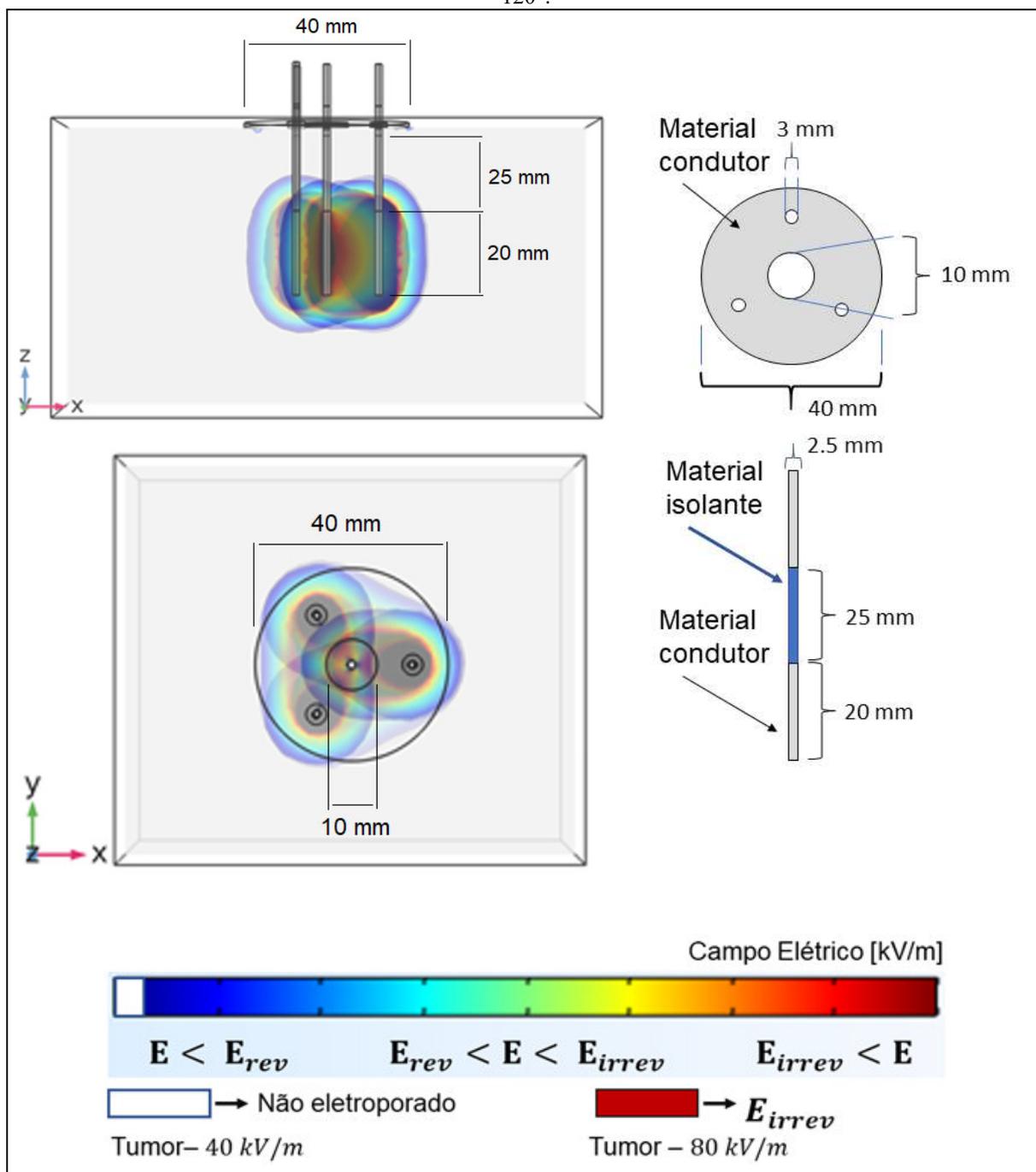
Uma vez definida a tensão para os patamares dos pulsos no eletroporador, são aplicados o comando 3 seguido do comando 6, Tabela 15, APÊNDICE A. Assim, de maneira automatizada, em poucos segundos todo o tratamento é efetuado no tecido neoplásico, previamente preparado com o posicionamento dos polos do eletrodo especificado.

O comando 3 aplica a sequência de pulsos entre as três hastes que passam pelos orifícios de $3 mm$, distribuídos a 120° ao redor da placa toroidal do referido eletrodo. Se forem essas hastes nomeadas de polos A, B e C (conforme Figura 15), a sequência dos trens de pulsos se dá entre as combinações AP, BP e CP, representado na Figura 55.

O comando 6 aplica a sequência de pulsos entre as três hastes e a placa toroidal. A sequência de trens de pulsos se dá entre as combinações AB, BC e CA, representado na Figura 56.

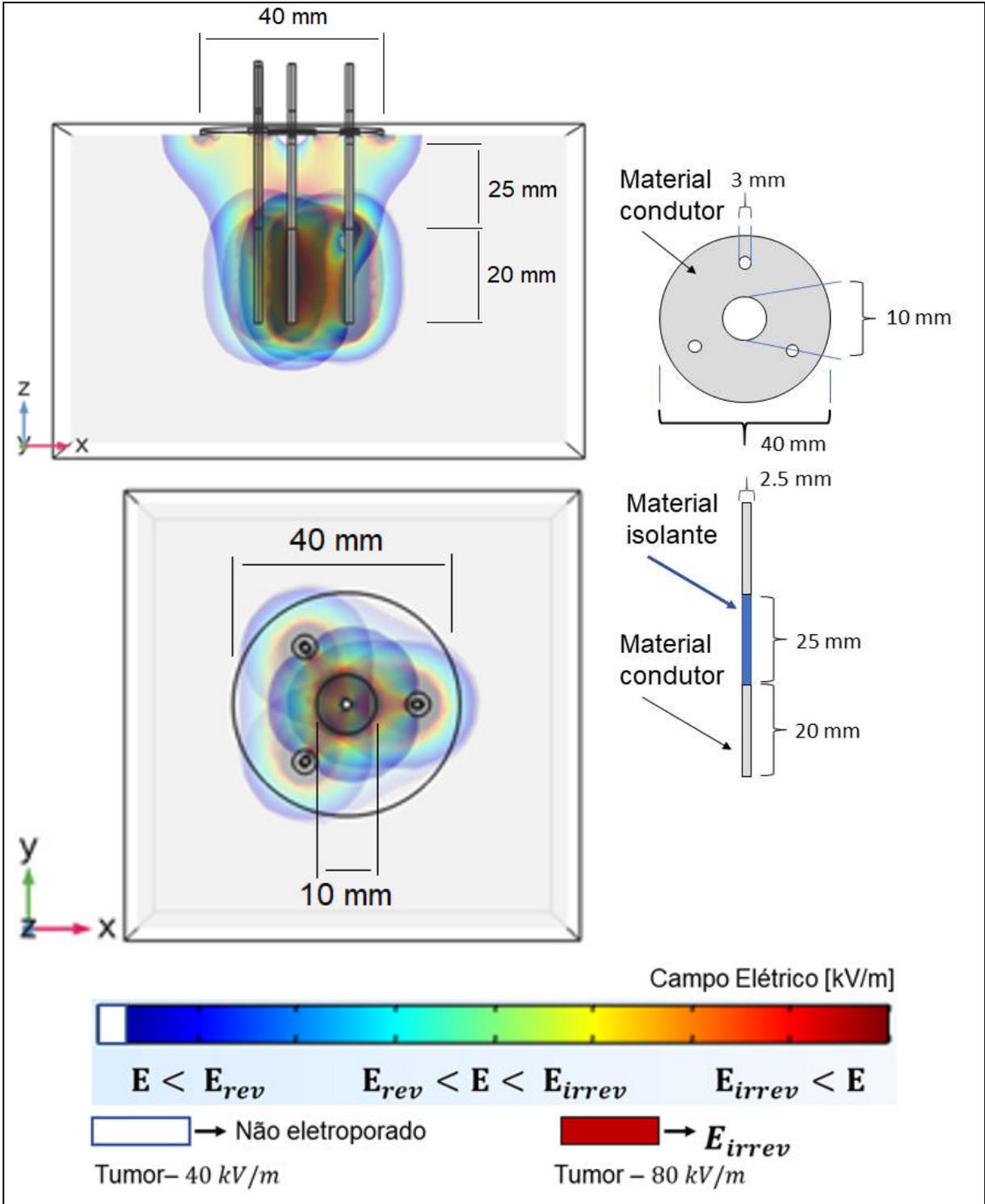
Embora a sobreposição dos comandos 3 e 6 tenha apresentado um ótimo resultado para o tratamento, na prática, poderia ser acrescentado o comando 2 como redundância. Este comando aplica um trem de pulsos entre o polo A e a placa P.

Figura 55 - Aplicação do comando 3 no eletrodo de placa toroidal, com três agulhas ao redor, distribuídas em 120° .



Na Figura 55 e Figura 56 é possível notar a grande região tratada no caso da EQT. Com somente um posicionamento do referido eletrodo, foi possível aplicar o tratamento sem falhas dentro do volume eletroporado. É notável que devido a distribuição dos polos, existe a vantagem quanto redundância na aplicação dos campos elétricos em algumas partes dentro da região alvo. E quanto mais ao centro do volume, haverá incrementos de redundâncias nos diversos sentidos dos vetores de campo elétrico.

Figura 56 - Aplicação do comando 6 no eletrodo de placa toroidal, com três agulhas ao redor, distribuídas em 120°.



5 DISCUSSÃO

Considera-se a condutividade elétrica inicial de uma dada amostra constante e isotrópica, para todo tubérculo de batata não exposto à campos elétricos. E uma vez aplicado o protocolo, os patamares de campos elétricos consequentes de elevadas tensões impostas no tecido vivo, causam o incremento da condutividade elétrica na amostra. Isto decorre da eletroporação, segundo os modelos matemáticos expressos na equação (6), do modelo vegetal (IVORRA; MIR; RUBINSKY, 2009), (CAMPANA *et al.*, 2017) e (BERKENBROCK *et al.*, 2019), e na equação (7) do modelo animal (SUZUKI *et al.*, 2015). No entanto, quando a simulação computacional indicar a existência da EP irreversível, é sinal que já se trabalha em intervalos considerados não lineares segundo os modelos matemáticos. Quando se trabalha com EP reversível e, por isso também é adotado o protocolo ESOPE, não é necessária a quantidade de energia para ablação por destruição da integridade celular, pois a destruição celular é conduzida pelos efeitos do quimioterápico (GEHL *et al.*, 2018). Trabalhar em regiões próximas a EP irreversível é crítico ao tratamento por EQT, em pelo menos duas circunstâncias. A primeira é devido a um pequeno incremento da tensão no limiar superior de EP reversível conseguir alcançar até mesmo significativas porções de EP irreversível, além da colaboração com uma possível circulação de corrente danosa em termos de aquecimento nas adjacências dos polos com o tecido vivo – APÊNDICE C. A segunda circunstância decorre das estruturas de um mesmo órgão ou tecidos sobrepostos, que devido a anisotropia, possa apresentar condutividades elétricas imprevisíveis no decorrer das aplicações, durante o procedimento clínico (BERTACCHINI *et al.*, 2007; GALLINATO *et al.*, 2019; JOURABCHI *et al.*, 2014). Nas simulações com os parâmetros de tecidos animais e os três eletrodos propostos, é possível observar os efeitos dos diferentes tipos de tecidos sobrepostos em relação aos efeitos em tratamentos similares com um único tipo de tecido – APÊNDICE G. Dado os modelos matemáticos normalmente utilizados e a natureza anisotrópica de tecidos vivos, ou um conjunto destes, o campo elétrico a ser definido para a EQT geralmente atinge magnitudes suficientes para a EP irreversível de certas regiões, em benefício da EP reversível no restante da região tratada.

Como a EP irreversível pode apresentar certa evolução “explosiva” da corrente para pequenos incrementos de tensão, para a validação dos modelos matemáticos em tratamentos com elevadas tensões elétricas, não é possível admitir a EP irreversível de modo amplo (GARCIA *et al.*, 2010), (GUO *et al.*, 2010) e (ELLIS *et al.*, 2011). Embora os critérios entre

EP reversível e irreversível necessitem de esclarecimentos intrínsecos ao próprio fenômeno, este ainda é um bom critério para o desenvolvimento de eletrodos, constrictos às geometrias que privilegiam a distribuição de campo elétrico tão homogêneo quanto possível. O que reforça a aderência quanto a metodologia da avaliação de eletrodos para uso clínico, por exigir níveis semelhantes de EP próximos da EP irreversível para pares de experimentos, indiferente das modelagens matemáticas adotadas, tampouco das suas diferenças de condutividades elétricas, além de outras características a serem discutidas no último tópico deste capítulo.

A eletroporação em *Solanum tuberosum* sem a utilização do marcador vermelho tende a apresentar diferentes colorações para a área de EP reversível e EP irreversível, APÊNDICE B. Entretanto, sem o uso do marcador, geralmente há dificuldades na distinção das fronteiras escurecidas por causa da oxidação dos fluidos que extravasam da amostra. Além das alterações nas tonalidades escurecidas devido às alterações físicas pela perda de água para o ambiente, ocorre também a veloz deterioração e a interferência pelas formações fibrosas não homogêneas no interior dos tubérculos de batata (SUZUKI *et al.*, 2015). Além disto, como este trabalho exige tubérculos de batata de tamanhos maiores do que os geralmente encontrados na literatura sobre EQT, a não homogeneidade ao centro da amostra provavelmente corrobora com relevantes desvios nos resultados das áreas na EP irreversível.

5.1 PROJETO DE ELETRODOS

Em termos de projeto, um dado eletrodo é efetivo quando se tem uma grande região eletroporada para a menor diferença do potencial elétrico imposto a cada par de polos polarizados. Isto implica em uma adequada tendência à distribuição de campo elétrico em uma dada amostra de tecido vivo, o que favorece a avaliação utilitária da geometria quanto as aplicações em EQT. Em clínica, geralmente o tratamento contra neoplasias busca a eliminação completa no menor número de procedimentos. Não raramente isto valida a eletroporação irreversível (VALERIO *et al.*, 2017) e (WAGSTAFF *et al.*, 2016) como benéfica, pois funciona como uma garantia sobre a eliminação do tecido neoplásico, embora a EP irreversível não seja parte dos objetivos da EQT (BERTACCHINI *et al.*, 2007; JOURABCHI *et al.*, 2014). Pois, a EQT busca a seletividade do tratamento com a EP reversível.

Em alguns tecidos animais, por exemplo, o tecido hepático (SEL *et al.*, 2005b) e o tecido da mucosa oral (SUZUKI *et al.*, 2018), o limiar do campo elétrico para o tratamento com a EQT é semelhante ao limiar de marcação (área EP irreversível) no tubérculo de batata

(IVORRA; MIR; RUBINSKY, 2009). Portanto, em alguns casos é possível prever o volume do tratamento animal por meio dos resultados obtidos com tecidos vegetais.

Com a crescente demanda por eletrodos específicos (IZZO *et al.*, 2020; MAGLIETTI *et al.*, 2017; MATTHIESSEN *et al.*, 2011; RITTER *et al.*, 2018), principalmente no âmbito veterinário, para os diversos tipos de neoplasias, nas variadas localidades do organismo de animais de diferentes portes físicos, surge a necessidade pela construção e padronização de eletrodos (CAMPANA *et al.*, 2014a, 2016a; CEMAZAR *et al.*, 2008).

Em um suposto uso clínico, é natural a existência de um planejamento para evitar danos às partes do organismo que sejam sensíveis ao procedimento (MARČAN; KOS; MIKLAVČIČ, 2015). Para os três eletrodos apresentados, o planejamento é crítico no primeiro deles, Figura 8 a-). Este eletrodo oferece a vantagem de trabalhar com um número variado de polos, o que viabiliza diversas configurações. Isto permite tratar desde regiões superficiais até aquelas mais profundas, para diversos volumes totais de tecido de acordo com o número de polos e o comando dado ao eletroporador. Conforme apresentado nas Figura 55 e Figura 56, no capítulo 4, Resultados.

Embasado nos conceitos dos eletrodos verificados na revisão sistemática, aqueles que corroboram na sustentação funcional da família dos três eletrodos apresentados neste trabalho, estão sucintamente representados no APÊNDICE D. Tais contribuições são devidamente associadas às características discutidas a seguir.

Semelhante a reposicionar os polos de um eletrodo “tradicional”, a topologia do primeiro eletrodo apresentado, Figura 8 a-), dispõe de até quatro polos em forma de hastes e um polo em forma de placa circular, cujas polaridades elétricas podem ser comutadas de acordo com a perspectiva do tratamento, similar ao encontrado em alguns trabalhos (SELMA; PAVLIN; MIKLAV, 2007), (REBERŠEK *et al.*, 2008), (COROVIC; ZUPANIC; MIKLAVCIC, 2008), (ŽUPANIČ; ČOROVIĆ; MIKLAVČIČ, 2008), (ADEYANJU; AL-ANGARI; SAHAKIAN, 2012), (BLAGUS *et al.*, 2013), (NICKFARJAM; FIROOZABADI, 2014), (CAMPANA *et al.*, 2014a), (KURATA; NOMURA; TAKAMATSU, 2014), (DENZI *et al.*, 2015), (BONAKDAR *et al.*, 2015), (ONGARO *et al.*, 2016), (GONZÁLEZ *et al.*, 2018) e (BERKENBROCK; MACHADO; SUZUKI, 2018). Este primeiro eletrodo apresentado ampara as aplicações para tecidos distantes da superfície de fixação da placa (NEAL *et al.*, 2010), (KOS *et al.*, 2010), (KURATA; NOMURA; TAKAMATSU, 2014), (GARCIA; DAVALOS; MIKLAVCIC, 2014), (BONAKDAR *et al.*, 2015), (GASBARRINI *et al.*, 2015), (MAGLIETTI *et al.*, 2017), (YAO *et al.*, 2017), (PINTAR *et al.*, 2018) e (CALZADO *et al.*, 2019). Além do

polo em formato circular, possui os demais polos dotados por um segmento intermediário com isolamento elétrico (NEAL *et al.*, 2010), (GARCIA; DAVALOS; MIKLAVCIC, 2014) e (KUNG *et al.*, 2017), com características adequadas a significantes volumes, tolerante a imposição de uma polaridade elétrica distinta das demais ao seu redor, ainda que seja o estado de alta impedância (KOS *et al.*, 2010), (GROSELJ *et al.*, 2015), (ROSSMEISL *et al.*, 2015), (GASBARRINI *et al.*, 2015), (MAGLIETTI *et al.*, 2017), (YAO *et al.*, 2017), (PINTAR *et al.*, 2018) e (CALZADO *et al.*, 2019). E quando os polos das hastes são combinados para uma mesma polaridade em oposição a polaridade da placa em forma de disco, por meio de arranjos de pulsos, contemplam uma grande região com campo elétrico efetivo ao devido tratamento. Ademais, junto às funcionalidades do eletroporador, é possível aplicar os campos elétricos em variadas combinações e sentidos (MAHMOOD; GEHL, 2011) e (ONGARO *et al.*, 2016). Seria um resultado semelhante a reposicionar várias vezes um eletrodo tradicional, o que certamente poupa tempo e reduz as chances de eventuais lesões, por exemplo, em tendões, nervos, vasos sanguíneos calibrosos e demais estruturas (MARČAN; KOS; MIKLAVČIČ, 2015) e (MIR *et al.*, 2006).

O segundo eletrodo, Figura 8 -b), utiliza a calota semiesférica, combinada com um polo em forma de haste e isolamento central, (idêntico às hastes dos demais eletrodos da família). Sua geometria de superfície côncava para o contato elétrico permite tratar regiões em protuberâncias arredondadas, que idealmente possam preencher este espaço. (AGORAMURTHY; CAMPANA; SUNDARARAJAN, 2011) e (DERMOL; MIKLAVČIČ, 2015). As regiões adjacentes ao volume contido na concavidade recebem tratamento por meio da utilização do polo no formato de haste (NEAL *et al.*, 2010), (GARCIA; DAVALOS; MIKLAVCIC, 2014), (DENZI *et al.*, 2015), (BONAKDAR *et al.*, 2015), (KUNG *et al.*, 2017) e (YAO *et al.*, 2017), aplicado através do topo do polo em forma de calota, ou ao redor desta calota, em ângulo de 45°. Este arranjo foi percebido a partir do aperfeiçoamento dos elementos de alguns trabalhos (MIKLAVCIC *et al.*, 2006a), (IVORRA *et al.*, 2008), (BOMMAKANTI *et al.*, 2011), (AGORAMURTHY; CAMPANA; SUNDARARAJAN, 2011), (MAHNIČ-KALAMIZA; KOTNIK; MIKLAVČIČ, 2012), (MARČAN; KOS; MIKLAVČIČ, 2015), (SUZUKI *et al.*, 2018), (ONGARO *et al.*, 2016) e (CAMPANA *et al.*, 2019b). Em geral, regiões de protuberâncias são mais seguras quanto ao planejamento do tratamento. Geralmente, não possuem vasos sanguíneos calibrosos ou nervos importantes a serem afetados negativamente. E devido ao formato protuberante, caso seja extrapolado o campo elétrico a valores compatíveis

à eletroporação irreversível, a eventual necrose pode representar o sucesso em eliminar tecidos neoplásicos (WAGSTAFF *et al.*, 2016) e (VALERIO *et al.*, 2017).

O terceiro eletrodo, Figura 8 c-) não possui partes perfurantes, cujo conceito utilitário pode ser encontrado a partir de certos trabalhos (SODEN *et al.*, 2006) e (MAZÈRES *et al.*, 2009), (LEKNER, 2014) e (HOULIHAN *et al.*, 2017). É um eletrodo de placa em forma de disco com haste central fixa e isolada, dotada de uma extremidade esférica condutora elétrica. Isto é uma importante vantagem no tratamento de cavidades (NICKFARJAM; FIROOZABADI, 2014) e (CAMPANA *et al.*, 2016b). Um exemplo comum de uso a ser citado é para o tratamento em alvéolos dentários (quando na base apresentam-se tecidos neoplásicos), cavidades nasais e tecidos pulmonares. Este último tratado por varredura da superfície externa após a retirada cirúrgica de nódulos (SODEN *et al.*, 2006), (MAZÈRES *et al.*, 2009) e (ONGARO *et al.*, 2016). No caso do tecido pulmonar, quando um nódulo canceroso é desprendido da sua superfície externa, há necessidade de complementar tal procedimento com alguma técnica que recubra a região de segurança ao redor da cavidade remanescente (LEKNER, 2014), (CAMPANA *et al.*, 2016b), (HOULIHAN *et al.*, 2017) e (CAMPANA *et al.*, 2019a). Ainda sobre o terceiro eletrodo, sua utilização pode contar com placas metálicas laterais para a potencialização dos resultados (MIKLAVČIČ *et al.*, 2006a), (ČOROVIĆ *et al.*, 2008), (BOMMAKANTI *et al.*, 2011), (ČOROVIĆ; MIR; MIKLAVČIČ, 2012), (MAHNIČ-KALAMIZA; KOTNIK; MIKLAVČIČ, 2012) e (DERMOL; MIKLAVČIČ, 2015). Eventualmente essas placas laterais podem ser substituídas por gel condutor de elevada viscosidade, para garantir a aderência. A título de exemplo, novamente no tratamento de um alvéolo dentário, na utilização do eletrodo e as placas laterais, poderia ser possível tratar significantes porções de tecidos sem causar perfurações, similar aos experimentos 07 e 08.

A família dos três eletrodos propostos pode ser considerada de uso mais versátil do que as propostas de eletrodos encontrados na revisão sistemática. Quando em tensões adequadas para os tratamentos por EQT, podem contemplar regiões de representativas superfícies e profundidades, por meio de variadas configurações. Deste modo, haverá tendência em mitigar o tempo e esforços gastos durante demoradas varreduras (normalmente feitas com eletrodos de agulhas ou placas) e possibilitar inovações quanto a praticidade.

Os eletrodos apresentados na Tabela 5, no capítulo 4, representam um resumo genérico dos aspectos funcionais dos eletrodos encontrados durante a revisão da literatura, onde itens considerados relevantes são apresentados. Apesar da Tabela 5 contemplar somente grandezas de campo elétrico em detrimento as tensões aplicadas, a literatura apresenta eletrodos

operacionais partir de 300 V até 1 kV, e com raridade são encontrados eletrodos dedicados às tensões na faixa de 2,5 kV até 3,0 kV (STAAL; GILBERT, 2011), eles são limitados por componentes de potência e tem capacidade de corrente em torno de 50 A (BERTACCHINI *et al.*, 2007). Por meio da construção do eletroporador e dos eletrodos para este trabalho, é entendido que estratégias operacionais a partir de 3,0 kV são uma limitação relacionada quase que exclusivamente à eletrônica adotada na implementação para os disparos dos pulsos (LUCIA *et al.*, 2019), (REBERŠEK; MIKLAVČIČ, 2011) e (REBERŠEK *et al.*, 2014). Os componentes eletrônicos pertinentes às deliberações dos pulsos em elevadas tensões exigem *drivers* e proteções para os IGBTs bastante distantes da realidade comercial e de complexa implementação devido aos milhares de Volts envolvidos. Por outro lado, os eletrodos exigem materiais condutores em aço cirúrgico e materiais isolantes como resinas e vidrarias, de fácil acesso comercial e que naturalmente possuem dielétricos suficientes aos campos com milhares de Volts por milímetros. As dificuldades de sustentar e controlar elevados campos elétricos em materiais de baixa impedância (tecidos vivos), operação com isolação elétrica para fornecer um tratamento seguro (LÓPEZ-ALONSO *et al.*, 2019) são fatores que podem limitar o desenvolvimento dos eletrodos.

A família de eletrodos desenvolvidos tem áreas com eficiência de tratamento da EQT entre 5 e 21 cm², conforme Tabela 9. A maior área de tratamento dos eletrodos é dada por Campana *et al.*, 2016 com uma matrix com 67 eletrodos com 255 cm² (CAMPANA *et al.*, 2016b). Os outros eletrodos da Tabela 5 não apresentam áreas maiores que 2 cm². No entanto, a profundidade do campo elétrico para o tratamento adequado da EQT da matriz com 67 eletrodos é de 1 cm. A variação de profundidade da família de eletrodos deste trabalho foi entre 2 a 5 cm. Enquanto que apenas o eletrodo monopolar dos trabalhos de (NEAL *et al.*, 2010), (GARCIA; DAVALOS; MIKLAVCIC, 2014) e (BONAKDAR *et al.*, 2015) apresenta resultado similar, profundidade em torno de 2 cm. A proposta desta família está conectada ao tratamento de porções volumosas, na priorização de tratamentos profundos, aplicados sobre superfícies planas, convexas ou orifícios, com possibilidade de inserção de polos perfurantes ou não perfurantes.

A vantagem da família dos três eletrodos está no tratamento de superfícies de alguns tecidos moles (por exemplo, somente epiderme e derme) e tecidos rígidos (por exemplo, tecido ósseo), e porções de neoplasias no tecido nervoso (em procedimento intracerebral).

5.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a escolha de $N = 9$ amostras úteis, foram utilizadas cerca de 15 a 20 tubérculos de batata para o descarte daquelas com problemas de continuidade no tecido. O erro amostral apresentado foi entre 0,25 e 0,76 para as correntes elétricas e entre 0,38 e 1,87 para as áreas totais eletroporadas. Desta forma, como os testes com o corante permitiam a distinção das regiões sensibilizadas pela poração, este procedimento foi adotado com a finalidade de permitir a adequada distinção e contabilização da área eletroporada, em vermelho devido ao marcador aplicado.

Os menores erro relativos de todos os eletrodos para as correntes elétricas são de C04 e C05. Foram obtidos erros relativos de 0,90 % e 2,16 %, Tabela 7, da corrente elétrica, respectivamente. Os menores erros relativos de todos os eletrodos para as áreas totais eletroporadas são de A02 e A05, onde foram obtidos $-0,60$ % e 4,29 %, Tabela 10, de áreas totais eletroporadas, respectivamente. Isso rotula o experimento 05 e o eletrodo de calota com a haste inserida lateralmente, em ângulo de 45° , como o eletrodo de melhores resultados passíveis à validação com o modelo matemático da evolução da condutividade elétrica em tecidos vegetais, em função do campo elétrico.

Os maiores erros relativos para as correntes elétricas ocorreram em C02 com $-22,61$ % e em C06 com $-41,31$ %. O ensaio A02 com $-0,60$ %, é o menor valor em módulo para as áreas totais eletroporadas de todos os experimentos de áreas, e o ensaio A06 com $-23,86$ %, o maior valor em módulo para as áreas totais eletroporadas de todos os experimentos de áreas.

Assim, frente aos valores dos desvios padrão, dos testes de normalidade e da significância amostral em 95 % aprovada em testes e erros amostrais relativamente pequenos, a escolha do $N = 9$ foi considerado suficiente para a análise estatística, tal como é feita de forma recorrente nos trabalhos encontrados na literatura científica sobre o assunto. Os resultados finais dessa abordagem estatística fazem sentido quando vários eletrodos distintos são estudados e comparados. Porém, a partir da obtenção do erro relativo percentual de cada experimento (Tabela 7 e Tabela 10), torna-se evidente a ausência de alguma lógica clara, o que pode indicar a existência de regiões com distribuições não lineares nos experimentos da família de eletrodos e disparidades do modelo matemático simulado frente as não homogeneidades nos experimentos em extensas regiões do tubérculo de batata.

Na literatura, a avaliação de modelos matemáticos utiliza eletrodos capazes de impor campo elétrico considerado uniforme (IVORRA, 2010; SEL *et al.*, 2005a). Desta forma, essa é uma limitação para a validação dos três eletrodos propostos por meio da modelagem largamente adotada na literatura: avaliações estatísticas que normalmente conduzem aos parâmetros apresentados na Tabela 7 e na Tabela 10, no capítulo 4, Resultados.

Desta maneira, é possível compreender a falta de padronização nos trabalhos publicados em artigos, pois nada foi encontrado a este respeito nas pesquisas em bases de dados. Neste sentido, na família dos três eletrodos apresentados neste estudo, não houve informações passíveis de padronização segundo uma análise estatística comum, tampouco oferece colaboração com o emprego dos eletrodos em trabalhos de EQT.

5.3 ANÁLISE QUANTITATIVA

Esta proposta metodológica contribui com a avaliação do desempenho de eletrodos para EQT, na busca de resultados próximos do uso clínico, antes de qualquer aplicação em animais.

A metodologia correlaciona os resultados *in silico* e *in vivo* de um *phantom* vegetal, em seguida correlaciona os resultados *in silico* com *Solanum tuberosum* e os resultados *in silico* de um tecido neoplásico (de elevada condutividade elétrica), e denota respostas quantitativas. Nos experimentos deste trabalho o eletrodo varia configurações de campo elétrico, com a permuta de polos eletricamente ativos, ou eletrodos com um dos polos no formato de uma superfície ampla ao se comparar a qualquer outro polo em uso. Lembrando que a aplicação desta metodologia em um dado eletrodo (externo a este trabalho), não necessita que o eletrodo seja passível de variadas configurações dos seus polos.

Apesar do modelo matemático adotado nas simulações computacionais e da possível tendência não linear no espalhamento de parte considerável do campo elétrico entre os polos e as relações das regiões eletroporadas reversível e irreversivelmente, há correlações expressivas entre a teoria e a prática adotadas, de maneira a mitigar fatores sistêmicos que possam impactar um dos grupos de amostras em detrimento do outro, APÊNDICE E. Neste caso, em termos de natureza, podem ser consideradas irrelevantes as diferenças de condutividade elétrica dos tubérculos utilizados e os valores das tensões nos patamares próximos a saturação do consequente campo elétrico aplicado, desde que os experimentos obedeçam a mesma ordem das diferenças no posicionamento dos polos dos eletrodos. No entanto, há um requisito

importante quanto as amostragens para a correlações de Pearson: a aprovação em algum teste de normalidade (MIOT, 2018) e (PERROCA; GAIDZINSKI, 2002). A organização das amostragens e os resultados quanto a normalidade estão no APÊNDICE E, na Tabela 16 para a correlação α , na Tabela 17 para a correlação β , na Tabela 18 para a correlação γ e na Tabela 19 para a correlação δ .

Com as quatro correlações aplicadas nos conjuntos de valores obtidos dos diferentes eletrodos em circunstâncias variadas de situações, foram logrados resultados “fortes”. Por meio desse estudo é possível notar a possibilidade de transitar entre modelos e experimentos tão diversos quanto os elaborados no trabalho, com mínimos problemas de distorções nos resultados. Isto implica na possibilidade de utilizar os eletrodos em tecidos *in vivo* com prévia noção refinada das regiões tratadas pela EQT. As avaliações quantitativas pela correlação de Pearson se mostram úteis para apresentar o quanto dois conjuntos de amostras são de proporções semelhantes, mesmo em escalas diferentes de tensões, correntes elétricas e condutividades elétricas. Assim, esta metodologia de padronização de eletrodos de EQT pelas letras gregas α , β , γ e δ pode representar um padrão de avaliação antes do uso em animais.

Para a família de eletrodos proposta, foram obtidas as letras gregas com os seguintes valores: $\alpha = 97,15 \%$, $\beta = 98,67 \%$, $\gamma = 77,10 \%$ e $\delta = 99,38 \%$. Em busca de uma justificativa para estas fortes correlações, encontra-se que o motivo significativo seja a utilização de eletroporações em tensões que conduzam a semelhantes níveis de saturação (início da eletroporação irreversível) no tecido do tubérculo de batata e no tecido neoplásico. Em busca da justificativa para a correlação $\gamma = 77,10 \%$ destoar das demais, é suspeito que o processo manual de seleção da imagem considerada eletroporada tenha sido problemático. Isto ganha importância devido à dificuldade visual em contornar a área tingida pelo marcador vermelho, pois tal área não possui fronteiras exatas com a cor amarelada do tubérculo de batata. Desta maneira a contabilização da área experimental é suspeita de deficiências frente a área calculada pelo *software* simulador. Da mesma forma, ainda que adotadas modelagens distintas e parâmetros de tecidos também distintos, foi obtida a correlação $\delta = 99,38 \%$.

Em linhas gerais, a seguir são listadas as considerações finais para a apresentação completa de eletrodos padronizados para a EQT:

- No caso de valores práticos, apresentar o número N adotado para a quantidade de amostras adquiridas para a média, estas que preenchem os conjuntos a serem

correlacionados. E o respectivo resultado quanto a normalidade e significância de cada um destes conjuntos;

- Representação do trem de pulsos da tensão elétrica;
- Resultados das correlações entre amostras simuladas e experimentais de um *phantom* (neste caso o *Solanum tuberosum*, cujos parâmetros alimentam o modelo matemático da simulação);
- Resultados das correlações entre amostras simuladas do tecido animal de elevada condutividade elétrica (neste trabalho o tecido tumoral foi adotado, alvo natural da EQT) e amostras simuladas com os parâmetros do *phantom* (*Solanum tuberosum*);
- Imagens de simulação computacional com o volume tratado marcado na imagem (pelos parâmetros do mesmo tecido animal das correlações), suas cotas em milímetros e das partes relevantes dos polos do eletrodo.

A título de sugestão quanto a aplicação, no caso de caracterizar eletrodos como os de agulhas ou par de placas, é sugerido que as simulações e as práticas laboratoriais sejam realizadas com determinadas variações nas distâncias dos seus respectivos polos. Assim, os valores de α , β , γ e δ são os valores representativos da padronização, e valores de tensão aplicada no trem de pulsos, a corrente elétrica e a área (total) eletroporada, podem ser apresentadas como informações opcionais.

6 CONCLUSÃO

A pesquisa realizada nesta tese decorre da necessidade de eletrodos para a EQT adequados às regiões tumorais com consideração às margens cirúrgicas e de uma metodologia suficiente à avaliação e padronização de eletrodos próximo do uso clínico, sem que cobaias animais sejam solicitadas, buscando reduzir seu uso nas metodologias para o desenvolvimento de novos eletrodos.

Para a idealização de novos eletrodos na técnica de EQT, foi efetivada a busca por anterioridades na literatura científica. Durante esta busca, trabalhou-se no aprimoramento conceitual de eletrodos adequados às regiões consideradas grandes para a técnica, como normalmente é empregada. Em seguida, a viabilidade e utilidade deste trabalho foram testadas com a construção do eletroporador, dos eletrodos e aquisição dos dados experimentais.

Os eletrodos propostos (a família dos três eletrodos) não apresentaram similaridade com nenhum outro apresentado pela revisão da literatura. Os experimentos e simulações desenvolvidos e a revisão da literatura demonstraram que as vantagens em relação aos eletrodos existentes são o tratamento com porções volumosas com profundidades que normalmente são alcançadas apenas por meios cirúrgicos. E as aplicações especificam o eletrodo pela sua geometria, através das condições de superfícies planas, convexas ou orifícios, de modo a oferecer possibilidades de inserção de polos perfurantes ou não perfurantes.

A família dos três eletrodos foi apresentada junto aos experimentos *in silico* e *in vitro* do tecido vegetal. Para a validação dos eletrodos, foram utilizados dois modelos computacionais: um para o tecido do tubérculo de batata e outro adequado à neoplasia.

Na busca de uma metodologia para a avaliação dos eletrodos quanto ao uso clínico, foi necessário propor uma padronização. Como os eletrodos são caracterizados por um dos polos de grande superfície e os demais polos iguais entre si, foi pensado que há uma consistência na natureza dos resultados, independente de fatores sistêmicos como a tensão aplicada, corrente elétrica, condutividade elétrica do tecido e a eventuais modelagens matemáticas utilizadas nos experimentos práticos e teóricos. A correlação avalia proporções no conjunto sequencial de dados, então, a condição necessária nos experimentos independentes é o nível de saturação (condições próximas ao início da EP irreversível), recomendada em seus limiares iniciais para a preparação das amostras e simulações computacionais. No presente trabalho, a padronização foi obtida para os três eletrodos, cujos dados alimentaram as correlações de Pearson em uma resposta quantitativa. Como apresentado no capítulo de Resultados, as correlações $\alpha = 97,15 \%$,

$\beta = 98,67 \%$, $\gamma = 77,10 \%$ e $\delta = 99,38\%$ recebem a classificação de relevante impacto, pertinentes a correlações fortes (KOZAK; KRZANOWSKI; TARTANUS, 2012) e (KOZAK, 2009).

Esta tese produziu resultados técnicos e práticos que sugerem novas investigações. Novas pesquisas e protótipos estão em andamento desde meados do ano de 2018, cujo intuito é dar continuidade ao estudo da EQT a partir das realizações atuais.

6.1 TRABALHOS EM DESENVOLVIMENTO

- Desenvolvimento de um artigo de revisão com a proposta da padronização de parâmetros elétricos característicos dos eletrodos nas publicações dedicadas a EQT;
- Desenvolvimento do *hardware* para a proteção efetiva dos IGBTs no projeto dos *drivers* do eletroporador construído neste trabalho;
- Finalização do *firmware* para o eletroporador utilizar o seu *hardware* nativo de aquisição dos sinais de tensão e corrente;
- Desenvolvimento dos eletrodos para o uso veterinário, com materiais inertes, autoclaváveis e reutilizáveis.

6.2 TRABALHOS FUTUROS

- Disponibilizar o eletroporador para uso clínico veterinário, com intuito da obtenção dos dados devido aos tratamentos de casos reais;
- Utilização da família de eletrodos propostas nesse trabalho em tecidos animais;
- Investigação histopatológica da marcação por corantes e busca por substâncias para apresentar colorações de acordo com a intensidade da eletroporação em tubérculos de batata;
- Definir os parâmetros estatísticos para a melhor utilização das correlações em uma metodologia para a validação de diferentes modelos matemáticos, cada qual entre os devidos limites específicos, de maneiras a avaliar quantitativamente a extrapolação de resultados, como os apresentados neste trabalho, e pertinentes a lógica frente às seguintes possibilidades:
 - i- Os valores das médias experimentais e os valores simulados, ambos de tecidos animais;

- ii- Os valores das médias experimentais de tubérculos de batata e os valores das médias experimentais de tecidos animais.
- Melhoria no projeto do eletroporador para outros protocolos de disparo, por exemplo, trens de pulsos de 1 *kHz* até 5 *kHz*;
- Promover um estudo teórico das correlações a seguir podem ser úteis para testar a validação das correlações apresentadas neste trabalho:
 - i- Os valores das médias experimentais e os valores simulados de tecidos animais;
 - ii- Os valores das médias experimentais de tubérculos de batata e os valores das médias experimentais de tecidos animais.

7 PERSPECTIVAS

Este trabalho apresenta eletrodos para o tratamento de grandes volumes (área e profundidade) quando comparado a eletrodos normalmente utilizados na eletroquimioterapia. No entanto, alguns detalhes da análise teórica e experimental necessitam de esforços na pesquisa nos seguintes aspectos:

- Análise teórica da condutividade nas regiões de eletroporação irreversível;
- Unificação do modelo de eletroporação reversível com um modelo irreversível a ser desenvolvido;
- Melhorias no projeto dos *drivers* de IGBTs, estes que não estão devidamente protegidos quando nas aplicações em tecido vivo ocorre a abertura de arcos elétricos;
- Melhorias no *firmware* do eletroporador para aplicação de pulsos de características totalmente configuráveis pelo usuário.

O *hardware* do eletroporador desenvolvido neste trabalho necessita de poucos refinamentos para a utilização pré-clínica. Numerosas características foram inspiradas em melhorias sobre os aparelhos comerciais que tivemos acesso. Sob esse aspecto, deve-se destacar a capacidade em manter trens de pulsos retangulares com praticamente a mesma amplitude inicial, autonomia estendida a várias horas com o uso de baterias internas ao eletroporador, recarregadas pelo próprio equipamento, *software* capaz de comandar pulsos em eletrodos que impõe campo elétrico em múltiplas direções no tecido e isolamento galvânico da rede elétrica.

REFERÊNCIAS

ADEYANJU, O. O.; AL-ANGARI, H. M.; SAHAKIAN, A. V. The optimization of needle electrode number and placement for irreversible electroporation of hepatocellular carcinoma. **Radiology and Oncology**, v. 46, n. 2, p. 126–135, 2012.

AGORAMURTHY, P.; CAMPANA, L.; SUNDARARAJAN, R. Finite element modeling and analysis of human breast tissue for electrochemotherapy. **Annual Report - Conference on Electrical Insulation and Dielectric Phenomena, CEIDP**, p. 191–194, 2011.

ALDRICK, J. Institute of Mathematical Statistics is collaborating with JSTOR to digitize, preserve, and extend access to Statistical Science. ® www.jstor.org. **Statistical Science**, v. 10, n. 1, p. 364–376, 1995.

B. MAINIER, F. Corrosion in surgical instruments. **IOSR Journal of Engineering**, v. 3, n. 10, p. 25–31, out. 2013.

BASKAR, R.; LEE, K. A.; YEO, R.; YEOH, K. W. Cancer and radiation therapy: Current advances and future directions. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 3, p. 193–199, 2012.

BELEHRADEK, J.; ORLOWSKI, S.; PODDEVIN, B.; PAOLETTI, C.; MIR, L. M. Electrochemotherapy of Spontaneous Mammary Tumours in Mice. **EurJ Cancer**, v. 27, n. 1, p. 73–76, 1991.

BERKENBROCK, J. A.; BRASIL, G.; AFRÂNIO, P.; ANTÔNIO, D. C.; SUZUKI, D. O. H. Verification of Electroporation Models Using the Potato Tuber as In Vitro Simulation. **Journal of Medical and Biological Engineering**, v. 39, n. 02 April 2019, p. 224–229, 2019.

BERKENBROCK, J. A.; MACHADO, R. G.; SUZUKI, D. O. H. Electrochemotherapy Effectiveness Loss due to Electric Field Indentation between Needle Electrodes: A Numerical Study. **Journal of Healthcare Engineering**, v. 2018, p. 1–8, 2 jul. 2018.

BERKENBROCK, J. A.; PINTARELLI, G.; ANTÔNIO, A.; SUZUKI, D. O. H. In Vitro Simulation of Electroporation Using Potato Model. **CMBES Proceedings**, p. 5, 2018.

BERNARDIS, A.; BULLO, M.; CAMPANA, L. G.; DI BARBA, P.; DUGHIERO, F.; FORZAN, M.; MOGNASCHI, M. E.; SGARBOSSA, P.; SIENI, E. Electric field computation and measurements in the electroporation of inhomogeneous samples. **Open Physics**, v. 15, n. 1, p. 790–796, 2017.

BERTACCHINI, C.; MARGOTTI, P. M.; BERGAMINI, E.; LODI, A.;

RONCHETTI, M.; CADOSSO, R. Design of an irreversible electroporation system for clinical use. **Technology in Cancer Research and Treatment**, v. 6, n. 4, p. 313–320, 2007.

BLAGUS, T.; MARKELC, B.; CEMAZAR, M.; KOSJEK, T.; PREAT, V.; MIKLAVCIC, D.; SERSA, G. In vivo real-time monitoring system of electroporation mediated control of transdermal and topical drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 172, n. 3, p. 862–871, 2013.

BLAIR, R. C.; HIGGINS, J. J. The Power of t and Wilcoxon Statistics: A Comparison. **Evaluation Review**, v. 4, n. 5, p. 645–656, 1980.

BOMMAKANTI, S.; AGORAMURTHY, P.; CAMPANA, L.; SUNDARARAJAN, R. A simulation analysis of large multi-electrode needle arrays for efficient electrochemotherapy of cancer tissues. **Annual Report - Conference on Electrical Insulation and Dielectric Phenomena, CEIDP**, p. 187–190, 2011.

BONAKDAR, M.; LATOUCHE, E. L.; MAHAJAN, R. L.; DAVALOS, R. V. The feasibility of a smart surgical probe for verification of IRE treatments using electrical impedance spectroscopy. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 62, n. 11, p. 2674–2684, 2015.

BOUZAS, L. F. S. Transplante De Medula Óssea Em Pediatria E Transplante De Cordão Umbilical. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 33, n. 3, p. 241, 2000.

BOX, G.E.P., HUNTER, W.G. AND HUNTER, J. S. Statistics for Experimenters. **John Wiley & Sons, Inc.**, v. 25, n. 2, p. 664, 1978.

CALVET, C. Y.; THALMENSI, J.; LIARD, C.; PLIQUET, E.; BESTETTI, T.; HUET, T.; LANGLADE-DEMOYEN, P.; MIR, L. M. Optimization of a gene electrotransfer procedure for efficient intradermal immunization with an hTERT-based DNA vaccine in mice. **Molecular Therapy — Methods & Clinical Development**, v. 1, n. May, p. 14045, set. 2014.

CALZADO, E. M.; RODRÍGUEZ, J. L. G.; CABRALES, L. E. B.; GARCÍA, F. M.; CASTAÑEDA, A. R. S.; DELGADO, I. M. G.; TORRES, L. M.; URIBAZO, F. V. G.; GONZÁLEZ, M. M.; BROOKS, S. C. A.; GONZÁLEZ, T. R.; ORIA, E. J. R.; ROGER, L. L. B.; FIGUEROA, H. E. H.; PÉREZ, G. D. Simulations of the electrostatic field, temperature, and tissue damage generated by multiple electrodes for electrochemical treatment. **Applied Mathematical Modelling**, v. 76, p. 699–716, 2019.

CAMPANA, L. G.; CLOVER, A. J. P.; VALPIONE, S.; QUAGLINO, P.; GEHL, J.; KUNTE, C.; SNOJ, M.; CEMAZAR, M.; ROSSI, C. R.; MIKLAVCIC, D.; SERSA, G. **Recommendations for improving the quality of reporting clinical electrochemotherapy**

studies based on qualitative systematic review **Radiology and Oncology**, 2016a.

CAMPANA, L. G.; DI BARBA, P.; DUGHIERO, F.; FORZAN, M.; MOGNASCHI, M. E.; RIZZO, R.; SIENI, E. Non-parallelism of needles in electroporation: 3D computational model and experimental analysis. **COMPEL - The International Journal for Computation and Mathematics in Electrical and Electronic Engineering**, v. 38, n. 1, p. 348–361, 2019a.

CAMPANA, L. G.; DI BARBA, P.; MOGNASCHI, M. E.; BULLO, M.; DUGHIERO, F.; FORZAN, M.; SGARBOSSA, P.; SPESSOT, E.; SIENI, E. Electrical resistance in inhomogeneous samples during electroporation. **SMACD 2017 - 14th International Conference on Synthesis, Modeling, Analysis and Simulation Methods and Applications to Circuit Design**, p. 1–4, 2017.

CAMPANA, L. G.; DUGHIERO, F.; FORZAN, M.; ROSSI, C. R.; SIENI, E. A prototype of a flexible grid electrode to treat widespread superficial tumors by means of Electrochemotherapy. **Radiology and Oncology**, v. 50, n. 1, p. 49–57, 2016b.

CAMPANA, L. G.; EDHEMOVIC, I.; SODEN, D.; PERRONE, A. M.; SCARPA, M.; CAMPANACCI, L.; CEMAZAR, M.; VALPIONE, S.; MIKLAVČIČ, D.; MOCELLIN, S.; SIENI, E.; SERSA, G. Electrochemotherapy – Emerging applications technical advances, new indications, combined approaches, and multi-institutional collaboration. **European Journal of Surgical Oncology**, v. 45, n. 2, p. 92–102, 2019b.

CAMPANA, L. G.; MALI, B.; SERSA, G.; VALPIONE, S.; GIORGI, C. A.; STROJAN, P.; MIKLAVCIC, D.; ROSSI, C. R. Electrochemotherapy in non-melanoma head and neck cancers: A retrospective analysis of the treated cases. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 52, n. 10, p. 957–964, 2014a.

CAMPANA, L. G.; MALI, B.; SERSA, G.; VALPIONE, S.; GIORGI, C. A.; STROJAN, P.; MIKLAVCIC, D.; ROSSI, C. R. Electrochemotherapy in non-melanoma head and neck cancers: a retrospective analysis of the treated cases. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 52, n. 10, p. 957–964, dez. 2014b.

CASTELLVÍ, Q.; BANÚS, J.; IVORRA, A. 3D Assessment of Irreversible Electroporation Treatments in Vegetal Models. **BERG Biomedical Electronics Research Group Research Group**, v. 53, p. 294–297, 2016.

CEMAZAR, M.; TAMZALI, Y.; SERSA, G.; TOZON, N.; MIR, L. M.; MIKLAVCIC, D.; LOWE, R.; TEISSIE, J. Electrochemotherapy in Veterinary Oncology. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v. 22, n. 4, p. 826–831, jul. 2008.

COHEN, J. **Statistical power analysis for the behavioral sciences**. 2nd. ed. [s.l.]:

Routledge, 1988.

ČOROVIĆ, S.; AL SAKERE, B.; HADDAD, V.; MIKLAVČIČ, D.; MIR, L. M. Importance of Contact Surface between Electrodes and Treated Tissue in Electrochemotherapy. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 7, n. 5, p. 393–399, out. 2008.

COROVIC, S.; LACKOVIC, I.; SUSTARIC, P.; SUSTAR, T.; RODIC, T.; MIKLAVCIC, D. Modeling of electric field distribution in tissues during electroporation. **BioMedical Engineering OnLine**, v. 12, n. 1, p. 16, 2013.

ČOROVIĆ, S.; MIR, L. M.; MIKLAVČIČ, D. In vivo muscle electroporation threshold determination: Realistic numerical models and in vivo experiments. **Journal of Membrane Biology**, v. 245, n. 9, p. 509–520, 2012.

COROVIC, S.; ZUPANIC, A.; MIKLAVCIC, D. Numerical modeling and optimization of electric field distribution in subcutaneous tumor treated with electrochemotherapy using needle electrodes. **IEEE Transactions on Plasma Science**, v. 36, n. 4 PART 3, p. 1665–1672, 2008.

COUNCIL, J. G.; BARBEE, R. W.; JOSEPH, T. B. **GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS**. Eighth ed. Washington, D.C.: The National Academies Press, 2010.

DA SILVA, L. A. S. R. Cirurgia oncológica: Um grande desafio. **Revista do Colegio Brasileiro de Cirurgioes**, v. 43, n. 3, p. 139–140, 2016.

DAMIANI, T. B. **Estudo in silico do uso de modelo tridimensional realista via tomografia computadorizada da eletroquimioterapia no tratamento de tumor oral**. Universidade Federal de Santa Catarina, 2017.

DAVALOS, R. V.; MIR, L. M.; RUBINSKY, B. Tissue Ablation with Irreversible Electroporation. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 33, n. 2, p. 223–231, fev. 2005.

DAVID S. MOORE; MCCABE, G. P.; A., C. B. **Introduction to the Practice of Statistics**. 6th. ed. New York, NY: W. H. Freeman, 1996.

DEAN, D. A. Electroporation of the vasculature and the lung. **DNA and cell biology**, v. 22, n. 12, p. 797–806, dez. 2003.

DENZI, A.; STRIGARI, L.; DI FILIPPO, F.; BOTTI, C.; DI FILIPPO, S.; PERRACCHIO, L.; RONCHETTI, M.; CADOSSO, R.; LIBERTI, M. Modeling the positioning of single needle electrodes for the treatment of breast cancer in a clinical case. **BioMedical Engineering Online**, v. 14, n. Suppl 3, p. 1–14, 2015.

DERMOL, J.; MIKLAVČIČ, D. Mathematical Models Describing Chinese Hamster

Ovary Cell Death Due to Electroporation In Vitro. **Journal of Membrane Biology**, v. 248, n. 5, p. 865–881, 2015.

DEXTER, F. Wilcoxon-mann-whitney test used for data that are not normally distributed. **Anesthesia and Analgesia**, v. 117, n. 3, p. 537–538, 2013.

DÍAZ, E.; OSUNA, R. Understanding spurious correlation: A rejoinder to Kliman. **Journal of Post Keynesian Economics**, v. 31, n. 2, p. 357–362, 2008.

DINE, J.; GORDON, R.; SHAMES, Y.; KASLER, M. K.; BARTON-BURKE, M. Immune Checkpoint Inhibitors: An Innovation in Immunotherapy for the Treatment and Management of Patients with Cancer of immunotherapies reflects a promising new approach to cancer treatment involving activation of the immune system against cancer. **Immune. Asia-Pacific J. Oncology Nursing**, v. 4, p. 127–35, 2017.

ELLIS, T. L.; GARCIA, P. A.; ROSSMEISL, J. H.; HENAO-GUERRERO, N.; ROBERTSON, J.; DAVALOS, R. V. Nonthermal irreversible electroporation for intracranial surgical applications: Laboratory investigation. **Journal of Neurosurgery**, v. 114, n. 3, p. 681–688, 2011.

FINI, M.; SALAMANNA, F.; PARRILLI, A.; MARTINI, L.; CADOSSO, M.; MAGLIO, M.; BORSARI, V. Electrochemotherapy is effective in the treatment of rat bone metastases. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 30, n. 8, p. 1033–1045, 7 dez. 2013.

FUCHS, Y.; STELLER, H. Programmed cell death in animal development and disease. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 742–758, 2011.

GALLINATO, O.; DE SENNEVILLE, B. D.; SEROR, O.; POIGNARD, C. Numerical workflow of irreversible electroporation for deep-seated tumor. **Physics in Medicine and Biology**, v. 64, n. 5, p. 0–12, 2019.

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, 2014.

GARCIA, P. A.; ROSSMEISL, J. H.; ROBERT, J.; II, E. N.; ROBERTSON, J.; DAVALOS, R. V. Intracranial Nonthermal Irreversible Electroporation : In Vivo Analysis. **J. Membr Biol.**, n. 236, p. 127–136, 2010.

GASBARRINI, A.; CAMPOS, W. K.; CAMPANACCI, L.; BORIANI, S. Electrochemotherapy to metastatic spinal melanoma: A novel treatment of spinal metastasis? **Spine**, v. 40, n. 24, p. E1340–E1346, 2015.

GEHL, J.; SERSA, G.; MATTHIESSEN, L. W.; MUIR, T.; 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.; GEHL, J.; SERSA, G.; MATTHIESSEN, L. W.; MUIR, T.; OCCHINI, A.; QUAGLINO, P.; CURATOLO, P.; CAMPANA, L. G.; KUNTE, C.; CLOVER, J. P.; BERTINO, G.; FARRICHA, V.; ODILI, J.; DAHLSTROM, K.; BENAZZO, M. Updated standard operating procedures for electrochemotherapy of cutaneous tumours and skin metastases. **Acta Oncologica**, v. 57, n. 7, p. 874–882, 2018.

GEHL, J.; SKOVSGAARD, T.; MIR, L. M. Enhancement of cytotoxicity by electropermeabilization. **Anti-Cancer Drugs**, v. 9, n. 4, p. 319–326, abr. 1998.

GONZÁLEZ, M. M.; AGUILAR, C. H.; PACHECO, F. A. D.; CABRALES, L. E. B.; REYES, J. B.; NAVA, J. J. G.; AMBROSIO, P. E.; DOMIGUEZ, D. S.; GONZÁLEZ, V. G. S.; PUPO, A. E. B.; CIRIA, H. M. C.; ALEMÁN, E. I.; GARCÍA, F. M.; RIVAS, C. B.; REINA, E. C. Tissue damage, temperature, and pH induced by different electrode arrays on potato pieces (*Solanum tuberosum* L.). **Frontiers in Oncology**, v. 8, n. APR, p. 1–12, 2018.

GRAY-SCHOPFER, V.; WELLBROCK, C.; MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851–857, 2007.

GROSELJ, A.; KOS, B.; CEMAZAR, M.; URBANCIC, J.; KRAGELJ, G.; BOSNJAK, M.; VEBERIC, B. Coupling treatment planning with navigation system : a new technological approach in treatment of head and neck tumors by electrochemotherapy. v. 14, n. Suppl 3, p. 1–14, 2015.

GUERRA, M. R.; BUSTAMANTE-TEIXEIRA, M. T.; CORRÊA, C. S. L.; DE ABREU, D. M. X.; CURADO, M. P.; MOONEY, M.; NAGHAVI, M.; TEIXEIRA, R.; FRANÇA, E. B.; MALTA, D. C. Magnitude and variation of the burden of cancer mortality in Brazil and Federation Units, 1990 and 2015. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 20, n. 25000192049, p. 102–115, 2017.

GUO, Y.; ZHANG, Y.; KLEIN, R.; NIJM, G. M.; SAHAKIAN, A. V.; OMARY, R. A.; YANG, G. Y.; LARSON, A. C. Irreversible electroporation therapy in the liver: Longitudinal efficacy studies in a rat model of hepatocellular carcinoma. **Cancer Research**, v. 70, n. 4, p. 1555–1563, 2010.

HIELKO E.GROMMERS; DO A.VAN DER KROGT. Potato Starch: Production, Modifications and Uses. In: JAMES, B.; WHISTLER, R. (Eds.). **Potato Starch: Production, Modifications and Uses**. 3. ed. [s.l.]: Elsevier Inc., 2009. p. 511–539.

HOULIHAN, R.; GRYGORYEV, K.; NING, Z.; WILLIAMS, J.; MOORE, T.;

O'MAHONY, C. Finite-element modelling and preliminary validation of microneedle-based electrodes for enhanced tissue electroporation. **Proceedings of the Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society, EMBS**, p. 3572–3575, 2017.

IVORRA, A. Tissue Electroporation as a Bioelectric Phenomenon: Basic Concepts. In: RUBINSKY, B. (Ed.). **Irreversible Electroporation**. 1. ed. [s.l.]: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010. p. 23–61.

IVORRA, A.; AL-SAKERE, B.; RUBINSKY, B.; MIR, L. M. Use of conductive gels for electric field homogenization increases the antitumor efficacy of electroporation therapies. **Physics in Medicine and Biology**, v. 53, n. 22, p. 6605–6618, 2008.

IVORRA, A.; MIR, L. M.; RUBINSKY, B. Electric field redistribution due to conductivity changes during tissue electroporation: Experiments with a simple vegetal model. **IFMBE Proceedings**, v. 25, n. 13, p. 59–62, 2009.

IVORRA, A.; RUBINSKY, B. In vivo electrical impedance measurements during and after electroporation of rat liver. **Bioelectrochemistry**, v. 70, n. 2, p. 287–295, 2007a.

IVORRA, A.; RUBINSKY, B. Electric field modulation in tissue electroporation with electrolytic and non-electrolytic additives. **Bioelectrochemistry**, v. 70, n. 2, p. 551–560, maio 2007b.

IVORRA, A.; RUBINSKY, B.; MIR, L. M. Electric field redistribution during tissue electroporation: its potential impact on treatment planning. **IFMBE proceedings**, v. 25, n. 13, p. 59–62, 2010.

IZZO, F.; IONNA, F.; GRANATA, V.; ALBINO, V.; PATRONE, R.; LONGO, F.; GUIDA, A.; DELRIO, P.; REGA, D.; SCALA, D.; PEZZUTO, R.; FUSCO, R.; DI BERNARDO, E.; D'ALESSIO, V.; GRASSI, R.; CONTARTESE, D.; PALAIA, R. New deployable expandable electrodes in the electroporation treatment in a pig model: A feasibility and usability preliminary study. **Cancers**, v. 12, n. 2, 2020.

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, 2014.

KOS, B.; ZUPANIC, A.; KOTNIK, T.; SNOJ, M.; SERSA, G.; MIKLAVCIC, D. Robustness of Treatment Planning for Electrochemotherapy of Deep-Seated Tumors. **The Journal of Membrane Biology**, v. 236, n. 1, p. 147–153, 2 jul. 2010.

KOZAK, M. What is strong correlation? **Teaching Statistics**, v. 31, n. 3, p. 85–86,

2009.

KOZAK, M.; KRZANOWSKI, W.; TARTANUS, M. Use of the correlation coefficient in agricultural sciences: Problems, pitfalls and how to deal with them. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 84, n. 4, p. 1147–1156, 2012.

KUNG, Y.; LIHACHEV, A.; ŠATKAUSKAS, S.; LAN, K. L.; CHEN, W. S. Electroporation by concentric-type needle electrodes and arrays. **Bioelectrochemistry**, v. 118, p. 31–37, 2017.

KURATA, K.; NOMURA, S.; TAKAMATSU, H. Three-dimensional analysis of irreversible electroporation: Estimation of thermal and non-thermal damage. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 72, p. 66–74, 2014.

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.

LEKNER, J. Electroporation in cancer therapy without insertion of electrodes. **Physics in Medicine and Biology**, v. 59, n. 20, p. 6031–6042, 2014.

LIDE, D. R. **CRC Handbook of Chemistry and Physics**. 84. ed. Washington, DC: CRC Press, 2003.

LÓPEZ-ALONSO, B.; HERNÁEZ, A.; SARNAGO, H.; NAVAL, A.; GÜEMES, A.; JUNQUERA, C.; BURDÍO, J. M.; CASTIELLA, T.; MONLEÓN, E.; GRACIA-LLANES, J.; BURDIO, F.; MEJÍA, E.; LUCÍA, O. Histopathological and Ultrastructural Changes after Electroporation in Pig Liver Using Parallel-Plate Electrodes and High-Performance Generator. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019.

LOTTI, R. S.; MACHADO, A. W.; MAZZIEIRO, Ê. T.; LANDRE JÚNIOR, J. Aplicabilidade científica do método dos elementos finitos. **Revista Dental Press de Ortodontia e Ortopedia Facial**, v. 11, n. 2, p. 35–43, abr. 2006.

LUCIA, O.; SARNAGO, H.; GARCIA-SANCHEZ, T.; MIR, L. M.; BURDIO, J. M. Industrial Electronics for Biomedicine: A New Cancer Treatment Using Electroporation. **IEEE Industrial Electronics Magazine**, v. 13, n. 4, p. 6–18, 2019.

LV, Y.; CHENG, X.; CHEN, S.; LIU, H.; WANG, Y.; YAO, C.; RUBINSKY, B. Analysis of the electric field-dependent current during electroporation pulses. **IEEE Access**, v. 8, p. 93850–93856, 2020.

MAGLIETTI, F.; TELLADO, M.; DE ROBERTIS, M.; MICHINSKI, S.; FERNÁNDEZ, J.; SIGNORI, E.; MARSHALL, G. Electroporation as the immunotherapy

strategy for cancer in veterinary medicine: State of the art in Latin America. **Vaccines**, v. 8, n. 3, p. 536–537, 2020.

MAGLIETTI, F.; TELLADO, M.; OLAIZ, N.; MICHINSKI, S.; MARSHALL, G. Minimally invasive electrochemotherapy procedure for treating nasal duct tumors in dogs using a single needle electrode. **Radiology and Oncology**, v. 51, n. 4, p. 422–430, 1 nov. 2017.

MAHMOOD, F.; GEHL, J. Optimizing clinical performance and geometrical robustness of a new electrode device for intracranial tumor electroporation. **Bioelectrochemistry**, v. 81, n. 1, p. 10–16, 2011.

MAHNIČ-KALAMIZA, S.; KOTNIK, T.; MIKLAVČIČ, D. Educational application for visualization and analysis of electric field strength in multiple electrode electroporation. **BMC Medical Education**, v. 12, n. 1, 2012.

MANDEL, J. **The statistical analysis of experimental data**. Washington, D.C.: DOVER PUBLICATIONS, INC., 1964.

MARČAN, M.; KOS, B.; MIKLAVČIČ, D. Effect of blood vessel segmentation on the outcome of electroporation-based treatments of liver tumors. **PLoS ONE**, v. 10, n. 5, p. 1–15, 2015.

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.

MATTHIESSEN, L. W.; CHALMERS, R. L.; SAINSBURY, D. C. G.; VEERAMANI, S.; KESSELL, G.; HUMPHREYS, A. C.; BOND, J. E.; MUIR, T.; GEHL, J. Management of cutaneous metastases using electrochemotherapy. **Acta Oncologica**, v. 50, n. 5, p. 621–629, 16 jun. 2011.

MAZÈRES, S.; SEL, D.; GOLZIO, M.; PUCIHAR, G.; TAMZALI, Y.; MIKLAVCIC, D.; TEISSIÉ, J. Non invasive contact electrodes for in vivo localized cutaneous electropulsation and associated drug and nucleic acid delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 134, n. 2, p. 125–131, 2009.

MIKLAVCIC, D.; COROVIC, S.; PUCIHAR, G.; PAVSELJ, N. Importance of tumour coverage by sufficiently high local electric field for effective electrochemotherapy.

European Journal of Cancer Supplements, v. 4, n. 11, p. 45–51, nov. 2006a.

MIKLAVCIC, D.; COROVIC, S.; PUCIHAR, G.; PAVSELJ, N. Importance of tumour coverage by sufficiently high local electric field for effective electrochemotherapy.

European Journal of Cancer Supplements, v. 4, n. 11, p. 45–51, nov. 2006b.

MIKLAVČIČ, D.; ŠEMROV, D.; MEKID, H.; MIR, L. M. A validated model of in vivo electric field distribution in tissues for electrochemotherapy and for DNA electrotransfer for gene therapy. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1523, n. 1, p. 73–83, 2000.

MIKLAVČIČ, D.; SERŠA, G.; BRECELJ, E.; GEHL, J.; SODEN, D.; BIANCHI, G.; RUGGIERI, P.; ROSSI, C. R.; CAMPANA, L. G.; JARM, T. Electrochemotherapy: technological advancements for efficient electroporation-based treatment of internal tumors. **Medical & Biological Engineering & Computing**, v. 50, n. 12, p. 1213–1225, 21 dez. 2012.

MIKLAVCIC, D.; SNOJ, M.; ZUPANIC, A.; KOS, B.; CEMAZAR, M.; KROPIVNIK, M.; BRACKO, M.; PECNIK, T.; GADZIJEV, E.; SERSA, G. Towards treatment planning and treatment of deep-seated solid tumors by electrochemotherapy. **BioMedical Engineering OnLine**, v. 9, n. 1, p. 10, 2010.

MIOT, H. A. Análise de correlação em estudos clínicos e experimentais Correlation analysis in clinical and experimental studies. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 17, n. 4, p. 275–279, 2018.

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 CliniporatorTM 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 and Clinical Oncology**, v. 27, n. 1, p. 68–72, jan. 1991.

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, 2012.

NEAL, R. E.; SINGH, R.; HATCHER, H. C.; KOCK, N. D.; TORTI, S. V.;

DAVALOS, R. V. Treatment of breast cancer through the application of irreversible electroporation using a novel minimally invasive single needle electrode. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 123, n. 1, p. 295–301, 2010.

NEEL, H. B.; KETCHAM, A. S.; HAMMOND, W. G. Requisites for Successful Cryogenic Surgery of Cancer. **Archives of Surgery**, v. 102, n. 1, p. 45–48, 1971.

NEVES, G. G.; BERKENBROCK, J. A.; RANGEL, M. M. M.; SUZUKI, D. O. H. Estudo Numérico da Eletroquimioterapia em Tumor Cutâneo com Eletrodos de Placas e Agulhas. **XXIV CBEB EDIÇÃO 2014**, p. 1176–1179, 2014.

NICKFARJAM, A.; FIROOZABADI, S. M. P. Parametric study of irreversible electroporation with different needle electrodes: Electrical and thermal analysis. **International Journal of Hyperthermia**, v. 30, n. 5, p. 335–347, 2014.

OEY, I.; FARIDNIA, F.; LEONG, S. Y.; BURRITT, D. J. Handbook of Electroporation. **Handbook of Electroporation**, n. June, 2016.

OEY, I.; FARIDNIA, F.; LEONG, S. Y.; BURRITT, D. J.; LIU, T. Determination of pulsed electric fields effects on the structure of potato tubers. In: **Handbook of Electroporation**. [s.l: s.n.]. v. 2, p. 1489–1507.

ONGARO, A.; CAMPANA, L. G.; DE MATTEI, M.; DUGHIERO, F.; FORZAN, M.; PELLATI, A.; ROSSI, C. R.; SIENI, E. Evaluation of the Electroporation Efficiency of a Grid Electrode for Electrochemotherapy: From Numerical Model to In Vitro Tests. **Technology in Cancer Research and Treatment**, v. 15, n. 2, p. 296–307, 2016.

PARANHOS, R.; FIGUEIREDO FILHO, D. B.; ROCHA, E. C. DA; SILVA JÚNIOR, J. A. DA; NEVES, J. A. B.; SANTOS, M. L. W. D. Desvendando os Mistérios do Coeficiente de Correlação de Pearson: o Retorno. **Leviathan (São Paulo)**, n. 8, p. 66, 2014.

PERROCA, M. G.; GAIDZINSKI, R. R. Instrumento de classificação de pacientes de PERROCA: teste de confiabilidade pela concordância entre avaliadores-correlação. **Revista da Escola de Enfermagem da U S P**, v. 36, n. 3, p. 245–252, 2002.

PINTAR, M.; LANGUS, J.; EDHEMOVIĆ, I.; BRECELJ, E.; KRANJC, M.; SERSA, G.; ŠUŠTAR, T.; RODIČ, T.; MIKLAVČIČ, D.; KOTNIK, T.; KOS, B. Time-dependent finite element analysis of in vivo electrochemotherapy treatment. **Technology in Cancer Research and Treatment**, v. 17, p. 1–9, 2018.

RANGEL, M. M. M.; LUZ, J. C. S.; OLIVEIRA, K. D.; OJEDA, J.; FREYTAG, J. O.; SUZUKI, D. O. Electrochemotherapy in the treatment of neoplasms in dogs and cats. **Austral Journal of Veterinary Sciences**, v. 51, n. 2, 2019.

RANGEL, M. M. M.; OLIVEIRA, K. D. DE; FREYTAG, J. O.; QUADROS, P. G.; SUZUKI, D. O. H. Electrochemotherapy on Bladder - Preliminary Results. **Biomedical Journal of Scientific & Technical Research**, v. 5, n. 4, p. 11–14, 2018.

REBERŠEK, M.; ČOROVIĆ, S.; SERŠA, G.; MIKLAVČIČ, D. Electrode commutation sequence for honeycomb arrangement of electrodes in electrochemotherapy and corresponding electric field distribution. **Bioelectrochemistry**, v. 74, n. 1, p. 26–31, 2008.

REBERŠEK, M.; MIKLAVČIČ, D. Advantages and Disadvantages of Different Concepts of Electroporation Pulse Generation. **Automatika**, v. 52, n. 1, p. 12–19, 2011.

REBERŠEK, M.; MIKLAVČIČ, D.; BERTACCHINI, C.; SACK, M. Cell membrane electroporation-Part 3: The equipment. **IEEE Electrical Insulation Magazine**, v. 30, n. 3, p. 8–18, 2014.

REEVE, R. M.; TIMM, H.; WEAVER, M. L. Cell wall thickness during growth of domestic and foreign potato cultivars. **American Potato Journal**, v. 50, n. 6, p. 204–211, 1973.

RITTER, A.; BRUNERS, P.; ISFORT, P.; BARABASCH, A.; PFEFFER, J.; SCHMITZ, J.; PEDERSOLI, F.; BAUMANN, M. Electroporation of the Liver: More Than 2 Concurrently Active, Curved Electrodes Allow New Concepts for Irreversible Electroporation and Electrochemotherapy. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 17, p. 153303381880999, 9 jan. 2018.

ROSSMEISL, J. H.; GARCIA, P. A.; PANCOTTO, T. E.; ROBERTSON, J. L.; HENAO-GUERRERO, N.; NEAL, R. E.; ELLIS, T. L.; DAVALOS, R. V. Safety and feasibility of the NanoKnife system for irreversible electroporation ablative treatment of canine spontaneous intracranial gliomas. **Journal of Neurosurgery**, v. 123, n. 4, p. 1008–1025, 2015.

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

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

SELMA, Ž.; PAVLIN, M.; MIKLAV, D. Analytical and numerical quantification and comparison of the local electric field in the tissue for different electrode configurations. v. 14, p. 1–14, 2007.

SERŠA, G. The state-of-the-art of electrochemotherapy before the ESOPE study; advantages and clinical uses. **European Journal of Cancer Supplements**, v. 4, n. 11, p. 52–

59, nov. 2006.

SHAPIRO, S. S.; WILK, M. B. An Analysis of Variance Test for Normality (Complete Samples). **Biometrika**, v. 52, n. 3/4, p. 591, 1965.

SODEN, D. M.; LARKIN, J. O.; COLLINS, C. G.; TANGNEY, M.; AARONS, S.; PIGGOTT, J.; MORRISSEY, A.; DUNNE, C.; O'SULLIVAN, G. C. Successful application of targeted electrochemotherapy using novel flexible electrodes and low dose bleomycin to solid tumours. **Cancer Letters**, v. 232, n. 2, p. 300–310, fev. 2006.

STAAL, L. G.; GILBERT, R. Generators and Applicators: Equipment for Electroporation. In: **Clinical Aspects of Electroporation**. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2011. p. 45–65.

STERNBERG, C. N. Addition of Docetaxel, Zoledronic Acid, or Both to First-line Long-term Hormone Therapy in Prostate Cancer (STAMPEDE): Survival Results from an Adaptive, Multiarm, Multistage, Platform Randomised Controlled Trial. **European Urology**, v. 69, n. 6, p. 1155–1156, 2016.

SUZUKI, D. O. H. **Estudo da condutividade elétrica de suspensões de eritrócitos de ratos durante aplicação de campos elétricos intensos: teoria, modelagem e experimentação**. Florianópolis, SC, 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.; FREDERICO, M. J. S.; SILVA, F. R. M. B.; RANGEL, M. M. M. Oral Mucosa Model for Electrochemotherapy Treatment of Dog Mouth Cancer: Ex Vivo, In Silico, and In Vivo Experiments. **Artificial Organs**, v. 42, n. 3, p. 297–304, 2018.

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.

TELLADO, M. N.; MAGLIETTI, F. H.; MICHINSKI, S. D.; MARSHALL, G. R.; SIGNORI, E. Electrochemotherapy in treatment of canine oral malignant melanoma and factors

influencing treatment outcome. **Radiology and Oncology**, v. 54, n. 1, p. 68–78, 2020.

THU, K.; AUNG, Y.; KHINE, K. K.; THU, Y. Y. Isolation , Identification and Chemical Control of Leaf Blight Bacterium on Rice Plants. **3rd Myanmar Korea Conference Research**, v. 3, n. 1, p. 360–367, 1991.

TIONG, L., MADDERN, G. J. Systematic review and meta-analysis of survival and disease recurrence after radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma. **British Journal of Surgery**, v. 98, n. 9, p. 1210–1224, 2011.

VALERIO, M.; DICKINSON, L.; ALI, A.; RAMACHADRAN, N.; DONALDSON, I.; MCCARTAN, N.; FREEMAN, A.; AHMED, H. U.; EMBERTON, M. Nanoknife Electroporation Ablation Trial: A Prospective Development Study Investigating Focal Irreversible Electroporation for Localized Prostate Cancer. **Journal of Urology**, v. 197, n. 3, p. 647–654, 2017.

WAGNER, A. D.; SYN, N. L. X.; MOEHLER, M.; GROTHE, W.; YONG, W. P.; TAI, B. C.; HO, J.; UNVERZAGT, S. Chemotherapy for advanced gastric cancer. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 8, 2017.

WAGSTAFF, P. G. K.; BUIJS, M.; VAN DEN BOS, W.; DE BRUIN, D. M.; ZONDERVAN, P. J.; DE LA ROSETTE, J. J. M. C. H.; LAGUNA PES, M. P. Irreversible electroporation: State of the art. **OncoTargets and Therapy**, v. 9, p. 2437–2446, 2016.

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

YAO, C.; DONG, S.; ZHAO, Y.; LV, Y.; LIU, H.; GONG, L.; MA, J.; WANG, H.; SUN, Y. Bipolar Microsecond Pulses and Insulated Needle Electrodes for Reducing Muscle Contractions during Irreversible Electroporation. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 64, n. 12, p. 2924–2937, 2017.

ŽUPANIČ, A.; ČOROVIĆ, S.; MIKLAVČIČ, D. Optimization of electrode position and electric pulse amplitude in electrochemotherapy. **Radiology and Oncology**, v. 42, n. 2, p. 93–101, 2008.

APÊNDICE A – Equipamento eletroporador desenvolvido utilizado neste trabalho

Recursos e propriedades gerais do equipamento eletroporador

O eletroporador elaborado para este estudo apresenta as características a seguir:

- Fonte externa de energia, 19 V e 3,5 A, padronizada para computadores portáteis;
- O conversor estático para a geração da elevada tensão para os pulsos em tecidos vivos é um *push-pull* em chaveamento de 85 kHz. Os demais conversores auxiliares são topologias *fly-back* a 80 kHz;
- A tensão disponível no barramento dos IGBTs para os pulsos é isolada galvanicamente em até 7.5 kV Com um banco de uma até quatro baterias de 12 V e 7Ah. Assim o equipamento pode operar sem qualquer alimentação externa;
- Redundância tripla no monitoramento do barramento de tensão para os pulsos em tecidos vivos;
- Quando desconectado da fonte externa de energia, o consumo de corrente é controlado a durabilidade substancial das baterias. É mantida a variação da tensão de entrada ao redor de 5 %, mesmo com o envelhecimento mediano das baterias;
- Aviso luminoso de 5 níveis de tensão do banco de baterias e interrupção imediata da tensão elevada quando existir a necessidade de recarga por meio da fonte externa de energia;
- Interruptor de painel para a desconexão imediata entre o barramento de tensão elevada e os IGBTs;
- Os drivers de IGBTs são um projeto específico para o equipamento em questão. Permitem o uso de duas unidades de fontes de tensão elevada em série, de forma a alimentar o barramento dos IGBTs com magnitudes de 900 V até 4200 V. Assim, os bancos de capacitores são adequados para deliberar até 340 J;
- A alta tensão é conectada para ser chaveada nos IGBTs somente enquanto ocorrem as aplicações de pulsos nos tecidos vivos;
- Oferece quatro saídas ativas (tensão elevada, alta impedância, neutro da tensão elevada). Oferece uma saída passiva (alta impedância e neutro da tensão elevada), Tabela 14;

- O *hardware* e *firmware* são projetados para aplicar diversas combinações de pulsos entre os polos dos eletrodos sem a reposicionamento manual do eletrodo ou suas partes, Figura 57 e Tabela 15;
- O *firmware* está de acordo como o uso dos eletrodos propostos nesse trabalho, e adaptado ao referido no protocolo ESOPE para placas e agulhas (MARTY *et al.*, 2006; MIR *et al.*, 2006; NEVES *et al.*, 2014; SUZUKI *et al.*, 2018; SUZUKI; MARQUES; RANGEL, 2016);
- O *firmware* permite as configurações apresentadas na Tabela 15.

Tabela 14 - Rótulo dos terminais para os polos do eletrodo em uso.

Características elétricas dos terminais do eletroporador	
Rótulo dos bornes no painel do equipamento	Polaridades assumidas pelos terminais do eletroporador
CT	Neutro e auto impedância
P	Tensão elevada controlável, neutro e alta impedância
A	Tensão elevada controlável, neutro e alta impedância
B	Tensão elevada controlável, neutro e alta impedância
C	Tensão elevada controlável, neutro e alta impedância

Figura 57 - Conexões adequadas aos polos dos eletrodos.

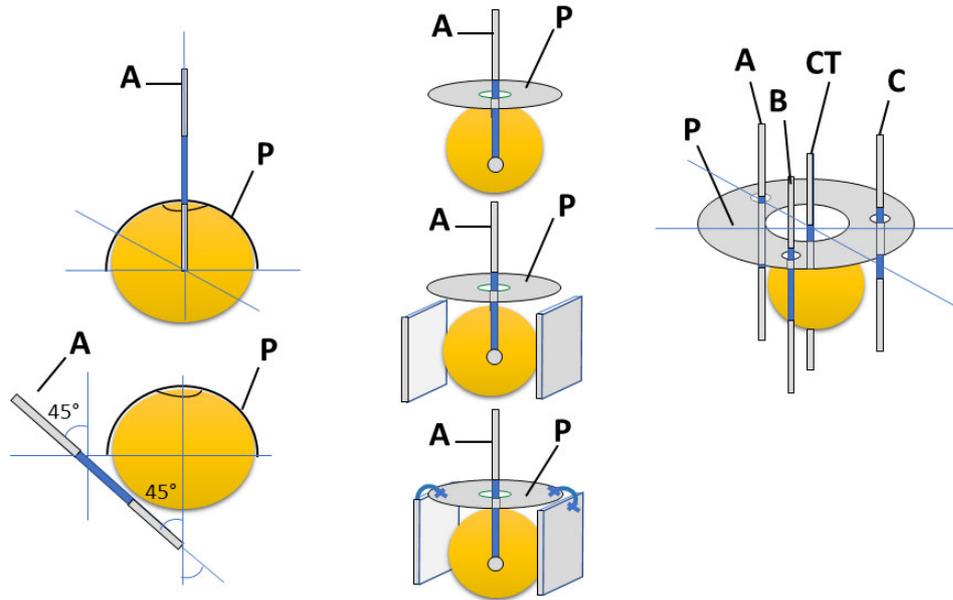


Tabela 15 – Comandos para aplicações definidas para os três eletrodos propostos, além dos eletrodos tradicionais de agulhas e de placas.

Mapeamento dos comandos do eletroporador para a aplicação da EQT				
Comando	Modo bipolar		Modo monopolar	
	Tensão elevada	Neutro (referência)	Tensão elevada	Neutro (referência)
1	A, B, C	P	A, B, C	CT
2	A [conectado na agulha central]	P	P	CT
3	A	P	A	CT
	B	P	B	CT
	C	P	C	CT
4	-	-	A, B, C, P	CT
5	A, B	P	A, B	CT
	B, C	P	B, C	CT
	C, A	P	C, A	CT
6	A	B	A	B
	B	C	B	C
	C	A	C	A
7	-	-	A	CT
	-	-	B	CT
	-	-	C	CT

Os terminais A, B, C e CT devem ser conectados aos polos de mesmos nomes no eletrodo de placa toroidal e quatro agulhas parcialmente isoladas.

Quando são escolhidos comandos com pulsos monopulares, são deliberados oito pulsos separados por um período de um segundo, cada um desses com 100 μ s no patamar de tensão elevada. Quando os comandos consideram pulsos bipolares, são deliberados oito pulsos separados por um período de um segundo, cada um desses com um patamar de 100 μ s em tensão positiva, imediatamente seguido por outro patamar de 100 μ s em tensão negativa, ambos com o mesmo valor de tensão em módulo.

Para o entendimento prático, segundo a Tabela 15, para um suposto um tratamento com pulsos bipolares, é aplicado o comando 3, seguido do comando 6, ambos especificamente para pulsos bipolares (opções disponibilizadas no écran do eletroporador quando busca na devida listagem), então ajustada a tensão manualmente: há uma tecla para iniciar o procedimento.

Assim, de forma automática, em cerca de dois segundos todo o tratamento é efetuado no tecido vivo previamente preparado com o posicionamento do eletrodo específico.

Figura 58- Duas unidades do eletroporador.

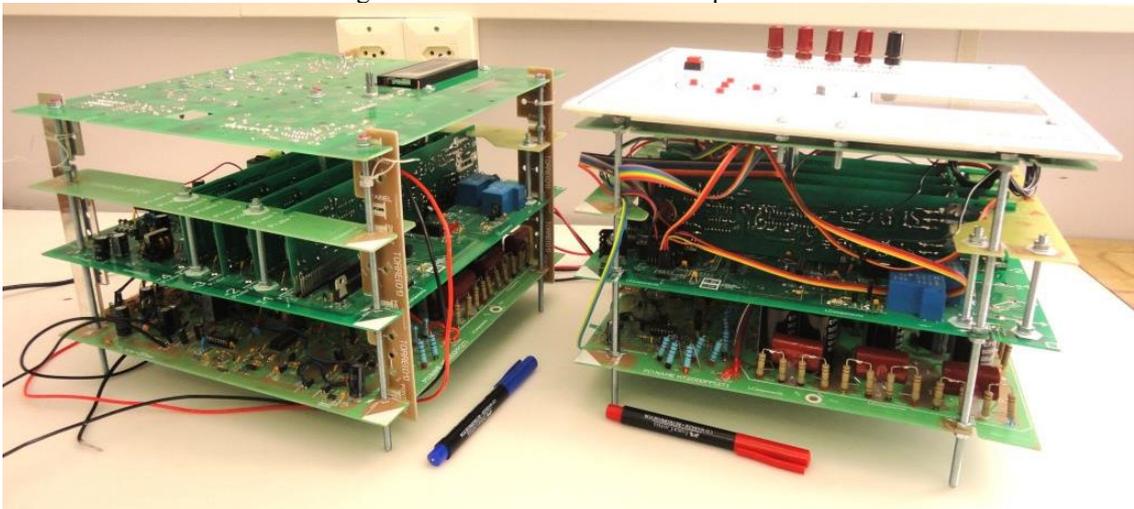


Figura 59 - Painel do eletroporador.

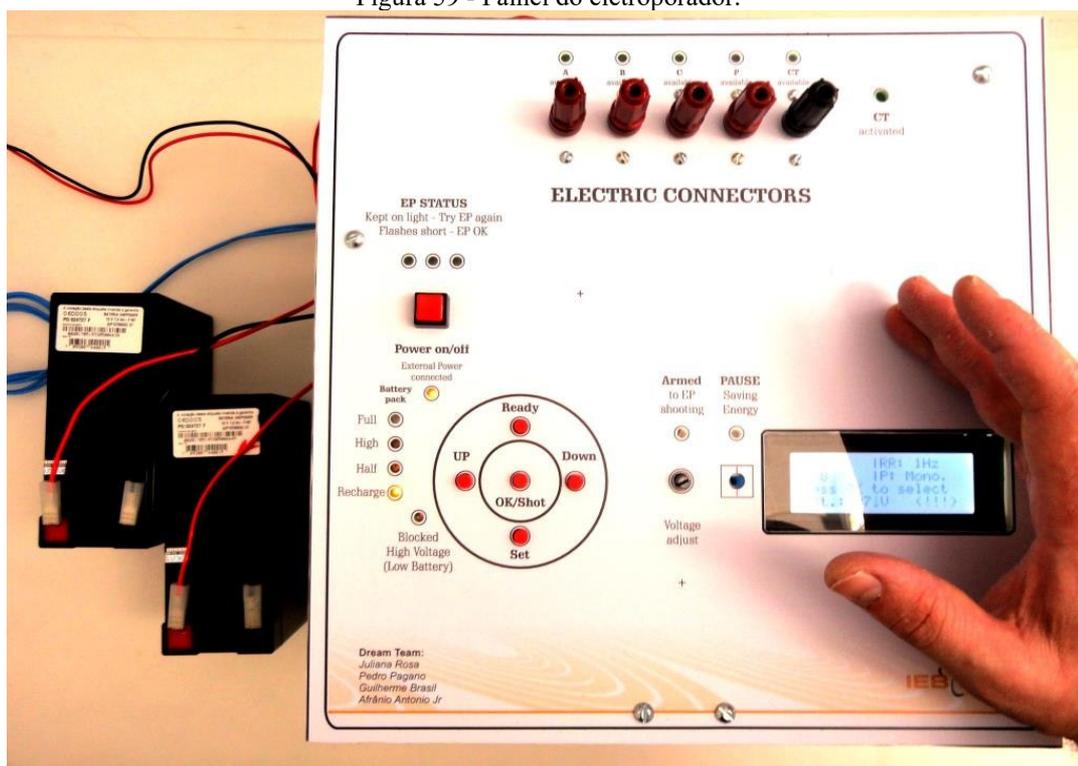


Figura 60 - Fonte de tensões elevadas ajustáveis.



Figura 61 - Placa principal do eletroporador, com fonte auxiliar, microcontrolador e as primeiras versões dos drivers para os IGBTs.

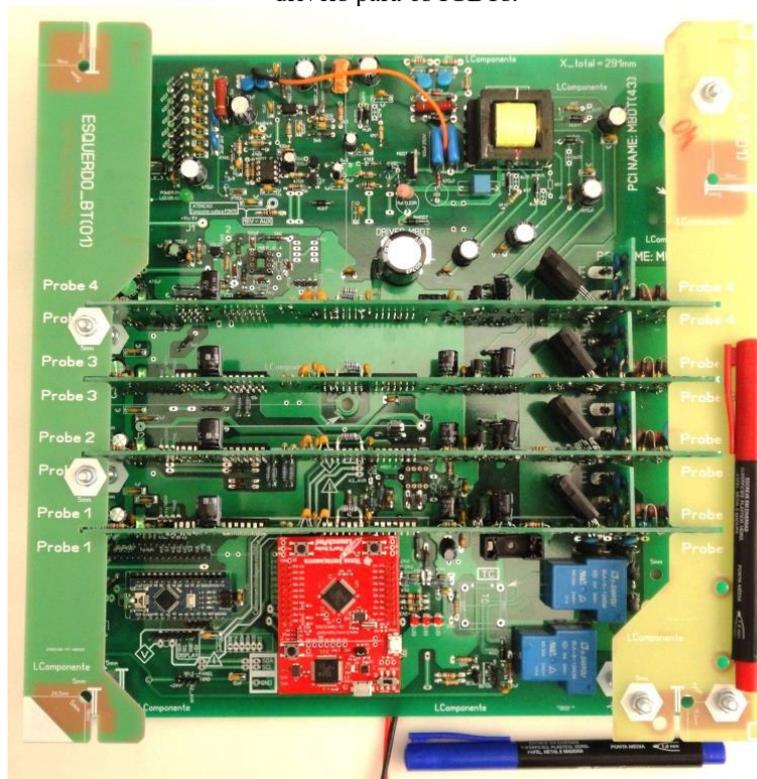
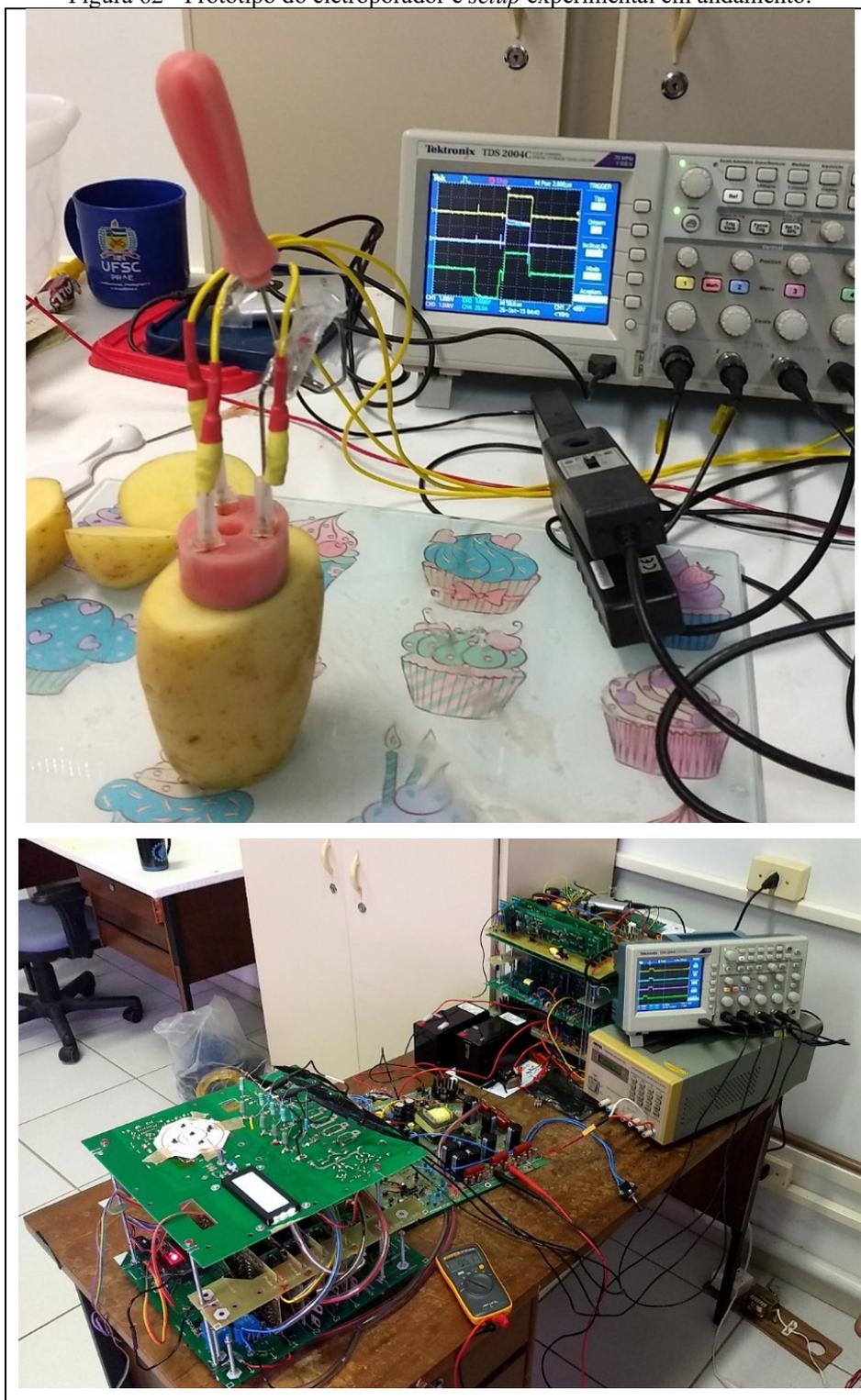


Figura 62 - Protótipo do eletroporador e *setup* experimental em andamento.

Esquemático essencial do equipamento eletroporador

O esquemático mais relevante para a montagem do eletroporador é aquele que recebe os sinais do microcontrolador em opto acopladores, Figura 63. A partir dos quais portas lógicas fazem seu tratamento para a etapa de criação do tempo morto, necessário à técnica de acionamento de IGBTs em ponte, Figura 64.

Figura 63 - Tratamento do sinal de disparo vindo do microcontrolador, de maneiras a seguir para a etapa de criação do tempo morto.

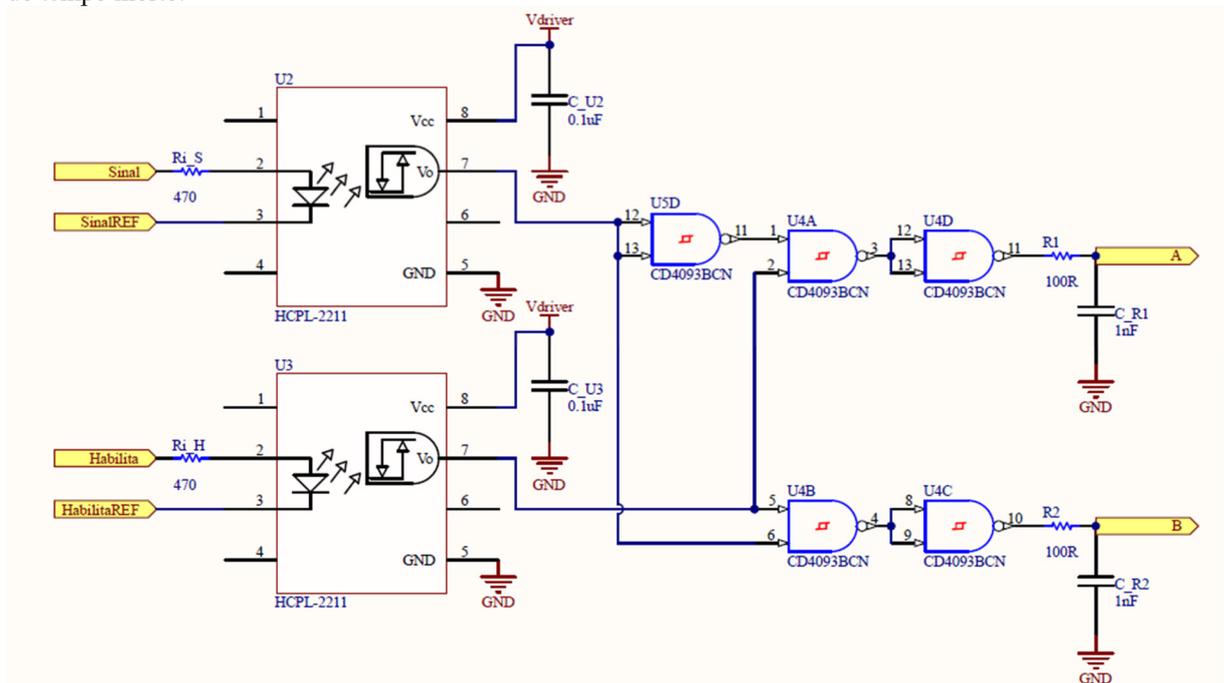
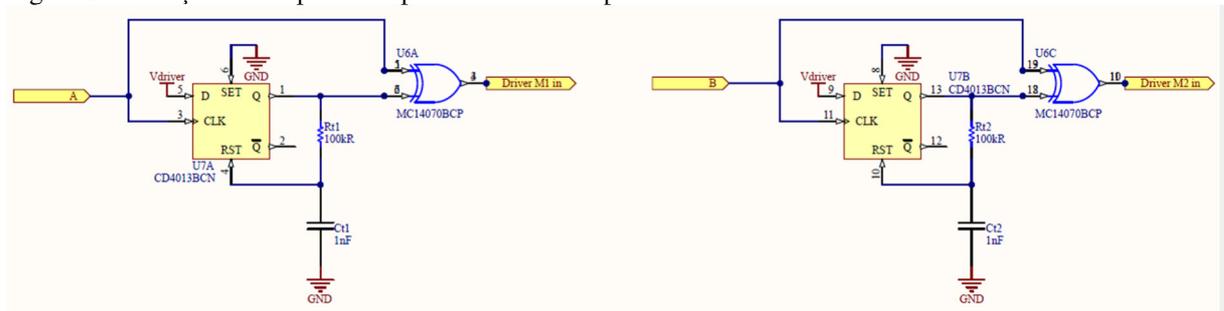


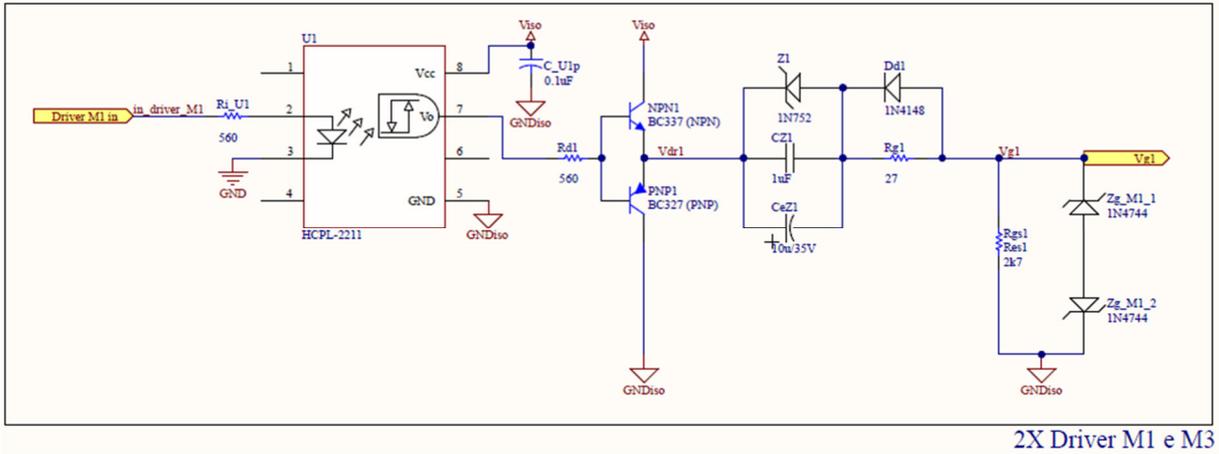
Figura 64 - Criação do tempo morto para os IGBTs em ponte.



A disponibilização d esquemático foca em permitir aos interessados em reproduzir o aparelho sem a necessidade de resolver as partes mais problemáticas da eletrônica adotada. A principal dificuldade foi desenvolver um circuito com o tempo morto ajustável para IGBTs de tensões maiores de 1200 V. Estas características são comercialmente difíceis de encontrar, além do elevado custo financeiro.

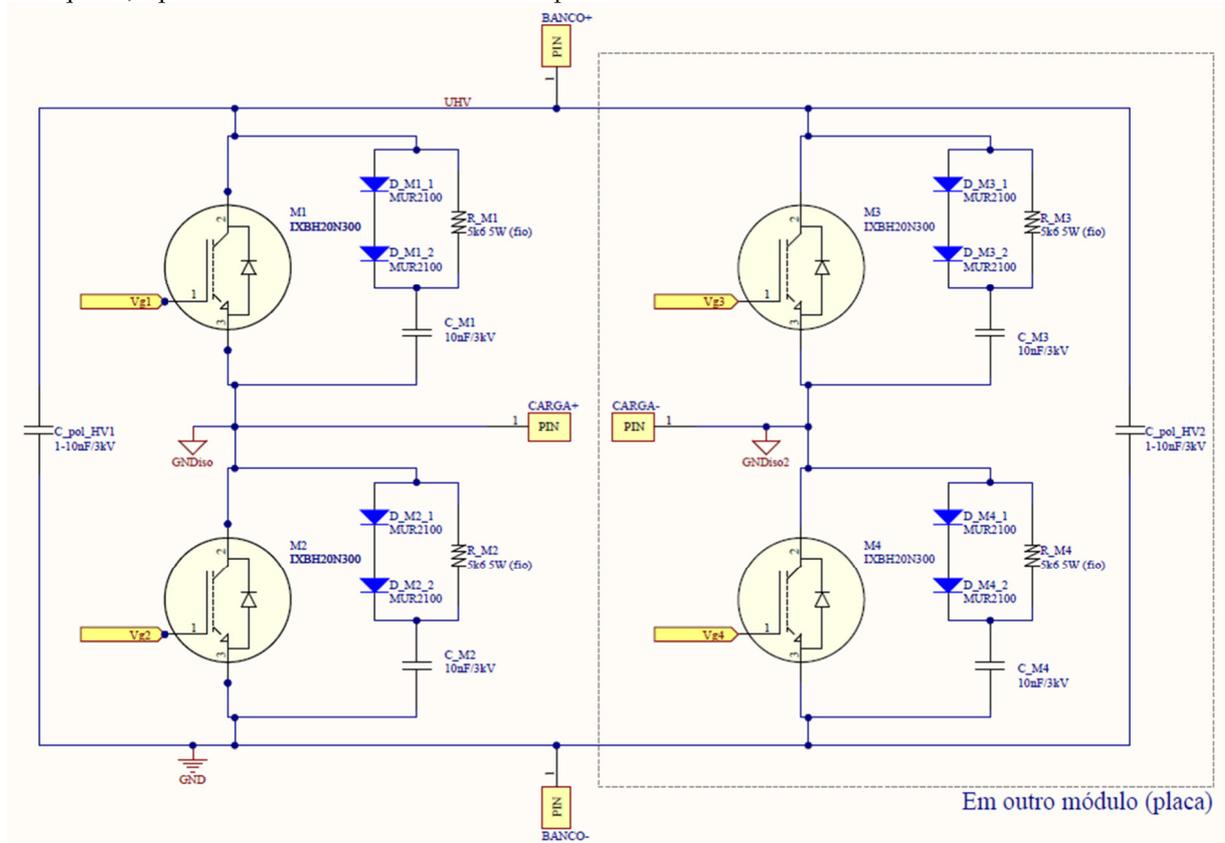
Por meio dos esquemáticos apresentados, é possível realizar os experimentos com tensões nominais dependentes do IGBT utilizado, Figura 65.

Figura 65 - Driver para IGBTs, acionado em tensão positiva, e desligando em tensão negativa, em repouso com tensão nula.



No caso, é recomendado o IXBH20N300, que suporta 3000 V no banco de tensão contínua. Assim, na prática (nesta versão mais primitiva daquela atualmente construída), foi possível experimentar 2500 V nas amostras.

Figura 66 - Exemplo de um conjunto de IGBTs para dois eletrodos independentes. A cada par de IGBTs, uma meia ponte, é possível obter mais um eletrodo independente.



A fonte de elevadas tensões é de complexo ajuste e montagem, podendo ser eletricamente substituída por um transformador variável ligado a rede elétrica, seguido de um transformador isolador e elevador de tensão. Por fim, fazendo a retificação por ponte completa de diodos e adotando capacitores de características pertinentes ao uso.

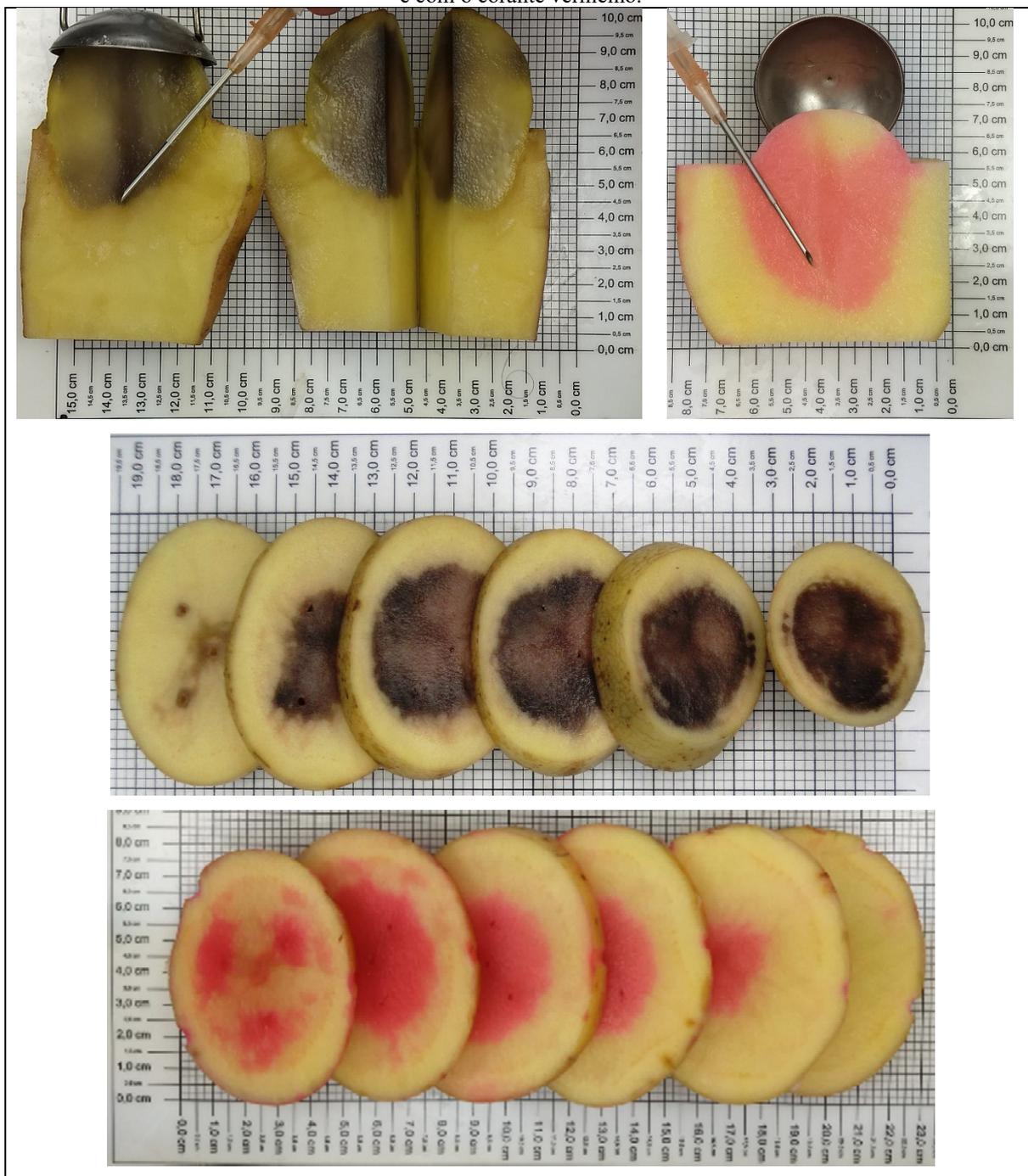
O pesquisador que desejar realizar experimentos utilizando o eletroporador deste trabalho é bem-vindo ao IEB-USFC. Basta consultar e definir uma data com a orientadora deste trabalho.

APÊNDICE B – Marcador vermelho

Seja na eletroporação reversível ou irreversível, a característica fundamental é a abertura de poros na membrana, ou parede celular, para a entrada de compostos pelas diferenças de concentração entre o meio extracelular e intracelular, devido ao gradiente de concentração (BERKENBROCK *et al.*, 2019; BERNARDIS *et al.*, 2017). Da mesma forma, a cor vermelha caracteriza a entrada de moléculas pelos poros celulares, também devido ao gradiente de concentração. Na espécie de tubérculo utilizado neste trabalho, isto ocorre após a imposição do campo elétrico tipicamente igual ou maior a 400 V/cm (CASTELLVÍ; BANÚS; IVORRA, 2016).

A vantagem do uso do corante (marcador) vermelho é apresentada na Figura 67, onde para o mesmo tipo de experimentos houve a marcação com boa nitidez e homogeneidade da região onde se esperava haver eletroporação.

Figura 67 – Imagens ilustrativas a respeito da coloração nas regiões eletroporadas para tubérculos de batata sem e com o corante vermelho.



Utilizou-se o marcador Vermelho II (vermelho de metila) e o Vermelho IV (vermelho de eritrosina) da empresa Arcólor, São Paulo-SP (<https://arcolor.com.br/> - Acessado em 15 de julho de 2021), rotulado comercialmente como corante vermelho para fins alimentícios, Figura 68.

Figura 68 - Marcador vermelho, frasco comercializado.



Marcadores utilizados

Disponibilizado em um único frasco, o produto foi utilizado como marcador para as regiões eletroporadas dos tubérculos de batata, é uma solução composta das substâncias: vermelho II (vermelho de metila) e vermelho IV (vermelho de eritrosina).

O vermelho de metila, ou vermelho de metilo, normalmente é formulado para uso como indicador de pH como uma solução de 0,02 % em *m/v* em etanol a 60 % *v/v* em água. Como indicador, é vermelho em pH abaixo de 4,4, amarelo em pH acima de 6,2, e laranja entre estes valores. Em microbiologia, é utilizado no teste do vermelho de metila ou *Methyl Red (MR) test*, para a identificação das bactérias produtoras de ácidos estáveis por mecanismos de fermentação da glicose, Teste Voges-Proskauer (VP) (THU *et al.*, 1991).

A eritrosina, ou tetraiodofluoresceína, é um corante rosa-cereja, derivado da fluorona. É largamente utilizado como corante para alimentos, em tintas de impressão, como corante biológico e na produção de produtos corantes da placa bacteriana em dentes. Também é adotado como indicador de pH com ponto de viragem em pH 2,2 – 3,6, com a ocorrência da cor laranja para a vermelha, utilizado na forma de solução a 0,1% em água (LIDE, 2003). Devido a cor vermelha quando o pH é acima de 3,6, este corante é o principal colorífico visível na marcação dos tubérculos de batata.

APÊNDICE C – Considerações quanto aos efeitos térmicos da passagem de corrente elétrica em um meio condutor biológico

Efeito Joule na EP

A energia do campo elétrico aplicada a um determinado material tem seus efeitos apresentados pela Lei de Ampère, equação (5), passível da dissipação térmica. A Lei de Ohm local é embasada no fato de haver condutividade elétrica, σ , em cada parte dos materiais, por moderada que sejam suas dimensões espaciais. Desta forma, a conceituação da densidade de corrente elétrica é dada na equação (6), e a parcela $\varepsilon \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t}$ pode ser omitida quando a Lei de Ampère é observada em fenômenos elétricos em baixas frequências, como é o caso dos pulsos de tensão na EQT. Por consequência, a energia dissipada devido a passagem de corrente elétrica por um meio condutor elétrico denota a Lei de Joule local, equação (6).

$$\nabla \times \mathbf{H} = \sigma \mathbf{E} + \varepsilon \frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t} \quad \text{Lei de Ampère.} \quad (5)$$

$$\mathbf{J} = \sigma \mathbf{E} \quad \text{Lei de Joule local – corrente de condução com densidade } \sigma \mathbf{E}. \quad (6)$$

Por meio das equações (5) e (6), é possível obter o conceito de densidade de energia, passível de representação pela equação (7), ou pela equação (8).

$$W_{Joule} = |\mathbf{E} \cdot \mathbf{J}| \quad [J/m^3] \quad (7)$$

$$W_{Joule} = \sigma |\mathbf{E}|^2 \quad [J/m^3] \quad (8)$$

Alternativamente, é possível avaliar a densidade de energia dissipada em um dado volume de material condutivo, desde que satisfaça $E = |\nabla V|$, o que denota uma componente do teorema do vetor de Poynting, equação (9).

$$W_{Joule} = \int_v \sigma E^2 dv \quad [J/m^3] \quad (9)$$

Bioequação do calor

A bioequação do calor é útil para modelar o fenômeno físico observado a partir do aquecimento elétrico-térmico de um tecido biológico. Os modelos de aquecimento por exposição do tecido vivo à radiação eletromagnética são fundamentados na análise do domínio temporal, e geralmente provenientes da equação do biocalor para o estudo da distribuição espacial da temperatura no tecido (TIONG, L., MADDERN, 2011). A equação (10) é apresentada com termos simplificados à equação do biocalor:

$$\rho c_p \frac{\partial T}{\partial t} = \Delta \cdot K \nabla T + q - Q_p + Q_m \quad [W/m^3] \quad (10)$$

onde a densidade de massa ρ , o calor específico c_p , a condutividade térmica K , a temperatura T , em graus celsius, a fonte de calor q , a perda de calor por perfusão Q_p , e a geração de calor devido ao metabolismo Q_m , este último negligenciado quando a amostra for vegetal ou um *ex vivo*.

A partir da equação do biocalor, a fonte de calor q equivale a perda por efeito Joule no tecido, representado na equação (11):

$$q = |\vec{J}| |\vec{E}| \quad \left[\frac{VA}{m^3} \right] \quad (11)$$

onde se verifica o produto da densidade de corrente elétrica J com a intensidade de campo elétrico E . Simplificando os termos da equação (10) por meio da definição apresentada na equação (11), negligenciando Q_m e a condutividade térmica K (na consideração de tecidos com elevada quantidade de água): é possível obter a equação da variação de temperatura pela aplicação de um pulso de campo elétrico em um tecido *ex vivo* de condutividade elétrica, calor específico e densidade mássica conhecidos. Assim, a parcela da energia convertida em calor devido a EQT faz a temperatura variar de acordo com a equação (12).

$$\Delta T = \frac{E_0^2 \sigma_0}{c_p \rho} t_{pulso} \quad [^{\circ}C] \quad (12)$$

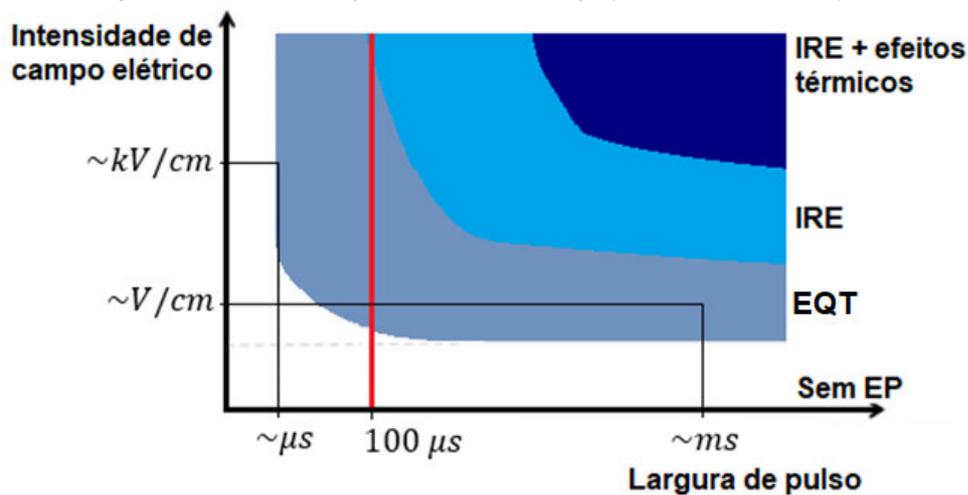
A imposição de um pulso de campo elétrico destinará parte da sua magnitude original em uma parcela E_0 com duração t_{pulso} , para um incremento ΔT de temperatura na amostra, inversamente dependente do calor específico c_p e densidade local ρ dada pela razão entre massa e volume locais (SUZUKI, 2009).

Em consequência dos oito períodos de $100 \mu s$ em intervalos de 1 segundo, o protocolo ESOPE (MARTY *et al.*, 2006; NEVES *et al.*, 2014) desconsidera o incremento local de temperatura na EQT.

Efeito térmico na eletroporação

De acordo com o protocolo ESOPE (MIR *et al.*, 2006), em tensões abaixo de $1 kV$ a eletroporação será performada em campo elétricos de $\sim V/cm$ e se localiza em uma região distante das consequências térmicas no procedimento da EQT. Seu mapeamento é apresentado na Figura 69.

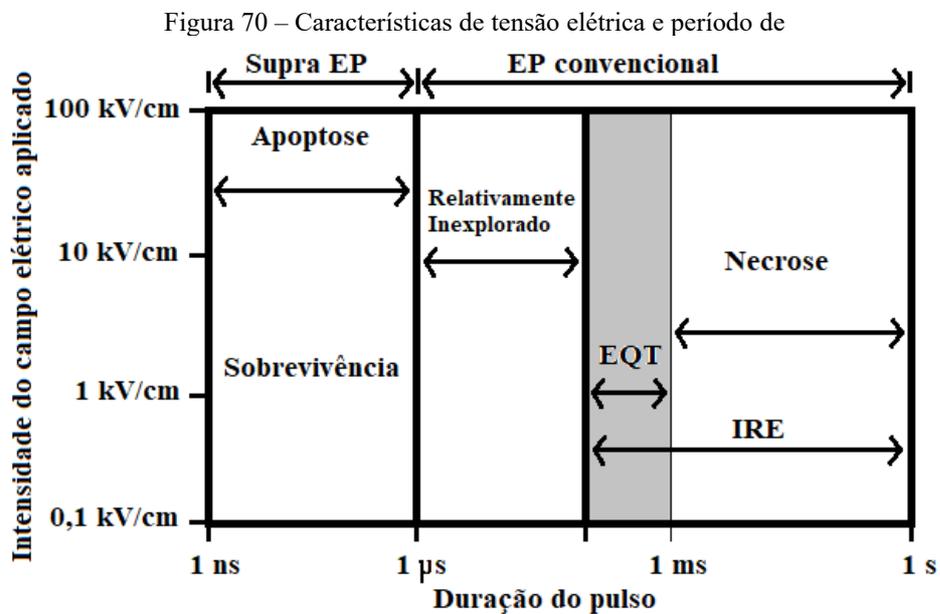
Figura 69 - Intensidade do campo elétrico aplicado, E, e a largura de pulso – eletroporação irreversível, ablação térmica – IRE, eletroporação irreversível, procedimento de ablação não-térmica – IRE, e eletroquimioterapia, procedimento de ablação não-térmica – EQT (RITTER *et al.*, 2018).



Fonte: (RITTER *et al.*, 2018).

Nas últimas décadas, uma grande variedade de estudos forneceu evidências científicas suficientes para a produção dos Procedimentos Operacionais Padrão Europeus de Eletroquimioterapia – ESOPE (MIR *et al.*, 2006). Uma vez adotado o protocolo para a técnica, foi possível definir parâmetros gerais sobre os limites de tensão e seu período de aplicação, conforme mostrado na Figura 69. Enquanto restrito na região de campo elétrico e período de exposição aos pulsos referentes a eletroquimioterapia, EQT, são normalmente adotados pulsos de microssegundos para realizar a eletroporação reversível. Esta eletroporação causa poros irreversíveis por ablação de tecido, o que leva à morte celular sem a necessidade de quimioterápicos (DAVALOS; MIR; RUBINSKY, 2005).

A relação entre intensidade aplicada e comprimento do campo elétrico para eletroporação, Figura 70, onde EP - eletroporação, nsPEF - campos elétricos pulsados em nanossegundos, Supra-EP - exposição a campos elétricos grandes, EP convencional - eletroporação com elevada amplitude de pulsos, no sentido de que a tensão transmembrana sobe para valores suprafisiológicos, tipicamente entre pelo menos 0,2 V e até aproximadamente 1,0 V, lesão Elétrica - frequentemente tem um componente térmico principal que queima o tecido vivo, EQT - eletroquimioterapia.



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

APÊNDICE D – Exemplos representativos de eletrodos encontrados na análise bibliométrica da revisão sistemática

Neste apêndice são apresentados de maneira sucinta os formatos e as configurações de eletrodos que, durante o período de realização do estudo, contribuíram tecnicamente para o desenvolvimento da proposta de uma família de três eletrodos para EQT.

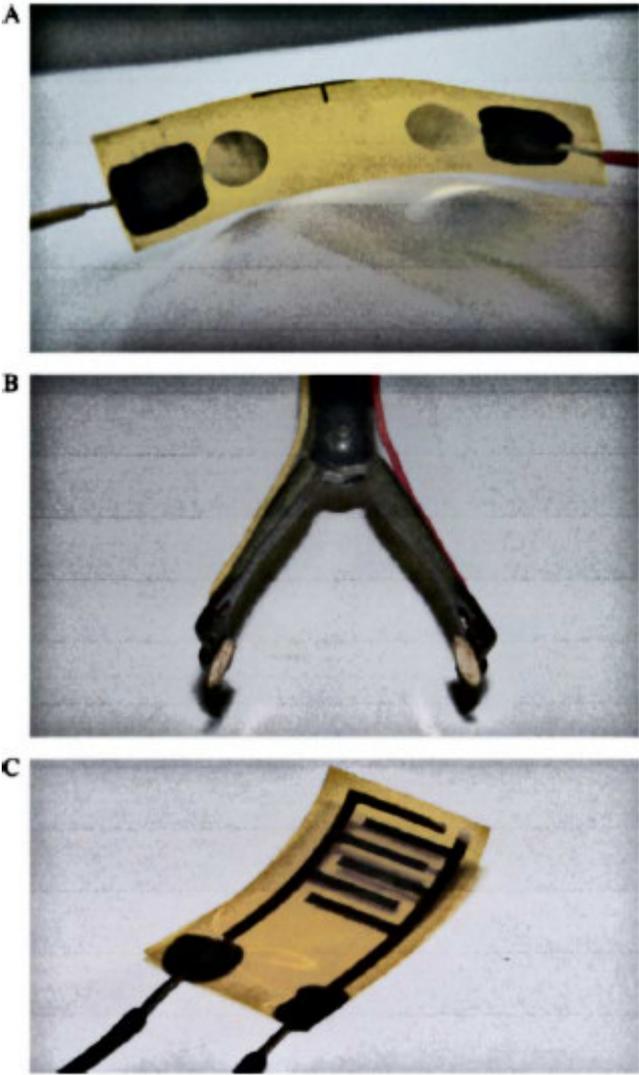
Segundo foi verificado na base de dados sobre eletrodos, de 2006 (com o surgimento do protocolo ESOPE (GEHL *et al.*, 2018)(MARTY *et al.*, 2006) até 2019, em relação aos três eletrodos propostos, não foram encontrados trabalhos capazes de superar as características de inovação, novidade e de construção possível por meio de materiais comercializados.

Neste apêndice são encontradas as partes entendidas como representativas dos 44 trabalhos da seleção final na busca em base de dados (do Quadro 1 ao Quadro 44), que de alguma forma contribuíram na técnica, desde suas geometrias, distribuição de campo elétrico, materiais e disposição geral de quaisquer elementos considerados relevantes.

Quadro 1:

Título	<i>Importance of tumour coverage by sufficiently high local electric field for effective electrochemotherapy</i>
DOI	10.1016/j.ejcsup.2006.08.006
Ano	2006
Anotação	<p>Fonte: Adaptado de (MIKLAVCIC <i>et al.</i>, 2006a).</p>
Referência	(MIKLAVCIC <i>et al.</i> , 2006a)

Quadro 2:

Título	<i>Successful application of targeted electrochemotherapy using novel flexible electrodes and low dose bleomycin to solid tumours</i>
DOI	10.1016/j.canlet.2005.03.057
Ano	2006
 <p>Fonte: Adaptado de (SODEN <i>et al.</i>, 2006).</p>	
Anotação	<p>Eletrodos de ouro flexíveis usados durante os experimentos de EQT. (A) Aderente aos eletrodos de ouro a uma poliamida antes da montagem em uma pinça de biópsia. (B) O mesmo eletrodo de (A), ligados a uma pinça de biópsia laparoscópica. (C) Um eletrodo flexível projetado com seguimentos de polaridades opostas, integrados para uma superfície flexível para a eletroporação planar.</p>
Referência	(SODEN <i>et al.</i> , 2006)

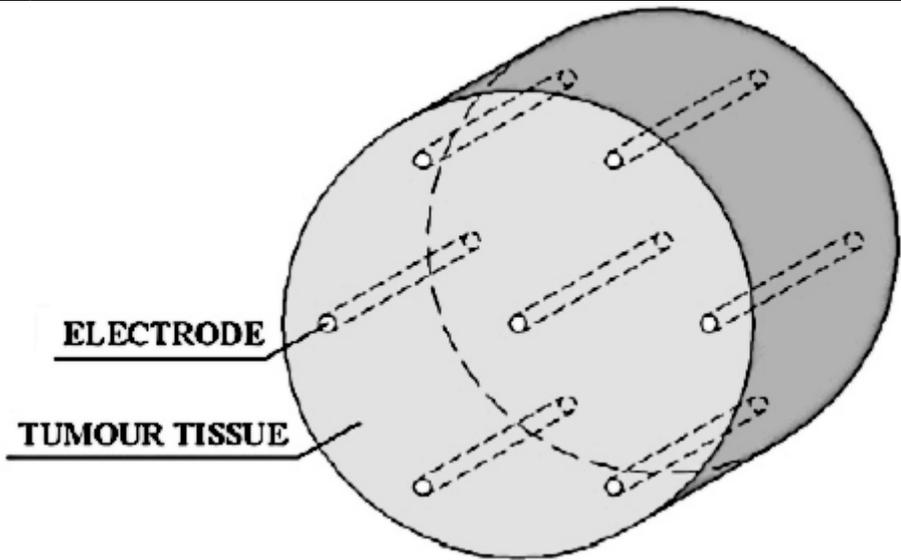
Quadro 3:

<p>Título</p>	<p><i>Analytical and numerical quantification and comparison of the local electric field in the tissue for different electrode configurations</i></p>
<p>DOI</p>	<p>10.1186/1475-925X-6-37</p>
<p>Ano</p>	<p>2007</p>
<p style="text-align: center;">Fonte: Adaptado de (SELMA; PAVLIN; MIKLAV, 2007).</p>	
<p>Anotação</p>	<p>Diferentes configurações de eletrodos de agulha analisadas neste estudar. Distribuição de campo elétrico calculado para diferentes configurações de eletrodos de agulha.</p>
<p>Referência</p>	<p>(SELMA; PAVLIN; MIKLAV, 2007)</p>

Quadro 4:

Título	<i>Importance of contact surface between electrodes and treated tissue in electrochemotherapy</i>
DOI	10.1177/153303460800700507
Ano	2008
	<p style="text-align: center;">Fonte: Adaptado de (ČOROVIĆ <i>et al.</i>, 2008).</p>
Anotação	<p>Comparação dos resultados obtidos entre o modelo 1 [(A) modelo 3D geometria com superfície de contato destacada 1; (A1) E na seção transversal XY; (A2) E na seção transversal ZY; e (A3) E em seção transversal ZX] e modelo 2 [(B) Geometria do modelo 3D com superfície de contato 2 destacada; (B1) E no cruzamento XY seção; (B2) E na seção transversal ZY; e (B3) E na seção transversal ZX], ($\sigma_1 = 0,2S / m$, $\sigma_2 = 0,4S / m$, $E_{rev} = 400$ V / cm e $E_{irrev} = 1500$ V / cm).</p>
Referência	(ČOROVIĆ <i>et al.</i> , 2008)

Quadro 5:

Título	<i>Electrode commutation sequence for honeycomb arrangement of electrodes in electrochemotherapy and corresponding electric field distribution</i>
DOI	10.1016/j.bioelechem.2008.03.001
Ano	2008
 <p>Fonte: Adaptado de (REBERŠEK <i>et al.</i>, 2008).</p>	
Anotação	Uma geometria do modelo 3D de vários eletrodos de agulha inseridos no tecido neoplásico. O tecido neoplásico tem a forma de um cilindro com 15 mm de diâmetro e comprimento de 6 mm. Os eletrodos de sete agulhas inseridos estão em arranjo de favo de mel com um diâmetro de 0,5 mm e a distância entre duas agulhas vizinhas é de 5,5 mm.
Referência	(REBERŠEK <i>et al.</i> , 2008)

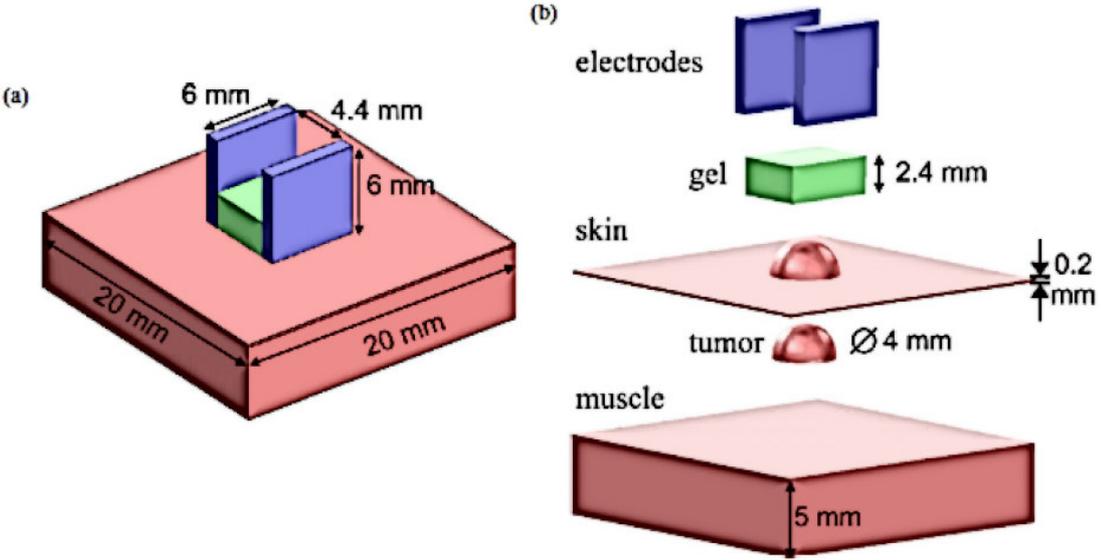
Quadro 6:

Título	<i>Numerical modeling and optimization of electric field distribution in subcutaneous tumor treated with electrochemotherapy using needle electrodes</i>
DOI	10.1109/TPS.2008.2000996
Ano	2008
	<p>Fonte: Adaptado de (COROVIC; ZUPANIC; MIKLAVCIC, 2008).</p>
Anotação	<p>Figura superior: Visualização Y Z central em todo o modelo de tumor subcutâneo, onde U é a tensão aplicada entre as fileiras de eletrodos, g é a profundidade da agulha inserção, d é a distância entre os eletrodos, conforme mostrado na figura inferior.</p> <p>Figura inferior: σ_1 e σ_2 são as condutividades do tecido saudável e tumoral, respectivamente. O tumor é posicionado 0,5 mm abaixo da superfície do modelo. Geometria tridimensional do tumor subcutâneo com quatro geometrias de eletrodo de agulha analisadas: (a) Um par de eletrodo de agulha, (b) três pares de eletrodos de agulha, (c) quatro pares de eletrodos de agulha e (d) agulha hexagonal matriz de eletrodos.</p>
Referência	(COROVIC; ZUPANIC; MIKLAVCIC, 2008)

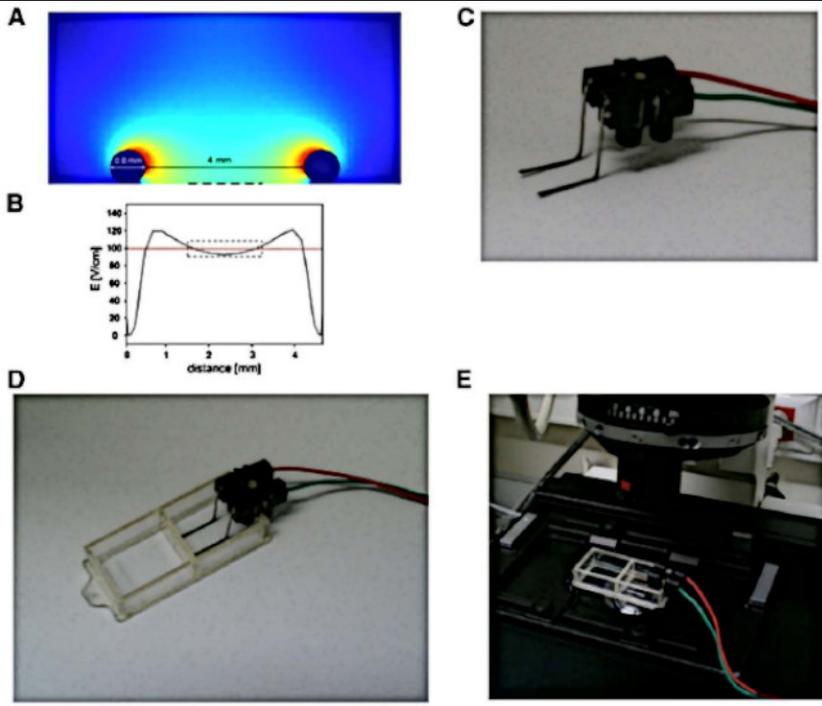
Quadro 7:

Título	<i>Optimization of electrode position and electric pulse amplitude in electrochemotherapy</i>
DOI	10.2478/v10019-008-0005-5
Ano	2008
	<p>Fonte: Adaptado de (ŽUPANIČ; ČOROVIĆ; MIKLAVČIČ, 2008).</p>
Anotação	<p>À esquerda: Geometrias e polaridades dos eletrodos: a) três pares de eletrodos de agulha (3 pares); b) eletrodo de quatro agulhas pares (4 pares); c) matriz de eletrodos de agulha hexagonal com dois eletrodos em potencial positivo, dois em negativo e dois neutros (2x2); d) eletrodo de agulha hexagonal matriz com três eletrodos em potencial positivo e três em potencial negativo (3x3). Distâncias entre eletrodos d1-3 estavam entre os parâmetros otimizados em nosso processo de otimização. Diâmetro de todos os eletrodos era de 0,7 mm.</p> <p>À direita: Distribuição de campo elétrico para o otimizado modelo de tumores subcutâneos. Em cada caso, apenas a melhor configuração de eletrodo é dada: a) três pares de agulhas para o tumor esférico; b) quatro pares de agulhas para o elipsoide; c) quatro pares de agulhas para o elipsoide mais profundo no tecido; d) três pares de agulhas para o tumor realista. A distribuição elétrica é mostrada em dois planos perpendiculares centrais: YZ e XY ambos passando pelo centro do tumor.</p>
Referência	(ŽUPANIČ; ČOROVIĆ; MIKLAVČIČ, 2008)

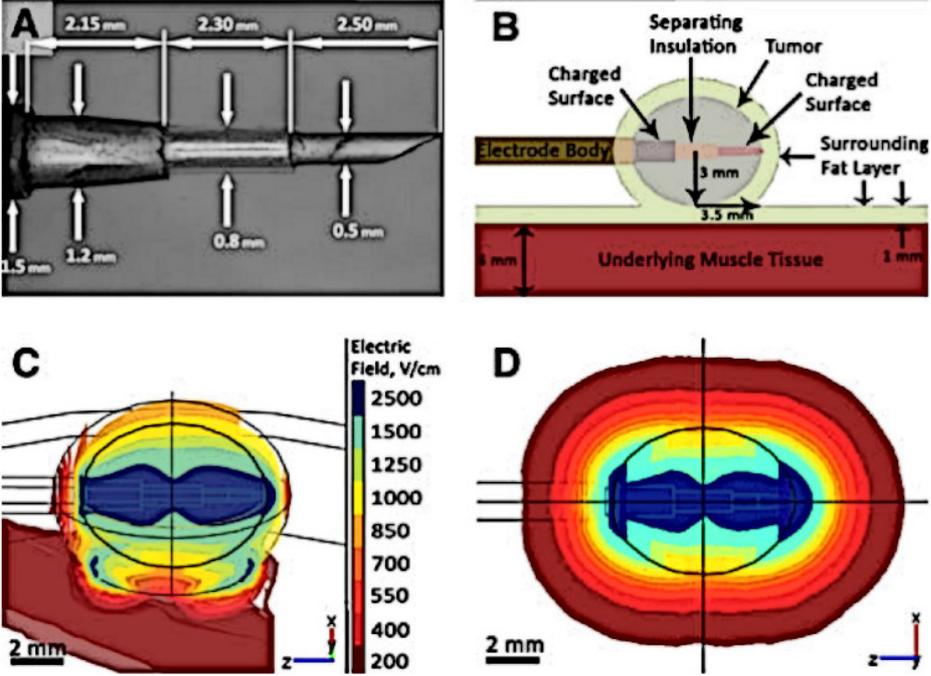
Quadro 8:

Título	<i>Use of conductive gels for electric field homogenization increases the antitumor efficacy of electroporation therapies</i>
DOI	10.1088/0031-9155/53/22/020
Ano	2008
 <p>(a) Geometria do modelo empregado nas simulações FEM; (b) partes do modelo. A espessura do eletrodo é de 1 mm.</p> <p>Fonte: Adaptado de (IVORRA <i>et al.</i>, 2008)</p>	
Anotação	(a) Geometria do modelo empregado nas simulações FEM; (b) partes do modelo. A espessura do eletrodo é de 1 mm.
Referência	(IVORRA <i>et al.</i> , 2008)

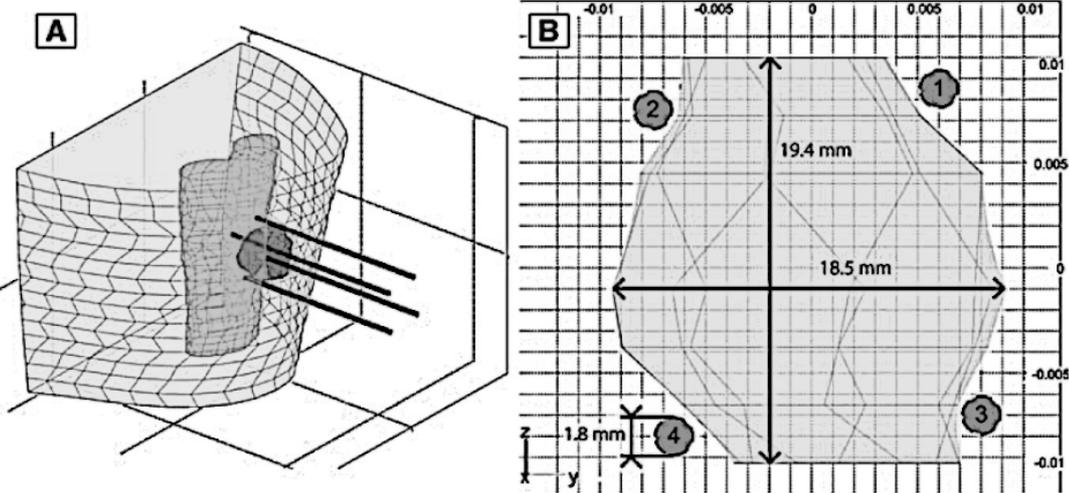
Quadro 9:

Título	<i>Non-invasive contact electrodes for in vivo localized cutaneous electropulsation and associated drug and nucleic acid delivery</i>
DOI	10.1016/j.jconrel.2008.11.003
Ano	2009
 <p>Fonte: Adaptado de (MAZÈRES <i>et al.</i>, 2009).</p>	
Anotação	<p>Cálculo da distribuição do campo elétrico entre os eletrodos na configuração <i>in vitro</i>. A - Eletrodos com 0,8 mm de diâmetro, separados por 4 mm de distância e posicionados para o fundo do prato. A condutividade do meio extracelular foi ajustada para 1,4 mS/cm. As linhas tracejadas delimitam a superfície onde um campo homogêneo está presente. B - Gráfico da distribuição de campo elétrico. A linha horizontal denota a relação entre tensão e distância (U/d). O quadrado tracejado é o volume onde um campo homogêneo estava presente (menos de 10 % variação). C - Configuração do eletrodo com os fios conectados ao gerador de pulsos. D - Eletrodos em um cubeta. Os eletrodos estão em contato com o fundo da cubeta. E - A cubeta com os eletrodos está disposta para o uso em um microscópio.</p>
Referência	(MAZÈRES <i>et al.</i> , 2009)

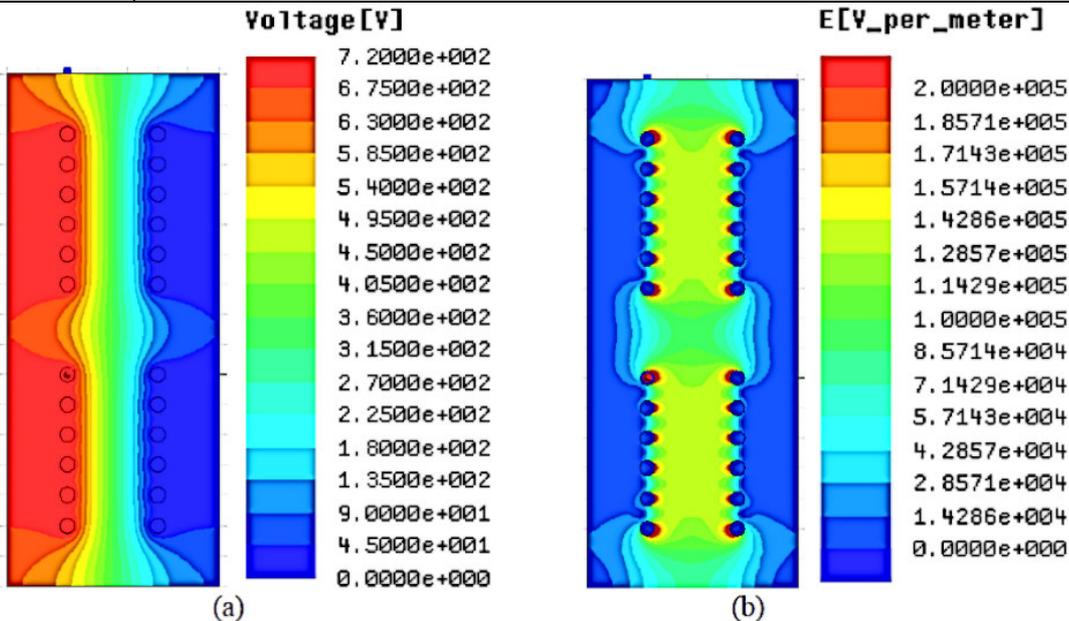
Quadro 10:

Título	<i>Treatment of breast cancer through the application of irreversible electroporation using a novel minimally invasive single needle electrode</i>
DOI	10.1007/s10549-010-0803-5
Ano	2010
	 <p>Fonte: Adaptado de (NEAL <i>et al.</i>, 2010).</p>
Anotação	<p>Projeto de eletrodos e modelos de tratamento numérico:</p> <p>(a) um eletrodo e dimensões usadas para tratamentos;</p> <p>(b) esquema da configuração do modelo mostrando o eletrodo inserido na neoplasia, rodeado por gordura e sobre uma camada de músculo;</p> <p>(c) modelos numéricos de saída de campo elétrico dos experimentos, onde cada camada corresponde aos contornos equipotenciais. A neoplasia está inteiramente dentro do contorno de 1000 V/cm, sugerindo um limite razoável a ser usado no planejamento do tratamento de EQT;</p> <p>(d) a distribuição de campo elétrico se o mesmo procedimento fosse aplicado profundamente no tecido mamário humano.</p>
Referência	(NEAL <i>et al.</i> , 2010)

Quadro 11:

Título	<i>Robustness of Treatment Planning for Electrochemotherapy of Deep-Seated Tumors</i>
DOI	10.1007/s00232-010-9274-1
Ano	2010
 <p>Fonte: Adaptado de (KOS <i>et al.</i>, 2010).</p>	
Anotação	A – Geometria do modelo. Quatro eletrodos são inseridos na coxa (cinza claro) ao redor da neoplasia (cinza escuro), de acordo com o plano de tratamento. Também são mostrados dois músculos adjacentes que os eletrodos penetram por alguns milímetros. B – Eletrodo posicionado na seção transversal perpendicular aos eixos eletrodos, através do centro de massa da neoplasia.
Referência	(KOS <i>et al.</i> , 2010)

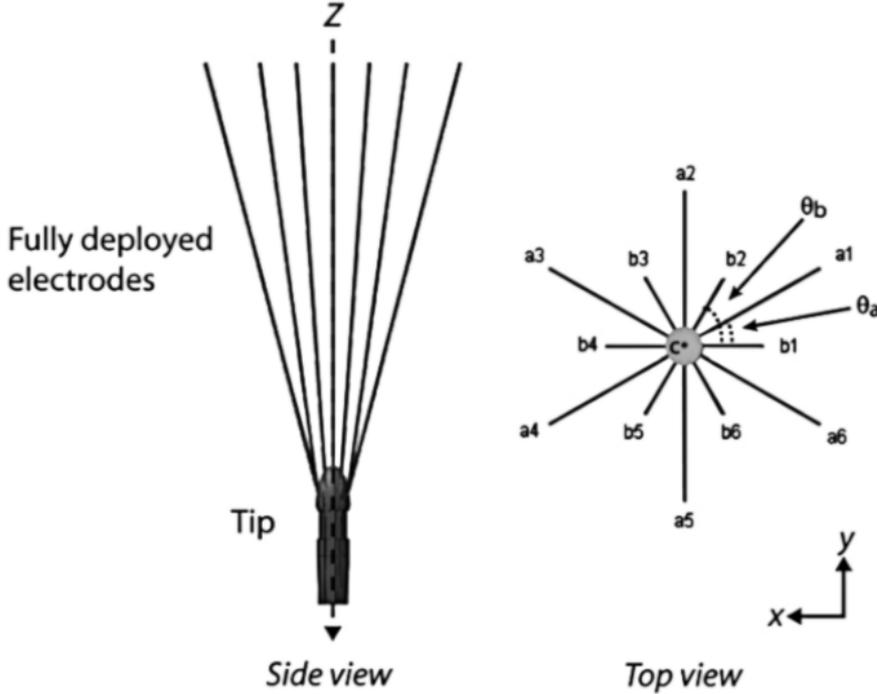
Quadro 12:

Título	<i>A simulation analysis of large multi-electrode needle arrays for efficient electrochemotherapy of cancer tissues</i>
DOI	10.1109/CEIDP.2011.6232628
Ano	2011
 <p style="text-align: center;">Fonte: Adaptado de (BOMMAKANTI <i>et al.</i>, 2011).</p>	
Anotação	Os 24 eletrodos são dispostos em uma configuração longitudinal (12mm x 2mm). Neste caso também o campo elétrico é uniforme. A figura (a) mostra a distribuição de tensão e a figura (b) mostra a distribuição do campo elétrico.
Referência	(BOMMAKANTI <i>et al.</i> , 2011)

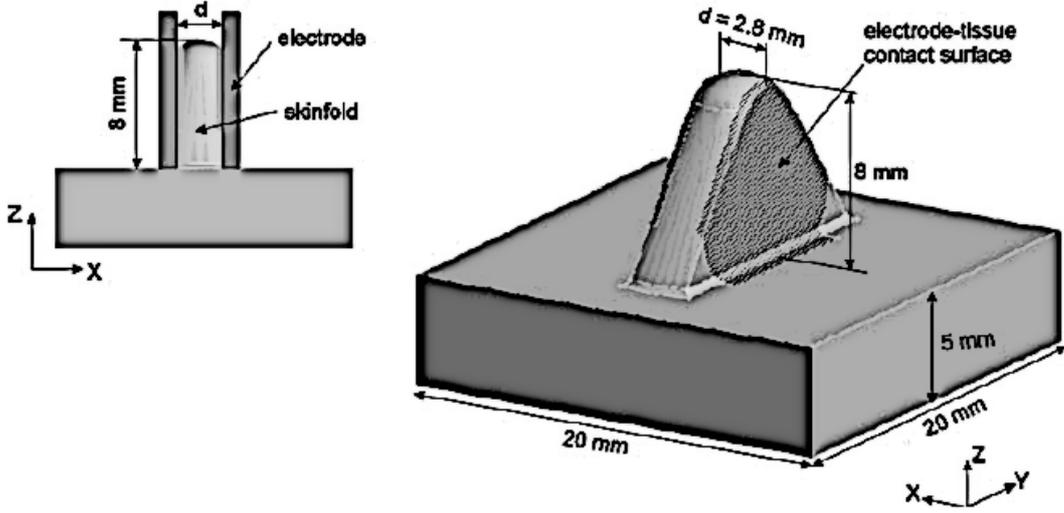
Quadro 13:

Título	<i>Finite element modeling and analysis of human breast tissue for electrochemotherapy</i>
DOI	10.1109/CEIDP.2011.6232629
Ano	2011
<p>(a) (b) (c)</p>	
<p>Fonte: Adaptado de (AGORAMURTHY; CAMPANA; SUNDARARAJAN, 2011).</p>	
Anotação	<p>Modelo de elemento finito de tecido mamário normal com placa paralela eletrodos (a), neoplasia dentro do tecido mamário com eletrodos de placa paralela (b) e neoplasia dentro do tecido mamário com eletrodos de agulha (c).</p>
Referência	(AGORAMURTHY; CAMPANA; SUNDARARAJAN, 2011)

Quadro 14:

Título	<i>Optimizing clinical performance and geometrical robustness of a new electrode device for intracranial tumor electroporation</i>
DOI	10.1016/j.bioelechem.2010.12.002
Ano	2011
 <p>Side view</p> <p>Top view</p>	
<p>Fonte: Adaptado de (MAHMOOD; GEHL, 2011).</p>	
Anotação	Dispositivo de eletrodo. Os eletrodos a1-a6 definem o anel (Θ_a), os eletrodos b1-b6 definem o anel (Θ_b). À direita, o eletrodo está ao longo do eixo z, que define o eixo de simetria rotacional.
Referência	(MAHMOOD; GEHL, 2011)

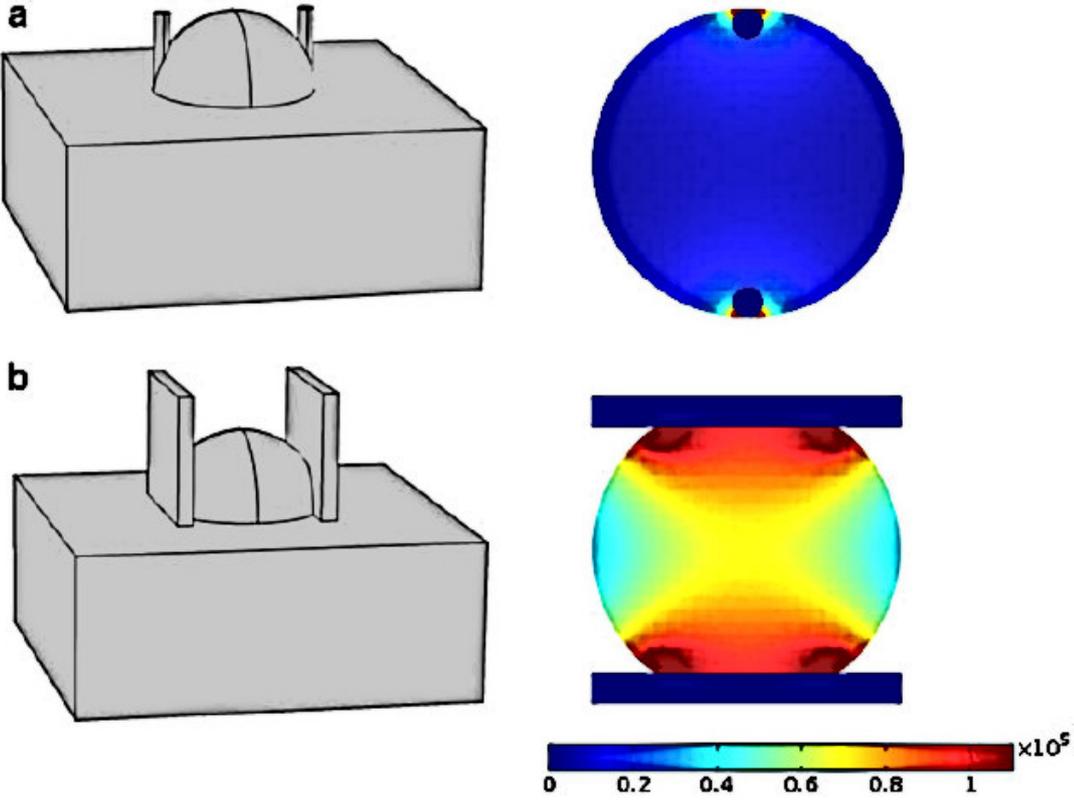
Quadro 15:

Título	<i>In Vivo Muscle Electroporation Threshold Determination Realistic Numerical Models and In Vivo Experiments</i>
DOI	https://doi.org/10.1007/s00232-012-9432-8
Ano	2012
	
Fonte: Adaptado de (ČOROVIĆ; MIR; MIKLAVČIČ, 2012).	
Anotação	Dimensões do eletrodo usado em experimentos na dobra de pele para o tratamento por eletroporação.
Referência	(ČOROVIĆ; MIR; MIKLAVČIČ, 2012)

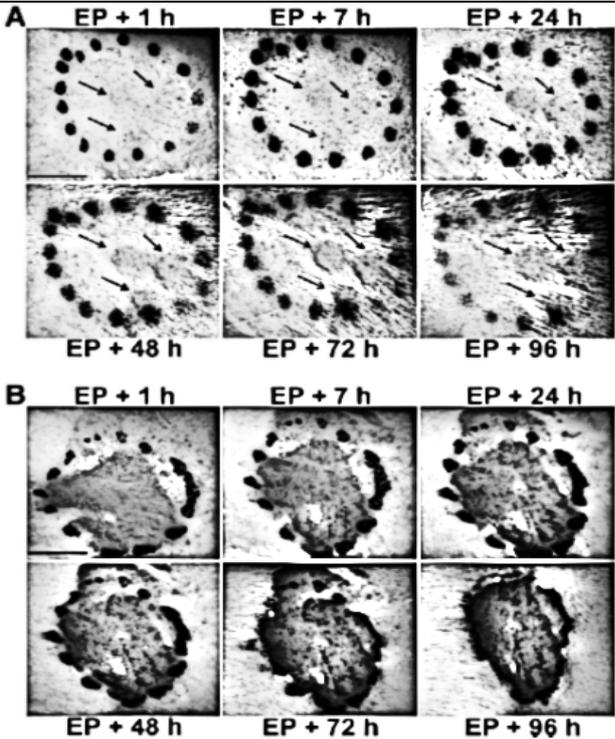
Quadro 16:

Título	<i>The optimization of needle electrode number and placement for irreversible electroporation of hepatocellular carcinoma</i>
DOI	10.2478/v10019-012-0026-y
Ano	2012
<p>Fonte: Adaptado de (ADEYANJU; AL-ANGARI; SAHAKIAN, 2012).</p>	
Anotação	Descrição das configurações do eletrodo. Os círculos em preto representam eletrodos ativos e os eletrodos sombreados mais claros são configurados para aterramento. A distância (d1) entre os eletrodos e a profundidade de inserção (d2) foi variada no estudo.
Referência	(ADEYANJU; AL-ANGARI; SAHAKIAN, 2012)

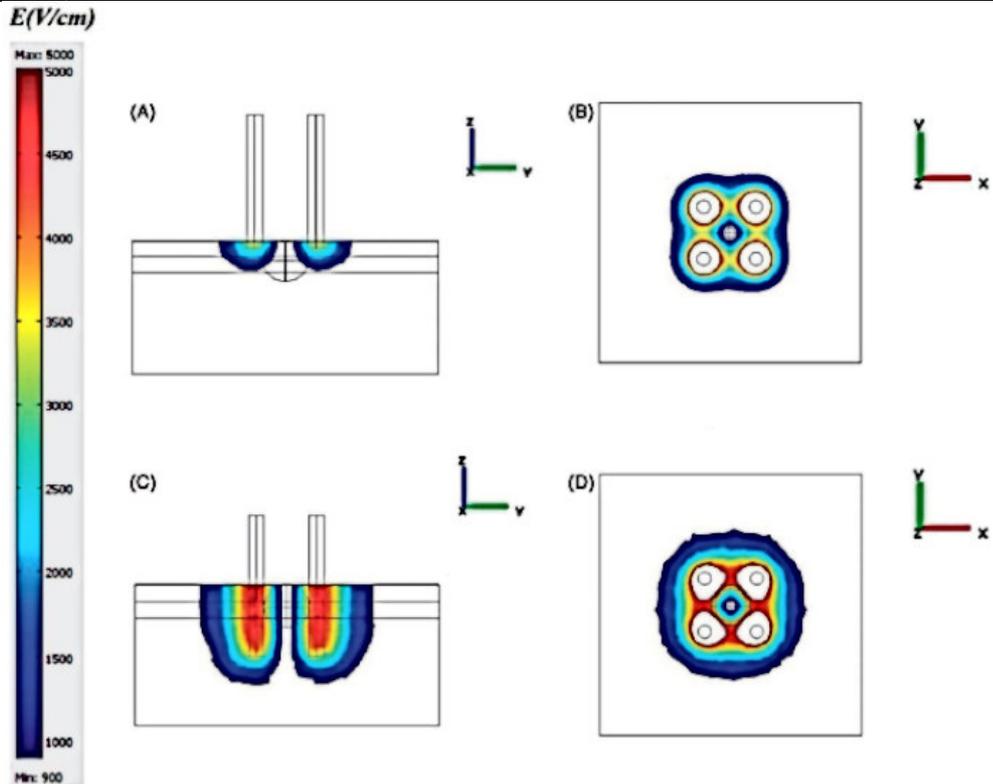
Quadro 17:

Título	<i>Educational application for visualization and analysis of electric field strength in multiple electrode electroporation</i>
DOI	10.1186/1472-6920-12-102
Ano	2012
 <p>The figure illustrates the electric field distribution for two different electrode configurations used in electroporation. Configuration (a) shows a 3D schematic of a rectangular block with a hemispherical neoplasm on top, flanked by two vertical plate electrodes. The corresponding field map shows a localized, high-intensity field (red/yellow) concentrated between the electrodes and over the neoplasm. Configuration (b) shows a similar setup but with two parallel needle electrodes positioned above and below the neoplasm. The field map for (b) shows a more uniform, higher-intensity field (red/yellow) distributed across the neoplasm. A color scale at the bottom indicates field strength in V/m, ranging from 0 (blue) to 1 x 10⁵ (red).</p>	
<p>Fonte: Adaptado de (MAHNIČ-KALAMIZA; KOTNIK; MIKLAVČIČ, 2012).</p>	
Anotação	<p>Distribuição de campo elétrico para eletrodos de placa em uma eletroporação de neoplasia cutânea (a) e eletrodos de agulha paralelos em eletroporação de neoplasia cutânea (b). A geometria é mostrada no lado esquerdo e a intensidade do campo resultante à direita. Diâmetro da neoplasia em ambos os casos são de 2 cm, a espessura do eletrodo é de 0,2 cm e a distância do eletrodo é de 1,6 cm. A tensão aplicada foi de 1300 V. A intensidade do campo resultante na escala de cores está em V/m.</p>
Referência	(MAHNIČ-KALAMIZA; KOTNIK; MIKLAVČIČ, 2012)

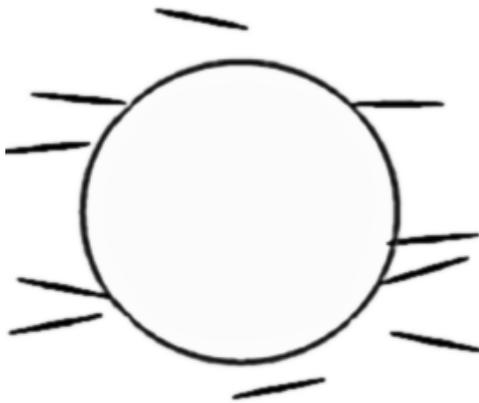
Quadro 18:

Título	<i>In vivo real-time monitoring system of electroporation mediated control of transdermal and topical drug delivery</i>
DOI	10.1016/j.jconrel.2013.09.030
Ano	2013
	 <p>A EP + 1 h EP + 7 h EP + 24 h EP + 48 h EP + 72 h EP + 96 h</p> <p>B EP + 1 h EP + 7 h EP + 24 h EP + 48 h EP + 72 h EP + 96 h</p> <p>Fonte: Adaptado de (BLAGUS <i>et al.</i>, 2013).</p>
Anotação	<p>Alopecia induzida pelo fornecimento de doxorubicina. (A) Alopecia induzida temporariamente com o tópico Entrega de doxorubicina mediada por EP (eletroporação) com amplitude de 570V. Doxorubicina foi entregue topicamente com EP e então as imagens foram adquiridas em momentos designados. Setas marcam a posição dos eletrodos e subsequente desenvolvimento de alopecia sob os eletrodos. Recrescimento de o cabelo é observado 96 h após a EP. (B) O dano à pele com método de remoção de fita foi substancial; levando à formação de crosta em 48 h. A área predeterminada para o tratamento foi marcada com marcador permanente (manchas pretas pontilhadas). Barra de escala: 5 mm.</p>
Referência	(BLAGUS <i>et al.</i> , 2013)

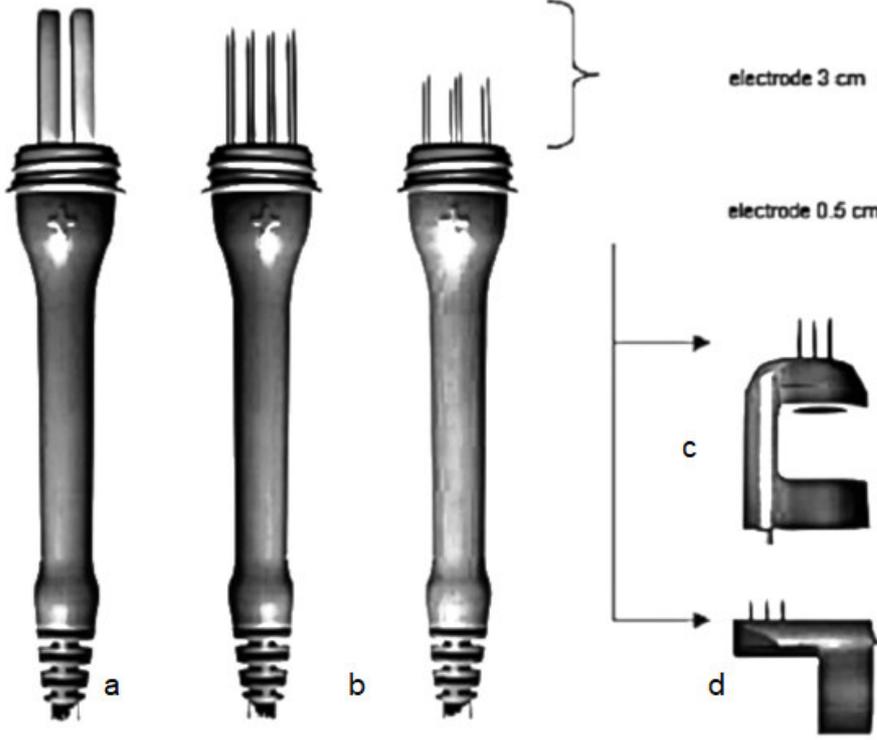
Quadro 19:

Título	<i>Parametric study of irreversible electroporation with different needle electrodes Electrical and thermal analysis</i>
DOI	10.3109/02656736.2014.937775
Ano	2014
 <p>Fonte: Adaptado de (NICKFARJAM; FIROOZABADI, 2014).</p>	
Anotação	O efeito da inserção do eletrodo na distribuição elétrica na neoplasia e no tecido normal para a configuração de 4 eletrodos. (A) $i = 0,5$ mm, vista $y - z$, (B) $i = 0,5$, vista $x - y$, (C) $i = 5$ mm, vista $y - z$, (D) $i = 5$ mm, vista $x - y$. O efeito da inserção do eletrodo no volume eletroporado irreversivelmente acaba por ser mais evidente no tecido normal.
Referência	(NICKFARJAM; FIROOZABADI, 2014)

Quadro 20:

Título	<i>Electroporation in cancer therapy without insertion of electrodes</i>
DOI	10.1088/0031-9155/59/20/6031
Ano	2014
 <p>Fonte: Adaptado de (LEKNER, 2014).</p>	
Anotação	Uma célula com microcondutores esféricos ao seu redor, em um circuito elétrico externo campo (com tendência horizontal na figura), que tende a alinhar os microcondutores. O movimento browniano interrompe ligeiramente a orientação. O campo externo, pulsado ou em alta frequência, é amplificado nas extremidades dos esferóides, causando a formação de poros na membrana celular (eletroporação), permitindo que drogas contra o câncer entrem na célula.
Referência	(LEKNER, 2014)

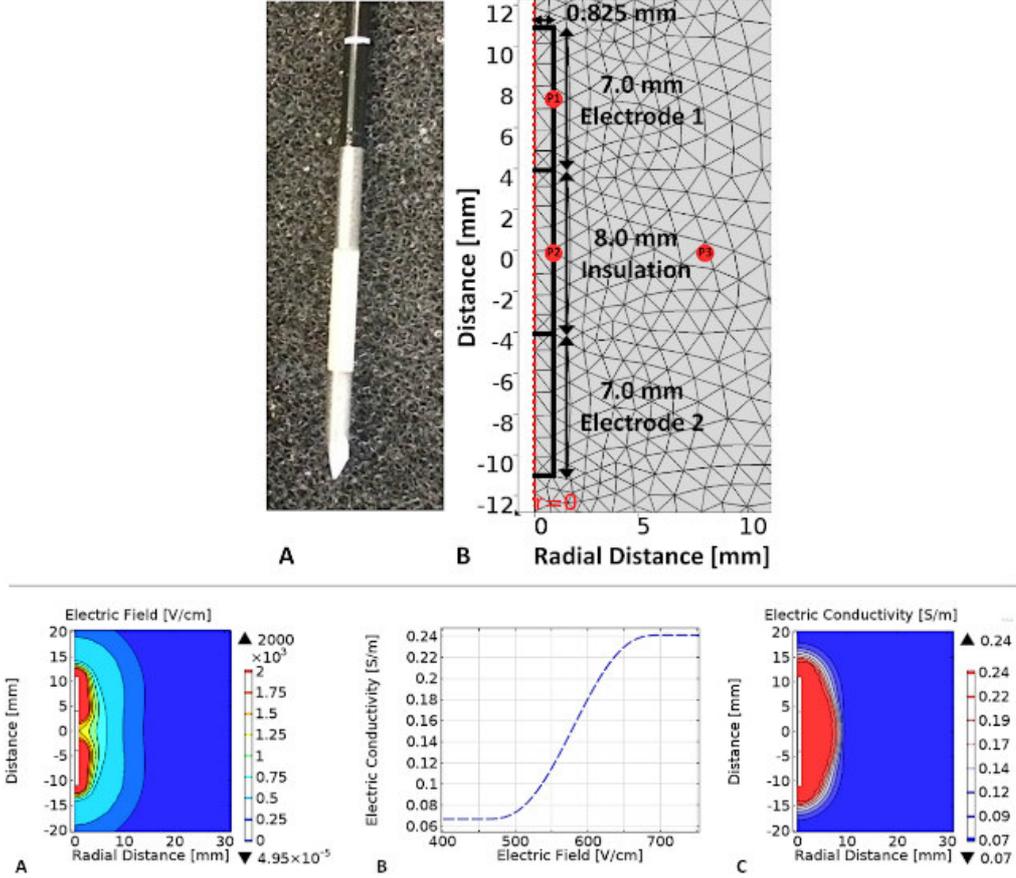
Quadro 21:

Título	<i>Electrochemotherapy in non-melanoma head and neck cancers a retrospective analysis of the treated cases</i>
DOI	10.1016/j.bjoms.2014.08.004
Ano	2014
 <p>Fonte: Adaptado de (CAMPANA <i>et al.</i>, 2014a).</p>	
Anotação	<p>Tipos diferentes de eletrodos:</p> <p>(a) eletrodo não invasivo de placas paralelas conectadas a uma alça de 13 cm de comprimento) era usado por aplicativo de contato para a espectroporação ao redor de neoplasias exofíticas;</p> <p>(b) dois arranjos em linhas paralelas de agulhas conectadas a um cabo para manuseio de 13 cm de comprimento. É utilizado sobre um tecido em tratamento, para lesões infiltrantes menores;</p> <p>(c) configuração de hexágono de agulhas conectadas a uma alça de 13 cm de comprimento. É usado para tumores infiltrantes maiores;</p> <p>(d) duas linhas de agulhas de 5 mm foram usadas para direcionar as neoplasias da cavidade oral e da orofaringe.</p>
Referência	(CAMPANA <i>et al.</i> , 2014a)

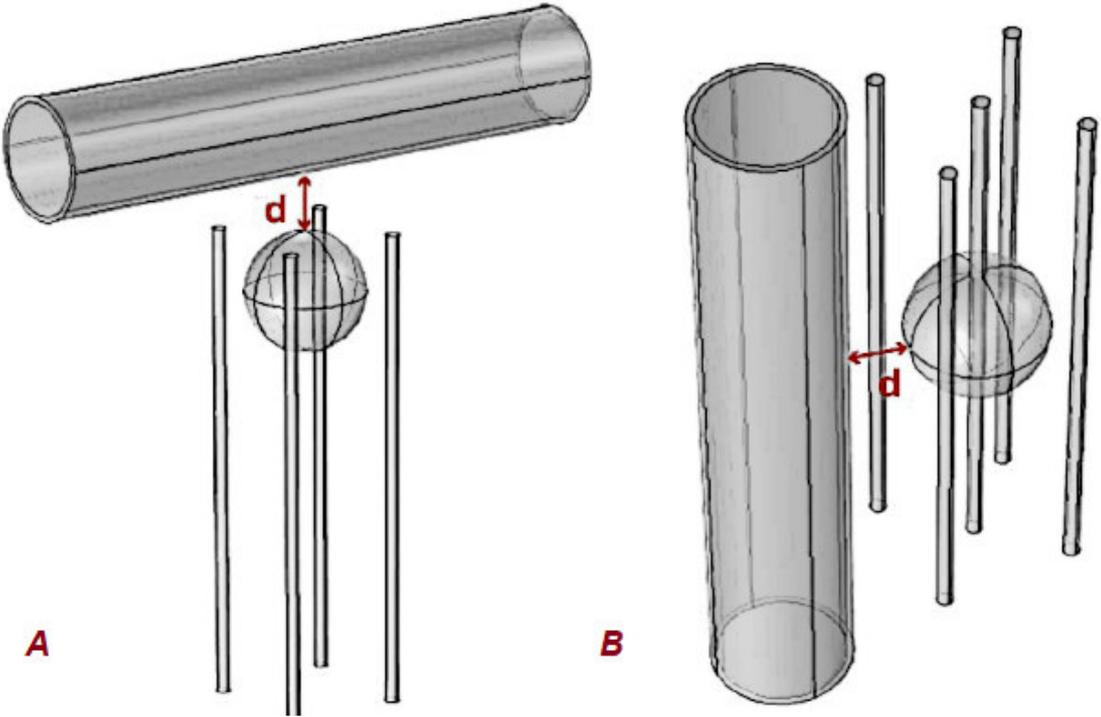
Quadro 22:

Título	<i>Three-dimensional analysis of irreversible electroporation Estimation of thermal and non-thermal damage</i>
DOI	10.1016/j.ijheatmasstransfer.2013.12.065
Ano	2014
<p>(a) (b) (c)</p> <p>$\nabla\Phi$ ~[V/m]</p> <p>0.2 0.19 0.18 0.17 0.16 0.15 0.14 0.13 0.12 0.11 0.1 0.09 0.08 0.07 0.06 0.05 0.04 0.03 0.02 0.01 0</p>	
Fonte: Adaptado de (KURATA; NOMURA; TAKAMATSU, 2014).	
Anotação	Distribuição do campo elétrico para distâncias de L = 5 mm (a), L = 10 mm (b) e L = 15 mm (c).
Referência	(KURATA; NOMURA; TAKAMATSU, 2014)

Quadro 23:

Título	<i>A Numerical Investigation of the Electric and Thermal Cell Kill Distributions in Electroporation-Based Therapies in Tissue</i>
DOI	10.1371/journal.pone.0103083
Ano	2014
	 <p>Fonte: Adaptado de (GARCIA; DAVALOS; MIKLAVCIC, 2014).</p>
Anotação	<p>Figura superior: Visualização física do eletrodo e da malha para o ajuste extremamente fino usado no <i>software</i> de modelagem numérica.</p> <p>Figuras inferiores: Resposta de condutividade elétrica do tecido hepático durante a eletroporação irreversível. Simulação numérica do A) campo elétrico e C) distribuições de condutividade elétrica durante procedimentos de eletroporação irreversível com uma sonda bipolar e uma tensão aplicada de 3000 V. Estes os resultados empregam as B) propriedades do tecido hepático dependentes do campo elétrico não linear que resultam imediatamente após o final de cada pulso de eletroporação e foi escalado em 1.256, 1.506 e 1.756 para estudar a variabilidade potencial de órgão a órgão.</p>
Referência	(GARCIA; DAVALOS; MIKLAVCIC, 2014)

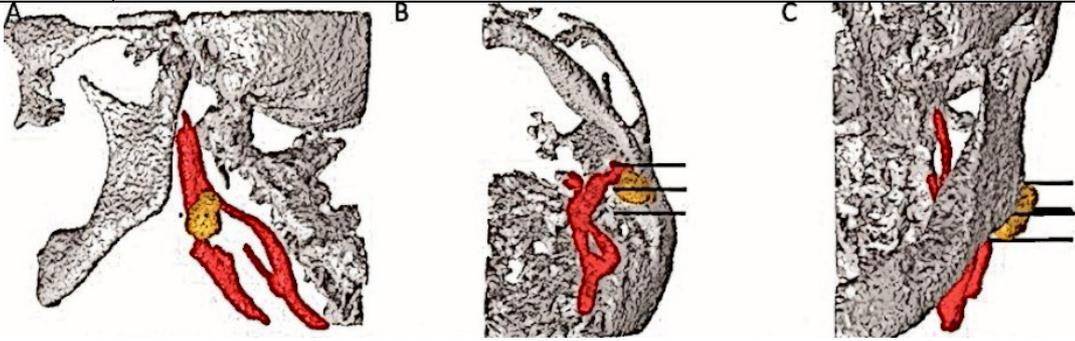
Quadro 24:

Título	<i>Effect of Blood Vessel Segmentation on the Outcome of Electroporation-Based Treatments of Liver Tumors</i>
DOI	10.1371/journal.pone.0125591
Ano	2015
 <p>The diagram shows two experimental setups, labeled A and B. In setup A, four thin cylindrical electrodes are arranged in a square pattern. A spherical tumor is positioned in the center of this square. A blood vessel, represented as a larger cylinder, is oriented vertically, passing through the tumor. A red double-headed arrow labeled 'd' indicates the distance from the center of the tumor to the center of the blood vessel. In setup B, the four electrodes are arranged in a different pattern. The blood vessel is oriented horizontally, parallel to the electrodes. A red double-headed arrow labeled 'd' indicates the distance from the center of the tumor to the center of the blood vessel.</p>	
Fonte: Adaptado de (MARČAN; KOS; MIKLAVČIČ, 2015).	
Anotação	<p>Duas configurações de eletrodos diferentes e duas posições diferentes do vaso sanguíneo – “d” denota distância do vaso sanguíneo ao tumor:</p> <p>(A) Quatro eletrodos com vaso sanguíneo perpendicular a eles;</p> <p>(B) Eletrodos com o vaso sanguíneo paralelo a eles.</p>
Referência	(MARČAN; KOS; MIKLAVČIČ, 2015)

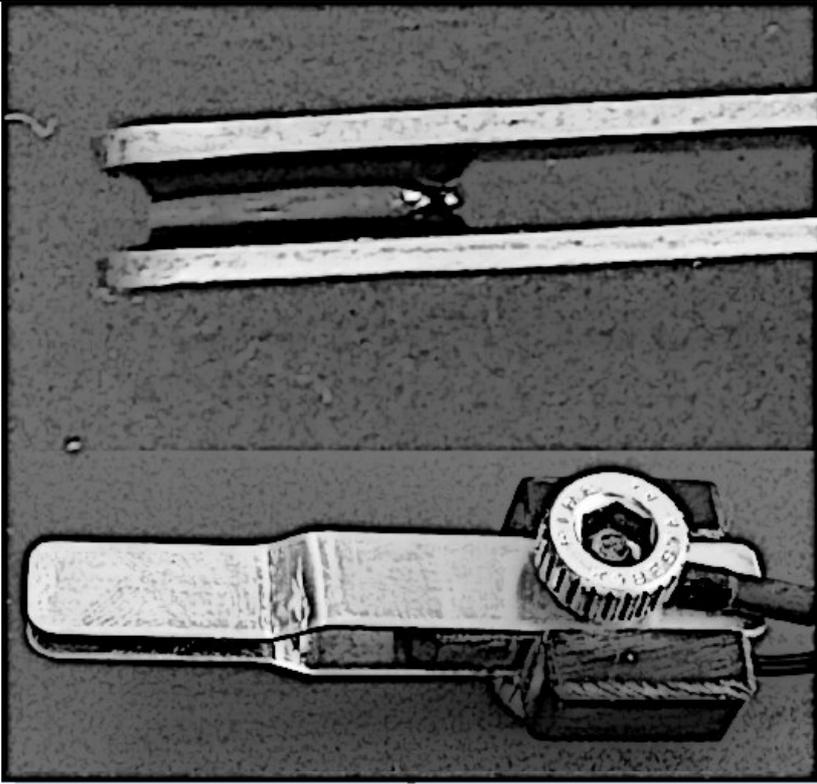
Quadro 25:

Título	<i>Modeling the positioning of single needle electrodes for the treatment of breast cancer in a clinical</i>
DOI	10.1186/1475-925X-14-S3-S1
Ano	2015
<p>Fonte: Adaptado de (DENZI <i>et al.</i>, 2015).</p>	
Anotação	As duas diferentes configurações são relatadas: (a) modelo "simétrico" (eletrodos retos azuis igualmente espaçados) e (b) modelo "assimétrico" (eletrodos verdes), o eletrodo central é inclinado em um ângulo (25°), os eletrodos externos são movidos com deslocamentos ao longo da linha que os conectam ao eletrodo central. As distâncias são de 1,8 mm, 2,8 mm e 2,1 mm para os pares 1-5, 2-5 e 3-5, respectivamente. A posição para o eletrodo número 4 permanece inalterado nas duas configurações de eletrodo.
Referência	(DENZI <i>et al.</i> , 2015)

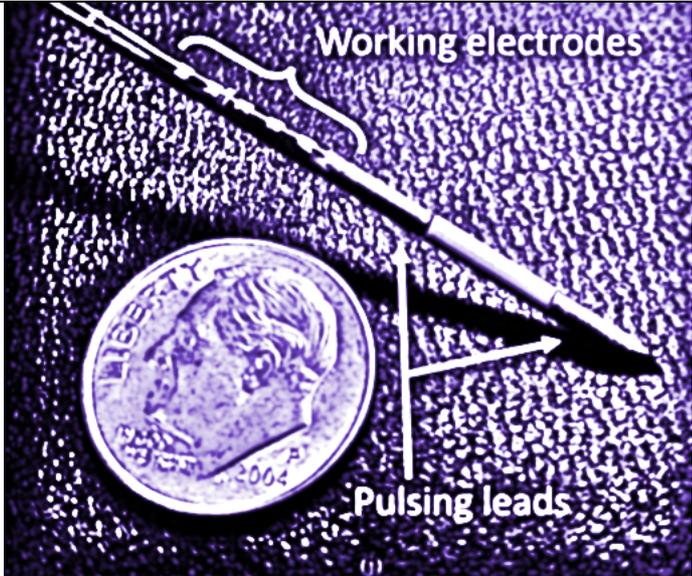
Quadro 26:

Título	<i>Coupling treatment planning with navigation system: A new technological approach in treatment of head and neck tumors by electrochemotherapy</i>
DOI	10.1186/1475-925X-14-S3-S2
Ano	2015
 <p>Fonte: Adaptado de (GROSELJ <i>et al.</i>, 2015).</p>	
Anotação	Plano de tratamento para metástases no pescoço, atrás do ângulo mandibular esquerdo. As figuras A, B, C mostram o modelo 3D com o osso (branco), neoplasia (amarelo), vasos sanguíneos (vermelho) e eletrodos (preto).
Referência	(GROSELJ <i>et al.</i> , 2015)

Quadro 27:

Título	<i>Mathematical Models Describing Chinese Hamster Ovary Cell Death Due to Electroporation In Vitro</i>
DOI	10.1007/s00232-015-9825-6
Ano	2015
	 <p>Fonte: Adaptado de (DERMOL; MIKLAVČIČ, 2015).</p>
Anotação	Eletrodos de placa paralela de aço inoxidável com uma gota de célula suspensão entre os eletrodos (imagem superior). As placas são mantidas a distância é 2 mm.
Referência	(DERMOL; MIKLAVČIČ, 2015)

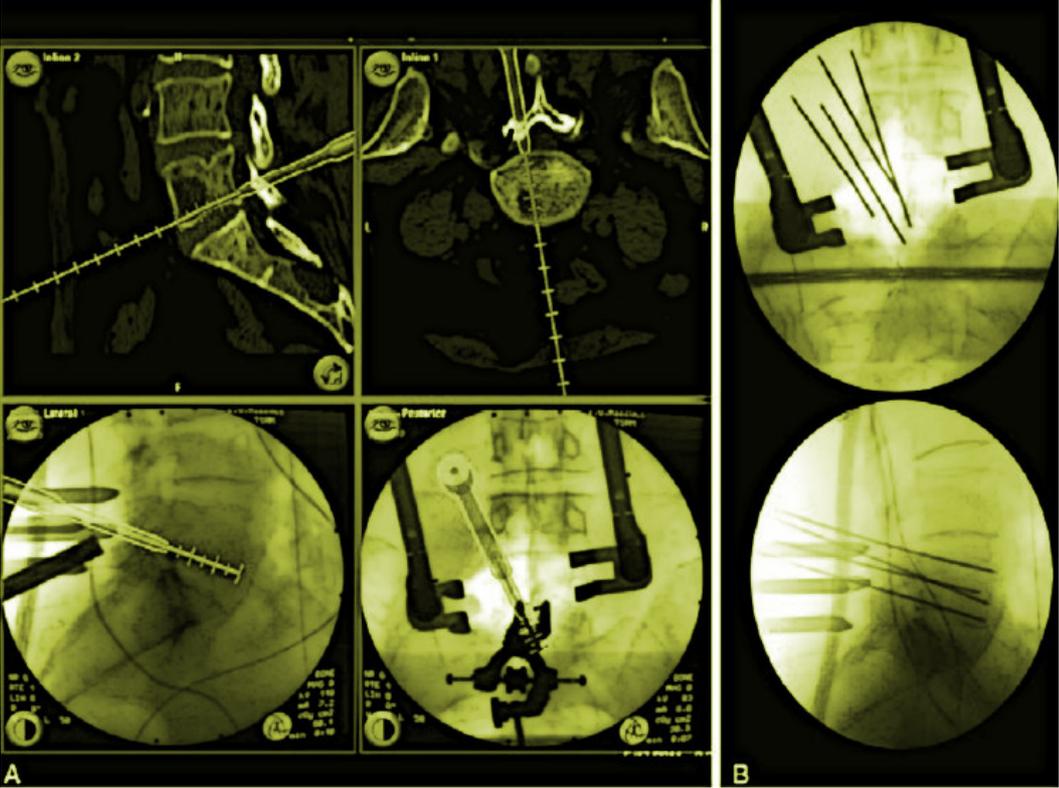
Quadro 28:

Título	<i>The Feasibility of a Smart Surgical Probe for verification of IRE treatments using electrical impedance spectroscopy</i>
DOI	10.1109/TBME.2015.2441636
Ano	2015
 <p>Fonte: Adaptado de (BONAKDAR <i>et al.</i>, 2015).</p>	
Anotação	Sonda de impedância instalada na sonda bipolar IRE. Tamanho é comparado com uma moeda norte americana de dez centavos.
Referência	(BONAKDAR <i>et al.</i> , 2015)

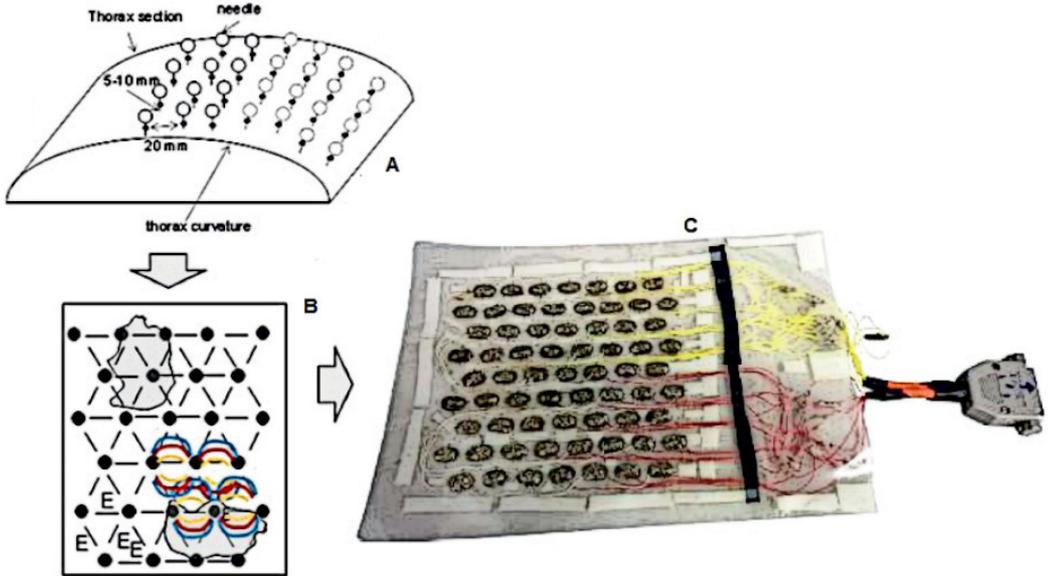
Quadro 29:

Título	<i>Safety and feasibility of the NanoKnife system for irreversible electroporation ablative treatment of canine spontaneous intracranial gliomas</i>
DOI	10.3171/2014.12.JNS141768
Ano	2015
 <p>Fonte: Adaptado de (ROSSMEISL <i>et al.</i>, 2015).</p>	
Anotação	<p>À esquerda: Sonda de eletrodo monopolar de ponta romba usada para tratamento IRE de glioma.</p> <p>À direita: dispositivo de imobilização usado para manter as restrições de uma matriz de sonda de 6 eletrodos</p>
Referência	(ROSSMEISL <i>et al.</i> , 2015)

Quadro 30:

Título	<i>Electrochemotherapy to Metastatic Spinal Melanoma A Novel Treatment of Spinal Metastasis</i>
DOI	10.1097/BRS.0000000000001125
Ano	2015
 <p>Fonte: Adaptado de (GASBARRINI <i>et al.</i>, 2015).</p>	
Anotação	Imagem intra-operatória de controle. A precisa colocação de eletrodos de agulha em torno da lesão neoplásicas foi alcançada (A) e controle fluoroscópico (B) dos eletrodos colocados.
Referência	(GASBARRINI <i>et al.</i> , 2015)

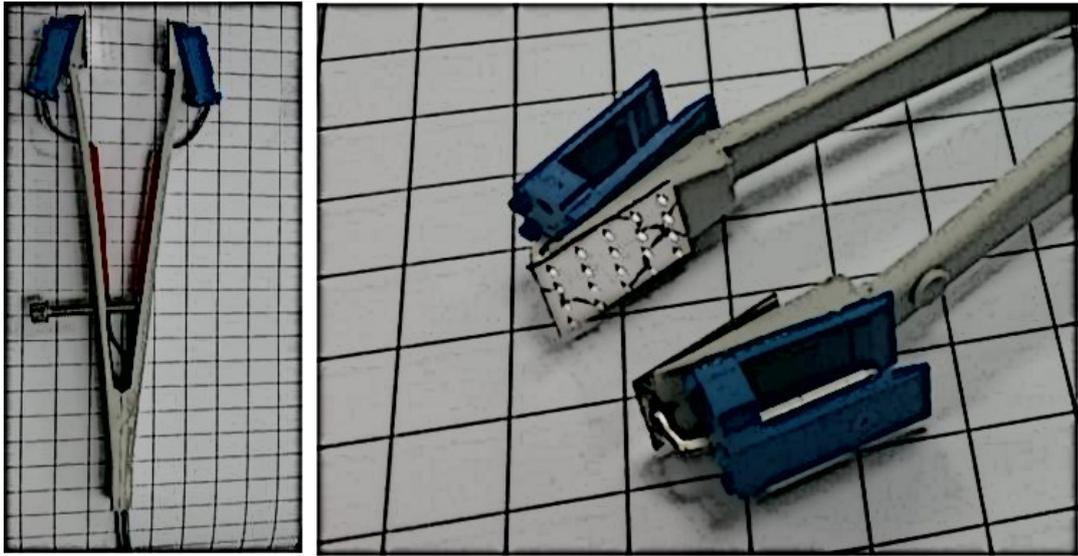
Quadro 31:

Título	<i>A prototype of a flexible grid electrode to treat widespread superficial tumors by means of Electrochemotherapy</i>
DOI	10.1515/raon-2016-0013
Ano	2016
 <p>Fonte: Adaptado de (CAMPANA <i>et al.</i>, 2016b).</p>	
Anotação	A extensa distribuição de eletrodo para o tratamento de EQT sobre a epiderme. (A) Esboço do dispositivo, (B) linhas de campo elétrico resultantes de uma grade eletrodos. Protótipos do eletrodo flexível (C), um dispositivo quadrado de 15 x 15 cm com arranjo hexagonal de guias condutivas destacadas.
Referência	(CAMPANA <i>et al.</i> , 2016b)

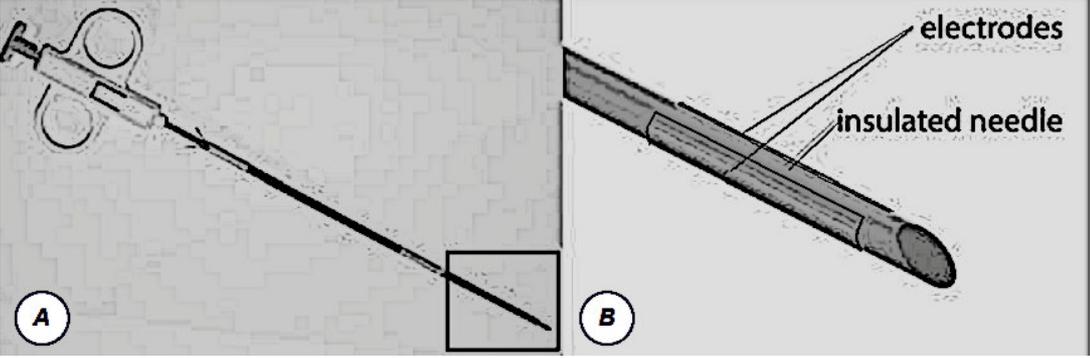
Quadro 32:

Título	<i>Effect of Electrode Distance in Grid Electrode Numerical Models and In Vitro Tests</i>
DOI	10.1177/1533033818764498
Ano	2016
<p>The diagram shows two circular electrode configurations at the top. The left one is labeled '52 needles electrode' and shows a dense hexagonal grid of needles. The right one is labeled '13 needles electrode' and shows a sparse hexagonal grid. Below these, a dashed-line shape represents the 'Triangle sub-structure', which is a central shaded triangle surrounded by a hexagonal grid of needles. Arrows point from the two electrode configurations towards this sub-structure.</p>	
Fonte: Adaptado de (ONGARO <i>et al.</i> , 2016)	
Anotação	Geometria do eletrodo de 8 cm de diâmetro com 52 agulhas com distância de 1 cm, 13 agulhas com distância de 2 cm, e o subestrutura do triângulo.
Referência	(ONGARO <i>et al.</i> , 2016)

Quadro 33:

Título	<i>Finite-element modelling and preliminary validation of microneedle-based electrodes for enhanced tissue electroporation</i>
DOI	10.1109/EMBC.2017.8037629
Ano	2017
	
<p>Fonte: Adaptado de (HOULIHAN <i>et al.</i>, 2017).</p>	
Anotação	<p>À Esquerda: dispositivo concluído mostrando a conexão elétrica e parafuso de rolha.</p> <p>À direita: detalhe da região do eletrodo. Os retângulos com protuberâncias (matriz de agulhas de 1,7 mm) são de 6 mm².</p>
Referência	(HOULIHAN <i>et al.</i> , 2017)

Quadro 34:

Título	<i>Minimally invasive electrochemotherapy procedure for treating nasal duct tumors in dogs using a single needle electrode</i>
DOI	10.1515/raon-2017-0043
Ano	2017
 <p>Fonte: Adaptado de (MAGLIETTI <i>et al.</i>, 2017).</p>	
Anotação	(A) o protótipo, em (B) o esquema da ponta, ampliado a área de (A). O eletrodo consiste em uma agulha isolada cercada por duas placas paralelas de cada lado.
Referência	(MAGLIETTI <i>et al.</i> , 2017)

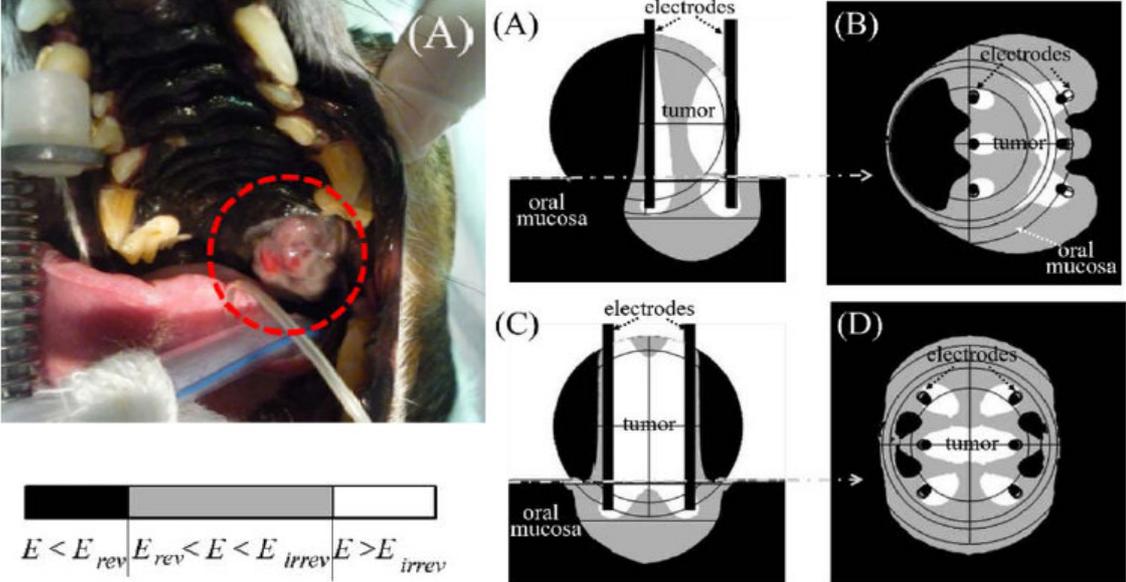
Quadro 35:

Título	<i>Electroporation by concentric-type needle electrodes and arrays</i>
DOI	10.1016/j.bioelechem.2017.06.014
Ano	2017
(a)	(b)
<p>Fonte: Adaptado de (KUNG <i>et al.</i>, 2017).</p>	
Anotação	(a) Diagrama esquemático da configuração experimental de um eletroporador; (b) diagrama estrutural do eletrodo de haste. O comprimento da agulha 20G é de 5 mm (diâmetro interno de 0,58 mm; diâmetro externo de 0,88 mm); o comprimento da agulha 30G é de 10 mm (diâmetro interno de 0,13 mm; diâmetro externo de 0,31 mm); e o comprimento do tubo de polietileno PE-10 é de aproximadamente 2 mm (diâmetro interno de 0,28 mm; diâmetro externo de 0,61 mm).
Referência	(KUNG <i>et al.</i> , 2017)

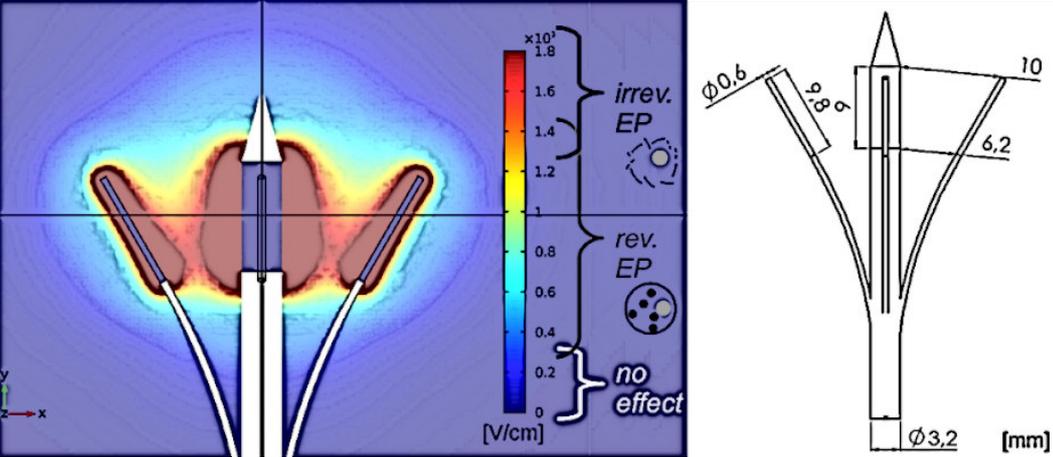
Quadro 36:

Título	<i>Bipolar Microsecond Pulses and Insulated Needle Electrodes for Reducing Muscle Contractions During Irreversible Electroporation</i>
DOI	10.1109/TBME.2017.2690624
Ano	2017
<p>(a) Monopolar pulse waveform with a pulse width of $100 \mu\text{s}$ and a period $T=1 \text{ s}$.</p> <p>(b) Bipolar H-FIRE pulse waveform with a total duration of $\text{Pulse width} \times \text{Pulse number} = 100 \mu\text{s}$, showing pulse number, pulse width, and delay. The period is $T=1 \text{ s}$.</p> <p>(c) Traditional needle electrode tip.</p> <p>(d) Insulated needle electrode tip.</p> <p>The graph shows Voltage [V] (left axis, -3 to 3) and Current [A] (right axis, -15 to 15) versus Time [μs] (0 to 20). The voltage (blue solid line) and current (orange dashed line) waveforms are shown for a bipolar pulse sequence.</p>	
Fonte: Adaptado de (YAO <i>et al.</i> , 2017)	
Anotação	Experimentos IRE e H-FIRE em fígados de coelhos. (a) Os tratamentos tradicionais de IRE usando um único pulso monopolar, que é repetido uma vez por segundo. (b) Os tratamentos H-FIRE usam uma deliberação rápida de pulsos de polaridade alternada. (c) As pontas dos eletrodos de agulha tradicionais estão totalmente expostas. (d) Os eletrodos de agulha isolados são pintados com um revestimento isolante em sua superfície externa. As formas de onda de tensão e corrente típicas com uma duração de pulso individual de $2 \mu\text{s}$.
Referência	(YAO <i>et al.</i> , 2017)

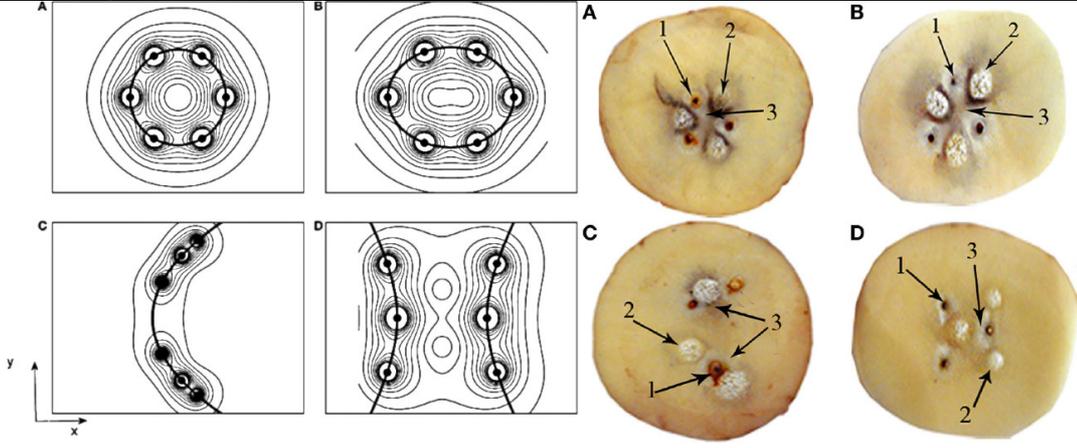
Quadro 37:

Título	<i>Oral Mucosa Model for Electrochemotherapy Treatment of Dog Mouth Cancer Ex Vivo, In Silico, and In Vivo Experiments</i>
DOI	10.1111/aor.13003
Ano	2018
 <p style="text-align: center;">Fonte: Adaptado de (SUZUKI <i>et al.</i>, 2018).</p>	
Anotação	<p>Um melanoma oral canino de 15 mm em diâmetro. O tumor foi tratado com uma aplicação EQT com eletrodos de agulha, 130 kV/m, 8 pulsos, 100 ms, 1 Hz:</p> <p style="text-align: center;">(A - esquerda) Antes do tratamento.</p> <p>À direita: situações de eletrodo para o tratamento <i>in vivo</i> e a presente distribuição de campo elétrico local para 130 kV/m com eletroporação em um modelo. A distância entre duas colunas de agulhas é de 5 mm. As imagens à esquerda mostram a visão central do YZ em todo o modelo de tumor. As fotos à direita mostram o XY corte transversal.</p> <p style="text-align: center;">Resultados para a simulação de osso sob a mucosa oral em A - direita, B, C e D.</p>
Referência	(SUZUKI <i>et al.</i> , 2018)

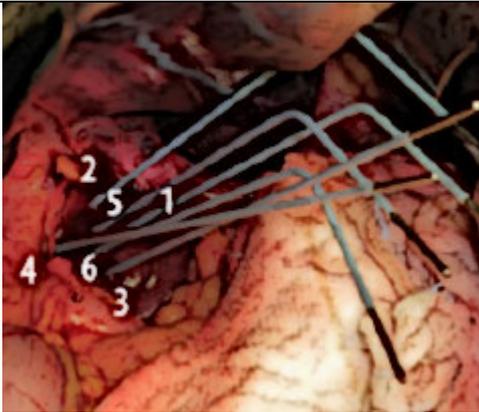
Quadro 38:

Título	<i>Electroporation of the liver: More than 2 concurrently active, curved electrodes allow new concepts for irreversible electroporation and electrochemotherapy</i>
DOI	10.1177/1533033818809994
Ano	2018
	 <p>The figure consists of two parts. On the left is a color-coded simulation of the electric field distribution in a cross-section of the liver. A central electrode is flanked by two curved electrodes. The field strength is indicated by a color scale from blue (low) to red (high). A legend on the right of the simulation shows three regions: 'irrev. EP' (red, > 1.3 kV/cm), 'rev. EP' (yellow/green, 0.3-1.3 kV/cm), and 'no effect' (blue, < 0.3 kV/cm). On the right is a technical drawing of the electrode assembly. It shows a central shaft with a diameter of 3.2 mm and two curved electrodes branching out. Dimensions are given in mm: the distance between the tips of the curved electrodes is 10 mm, the distance from the central shaft to the tip of each curved electrode is 6.2 mm, and the diameter of the curved electrodes is 0.6 mm. A 1.8 mm diameter section is also indicated.</p>
	Fonte: Adaptado de (RITTER <i>et al.</i> , 2018).
Anotação	<p>Simulação de campo elétrico:</p> <p>À esquerda: Plano seccional do sistema elétrico simulado distribuição de campo (estática) para uma tensão aplicada de $U = 1,5$ kV. Área vermelha: $E > 1,3$ kV / cm, o tecido nesta área será irreversivelmente eletroporado (térmico a ablação também é possível, especialmente perto da superfície do eletrodo). Área azul: $E < 0,3$ kV / cm, o tecido nesta área não será prejudicado. Área intermediária: EP reversível, área alvo para drogas quimioterápicas (EQT). Estes limites são estimados; assim, as áreas da imagem são sobrepostas. Os valores exatos dependem do tipo de tecido e do protocolo de pulso a serem determinados experimentalmente.</p> <p>À direita: Desenho do projeto com as cotas desta simulação.</p>
Referência	(RITTER <i>et al.</i> , 2018)

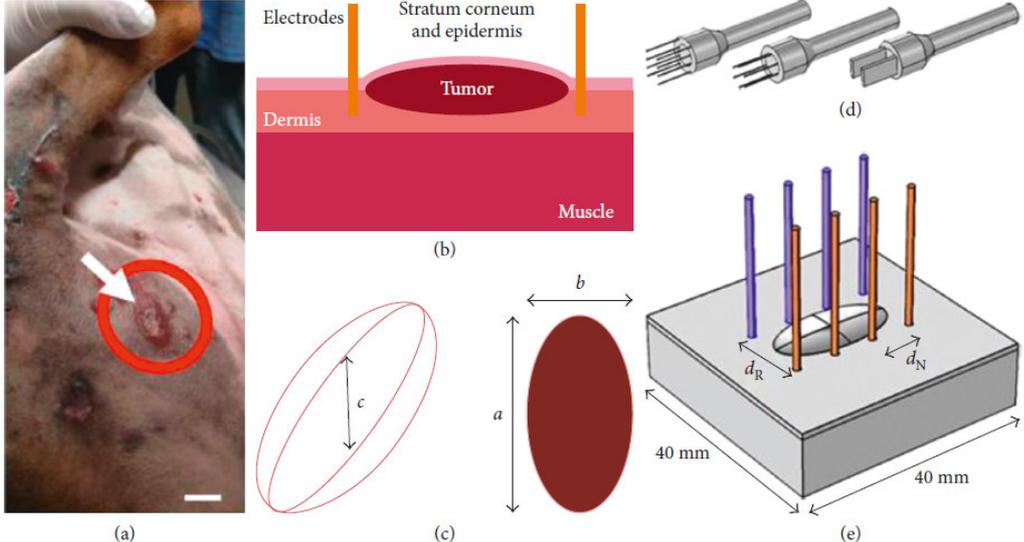
Quadro 39:

Título	<i>Tissue Damage, Temperature, and pH Induced by Different Electrode Arrays on Potato Pieces (Solanum tuberosum L.)</i>
DOI	10.3389/fonc.2018.00101
Ano	2018
	 <p style="text-align: center;">Fonte: Adaptado de (GONZÁLEZ <i>et al.</i>, 2018).</p>
Anotação	<p>Padrões espaciais bidimensionais da intensidade do campo elétrico induzido em um meio homogêneo, isotrópico e linear para configurações de eletrodo com (A) circular; (B) elíptico; (C) parabólico; e (D) formas hiperbólicas.</p> <p>Amstras dos pedaços de batata perturbados com 10 mA durante 30 min para (A) Configuração I; (B) Configuração II; (C) Configuração III; e (D) Configuração IV. Nesta figura é mostrada a necrose em torno de cada eletrodo (1), borbulhando em torno do cátodo (2), e danos irreversíveis ao tecido entre os eletrodos (3).</p>
Referência	(GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 2018)

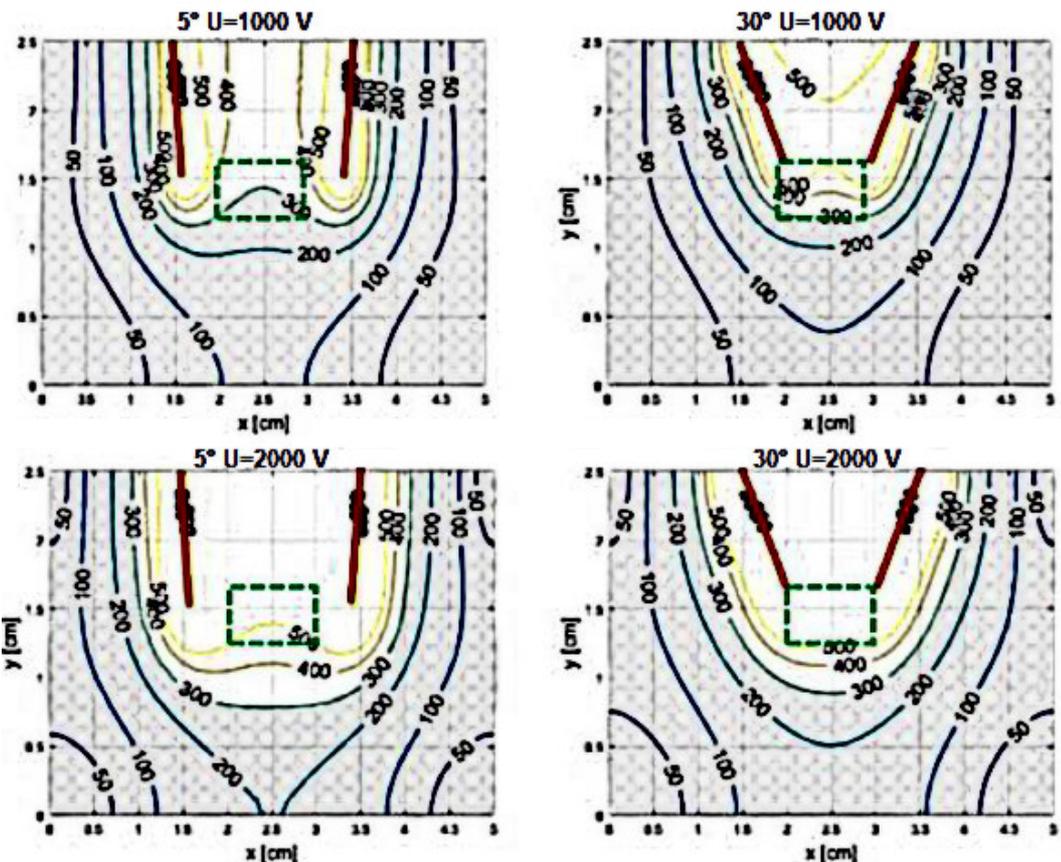
Quadro 40:

Título	<i>Time-Dependent Finite Element Analysis of In Vivo Electrochemotherapy Treatment</i>
DOI	10.1177/1533033818790510
Ano	2018
 <p>Fonte: Adaptado de (PINTAR <i>et al.</i>, 2018).</p>	
Anotação	Posições dos eletrodos durante o tratamento de eletroquimioterapia (ECT) in vivo da metástase colorretal.
Referência	(PINTAR <i>et al.</i> , 2018)

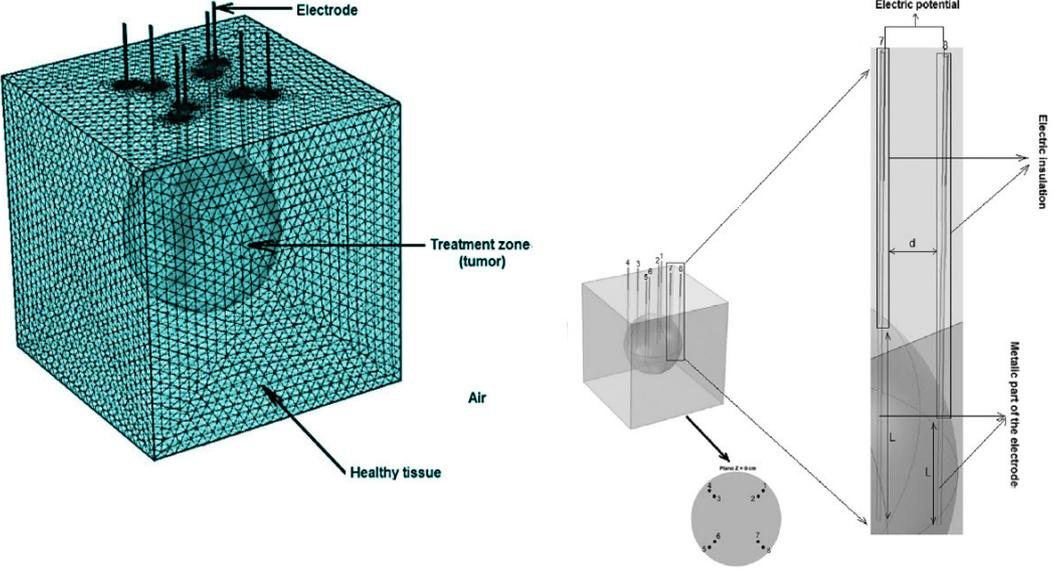
Quadro 41:

Título	<i>Electrochemotherapy Effectiveness Loss due to Electric Field Indentation between Needle Electrodes - A Numerical Study</i>
DOI	10.1155/2018/6024635
Ano	2018
Anotação	 <p>Fonte: Adaptado de (BERKENBROCK; MACHADO; SUZUKI, 2018)</p>
Referência	(BERKENBROCK; MACHADO; SUZUKI, 2018)

Quadro 42:

Título	<i>Non-parallelism of needles in electroporation 3d computational model and experimental analysis</i>
DOI	10.1108/COMPEL-04-2018-0189
Ano	2019
	
Fonte: Adaptado de (CAMPANA <i>et al.</i> , 2019a).	
Anotação	Intensidade do campo elétrico em [V/cm] e histograma elétrico valores de campo elétrico no quadrado pontilhado considerando o ângulo de (a) 5° e de (b) 30° com um tensão aplicada de 2.000 V e o ângulo de (c) 5° e de (d) 30° com um tensão aplicada de 1000 V
Referência	(CAMPANA <i>et al.</i> , 2019a)

Quadro 43:

Título	<i>Simulations of the electrostatic field, temperature, and tissue damage generated by multiple electrodes for electrochemical treatment</i>
DOI	10.1016/j.apm.2019.05.002
Ano	2019
 <p style="text-align: center;">Fonte: Adaptado de (CALZADO <i>et al.</i>, 2019).</p>	
Anotação	<p>Matriz neoplásica e eletrodos: Malha criada no domínio cúbico heterogêneo para resolução da equação de Poisson, a equação de Laplace e a equação estacionária de transferência do bioaquecimento de Pennes. Ao centro está o tecido neoplásico, rodeado pelo tecido saudável. O <i>software</i> definiu automaticamente o tamanho de cada elemento da geometria.</p>
Referência	(CALZADO <i>et al.</i> , 2019)

Quadro 44:

Título	<i>Electrochemotherapy – Emerging applications technical advances, new indications, combined approaches, and multi-institutional collaboration</i>
DOI	10.1016/j.ejso.2018.11.023
Ano	2019
 <p>Fonte: Adaptado de (CAMPANA <i>et al.</i>, 2019b).</p>	
Anotação	Sondas de eletrodos: (a) Eletrodo de comprimento ajustável. (b) Eletrodos de agulha longa para EQT de geometria variável. Geometria variável do eletrodo EQT implica na inserção de um número variável (de 2 a 6) de eletrodos de agulha de 16 a 30 cm de comprimento com uma ponta ativa de 3 ou 4 cm.
Referência	(CAMPANA <i>et al.</i> , 2019b)

APÊNDICE E – Entendimentos sobre a correlação de Pearson

Definições para as correlações

Seja x_1, x_2, \dots, x_n o conjunto de medidas de uma variável e y_1, y_2, \dots, y_n as medidas de outra variável: Calculados \bar{x}, \bar{y}, S_x e S_y as médias e desvio padrão amostrais dos dois conjuntos de medidas. Para obter o grau de associação da relação linear entre duas variáveis, usamos o coeficiente de correlação r :

$$r = \frac{S_{xy}}{S_x S_y} \quad (13)$$

Onde:

$$S_{xy} = \frac{\sum(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{n - 1} = \frac{\sum(x_i - y_i) - n\bar{x}\bar{y}}{n - 1} \quad (14)$$

O coeficiente de correlação populacional é representado por ρ e sua estimativa é dada por r , exatamente como \bar{x} é uma estimativa da média populacional μ (DAVID S. MOORE; MCCABE; A., 1996). o coeficiente de correlação de Pearson, r , é uma medida de associação linear entre variáveis, “A correlação mensura a direção e o grau da relação linear entre duas variáveis quantitativas” (DAVID S. MOORE; MCCABE; A., 1996).

Relações entre variáveis

Dois conceitos são chaves para entendê-la: “linearidade” e “associabilidade”. Em termos estatísticos, duas variáveis se associam quando elas guardam semelhanças na distribuição dos seus escores. De modo preciso, elas podem se associar a partir da distribuição das frequências ou pelo compartilhamento de variância. No caso da correlação de Pearson (r) vale esse último parâmetro, ou seja, ele é uma medida da variância compartilhada entre duas variáveis.

Linearidade

Somente relações lineares são detectadas pelo coeficiente de correlação descrito (em geral denominado por coeficiente de correlação de Pearson). Por exemplo, na sucessão de dados (pontos) que representam uma parábola, (polinômio de segundo grau), mesmo havendo uma clara relação (não-linear) entre x e y , o coeficiente de correlação é nulo.

Em termos gráficos, por relação linear entende-se que a melhor forma de representar o padrão de relacionamento entre duas variáveis é através de uma linha reta. Portanto, a correlação de Pearson, r , exige um compartilhamento de variância e que essa variação seja distribuída linearmente.

Por outro lado, o modelo linear supõe que o aumento ou decréscimo de uma unidade na variável x gera o mesmo impacto em $y = f(x)$. O modelo linear está baseado na função definida por $f(x) = ax$ para todo $x \in \mathbb{R}$ onde $a \neq 0$.

Associabilidade

A associação linear entre duas variáveis é avaliada por correlação. Para prever o valor de uma variável contínua a partir de uma outra variável e para descrever a relação entre duas variáveis utiliza-se regressão. O primeiro estágio em qualquer um dos casos é produzir um gráfico de pontos dos dados para obter alguma ideia da forma e grau de associação entre duas variáveis.

Suponha que seja encontrada uma associação ou correlação entre duas variáveis A e B. Podem existir diversas explicações do porque elas variam conjuntamente, desta maneira:

1. Mudanças em A causam mudanças em B;
2. Mudanças em B causam mudanças em A;
3. Mudanças em outras variáveis causam mudanças tanto em A quanto em B;
4. A relação observada é somente uma coincidência.

A terceira explicação é frequentemente a mais apropriada. Isto indica que existe algum processo de conexão em atuação. É difícil estabelecer relações causais a partir de dados observacionais e, por isso, se faz necessária a realização de experimentos para obter evidências impactantes quanto a alguma relação causal.

Interpretação do coeficiente de correlação

O coeficiente de Pearson, r está sempre entre -1 e $+1$, com $r = 0$ correspondente à não associação (ALDRICK, 1995; DÍAZ; OSUNA, 2008; KOZAK; KRZANOWSKI; TARTANUS, 2012; PARANHOS *et al.*, 2014).

O termo “correlação positiva” é usado quando $r > 0$, e nesse caso à medida que x cresce também cresce y , e correlação negativa quando $r < 0$, e nesse caso à medida que x cresce, y decresce (em média).

Quanto maior o valor de r em módulo, mais forte é entendida relação entre as duas variáveis. Neste caso, há dois extremos a serem considerados:

1. Caso $r = 1$ ou $r = -1$ então todos os pontos no gráfico de dispersão estão posicionados em uma reta;
2. Caso $r = 0$ não existe nenhuma associação linear.

Assim, os valores de (r) encontrados podem ser interpretados quanto na magnitude dos coeficientes.

(COHEN, 1988), valores entre 0,10 e 0,29 podem ser considerados pequenos; escores entre 0,30 e 0,49 podem ser considerados como médios; e valores entre 0,50 e 1,00 podem ser interpretados como grandes.

(KOZAK, 2009) apontam para uma classificação ligeiramente diferente:
 $r = 0,10$ até $0,30$ (fraco); $r = 0,40$ até $0,60$ (moderado); $r = 0,70$ até 1 (forte).

Ou seja, na prática quanto maior a proximidade de -1 e $+1$, maior é o grau de dependência estatística linear entre as variáveis. E quanto mais próximo de zero, mais tênue é a força dessa relação.

Algumas das principais propriedades da correlação de Pearson

Baseado em (COHEN, 1988)(DAVID S. MOORE; MCCABE; A., 1996), são destacadas as propriedades do coeficiente e as condições que precisam ser satisfeitas para realizar a análise de correlação de Pearson r :

1. O coeficiente de correlação de Pearson não diferencia entre variáveis independentes e variáveis dependentes;
2. O valor da correlação não muda ao se alterar a unidade de mensuração das variáveis;
3. O coeficiente tem um caráter adimensional, ou seja, ele é desprovido de unidade física que o defina (COHEN, 1988)(DAVID S. MOORE; MCCABE; A., 1996);
4. A correlação exige que as variáveis sejam quantitativas (contínuas ou discretas). Não faz sentido utilizar a correlação de Pearson r para dados categóricos já que é impossível calcular o desvio padrão da variável sexo, por exemplo;
5. Os valores observados precisam estar normalmente distribuídos;
6. Faz-se necessária a independência das observações, ou seja, a ocorrência de uma observação X_1 não influencia a ocorrência de outra observação X_2 .

Testes de normalidade para os conjuntos de valores

Para as correlações de Pearson do estudo de padronização para eletrodos, a variável é um conjunto de valores de mesmo tamanho (os sete experimentos e respectivas simulações) e ordenamento em relação a natureza do eletrodo ou da configuração de eletrodo adotada, a tensão utilizada e parâmetros elétricos do tecido.

Cada um dos vetores de sete posições formam um par proponente à correlação, que deve ser testado quanto a normalidade e, se aprovado, o par é correlacionável. Para este propósito, é possível utilizar o teste de Shapiro-Wilk ou o teste de Kolmogorov-Smirnov. Neste trabalho, ambos são utilizados apenas por motivo de redundância.

Tabela 16 - Resultado dos testes de normalidade para cada par de amostragens - correlação α .

Corrente elétrica	Tubérculo de batata	Teste	Critério	Resultado			
Simulada	teste de Shapiro-Wilk		0,91	>0,05	Aprovado		
	teste de Kolmogorov-Smirnov		0,82	>0,05	Aprovado		
Testado	20,88	16,45	14,63	35,43	26,80	5,35	8,77
Experimental	teste de Shapiro-Wilk		0,56	>0,05	Aprovado		
	teste de Kolmogorov-Smirnov		0,85	>0,05	Aprovado		
Testado	17,72	20,17	12,17	35,11	26,22	7,56	7,44

Tabela 17 - Resultado dos testes de normalidade para cada par de amostragens - correlação β .

Corrente elétrica	Tubérculo de batata	Teste	Critério	Resultado			
Simulada	teste de Shapiro-Wilk		0,91	>0,05	Aprovado		
	teste de Kolmogorov-Smirnov		0,82	>0,05	Aprovado		
Testado	20,88	16,45	14,63	35,43	26,80	5,35	8,77
Simulada	teste de Shapiro-Wilk		0,79	>0,05	Aprovado		
	teste de Kolmogorov-Smirnov		0,78	>0,05	Aprovado		
Testado	65,09	58,12	47,68	127,47	83,46	21,30	36,01

Tabela 18 - Resultado dos testes de normalidade para cada par de amostragens - correlação γ .

Área	Tubérculo de batata	Teste	Critério	Resultado			
Simulada	teste de Shapiro-Wilk		0,67	>0,05	Aprovado		
	teste de Kolmogorov-Smirnov		0,87	>0,05	Aprovado		
Testado	11,61	20,15	15,78	14,76	22,37	3,94	5,45
Experimental	teste de Shapiro-Wilk		0,33	>0,05	Aprovado		
	teste de Kolmogorov-Smirnov		0,91	>0,05	Aprovado		
Testado	12,76	20,27	17,18	21,41	13,4	4,88	4,62

Tabela 19 - Resultado dos testes de normalidade para cada par de amostragens - correlação δ .

Área	Tubérculo de batata				Teste	Critério	Resultado	
Simulada					teste de Shapiro-Wilk	0,67	>0,05	Aprovado
					teste de Kolmogorov-Smirnov	0,87	>0,05	Aprovado
Testado	11,61	20,15	15,78	14,76	22,37	3,94	5,45	
Simulada					teste de Shapiro-Wilk	0,32	>0,05	Aprovado
					teste de Kolmogorov-Smirnov	0,88	>0,05	Aprovado
Testado	10,13	16,74	14,15	14,15	18,61	3,89	5,57	

Correlação de Pearson nos experimentos

Na Tabela 20, são apresentadas as linhas dos comandos de entrada para os conjuntos de dados ordenados e os respectivos resultados das correlações.

Tabela 20 – Comandos no RStudio para efetuar as correlações de Pearson do estudo de padronização.

Comando no RStudio IDE 1.3 Released para obtenção da correlação	
Correlação de Pearson para as simulações e as médias das amostras de cada ensaio de áreas	
Correlação α : $Corrente_{batata(Exper)}^{batata(Simul)} = 97,15\%$	
<pre>> corrente\$`Corrente Experimental Tubérculo` [1] 17.72 20.17 12.17 35.11 26.22 7.56 7.44 > corrente\$`Corrente Simulada Tubérculo` [1] 20.88 16.45 14.63 35.43 26.80 5.35 8.77 > cor(corrente\$`Corrente Simulada Tubérculo`, corrente\$`Corrente Experimental Tubérculo`) [1] 0.9714861 > </pre>	
Correlação β : $Corrente_{batata(Simul)}^{animal(Simul)} = 98,67\%$	
<pre>> correlacao1\$`Corrente Tubérculo` [1] 20.88 16.45 14.63 35.43 26.80 5.35 8.77 > correlacao1\$`Corrente Tumor` [1] 65.09 58.12 47.68 127.47 83.46 21.30 36.01 > cor(correlacao1\$`Corrente Tubérculo`, correlacao1\$`Corrente Tumor`, method = "pearson") [1] 0.986657 ></pre>	
Correlação γ : $\acute{A}rea_{batata(Exper)}^{animal(Simul)} = 77,10\%$	
<pre>> area\$`Área Simulada Tubérculo` [1] 11.61 20.15 15.78 14.76 22.37 3.94 5.45 > area\$`Área Experimental Tubérculo` [1] 12.76 20.27 17.18 21.41 13.40 4.88 4.62 > cor(area\$`Área Experimental Tubérculo`, area\$`Área Simulada Tubérculo`) [1] 0.7710201 > </pre>	
Correlação δ : $\acute{A}rea_{batata(Exper)}^{batata(Simul)} = 99,38\%$	
<pre>> correlacao2\$`Área Tubérculo` [1] 11.61 20.15 15.78 14.76 22.37 3.94 5.45 > correlacao2\$`Área Tumor` [1] 10.13 16.74 14.15 14.15 18.61 3.89 5.57 > cor(correlacao2\$`Área Tubérculo`, correlacao2\$`Área Tumor`, method = "pearson") [1] 0.9938025 > </pre>	

APÊNDICE F – Os critérios das simulações pelo método FEM por meio do *software* COMSOL Multiphysics

Em consideração a geometria do modelo a ser simulado como parte de um meio contínuo, é aplicado o Método de Elementos Finitos (MEF). Então, sem perder as propriedades iniciais do modelo, é feita a devida discretização em um número finito de elementos. Assim, foram modeladas em consideração às condições de Dirichlet e Neumann.

Condições de limite de Dirichlet

Esta condição especifica os valores da solução em certas regiões do domínio no caso do contato entre eletrodo e tecido adjacentes. Neste trabalho, as condições de Dirichlet são aplicadas nas regiões polarizadas e eventualmente aterradas (MIKLAVČIČ *et al.*, 2000).

Condições de contorno de Neumann

Não há nenhuma restrição matemática imposta às fronteiras associadas às condições de Neumann, uma vez que é uma condição natural. As condições de Neumann são aplicadas nas superfícies externas, que neste trabalho são todas isolantes. Esta condição é expressa pela equação (15),

$$\frac{\partial V}{\partial \mathbf{n}} = 0 \quad (15)$$

onde \mathbf{n} representa a unidade do vetor normal para o limite onde a condição de Neumann é definida, e $\frac{\partial V}{\partial \mathbf{n}}$ é a taxa de mudanças potenciais de V ao longo da direção normal, externa ao limite (MIKLAVČIČ *et al.*, 2000; SEL *et al.*, 2005a).

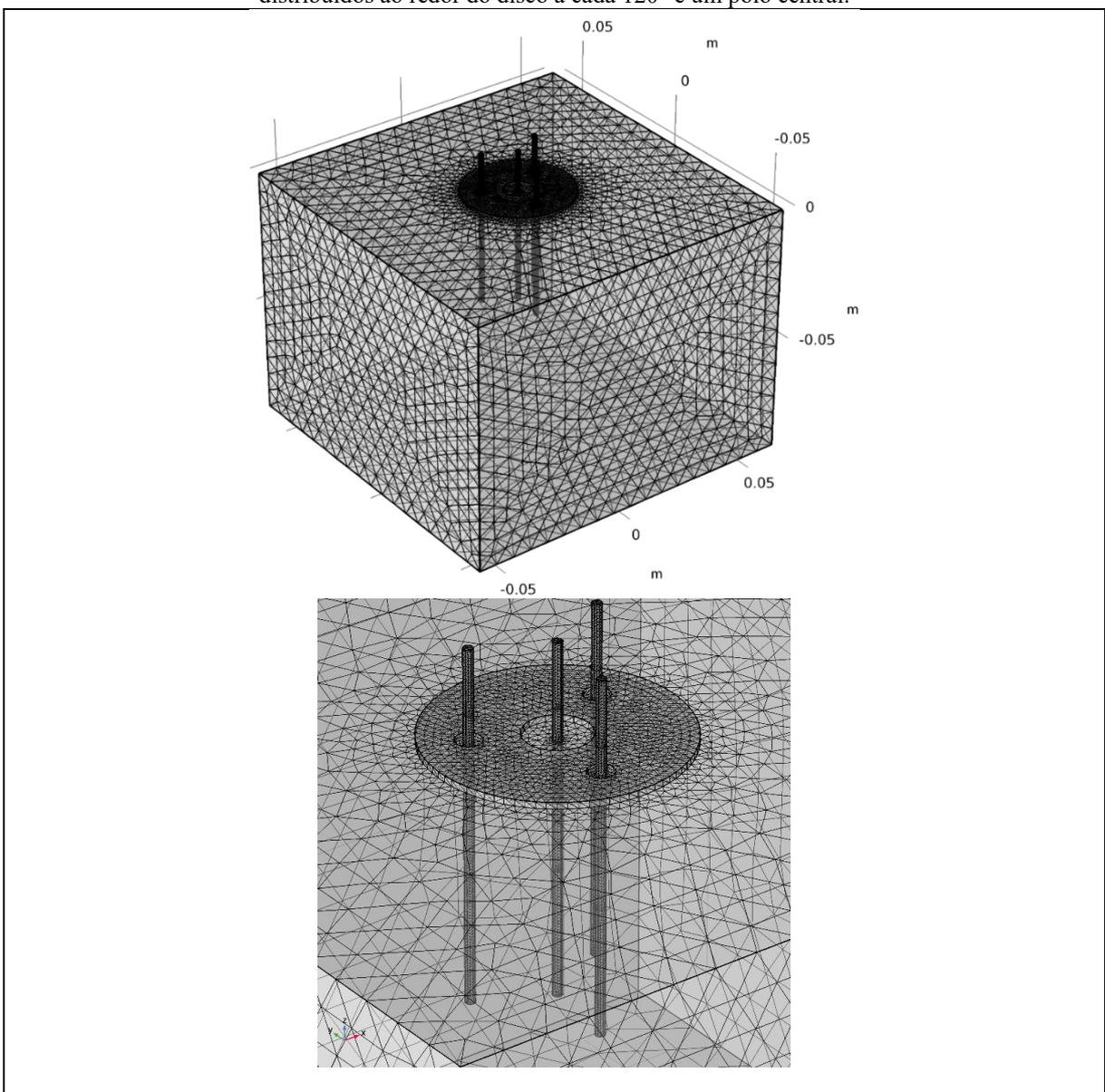
As geometrias dos modelos em elementos finitos

A família de três eletrodos teve suas malhas geradas pelo COMSOL Multiphysics, e são apresentadas nos tópicos a seguir.

Eletrodo de placa em forma de disco com até quatro eletrodos parcialmente isolados distribuídos no centro e a cerca de 120° no raio médio da placa

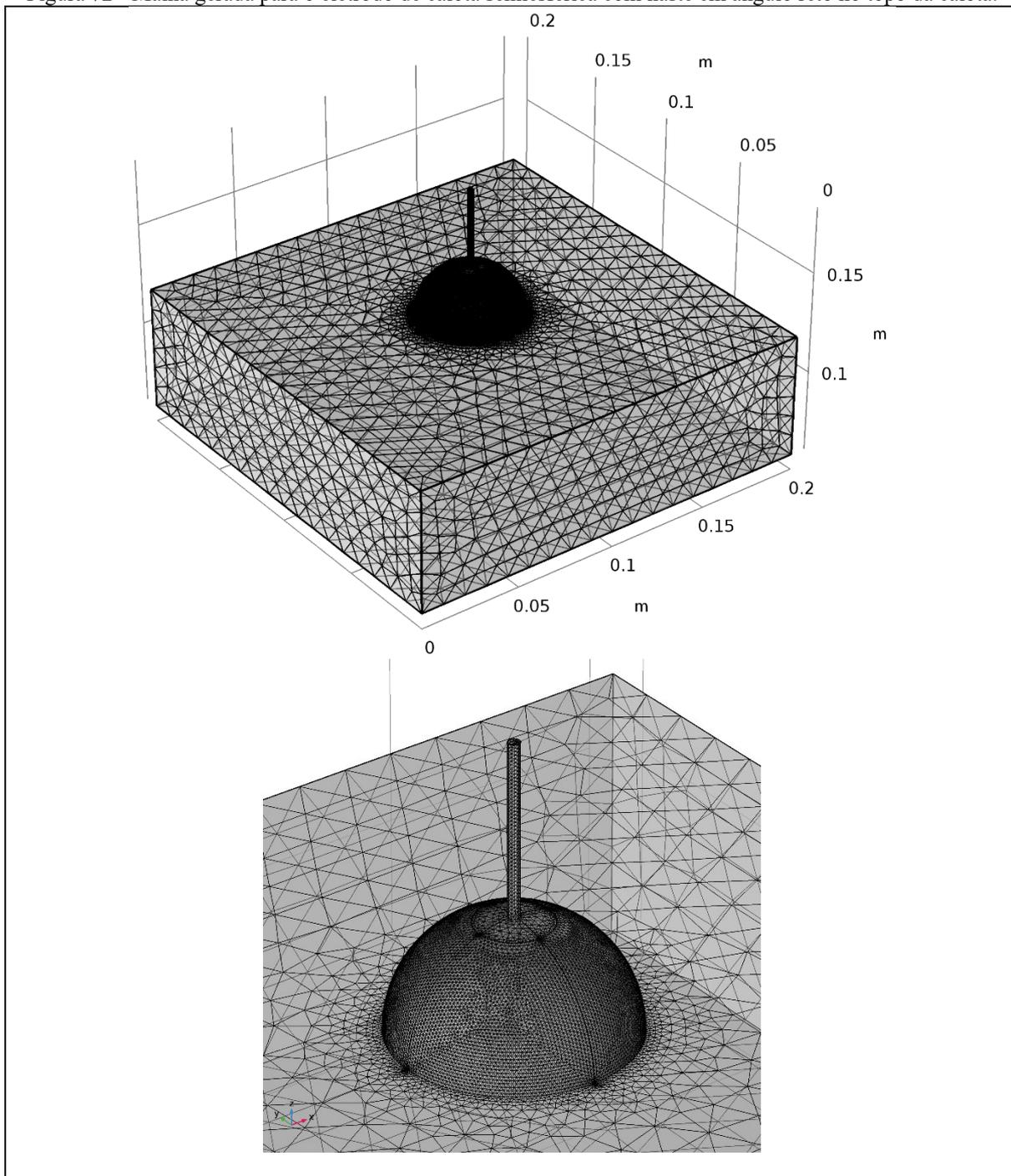
Modelo geométrico com malha gerada para definição dos domínios de cálculo no eletrodo de placa em forma de disco com até quatro polos parcialmente isolados, distribuídos no centro e acionados a cada 120° no raio da trajetória mediana da placa: o número dos elementos tetraédricos é de 307.098 unidades, Figura 71.

Figura 71 – Dado um tecido homogêneo para suporte, a malha gerada para o eletrodo de placa e três polos distribuídos ao redor do disco a cada 120° e um polo central.



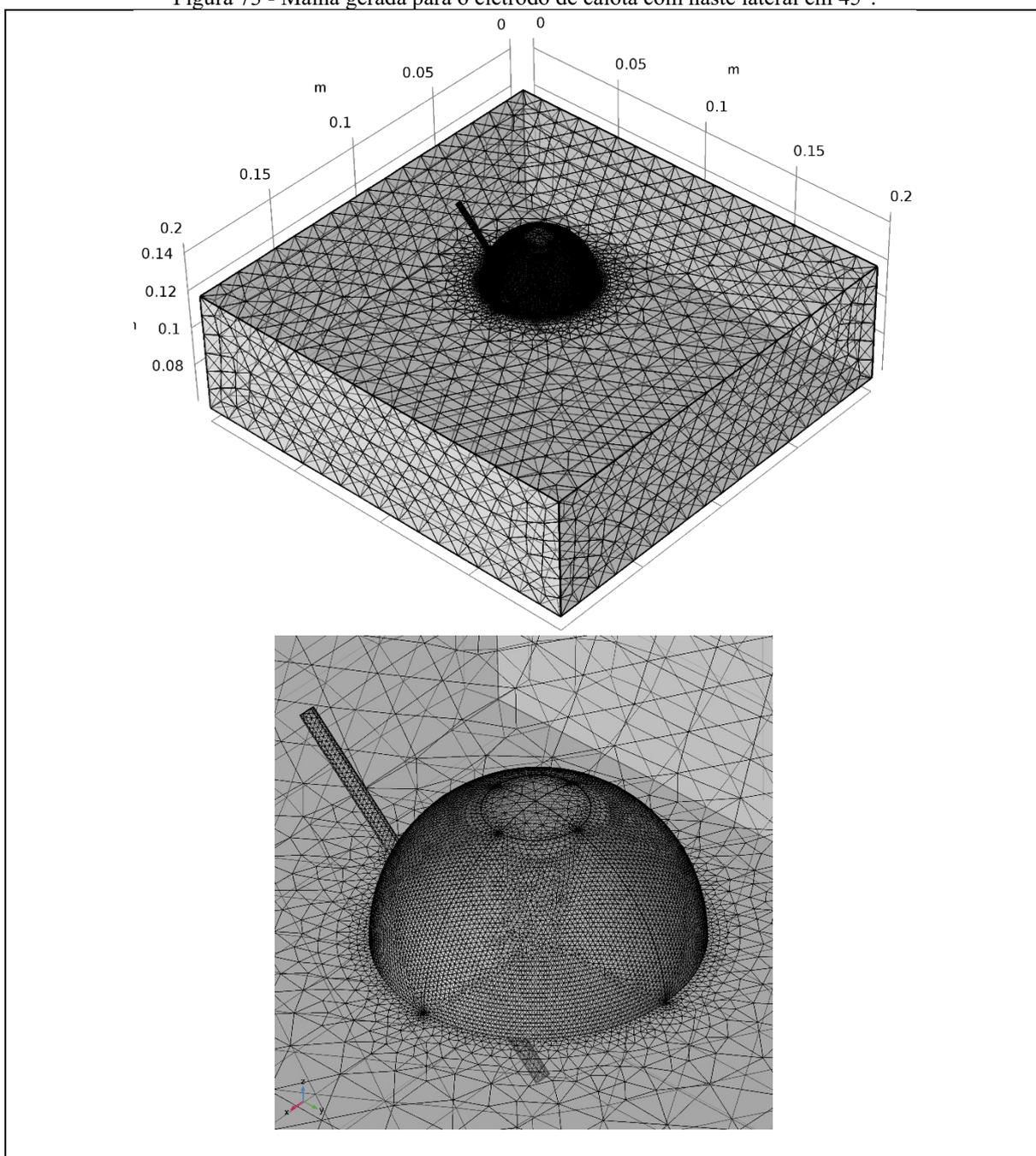
Modelo geométrico com malha gerada para definição dos domínios de cálculo na placa do eletrodo capa semiesférica com eletrodo parcialmente isolado de inserção no orifício superior da calota: o número dos elementos tetraédricos é de 347.286 unidades, Figura 72.

Figura 72 - Malha gerada para o eletrodo de calota semiesférica com haste em ângulo reto no topo da calota.



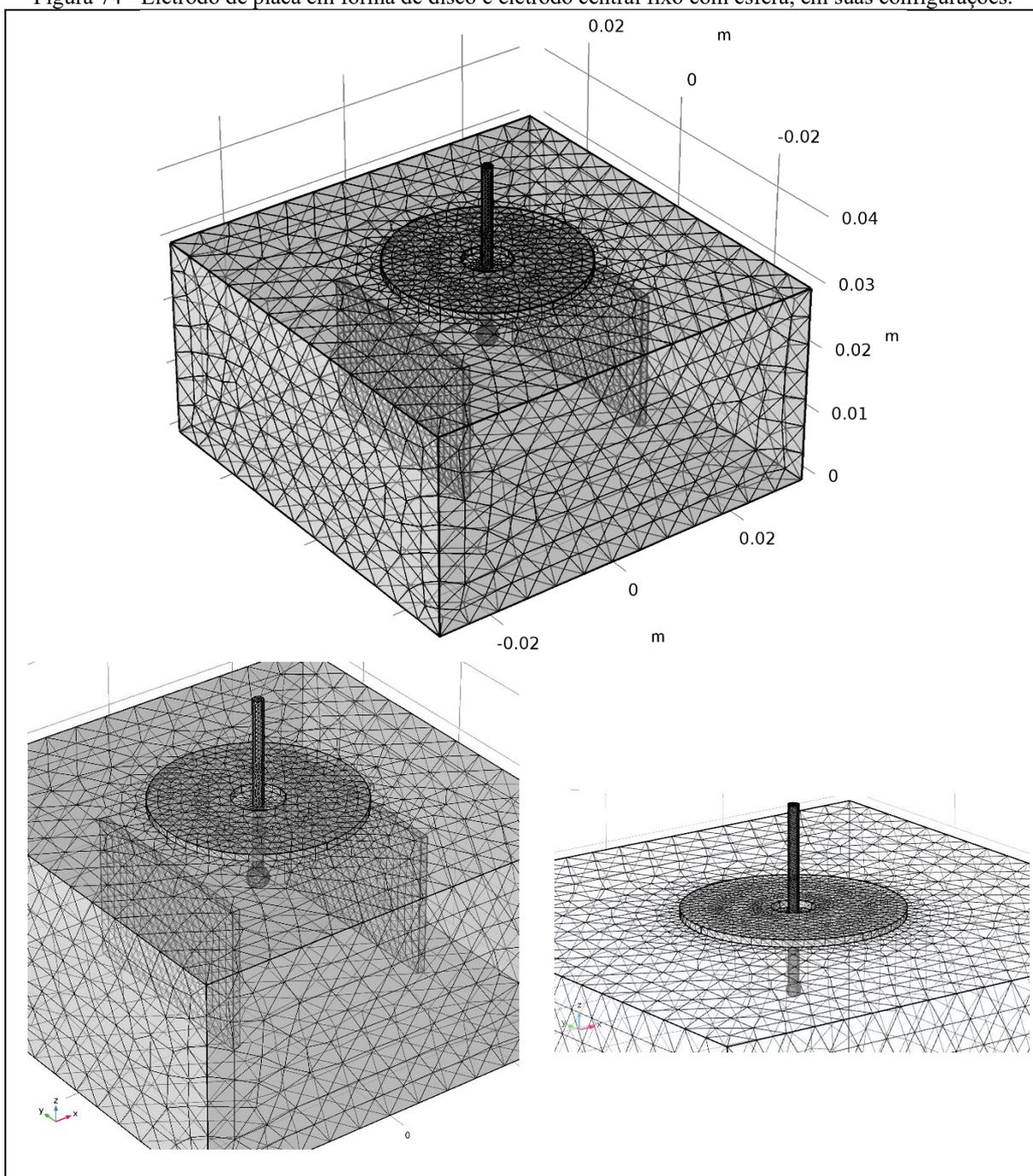
Modelo geométrico com malha gerada para definição dos domínios de cálculo na placa do eletrodo capa semiesférica com eletrodo parcialmente isolado de inserção lateral à calota: o número dos elementos tetraédricos é de 347.286 unidades, Figura 73.

Figura 73 - Malha gerada para o eletrodo de calota com haste lateral em 45°.



Modelo geométrico com malha gerada para definição dos domínios de cálculo no eletrodo de placa em forma de disco com haste isolada com extremidade esférica condutiva: o número de elementos tetraédricos é aproximadamente de 32.834 unidades, Figura 74.

Figura 74 - Eletrodo de placa em forma de disco e eletrodo central fixo com esfera, em suas configurações.



APÊNDICE G – Alguns resultados extras simulados com os eletrodos propostos

As simulação computacionais deste apêndice utilizam alguns dos parâmetros adequados para os tecidos vivos, apresentados na Tabela 21.

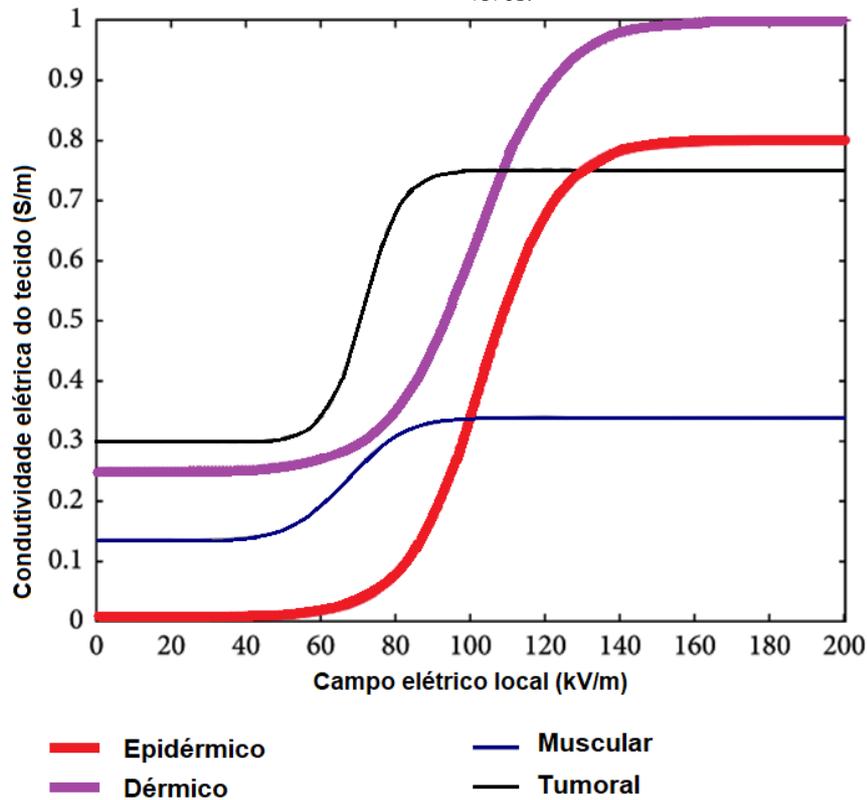
Tabela 21 - Listagem dos parâmetros de acordo com os tecidos normalmente adotados nos estudos de EQT.

Material	Condutividade elétrica inicial (σ) [S/m]	Máxima	E_{rev} [kV/m]	E_{irrev} [kV/m]
		condutividade elétrica alcançada (σ_{max}) [S/m]		
Epiderme e estrato córneo	0.008	0.800	40	120
Derme e gordura	0.250	1.000	30	120
Músculo (medição transversal)	0.135	0.340	20	80
Músculo (medição longitudinal)	0.75	1.875	8	80
Tumor	0.300	0.750	40	80
Tumor *	0.150	0.260	10	160
Tumor **	0.135	0.338	40	80
Osso	0.01	-	-	-
Gengiva	0.23	0.80	20	80
Fígado	0.10	0.30	360	640
Tubérculo de batata (<i>Solanum tuberosum</i>)	0.03	0.2	20	60
Aço cirurgico ou análogos inérfteis	1.74×10^9	-	-	-

Dados obtidos de * (IVORRA *et al.*, 2008) e ** (IVORRA *et al.*, 2009).

A título de exemplo, a evolução das condutividades elétricas nos tecidos vivos relacionadas à intensidade do campo elétrico pode ser verificada na Figura 75.

Figura 75 - Curvas das condutividades elétricas dependentes do campo elétrico local para cada um dos tecidos vivos.

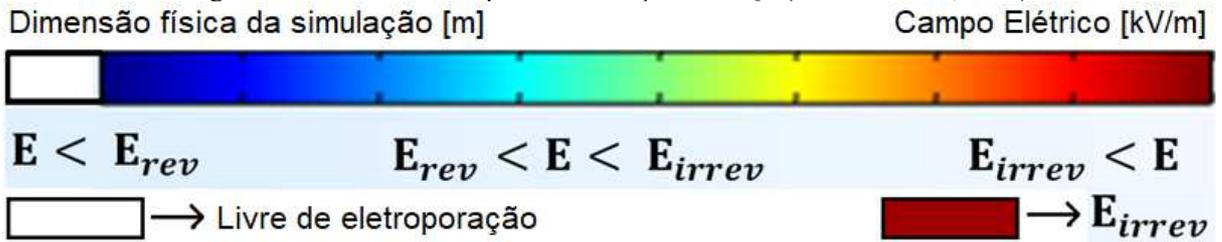


Fonte: Adaptado de (BERKENBROCK *et al.*, 2019; COROVIC *et al.*, 2013; RITTER *et al.*, 2018; SUZUKI; MARQUES; RANGEL, 2016).

O fenômeno de eletroporação é observado quando em uma determinada região o campo elétrico ultrapassa o limite E_{rev} , naturalmente a erguer a condutividade elétrica, de σ_0 a σ_{max} . Quando o campo elétrico é menor que E_{rev} , considera-se que o tecido não sofreu uma alteração elétrica notável. Para obter um tratamento eficaz, o campo elétrico deve ser estabelecido dentro da faixa $E_{rev} < E < E_{irrev}$.

Na Figura 76 são apresentadas as escalas de cores associadas às simulações e os respectivos valores de campo elétrico para o intervalo da eletroporação reversível.

Figura 76 - Escala de cores para as simulações de EQT (SUZUKI *et al.*, 2018).



Tumor - 40 kV/m
 Epiderme e estrato córneo - 40 kV/m
 Derme e gordura - 30 kV/m
 Músculo - 20 kV/m
 Osso - indefinido
 Gengiva - 20 kV/m
 Fígado - 360 kV/m
 Tubérculo de batata - 20 kV/m

Tumor - 80 kV/m
 Epiderme e estrato córneo - 120 kV/m
 Derme e gordura - 120 kV/m
 Músculo - 80 kV/m
 Osso - indefinido
 Gengiva - 80 kV/m
 Fígado - 640 kV/m
 Tubérculo de batata - 60 kV/m

Resultado gráfico das simulações dos experimentos 01T ao 08T

Os ensaios simulados com os parâmetros do tumor para os campos elétricos decorrentes da imposição de tensões entre 2,7 kV e 3,0 kV são apresentados na sequencia de figuras: Figura 77, Figura 78, Figura 79, Figura 80, Figura 81, Figura 82, Figura 83, Figura 84. Estes ensaios são respectivamente denominados de 01T, 02T, até 08T.

Figura 77 - Experimento 01T - pulsos entre toróide e haste central – tecido tumoral.

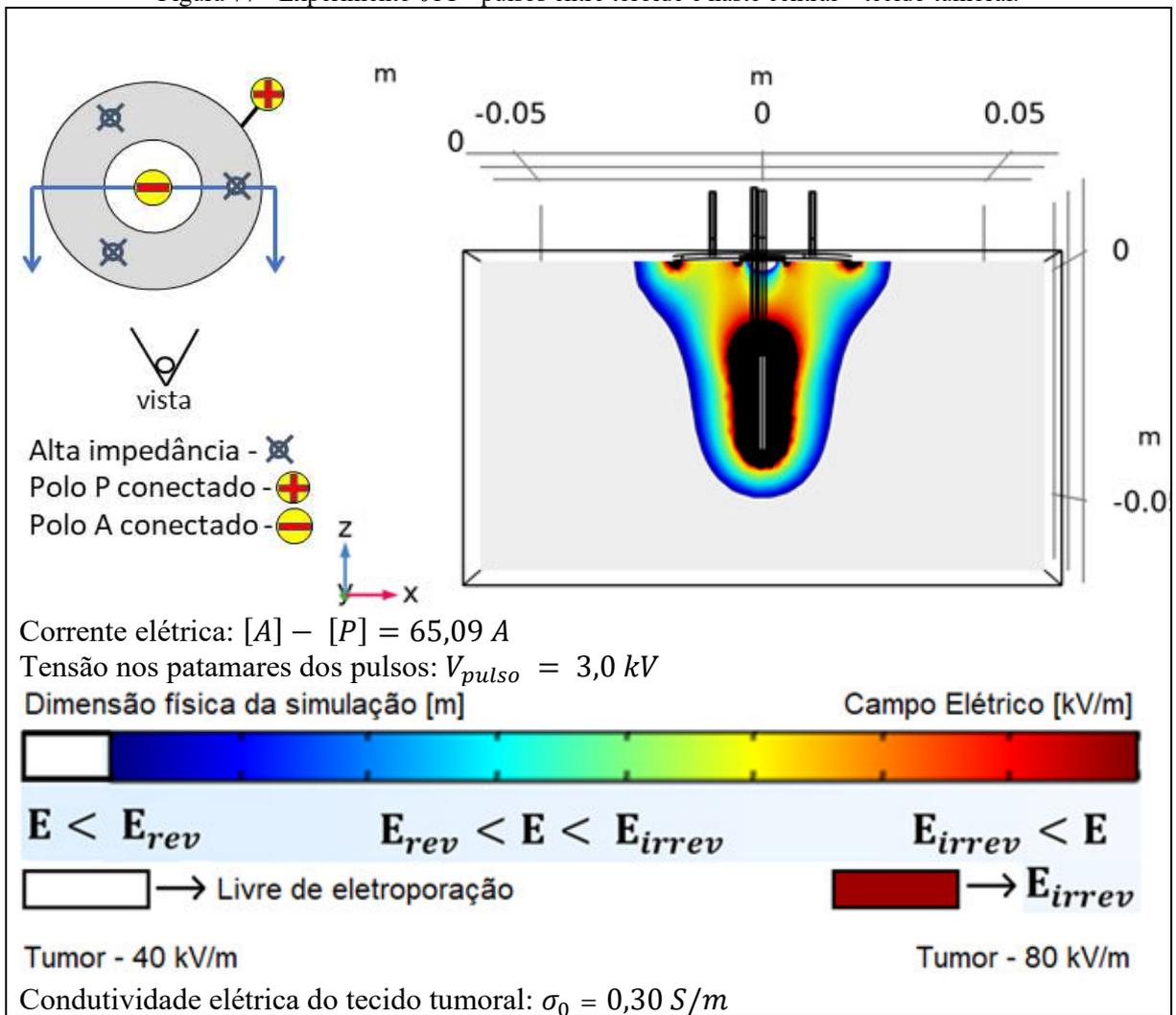


Figura 78 - Experimento 02T - pulsos entre haste central e haste da borda – tecido tumoral.

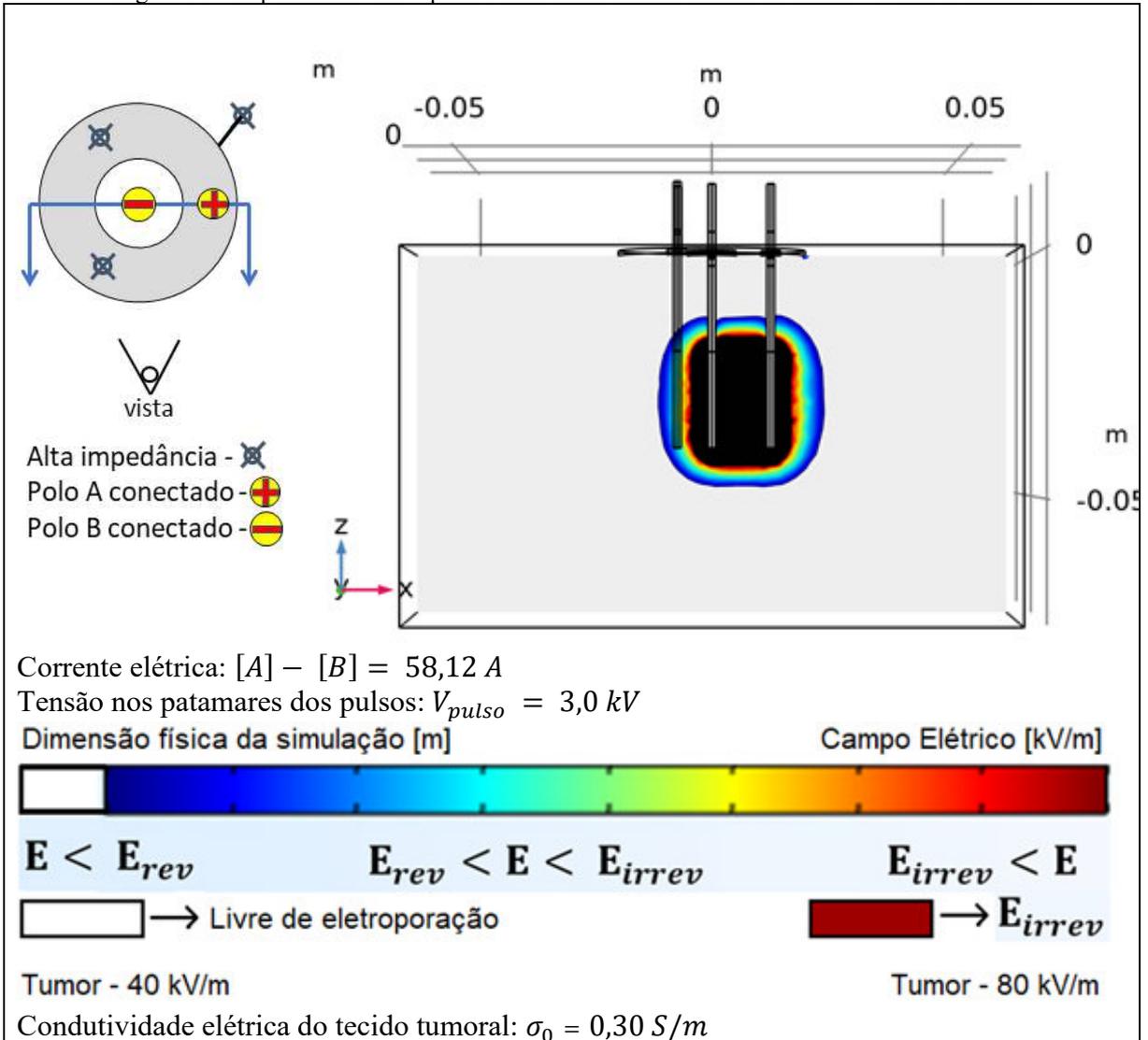


Figura 79 - Experimento 03T - pulsos entre um par de hastes na borda do toróide – tecido tumoral.

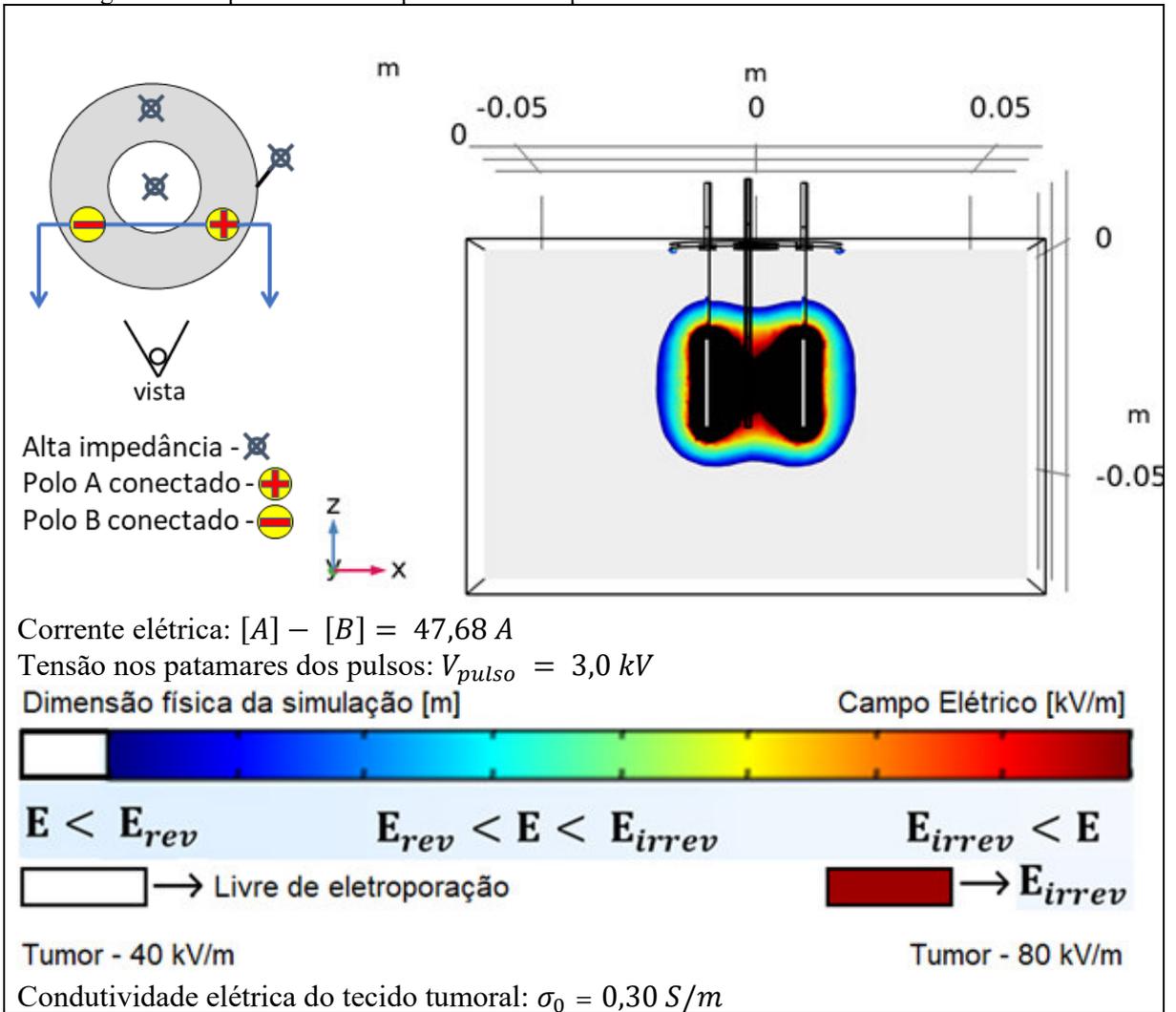


Figura 80 - Experimento 04T - pulsos entre calota e haste central vertical – tecido tumoral.

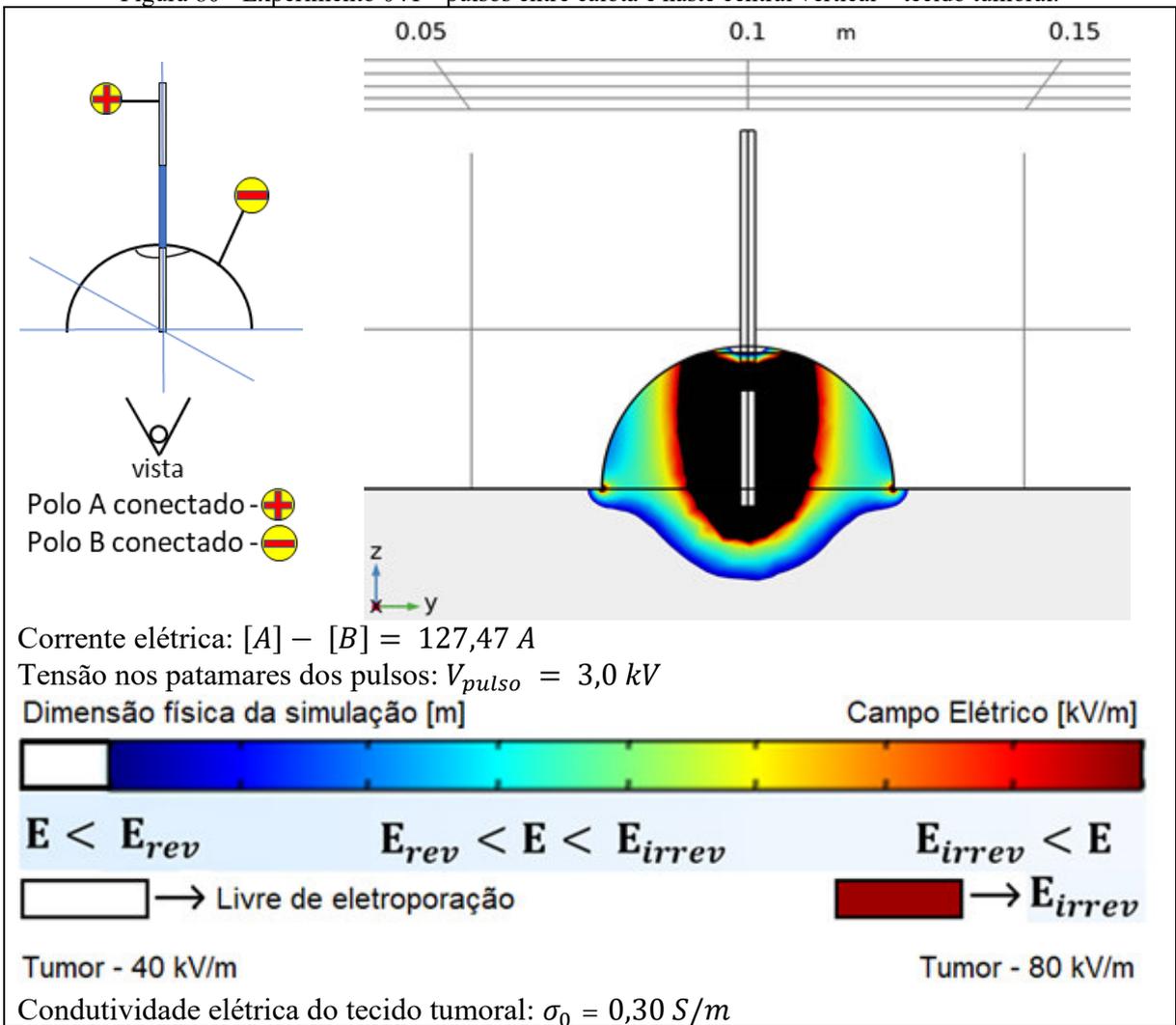


Figura 81 - Experimento 05T - pulsos entre calota e haste lateral inclinada – tecido tumoral.

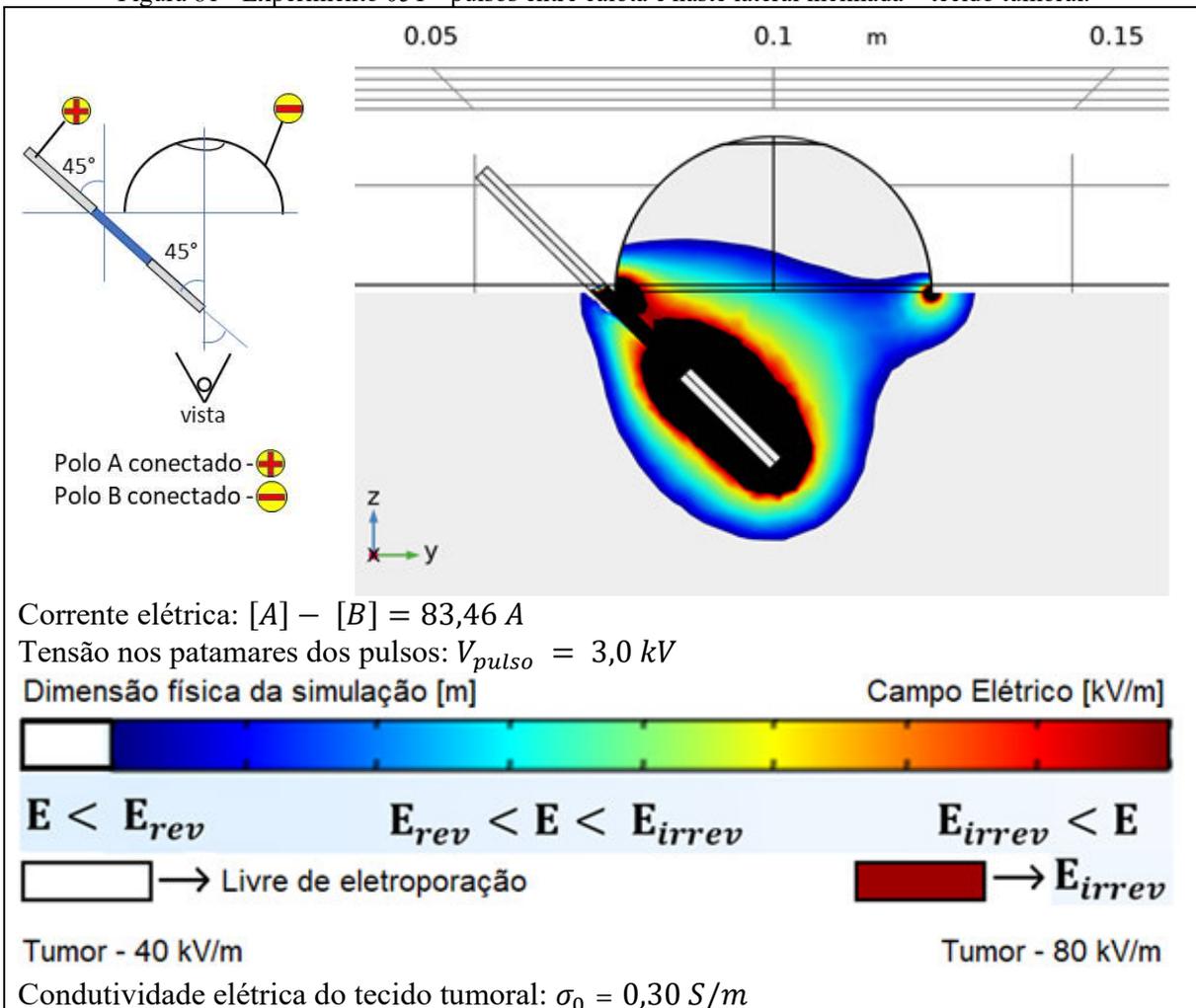


Figura 82 - Experimento 06T - pulsos entre placa circular e esfera, sem placas laterais – tecido tumoral.

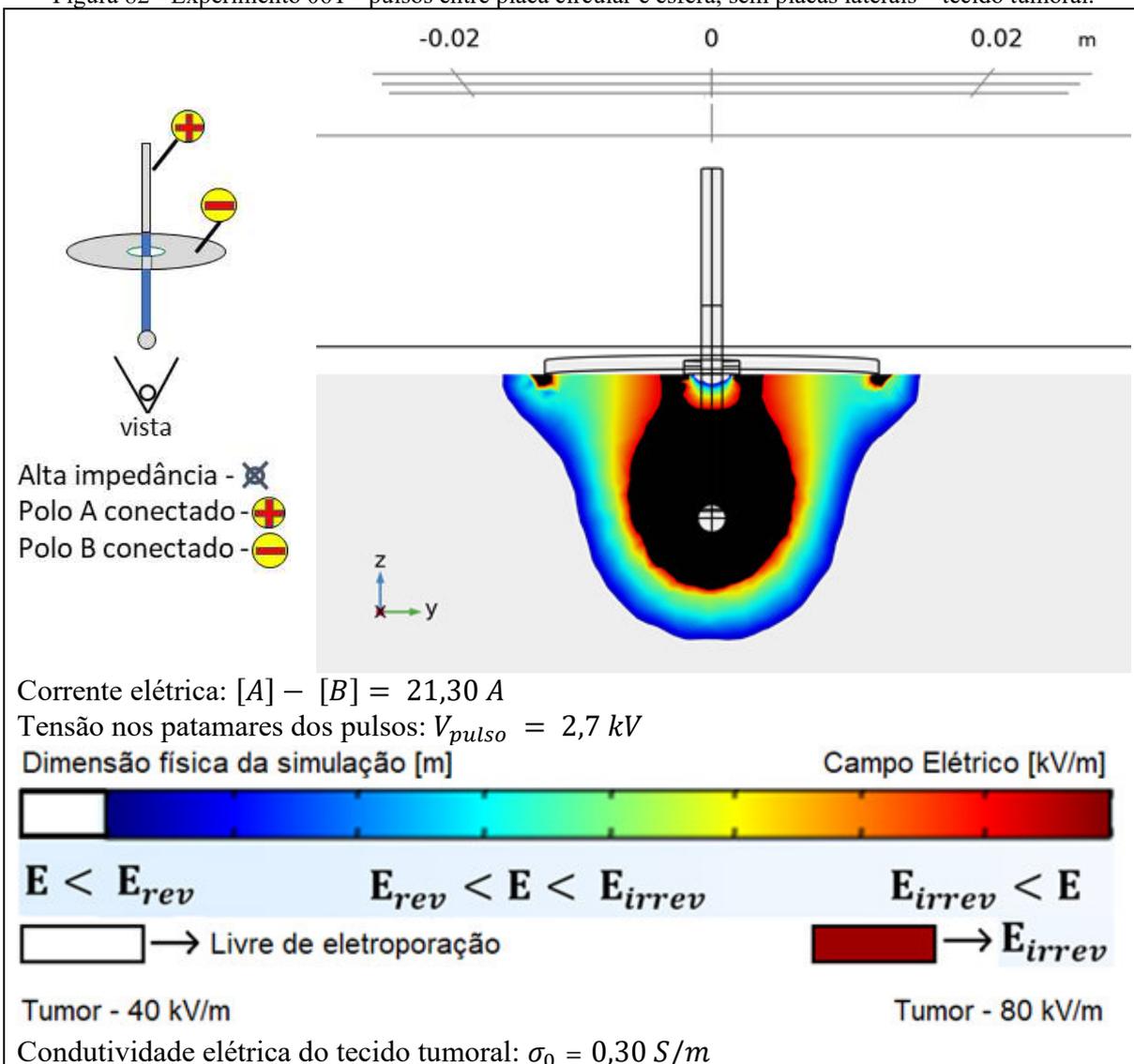


Figura 83 - Experimento 07T - pulsos entre placa circular e esfera, e placas laterais desconectadas – tecido tumoral.

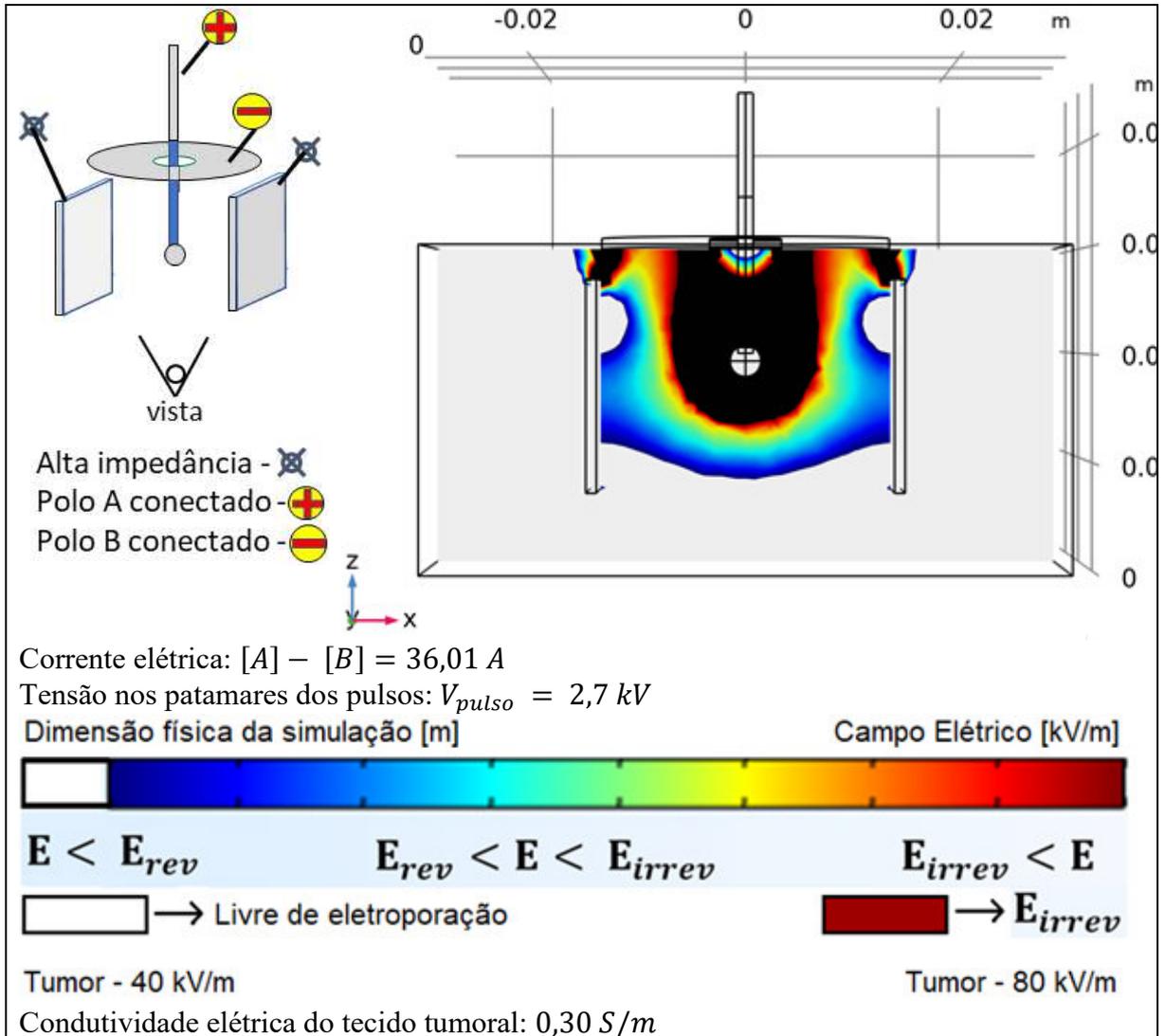
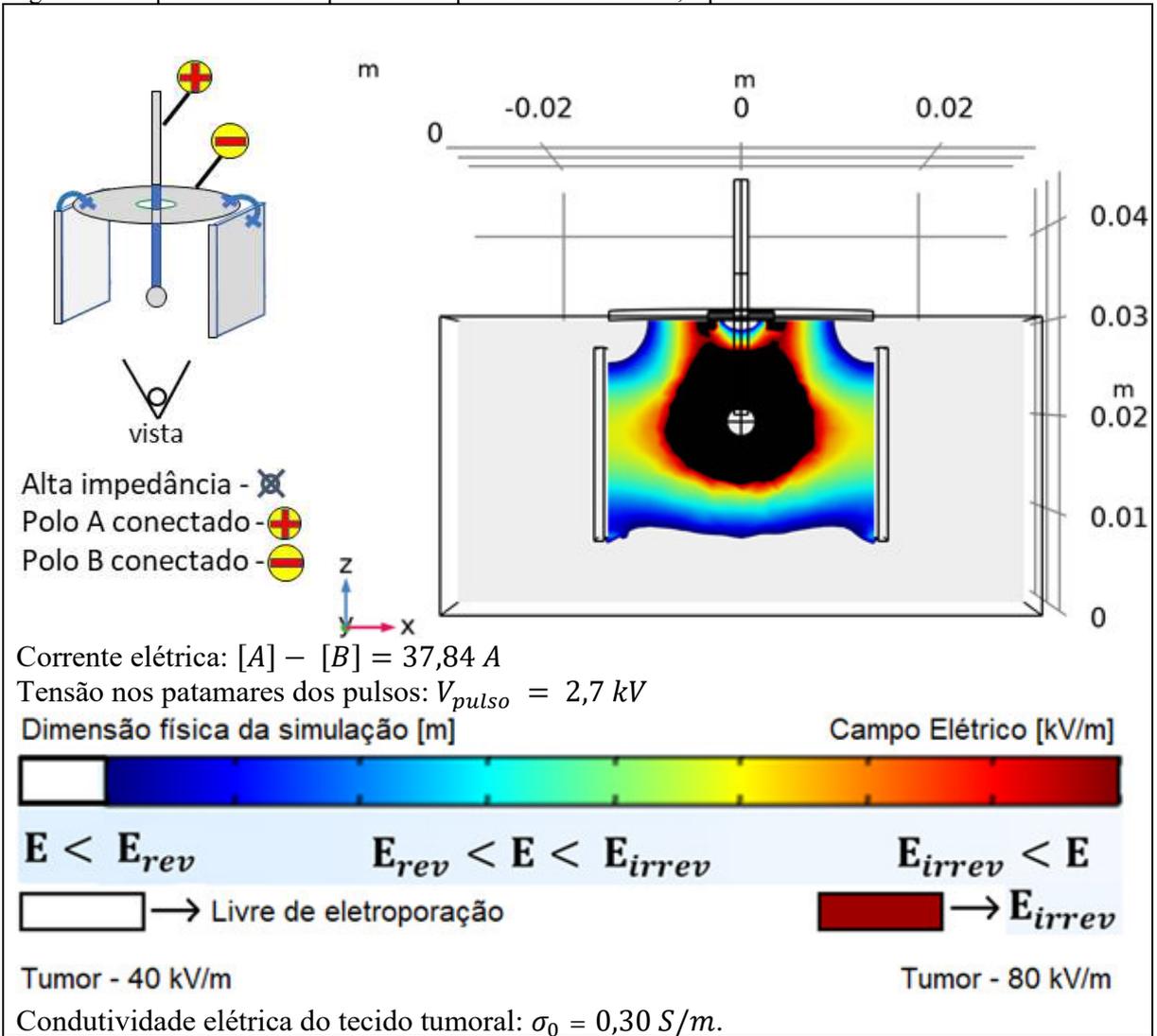


Figura 84 - Experimento 08T - pulsos entre placa circular e esfera, e placas laterais conectadas – tecido tumoral.



Resultado gráfico das simulações em suposições de tratamentos em tecidos vivos diversos

O modelo computacional alimentado com os parâmetros da Tabela 6, oferecem resultados com diferentes tecidos vivos ou sobreposições semelhantes ao encontrados de forma genérica na realidade clínica. Os resultados são apresentados a seguir, divididos em três porções, cada qual com um dos três eletrodos propostos, respectivamente das Figura 85 até a Figura 102.

Simulação com o eletrodo de placa em forma de disco com até quatro eletrodos de hastes parcialmente isolados distribuídos no centro e a cada 120° no raio médio da placa

Figura 85 - Simulação com os parâmetros do tecido hepático, comando 2, pulsos bipolares – visão frontal.

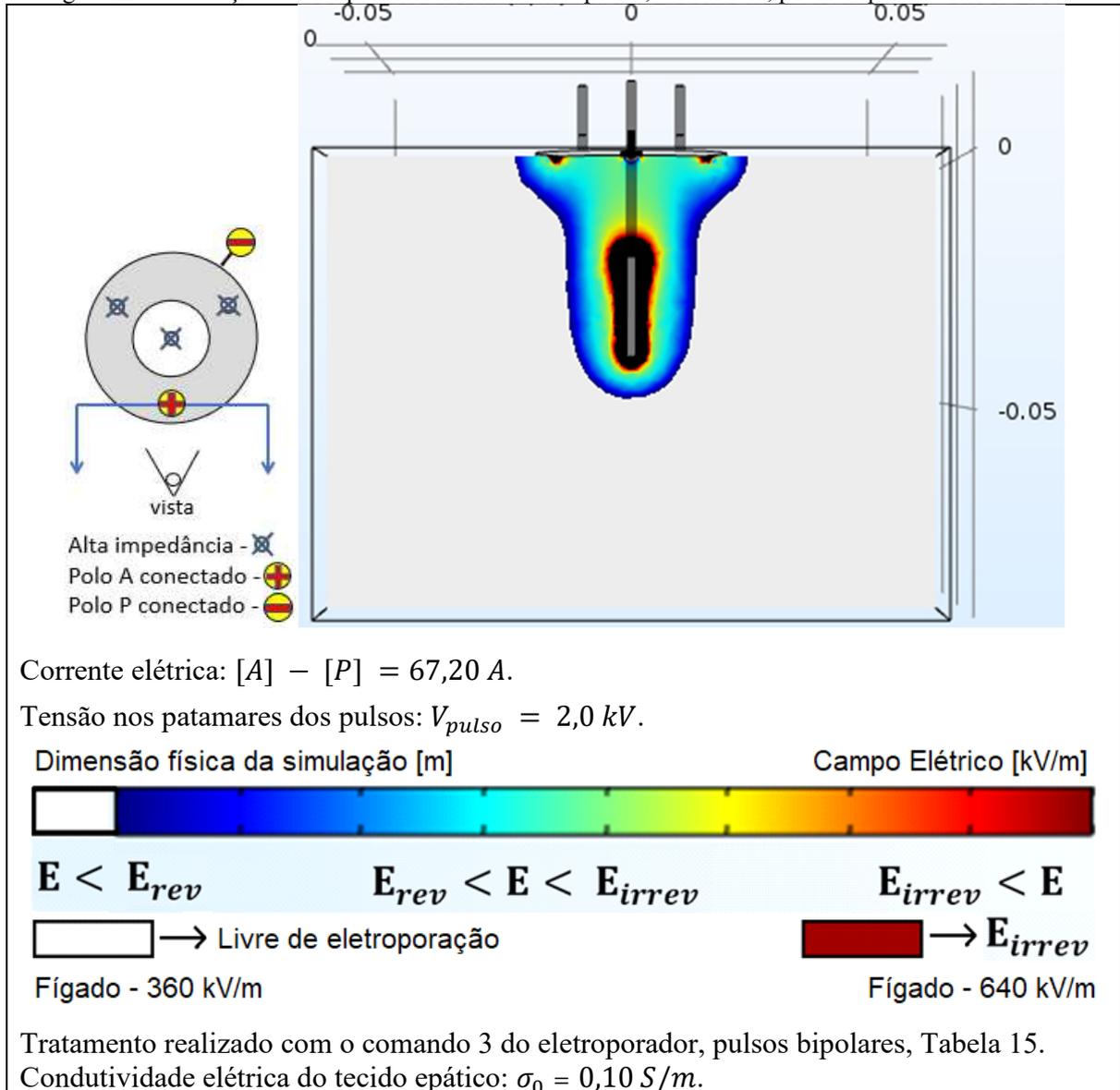


Figura 86 - Simulação com os parâmetros do tecido hepático, comando 2, pulsos bipolares – visão lateral.

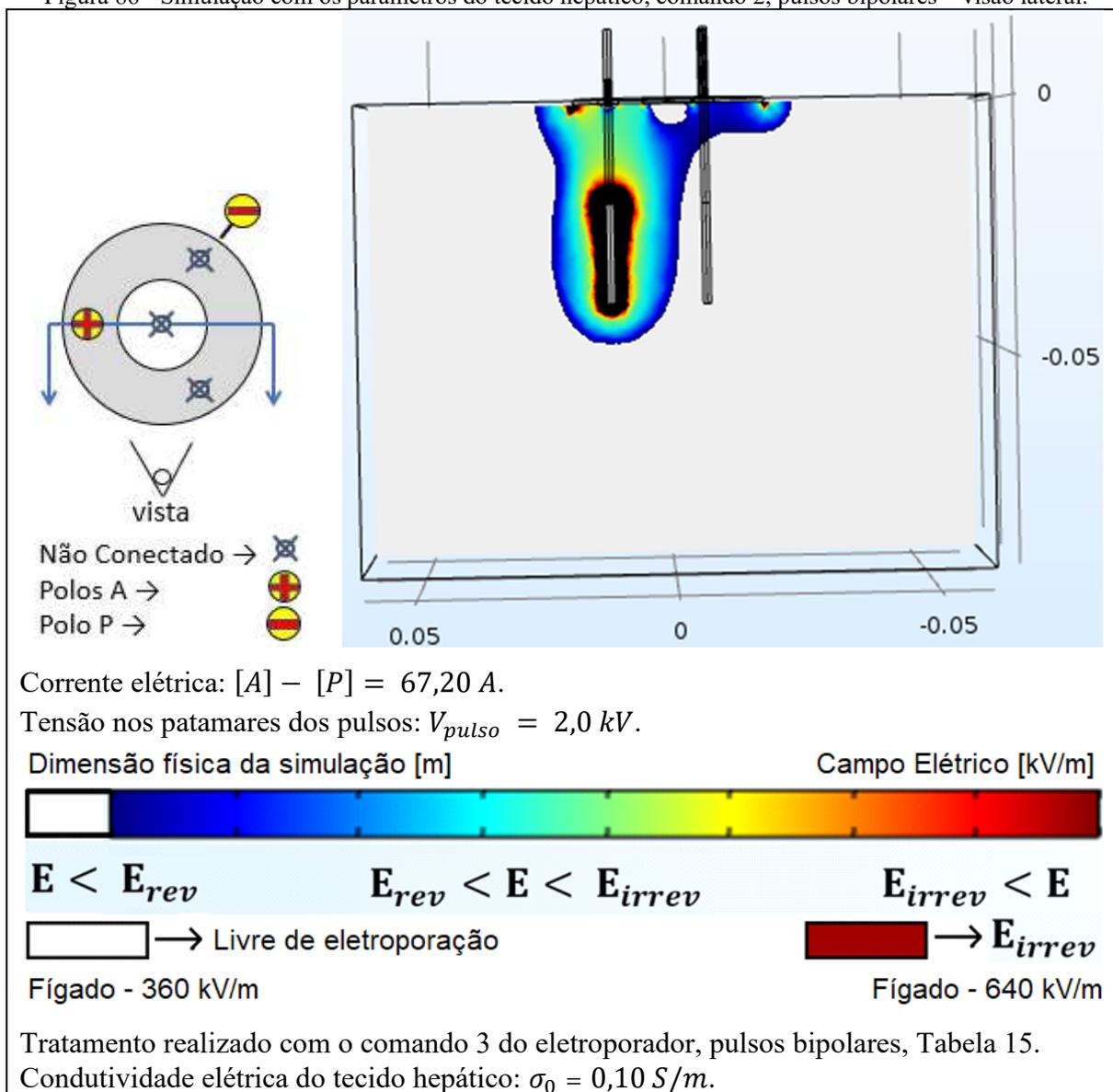


Figura 87 - Simulação com os parâmetros do tecido hepático, comando 4, pulsos monopolares – visão lateral.

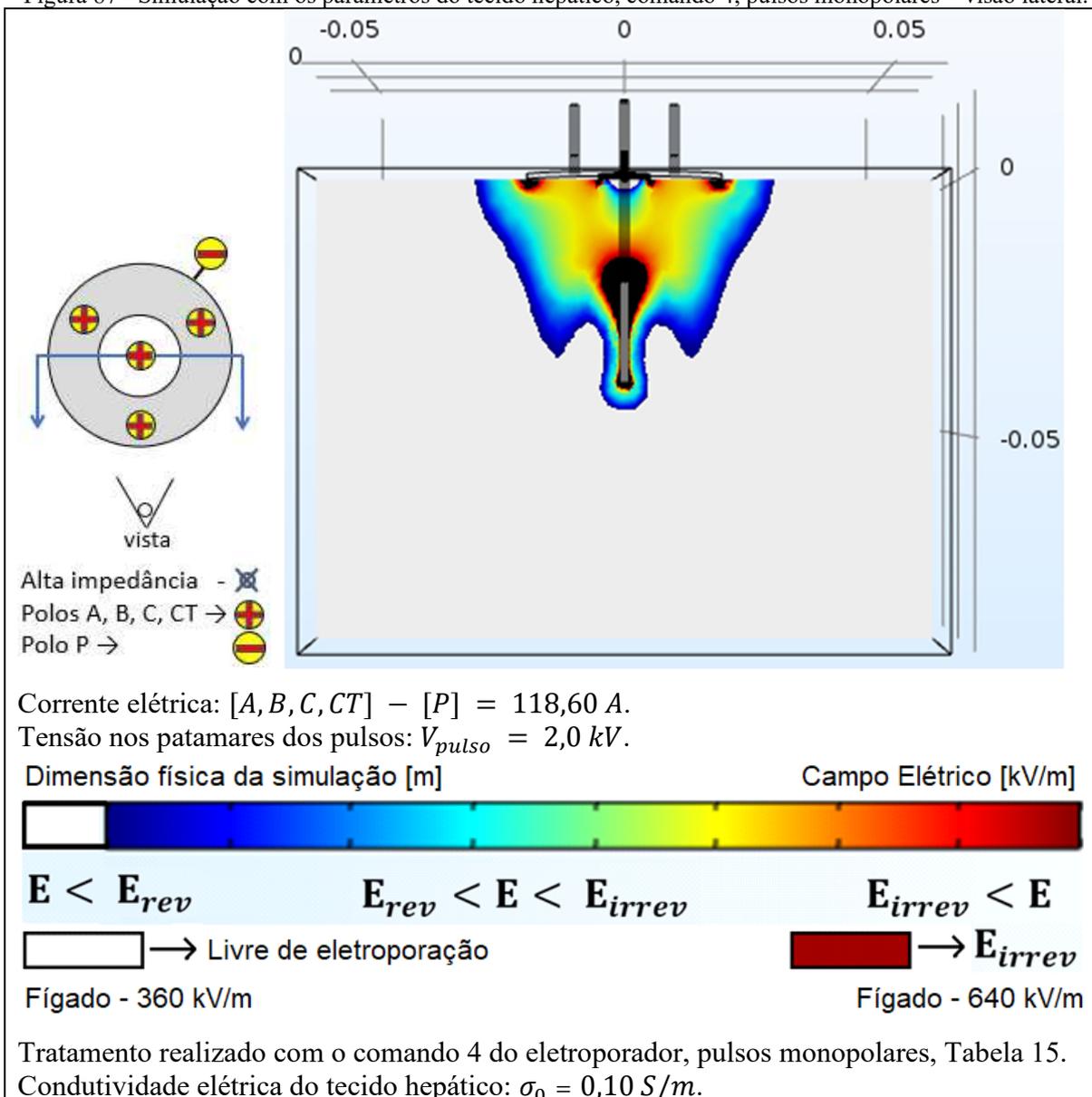
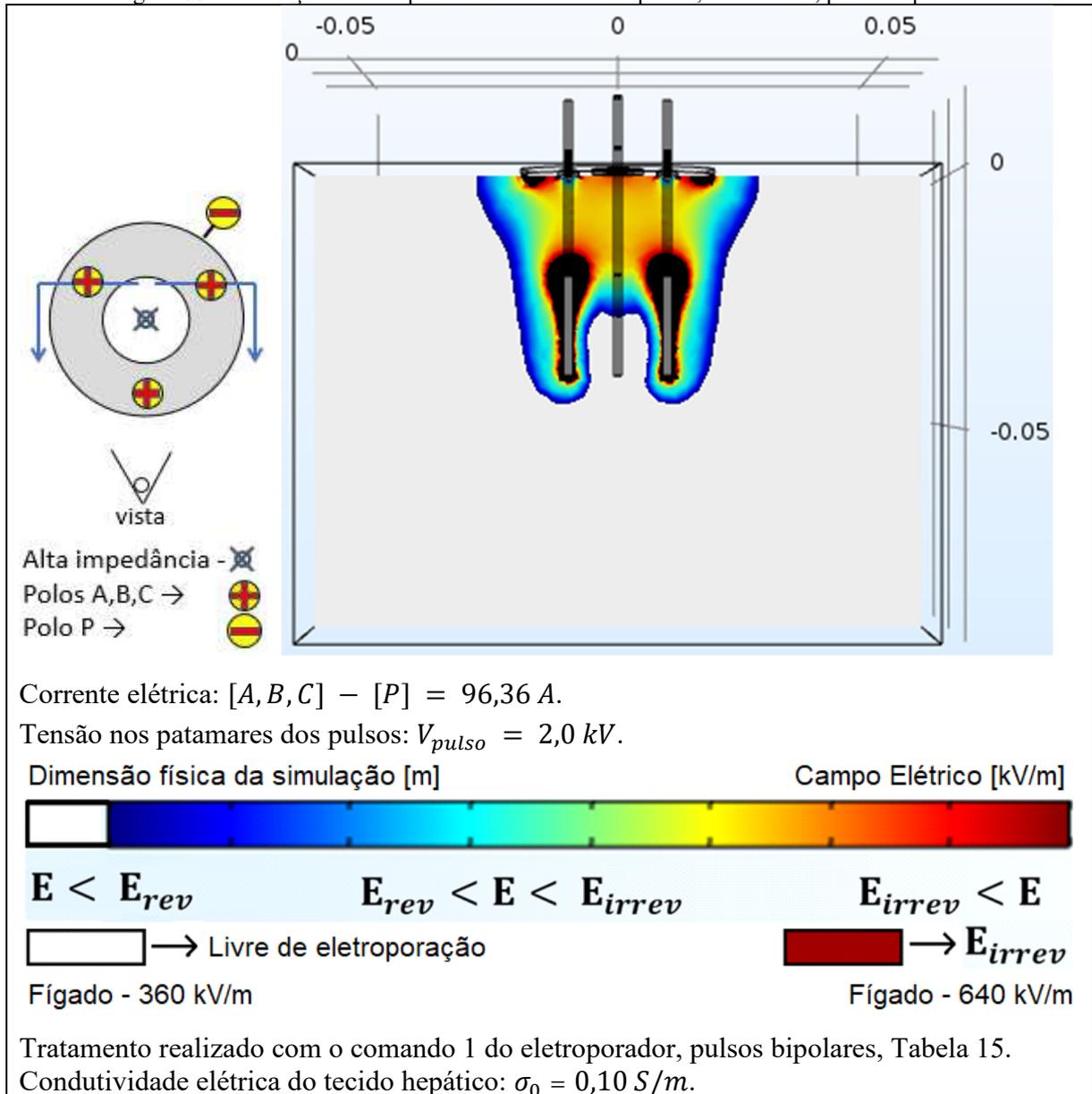
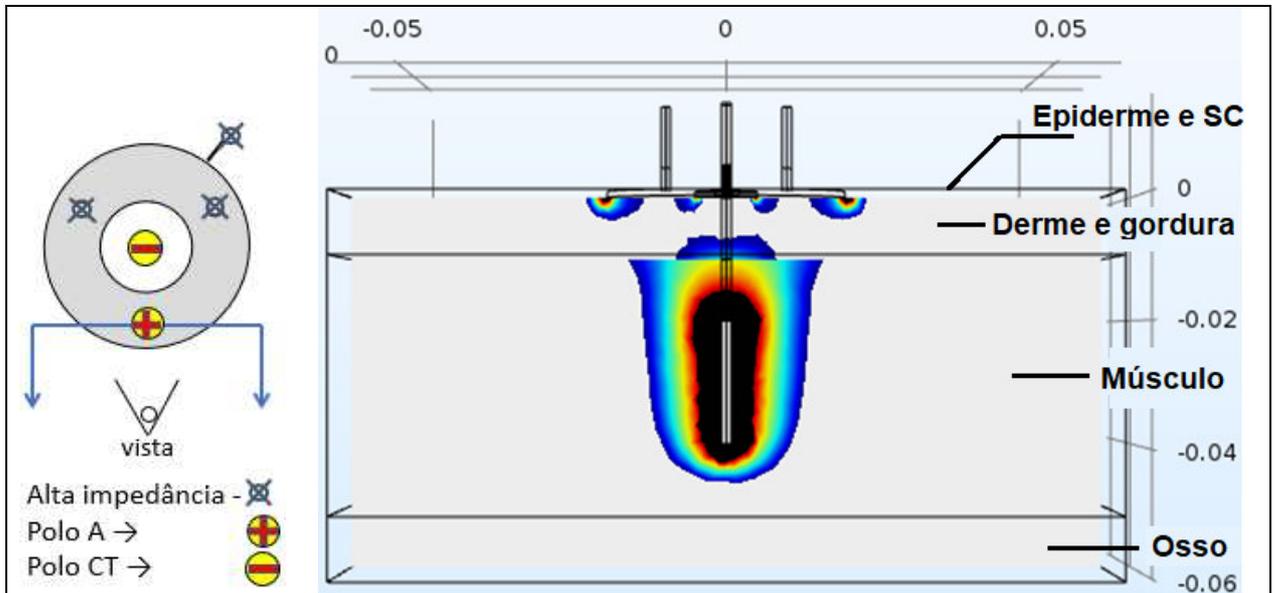


Figura 88 - Simulação com os parâmetros do tecido hepático, comando 1, pulsos bipolares.



Eletroporação de tecidos vivos (epiderme e SC, derme e gordura, músculo e osso)

Figura 89 - Simulação com os parâmetros do tecido hepático, comando 3, pulsos monopolares.



Corrente elétrica: $[A] - [CT] = 86,4 A$.

Tensão nos patamares dos pulsos: $V_{pulso} = 2,0 kV$.

Dimensão física da simulação [m]

Campo Elétrico [kV/m]



$E < E_{rev}$

$E_{rev} < E < E_{irrev}$

$E_{irrev} < E$

→ Livre de eletroporação

→ E_{irrev}

Epiderme e estrato córneo - 40 kV/m

Epiderme e estrato córneo - 120 kV/m

Derme e gordura - 30 kV/m

Derme e gordura - 120 kV/m

Músculo - 20 kV/m

Músculo - 80 kV/m

Osso - indefinido

Osso - indefinido

Tratamento realizado com o comando 3 do eletroporador, pulsos monopolares, Tabela 15.

Condutividade elétrica do tecido epidérmico e estrato córneo (sc): $\sigma_0 = 0,008 S/m$;

Condutividade elétrica do tecido dérmico e adiposo: $\sigma_0 = 0,250 S/m$;

Condutividade elétrica do tecido muscular: $\sigma_0 = 0,135 S/m$;

Condutividade elétrica do tecido ósseo: $\sigma_0 = 0,010 S/m$.

Figura 90 - Simulação com os parâmetros do tecido epidérmico e sc, dérmico e adiposo, muscular, e ósseo, comando 4, pulsos monopolares – corte longitudinal na haste central.

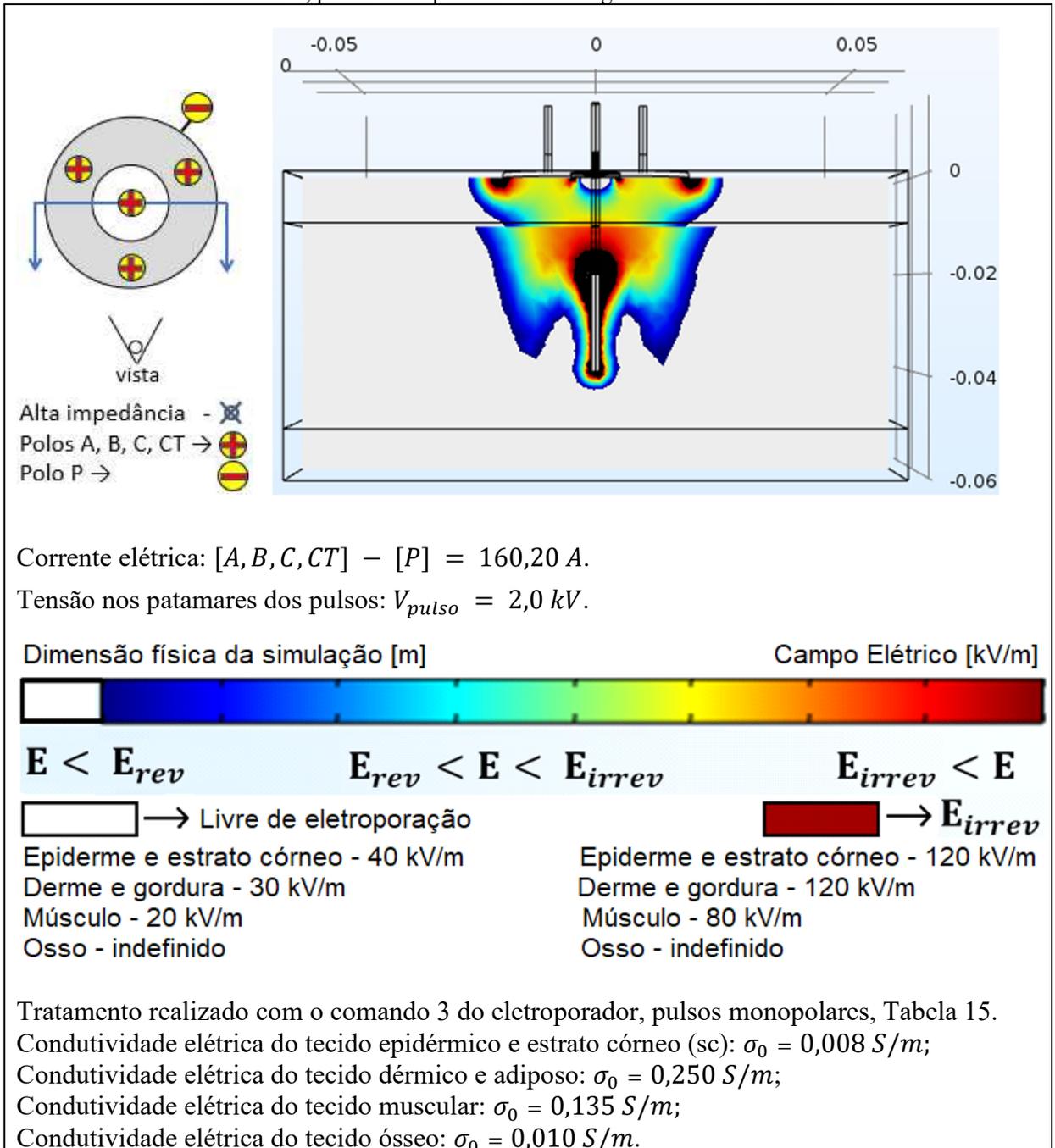


Figura 91 - Simulação com os parâmetros do tecido epidérmico e sc, dérmico e adiposo, muscular, e ósseo, comando 4, pulsos monopolares – corte longitudinal nas hastes anteriores a haste central.

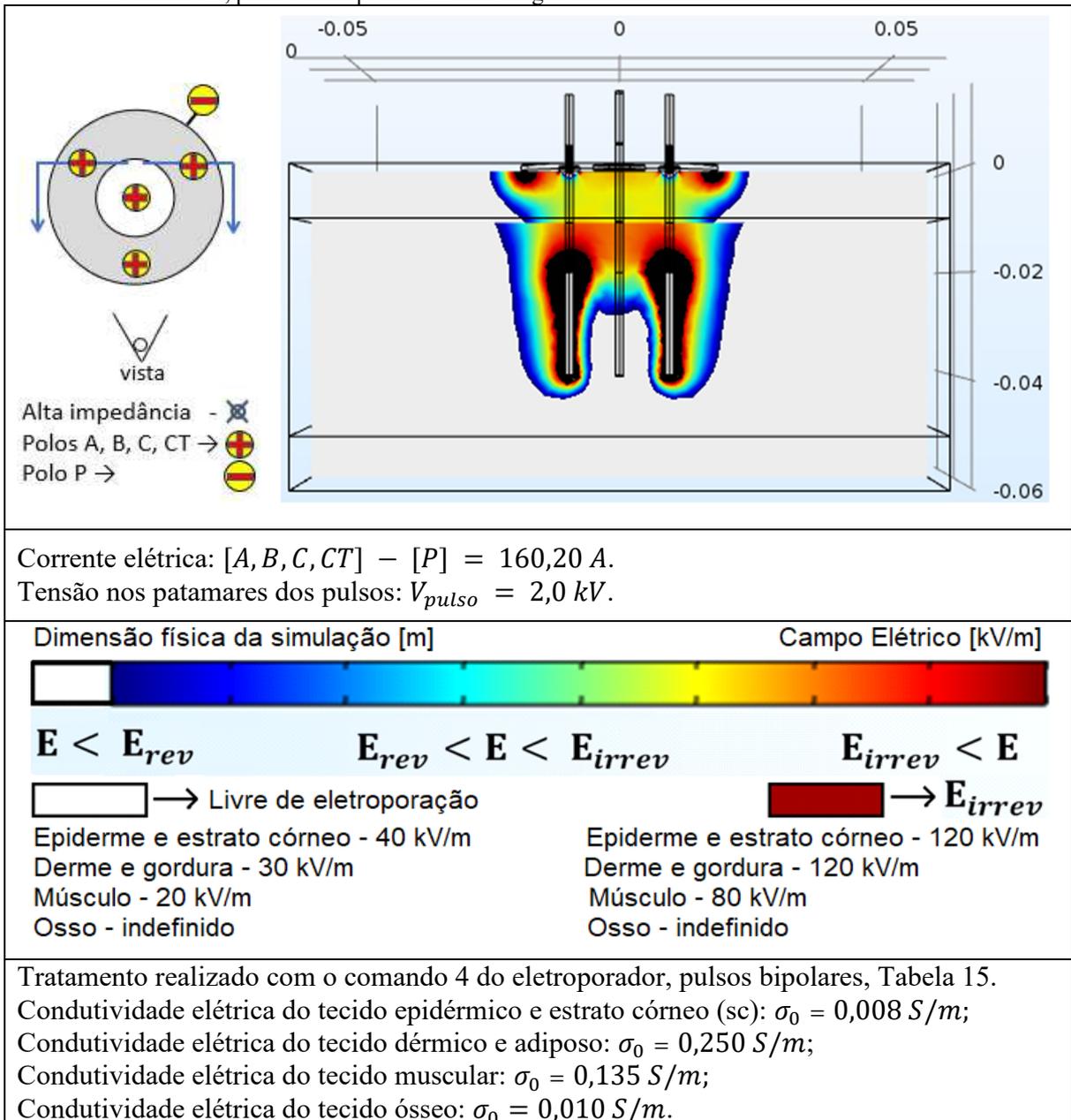
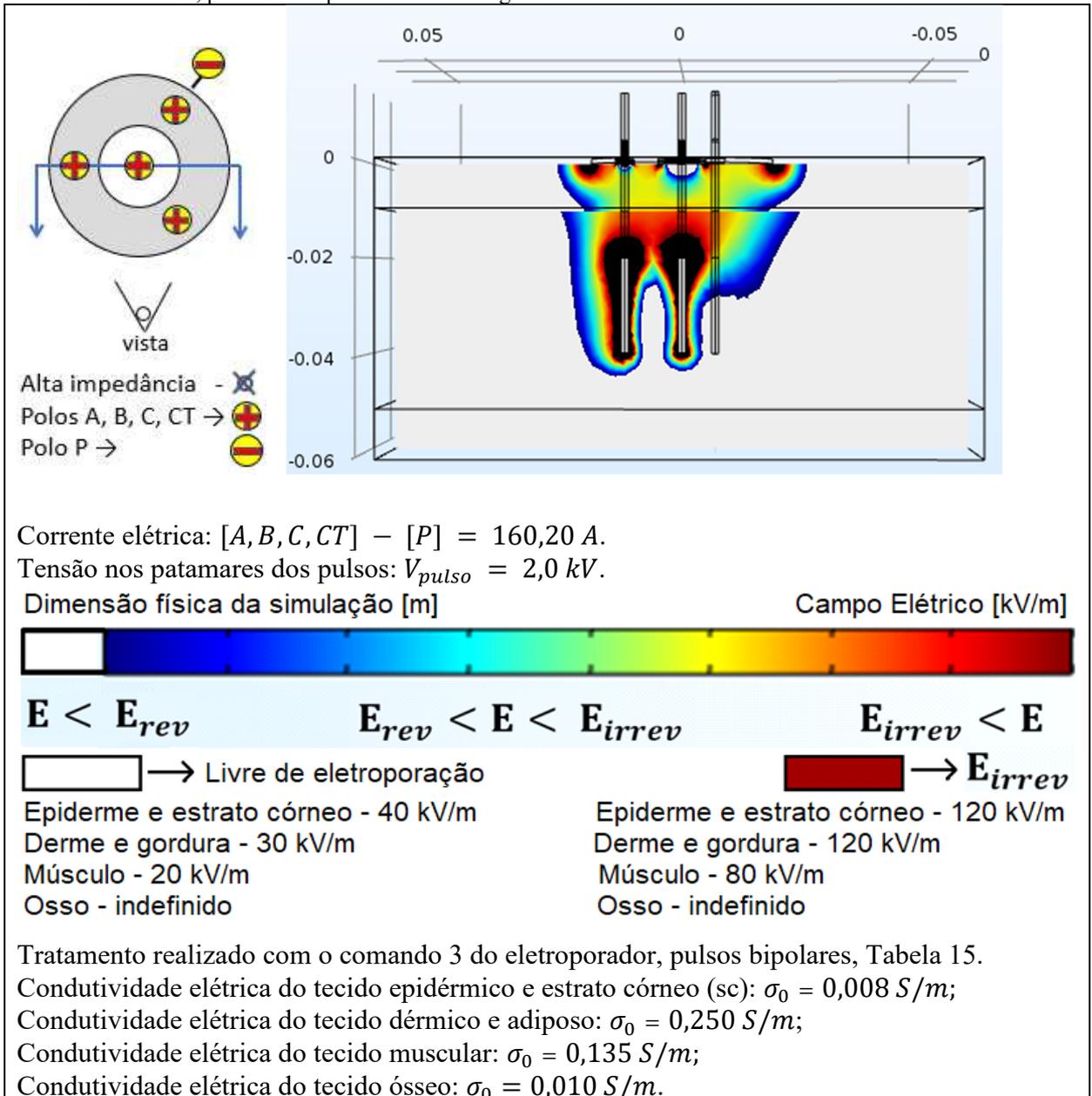
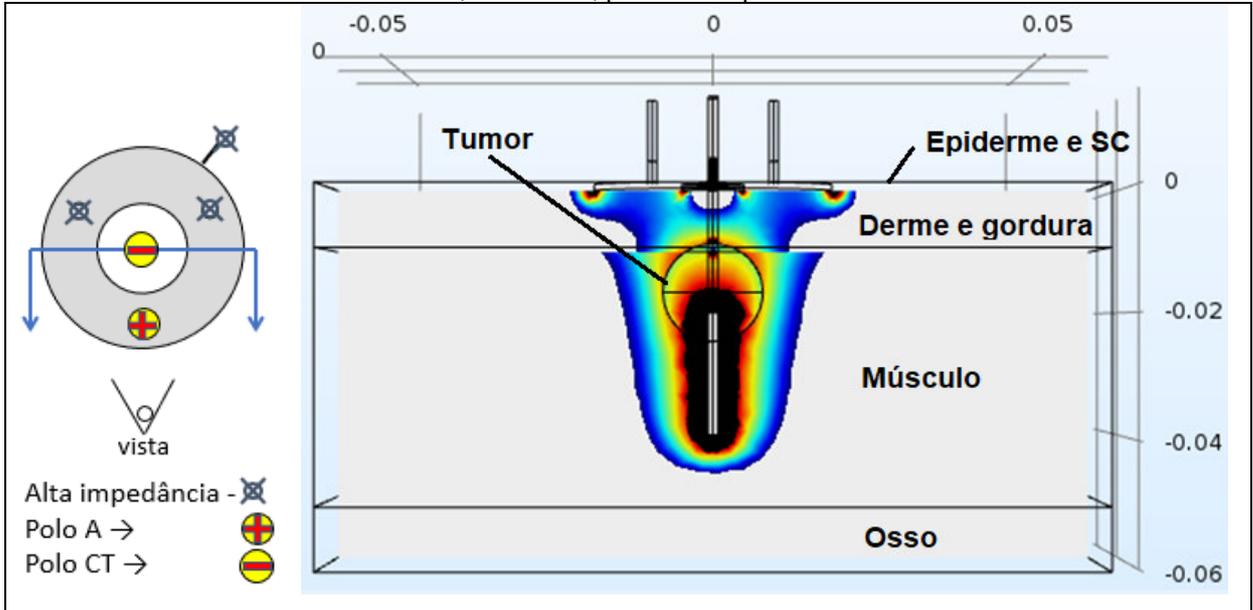


Figura 92 - Simulação com os parâmetros do tecido epidérmico e sc, dérmico e adiposo, muscular, e ósseo, comando 4, pulsos monopolares – corte longitudinal nas hastes central e com uma das laterais.

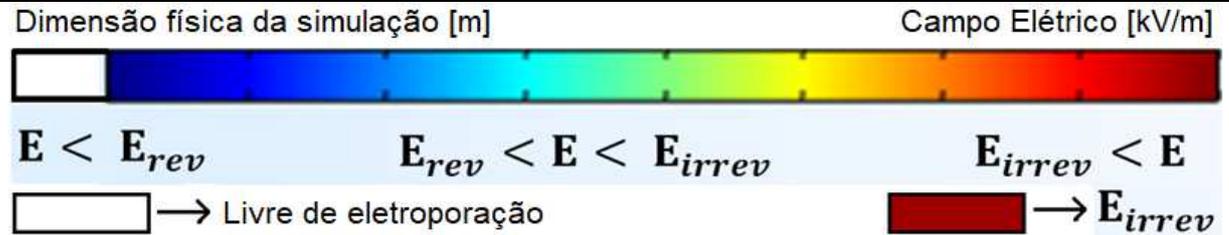


Eletroporação de tecidos vivos (epiderme e SC, derme e gordura, músculo, osso e um tumor esférico)

Figura 93 - Simulação com os parâmetros dos tecidos tumoral, epidérmico e sc, dérmico e adiposo, muscular, e ósseo, comando 3, pulsos monopolares.



Corrente elétrica: $[A] - [CT] = 98,90 A$
 Tensão nos patamares dos pulsos: $V_{pulso} = 2,0 kV$

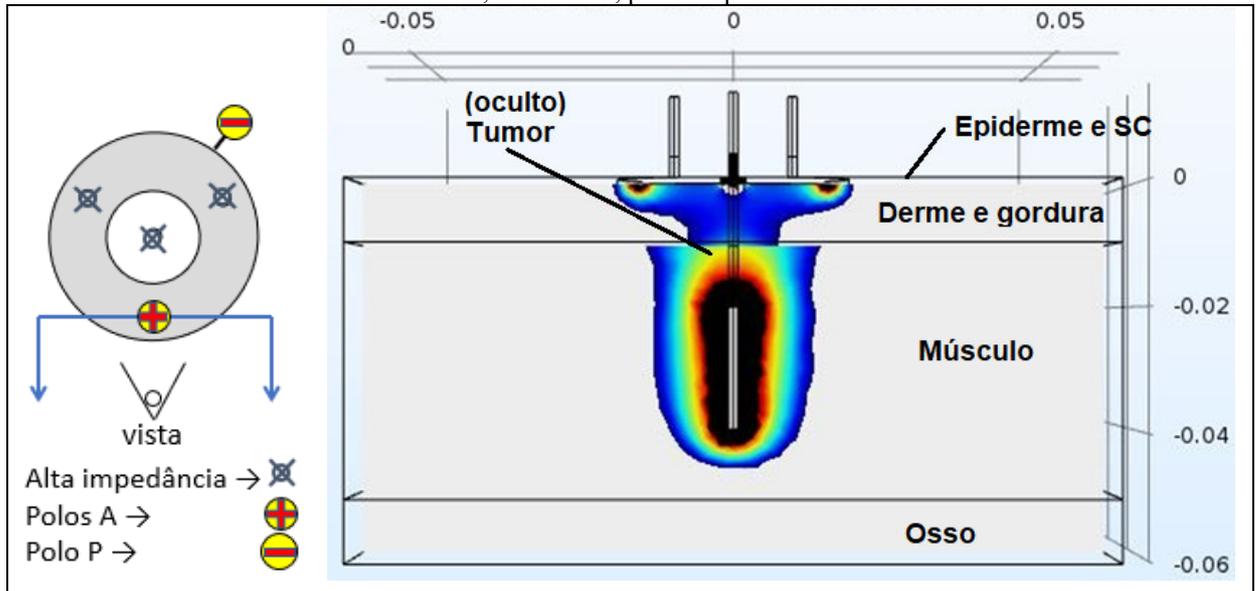


Tumor - 40 kV/m	Tumor - 80 kV/m
Epiderme e estrato córneo - 40 kV/m	Epiderme e estrato córneo - 120 kV/m
Derme e gordura - 30 kV/m	Derme e gordura - 120 kV/m
Músculo - 20 kV/m	Músculo - 80 kV/m
Osso - indefinido	Osso - indefinido

Tratamento realizado com o comando 3 do eletroporador, pulsos monopolares, Tabela 15.

- Condutividade elétrica do tecido tumoral: $\sigma_0 = 0,30 S/m$;
- Condutividade elétrica do tecido epidérmico e estrato córneo (sc): $\sigma_0 = 0,008 S/m$;
- Condutividade elétrica do tecido dérmico e adiposo: $\sigma_0 = 0,250 S/m$;
- Condutividade elétrica do tecido muscular: $\sigma_0 = 0,135 S/m$;
- Condutividade elétrica do tecido ósseo: $\sigma_0 = 0,010 S/m$.

Figura 94 - Simulação com os parâmetros dos tecidos tumoral, epidérmico e sc, dérmico e adiposo, muscular, e ósseo, comando 3, pulsos bipolares.



Corrente elétrica: $[A] - [P] = 93,31 \text{ A}$.

Tensão nos patamares dos pulsos: $V_{pulso} = 2,0 \text{ kV}$.

Dimensão física da simulação [m]

Campo Elétrico [kV/m]



$E < E_{rev}$

$E_{rev} < E < E_{irrev}$

$E_{irrev} < E$

→ Livre de eletroporação

→ E_{irrev}

Tumor - 40 kV/m

Epiderme e estrato córneo - 40 kV/m

Derme e gordura - 30 kV/m

Músculo - 20 kV/m

Osso - indefinido

Tumor - 80 kV/m

Epiderme e estrato córneo - 120 kV/m

Derme e gordura - 120 kV/m

Músculo - 80 kV/m

Osso - indefinido

Tratamento realizado com o comando 3 do eletroporador, pulsos bipolares, Tabela 15.

Condutividade elétrica do tecido tumoral: $\sigma_0 = 0,30 \text{ S/m}$;

Condutividade elétrica do tecido epidérmico e estrato córneo (sc): $\sigma_0 = 0,008 \text{ S/m}$;

Condutividade elétrica do tecido dérmico e adiposo: $\sigma_0 = 0,250 \text{ S/m}$;

Condutividade elétrica do tecido muscular: $\sigma_0 = 0,135 \text{ S/m}$;

Condutividade elétrica do tecido ósseo: $\sigma_0 = 0,010 \text{ S/m}$.

Figura 95 - Simulação com os parâmetros dos tecidos tumoral, epidérmico e sc, dérmico e adiposo, muscular, e ósseo, comando 3, pulsos bipolares.

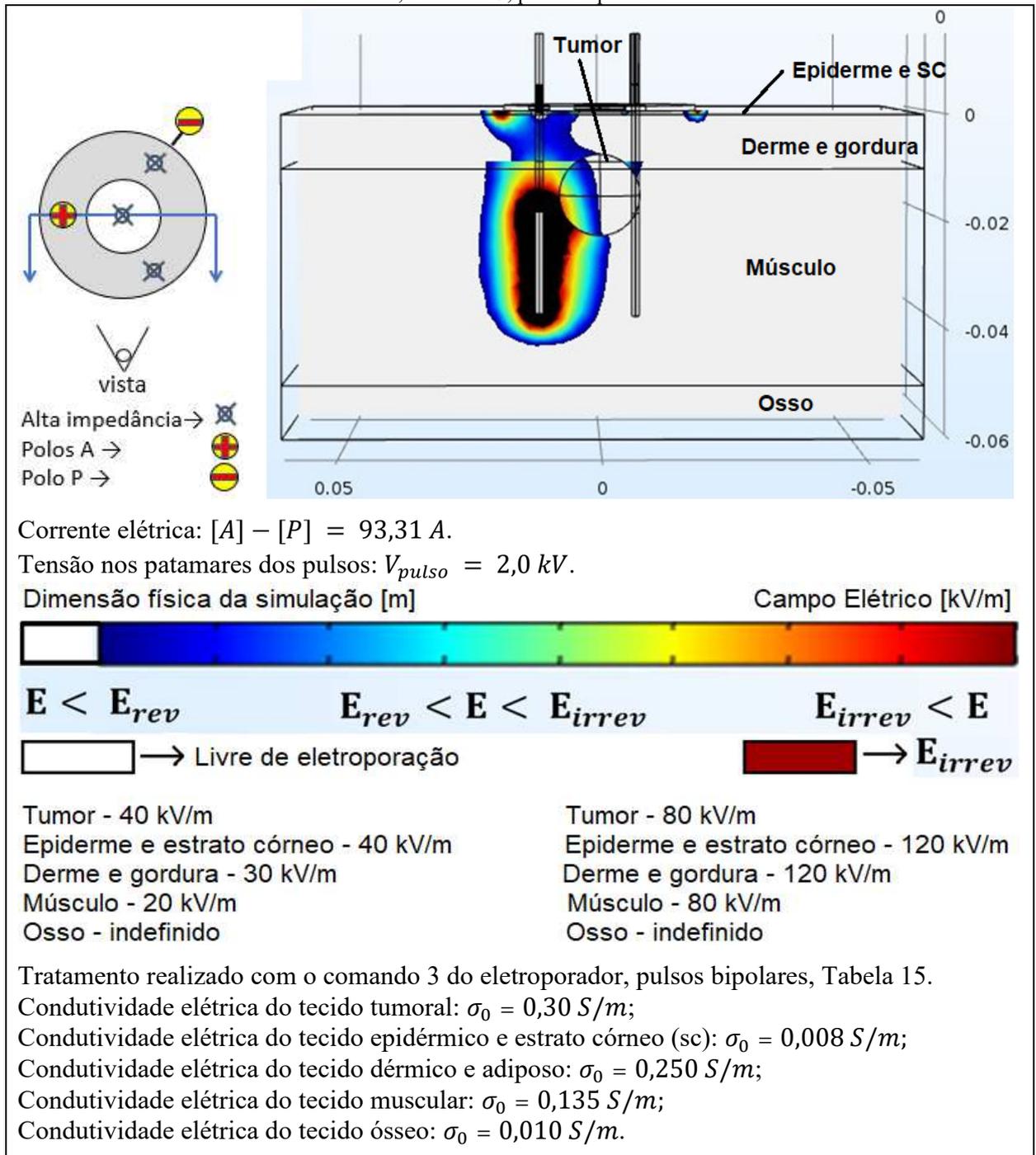


Figura 96 - Simulação com os parâmetros dos tecidos tumoral, epidérmico e sc, dérmico e adiposo, muscular, e ósseo, comando 4, pulsos monopolares.

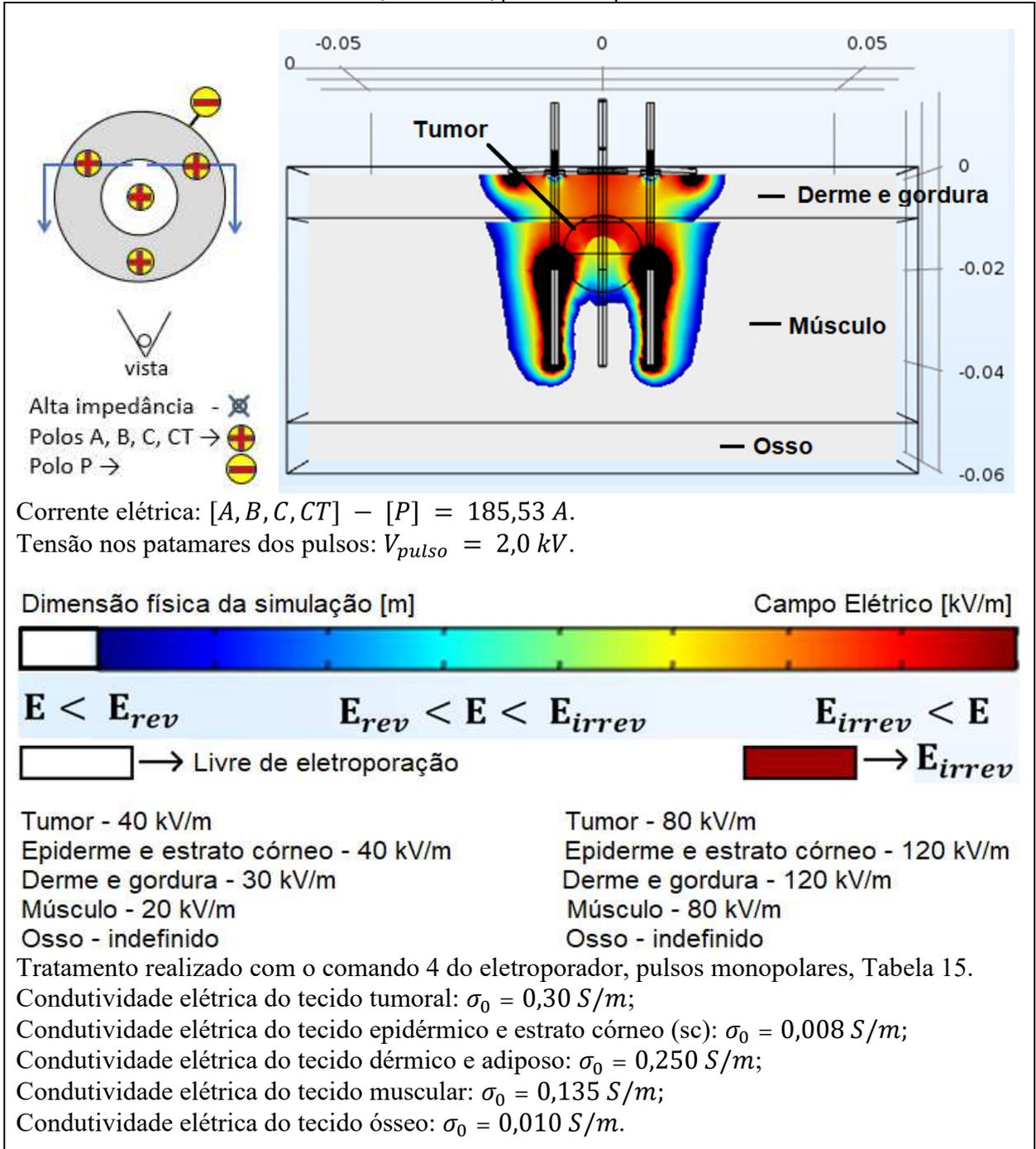


Figura 97 - Simulação com os parâmetros dos tecidos tumoral, epidérmico e sc, dérmico e adiposo, muscular, e ósseo, comando 4, pulsos monopolares.

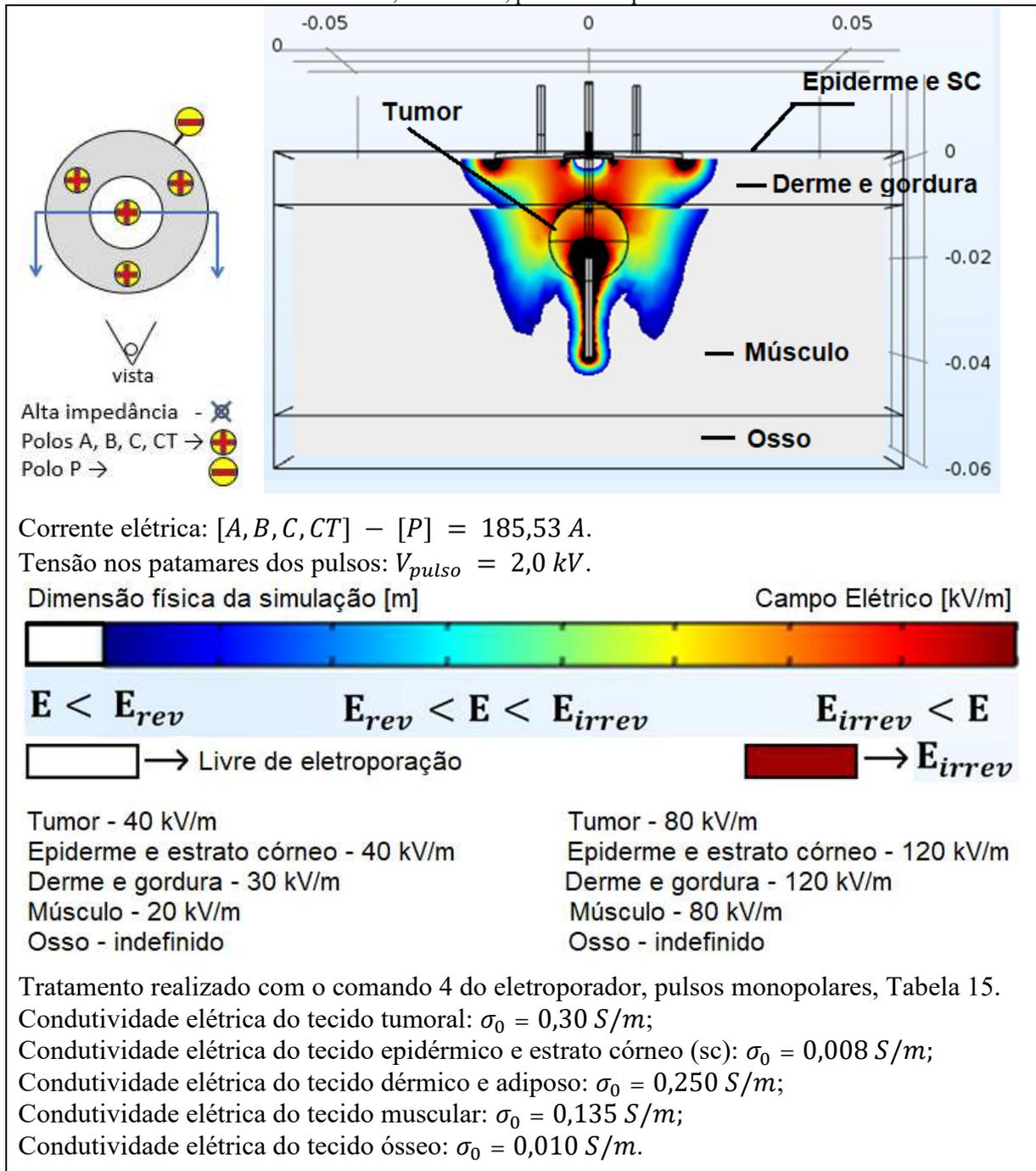
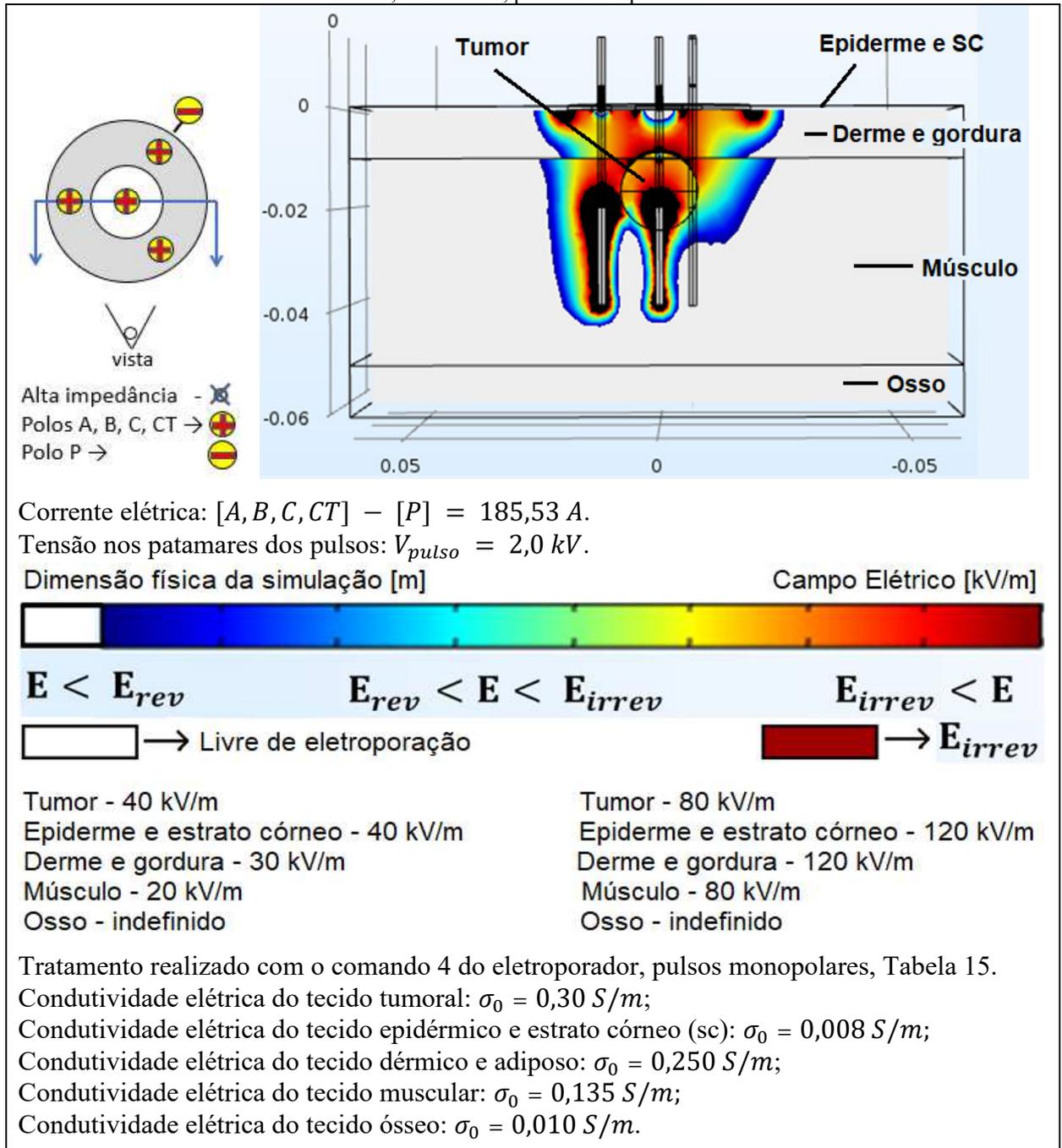
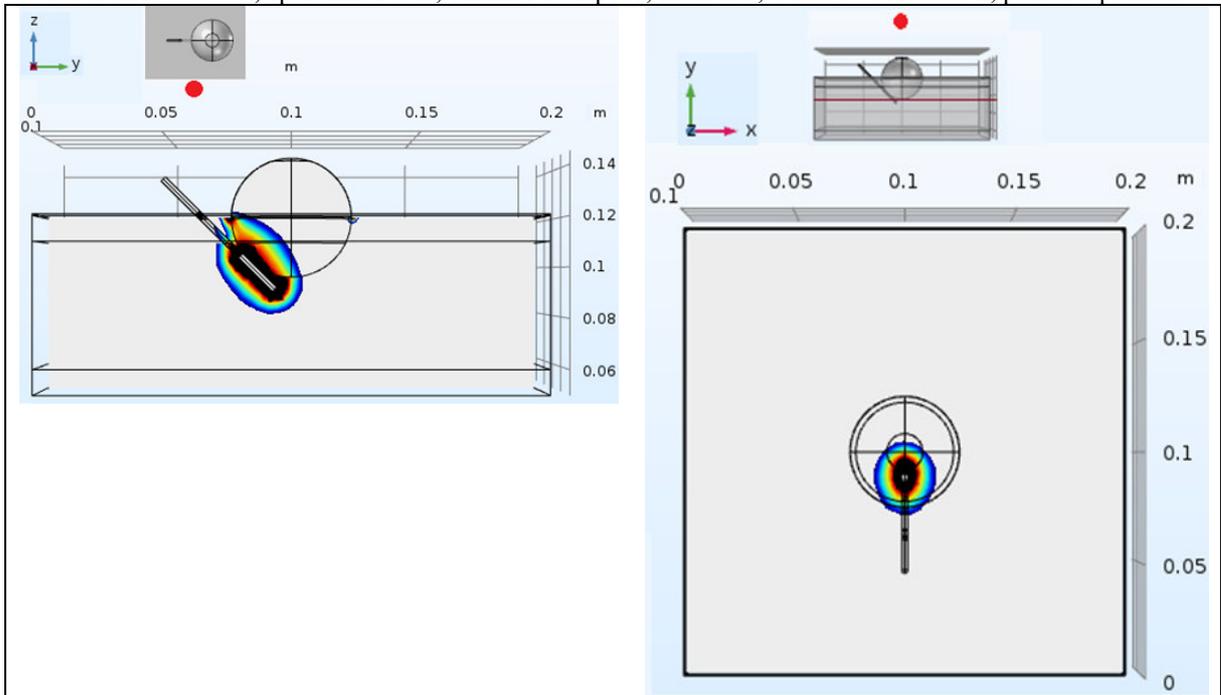


Figura 98 - Simulação com os parâmetros dos tecidos tumoral, epidérmico e sc, dérmico e adiposo, muscular, e ósseo, comando 4, pulsos monopolares.



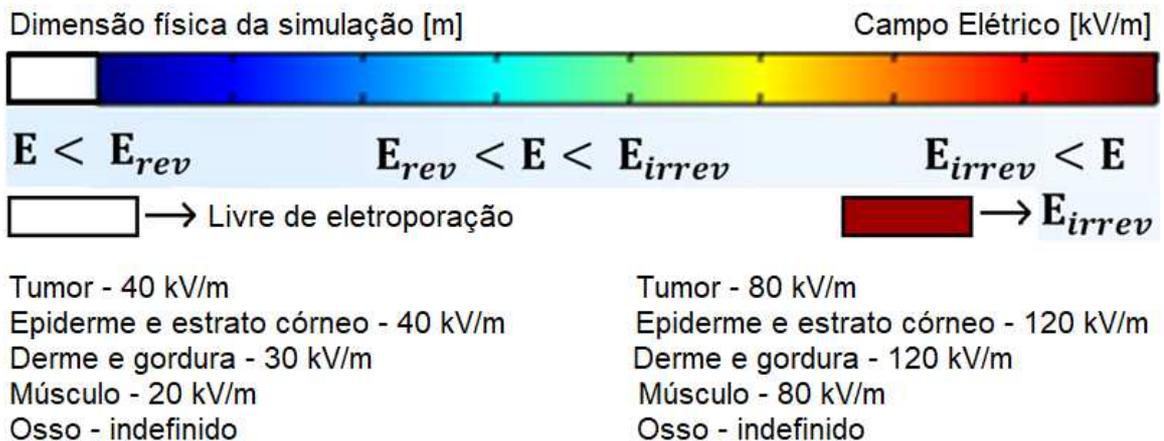
Simulação com o Eletrodo de calota semiesférica com eletrodo parcialmente isolado de inserção superior ou lateral

Figura 99 - Tumor (neoplasia) parcialmente envolvido por calota e haste a 45° – simulação com os parâmetros dos tecidos tumoral, epidérmico e sc, dérmico e adiposo, muscular, e ósseo - comando 2, pulsos bipolares.



Corrente elétrica: $[A] - [B] = 79.56 \text{ A}$.

Tensão nos patamares dos pulsos: $V_{pulso} = 2,0 \text{ kV}$.



Tratamento realizado com o comando 2 do eletroporador, pulsos bipolares, Tabela 15.

Condutividade elétrica do tecido tumoral: $\sigma_0 = 0,30 \text{ S/m}$;

Condutividade elétrica do tecido epidérmico e estrato córneo (sc): $\sigma_0 = 0,008 \text{ S/m}$;

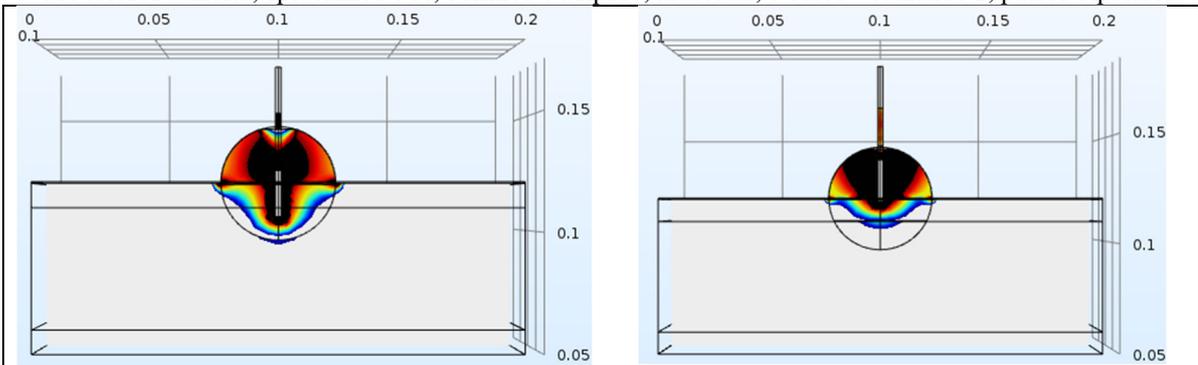
Condutividade elétrica do tecido dérmico e adiposo: $\sigma_0 = 0,250 \text{ S/m}$;

Condutividade elétrica do tecido muscular: $\sigma_0 = 0,135 \text{ S/m}$;

Condutividade elétrica do tecido ósseo: $\sigma_0 = 0,010 \text{ S/m}$.

Simulação com o Eletrodo de calota semiesférica com eletrodo parcialmente isolado de inserção superior

Figura 100 - Tumor (neoplasia) parcialmente envolvido por calota e haste central – simulação com os parâmetros dos tecidos tumoral, epidérmico e sc, dérmico e adiposo, muscular, e ósseo - comando 2, pulsos bipolares.



Extremidade condutiva da haste nos primeiros milímetros o tecido muscular:

Corrente elétrica [A] – [B] = 168,0 A.

Extremidade condutiva da haste em contato com o tecido epidérmico e estrato córneo:

Corrente elétrica: [A] – [B] = 204,00 A.

Tensão dos pulsos: $V_{pulso} = 2,0 \text{ kV}$.

Dimensão física da simulação [m]

Campo Elétrico [kV/m]



$E < E_{rev}$

$E_{rev} < E < E_{irrev}$

$E_{irrev} < E$

 → Livre de eletroporação

 → E_{irrev}

Gengiva - 20 kV/m

Gengiva - 80 kV/m

Tratamento realizado com o comando 2 do eletroporador, pulsos bipolares, Tabela 15.

Condutividade elétrica do tecido tumoral: $\sigma_0 = 0,30 \text{ S/m}$;

Condutividade elétrica do tecido epidérmico e estrato córneo (sc): $\sigma_0 = 0,008 \text{ S/m}$;

Condutividade elétrica do tecido dérmico e adiposo: $\sigma_0 = 0,250 \text{ S/m}$;

Condutividade elétrica do tecido muscular: $\sigma_0 = 0,135 \text{ S/m}$;

Condutividade elétrica do tecido ósseo: $\sigma_0 = 0,010 \text{ S/m}$.

Simulação com o Eletrodo de placa em forma de disco com haste isolada com extremidade esférica condutora

Figura 101 - Pulsos entre placa circular e esfera, sem placas laterais – simulação com os parâmetros dos tecidos gengivais - comando 2, pulsos bipolares – visão frontal.

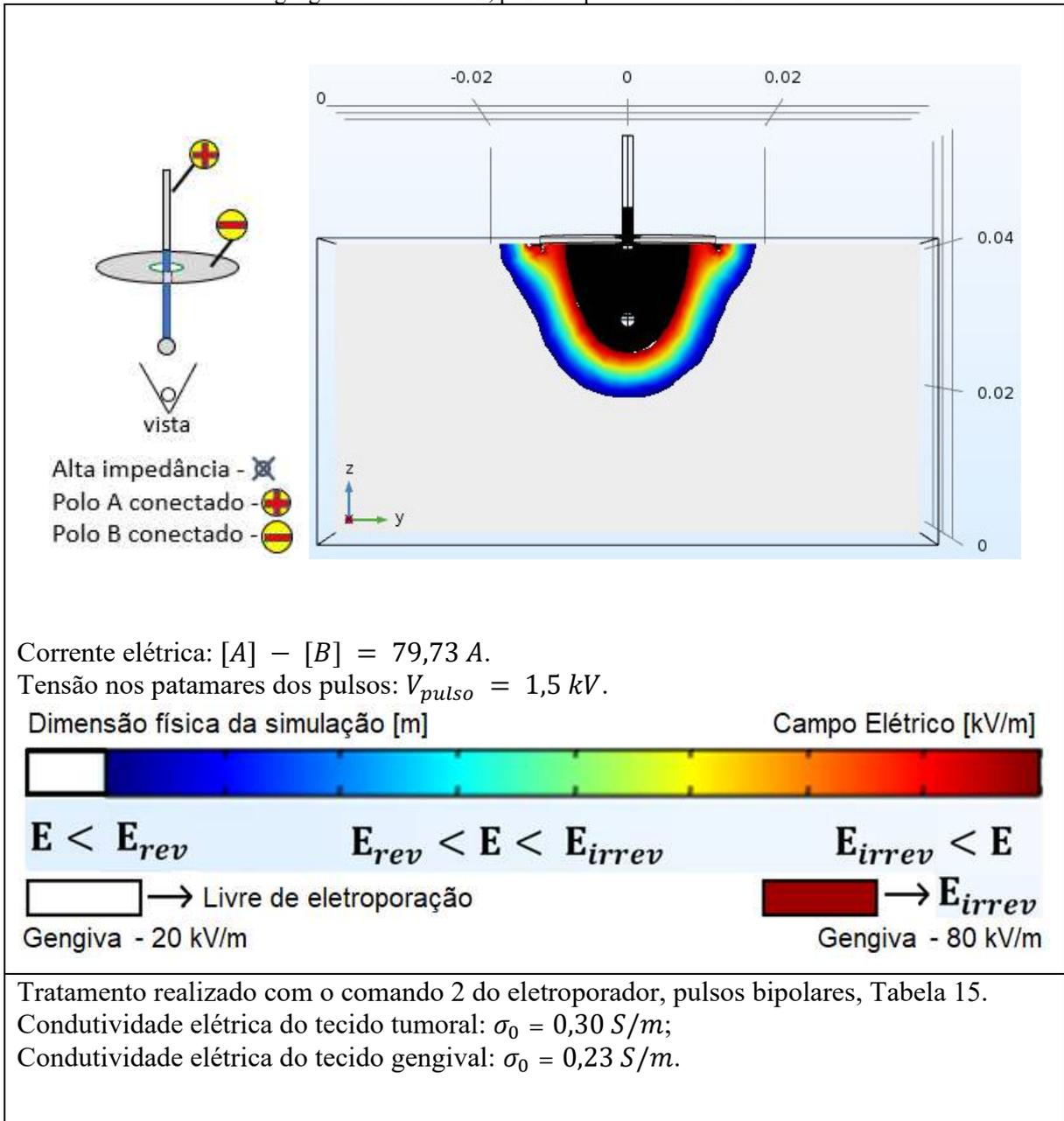
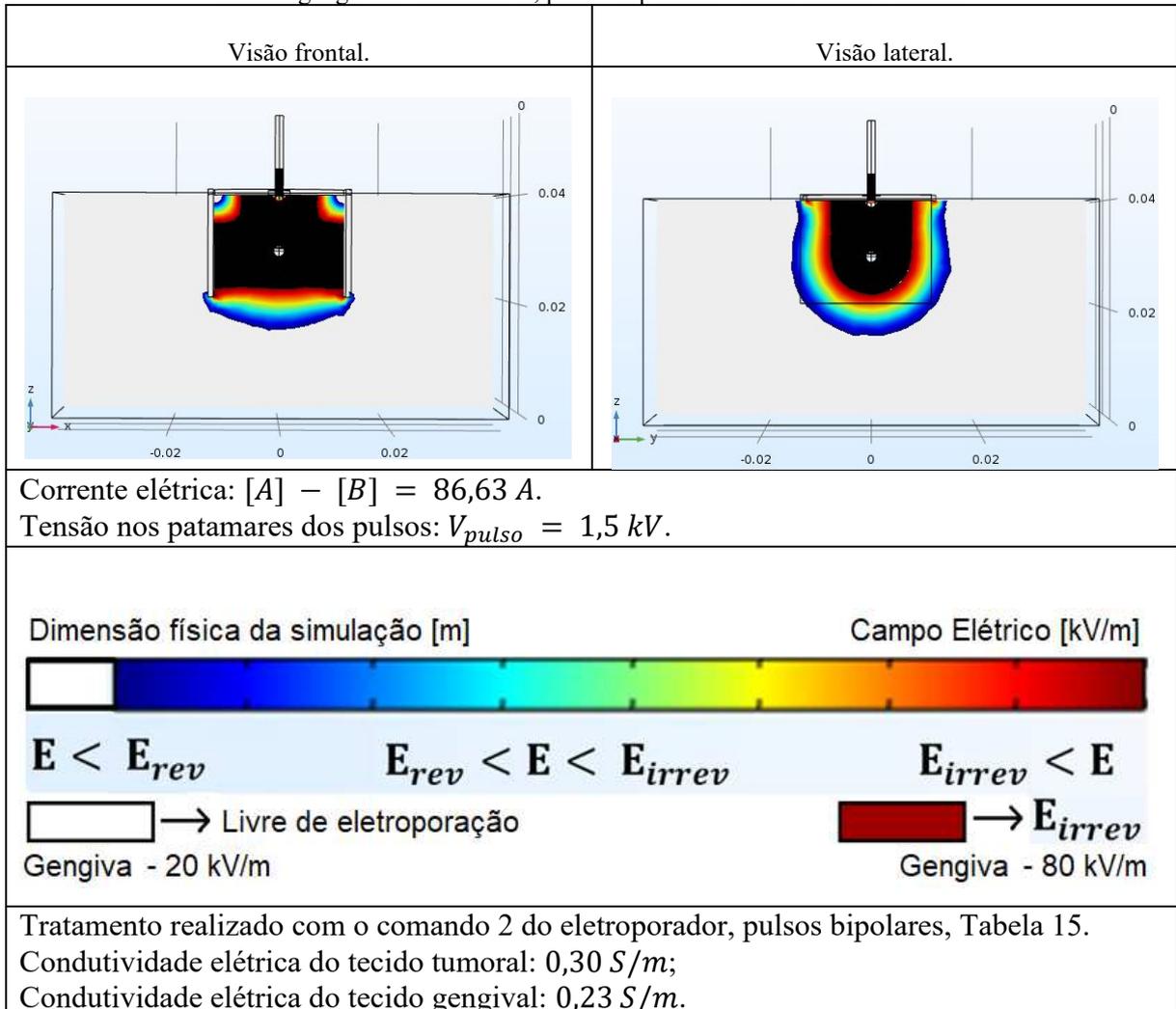


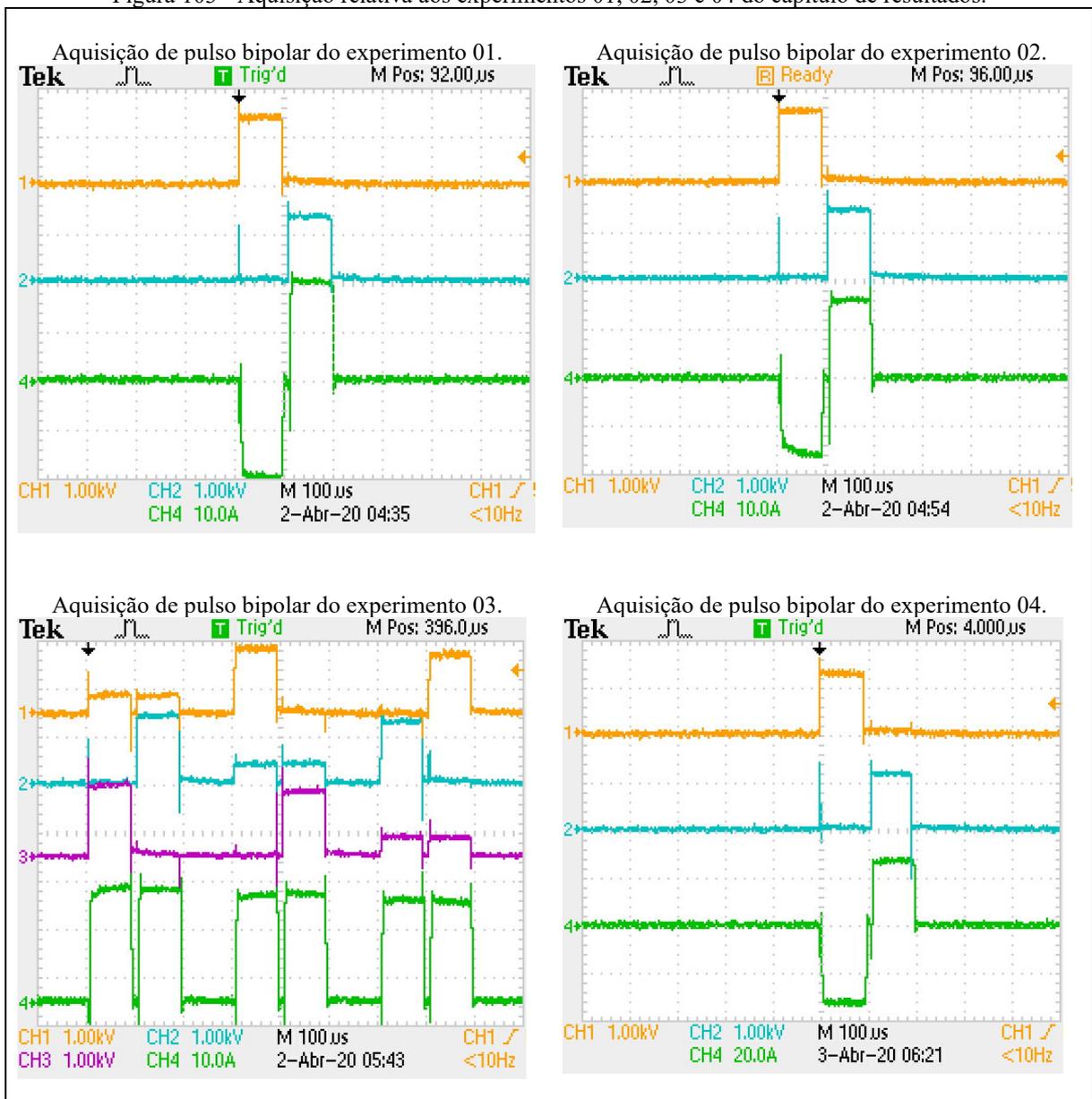
Figura 102 - Pulsos entre placa circular e esfera, e placas laterais conectadas– simulação com os parâmetros dos tecidos gengivais - comando 2, pulsos bipolares – visão frontal e lateral.



APÊNDICE H – Aquisição das formas de ondas das tensões e correntes elétricas dos oito experimentos realizados em laboratório

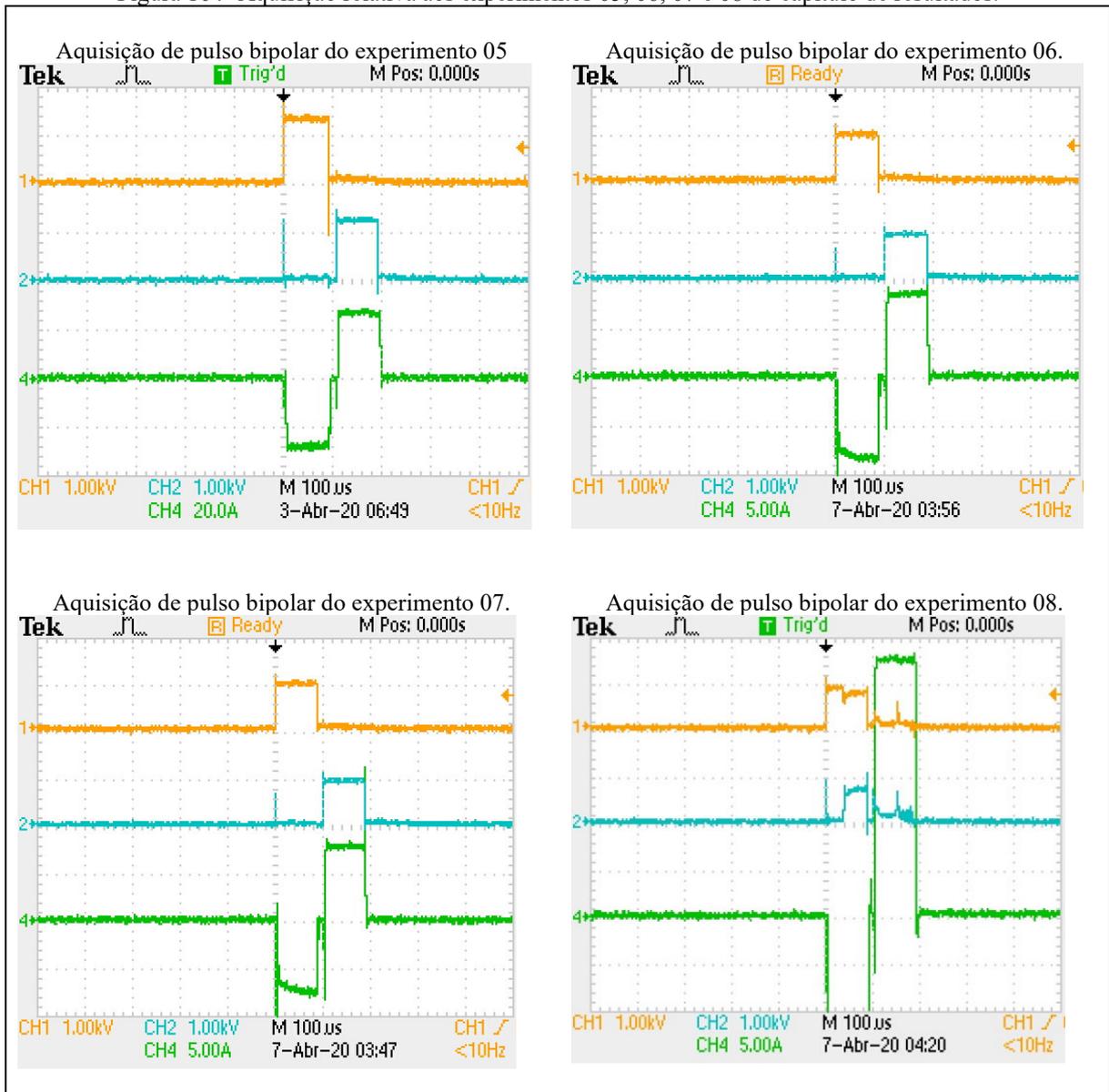
A partir da aquisição do oitavo pulso (último pulso considerando o protocolo ESOPE), foram obtidas as formas de onda aplicadas nos experimentos laboratoriais do capítulo de resultados. Na Figura 103 e Figura 104 são apresentadas as formas de ondas referentes ao experimento 01 até o experimento 08, respectivamente. Em todas as aquisições foram utilizadas a escala de 100 μs por divisão. Para a tensão foi utilizada a escala de 1 kV por divisão. Na escala de corrente as escalas variaram de 5 A até 20 A por divisão.

Figura 103 - Aquisição relativa aos experimentos 01, 02, 03 e 04 do capítulo de resultados.



No experimento 08, Figura 104, devido aos danos que tal experimento causa ao eletroporador, foi selecionada a aquisição dos instantes que os IGBTs foram danificados pelo rompimento de arco interno ao tecido.

Figura 104- Aquisição relativa aos experimentos 05, 06, 07 e 08 do capítulo de resultados.



Na Figura 105 são apresentadas aquisições relativas ao experimento 08. Sob escalas de tempo modificadas para de 50 µs, à esquerda é apresentada uma aquisição feita quando foi aplicada a tensão de 1 kV, quando não houve comprometimento do eletroporador. Na mesma figura, à direita é apresentada a aquisição quando ocorre falha destrutiva nos IGBTs ao se adotar tensão de 1,2 kV.

Figura 105 - Particularidades do experimento 08 devido as recorrentes rupturas do dielétrico do tecido vivo quando exposto a tensões elevadas.

