

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

**Desenvolvimento do método do circuito equivalente para análise
numérica de processos elétricos em tecidos biológicos**

Tese submetida à Universidade Federal
De Santa Catarina como parte dos requisitos
Para a obtenção do grau de doutor em Engenharia Elétrica

Airton Ramos

Florianópolis, Fevereiro de 2003

**DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DO CIRCUITO
EQUIVALENTE PARA ANÁLISE NUMÉRICA DE PROCESSOS
ELÉTRICOS EM TECIDOS BIOLÓGICOS**

AIRTON RAMOS

‘Esta tese foi julgada adequada para a obtenção do título de
Doutor em Engenharia Elétrica, Área de Concentração em
Engenharia Biomédica, e aprovada em sua forma final pelo
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da
Universidade Federal de Santa Catarina’

Prof. Jefferson Luiz Brum Marques, PhD
Orientador

Prof. Edson Roberto De Pieri, Dr.
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica

Banca Examinadora:

Prof. Jefferson Luiz Brum Marques, PhD.
Presidente

Prof. Adroaldo Raizer, Dr.
Co-orientador

Prof. José Wilson Magalhães Bassani, Dr.

Prof. Marcos Telló, Dr.

Prof. Walter Carpes Pereira Jr., Dr.

Profa. Fernanda Isabel Marques Argoud, Dra.

Minha gratidão às pessoas que me ajudaram nesse empreendimento:

Ao orientador e amigo Professor Jefferson L.B. Marques por ter acreditado na seriedade e viabilidade de nossa proposta de pesquisa e com muita dedicação nos ter apoiado durante toda essa trajetória.

Ao co-orientador Professor Adroaldo Raizer pelas relevantes orientações técnicas na fase inicial deste trabalho.

À companheira de trabalho Daniela Suzuki pela colaboração em vários aspectos de nossos estudos.

À minha querida esposa Sulamir pelo apoio incondicional.

Aos meus amados filhos João Victor, Lucas Leon e Mariana, pela paciência com um pai sempre sem tempo.

Agradeço também as Instituições que apoiaram essa pesquisa:

UDESC – Universidade Estadual de Santa Catarina

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina

CAPES – Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior

Resumo da tese apresentada à Universidade Federal de Santa Catarina Como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Engenharia Elétrica

Desenvolvimento do método do circuito equivalente para análise numérica de processos elétricos em tecidos biológicos

Airton Ramos
Fevereiro / 2003

Orientador: Jefferson L.B. Marques, PhD

Área de Concentração: Engenharia Biomédica

Palavras chave: Cálculo de Campo, Simulação Numérica, Modelagem de Sistemas Vivos, Eletro-Estimulação biológica, Eletropermeabilização.

Número de Páginas: 152

RESUMO: O interesse nas propriedades elétricas de materiais biológicos data de mais de um século. Contudo, a análise teórica de grandezas e propriedades em tecidos biológicos por métodos analíticos somente é possível em modelos muito simplificados. Esta tese baseia-se no desenvolvimento de um método numérico especialmente projetado para permitir a modelagem de agregados de células e tecidos, representando com fidelidade as características elétricas do meio em dimensões celulares e descrevendo com precisão as propriedades macroscópicas em grandes volumes de tecido. A técnica baseia-se na solução da equação de continuidade, em um espaço discretizado com elementos de volume retangulares, e modela o transporte elétrico no meio através de um circuito equivalente constituído de elementos concentrados, como capacitâncias, condutâncias e fontes de corrente. Esta técnica é denominada de Método do Circuito Equivalente (MCE), e foi concebida como tendo duas abordagens que se complementam: o modelo em escala celular e o modelo em escala de tecido. Esta tese demonstra a versatilidade e potencialidade do método para analisar diferentes aspectos do comportamento elétrico de tecidos. Com base nos resultados obtidos propomos que o MCE deve se tornar uma importante ferramenta na pesquisa em bioeletromagnetismo, bem como no planejamento de terapias baseadas na eletro-estimulação biológica.

Abstract of the thesis presented to Federal University of Santa Catarina as a partial fulfilment of the requirements for the degree of doctor in Electrical Engineering

**DEVELOPMENT OF THE EQUIVALENTE CIRCUIT METHOD
FOR NUMERICAL ANALYSIS OF ELECTRICAL PROCESS IN
BIOLOGICAL TISSUES**

Airton Ramos

February / 2003

Advisor: Jefferson L.B. Marques, PhD

Area of Concentration: Biomedical Engineering

Keywords: Field Calculation, Numerical Simulation, Living System Modelling, Biological Electro-Stimulation, Electroporpermabilisation.

Number of Pages: 152

ABSTRACT: Since before a century ago the electrical properties of biological materials are matter of interest. However, the theoretical analysis of the electrical phenomenon in biological tissues by analytical methods is possible only in very simplified models. This thesis is based on the development of a numerical method especially designed to permit the modeling of cell aggregates and tissues, correctly representing the electric characteristic of the medium in the scale of cell dimension and precisely describing the macroscopic properties in a large volume of tissue. The technic is based on the solution of the continuity equation in a discretized space with blocks of rectangular shape, and models the electric transport in the medium using an equivalent circuit constituted by lumped elements as capacitances, conductances and current sources. This technic is named Equivalent Circuit Method (ECM) and was designed as having two approaches that complement each other: the cell scale model and the tissue scale model. This thesis shows the power and versatility of the method to analyse different aspects of the electrical behavior of tissues. Based on these theoretical studies we believe that the ECM should become a valuable tool in the bioelectromagnetism research as well in the planning of therapies based on the biological electro-stimulation.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
CAPITULO 1 - PROPRIEDADES ELÉTRICAS DE TECIDOS BIOLÓGICOS.....	18
1.1 Transporte Elétrico em Soluções Eletrolíticas... ..	18
1.1.1 Corrente de ondução.....	18
1.1.2 Corrente de Difusão.....	21
1.1.3 A Equação de Nernst-Planck.....	22
1.2 Dispersão Dielétrica em Tecidos Biológicos.....	23
1.2.1 Modelo de Dispersão por Relaxação de Primeira Ordem.....	23
1.2.2 Mecanismos de Dispersão Dielétrica em Tecidos Biológicos.....	30
1.3 Distribuição Espacial de Campo Elétrico em Membranas.....	35
1.4 Eletropermeabilização de Membranas Biológicas.....	39
CAPÍTULO 2 - O MÉTODO DO CIRCUITO EQUIVALENTE.....	49
2.1 Fundamentos Teóricos.....	50
2.1.1 Equações de Transporte no Espaço Contínuo.....	50
2.1.2 Equações de Transporte no Espaço Discreto.....	51
2.2 O Modelo em Escala Celular.....	54
2.2.1 Circuito Equivalente Local.....	54
2.2.2 Método de Análise Usando o Modelo em Escala Celular.....	56
2.3 O Modelo em Escala de Tecido.....	61
2.3.1 Circuito Equivalente Macroscópico.....	61
2.3.2 Métodos de Análise Usando o Modelo em Escala de Tecido.....	63
2.4 Esquemas de Discretização Espacial.....	68
CAPÍTULO 3 - CONVERGÊNCIA, PRECISÃO E OUTROS ASPECTOS DO PROCESSAMENTO COM O MCE.....	74
3.1 Critério para Estabilidade do Método Iterativo no Modelo em Escala Celular.....	74
3.2 Erro em Regime Permanente.....	76

3.3 Análise Numérica da Convergência e Erro em Regime	
Permanente.....	79
3.4 Influência da Malha no Cálculo em Três Dimensões.....	81
3.4.1 Distribuição de Erros no Problema de uma Membrana	
Esférica.....	83
3.4.2 Tempo de Processamento.....	87
3.5 Critério para Estabilidade do Método Iterativo	
no Modelo em Escala de Tecido.....	89
3.6 Limite de frequência do MCE.....	90
CAPÍTULO 4 – Aplicação do MCE em sistemas biológicos.....	94
4.1 Tecido Muscular.....	94
4.1.1 Resultados Usando Degrau de Campo Elétrico.....	97
4.1.2 Resultados Usando Pulso de Campo Elétrico.....	100
4.1.3 Análise em Escala de Tecido.....	102
4.1.4 Conclusões Sobre a Simulação do Músculo	
Esquelético.....	105
4.2 Suspensão Diluída de Células Esféricas.....	109
4.2.1 Modelamento Numérico da Suspensão de Membranas Esféricas	
Segundo o MCE.....	109
4.2.2 Condutividade e Potencial de Membrana em	
Células Intactas.....	111
4.2.3 Limiar de Ruptura Dependente das	
Características da Membrana.....	114
4.2.4 Resposta ao Degrau e Distribuição de	
Permeabilidade na Membrana.....	116
4.2.5 Variação da Condutividade em Função do Campo	
Aplicado.....	118
4.2.6 Conclusões Sobre o Estudo da Suspensão de	
Membranas Esféricas.....	119
4.3 Eletro-Estimulação de Tecido Compacto de Células	
Cúbicas.....	121
4.3.1 Análise em Escala Celular.....	121

4.3.2 Análise em Escala de Tecido.....	129
4.3.3 Conclusões Sobre o Experimento de Eletro-Estimulação de um Tecido.....	137
CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO, CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS.....	139
5.1) DISCUSSÃO.....	139
5.2) CONCLUSÕES.....	141
5.3) TRABALHOS FUTUROS.....	142
REFERÊNCIAS.....	146

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Representação do movimento de íons em uma solução aquosa.....	19
Figura 1.2 - Ilustração do modelo matemático do processo de difusão.....	23
Figura 1.3 - Dispersão dielétrica devido à relaxação de primeira ordem.....	27
Figura 1.4- Dispersão da condutividade devido à relaxação de primeira ordem....	28
Figura 1.5 - Representação esquemática das principais regiões de dispersão dielétrica em tecidos biológicos.....	35
Figura 1.6 - Célula cilíndrica em um eletrólito sujeito a um campo elétrico externo.....	38
Figura 1.7 – Representação esquemática de poro hidrofóbico e poro hidrofílico em membranas lipídicas.....	42
Figura 1.8 – Energia livre associada a poros hidrofílicos e poros hidrofóbicos.....	42
Figura 1.9 – Distribuição simplificada de potencial em um poro.....	48
Figura 2.1 – Representação de um espaço discreto por meio de blocos de volume.....	52
Figura 2.2 – Circuito equivalente entre dois nós do espaço discreto.....	55
Figura 2.3 – Exemplo de uma malha regular tridimensional de nós.....	57
Figura 2.4 – Fluxograma do método iterativo para análise do circuito equivalente no modelo em escala celular.....	60
Figura 2.5 – Circuito equivalente representando uma banda de dispersão por relaxação de primeira ordem.....	63
Figura 2.6 – Circuito equivalente representando um material com três bandas de dispersão por relaxação de primeira ordem.....	63
Figura 2.7 – Fluxograma do método iterativo para análise do circuito equivalente no modelo em escala de tecido no domínio tempo.....	67
Figura 2.8 – Fluxograma do método fasorial para análise do circuito equivalente no modelo em escala de tecido no domínio frequência.....	69
Figura 2.9 – Efeito da discretização na representação de uma interface circular.....	71
Figura 2.10 – Efeito da discretização na representação do interstício entre células circulares bidimensionais.....	72
Figura 2.11 – Esquema de discretização direcional com progressão	

linear das arestas dos elementos retangulares.....	72
Figura 2.12 – Esquema de discretização espacial para obter uma distribuição uniforme de nós sobre uma interface circular.....	73
Figura 3.1 - Representação esquemática do processo de carregamento de uma interface condutor-isolante.....	75
Figura 3.2 - Distribuição de densidade de carga nas proximidades da interface isolante-condutor.....	77
Figura 3.3 - Módulo do erro em regime permanente no cálculo numérico da densidade superficial de carga.....	79
Figura 3.4 – Curvas de erro relativo médio no cálculo numérico da densidade de carga em função do passo de tempo.....	81
Figura 3.5 – Passo de tempo máximo para convergência do método iterativo em função do parâmetro de discretização espacial.....	82
Figura 3.6 – Erro relativo no cálculo da densidade de carga na interface, devido a discretização espacial.....	82
Figura 3.7 – Representação esquemática de uma membrana esférica em um campo elétrico uniforme.....	84
Figura 3.8 – Distribuição angular de potencial na membrana.....	85
Figura 3.9 – Distribuição de erro no potencial.....	86
Figura 3.10 – Constante de tempo de carregamento da membrana como função de seu raio.....	88
Figura 3.11 – Tempo de simulação como função do número de nós no circuito equivalente.....	89
Figura 3.12 – Circuito equivalente em um representação tridimensional de um material segundo o modelo em escala de tecido.....	90
Figura 3.13 – Ilustração para o cálculo simplificado do efeito indutivo em tecidos biológicos.....	93
Figura 4.1 – Modelo de músculo esquelético em duas dimensões.....	95
Figura 4.2 – Visão expandida de uma pequena região da malha de discretização.....	97
Figura 4.3 – Distribuições de potencial e corrente total no tecido muscular.....	98
Figura 4.4 – Distribuição angular de potencial na membrana da célula alvo.....	99
Figura 4.5 – Variação temporal do potencial de membrana.....	100

Figura 4.6 – Resposta do tecido à excitação na forma de pulso de campo elétrico.....	102
Figura 4.7 – Variação da condutividade e permissividade do tecido muscular com a frequência.....	103
Figura 4.8 – Modelo de músculo esquelético usado na análise em escala de tecido.....	104
Figura 4.9 – Distribuições de potencial e módulo da densidade de corrente total no modelo de músculo esquelético.....	106
Figura 4.10 – Condutividade e permissividade do modelo de músculo esquelético.....	107
Figura 4.11 – Detalhes geométricos da suspensão de células esféricas.....	110
Figura 4.12 – Distribuição de potencial na membrana em um oitante da célula alvo.....	112
Figura 4.13 – Dependência do potencial de membrana e da condutividade da suspensão com a fração volumétrica.....	114
Figura 4.14 – Resposta a uma rampa de campo elétrico em uma suspensão.....	115
Figura 4.15 - Corrente média e potencial de membrana no pólo da célula.....	117
Figura 4.16 – distribuição angular de potencial na membrana e mobilidade relativa.....	118
Figura 4.17 – Variação relativa da condutividade de uma suspensão de células...119	119
Figura 4.18 – Estrutura simplificada de um tecido de células cúbicas.....	122
Figura 4.19 – Espectros de condutividade e permissividade relativa do tecido.....	123
Figura 4.20 – Esquema utilizado no modelamento da condutância do tecido de células cúbicas.....	124
Figura 4.21 – Resposta do tecido à excitação com degrau de campo elétrico.....	127
Figura 4.22 – Resposta do tecido à excitação com rampa de campo elétrico.....	127
Figura 4.23 – Resposta do tecido à excitação com campo elétrico senoidal.....	128
Figura 4.24– Geometria de análise do tecido de células cúbicas.....	129
Figura 4.25 – Distribuição de potencial elétrico no plano $z=0$ do tecido.....	130
Figura 4.26 – Distribuição de corrente no plano $z=0$ do tecido.....	131
Figura 4.27 – Distribuição espacial da componente x do campo elétrico no tecido.....	132

Figura 4.28 – Distribuição espacial da componente y do campo elétrico no tecido.....	133
Figura 4.29 – Distribuição espacial da componente z do campo elétrico no tecido.....	134
Figura 4.30 – Distribuição espacial da condutividade no tecido.....	135
Figura 4.31 – Distribuição espacial de campo elétrico e condutividade.....	136
Figura 4.32 – Condutância da amostra de tecido como função do tempo.....	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Mobilidades iônicas em água em 298 K em diluição infinita.....	21
Tabela 4.1 – Propriedades elétricas do meio.....	96
Tabela 4.2 – Propriedades elétricas do tecido.....	105

INTRODUÇÃO

O interesse nas propriedades elétricas de materiais biológicos e no uso terapêutico de campos e correntes elétricas começou há mais de 150 anos e cresceu até os dias atuais acompanhando o ritmo de desenvolvimento da tecnologia de geração e medição de sinais elétricos. Segundo Foster e Schwan [1], as primeiras publicações técnicas nesse campo datam da primeira metade do século XIX tratando da capacidade dielétrica dos corpos de animais. Nesse mesmo século foi realizado o primeiro experimento com corrente alternada em tecidos vivos, indicando forte anisotropia na resistência do músculo esquelético (Herman, 1872, citado em [1]).

No início do século XX, com a melhoria da instrumentação para medição em corrente alternada, foi possível observar a dispersão dielétrica de tecidos biológicos até o limite de 100MHz, com intensa atividade de caracterização elétrica de vários sistemas de células vivas sendo realizada nas décadas de 1920-1930. Com o desenvolvimento da tecnologia de microondas, a partir da segunda guerra mundial, esse limite de frequências foi estendido para 10GHz [1].

Os desenvolvimentos teóricos que acompanharam toda essa experimentação levaram aos conceitos de polarização e relaxação para justificar os resultados observados, sendo reconhecido que a membrana plasmática das células desempenha papel fundamental nos processos dispersivos em áudio e rádio frequências e que processos moleculares que ocorrem preferencialmente no eletrólito são responsáveis pela dispersão nas frequências de microondas [1].

Além dessa intensa atividade de caracterização, nas últimas décadas, o estudo dos efeitos biológicos de campos eletromagnéticos ganhou considerável ênfase. Tais efeitos podem ser classificados em térmicos (aquecimento por corrente ou oscilação molecular em campos alternados), alterações estruturais (e.g., eletropermeabilização e eletrofusão de membranas) e estimulação de reações bioquímicas (e.g., metabolismo e biossíntese) [2-10]. Como consequência desses estudos, o uso terapêutico de campos e correntes elétricas passou de uma prática puramente empírica do início do século XX, para uma abordagem médica confiável, sendo que atualmente já se tem comprovada a eficácia da eletro-

estimulação no tratamento de certos tumores e na regeneração de alguns tecidos biológicos [11-16].

Contudo, devido à complexidade estrutural, anisotropia e dispersão das propriedades elétricas, tecidos biológicos são materiais muito difíceis de se estudar por métodos analíticos. A forma mais apropriada de se obter resultados teóricos de grandezas eletromagnéticas em materiais desse tipo, baseia-se no uso de métodos numéricos para solução das equações de Maxwell. Alguns dos métodos mais tradicionais como o método das diferenças finitas (FDM) e o método dos elementos finitos (FEM), entre outros, já foram aplicados na análise da distribuição de campos, correntes e potência dissipada em grandes porções de tecido, órgãos e corpos inteiros submetidos a campos externos [17].

Todos os métodos numéricos baseiam-se na discretização do espaço em um grande número de elementos de volume. Mesmo em um meio heterogêneo ou anisotrópico, dentro de cada elemento, as propriedades eletromagnéticas do meio são consideradas constantes independentes da posição e direção, embora possam variar de um elemento para outro. Assim, se um elemento tem volume tal que envolve muitas células daquele tecido, é razoável considerar as propriedades do meio, como a condutividade e a permissividade, como médias tomadas sobre um grande número de células. Isso elimina grande parte da complexidade do processo de modelagem, porque os detalhes estruturais das células e as particularidades nas distribuições de correntes e campos em torno das membranas desaparecem no processo de discretização. As propriedades do meio são obtidas a partir de métodos experimentais que naturalmente implicam em uma promediação espacial. Chamamos essa abordagem de *análise em escala de tecido*.

Existe, contudo, uma classe de problemas na qual essa promediação deve ser considerada com um grau muito maior de resolução espacial. Se o interesse está nas distribuições de campo e correntes em torno das membranas plasmáticas, por exemplo, então os elementos de volume da malha devem ter dimensões muito menores que as próprias células. As propriedades elétricas em cada elemento da malha dependerão agora do material ao qual ele está associado. No modelo mais simples, existem dois materiais que formam o tecido: o meio líquido intra e extracelular constituído principalmente por água, íons e proteínas e as membranas lipídicas. Nesse nível de resolução espacial, toda a complexidade estrutural da célula tem que ser levada em conta. O meio, nesse caso é sempre heterogêneo e anisotrópico. A membrana plasmática, por exemplo, além de apresentar, em geral, formas muito complexas, tem espessura extremamente pequena

comparada com outras dimensões celulares. Além disso, o método de análise deve levar em conta a acumulação de cargas nas interfaces eletrólito-membrana, pois isso provoca distorções do campo elétrico em torno das células e as correntes de difusão de íons em torno e através (no caso da eletropermeabilização) da membrana, pois essas podem se tornar importantes quando comparadas às correntes de condução. Chamamos essa abordagem de alta resolução espacial de *análise em escala celular*.

A pesquisa que resultou nesta tese teve por objetivo principal desenvolver métodos numéricos para análise de processos elétricos em meios biológicos, tanto em escala celular quanto em escala de tecido. Considerando a complexidade peculiar desses materiais, de acordo com o exposto anteriormente, ao invés de tentar adaptar um dos métodos tradicionais de cálculo de campo para realizar essa tarefa, optamos por desenvolver uma nova abordagem que reúne algumas das características mais fortes de alguns desses métodos e inclui elementos novos que facilitam o processo de modelagem das propriedades específicas desses materiais. Essa abordagem é denominada de *método do circuito equivalente*.

OBJETIVOS

Este trabalho de pesquisa foi proposto e desenvolvido com os seguintes objetivos:

OBJETIVO GERAL

Desenvolver modelos e métodos para análise numérica de processos elétricos em materiais biológicos, constituídos de agregados de células em meio eletrolítico, e demonstrar a sua aplicabilidade na caracterização de propriedades elétricas de tecidos e no planejamento de terapias baseadas na eletro-estimulação biológica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1) Desenvolver modelos e métodos computacionais para cálculo das distribuições de potencial elétrico e correntes iônicas em escala celular.

3) Desenvolver estratégias para obter parâmetros elétricos macroscópicos de um tecido.

4) Desenvolver modelos e métodos computacionais para cálculo das distribuições de potencial elétrico e correntes em escala de tecido.

5) Demonstrar a aplicabilidade dos modelos e métodos na análise das propriedades elétricas de tecidos biológicos.

6) Demonstrar a aplicabilidade dos modelos e métodos no estudo da eletropermeabilização de células e tecidos biológicos.

CAPÍTULO 1 – PROPRIEDADES ELÉTRICAS DE TECIDOS BIOLÓGICOS

Sob todos os pontos de vista, tecidos biológicos são materiais muito complexos. Em relação às propriedades elétricas, esta complexidade se manifesta principalmente em uma escala de dimensões microscópicas, onde se verifica uma grande variedade de componentes iônicos e moleculares na fase líquida e morfologia complexa das membranas lipídicas, as quais, por apresentarem condutividade muito baixa em relação ao eletrólito circundante, afetam intensamente o transporte elétrico no meio, produzindo efeitos macroscópicos muito importantes como anisotropia e dispersão dielétrica. Além disso, membranas celulares apresentam efeitos não lineares associados ao transporte por meio de canais protéicos e devido ao fenômeno de eletropermeabilização, pelo qual um campo elétrico suficientemente intenso provoca aumento da condutância elétrica na parte lipídica da membrana. Neste capítulo, apresentaremos uma compilação de conceitos e modelos aplicados na interpretação de fenômenos elétricos em tecidos biológicos.

1.1) TRANSPORTE ELÉTRICO EM SOLUÇÕES ELETROLÍTICAS

O movimento orientado de partículas carregadas em soluções eletrolíticas pode ser motivado por duas causas distintas: gradiente de potencial elétrico (campo elétrico), que impulsiona cada partícula carregada na direção e sentido da menor energia potencial elétrica e, gradiente de concentração, que impulsiona as partículas no sentido da uniformização da densidade volumétrica em todo o espaço considerado. No primeiro caso, o movimento das cargas é conhecido por corrente de condução e no segundo caso é chamado corrente de difusão. Apresentaremos a seguir os modelos matemáticos amplamente aceitos para descrever esses dois processos.

1.1.1) Corrente de Condução

Consideremos uma solução eletrolítica constituída por 'n' íons de concentrações e valências $(c_1, z_1), (c_2, z_2) \dots (c_n, z_n)$. Cada íon é portador de uma carga elétrica de valor $q_i = e z_i$, sendo $e = 1.602 \times 10^{-19}$ C. Quando a solução é submetida a um campo elétrico externo, as cargas passam a se deslocar, impulsionadas pela força elétrica, no sentido da menor energia potencial. Na verdade, todas as partículas da solução (íons e partículas neutras do solvente) estão em constante movimento caótico. O resultado da superposição do movimento térmico mais a aceleração produzida pelo campo elétrico, é bastante

complexo, conforme ilustrado na Figura (1.1). Uma parte da energia cinética fornecida pelo campo a cada íon, é rapidamente transferida para as demais partículas da solução por meio de colisões, o que resulta em mais agitação térmica do meio. Considerada em uma média espacial e temporal em dimensões bem maiores que o livre percurso médio e o tempo médio entre colisões, esta perda de energia pode ser representada como o efeito de uma força de fricção dependente da velocidade média do íon. Assim, cada íon, numa média espacial e temporal, alcança uma velocidade final de ‘arraste’ pelo campo, quando esta força de fricção se iguala à força exercida pelo campo elétrico. Em um modelo simples, onde os íons tenham a forma de esferas rígidas em um meio homogêneo de viscosidade \mathbf{h} (uma aproximação razoável quando a solução é bastante diluída e os íons têm dimensões bem maiores que as moléculas do solvente), a força de fricção é dada pela fórmula de Stokes [18]:

$$F_{ai} = 6\mathbf{h}r_i v_i \quad (1.1)$$

onde r_i é o raio do íon e v_i a sua velocidade média no meio. Quando a força elétrica $F_{ei} = z_i e E$ (sendo E o módulo do campo elétrico) é equilibrada pela força de fricção, a velocidade média em regime permanente do íon é:

$$v_i = \frac{z_i e}{6\mathbf{h}r_i} E \quad (1.2)$$

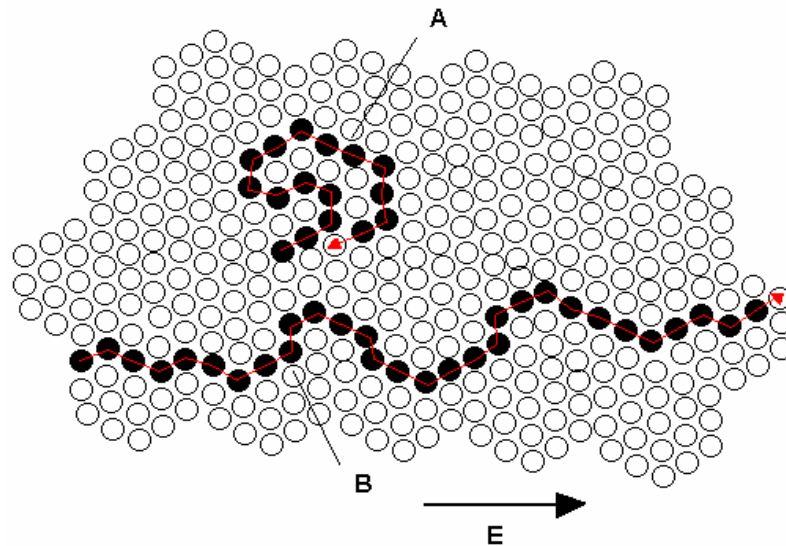


Figura 1.1 - Representação do movimento de íons em uma solução (A) não polarizada e (B) polarizada pelo campo elétrico indicado. No caso (B) o íon adquire velocidade vetorial média na direção do campo.

A velocidade vetorial de cada partícula na solução não excitada têm valor médio nulo, porque o movimento térmico é caótico. Contudo, a eq.(1.2) mostra que na solução excitada, os íons têm uma velocidade média não nula, e que seu módulo é proporcional a intensidade do campo elétrico. A direção do deslocamento médio resultante dos íons é a mesma do vetor campo elétrico, enquanto o sentido do deslocamento depende do sinal da carga. A constante de proporcionalidade entre a velocidade média do íon e a intensidade do campo elétrico é denominada mobilidade do íon naquele solvente.

$$m_i = \frac{z_i e}{6 \pi \eta r_i} \quad (1.3)$$

Se o solvente é a água, pode-se usar a eq.(1.3) para obter uma estimativa do valor da mobilidade iônica, desde que se use o valor correto para o raio r_i , que não é o raio atômico, mas sim, o raio hidrodinâmico do íon, ou seja, o raio efetivo considerando as moléculas de água que o íon carrega consigo, em virtude da forte atração eletrostática que a sua carga produz nas moléculas de água vizinhas. Assim, por exemplo, um íon pequeno como Na^+ ou Cs^+ , tem raio hidro-dinâmico da ordem de 170 pm. A mobilidade desse íon na água a 298 K, com $\eta = 8.91 \times 10^{-6} \text{ kg cm}^{-1} \text{ s}^{-1}$, segundo a eq.(1.3) é $5.6 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$. O valor experimental para o íon Na^+ é $5.19 \times 10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [18].

Dentro dos limites de validade da eq.(1.3) pode-se inferir que, na medida em que a viscosidade diminui com o aumento da temperatura da solução, a mobilidade iônica apresenta o comportamento inverso, ou seja, é maior em temperaturas maiores. A mobilidade também depende inversamente do raio do íon. Contudo, isso não significa necessariamente, que em todos os casos, os átomos menores formarão íons de maior mobilidade que os átomos maiores, porque o que interessa para a mobilidade é o raio hidro-dinâmico do íon. Por exemplo, para os íons de metais alcalinos, a mobilidade aumenta do Li^+ para o Cs^+ , embora o raio iônico aumente. Acontece que os íons menores concentram sua carga em um volume menor, por isso produzem campos elétricos mais intensos na sua vizinhança e, assim, são mais intensamente hidratados, ou seja, agregam maior número de moléculas de água. A Tabela (1.1) apresenta a mobilidade em água de alguns dos íons mais comumente encontrados em soluções biológicas. Os valores expressos na tabela são estimativas para o limite de máxima diluição do soluto. Na medida em que a concentração do eletrólito aumenta, diminui a distância média entre íons de sinal contrário na solução, e a força de atração entre eles, conseqüentemente, aumenta. Como os íons de sinal contrário se deslocam em sentidos opostos, isso acarreta um aumento na força

TABELA 1.1
MOBILIDADES IÔNICAS NA ÁGUA
EM 298K EM DILUIÇÃO INFINITA^a

Íon	$m(10^{-4} \text{ cm}^2 \text{ V}^{-1} \text{ s}^{-1})$
H ⁺	36.23
K ⁺	7.62
Na ⁺	5.19
Ca ²⁺	6.17
NH ₄ ⁺	7.63
Cl ⁻	7.91
OH ⁻	20.64
SO ₄ ²⁻	8.29

^a Obtido de [18].

média de fricção do meio, o que diminui a mobilidade dos íons. Experimentalmente se verificou que, para eletrólitos fortes (aqueles que se ionizam totalmente na solução), a condutividade por mol de soluto (e conseqüentemente, a mobilidade iônica) diminui linearmente com a raiz quadrada da concentração da solução (lei de Kohlrausch) [18].

Conhecidas as mobilidades iônicas na solução, a densidade de corrente de condução para cada íon pode ser escrita na forma:

$$J_{cond\ i} = e z_i c_i m_i E = r_i m_i E \quad (1.4)$$

onde se assume que as concentrações c_i sejam expressas em (íons/cm³) e r_i é a densidade volumétrica de carga do íon, expressa em (C/cm³). A densidade total de corrente de condução, naturalmente, pode ser obtida pela soma das densidades de corrente individuais de cada íon. Assim, podemos expressar a condutividade da solução através da equação:

$$s = \sum_i e z_i c_i m_i = \sum_i r_i m_i \quad (1.5)$$

Valores típicos de condutividade para soluções biológicas são da ordem de 10⁻² S/cm .

1.1.2) Corrente de Difusão

A difusão é o movimento de partículas na direção de um gradiente de concentração, e está associada à tendência natural de qualquer sistema de partículas de evoluir para uma situação de concentração uniforme. Suponhamos que a velocidade escalar média v das partículas em um sistema de partículas idênticas e a distribuição espacial da concentração

volumétrica $c(x)$ dessas partículas sejam conhecidas (consideraremos apenas variações em uma única direção). Devido ao movimento térmico caótico das partículas, em qualquer instante, um fluxo $f(x) = b v c(x)$ (partículas/unidade de área) atravessa uma área unitária em uma direção arbitrária, sendo b uma constante de proporcionalidade. Se a concentração de partículas não varia naquela direção, existe um fluxo idêntico na mesma direção, porém em sentido oposto, e o fluxo resultante é nulo. Porém, conforme indicado na Figura (1.2), se a concentração varia ao longo da direção especificada, haverá um fluxo líquido no sentido da menor concentração. Esse fluxo pode ser calculado por:

$$f_{dif} = -b v \left\{ [c(x_o) + l \left(\frac{dc}{dx} \right)_{x_o}] - [c(x_o) - l \left(\frac{dc}{dx} \right)_{x_o}] \right\} = -2 b v l \left(\frac{dc}{dx} \right)_{x_o} = -k \left(\frac{dc}{dx} \right)_{x_o} \quad (1.6)$$

onde l é o livre percurso médio entre colisões sucessivas e consideramos o fluxo líquido através de uma camada de espessura $2l$, pela diferença entre os fluxos através de suas faces em $(x_o + l)$ e $(x_o - l)$. k é o coeficiente de difusão dessas partículas ($k = 2bv l$). Em uma solução contendo diferentes eletrólitos, cada espécie de portador de carga é responsável por uma parcela da densidade total de corrente de difusão, segundo a expressão:

$$J_{dif i} = e z_i f_{dif i} = -e z_i k_i \frac{dc_i}{dx} = -k_i \frac{d\mathbf{r}_i}{dx} \quad (1.7)$$

Assim como a mobilidade, o coeficiente de difusão é dependente da temperatura, da densidade do eletrólito e das propriedades coligativas do solvente. Na verdade, mobilidade e coeficiente de difusão são grandezas interdependentes, e estão formalmente relacionadas pela relação de Einstein:

$$k = \frac{kT}{ze} m \quad (1.8)$$

onde k é a constante de Boltzmann ($k = 1.38 \times 10^{-23} JK^{-1}$) e T é a temperatura absoluta. Para $z=1$ e $T=298K$, a constante de proporcionalidade entre k e m vale aproximadamente 25.6 mV.

1.1.3) A Equação de Nernst-Planck

A densidade de corrente total associada ao movimento de cargas no meio possui então duas componentes: a componente de condução e a de difusão. Obtemos uma expressão teórica dessa corrente total pela soma das equações (1.4) e (1.7).

$$J_i = -e z_i c_i m \nabla V - e z_i k_i \nabla c_i \quad (1.9)$$

onde ∇V e ∇c_i são os gradientes de potencial elétrico e de concentração do íon considerado, respectivamente. A equação (1.9) é conhecida como equação de Nernst-Planck. Ela será usada no próximo capítulo na apresentação do método do circuito equivalente. Usando as seguintes substituições: $\mathbf{r}_i = e z_i c_i$ e $\mathbf{k}_i = v_i \mathbf{m}_i$ onde $v_i = kT/e z_i$, podemos reescrever essa equação em uma forma mais prática.

$$J_i = - \mathbf{m}_i (\mathbf{r}_i \nabla V + v_i \nabla \mathbf{r}_i) \quad (1.10)$$

que por sua vez pode ser reescrita numa forma mais conveniente para integração:

$$J_i = - \mathbf{m}_i v_i e^{-V/v_i} \nabla (\mathbf{r}_i e^{V/v_i}) \quad (1.11)$$

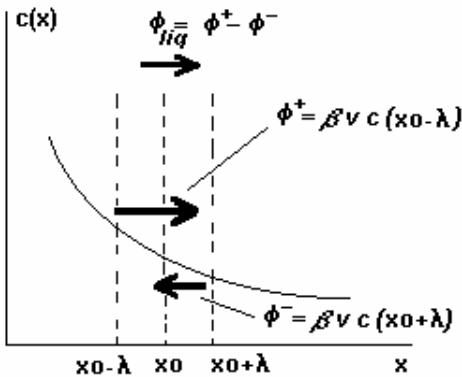


Figura 2.2 - Ilustração do modelo matemático do processo de difusão.

1.2) DISPERSÃO DIELÉTRICA EM TECIDOS BIOLÓGICOS

O termo dispersão dielétrica significa a variação da permissividade de um material com a frequência. Materiais biológicos apresentam forte dispersão dielétrica na faixa que se estende desde áudio frequências até microondas. A condutividade elétrica desses materiais também é dependente da frequência, sendo sua variação correlacionada com a variação da permissividade. Nesta seção discutiremos alguns modelos usados na análise da dispersão dielétrica em tecidos biológicos.

1.2.1) Modelo de Dispersão por Relaxação de Primeira Ordem

Quando um material é submetido a um degrau de campo elétrico, ocorrem deslocamentos de carga, que determinam a resposta elétrica do meio. A cinética desses deslocamentos, por sua vez, determina a dependência da permissividade e da condutividade do material com a frequência. Via de regra, existem dois mecanismos gerais

responsáveis pela dispersão dielétrica: relaxação e ressonância. Não discutiremos aqui o fenômeno de ressonância, pois ocorre apenas em frequências muito superiores às de interesse neste trabalho. No processo denominado relaxação, em sua forma mais simples (sistema de primeira ordem), a taxa de decaimento da polarização induzida no meio, quando o campo externo é eliminado, é proporcional ao seu valor instantâneo, não dependendo da história anterior da amostra. Podemos expressar esse fato através da equação:

$$\frac{dP}{dt} = -\frac{P}{\tau} \quad (1.12)$$

onde P é a densidade volumétrica de dipolo elétrico do material e τ é uma constante chamada tempo de relaxação. A solução da eq.(1.12), considerando que o campo externo tenha sido desligado em $t=0$, quando a polarização era P_o , é:

$$P(t) = P_o \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \quad (1.13)$$

Por outro lado, quando o campo elétrico é aplicado em $t=0$, a polarização do meio tende ao valor de regime permanente P_o , através da equação:

$$P(t) = P_o \left[1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)\right] \quad (1.14)$$

O tempo de relaxação depende da cinética do deslocamento das cargas que estabelecem a polarização do meio. Meios condutores de baixa permissividade, por exemplo, apresentam tempos de relaxação muito baixos. É fácil mostrar através da Lei de Gauss, Lei de Ohm e da equação da continuidade que qualquer excesso de carga local induzido por um campo externo em um condutor extingue-se após a eliminação do campo, com uma constante de tempo dada por $\tau = \epsilon / \sigma$, que para metais é da ordem de 10^{-18} s e para eletrólitos em concentração fisiológica é da ordem de 10^{-9} s. Outro processo de relaxação tipicamente muito rápido é a relaxação dipolar, relacionada ao movimento das moléculas polares do meio, tal como a água, com tempo de relaxação da ordem de algumas dezenas de picosegundos. Contudo, em meios biológicos, existem processos que ocorrem nas interfaces entre o meio condutor e as membranas, os quais podem ser modelados como fenômenos de relaxação, e que resultam em constantes de tempo muito maiores.

Assim, ao se estudar o comportamento dielétrico de tecidos biológicos em frequências relativamente bem mais baixas do que cerca de 1GHz, é possível representar essa parcela do vetor de polarização do meio que responde muito rapidamente às variações de campo, por uma resposta “instantânea” somada ao termo que varia exponencialmente

no tempo, e que descreve o fenômeno de polarização específico. Desse modo, a eq.(1.14) poderia ser reescrita na forma:

$$P(t) = P_{\infty} + (P_o - P_{\infty}) [1 - \exp(-\frac{t}{\tau})] \quad (1.15)$$

onde P_{∞} é a polarização “instantânea” do meio, devida aos processos de relaxação muito “rápidos”. Recorrendo à equação da teoria eletromagnética $D = \epsilon_o E + P$, vemos que é possível representar a indução elétrica no meio por uma relação análoga à eq.(1.15).

$$D(t) = D_{\infty} + (D_o - D_{\infty}) [1 - \exp(-\frac{t}{\tau})] \quad (1.16)$$

A dispersão dielétrica pode agora ser formalmente representada para esse caso de relaxação de primeira ordem, tomando-se a transformada de Fourier da indução elétrica dada pela eq.(1.13) e considerando a relação $D = \epsilon \epsilon_o E$, para obter a constante dielétrica do meio como uma função complexa da frequência, através da expressão:

$$\hat{\epsilon}(\omega) = \epsilon_{\infty} + \frac{\epsilon_s - \epsilon_{\infty}}{1 + j\omega\tau} \quad (1.17)$$

Nesta equação ϵ_{∞} e ϵ_s são os valores da constante dielétrica em “altas” e “baixas” frequências, respectivamente. A ocorrência de dispersão da permissividade implica em dispersão simultânea da condutividade, porque permissividade e condutividade são grandezas relacionadas. Em um meio não dispersivo a densidade de corrente total em regime permanente para uma excitação senoidal é dada por:

$$J = s E + j\omega \epsilon \epsilon_o E \quad (1.18)$$

onde s e ϵ são constantes reais. A corrente de deslocamento existe mesmo no vácuo, mas é intensificada em meios materiais pelo movimento dos dipolos elétricos, de acordo com a equação seguinte:

$$J_{dest} = \frac{\partial D}{\partial t} = \epsilon_o \frac{\partial E}{\partial t} + \frac{\partial P}{\partial t} = j\omega \epsilon_o E + j\omega P \quad (1.19)$$

Em meios reais, o movimento de dipolos não é isento de perdas, ou seja, uma parte da energia potencial elétrica que se transforma em energia cinética de rotação dos dipolos, é convertida em agitação térmica devido às colisões que as moléculas polares efetuam entre si e com outras moléculas do meio. Essa perda implica em atraso no movimento dos dipolos, o que por sua vez acarreta diminuição na polarização do meio e na corrente de deslocamento. Por outro lado, na medida em que o vetor de polarização P não consegue acompanhar em fase o vetor de campo elétrico E , a perda dielétrica implica também em

uma componente de corrente em fase com o campo elétrico, o que pode ser considerada como uma corrente de condução. Assim, na ocorrência de um processo dispersivo, quanto maior a frequência, menor a permissividade e maior a condutividade do meio.

Seguindo essa linha de raciocínio, podemos escrever a permissividade como uma quantidade complexa, $\hat{\mathbf{e}} = \mathbf{e}' - j\mathbf{e}''$, onde a parte imaginária é devida às perdas dielétricas e usando a eq.(1.18) para definir a admitância específica do meio $y=J/E$, obtemos:

$$y = (\mathbf{s}_s + \mathbf{w} \mathbf{e}_o \mathbf{e}'') + j\mathbf{w} \mathbf{e}_o \mathbf{e}' \quad (1.20)$$

onde \mathbf{s}_s é a condutividade para $\mathbf{w}=0$. No modelo de dispersão de primeira ordem, obtemos da eq.(1.17), os valores de \mathbf{e}' e \mathbf{e}'' :

$$\mathbf{e}' = \text{Re}[\hat{\mathbf{e}}] = \mathbf{e}_\infty + \frac{\mathbf{e}_s - \mathbf{e}_\infty}{1 + \mathbf{w}^2 \mathbf{t}^2} \quad (1.21)$$

$$\mathbf{e}'' = -\text{Im}[\hat{\mathbf{e}}] = \frac{(\mathbf{e}_s - \mathbf{e}_\infty) \mathbf{w} \mathbf{t}}{1 + \mathbf{w}^2 \mathbf{t}^2} \quad (1.22)$$

A dispersão resultante na condutividade pode então ser obtida por:

$$\mathbf{s} = \mathbf{s}_s + \mathbf{w} \mathbf{e}_o \mathbf{e}'' = \mathbf{s}_s + \frac{(\mathbf{s}_\infty - \mathbf{s}_s) \mathbf{w}^2 \mathbf{t}^2}{1 + \mathbf{w}^2 \mathbf{t}^2} = \mathbf{s}_\infty + \frac{\mathbf{s}_s - \mathbf{s}_\infty}{1 + \mathbf{w}^2 \mathbf{t}^2} \quad (1.23)$$

onde \mathbf{s}_∞ , a condutividade em altas frequências, é definida pela relação:

$$\mathbf{s}_\infty = \mathbf{s}_s + \frac{\mathbf{e}_o}{\mathbf{t}} (\mathbf{e}_s - \mathbf{e}_\infty) \quad (1.24)$$

A Figura (1.3) apresenta os gráficos das relações de dispersão para um caso de primeira ordem. Como se vê, a parte imaginária da permissividade se anula para frequências distantes da frequência de corte $\mathbf{w}_c = 1/\mathbf{t}$. Contudo, se existem efeitos dispersivos em altas frequências, de modo que \mathbf{e}'' não se anula quando $\mathbf{w} \rightarrow \infty$, então será preciso acrescentar o termo $\mathbf{w} \mathbf{e}_o \mathbf{e}''_\infty$ à eq.(1.23), resultando em:

$$\mathbf{s}' = \mathbf{s}_\infty + \frac{\mathbf{s}_s - \mathbf{s}_\infty}{1 + \mathbf{w}^2 \mathbf{t}^2} + \mathbf{w} \mathbf{e}_o \mathbf{e}''_\infty \quad (1.25)$$

A Figura (1.4) mostra a dispersão da condutividade segundo a eq.(1.25), para um material com propriedades semelhantes à um tecido biológico.

Outro mecanismo de dispersão, particularmente importante em meio biológico por ocorrer em frequências muito menores que a relaxação dipolar, é devido à diferença de condutividade entre fluido condutor e membranas. Quando o tecido é excitado por um campo elétrico, as cargas iônicas se acumulam nas superfícies das membranas, na medida

em que as correntes iônicas provenientes do fluido se anulam na interface. Cargas de sinais contrários se acumulam em faces distintas da membrana (tipicamente como acontece em um capacitor de placas paralelas) e em virtude da “dupla camada” (a distribuição de cargas em membranas biológicas será discutida mais tarde) também se forma uma camada de dipolos elétricos nas vizinhanças da interface. Assim, a corrente de condução que é geralmente muito pequena em baixas frequências, devido a condutividade muito baixa da membrana, tende a aumentar com o aumento da frequência acima de um valor típico, a partir do qual as camadas de dipolos elétricos associadas à membrana não conseguem

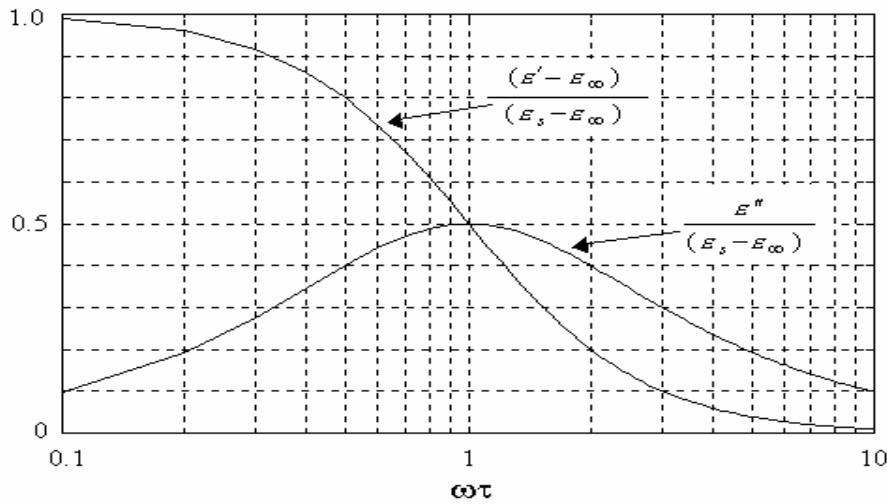


Figura 1.3- Dispersão dielétrica devido à relaxação de primeira ordem

seguir as variações do campo elétrico aplicado. Se assumirmos que esse efeito pode ser modelado por uma relaxação de primeira ordem, na ocorrência de um degrau de campo elétrico, escreveremos a densidade de corrente de condução na forma:

$$J_{cond} = J_{\infty} + (J_s - J_{\infty}) [1 - \exp(-\frac{t}{\tau})] \tag{1.26}$$

onde J_{∞} e J_s são as densidades de corrente “instantânea” e em regime permanente, respectivamente. Podemos agora obter a relação de dispersão para a condutividade, tomando-se a transformada de Fourier da eq.(1.26) e recorrendo à relação $J = sE$. Esse procedimento resulta em:

$$\hat{s}(\omega) = s_{\infty} + \frac{s_s - s_{\infty}}{1 + j\omega\tau} \tag{1.27}$$

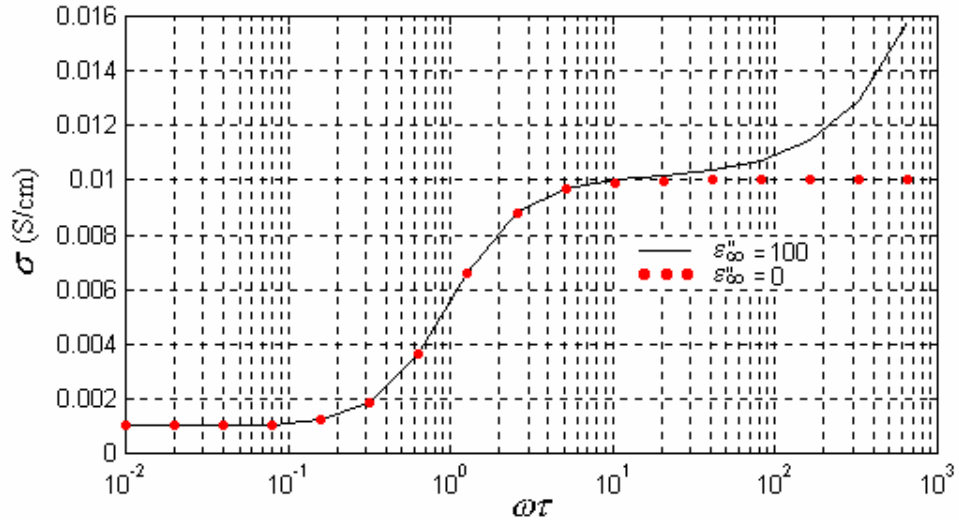


Figura 1.4 – Dispersão da condutividade segundo a eq.(1.25). $\mathbf{s}_s = 10^{-3} \text{ S/cm}$, $\mathbf{s}_\infty = 10^{-2} \text{ S/cm}$, $\mathbf{t} = 10^{-6} \text{ s}$. Observar que foram considerados dois valores diferentes da parte imaginária da permissividade em altas frequências.

cujas partes real e imaginária são:

$$\mathbf{s}' = \mathbf{s}_\infty + \frac{\mathbf{s}_s - \mathbf{s}_\infty}{1 + \omega^2 \mathbf{t}^2} \quad (1.28)$$

$$\mathbf{s}'' = \frac{(\mathbf{s}_\infty - \mathbf{s}_s) \omega \mathbf{t}}{1 + \omega^2 \mathbf{t}^2} \quad (1.29)$$

A partir desses resultados podemos escrever a admitância do meio na forma:

$$y = \mathbf{s}' + j\omega \mathbf{e}_o \left(\mathbf{e}_\infty + \frac{\mathbf{s}''}{\omega \mathbf{e}_o} \right) \quad (1.30)$$

O termo entre parênteses corresponde à parte real da permissividade. Substituindo \mathbf{s}'' na eq.(1.30), obtemos:

$$\mathbf{e} = \mathbf{e}_\infty + \frac{\mathbf{e}_s - \mathbf{e}_\infty}{1 + \omega^2 \mathbf{t}^2} \quad (1.31)$$

onde \mathbf{e}_s , a permissividade em baixas frequências, é dada por:

$$\mathbf{e}_s = \mathbf{e}_\infty + \frac{\mathbf{t}}{\mathbf{e}_o} (\mathbf{s}_\infty - \mathbf{s}_s) \quad (1.32)$$

Assim, a dispersão na condutividade implica em dispersão simultânea na permissividade, de forma totalmente equivalente à discussão anterior sobre relaxação dipolar. Se a parte

imaginária da condutividade não se anula quando $\omega \rightarrow 0$, o termo $\mathbf{s}_s''/\omega\epsilon_0$ deve ser acrescentado à eq.(1.31), resultando em:

$$\mathbf{e} = \mathbf{e}_\infty + \frac{\mathbf{e}_s - \mathbf{e}_\infty}{1 + \omega^2 \mathbf{t}^2} + \frac{\mathbf{s}_s''}{\omega\epsilon_0} \quad (1.33)$$

Nesse caso, existe uma singularidade na origem, indicando que o campo elétrico é totalmente cancelado dentro do material no limite de $\omega \rightarrow 0$. Isso é tipicamente o que acontece no interior de condutores sujeitos a campos externos.

Quando o meio é complexo, com muitos fenômenos dispersivos ocorrendo em frequências relativamente próximas, o modelo de primeira ordem deve ser modificado. No caso mais simples, no qual os processos de relaxação são todos de primeira ordem e os tempos de relaxação são suficientemente separados, a dispersão total pode ser considerada como a soma de dispersões individuais. Assim, a permissividade poderia ser escrita na forma:

$$\mathbf{e} = \mathbf{e}_\infty + \sum_i \frac{\Delta \mathbf{e}_i}{1 + j \omega \mathbf{t}_i} \quad (1.34)$$

onde a amplitude da dispersão total é dada por:

$$\mathbf{e}_s - \mathbf{e}_\infty = \sum_i \Delta \mathbf{e}_i \quad (1.35)$$

Porém, quando os processos não são todos de primeira ordem ou quando os tempos de relaxação são muito próximos, as dispersões individuais se superpõem e a curva resultante pode ser muito complexa. Nesse caso, é mais adequado modelar o sistema por uma distribuição contínua de tempos de relaxação, de modo que a eq.(1.31) deve ser reescrita na forma [19]:

$$\mathbf{e} = \mathbf{e}_\infty + (\mathbf{e}_s - \mathbf{e}_\infty) \int_0^\infty \frac{g(\mathbf{t}) d\mathbf{t}}{1 + j \omega \mathbf{t}} \quad (1.36)$$

onde $g(\mathbf{t})$, a função de distribuição de tempos de relaxação, satisfaz a condição:

$$\int_0^\infty g(\mathbf{t}) d\mathbf{t} = 1 \quad (1.37)$$

Uma prática comum aplicada na interpretação de resultados de dispersão dielétrica em meios biológicos é o uso de funções empíricas com parâmetros que devem ser ajustados para representar com erro mínimo um conjunto de resultados experimentais. Uma das mais utilizadas é a equação de Cole-Cole [19,20]:

$$\hat{\epsilon}(\omega) = \epsilon_{\infty} + \frac{\epsilon_s - \epsilon_{\infty}}{1 + (j\omega\tau)^{1-a}} \quad (1.38)$$

onde a e τ são os parâmetros que devem ser ajustados. O valor $a=0$ é usado para representar a relaxação de primeira ordem.

1.2.2) Mecanismos de Dispersão Dielétrica em Tecidos Biológicos

Três são os processos de relaxação que principalmente determinam o comportamento dielétrico de tecidos biológicos na faixa que se estende de áudio frequências até microondas: relaxação dipolar, polarização interfacial e difusão iônica superficial. Na seqüência discutiremos sucintamente cada um desses processos.

Relaxação Dipolar

Quando um material é submetido a um campo elétrico, as suas moléculas polares experimentam um torque que tende a orientar os seus vetores momento de dipolo elétrico na direção do campo. Contra essa tendência atua a agitação térmica do meio que promove, por meio de colisões, o espalhamento dos vetores momento de dipolo elétrico em direções aleatórias. No equilíbrio entre essas tendências, o meio adquire uma polarização que depende da intensidade do campo elétrico aplicado e da temperatura do meio. Um modelo aproximado dessa polarização é obtido pelo cálculo da média das projeções dos vetores momento de dipolo na direção do campo elétrico tomando-se como função de ponderação a distribuição de Boltzmann. Assim, se obtém [1,21]:

$$P = \frac{N_o p_o^2 E_o}{3kT} \quad (1.39)$$

onde N_o é o número médio por unidade de volume de moléculas com momento de dipolo elétrico p_o , submetidas ao campo elétrico local de intensidade E_o . Considerando a correção para o campo médio macroscópico, segundo a relação de Lorentz, obtém-se a seguinte relação para a permissividade relativa desse meio devido à orientação dipolar [21]:

$$\epsilon = \frac{1+2b}{1-b} \quad (1.40)$$

$$\text{onde } b = \frac{N_o p_o^2}{9kT\epsilon_o} .$$

O tempo de relaxação, estimado a partir de um modelo de difusão rotacional usando a fórmula de Stokes [1], é dado por:

$$\mathbf{t} = \frac{4\mathbf{p}h\mathbf{r}^3}{kT} \quad (1.41)$$

onde h é a viscosidade do meio e r é o raio da molécula. Observa-se que o fator mais importante na determinação do tempo de relaxação dipolar é o tamanho da molécula. Moléculas típicas dos componentes de tecidos biológicos apresentam tempo de relaxação de algumas dezenas de picossegundos, no caso de moléculas pequenas como a água, até microssegundos, para as grandes proteínas globulares [1].

Polarização Interfacial

Um material eletricamente heterogêneo, quando submetido a um campo elétrico, apresentará acúmulo de cargas nas interfaces entre regiões de diferentes condutividades. Daí resulta o aparecimento de uma polarização interna que tem o comportamento típico da relaxação de primeira ordem. Consideremos o caso biologicamente relevante de membranas lipídicas em solução fisiológica. Foster e Schwan [1], baseando-se em resultados anteriormente obtidos por diversos pesquisadores (incluindo o próprio Maxwell), analisaram a dispersão de uma solução diluída de membranas esféricas em fluido condutor, obtendo (com muitas aproximações) os seguintes resultados:

$$\mathbf{e}_s - \mathbf{e}_\infty = \frac{9\mathbf{d}rC_m}{4\mathbf{e}_o} \quad (1.42)$$

$$\mathbf{t} = rC_m \left(\frac{1}{\mathbf{s}_i} + \frac{1}{2\mathbf{s}_o} \right) \quad (1.43)$$

Nestas expressões, r é o raio das membranas, \mathbf{d} é a fração de volume ocupado pelas membranas, C_m é a capacitância por unidade de área das membranas ($C_m = \mathbf{e}_m \mathbf{e}_o / d$, onde \mathbf{e}_m é a permissividade relativa da bicamada lipídica e d é a espessura da membrana); \mathbf{s}_i e \mathbf{s}_o são as condutividades do fluido condutor interno e externo às membranas, respectivamente. As expressões acima estão na forma limite em que a condutividade da bicamada lipídica é desprezada. Observamos que tanto a amplitude da dispersão da permissividade quanto o tempo de relaxação dependem linearmente do raio da célula. Podemos obter uma estimativa dos resultados fornecidos pelas equações (1.42) e (1.43), usando $\mathbf{s}_i = \mathbf{s}_o = 10^2$ S/cm, $C_m = 1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ e $\mathbf{d} = 0.5$. Assim, para células pequenas (como eritrócitos), usando $r = 10 \mu\text{m}$, obtemos $\mathbf{e}_s - \mathbf{e}_\infty \approx 1.27 \times 10^4$ e $\mathbf{t} = 0.15 \mu\text{s}$. Para células grandes, com $r = 100 \mu\text{m}$ por exemplo, obtemos valores 10 vezes maiores. Desse modo, conclui-se que a relaxação por

polarização interfacial deve dominar a resposta dielétrica de tecidos biológicos na faixa de 1MHz a 10MHz.

Difusão Iônica Superficial

Alguns tecidos biológicos apresentam forte dispersão dielétrica numa faixa de frequências muito baixas (em geral até algumas centenas de Hz), a qual tem sido associada à difusão iônica nas proximidades das superfícies das membranas [1,22]. A fim de discutir esse importante efeito dispersivo, inicialmente apresentaremos os principais aspectos da eletrostática das duplas camadas iônicas.

Membranas celulares normalmente apresentam uma camada de carga superficial negativa associada às extremidades livres de suas moléculas constituintes (fosfolipídeos, glicolipídeos e proteínas de membrana). O campo elétrico gerado por essas cargas atrai cátions e repele ânions da solução eletrolítica, de modo que se forma uma camada de cargas positivas adjacente a camada de cargas negativas da membrana. Essa estrutura é denominada dupla camada. A análise teórica das distribuições de potencial elétrico e densidade iônica na dupla camada é complexa, uma vez que envolve fenômenos elétricos e hidrodinâmicos. Na ausência de campo elétrico externo, uma solução aproximada de grande aceitação pela simplicidade e boa concordância com resultados experimentais é o modelo de Gouy-Chapman. Baseia-se esse modelo na hipótese de que toda a carga superficial está confinada a uma camada infinitamente delgada e que a única interação relevante é a força de Coulomb. Nestas condições, a equação de Poisson é resolvida, considerando-se a relação de Boltzmann entre potencial e densidade de carga, para uma solução de íons positivos e negativos em equilíbrio termodinâmico [23,24]:

$$r_i(x) = r_{oi} \exp\left(\frac{-e z_i V(x)}{kT}\right) \quad (1.44)$$

onde o índice i indica cada um dos tipos iônicos na solução e r_{oi} é a densidade em uma posição tomada como referência, na qual o potencial é arbitrado como sendo nulo. A solução para o potencial na dupla camada, para um eletrólito simétrico de valência z , concentração c e permissividade relativa ϵ , pode ser expressa nas duas equações seguintes; a primeira para a relação entre o potencial na superfície da membrana V_s e a densidade superficial de carga q_s , e a segunda para a distribuição de potencial $V(x)$ [23,24]:

$$\sinh\left(\frac{e z V_s}{2 k T}\right) = \frac{q_s}{\sqrt{8 \epsilon \epsilon_0 k T c}} \quad (1.45)$$

$$V(x) = \frac{2kT}{e} \ln \left(\frac{1 + f \exp(-x/L_D)}{1 - f \exp(-x/L_D)} \right) \quad (1.46)$$

onde $f = \frac{\exp(eV_s/2kT) - 1}{\exp(eV_s/2kT) + 1}$ e L_D é o comprimento de Debye, dado por:

$$L_D = \sqrt{\frac{\epsilon \epsilon_0 kT}{2z^2 e^2 c}} \quad (1.47)$$

Esses resultados são para um problema unidimensional, o único caso onde a equação Poisson-Boltzmann tem solução exata. Quando a densidade superficial de carga na membrana é pequena ou a densidade do eletrólito é elevada, de modo que $V_s \ll 2kT/ze$, as equações (1.45) e (1.46) podem ser aproximadas por:

$$V_s = \frac{q_s L_D}{\epsilon \epsilon_0} \quad (1.48)$$

$$V(x) = V_s \exp\left(-\frac{x}{L_D}\right) \quad (1.49)$$

É nesta forma que o modelo de Gouy-Chapman é mais conhecido e utilizado para analisar resultados experimentais. Para eletrólitos em concentrações fisiológicas, o comprimento de Debye é da ordem de 1 nm, o que significa que o modelo pode representar bem as distribuições de potencial e carga apenas em uma camada imediatamente adjacente à membrana. Contudo o modelo falha quando a membrana apresenta curvatura muito acentuada e quando a espessura da camada de carga superficial é comparável a L_D .

Podemos retornar agora ao problema da dispersão dielétrica. Quando o meio em questão é submetido a um campo elétrico externo, as correntes iônicas na superfície das partículas em suspensão no eletrólito diferem consideravelmente dos valores correspondentes no volume longe da superfície. Isso ocorre por que a condutividade superficial dos cátions é aumentada pelo acúmulo de cátions na superfície, enquanto a condutividade dos ânions é reduzida, já que a dupla camada é depletada de íons negativos. Na medida em que as densidades de corrente divergem (estamos falando do operador vetorial divergência) intensamente nas imediações da superfície, segundo a equação de continuidade, surge um excesso de carga volumétrica na região considerada. Essa carga espacial momentaneamente induzida pelo campo estabelece uma intensa polarização do meio, dando origem à forte dispersão dielétrica. A análise matemática desse fenômeno é extremamente complexa e nos limitaremos a citar duas aproximações relativamente bem sucedidas em fazer previsões compatíveis com resultados experimentais para partículas

esféricas isolantes em eletrólito aquoso. Na primeira, devida a Schwarz [25], a equação de Laplace é resolvida nas imediações da superfície da partícula para obter uma relação entre o campo elétrico tangencial e a corrente total tangencial, da qual se obtém uma expressão para o acréscimo na permissividade da partícula, devido ao acúmulo de cargas na superfície. O resultado alcançado por Schwarz pode ser expresso nas duas equações seguintes:

$$\Delta \mathbf{e} = \frac{z^2 e^2 r c_s}{e_0 k T} \frac{1}{1 + j \omega t} \quad (1.50)$$

$$t = \frac{z e r^2}{2 m k T} = \frac{r^2}{2 k_s} \quad (1.51)$$

onde r é o raio da partícula, z é a valência do íon majoritário na dupla camada (íon de sinal contrário à carga superficial da partícula), c_s é a densidade superficial desse íon, m é a sua mobilidade superficial e k_s o seu coeficiente de difusão superficial. Para células com $r=10\mu\text{m}$ em solução fisiológica (considerando $c_s=10^{13}\text{cm}^{-2}$ e o coeficiente de difusão do sódio) as equações (1.50) e (1.51) fornecem $\Delta \mathbf{e} \approx 7 \times 10^5$ e $t=38\text{ms}$, uma dispersão muito intensa com uma frequência de corte de cerca de 26Hz . O mecanismo de dispersão proposto por Schwarz baseia-se na difusão superficial de íons majoritários na dupla camada. Um mecanismo bastante diferente é o que Chew e Sen [26,27] propuseram. Usando o método das perturbações para resolver a equação de Laplace, eles conseguiram obter expressões para a distribuição de potencial e densidade de carga na região neutra adjacente à dupla camada, a qual chamaram de “nuvem de difusão”, cuja extensão é dependente da frequência do campo aplicado. Segundo Chew e Sen, a diferença entre as correntes tangenciais de íons positivos e negativos na dupla camada não pode ser compensada pelas correspondentes correntes de condução na região neutra adjacente, pois sendo iguais as concentrações e semelhantes as mobilidades iônicas, essas correntes de condução são aproximadamente iguais para todos os íons. Essa compensação deve ocorrer através das correntes de difusão na nuvem de difusão. Eles mostram que essas correntes de difusão introduzem uma forte componente de corrente fora de fase com o campo elétrico em baixas frequências, o que incrementa a permissividade do meio. Através de sua complexa formulação encontraram que o tempo de relaxação desse processo é dado por $t=r^2/2k$, onde k é o coeficiente de difusão (um valor médio entre todos os íons) no volume

da solução. Assim, no modelo de Chew e Sen , o processo dispersivo é dependente da difusão no volume do eletrólito.

A dependência da permissividade de *tecidos* biológicos com a frequência, de 0Hz até microondas, em geral apresenta três regiões de dispersão características, chamadas de dispersão α , dispersão β e dispersão γ , conforme mostra a Figura (1.5). Essas dispersões são normalmente associadas aos processos discutidos anteriormente. Assim, a dispersão α é associada à difusão iônica superficial, a dispersão β é associada principalmente à polarização interfacial e a dispersão γ é associada à relaxação dipolar. Contudo em virtude do grande espalhamento possível nos tempos de relaxação associados a cada processo, devido aos diferentes tamanhos das partículas envolvidas (moléculas e células), pode ser que, em alguns casos, as regiões não sejam tão nitidamente definidas, na medida em que um mesmo processo pode interferir em uma faixa muito mais ampla de frequências do que aquela que normalmente lhe é atribuída.

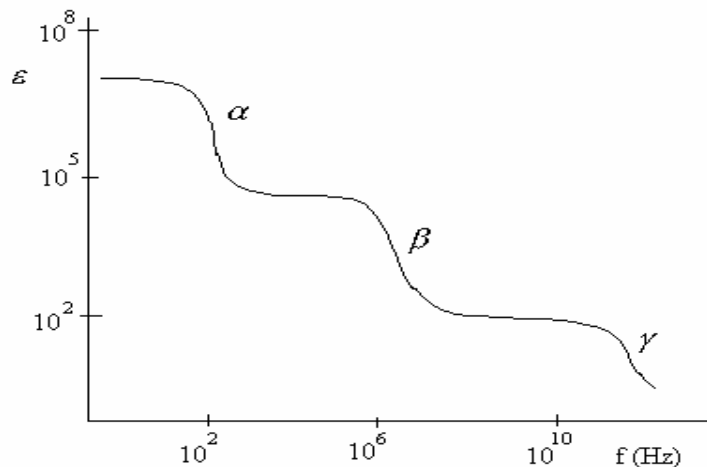


Figura 1.5 – Representação esquemática das principais regiões de dispersão dielétrica em tecidos biológicos. A dispersão α é devida à difusão iônica superficial, a dispersão β é devida à polarização interfacial e a dispersão γ é devida à relaxação dipolar.

1.3) DISTRIBUIÇÃO ESPACIAL DE CAMPO ELÉTRICO EM MEMBRANAS

Em um tecido biológico ou suspensão de células em eletrólito sujeito a um campo elétrico externo, ocorre o fenômeno de carregamento das membranas com cargas iônicas provenientes do meio condutor. Como as membranas celulares são muito delgadas, com espessuras da ordem de 10 nm, o campo elétrico resultante no interior da membrana, em geral, é bastante elevado. Uma estimativa do campo elétrico máximo na membrana celular

em um tecido pode ser obtida considerando-se que o campo elétrico médio (E_o) no meio estabelece uma diferença de potencial $\Delta V=2rE_o$ sobre uma célula, sendo r o raio da membrana. Esta diferença de potencial fica concentrada praticamente sobre as duas regiões da membrana que são perpendiculares ao campo (estamos desconsiderando a possibilidade de quedas de potencial em organelas citoplasmáticas). Assim, sobre cada região, a queda de potencial $\Delta V=rE_o$, através da espessura h da membrana estabelece o campo elétrico de intensidade $E_m=rE_o/h$. Para células de raio $10\mu\text{m}$, a proporção entre o campo máximo na membrana e o campo médio no meio é da ordem de 1000.

A distribuição detalhada de campo elétrico na membrana celular em tecidos ou suspensões muito concentradas, contudo, não pode ser obtida por métodos analíticos, em vista da complexidade geométrica do problema. Métodos numéricos são mais adequados para esse fim. Entretanto, muitos pesquisadores preferem utilizar soluções analíticas válidas para uma célula isolada na interpretação de resultados experimentais em suspensões diluídas de células. Com o aumento da concentração, a distribuição real de campo na membrana obviamente se afasta da teórica, principalmente nos pontos de maior proximidade entre células vizinhas. Consideremos o caso mais simples de uma membrana esférica isolante da raio a em um eletrólito de condutividade externa s_o e interna s_i . Quando o meio é submetido a um degrau de campo elétrico, de intensidade E_o , a diferença de potencial que resulta sobre a membrana é dada por [28] :

$$V_m = 1.5 a E_o \cos \mathbf{q} \left(1 - e^{-t/\tau} \right) \quad (1.52)$$

onde \mathbf{q} é o ângulo entre o vetor de campo elétrico aplicado e o vetor de posição na superfície da membrana onde a diferença de potencial está sendo considerada. O campo elétrico na membrana é, portanto, máximo em $\mathbf{q}=0$ e decresce para zero na medida em que $\mathbf{q} \rightarrow \pi/2$. A constante de tempo de carregamento da membrana é obtida por:

$$\tau = a C_m \left(\frac{1}{s_i} + \frac{1}{2s_o} \right) \quad (1.53)$$

onde C_m é a capacitância por unidade de área da membrana. O campo na membrana tem o comportamento típico de um processo de relaxação de primeira ordem. No domínio frequência, a sua relação com o campo aplicado $E(\mathbf{w})$ é dada por:

$$E_m(\mathbf{w}, \mathbf{q}) = 1.5 \frac{a}{h} \frac{\cos \mathbf{q}}{1 + j\mathbf{w}\tau} E(\mathbf{w}) \quad (1.54)$$

O problema equivalente de uma membrana circular bidimensional nos interessa porque é mais fácil realizar análises numéricas em duas dimensões e as soluções analíticas são usadas como referências na avaliação do erro numérico. Nessa análise usamos um método semelhante ao aplicado por Kinoshita *et al* [28]. Considerando que a densidade de carga em todo o espaço é nula, exceto sobre a membrana, podemos utilizar a equação de Laplace. Em coordenadas cilíndricas em duas dimensões, temos:

$$\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial V}{\partial r} \right) + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 V}{\partial \mathbf{q}^2} = 0 \quad (1.55)$$

A solução geral desta equação, obtida por separação de variáveis, é da forma:

$$V(r, \mathbf{q}, t) = [s_1(t) r^m + s_2(t) r^{-m}] \cdot [s_3(t) \cos(m\mathbf{q}) + s_4(t) \sin(m\mathbf{q})] \quad (1.56)$$

Onde assumimos, conforme indicado na Figura (1.6), que o sistema de coordenadas tem sua origem no centro do cilindro. Os coeficientes $s_n(t)$ são funções somente do tempo e m é uma constante. Todos esses valores desconhecidos devem ser determinados a partir das condições de contorno do problema, as quais podem ser resumidas nas seguintes relações:

$$\begin{aligned} V(r \rightarrow 0, \mathbf{q}, t) &\rightarrow \text{valor finito} \\ V(r \rightarrow \infty, \mathbf{q}, t) &= r E \cos \mathbf{q} \\ \frac{\partial q_s^+}{\partial t} &= -\mathbf{s}_0 \frac{\partial V}{\partial r}(r \rightarrow a^+) = C_m \frac{\partial}{\partial t} [V_{(r \rightarrow a^+)} - V_{(r \rightarrow a^-)}] \\ \frac{\partial q_s^-}{\partial t} &= \mathbf{s}_1 \frac{\partial V}{\partial r}(r \rightarrow a^-) = C_m \frac{\partial}{\partial t} [V_{(r \rightarrow a^-)} - V_{(r \rightarrow a^+)}] \end{aligned} \quad (1.57)$$

As duas primeiras referem-se ao valor do potencial no centro do cilindro e em pontos muito afastados do mesmo. E é a intensidade do campo elétrico uniforme aplicado a partir de eletrodos. As duas últimas descrevem a cinética de carregamento da membrana, onde a variação temporal das densidades superficiais de carga acumuladas em cada face, q_s^+ e q_s^- , é relacionada simultaneamente às correntes de condução transversais e à taxa de variação

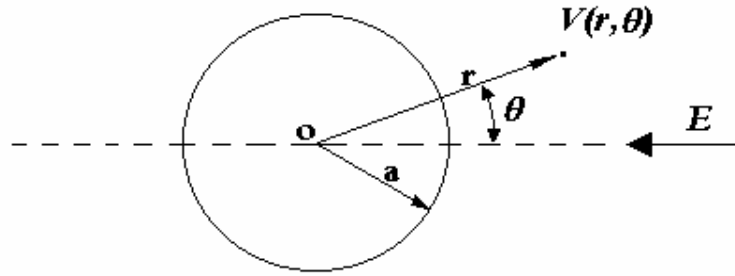


Figura 1.6 – Célula cilíndrica em um eletrólito sujeito a um campo elétrico externo.

do potencial induzido entre as faces da membrana. Sendo a membrana muito fina, podemos assumir que $q_s^+ = -q_s^-$, devido à condição de continuidade do fluxo elétrico. A notação $r@a^+$ e $r@a^-$ refere-se ao limite de $r=a+d$ e $r=a-d$ quando $d@0$.

Aplicando as condições de contorno indicadas em (1.57) e transformando as derivadas temporais para o domínio frequência, obtemos a seguinte solução para o potencial elétrico no meio:

$$V = E'' r \cos \mathbf{q} \quad \text{para } r < a \quad (1.58)$$

$$V = (Er + E' r^{-1}) \cos \mathbf{q} \quad \text{para } r > a \quad (1.59)$$

onde:

$$E' = \frac{1 + j\omega a C_m (1/\mathbf{s}_i - 1/\mathbf{s}_o)}{1 + j\omega a C_m (1/\mathbf{s}_i + 1/\mathbf{s}_o)} a^2 E(\omega) \quad (1.60)$$

$$E' = \frac{j\omega 2a C_m / \mathbf{s}_i}{1 + j\omega a C_m (1/\mathbf{s}_i + 1/\mathbf{s}_o)} E(\omega) \quad (1.61)$$

Assim, o potencial elétrico na membrana, no domínio frequência, é dado por:

$$V_m = V_{(r@a^+)} - V_{(r@a^-)} = 2a \cos \mathbf{q} \frac{E(\omega)}{(1 + j\omega \mathbf{t})} \quad (1.62)$$

onde:

$$\mathbf{t} = a C_m (1/\mathbf{s}_i + 1/\mathbf{s}_o) \quad (1.63)$$

e no domínio do tempo, se o campo externo é aplicado como um degrau de amplitude E_o , temos:

$$V_m = 2 a E_o \cos \mathbf{q} \left(1 - e^{-t/\tau}\right) \quad (1.64)$$

1.4) ELETROPERMEABILIZAÇÃO DE MEMBRANAS BIOLÓGICAS

Eletropermeabilização é o fenômeno no qual a membrana de uma célula exposta a campos elétricos de alta intensidade pode ser temporariamente desestabilizada e com isso se tornar altamente permeável aos elementos iônicos e moleculares presentes no meio líquido interno e externo à célula.

De acordo com a seção anterior, a diferença de potencial induzida na membrana de uma célula, em um tecido ou suspensão de células em eletrólito, sujeito a um campo elétrico, apresenta uma distribuição de intensidades que depende da posição na membrana em relação à direção do campo aplicado. Nos pontos de incidência perpendicular do campo na membrana, essa diferença de potencial é máxima. Para células esféricas ou cilíndricas isso acontece em $\mathbf{q}=0$ e $\mathbf{q}=\mathbf{p}$ rad, o que define dois pólos distintos, um de potencial positivo e outro negativo. Kinoshita et al [29], usando microscopia óptica de alta resolução com um corante fluorescente solúvel na membrana, demonstrou experimentalmente a distribuição angular prevista pela equação (1.52) para células esféricas e verificou a existência dos dois pólos frontais aos eletrodos usados na aplicação do campo. Observou também que para campos muito intensos, para os quais o potencial teórico de membrana segundo a equação (1.52) era maior que 1V, a distribuição de potencial na membrana se modificava significativamente em relação à forma senoidal, apresentando uma região quase plana nos pólos, com valor em torno de 1V. Isso foi interpretado como resultado do aumento acentuado da condutância elétrica da membrana na região dos pólos, onde o potencial induzido atingiu um limiar próximo de 1V. O aumento do campo a partir desse limiar é compensado pelo aumento de condutância, de modo que o potencial de membrana praticamente se mantém invariável no valor limiar.

Outros experimentos demonstraram que as membranas de células tratadas com pulsos de campo elétrico tornam-se permeáveis à moléculas de tamanho menor que um certo limite, surgindo daí o conceito de que o campo induz a formação de poros na membrana [30-34]. Esse processo foi denominado eletroporação (“electroporation” em inglês). Contudo a constatação visual da eletroporação só veio em 1990, pelos experimentos com microscopia eletrônica realizadas por Chang [35]. Nesses experimentos,

amostras de eritrócitos foram tratadas com pulsos de campo elétrico oscilante com frequência 100 kHz, duração de 0.3 ms e intensidade de 4 a 5 kV/cm. Imediatamente após um intervalo controlado de 1ms a minutos, cada amostra tratada foi imersa em uma mistura líquida de propano e etano refrigerada por nitrogênio líquido. As amostras congeladas foram então cortadas e observadas em microscópio eletrônico. Esse método permitiu capturar mudanças morfológicas transitórias na membrana celular. Observou-se que a população de poros induzidos apresentou uma distribuição de diâmetros que evolui com o tempo após a aplicação do campo. Para um intervalo de 40 ms, por exemplo, os diâmetros de poros se distribuíram entre 10 e 120nm, com a máxima frequência de poros ocorrendo em torno de 50nm. O método, contudo, tinha resolução de cerca de 2nm, o que significa que os poros muito pequenos não foram considerados. Também foi observado que após alguns segundos a partir do desligamento do campo, os poros induzidos começam a se fechar, praticamente desaparecendo após um intervalo de 10 segundos.

Teorias da eletroporação

Apesar da intensa atividade experimental com eletroporação de membranas lipídicas nas últimas décadas, não dispomos ainda de uma compreensão perfeita dos mecanismos envolvidos. Entretanto, alguns conceitos e modelos se popularizaram nos últimos anos, porque explicam de maneira relativamente simples alguns dos principais aspectos desse fenômeno:

- A) A parte lipídica da membrana plasmática é impermeável a íons e moléculas polares, tais como a água. A contribuição mais importante para essa propriedade da membrana se deve a estrutura apolar dos ácidos graxos que compõem a sua camada interna. A energia necessária para polarizar essa camada, conhecida como energia de Born, é muito elevada, quando comparada com o nível normal de energia associada com a agitação térmica do meio [36,37].
- B) Acima de uma certa temperatura crítica, muitas das ligações metileno ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$) da cadeia de hidrocarbonetos dos ácidos graxos são convertidas da conformação “trans” para “cis” [38]. Isso pode desorganizar a camada lipídica, criando defeitos na estrutura, pelos quais íons e moléculas hidrofílicas podem atravessar a membrana. Contudo, tais defeitos são estruturas altamente flutuantes. A isomerização “trans-cis” ocorre em cerca de 5ns e um defeito se desenvolve

somente se esse evento se propaga para as moléculas vizinhas, o que ocorre em microssegundos [39,40].

- C) Glaser et al. [41], a partir de um experimento com membranas planas, constataram que em resposta a pulsos de potencial elétrico de amplitude suficiente para produzir eletroporação, a condutância da membrana cresce linearmente no tempo com uma taxa que depende do potencial aplicado. Esse experimento consistiu na aplicação de três pulsos de potencial através da membrana: O primeiro e o terceiro eram de amplitudes iguais e serviam para medir a condutância da membrana. Não provocavam eletroporação. O segundo, por sua vez, era grande o suficiente para eletropermeabilizar a membrana, e sua amplitude V_t foi variada ao longo de várias repetições do teste. A corrente através da membrana foi medida no final do primeiro pulso e no início do terceiro e a diferença ΔI_m entre esses valores foi anotada para cada amplitude do segundo pulso. A dependência de taxa de variação temporal da condutância com o potencial de eletropermeabilização, na faixa de potenciais que se estende de 0.65 a 1.5 V, segue uma lei bem definida, expressa pela equação:

$$\ln\left(\frac{\Delta I_m}{\Delta t}\right) = A + B V_t^2 \quad (1.65)$$

onde Δt é a duração do pulso de eletropermeabilização e as constantes A e B têm valores da ordem de -16 e $4.8V^2$, respectivamente, para membranas de asolecitina. Na análise de seus resultados, Glaser et al. [41] propuseram o modelo que apresentamos a seguir.

- D) Poros hidrofóbicos são formados espontaneamente por movimento térmico na matriz lipídica e quando excedem um tamanho crítico, convertem-se em poros hidrofílicos pela reorientação das moléculas lipídicas, de modo que suas cabeças polares passam a formar a parede interna do poro [42,43] (Figura (1.7)).
- E) Uma barreira de energia se opõe à formação de poros hidrofílicos, porque o aumento de tamanho do poro hidrofóbico faz aumentar a sua energia livre devido à tensão interfacial entre a cadeia apolar dos lipídeos e a água. Essa energia é calculada pela expressão [41]:

$$E_o = 2\pi h r \alpha(r) \quad (1.66)$$

onde r é o raio do poro, h é espessura da membrana e α é o módulo da tensão interfacial, o qual depende do raio do poro. Se essa barreira de energia for superada

pela agitação térmica na matriz lipídica, a energia livre pode diminuir com a expansão do poro a partir desse tamanho crítico (Figura (1.8)). A variação de energia livre associada com o aparecimento de poros hidrofílicos é geralmente calculada pela expressão [42 - 45].

$$E_i = 2\mathbf{p} \mathbf{g} - \mathbf{p} r^2 \Gamma + \frac{C}{r^4} \quad (1.67)$$

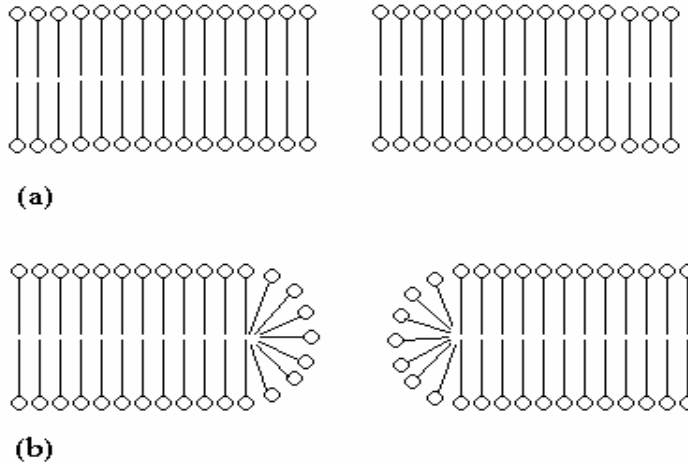


Figura 1.7 – Representação esquemática de (a) poro hidrofóbico e (b) poro hidrofílico em membranas lipídicas. O pequeno círculo representa a cabeça polar e o traço representa a cadeia de ácido graxo da molécula lipídica.

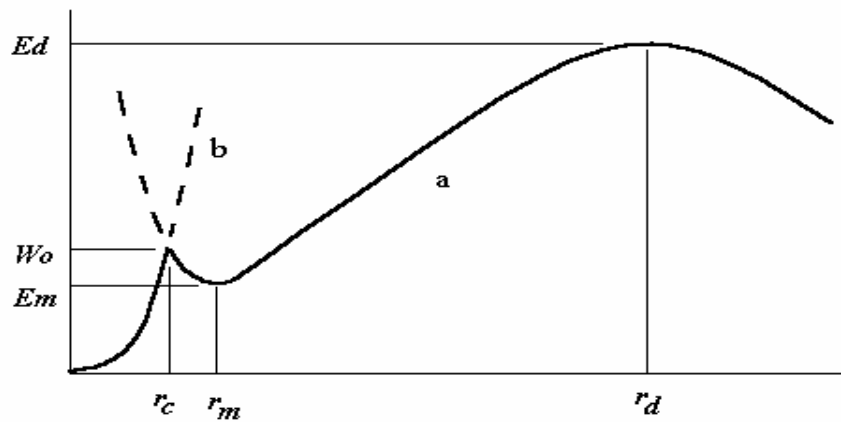


Figura 1.8 – Energia livre associada a (a) poros hidrofílicos e (b) poros hidrofóbicos. r_c é o raio crítico para transição de estado do poro, r_m é o raio de mínima energia do poro no estado hidrofílico e r_d é o raio máximo de estabilidade além do qual a membrana se rompe. W_o é barreira de energia para transição de estado. E_m e E_d são as energias mínima e máxima na região de estabilidade dos poros hidrofílicos.

Nesta equação g é a energia por unidade de comprimento do perímetro interno do poro. Essa energia se origina da tensão interfacial entre a camada lipídica e a água na parede interna do poro. Como a espessura da membrana, por simplicidade do modelo, é considerada constante no processo de formação do poro, essa parcela da energia livre varia apenas com r . G é a energia por unidade de área da membrana, também associada à tensão interfacial com a água, e que se perde pela eliminação da área de contato com o aparecimento do poro. O último termo na equação (1.67) representa a energia de repulsão entre as cabeças polares das moléculas lipídicas da parede interna do poro, sendo C uma constante. Esse termo aumenta intensamente na medida que o raio diminui, o que significa que um poro não pode encolher demais no estado hidrofílico, devendo se reestruturar na forma hidrofóbica para ocorrer o fechamento. Na intersecção entre as curvas de energia de poros hidrofóbicos e hidrofílicos define-se a barreira de energia e o raio crítico para transição de estado. Essa barreira de energia é dada por [41]:

$$W_o = 2p h r \chi(r_c) \quad (1.68)$$

- F) Poros hidrofóbicos surgem e desaparecem com a mesma frequência n de flutuação térmica da matriz lipídica. Poros hidrofílicos, por sua vez, são gerados a partir dos poros hidrofóbicos que conseguem superar a barreira de energia W_o . A taxa de geração de poros hidrofílicos, portanto, depende da frequência n e da probabilidade de um poro hidrofóbico atingir o estado de energia necessário para a transição. Essa taxa de geração pode então ser escrita na forma [41,42,44,46 - 49]:

$$G_p = \frac{A_{memb}}{a_{mol}} n \exp\left(\frac{-W_o}{kT}\right) \quad (1.69)$$

onde A_{memb} e a_{mol} são a área da membrana e a área ocupada por uma molécula lipídica, respectivamente.

- G) A barreira de energia W_o , contudo, pode ser reduzida com a aplicação de uma diferença de potencial entre as faces da membrana. Um dielétrico polarizado por um campo elétrico aplicado armazena energia cuja densidade volumétrica pode ser calculada a partir do trabalho realizado na criação e /ou orientação dos dipolos elétricos naquela amostra. Essa densidade de energia depende do produto escalar do campo aplicado (E) com o vetor de polarização do meio (P), segundo a expressão [50]:

$$u = -\frac{1}{2} P.E \quad (1.70)$$

Para um material linear e isotrópico, o vetor de polarização é proporcional ao campo aplicado, $P = \mathbf{c} E$, onde a constante \mathbf{c} é denominada susceptibilidade elétrica e está relacionada à permissividade elétrica do meio através da relação [51]: $\mathbf{e} = \mathbf{e}_o + \mathbf{c}$. A variação de energia eletrostática na membrana quando um poro hidrofílico surge, pode ser calculada pela diferença de energia, no volume do poro, quando a matriz lipídica é substituída por água. Isso resulta em:

$$W_e = -\frac{1}{2} (\mathbf{c}_w - \mathbf{c}_m) E_m^2 \mathbf{p} r^2 h = -\frac{1}{2} \mathbf{e}_o (\mathbf{e}_w - \mathbf{e}_m) E_m^2 \mathbf{p} r^2 h \quad (1.71)$$

onde E_m é o campo no interior da membrana e \mathbf{e}_w e \mathbf{e}_m são as permissividades relativas da água e da matriz lipídica, respectivamente. Substituindo o campo E_m pela sua relação com o potencial de membrana ($E_m = V_m/h$), a equação (1.71) pode ser reescrita em função do potencial e da capacitância de membrana ($C_m = \mathbf{e}_m \mathbf{e}_o/h$):

$$W_e = -\frac{1}{2} C_m \left(\frac{\mathbf{e}_w}{\mathbf{e}_m} - 1 \right) \mathbf{p} r^2 V_m^2 \quad (1.72)$$

Sendo $\mathbf{e}_w > \mathbf{e}_m$, percebe-se que a contribuição da energia eletrostática tem o sentido de reduzir a energia livre do poro, o que reduz a barreira de potencial para a geração de poros hidrofílicos. A taxa de geração dada pela equação (1.69) pode agora ser reescrita em função do potencial de membrana:

$$\ln G_p = \ln \left(\frac{A_{memb}}{a_{mol}} \mathbf{n} \right) - \frac{W_o}{kT} + \frac{C_m \left(\frac{\mathbf{e}_w}{\mathbf{e}_m} - 1 \right) \mathbf{p} r_c^2}{2kT} V_m^2 = a + b V_m^2 \quad (1.73)$$

as constantes a e b são definidas pelas equações:

$$a = \ln \left(\frac{A_{memb}}{a_{mol}} \mathbf{n} \right) - \frac{W_o}{kT} \quad (1.74)$$

$$b = \frac{C_m \left(\frac{\mathbf{e}_w}{\mathbf{e}_m} - 1 \right) \mathbf{p} r_c^2}{2kT} \quad (1.75)$$

A equação (1.73) é totalmente coerente com o resultado experimental expresso na equação (1.65). Glaser et al. [41], aplicando as equações (1.74) e (1.75) aos seus resultados experimentais, obtiveram valores diferentes para r_c , 0.3 e 0.5 nm. Considerando a precisão experimental e limitações dos modelos matemáticos, os autores concluíram que esses valores concordam entre si. Pelo fato dos coeficientes

a e b referirem-se a aspectos completamente diferentes do processo de formação de poros, essa concordância suporta o modelo proposto.

- H) Pastushenko et al. [52] e Weaver e Barnet [46,47] propuseram que a evolução de poros hidrofílicos pode ser teoricamente descrita como um processo de transporte através de condução e difusão de poros em um espaço unidimensional associado ao raio do poro. Eles definiram uma variável densidade de poros $n(r,t)$ de modo que $n(r,t) dr$ fornece o número de poros com raio entre r e $r+dr$ no instante t . Definiram também o fluxo de poros como tendo uma componente de difusão relacionada ao movimento térmico da matriz lipídica e uma componente de condução associada à energia livre do poro. Esse fluxo é descrito pela equação:

$$\mathbf{f}_n = -\mathbf{k}_p \left(\frac{\partial n}{\partial r} + \frac{n}{kT} \frac{dE}{dr} \right) \quad (1.76)$$

Onde \mathbf{k}_p é o coeficiente de difusão e E é a energia livre de poros hidrofílicos. Essa energia, segundo as equações (1.67) e (1.72), pode ser escrita na forma:

$$E = E_i(r) - \frac{1}{2} \mathbf{p} r^2 C V_m^2 \quad (1.77)$$

onde $C = C_m \left(\frac{e_w}{e_m} - 1 \right)$.

Considerando que no intervalo $r_c < r < r_d$ (ver figura (1.8)) não deve haver geração ou eliminação de poros, pode-se aplicar a equação de continuidade para relacionar $n(r,t)$ e \mathbf{f}_n :

$$\frac{\partial n}{\partial t} = -\frac{\partial \mathbf{f}_n}{\partial r} \quad (1.78)$$

Substituindo \mathbf{f}_n da equação (1.76), obtêm-se a equação diferencial que descreve a evolução temporal da distribuição de poros:

$$\frac{\partial n}{\partial t} = \mathbf{k}_p \left(\frac{\partial^2 n}{\partial r^2} + \frac{1}{kT} \frac{\partial n}{\partial r} \frac{dE}{dr} + \frac{n}{kT} \frac{d^2 E}{dr^2} \right) \quad (1.79)$$

Essa equação foi usada para avaliar teoricamente o tempo de vida [52] e o transporte iônico e molecular [46,47] em membranas lipídicas planas eletropermeabilizadas.

- I) DeBruin e Krassowska [45,53,54] propuseram que a equação (1.73) descreve a taxa de geração de poros mas exige um termo adicional que permita descrever um estado de regime permanente da membrana. Segundo a equação (1.73) o número de poros aumenta sempre, mesmo para $V_m=0$. Qualquer membrana descrita por essa

equação seria instável e sofreria ruptura, mesmo sem polarização elétrica. Para obter uma descrição realista em intervalos longos de tempo, as pesquisadoras propuseram um modelo no qual a taxa de variação do número total de poros por unidade de área da membrana é dada por G_p multiplicada por um termo que sempre se anula em regime permanente, isto é:

$$\frac{dN}{dt} = a \exp(bV_m^2) \left(1 - \frac{N}{N_{eq}}\right) \quad (1.80)$$

onde N_{eq} é a densidade total de poros em equilíbrio. Esse valor é calculado assumindo-se uma distribuição estacionária de densidade de poros $n(r)$ na forma da Lei de Boltzmann:

$$n(r) = A \exp\left(\frac{-E(r, V_m)}{kT}\right) \quad (1.81)$$

Essa hipótese é consistente com o modelo de fluxo de poros definido anteriormente, pois quando essa distribuição é aplicada à equação (1.76), resulta em um fluxo nulo. Assumindo adicionalmente que a energia $E(r, V_m)$ tem um mínimo em $r=r_m$ (ver Figura (1.8)), e que os poros tendem a ajustar seus tamanhos a fim de minimizar suas energias, então no estado de equilíbrio todos os poros devem se situar próximos desse ponto. Isso leva à seguinte densidade total de poros:

$$N_{eq} = A \exp\left(\frac{-E(r_m, V_m)}{kT}\right) \quad (1.82)$$

Usando a equação (1.77) para substituir a energia $E(r_m, V_m)$, obtém-se:

$$N_{eq} = N_o \exp(qbV_m^2) \quad (1.83)$$

onde N_o , a densidade total de poros em equilíbrio na membrana não polarizada e a constante q , são dadas por:

$$N_o = A \exp\left(\frac{-E_i(r_m)}{kT}\right) \quad (1.84)$$

$$q = \left(\frac{r_m}{r_c}\right)^2 \quad (1.85)$$

- J) A condutância de um poro em uma membrana lipídica é uma função do potencial aplicado, o que significa que os poros gerados por eletropermeabilização conferem à membrana um comportamento não ôhmico. Isso se deve à existência de uma barreira de potencial para os íons que atravessam a membrana. Os íons polarizam o

meio constituído de moléculas de água e da membrana. Devido a permissividade da matriz lipídica ser menor que a da água, surge nas paredes do poro uma carga de polarização de sinal igual ao íon que gerou a polarização do meio, produzindo então um potencial repulsivo. Essa barreira se soma à diferença de potencial aplicada, resultando uma distribuição de potencial bastante complexa através da membrana.

Glaser et al. [41], DeBruin e Krassowska [45,54] e Barnet [55], analisaram a relação corrente – potencial na membrana plana, assumindo diversas simplificações que permitiram a obtenção de uma solução analítica para a equação de Nernst-Planck (equação (1.11)) no caso unidimensional. A principal simplificação dizia respeito à distribuição de potencial dentro do poro, que foi assumida como sendo linear por segmentos, conforme mostra a Figura (1.9). Para um íon de mobilidade m na água e concentrações de carga r_a na face positiva da membrana e r_b na face negativa, a relação corrente-potencial em um poro de raio r e comprimento h pode ser expressa na forma:

$$I_i = \frac{pr^2 m}{h} V_m \frac{r_a \exp(V_m / v_i) - r_b}{A \exp(V_m / v_i) - B} \quad (1.86)$$

onde A e B são funções do potencial aplicado e são definidas pelas expressões:

$$A = \frac{w_o \exp\left(\frac{w_o - pV_m}{v_i}\right) - pV_m}{w_o - pV_m} \quad (1.87)$$

$$B = \frac{w_o \exp\left(\frac{w_o + pV_m}{v_i}\right) + pV_m}{w_o + pV_m} \quad (1.88)$$

onde v_i é uma constante característica de cada íon e relaciona o coeficiente de difusão com a mobilidade do íon, sendo dada por $v_i = kT/ez_i$. w_o é altura da barreira de potencial em equilíbrio no poro e $p = d/h$ é um parâmetro relacionado ao perfil dessa barreira nas extremidades do poro.

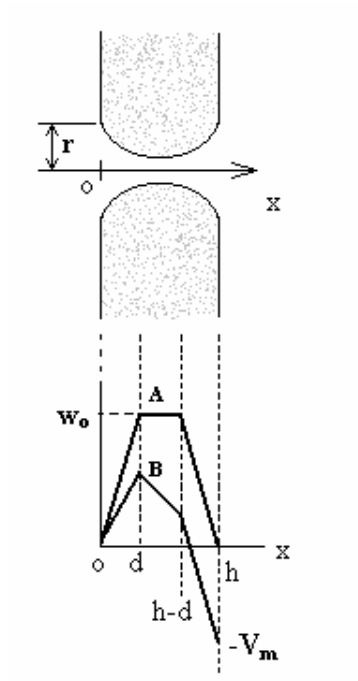


Figura 1.9 – Distribuição simplificada de potencial em um poro. (A) sem potencial aplicado e com barreira de potencial W_0 . (B) com potencial aplicado (V_m) a barreira de potencial diminui [41].

CAPÍTULO 2 - O MÉTODO DO CIRCUITO EQUIVALENTE

Neste capítulo apresentamos o método de análise elétrica por simulação numérica baseado no circuito equivalente do meio, ou simplesmente método do circuito equivalente (MCE). Ele foi desenvolvido especialmente para facilitar a modelagem e análise de resultados na simulação de problemas de estimulação elétrica de materiais biológicos.

Diferentemente de métodos tradicionais de cálculo de campo baseados na solução direta das equações de campo de Maxwell, o MCE focaliza os processos de transporte elétrico no meio, utilizando a equação de continuidade e a teoria de circuitos elétricos para obter, a partir de modelos matemáticos apropriados para os processos de transporte, um sistema de equações algébricas para a distribuição de potenciais elétricos num espaço discretizado de elementos de volume.

O MCE tem duas abordagens distintas que se complementam na análise de material biológico. Quando se deseja obter informações sobre a distribuição local de potencial elétrico, densidade de carga e correntes iônicas em torno da membrana plasmática ou outras estruturas sub-celulares, adota-se a estratégia de representar o meio com um número mínimo de células necessário para reproduzir o ambiente de uma célula envolvida por suas vizinhas mais próximas. A malha de discretização espacial deve ter resolução compatível com as pequenas dimensões envolvidas e os modelos de transporte elétrico usados devem levar em conta a anisotropia resultante da grande diferença de permissividade e condutividade elétrica entre o meio líquido e as membranas lipídicas. Essa abordagem de alta resolução espacial é denominada *modelo em escala celular*. Por outro lado, quando se deseja analisar grandes porções de tecido, a malha de discretização deve ter resolução muito menor e cada elemento de volume envolverá possivelmente um grande número de células. Nesse caso, as propriedades de transporte do meio são representadas por valores médios tomados sobre grandes volumes e a análise fornece apenas as distribuições de potencial elétrico e corrente total. Essa abordagem é denominada *modelo em escala de tecido*.

Em ambos os casos, os processos de transporte são modelados usando-se elementos concentrados de circuito, como capacitâncias, condutâncias e fontes de corrente. Esse recurso facilita a montagem do sistema de equações e a especificação de condições de contorno e de continuidade nas interfaces. Além disso, a

implementação prática de algoritmos e a própria análise de resultados ficam muito simplificadas para aqueles familiarizados com a teoria de circuitos elétricos.

O MCE reúne várias estratégias bem sucedidas de outros métodos: A transformação de equações diferenciais em expressões algébricas como no método das diferenças finitas (FDM) [56,57], a solução de equações integrais pela técnica de integração finita [58] e o uso de circuitos equivalentes com parâmetros concentrados como no método de impedância quase estática [17,59,60] e modelagem por linha de transmissão (TLM)[61].

2.1) FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1.1) Equações de Transporte no Espaço Contínuo

Iniciaremos considerando a origem da equação de continuidade e da lei das correntes de Kirchhoff, as quais formam a base teórica do MCE. Consideremos duas das equações de Maxwell: a lei de Ampere, expressa por:

$$\nabla \times H = J_q + \frac{\partial D}{\partial t} \quad (2.1)$$

e a lei de Gauss, dada por:

$$\nabla \cdot D = \mathbf{r} \quad (2.2)$$

Nestas equações H é o campo magnético, J_q é a densidade de corrente relativa ao movimento de partículas eletricamente carregadas, D é a indução elétrica e \mathbf{r} é a densidade de carga. O último termo em (2.1) é conhecido como densidade de corrente de deslocamento (J_d). A equação de continuidade pode ser obtida aplicando-se o operador divergente em ambos os lados de (2.1), usando a identidade vetorial $\nabla \cdot \nabla \times H = 0$ e fazendo a substituição de $\nabla \cdot D$ a partir da lei de Gauss. Desse modo obtém-se:

$$\nabla \cdot J_q = -\frac{\partial \mathbf{r}}{\partial t} \quad (2.3)$$

Podemos interpretar o significado físico desta equação recorrendo ao conceito associado ao operador divergente, o qual fornece a densidade volumétrica de fluxo de um campo vetorial. Se $\nabla \cdot J_q$ é não nulo em algum pequeno volume do espaço, então, o fluxo de carga entrando nesse volume é maior que o fluxo saindo, ou vice-versa. Isso faz com que a densidade de carga no volume varie no tempo com a taxa dada por (2.3).

Contudo a equação de continuidade torna-se mais útil para nós em um outro formato, quando definimos a densidade de corrente total como sendo a soma da densidade de corrente de carga J_q com a densidade de corrente de deslocamento J_d , ou seja:

$$J_T = J_q + \frac{\partial D}{\partial t} = J_q + J_d \quad (2.4)$$

Assim, a equação de continuidade resulta em:

$$\nabla \cdot J_T = 0 \quad (2.5)$$

Essa equação pode ser interpretada fisicamente como a forma diferencial da lei das correntes de Kirchhoff, pois ela expressa que a corrente total que sai de um volume é sempre exatamente igual à corrente total que entra.

A corrente total em um meio qualquer pode ser expressa como uma soma de parcelas devidas a três processos: condução, difusão e deslocamento. Usando a equação (1.10) podemos representar J_T por meio da seguinte expressão:

$$J_T = \sum_i -m_i \mathbf{r}_i \nabla V - \mathbf{k}_i \nabla r_i + \frac{\partial D}{\partial t} \quad (2.6)$$

onde ∇V e $\nabla \mathbf{r}$ são os gradientes de potencial e de densidade de carga, respectivamente, e o somatório deve ser aplicado a todos os tipos de transportadores de carga do meio.

2.1.2) Equações de Transporte no Espaço Discreto

Consideremos agora um espaço constituído por blocos com a forma de paralelepípedos, conforme mostra a Figura (2.1a). Assumimos que os menores volumes que podem ser representados nesse espaço são os volumes dos próprios blocos, ou seja, o espaço é discretizado. A posição de cada bloco é identificada pelas coordenadas de seu centro geométrico. O conjunto de pontos associados aos centros dos blocos pode ser descrito por um sistema discreto de coordenadas. Cada ponto nesse espaço discreto é denominado um nó do sistema. Cada bloco comunica-se com seus vizinhos mais próximos através de uma face comum, com uma área definida, e ao longo de um comprimento definido. Isso é representado na Figura (2.1b) pelos símbolos A e L , respectivamente.

Desejamos obter a corrente total que atravessa uma face qualquer entre dois blocos no espaço discreto e para isso calculamos o fluxo da densidade de corrente total J_T na área dessa face. Como não conhecemos *a priori* as distribuições espaciais de corrente e potencial, usamos as aproximações que a densidade de corrente se distribui uniformemente na área da face e que o potencial elétrico varia linearmente entre os nós. Supomos que os

erros decorrentes dessas aproximações se anulam na medida em que a área da face e a distância entre os nós tendam a zero.

Assim, a corrente de deslocamento entre dois nós é dada por:

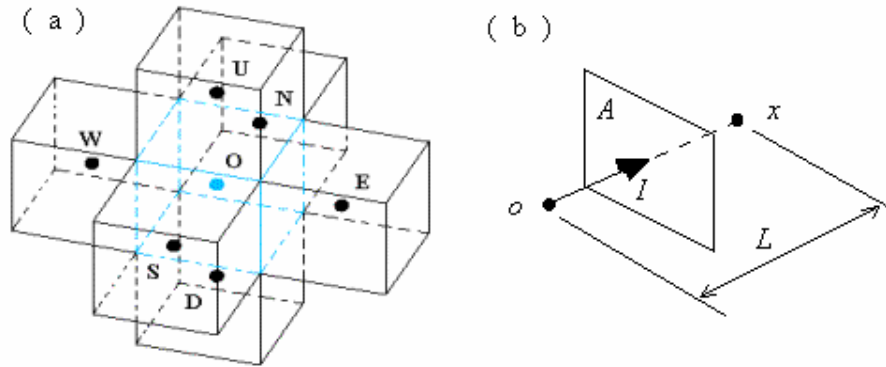


Figura 2.1 – (a) Representação de um espaço discreto por meio de blocos de volume. Os pontos nos centros dos blocos são denominados nós do sistema e são identificados por um sistema discreto de coordenadas. (b) detalhe de uma face comum entre dois blocos com o fluxo de corrente indicado por I .

$$I_d = \int_A J_d \cdot ds = \frac{d}{dt} \int_A D \cdot ds = \mathbf{e} \frac{d}{dt} \int_A E \cdot ds = \mathbf{e} \frac{d}{dt} \left(\frac{\Delta V}{L} A \right) \quad (2.7)$$

onde $\Delta V = V_o - V_x$ é a diferença de potencial entre os nós e a permissividade foi considerada constante dentro do volume definido por A e L . A equação (2.7) pode ser reescrita na forma de uma equação de circuito elétrico, com a definição da capacitância da conexão:

$$c = \mathbf{e} \frac{A}{L} \quad (2.8)$$

e desse modo, temos:

$$I_d = c \frac{d}{dt} (\Delta V) \quad (2.9)$$

ou seja, a corrente de deslocamento entre dois blocos adjacentes pode ser calculada como sendo a corrente em um capacitor de placas paralelas.

A corrente de transporte de carga deve ser calculada de modo semelhante. Usando a equação (1.11), temos:

$$I_{qi} = \int_A J_{qi} \cdot ds = J_{qi} A = -A \mathbf{m} v_i e^{-V/v_i} \frac{d}{dl} (\mathbf{r}_i e^{V/v_i}) \quad (2.10)$$

onde dl é um comprimento diferencial na direção do segmento de reta que une os dois nós. A fim de resolver essa equação, multiplicamos ambos os lados por $\exp(V/v_i)$ e calculamos a integral de linha ao longo desse segmento:

$$I_{qi} \int_0^x e^{V/v_i} dl = -A m_i v_i \int_0^x d(r_i e^{V/v_i}) \quad (2.11)$$

Para um potencial linearmente variável ao longo do segmento de reta, temos:

$$V = V_o - \Delta V \frac{l}{L} \quad (2.12)$$

onde l é o comprimento medido em relação ao nó o . Substituindo a equação (2.12) em (2.11) e resolvendo as integrais, obtemos:

$$I_{qi} = m_i \frac{A}{L} \Delta V \frac{r_{io} e^{\Delta V/v_i} - r_{ix}}{e^{\Delta V/v_i} - 1} \quad (2.13)$$

desejamos reescrever esta equação em função da densidade média de carga $r_{im} = (r_{io} + r_{ix})/2$ e da diferença de densidade $\Delta r_i = r_{io} - r_{ix}$. Substituímos então as densidades r_{io} e r_{ix} na equação (2.13) pelas expressões:

$$r_{io} = r_{im} + \frac{1}{2} \Delta r_i \quad (2.14)$$

$$r_{ix} = r_{im} - \frac{1}{2} \Delta r_i \quad (2.15)$$

e isso resulta em:

$$I_{qi} = m_i r_{im} \frac{A}{L} \Delta V + k_i \frac{A}{L} \frac{1}{2} \frac{\Delta V}{v_i} \frac{e^{\Delta V/v_i} + 1}{e^{\Delta V/v_i} - 1} \Delta r_i \quad (2.16)$$

nesta transformação algébrica usamos a relação $k_i = v_i m_i$. Devido a dependência linear com ΔV , associamos o primeiro termo do segundo membro nesta equação com a corrente de condução. Definimos então a condutância da conexão pela expressão:

$$g_i = m_i r_{im} \frac{A}{L} \quad (2.17)$$

O segundo termo, por sua vez, depende da diferença de densidade de carga entre os dois nós e por isso é identificado com a corrente de difusão. Entretanto, observa-se a dependência desse termo também com a diferença de potencial. Reunindo a expressão dependente de ΔV em uma única variável, definimos o fator f pela equação:

$$f_i = \frac{1}{2} \frac{\Delta V}{v_i} \frac{e^{\Delta V/v_i} + 1}{e^{\Delta V/v_i} - 1} \quad (2.18)$$

e o interpretamos como um fator de compensação para o erro de discretização. Observamos que $f \rightarrow 1$ quando $\Delta V \rightarrow 0$, ou seja, quando a malha discreta tende ao espaço contínuo e o erro naturalmente tende a zero. Definimos, então, o coeficiente de difusão da conexão pela expressão:

$$k_i = f_i \mathbf{k}_i \frac{A}{L} \quad (2.19)$$

e a corrente associada ao movimento de cargas, de acordo com a equação (2.16), pode ser expressa na forma:

$$I_{qi} = g_i \Delta V + k_i \Delta \mathbf{r}_i \quad (2.20)$$

Assim, a corrente total entre dois blocos no espaço discreto é dada por:

$$I_T = \sum_i (g_i \Delta V + k_i \Delta \mathbf{r}_i) + c \frac{d}{dt}(\Delta V) \quad (2.21)$$

2.2) O MODELO EM ESCALA CELULAR

Modelo em escala celular é o nome adotado para descrever a abordagem de alta resolução do método do circuito equivalente. Ele é totalmente baseado na descrição precedente sobre os processos de transporte elétrico no espaço discreto. Essa abordagem também inclui uma estratégia para minimizar o tamanho do sistema de equações finais a resolver e consiste em discretizar um pequeno volume de material que contenha apenas algumas poucas células, suficiente para representar uma célula “alvo” envolvida por suas células vizinhas mais próximas. A célula alvo é assim designada porque todos os cálculos de potenciais, correntes e campos representativos do meio contínuo, são realizados dentro do volume ocupado por essa célula.

2.2.1) Circuito Equivalente Local

A Figura (2.2) apresenta o circuito equivalente para o transporte elétrico em um espaço discreto, de acordo com a equação (2.21). As definições de condutância e capacitância são as convencionais da teoria de circuitos elétricos. A fonte de corrente, por outro lado, representa a corrente de difusão, uma parcela da corrente total que no espaço contínuo não dependeria diretamente do potencial entre os nós. Embora no espaço discreto essa parcela dependa do potencial através do fator f , mantemos essa representação por uma questão de simplicidade e por não ter qualquer inconveniente na aplicação do método proposto para solução do circuito equivalente do meio.

Os índices o e x foram acrescentados na representação dos parâmetros c , g_i e k_i na Figura (2.2) a fim de permitir a identificação do ramo de conexão. O símbolo x representa qualquer um dos nós conectados ao nó o na Figura (2.1a). Usando essa notação e aplicando a Lei das Correntes de Kirchhoff a esse nó, obtemos:

$$\sum_i \sum_x I_{qiox} + \sum_x c_{ox} \frac{d}{dt} (\Delta V_{ox}) = 0 \quad (2.22)$$

onde:

$$I_{qiox} = g_{iox} \Delta V_{ox} + k_{iox} \Delta r_{iox} \quad (2.23)$$

e o somatório em x se estende a todos os nós conectados ao nó o .

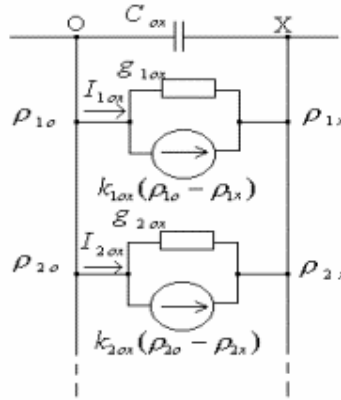


Figura 2.2 – Circuito equivalente entre dois nós do espaço discreto. As condutâncias e fontes de corrente representam as parcelas de corrente de condução e difusão, respectivamente, para cada tipo de transportador de carga móvel. A capacitância representa a corrente de deslocamento. Nos nós do circuito equivalente são especificadas as concentrações de cada transportador de carga.

A forma integrada no tempo da equação (2.22) será útil na solução iterativa do circuito equivalente. Em um pequeno intervalo de tempo δt , as variações de carga de cada tipo de íon e a variação de carga total em cada nó são dadas, respectivamente, por:

$$dQ_{io} = - \sum_x I_{qiox} dt \quad (2.24)$$

$$dQ_o = - \sum_i \sum_x I_{qiox} dt \quad (2.25)$$

O sinal negativo é devido a convenção adotada de considerar positiva a corrente que sai do nó. Então, a integração da equação (2.22) resulta na seguinte importante relação entre potenciais e carga em cada nó do circuito equivalente:

$$\sum_x c_{ox} d(V_o - V_x) = dQ_o \quad (2.26)$$

e se a capacitância c_{ox} for constante no tempo, essa equação pode ser reescrita na forma de uma relação entre as variáveis totais:

$$\sum_x c_{ox} (V_o - V_x) = Q_o \quad (2.27)$$

2.2.2) Método de Análise Usando o Modelo em Escala Celular

Após a discretização, o sistema de equações de nós (equação (2.27)) e as integrais finitas de carga (equações (2.24) e (2.25)), devem ser resolvidas, a partir de condições iniciais e de contorno especificadas. Esse procedimento fornece as distribuições de potencial elétrico e densidades de carga no volume da célula alvo, permitindo análises detalhadas com alta resolução espacial.

A fim de discutirmos um método de solução utilizando o modelo em escala celular, expandimos o somatório na equação (2.27) para um caso particular de uma malha regular onde cada nó está conectado no máximo a seis vizinhos mais próximos, conforme mostrado na Figura (2.1a). Nesse caso temos:

$$(c_{ON} + c_{OS} + c_{OW} + c_{OE} + c_{OU} + c_{OD})V_O - c_{ON}V_N - c_{OS}V_S - c_{OW}V_W - c_{OE}V_E - c_{OU}V_U - c_{OD}V_D = Q_O \quad (2.28)$$

Cada nó do circuito equivalente do meio será representado por uma equação desse tipo. Com essa representação, obtemos então um sistema de N equações lineares, onde N é o número total de nós, com N variáveis que são os potenciais de nó. Esse sistema pode ser representado com notação matricial na seguinte forma:

$$CV = Q + F \quad (2.29)$$

Nesta equação V é um vetor de potenciais de nó, Q é um vetor de carga total em cada nó e F é o vetor que descreve as fontes de potencial que excitam o meio. Todos comportam N elementos. C é a matriz das capacitâncias. Essa matriz tem dimensão N x N e seus elementos são formados por combinações das capacitâncias de conexão.

Para discutir detalhadamente a constituição de cada um dos termos da equação (2.29) precisamos especificar o modo de identificação dos nós. Cada nó ocupa uma posição específica no espaço discreto e é identificado por um número inteiro contado a partir da origem. Isso é mostrado na Figura (2.3) para uma malha regular definida com 20 divisões no eixo z e 20 no eixo y, totalizando 400 nós no plano yz.

Os vetores de potencial e carga são então definidos por:

$$V = \begin{pmatrix} V_1 \\ V_2 \\ V_3 \\ \dots \\ V_N \end{pmatrix} \quad \text{e} \quad Q = \begin{pmatrix} Q_1 \\ Q_2 \\ Q_3 \\ \dots \\ Q_N \end{pmatrix}$$

Para entendermos a estrutura dos vetores F e C , consideremos a aplicação da equação (2.28) a alguns nós do esquema mostrado na Figura (2.3). Para o nó 422, por exemplo, a equação (2.28) toma a seguinte forma:

$$\begin{aligned} & (c_{422,421} + c_{422,423} + c_{422,22} + c_{422,822} + c_{422,402} + c_{422,442})V_{422} \\ & - c_{422,421}V_{421} - c_{422,423}V_{423} - c_{422,22}V_{22} - c_{422,822}V_{822} \\ & - c_{422,402}V_{402} - c_{422,442}V_{442} = Q_{422} \end{aligned} \quad (2.30)$$

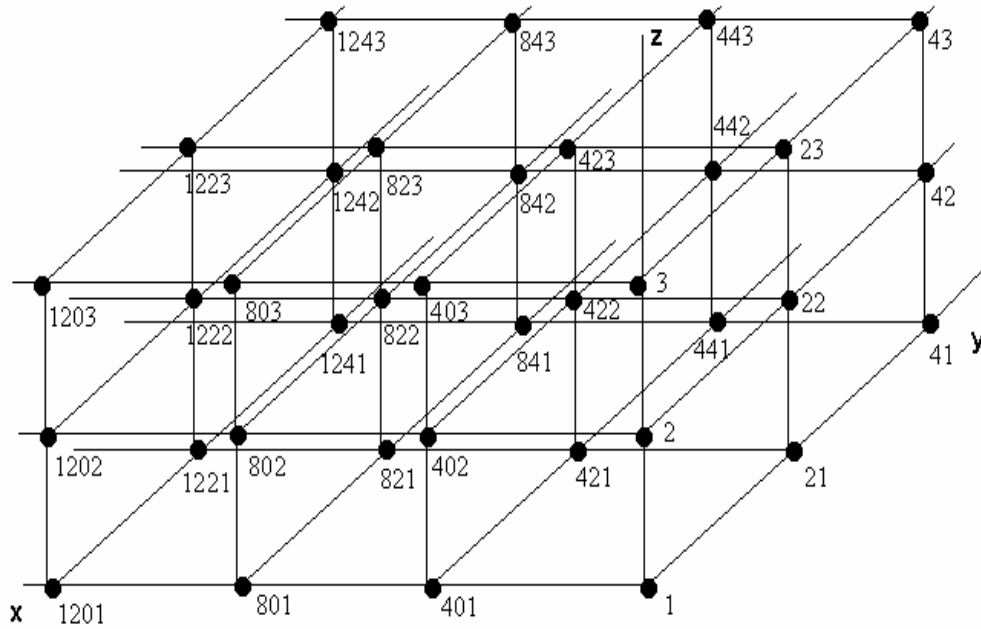


Figura 2.3 – Exemplo de uma malha regular tridimensional de nós com 20 divisões nos eixos z e y , totalizando 400 nós em cada plano yz . A numeração dos nós é feita seguindo o eixo z , y e x respectivamente.

onde os índices conjugados n_1, n_2 indicam os nós conectados pelo capacitor correspondente.

Concluimos que a linha 422 da matriz C é formada pelos elementos:

$$\begin{aligned} C_{22} &= -c_{422,22} & C_{402} &= -c_{422,402} & C_{421} &= -c_{422,421} \\ C_{422} &= c_{422,421} + c_{422,423} + c_{422,22} + c_{422,822} + c_{422,402} + c_{422,442} \\ C_{423} &= -c_{422,423} & C_{442} &= -c_{422,442} & C_{822} &= -c_{422,822} \end{aligned}$$

onde o índice dos elementos indica a posição na linha. Os demais elementos nessa linha são nulos. Em uma malha regular tal como aquela mostrada na Figura (2.3), existem relações definidas entre as posições dos nós envolvidos em cada equação de nó do circuito. Se o número de nós nos eixos x , y e z é N_x , N_y e N_z , respectivamente, então no plano yz existem $N_{yz} = N_y N_z$ nós e o sistema completo possui $N = N_x N_y N_z$ nós. Então a linha l da matriz C , onde l varia de 1 a N , é formada pelos seguintes elementos não nulos:

$$\begin{aligned}
C_{l-N_{yz}} &= -c_{l,l-N_{yz}} & C_{l-N_z} &= -c_{l,l-N_z} & C_{l-1} &= -c_{l,l-1} \\
C_l &= c_{l,l-N_{yz}} + c_{l,l-N_z} + c_{l,l-1} + c_{l,l+1} + c_{l,l+N_z} + c_{l,l+N_{yz}} \\
C_{l+1} &= -c_{l,l+1} & C_{l+N_z} &= -c_{l,l+N_z} & C_{l+N_{yz}} &= -c_{l,l+N_{yz}}
\end{aligned}$$

Isso se aplica integralmente para um nó envolvido por seis vizinhos. No caso de nós localizados sobre as superfícies de contorno do volume analisado, algumas conexões não existirão, e alguns dos elementos C_j mostrados acima serão nulos. O nó 802 no plano xy da Figura (2.3), por exemplo, faz apenas 5 conexões e o nó 801 no eixo x , apenas 4. O esquema abaixo representa genericamente a matriz C para o sistema da Figura (2.3).

$$\begin{array}{cccccc}
& 1 & 2 & 3\dots & 21\dots & 401\dots \\
& \downarrow & \downarrow & \downarrow & \downarrow & \downarrow \\
1 \rightarrow & \sum_j c_{1,j} & -c_{1,2} \dots & 0\dots & -c_{1,21} \dots & 0\dots & -c_{1,401} \dots & 0\dots \\
2 \rightarrow & -c_{21} & \sum_j c_{2,j} & -c_{2,3} \dots & 0\dots & -c_{2,22} \dots & 0\dots & -c_{2,402} \dots & 0\dots \\
\dots & & & & & & & & \\
l \rightarrow & 0\dots & -c_{l,l-N_{yz}} \dots & 0\dots & -c_{l,l-N_z} \dots & 0\dots & -c_{l,l-1} & \sum_j c_{l,j} & -c_{l,l+1} \dots & 0\dots & -c_{l,l+N_z} \dots & 0\dots & -c_{l,l+N_{yz}} \dots & 0\dots \\
\dots & & & & & & & & & & & & & & \\
N \rightarrow & & & & & & & \dots & 0\dots & -c_{N,N-N_{yz}} \dots & 0\dots & -c_{N,N-N_z} \dots & 0\dots & -c_{N,N-1} & \sum_j c_{N,j}
\end{array}$$

Consideremos agora a estrutura do vetor F . Supomos que todos os nós no plano yz em $x=0$ estão conectados a um potencial aplicado de valor V_F . Nesse caso, para qualquer nó nesse plano, a equação de nó inclui o termo $-c_F V_F$ no lado esquerdo, onde c_F é a capacitância de acoplamento de fonte. Por exemplo para o nó 1, temos:

$$(c_{1,2} + c_{1,21} + c_{1,401} + c_F) V_1 - c_{1,2} V_2 - c_{1,21} V_{21} - c_{1,401} V_{401} - c_F V_F = Q_1 \quad (2.31)$$

De modo geral, como temos total liberdade na escolha de valores adequados para c_F , podemos considerar a inclusão de um termo $-c_{Fn} V_{Fn}$ em cada equação de nó no circuito (n identifica o nó), independentemente desse nó estar ligado ou não a uma fonte real. Naqueles nós não conectados a uma fonte de potencial, simplesmente fazemos $c_{Fn} = 0$.

Então, reescrevemos todas as equações de nó com o termo $c_{Fn} V_{Fn}$ no lado direito e definimos o vetor F da seguinte forma:

$$F = \begin{pmatrix} c_{F1} V_{F1} \\ c_{F2} V_{F2} \\ c_{F3} V_{F3} \\ \dots \\ c_{FN} V_{FN} \end{pmatrix}$$

Tendo todos os termos da equação (2.29) sido definidos, a solução para o potencial em cada nó do circuito pode ser obtida multiplicando-se ambos os lados dessa equação por C^{-1} , o que resulta em:

$$V = C^{-1}(Q + F) \quad (2.32)$$

Segundo as equações (2.24) e (2.25), a carga total por nó e as densidades individuais de cada íon variam no tempo e portanto devem ser atualizadas a cada passo de duração δt , através das expressões:

$$r_{in}^k = r_{in}^{k-1} - \frac{\mathbf{d}}{\Delta Vol_n} \sum_x I_{qinx} \quad (2.33)$$

$$Q_n^k = Q_n^{k-1} - \mathbf{d} \sum_i \sum_x I_{qiox} \quad (2.34)$$

onde k é um índice que conta os intervalos de tempo e ΔVol_n é o volume do bloco n no espaço discreto.

Assim, o método iterativo para solução do sistema de equações de nó do circuito equivalente pode ser assim descrito:

1) especificar os valores iniciais de carga total e densidade de carga de cada íon, bem como o potencial inicial em cada nó. Geralmente será usado $V_n=0$, $Q_n=0$ para todos os nós, enquanto a densidade de carga iônica deve satisfazer a condição $\sum r_i = 0$, que garante a neutralidade elétrica inicial do meio.

2) Especificar os potenciais de fonte e montar o vetor F .

3) Calcular o vetor de potenciais de acordo com a equação (2.32). Se a permissividade elétrica em cada bloco for constante, a inversão da matriz C deve ser feita uma única vez na primeira iteração, e a sua inversa deve ser armazenada para uso nas iterações seguintes. Esse detalhe é muito importante, uma vez que a operação de inversão demanda muito tempo de processamento.

4) calcular as condutâncias (g_i) das conexões entre nós, usando a densidade de carga da iteração anterior, por meio da equação (2.17).

- 5) calcular os coeficientes de difusão (k_i) das conexões entre nós usando as equações (218) e (2.19).
- 6) calcular as correntes saindo dos nós usando a equação (2.20).
- 7) atualizar a densidade de carga de cada íon em cada nó segundo a equação (2.33).
- 8) atualizar a carga total em cada nó segundo a equação (2.34).
- 9) retornar ao item (2) para nova iteração.

A Figura (2.4) mostra um fluxograma desse método.

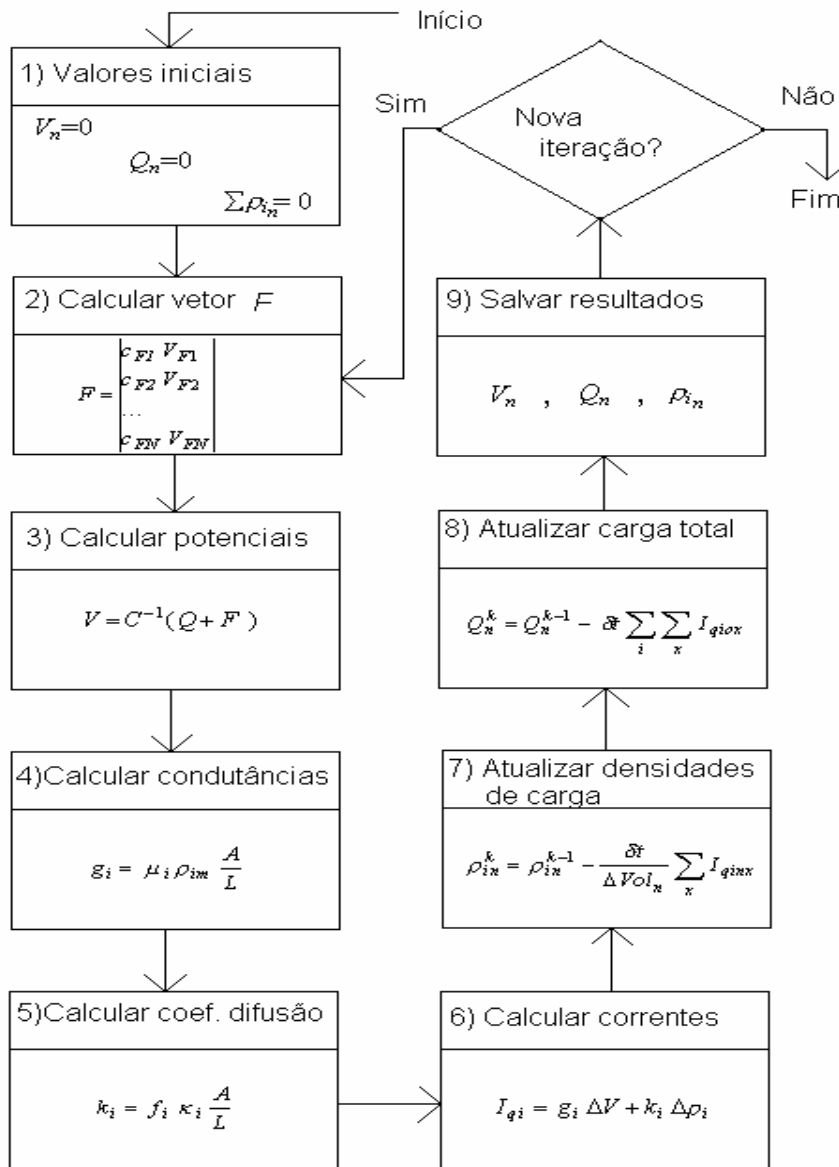


Figura 2.4 – Fluxograma do método iterativo para análise do circuito equivalente no modelo em escala celular.

O modelo em escala celular é adequado para realizar análises locais detalhadas envolvendo quase sempre volumes microscópicos contendo apenas umas poucas células. Grandes volumes de tecido contendo muitas células não podem ser analisados por esse método em virtude das limitações de memória e velocidade de processamento dos computadores. Essa questão é resolvida com o uso do modelo macroscópico que será apresentado a seguir.

Embora nossas análises nesta seção tenham se baseado na discretização com malha regular, isso raramente é adequado para análise local, devido a dificuldade em se compatibilizar as exigências de alta resolução espacial em torno das membranas com um tamanho final do circuito equivalente que não seja demasiado grande, pois do contrário, o processamento numérico pode não ser viável, por falta de memória ou extrema lentidão. Geralmente é necessário o uso de malhas irregulares que apresentem pequenos espaçamentos entre nós em torno das membranas e espaçamentos grandes longe delas. Isso será discutido na seção 2.4.

2.3) O MODELO EM ESCALA DE TECIDO

O modelo em escala de tecido baseia-se no uso de valores médios espaciais da condutividade e permissividade do meio, que sejam representativos de um volume contendo muitas células. Ele deve ser entendido como uma extensão do modelo em escala celular, na medida em que seus parâmetros podem ser determinados a partir da promediação espacial das distribuições locais de potencial e correntes em torno das células. De fato, esses dois modelos formam um conjunto de recursos computacionais que se complementam na análise de um agregado de células, permitindo a conexão entre variáveis locais, como correntes iônicas e potenciais de membrana celular, e variáveis macroscópicas que podem ser medidas, como campo elétrico e corrente total.

2.3.1) Circuito Equivalente Macroscópico

Conforme discutido no capítulo 1, alguns mecanismos de dispersão dielétrica determinam a variação da permissividade e da condutividade de materiais biológicos com a frequência. Os três processos de relaxação dielétrica dominantes foram teórica e experimentalmente bem caracterizados como sendo de primeira ordem e ocorrendo em frequências bem separadas no espectro eletromagnético [1,25,26,27]. A dispersão α , devido à difusão superficial na dupla camada das membranas, ocorre na faixa de áudio

freqüências, geralmente abaixo de 1kHz. A dispersão β , devido à polarização das interfaces eletrólito-membrana, ocorre na faixa de rádio freqüências, geralmente de 1 a 10 MHz. Finalmente, a dispersão γ , devido à relaxação dipolar, ocorre principalmente na faixa de microondas, sendo que a contribuição mais importante, devido às moléculas de água, determina uma banda principal em torno de 20 GHz.

Em uma banda de dispersão por relaxação de primeira ordem, de acordo com as equações (1.21) e (1.23), a condutividade e a permissividade podem ser escritas na forma:

$$\mathbf{e}(\mathbf{w}) = \mathbf{e}_\infty + \frac{\Delta \mathbf{e}}{1 + \mathbf{w}^2 \mathbf{t}^2} \quad (2.35)$$

$$\mathbf{s}(\mathbf{w}) = \mathbf{s}_s + \frac{\Delta \mathbf{s} \mathbf{w}^2 \mathbf{t}^2}{1 + \mathbf{w}^2 \mathbf{t}^2} \quad (2.36)$$

onde as amplitudes de dispersão $\Delta \mathbf{s}$ e $\Delta \mathbf{e}$ estão relacionadas por:

$$\frac{\Delta \mathbf{e}}{\Delta \mathbf{s}} = \frac{\mathbf{t}}{\mathbf{e}_o} \quad (2.37)$$

Consideremos agora o espaço discreto representado na Figura (2.1). Supondo que o meio tem as suas propriedades descritas pelas equações (2.35) e (2.36), podemos definir os seguintes elementos de circuito na conexão entre dois blocos adjacentes:

$$\text{condutância estática: } g_s = \mathbf{s}_s \frac{A}{L}$$

$$\text{condutância de dispersão: } g_w = \Delta \mathbf{s} \frac{A}{L}$$

$$\text{capacitância em alta freqüência: } c_\infty = \mathbf{e}_\infty \frac{A}{L}$$

$$\text{capacitância de dispersão: } c_w = \Delta \mathbf{e} \frac{A}{L}$$

onde o índice w identifica genericamente a banda de dispersão. Com estas definições podemos representar as propriedades do meio no espaço discreto pelo circuito equivalente mostrado na figura (2.5). Em um material onde ocorrem vários processos de relaxação de primeira ordem podemos acrescentar vários termos de dispersão na descrição de suas propriedades. Assim, para um tecido biológico com as três bandas de dispersão principais perfeitamente definidas, podemos escrever:

$$\mathbf{e}(\mathbf{w}) = \mathbf{e}_\infty + \frac{\Delta \mathbf{e}_a}{1 + \mathbf{w}^2 \mathbf{t}_a^2} + \frac{\Delta \mathbf{e}_b}{1 + \mathbf{w}^2 \mathbf{t}_b^2} + \frac{\Delta \mathbf{e}_g}{1 + \mathbf{w}^2 \mathbf{t}_g^2} \quad (2.38)$$

$$\mathbf{s}(\mathbf{w}) = \mathbf{s}_s + \frac{\Delta \mathbf{s}_a \mathbf{w}^2 \mathbf{t}_a^2}{1 + \mathbf{w}^2 \mathbf{t}_a^2} + \frac{\Delta \mathbf{s}_b \mathbf{w}^2 \mathbf{t}_b^2}{1 + \mathbf{w}^2 \mathbf{t}_b^2} + \frac{\Delta \mathbf{s}_g \mathbf{w}^2 \mathbf{t}_g^2}{1 + \mathbf{w}^2 \mathbf{t}_g^2} \quad (2.39)$$

onde os índices \mathbf{a} , \mathbf{b} e \mathbf{g} representam as bandas de dispersão. As amplitudes de dispersão para cada banda estão relacionadas de acordo com a equação (2.37). Para esse material, o circuito equivalente macroscópico é representado na Figura (2.6).

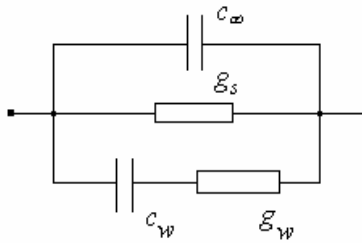


Figura 2.5 – Circuito equivalente representando uma banda de dispersão por relaxação de primeira ordem.

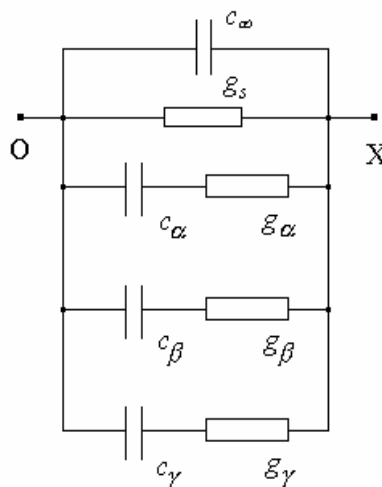


Figura 2.6 – Circuito equivalente representando um material com três bandas de dispersão por relaxação de primeira ordem. Os símbolos O e X indicam dois nós do circuito equivalente e.

2.3.2) Métodos de Análise Usando o Modelo em Escala de Tecido

Apresentaremos dois métodos de solução do circuito equivalente obtido pela modelagem do meio por suas equações de dispersão. O primeiro método é aplicável no domínio do tempo, onde a corrente de dispersão é obtida em cada passo de tempo por um processo iterativo. O segundo método é uma análise no domínio frequência usando a técnica dos fasores.

Análise no domínio do tempo

Considerando o circuito da Figura (2.6), calculemos a corrente saindo do nó O na direção de X. Ela pode ser expressa por:

$$I_{ox} = c_{\infty} \frac{d}{dt}(V_o - V_x) + I_s + I_w \quad (2.40)$$

onde I_s é a corrente circulando por g_s e I_w é a soma das correntes de dispersão. Cada termo de I_w pode ser calculado de forma iterativa. Se a corrente em qualquer dos ramos dispersivos tem valor $I_w(t)$ no instante t e sofre um acréscimo δI_w durante um pequeno intervalo de tempo δt subsequente, então a variação na diferença de potencial entre os nós nesse intervalo será dada por:

$$d(V_o - V_x) = \frac{I_w(t)}{c_w} dt + \frac{dI_w}{g_w} \quad (2.41)$$

desta equação podemos obter a variação δI_w correspondente a um degrau $\delta(V_o - V_x)$:

$$dI_w = g_w d(V_o - V_x) - \frac{dt}{t_w} I_w(t) \quad (2.42)$$

onde $t_w = c_w/g_w$. A corrente no final do intervalo pode então ser expressa por:

$$I_w(t + dt) = I_w(t) + dI_w = g_w d(V_o - V_x) + (1 - \frac{dt}{t_w}) I_w(t) \quad (2.43)$$

A corrente dispersiva total pode então ser especificada em cada passo de tempo de um processo iterativo somando as contribuições de cada um dos ramos dispersivos na Figura (2.7). Usando um inteiro k para indicar a iteração, podemos expressar a corrente dispersiva total na seguinte forma:

$$I_w^k = (g_a + g_b + g_g) d^k (V_o - V_x) + (I_a^{k-1} + I_b^{k-1} + I_g^{k-1}) - \left(\frac{I_a^{k-1}}{t_a} + \frac{I_b^{k-1}}{t_b} + \frac{I_g^{k-1}}{t_g} \right) dt \quad (2.44)$$

onde o símbolo δ^k foi usado para representar a variação da diferença de potencial entre as iterações $k-1$ e k .

Podemos agora aplicar a equação (2.40) junto com (2.44) para analisar o circuito equivalente do meio. Aplicando a Lei das correntes de Kirchhoff ao nó n da malha, obtemos:

$$\sum_x c_{\infty nx} \frac{d}{dt}(V_n - V_x) + I_{snx} + I_{wnx} = 0 \quad (2.45)$$

Resolvendo para a diferença de potencial obtemos:

$$\sum_x c_{\infty nx} d(V_n - V_x) = - \sum_x (I_{snx} + I_{wnx}) dt = dQ_n \quad (2.46)$$

onde δQ_n é a variação na carga total do nó n . Se as capacitâncias c_{∞} são constantes, esta equação pode ser reescrita na forma de uma relação entre as variáveis totais, potencial e carga em cada nó.

$$\sum_x c_{\infty nx} (V_n - V_x) = Q_n \quad (2.47)$$

Esta equação é equivalente à equação (2.27) para o modelo em escala celular. Podemos aplicar o mesmo método iterativo usado nesse modelo. A equação (2.47) pode ser expandida na forma da equação (2.28) e pode ser reescrita na forma matricial exatamente como a equação (2.29). Assim, a solução geral de um problema de análise em escala de tecido tem a forma:

$$V = C_{\infty}^{-1} (Q + F) \quad (2.48)$$

onde os vetores desta equação são definidos exatamente da mesma forma que no modelo em escala celular, ou seja:

$$V = \begin{bmatrix} V_1 \\ V_2 \\ V_3 \\ \dots \\ V_N \end{bmatrix}, \quad Q = \begin{bmatrix} Q_1 \\ Q_2 \\ Q_3 \\ \dots \\ Q_N \end{bmatrix}, \quad F = \begin{bmatrix} c_{F1} V_{F1} \\ c_{F2} V_{F2} \\ c_{F3} V_{F3} \\ \dots \\ c_{FN} V_{FN} \end{bmatrix}$$

e a matriz das capacitâncias C_{∞} tem também a mesma organização interna que a matriz C definida anteriormente. O método iterativo consiste, então, em calcular em cada passo de tempo, o vetor de potenciais de nó usando a equação (2.48) com o vetor de fontes atual e o vetor de carga da iteração anterior. O vetor de carga deve ser atualizado em cada iteração efetuando-se a integração finita da equação de continuidade em cada nó, o que resulta em:

$$Q_n^k = Q_n^{k-1} - dt \sum_x (I_{snx}^{k-1} + I_{wnx}^{k-1}) \quad (2.49)$$

onde a corrente dispersiva é calculada pela equação (2.44) e a corrente através da condutância estática é calculada pela lei de Ohm:

$$I_{snx}^k = g_s V_{nx}^k \quad (2.50)$$

A Figura (2.7) mostra um fluxograma deste método.

Análise no Domínio da frequência

Para a análise no domínio da frequência definimos a admitância específica do meio pela expressão:

$$\mathbf{g}(\mathbf{w}) = \mathbf{s}(\mathbf{w}) + j \mathbf{w} \mathbf{e}_o \mathbf{e}(\mathbf{w}) \quad (2.51)$$

onde $\mathbf{s}(\mathbf{w})$ e $\mathbf{e}(\mathbf{w})$ são dadas pelas equações (2.38) e (2.39). Entre cada nó e seus vizinhos no espaço discreto, podemos definir uma admitância que se obtém pelo produto da admitância específica daquela conexão pelo fator geométrico A/L , isto é:

$$y(\mathbf{w}) = \mathbf{g}(\mathbf{w}) \frac{A}{L} = \mathbf{s}(\mathbf{w}) \frac{A}{L} + j \mathbf{w} \mathbf{e}_o \mathbf{e}(\mathbf{w}) \frac{A}{L} = \mathbf{g}(\mathbf{w}) + j \mathbf{w} \mathbf{c}(\mathbf{w}) \quad (2.52)$$

Aplicando a Lei das correntes de Kirchoff ao nó n , obtemos:

$$\sum_x y_{nx} (\mathbf{f}_n - \mathbf{f}_x) = 0 \quad (2.53)$$

onde \mathbf{f}_n e \mathbf{f}_x são os fasores de potencial elétrico de nó. Podemos reescrever esta equação representando cada elemento por sua parte real e imaginária, obtendo então duas outras equações com a seguinte forma:

$$\sum_x g_{nx} (\mathbf{f}_n^r - \mathbf{f}_x^r) - \mathbf{w} c_{nx} (\mathbf{f}_n^i - \mathbf{f}_x^i) = 0 \quad (2.54)$$

para a parte real e,

$$\sum_x \mathbf{w} c_{nx} (\mathbf{f}_n^r - \mathbf{f}_x^r) + g_{nx} (\mathbf{f}_n^i - \mathbf{f}_x^i) = 0 \quad (2.55)$$

para a parte imaginária. Os índices r e i são usados para identificar a parte real e imaginária dos fasores, respectivamente.

Este sistema de equações reais pode ser escrito na forma de uma única equação matricial com a definição do vetor de potenciais de comprimento $2N$, sendo N o número de nós. Os primeiros N elementos desse vetor são as partes reais dos potenciais e os últimos N elementos são as partes imaginárias. Assim, temos:

$$\Phi = \begin{pmatrix} \mathbf{f}_1^r \\ \mathbf{f}_2^r \\ \dots \\ \mathbf{f}_N^r \\ \mathbf{f}_1^i \\ \mathbf{f}_2^i \\ \dots \\ \mathbf{f}_N^i \end{pmatrix}$$

Por sua vez, os elementos provenientes da admitância do meio, g_{nx} e c_{nx} , são organizados em uma matriz admitância de dimensões $2N \times 2N$, que tem a seguinte forma:

$$Y = \begin{pmatrix} G & -\mathbf{w}C \\ \mathbf{w}C & G \end{pmatrix}$$

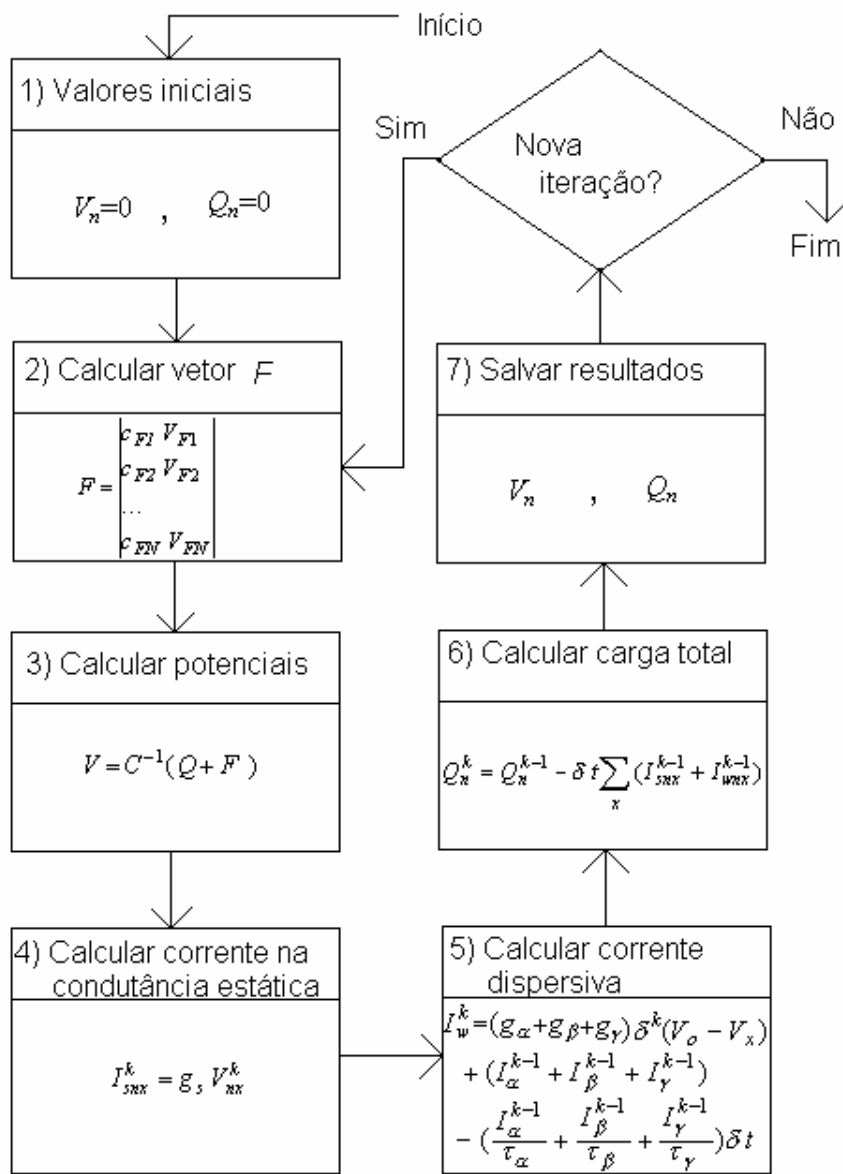


Figura 2.7 – Fluxograma do método iterativo para análise do circuito equivalente no modelo em escala de tecido no domínio do tempo.

onde G e C são matrizes $N \times N$ que têm exatamente a mesma estrutura da matriz C apresentada na seção (2.2.2) a respeito do modelo em escala celular. G é formada pelas condutâncias g_{nx} e C é formada pelas capacitâncias c_{nx} . Com essas definições, a equação geral do sistema pode ser escrita na forma:

$$Y\Phi = F \tag{2.56}$$

onde F é o vetor de fontes que excitam o meio. Se assumirmos que todas as fontes tem apenas parte real, podemos expressar o vetor F na forma:

$$F = \begin{pmatrix} g_{F1} & \mathbf{f}_{F1} \\ g_{F2} & \mathbf{f}_{F2} \\ \dots & \dots \\ g_{FN} & \mathbf{f}_{FN} \\ \mathbf{w}c_{F1} & \mathbf{f}_{F1} \\ \mathbf{w}c_{F2} & \mathbf{f}_{F2} \\ \dots & \dots \\ \mathbf{w}c_{FN} & \mathbf{f}_{FN} \end{pmatrix}$$

onde g_F e c_F são a condutância e a capacitância de acoplamento de fonte, respectivamente, e \mathbf{f}_F é o potencial de fonte aplicado em cada nó. A solução do sistema de equações representado pela equação (2.56) é obtida com a multiplicação de ambos os lados dessa equação por Y^{-1} .

$$\Phi = Y^{-1} F$$

(2.57)

Esse método deve ser repetido em todas as frequências de interesse. A Figura (2.8) apresenta um fluxograma do método de análise no domínio da frequência.

2.4) ESQUEMAS DE DISCRETIZAÇÃO ESPACIAL

A discretização espacial é uma das fases mais importantes no planejamento de um experimento de simulação numérica para cálculo de campo. A princípio, a definição dos tamanhos dos blocos e a maior concentração de nós em algumas regiões do que em outras deve atender a dois critérios básicos: erro máximo permitido (relativamente ao cálculo de potenciais, campo, correntes e densidade de carga) e capacidade limitada de processamento do sistema computacional. Normalmente o erro diminui ao aumentar a resolução da malha, mas isso em geral implica em aumentar o número de nós, o que faz aumentar o tempo de processamento. Infelizmente não existem métodos analíticos diretos para prever com precisão os erros numéricos nem o tempo de processamento para um dado problema. É possível, contudo, a partir de simulações de problemas simples, com resultados analíticos conhecidos, obter numericamente as relações entre erro, tempo de processamento, resolução e número de nós da malha. Isso será discutido no próximo capítulo.

Nesta seção discutiremos apenas o efeito da resolução da malha na representação dos contornos de membranas isolantes e interstícios celulares, pois nesses locais a acumulação de cargas em geral produz variações espaciais mais intensas de campo e

corrente elétrica do que em outras regiões, o que os torna locais críticos em termos de precisão no cálculo numérico.

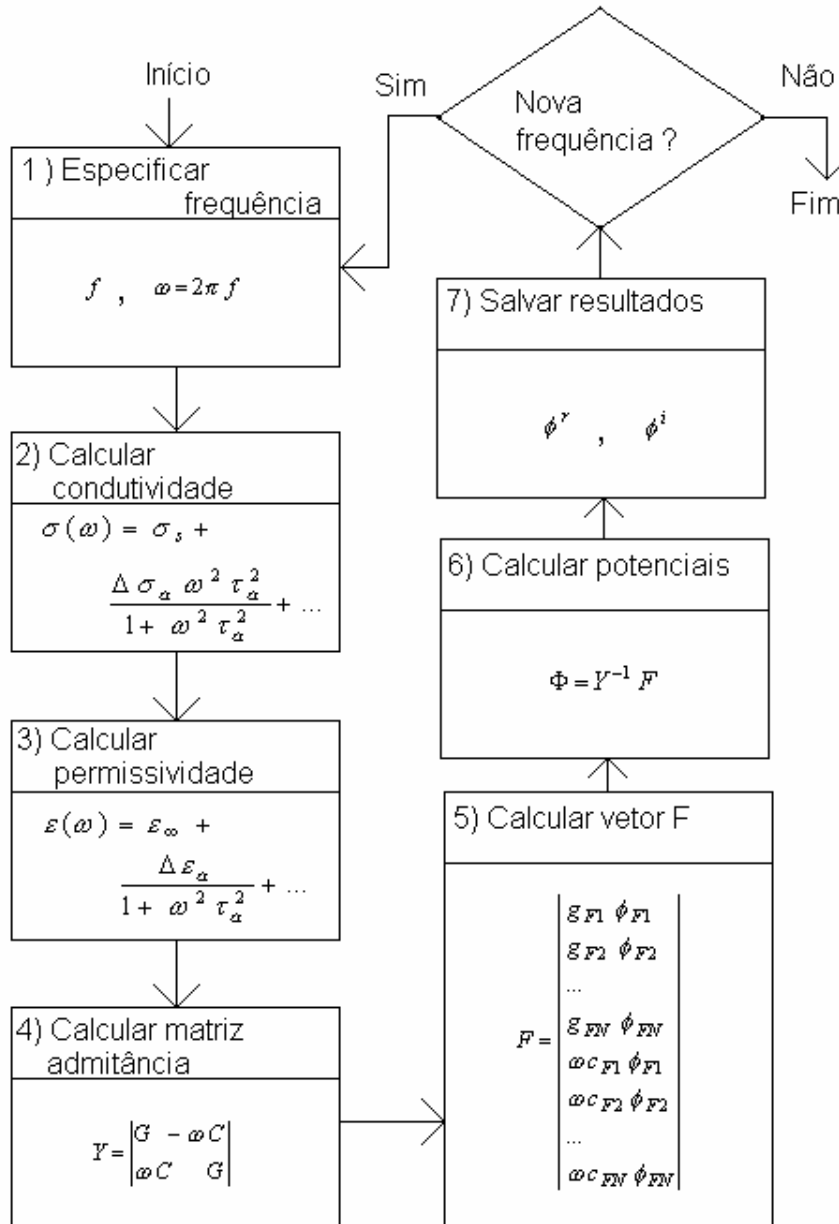


Figura 2.8 – Fluxograma do método fasorial para análise do circuito equivalente no modelo em escala de tecido no domínio da frequência .

A Figura (2.9) mostra o efeito da resolução da malha na representação de uma interface circular. A curva original é mostrada com traço contínuo e a curva efetivamente

obtida é mostrada com tracejado. Como se percebe facilmente nessa figura, a discretização resulta em maior distorção na representação dos objetos menores (área ou volume). Assim, a resolução da malha deve ser especificada de acordo com as dimensões dos objetos. Um critério que adotamos é o de especificar as arestas dos blocos como sendo no máximo um décimo do comprimento do objeto em cada direção do sistema de eixos coordenados. Por exemplo, para uma célula de raio $10\mu\text{m}$, as arestas devem ter no máximo $1\mu\text{m}$. Isso, contudo, nem sempre proporciona uma representação muito boa das interfaces, como se percebe na curva do meio na Figura (2.9). Além disso, a discretização de agregados de células acrescenta uma complexidade maior relativamente à representação dos espaços intersticiais entre células vizinhas. Esse espaço pode ser muito pequeno em tecidos compactos, da ordem de algumas dezenas de nanômetros, mas mesmo para células diluídas em meio eletrolítico, dependendo da concentração, esse interstício pode ser difícil de representar. A Figura (2.10) mostra o interstício entre três células circulares em um esquema bidimensional. Pode-se notar que usando-se somente a malha mais larga, o interstício não poderia ser bem representado nos locais de maior proximidade entre as células. Nesses pontos as membranas ficariam muito próximas ou muito distantes, dependendo do caminho escolhido para o contorno de cada membrana no espaço discreto. Além disso, o número muito pequeno de blocos no interstício resultaria em erros grosseiros no cálculo da corrente nesse espaço. A solução encontrada, que representa um compromisso entre resolução espacial e número final de nós, é a definição de uma malha “mais fina” em torno das membranas e no espaço intersticial. No exemplo da Figura (2.10) todos os blocos mais próximos das membranas e dentro do interstício foram divididos em nove blocos menores, o que significa uma melhoria da resolução por um fator de três em cada eixo. Tanto os contornos das membranas, quanto as distâncias entre células ficaram relativamente bem representadas nesse esquema de discretização.

Outros esquemas de discretização não são tão gerais quanto àqueles mostrados nas figuras (2.9) e (2.10), mas são especialmente úteis com certas geometrias de células e permitem obter excelente representação de pequenos espaços minimizando o número total de nós. Na Figura (2.11) uma estrutura bidimensional de células quadradas com interstício muito pequeno é modelada com o uso de uma malha de elementos retangulares, cujas arestas variam segundo uma progressão aritmética a partir da posição central no interstício. Essa progressão é direcional, afetando apenas o eixo perpendicular à membrana em cada interstício.

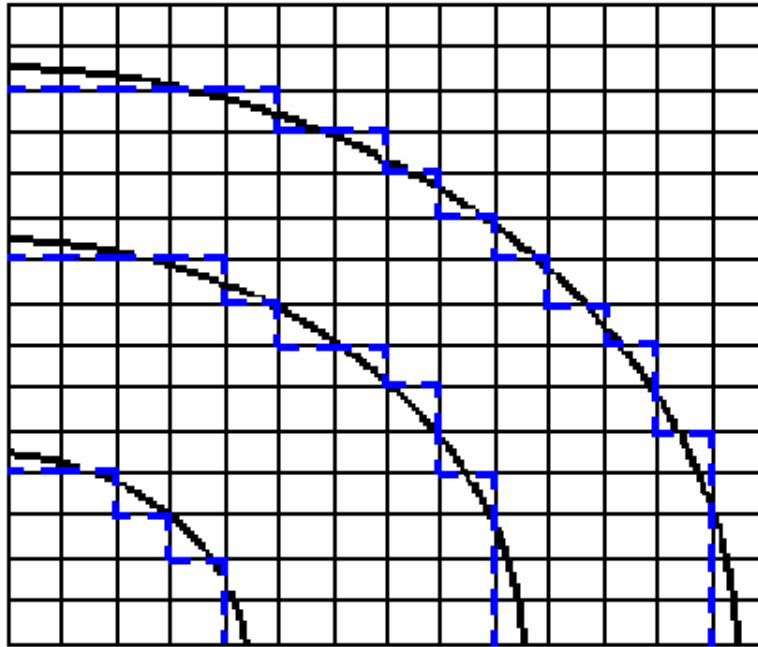


Figura 2.9 – Efeito da discretização na representação de uma interface circular. A linha contínua é a curva original e o tracejado é a sua representação no espaço discreto.

Quando a diferença de resolução espacial entre duas regiões adjacentes é muito grande, uma transição abrupta entre essas regiões, pode introduzir distorções importantes na distribuição espacial de potencial obtida numericamente. A progressão gradual da malha supera esse problema. Outras formas de progressão, além da linear, podem ser usadas. Muitas vezes a progressão geométrica é vantajosa porque acelera o crescimento da malha, permitindo uma transição em espaços muito limitados. Na Figura (2.12) mostra-se uma malha especialmente apropriada para representar uma interface circular, de modo a obter uma distribuição uniforme de nós sobre a superfície com um número mínimo de elementos. As arestas dos elementos seguem então uma progressão senoidal com o ângulo de posição do ponto na interface.

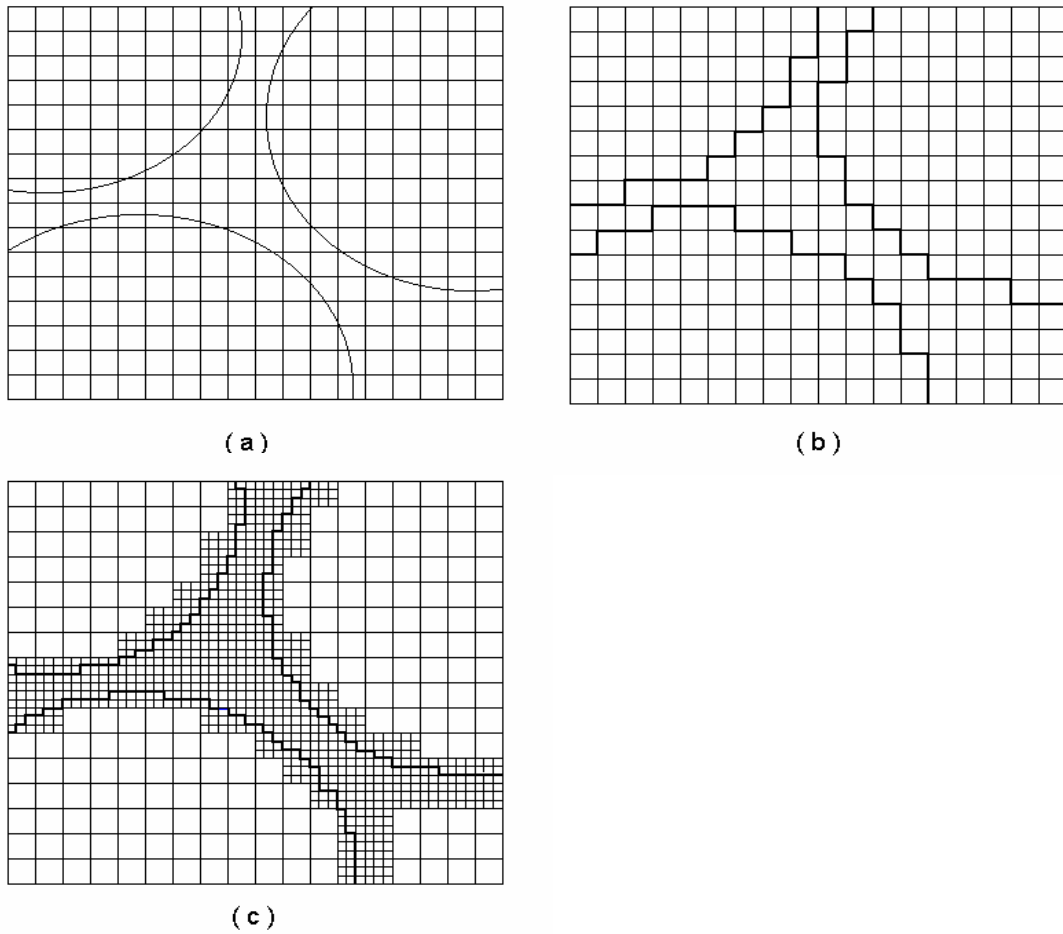


Figura 2.10 – Efeito da discretização na representação do interstício entre células circulares bidimensionais. (a) células reais. (b) representação no espaço discreto de baixa resolução. (c) representação no espaço discreto de alta resolução. Em (c) cada bloco em torno das membranas e no interstício foi dividido em nove blocos menores, melhorando a resolução por um fator de três nessa região.

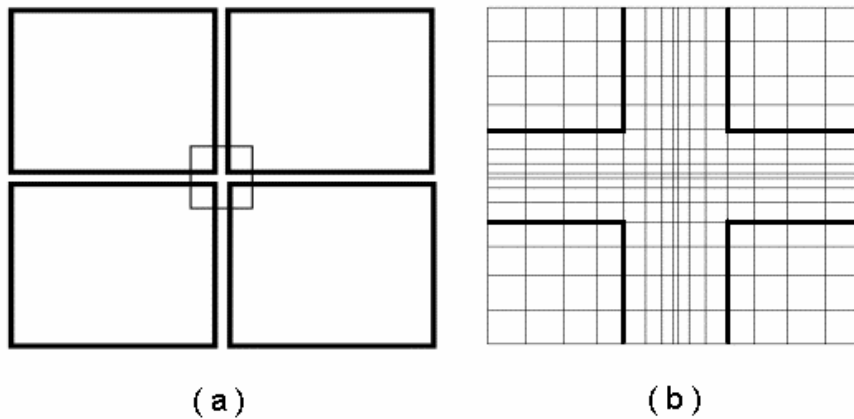


Figura 2.11 – Esquema de discretização direcional com progressão linear das arestas dos elementos retangulares. (a) estrutura de células quadradas. (b) detalhe da malha dentro do pequeno quadrado central.

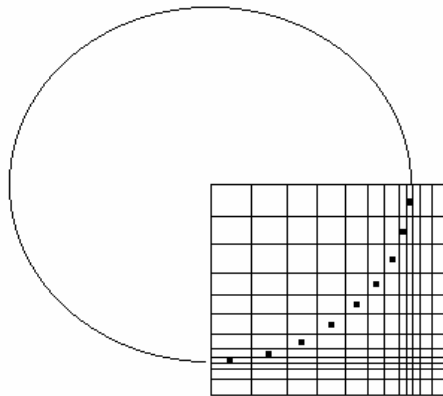


Figura 2.12 – Esquema de discretização espacial para obter uma distribuição uniforme de nós sobre uma interface circular. As arestas dos elementos seguem uma progressão senoidal com o ângulo de posição na interface.

CAPÍTULO 3 - CONVERGÊNCIA, PRECISÃO E OUTROS

ASPECTOS DO PROCESSAMENTO COM O MCE

A discretização espacial e temporal em um experimento de simulação numérica deve atender, entre outros requisitos, às exigências de convergência do processo iterativo e obtenção de respostas dentro de margens de erro consideradas aceitáveis. Assim, é fundamental dispor de critérios para especificar os incrementos de espaço (Δx , Δy , Δz) e de tempo (δt), de modo a satisfazer essas exigências. Em vista da complexidade do problema, estabeleceremos esses critérios a partir de uma análise muito simplificada, cujos resultados, porém, estão em plena concordância com a experimentação, conforme se demonstrará. Neste capítulo também analisaremos a questão da precisão em simulações de problemas tridimensionais comparando resultados numéricos e analíticos para uma membrana esférica. O problema do tempo de processamento, por ser dependente das características do hardware, é discutido apenas em uma base empírica, a partir dos resultados numéricos obtidos. Na última seção deste capítulo analisamos a importante questão do limite de frequência de validade dos modelos aplicados no MCE.

3.1) CRITÉRIO PARA ESTABILIDADE DO MÉTODO ITERATIVO NO MODELO EM ESCALA CELULAR

Consideraremos nessa análise uma situação crítica em termos de geração de erros, que é o problema do acúmulo de cargas na interface entre dois meios, um condutor e outro isolante, como no caso da interface eletrólito–membrana em tecidos biológicos. Quando o meio em questão é submetido a um campo elétrico, a corrente elétrica que circula na parte condutora, transporta cargas elétricas até a interface. As cargas se acumulam dentro de uma camada muito delgada, e criam um campo elétrico em oposição ao campo na parte condutora. Quando o campo resultante na região condutora se anula, o sistema alcança a condição de regime permanente. Vamos avaliar a dinâmica desse processo no caso de um sistema unidimensional. A Figura (3.1) mostra os detalhes físicos dessa análise. O campo aplicado externamente se distribui uniformemente no espaço e gera uma corrente de condução na parte condutora. Nos instantes iniciais, apenas a interface se carrega de maneira apreciável. Opondo-se ao carregamento da superfície surge o campo elétrico produzido pelas cargas acumuladas e o gradiente de concentração que tende a afastar da interface o excesso de cargas.

Assim, baseados na equação da continuidade, concluímos que a taxa de crescimento da densidade de cargas na interface, nos instantes iniciais, é dada por:

$$\frac{\partial \mathbf{r}_s}{\partial t} = \frac{J_{cond} - J_{dif}}{\Delta x} = \frac{\mathbf{s}E_o}{\Delta x} - \left(\frac{\mathbf{s}}{2e} + \frac{2D}{\Delta x^2} \right) \mathbf{r}_s \quad (3.1)$$

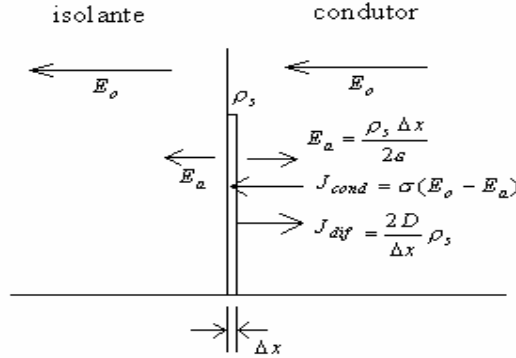


Figura 3.1 - Representação esquemática do processo de carregamento de uma interface condutor-isolante.

Por essa equação vemos que o carregamento da superfície, nos instantes iniciais, pode ser modelado como um processo de relaxação de primeira ordem, com uma constante de tempo dada por:

$$\mathbf{t}_s = \left(\frac{\mathbf{s}}{2e} + \frac{2D}{\Delta x^2} \right)^{-1} = \frac{2e \Delta x^2}{\mathbf{s} \Delta x^2 + 4De} \quad (3.2)$$

A evolução temporal da densidade de carga, em uma aproximação de primeira ordem, pode então ser obtida pela expressão:

$$\mathbf{r}_s^j = \mathbf{r}_s^{j-1} + \frac{\partial \mathbf{r}_s}{\partial t} \mathbf{dt} = \mathbf{r}_s^{j-1} + \frac{(\mathbf{r}_s^\infty - \mathbf{r}_s^{j-1})}{\mathbf{t}_s} \mathbf{dt} \quad (3.3)$$

onde o índice i indica a iteração e \mathbf{r}_s^∞ é o valor de regime permanente de \mathbf{r}_s . Iniciando com valor nulo, a fórmula de recorrência anterior leva ao resultado:

$$\mathbf{r}_s^j = \mathbf{r}_s^\infty \left[1 - \left(1 - \frac{\Delta t}{\mathbf{t}_s} \right)^{i-1} \right] \quad (3.4)$$

Naturalmente, a série converge apenas se $|1 - \frac{\Delta t}{\mathbf{t}_s}| < 1$, o que leva à seguinte condição de convergência do processo iterativo: $0 < \Delta t < 2\mathbf{t}_s$. Longe da interface, onde a corrente de difusão é insignificante em relação à corrente de condução, o tempo de relaxação é dado por $\mathbf{t}_v = e/\mathbf{s}$. Assim, para $\Delta x > 2L_D$, a convergência do processo iterativo tende a ser

limitada pelo acúmulo de cargas no volume do condutor. Para $\Delta x < 2L_D$ a limitação será o acúmulo de cargas na interface. De qualquer modo, o critério de escolher Δt menor que a menor constante de tempo entre t_s e t_v , garante a convergência do cálculo.

3.2) ERRO EM REGIME PERMANENTE

Consideremos agora o erro em regime permanente no cálculo numérico da densidade de carga acumulada na interface. A equação da continuidade para um ponto no interior do condutor pode ser expressa na forma:

$$\frac{\partial J}{\partial x} = \frac{\partial}{\partial x} \left(\mathbf{s} E - D \frac{\partial \mathbf{r}}{\partial x} \right) = \mathbf{s} \frac{\partial E}{\partial x} - D \frac{\partial^2 \mathbf{r}}{\partial x^2} = \frac{\mathbf{s}}{\mathbf{e}} \mathbf{r} - D \frac{\partial^2 \mathbf{r}}{\partial x^2} = - \frac{\partial \mathbf{r}}{\partial t} \quad (3.5)$$

Em regime permanente, fazendo $\frac{\partial \mathbf{r}}{\partial t} = 0$ na eq.(2.33), obtemos a seguinte equação diferencial para a distribuição de densidade de carga no condutor:

$$D \frac{\partial^2 \mathbf{r}}{\partial x^2} - \frac{\mathbf{s}}{\mathbf{e}} \mathbf{r} = 0 \quad (3.6)$$

A solução dessa equação, que satisfaz as condições de contorno $\mathbf{r}(0) = \mathbf{r}_s$ e $\mathbf{r}(\infty) = 0$, é dada por:

$$\mathbf{r}(x) = \mathbf{r}_s \exp\left(-\frac{x}{L_D}\right) \quad (3.7)$$

onde $L_D = \sqrt{\frac{De}{\mathbf{s}}}$ é o comprimento de Debye. A Figura (3.2) mostra a distribuição de carga de acordo com a eq.(3.7). A densidade de carga na interface, \mathbf{r}_s , pode ser calculada como função do campo elétrico aplicado, com o uso da Lei de Gauss, resultando em:

$$\mathbf{r}_s = \frac{2\mathbf{e} E_o}{L_D} \quad (3.8)$$

As eqs (3.7) e (3.8) representam a solução exata da eq.(3.6). O cálculo numérico, por sua vez, fornece uma aproximação discretizada dessa solução. Podemos expressar essa aproximação, usando a expansão em série de Taylor, para relacionar as densidades de carga entre dois pontos consecutivos do espaço, separados pela distância Δx . A aproximação de ordem n é dada por:

$$\mathbf{r}_j = \mathbf{r}_{j-1} + \sum_{m=1}^n \frac{1}{m!} \frac{\partial^m \mathbf{r}_{j-1}}{\partial x^m} \Delta x^m \quad (3.9)$$

onde j indica a posição do espaço. Baseando-se no fato de que a densidade de carga decresce exponencialmente a partir da superfície, de acordo com a eq.(3.7), podemos expressar a derivada de ordem m por:

$$\frac{\partial^m \mathbf{r}_{j-1}}{\partial x^m} = (-1)^m \frac{\mathbf{r}_{j-1}}{L_D^m} \quad (3.10)$$

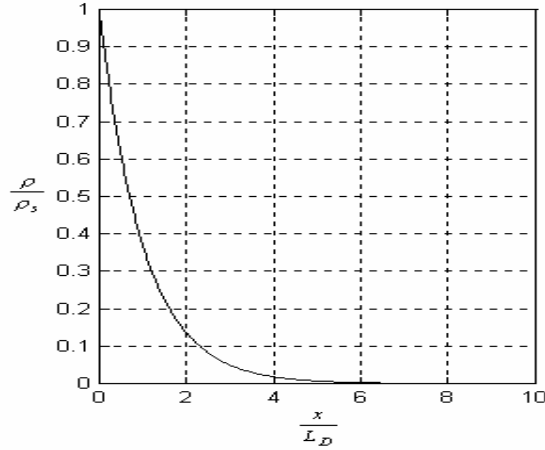


Figura 3.2 - Distribuição de densidade de carga nas proximidades da interface isolante-condutor para uma excitação com campo elétrico constante.

Com a eq.(3.10) substituindo o termo correspondente na eq.(3.9), podemos usar a relação resultante para obter o valor da densidade de carga em qualquer ponto do espaço discretizado, em função da densidade na interface. A expressão final é:

$$\mathbf{r}_j = \mathbf{r}_s (f_n)^j \quad (3.11)$$

onde:

$$f_n = 1 + \sum_{m=1}^n \frac{(-1)^m}{m!} \left(\frac{\Delta x}{L_D} \right)^m \quad (3.12)$$

Podemos agora aplicar a Lei de Gauss para determinar o valor numérico de \mathbf{r}_s . A integral

$\int \mathbf{r} dx$ será substituída pela somatório $\sum \mathbf{r}_j \Delta x$. Assim, temos:

$$\sum_{j=0}^{\infty} \mathbf{r}_j \Delta x = \mathbf{r}_s \Delta x \sum_{j=0}^{\infty} (f_n)^j = \frac{\mathbf{r}_s \Delta x}{1 - f_n} = 2 \mathbf{e} E_o \quad \text{se } -1 < f_n < 1 \quad (3.13)$$

Assim, a densidade de carga na interface, na análise com espaço discreto, é dada por:

$$\mathbf{r}_s = \frac{2 \mathbf{e} (1 - f_n) E_o}{\Delta x} \quad (3.14)$$

Devemos comparar esse resultado com o valor exato fornecido na eq.(3.8), e determinar o erro relativo do método de cálculo com discretização espacial:

$$erro = \frac{(\mathbf{r}_s)_{num} - (\mathbf{r}_s)_{exato}}{(\mathbf{r}_s)_{exato}} = (1 - f_n) \frac{L_D}{\Delta x} - 1 \quad (3.15)$$

Por exemplo:

$$\text{para } n=1, f_n = 1 - \frac{\Delta x}{L_D} \text{ e } erro = 0;$$

$$\text{para } n=2, f_n = 1 - \frac{\Delta x}{L_D} + \frac{1}{2} \left(\frac{\Delta x}{L_D} \right)^2 \text{ e } erro = -\frac{1}{2} \frac{\Delta x}{L_D};$$

$$\text{para } n=3, f_n = 1 - \frac{\Delta x}{L_D} + \frac{1}{2} \left(\frac{\Delta x}{L_D} \right)^2 - \frac{1}{6} \left(\frac{\Delta x}{L_D} \right)^3 \text{ e } erro = -\frac{1}{2} \frac{\Delta x}{L_D} + \frac{1}{6} \left(\frac{\Delta x}{L_D} \right)^2$$

e assim por diante.

A Figura (3.3) mostra o erro como função da razão $\Delta x/L_D$. Consideramos meramente casual o fato da aproximação de primeira ordem resultar em um erro nulo no cálculo da densidade de carga na interface. Acontece que o erro na integração numérica compensou exatamente os erros individuais na série de primeira ordem em relação à solução exata. Por outro lado, observa-se que na medida em que a ordem da aproximação numérica aumenta, o erro tende a um valor limite não nulo. Já que os erros individuais de cada termo da série em relação à solução exata tendem a zero, com o aumento da ordem da aproximação numérica, concluímos que esse erro limite se deve ao erro inerente à integração numérica. O critério óbvio para escolha de Δx é fazê-lo bem menor do que L_D . Na verdade isso é realmente necessário apenas se desejamos conhecer a variação local do campo elétrico e densidade de carga, em distâncias da interface da ordem de L_D ou menores. Quando não for esse o caso, pode-se usar $\Delta x \gg L_D$, contando-se, porém, com o fato de que a densidade de carga na interface será subestimada. Fora dessa camada interfacial de carga, o meio é essencialmente neutro e espera-se que o erro no cálculo do potencial elétrico seja comparável ao erro de truncamento na expansão em diferenças finitas da equação de Laplace, o qual é da ordem de $\frac{1}{12} \frac{\partial^4 V}{\partial x^4} \Delta x^2$, onde V é o potencial elétrico e ignora-se termos de ordem maior do que 4 na expansão em série de Taylor [56]. Infelizmente não há uma forma geral de calcular a derivada que aparece nessa expressão, e assim, não temos uma regra geral para avaliar esse erro de truncamento. Porém, espera-se que nas proximidades de superfícies carregadas no interior de condutores, esse termo seja muito pequeno.

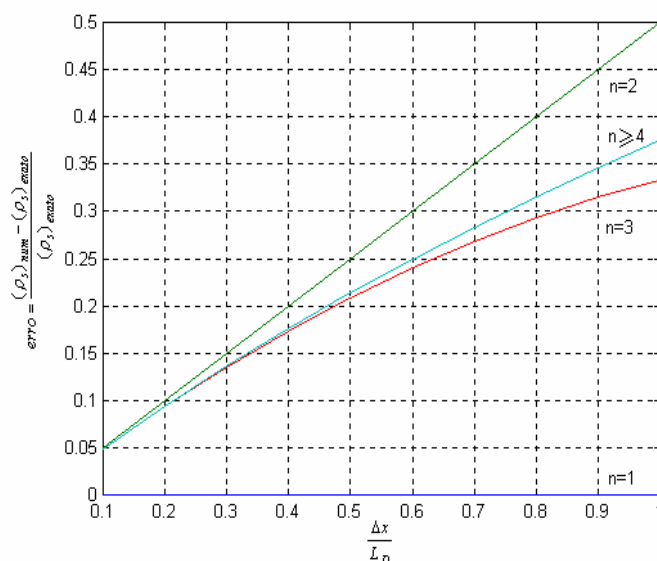


Figura 3.3 - Módulo do erro em regime permanente no cálculo numérico da densidade superficial de carga na interface condutor-isolante como função do parâmetro Δx da malha de discretização unidimensional. n indica a ordem da aproximação da solução numérica.

3.3) ANÁLISE NUMÉRICA DE CONVERGÊNCIA E ERRO EM REGIME PERMANENTE

O problema da interface isolante-condutor discutido nas seções anteriores foi simulado usando o MCE unidimensional, objetivando estabelecer a comparação entre valores obtidos numericamente com aqueles previstos teoricamente para o limite de convergência e erro em regime permanente na densidade superficial de carga. Realizamos diversas simulações, variando o parâmetro de malha, Dx , e o passo de tempo, dt . Para cada Dx e dt , o erro na distribuição numérica de densidade de carga foi obtido, comparando-se com o modelo analítico expresso nas equações (3.7) e (3.8). O meio condutor é um eletrólito contendo água e NaCl, em uma concentração que produz 13.5 C/cm^3 de densidade de carga positiva e -13.5 C/cm^3 de carga negativa, considerando a dissociação completa do sal. Por simplicidade, a permissividade do isolante é considerada igual à da água.

O programa de simulação numérica que usamos para implementar o método descrito neste trabalho foi desenvolvido em linguagem C, usando o compilador BORLAND C++ versão 5.0. Todas as simulações foram realizadas em um sistema PC-AMD 1.8GHz, equipado com 512 Mbytes de memória RAM e sistema operacional Windows 98. Os resultados gerados pelo simulador, na forma de

arquivos binários, foram analisados e os gráficos construídos, através de rotinas específicas escritas para o programa MATLAB.

A Figura (3.4) apresenta algumas curvas de erro como função de dt , para quatro valores diferentes do parâmetro Dx . Esse erro é uma média entre os erros relativos (densidade de carga obtida numericamente em relação ao valor obtido analiticamente) para os pontos da malha localizados no meio condutor adjacente à interface até a distância $5L_D$. Todas as curvas de erro apresentam um limite inferior que independe de dt , mas que depende do valor de Dx . Por outro lado, cada curva apresenta um valor limiar de dt , relativamente bem definido, que pode ser considerado um limite de convergência do método iterativo. Esse limiar de convergência, por sua vez, depende de Dx . As Figuras (3.5) e (3.6) mostram como esse limiar de convergência e o erro limite (nesse caso, o erro na densidade de carga na interface) variam com a razão Dx/L_D . O limiar de convergência, dt_{max} , foi assumido como o valor de dt para o qual o erro médio atinge um valor 10% acima do seu limite inferior. Junto com essas curvas obtidas pelo método numérico, apresentamos as curvas teóricas da constante de tempo t_s (eq.(3.2)) e do erro na densidade de carga na interface (eq.(3.15)), devido à discretização espacial, usando a expansão da função de distribuição exponencial em série de Taylor (eq. (3.12)), truncada no termo de ordem 4, o qual reproduzimos na equação seguinte:

$$erro = -\frac{1}{2} \frac{\Delta x}{L_D} + \frac{1}{6} \left(\frac{\Delta x}{L_D} \right)^2 - \frac{1}{24} \left(\frac{\Delta x}{L_D} \right)^3 \quad (3.16)$$

Esses gráficos demonstram que as estimativas de erro e limite de convergência obtidos analiticamente são consistentes com o processo de cálculo no método numérico. A Figura (3.3) mostra que o erro de discretização independe da ordem da expansão a partir da ordem 4, o que nos leva a concluir que, o erro numérico no cálculo da carga é devido ao processo de integração finita (lembrar que a densidade superficial de carga foi obtida a partir de uma integração numérica da série de Taylor da distribuição exponencial de carga, de acordo com a Lei de Gauss, a fim de atender às condições de contorno). Em virtude da excelente concordância entre resultados numéricos e analíticos na Figura (3.6), concluímos que a principal fonte de erros no método numérico, para $Dx < L_D$, é exatamente o processo de integração finita para obtenção das densidades de carga em cada nó do circuito equivalente.

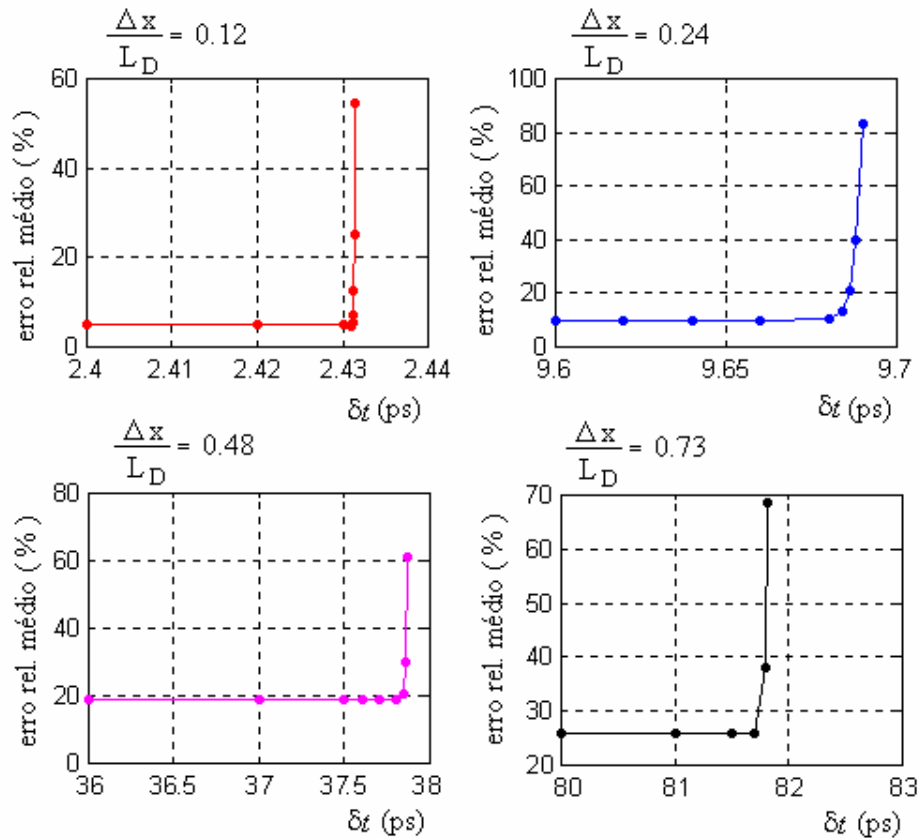


Figura 3.4 – Curvas de erro relativo médio no cálculo numérico da densidade de carga em função do passo de tempo do método iterativo para quatro valores da razão $\Delta x / L_D$.

3.4) INFLUÊNCIA DA MALHA NO CÁLCULO EM TRÊS DIMENSÕES

Como observado no item 3.2, estimativas de erro no cálculo numérico do potencial ou campo elétrico são difíceis de obter em uma forma genérica, em virtude da sua dependência com derivadas de ordem elevada do potencial. Uma alternativa interessante na avaliação de erros introduzidos pela discretização é a comparação de resultados numéricos com resultados analíticos conhecidos, embora essa estratégia seja aplicável apenas em casos simples onde a solução analítica possa ser obtida. Nesta seção, o problema de uma membrana esférica imersa em uma solução eletrolítica sujeita a um campo elétrico uniforme, é resolvido numericamente e os

resultados obtidos são comparados com as equações (1.52) e (1.53), a fim de avaliarmos a influência da malha na geração de erros.

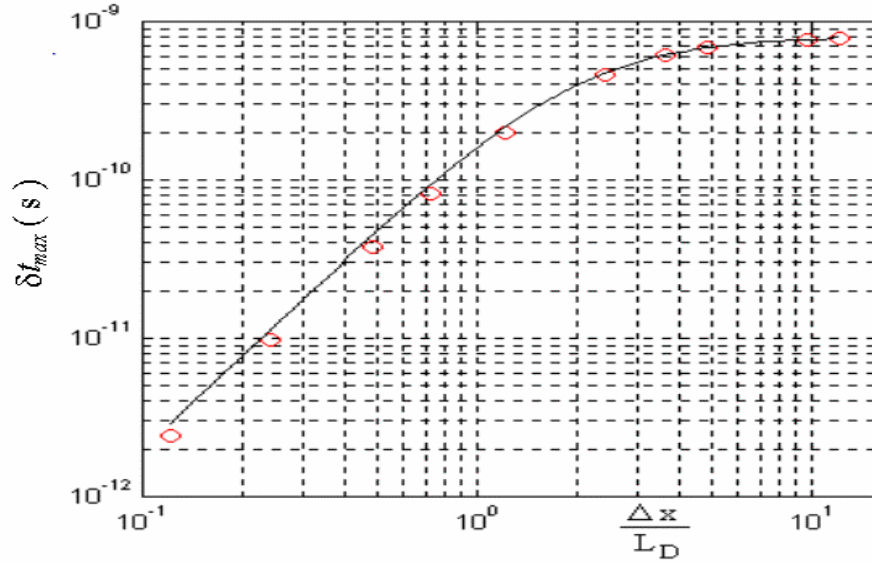


Figura 3.5 – Passo de tempo máximo para convergência do método iterativo em função do parâmetro de discretização espacial Δx . A curva contínua é o valor teórico da constante de tempo inicial de carregamento da interface, de acordo com a eq.(3.2).

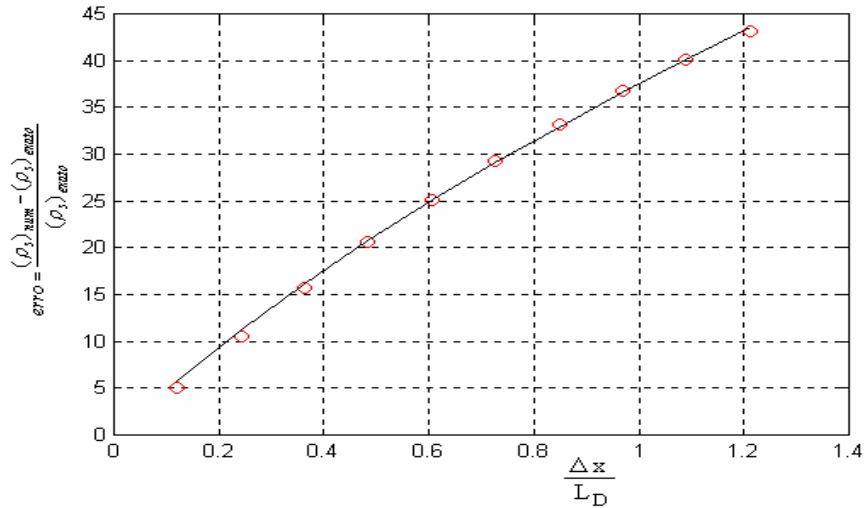


Figura 3.6 – Erro relativo no cálculo da densidade de carga na interface, devido a discretização espacial, pelo processo numérico (O) e pela expansão em série de Taylor até ordem 4. (S) (eq.(3.16)).

3.4.1) Distribuição de Erros no Problema de uma Membrana Esférica

A Figura (3.7) mostra uma representação esquemática de uma membrana esférica com um campo elétrico aplicado na direção x . O ângulo entre a direção do campo e a direção do vetor de posição de um ponto na superfície da membrana é designado por q . Em virtude da simetria da membrana em relação à direção do campo, a coordenada q é a única coordenada relevante em nossa discussão.

No estudo que passaremos a discutir foram realizadas simulações com membranas de diversos tamanhos, usando uma mesma malha tridimensional de cubos com aresta 1mm. A fim de podermos comparar diretamente os resultados obtidos com membranas de diferentes tamanhos, mantivemos as mesmas proporções entre o raio da membrana e os comprimentos dos eixos que definem a extensão da região de análise em cada direção ortogonal. As proporções utilizadas foram: $L_x=4a$ e $L_y=L_z=2a$. Esses comprimentos correspondem apenas a um oitavo do espaço total que envolve a membrana, sendo essa redução possível em virtude da simetria da forma esférica.

O campo aplicado em todos os casos foi de 1000 V/cm na direção x , e foi obtido a partir de potenciais definidos sobre os planos em $x=L_x$ e $x=0$. Em relação aos demais planos limitantes do espaço de análise ($y=0, y=L_y, z=0, z=L_z$), foi assumido que as componentes perpendiculares do campo e das correntes se anulam sobre eles. De acordo com as equações

(1.52) e (1.53), o potencial de membrana cresce exponencialmente no tempo, e assume uma distribuição cosenoidal em relação ao ângulo q . O valor máximo previsto de potencial ocorre nos pólos da célula, ou seja, em $q=0$ e $q=p$ rad, e é dado por:

$$V_p = 1.5 a E_o \quad (3.17)$$

onde a é o raio da membrana e E_o é o campo aplicado. Todos os potenciais apresentados a seguir são normalizados em relação ao valor V_p . A Figura (3.8a) mostra a distribuição angular de potenciais para três diferentes raios de membrana, 2mm, 6mm e 10mm. A linha contínua representa o valor previsto teoricamente. A Figura (3.8b) mostra a distribuição angular do erro relativo para o raio da membrana variando de 2 a 10mm. Observa-se que o erro é menor para as células de maior raio. Conforme discutido no capítulo 2, seção 2.4, a resolução finita da malha não permite uma definição precisa de objetos pequenos. Então, o erro introduzido

pela discretização espacial depende da relação entre as arestas dos elementos retangulares do espaço discreto e as dimensões dos objetos representados nesse espaço. Observa-se também que para a maior membrana, cuja relação raio da membrana/aresta do cubo é de 10:1, o erro é menor que 2% até cerca de 0.8 radianos e menor que 10% até 1.2 radianos. A partir dessa posição o erro torna-se grosseiro. Esse problema que ocorre em ângulos grandes deve-se principalmente à distorção grosseira da curva discretizada, nessa região, em relação à forma esférica. Por outro lado, como o potencial tende a se anular na direção $\pi/2$ radianos em relação ao campo aplicado, para qualquer resolução finita da malha o erro relativo próximo dessa posição tende a aumentar indefinidamente.

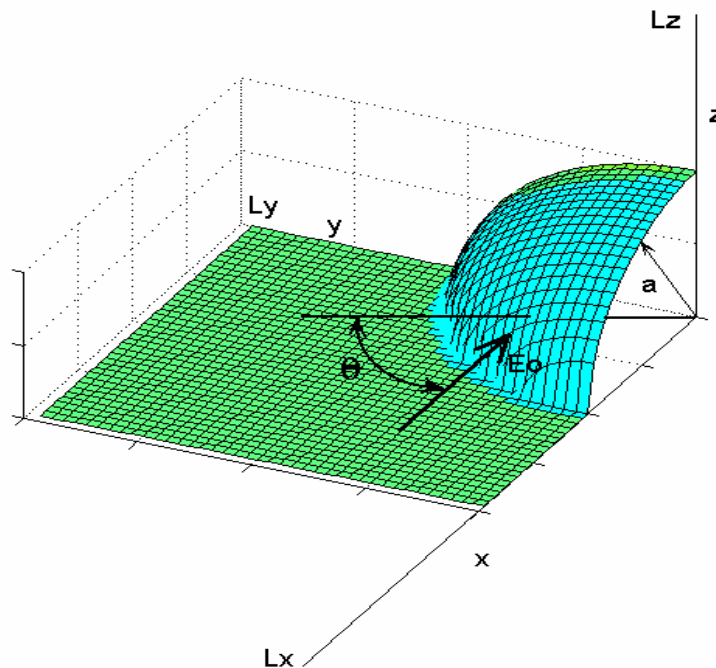


Figura 3.7 – Representação esquemática de uma membrana esférica em um campo elétrico uniforme. A posição de um ponto na superfície da membrana é identificada pelo ângulo q . A região de análise foi limitada à um oitante do espaço tridimensional em virtude da simetria esférica da membrana. Essa região é um paralelepípedo com arestas L_x , L_y e L_z .

Consideremos agora o efeito da discretização “mais fina” que foi discutida no capítulo 2. Trata-se de dividir cada bloco que envolve a membrana em um certo número de blocos menores de modo a melhorar a resolução espacial e com isso a definição da membrana. A Figura (3.9) mostra a distribuição de erros para três raios, 2mm, 6mm e 10mm, sendo que na região de alta resolução, em torno da membrana,

cada bloco foi dividido em 27 blocos menores, o que representa uma melhoria da resolução por um fator de 3 em cada eixo. Observa-se que o aumento local da resolução da malha em torno da membrana não proporcionou nenhuma melhoria perceptível na precisão do cálculo do potencial.

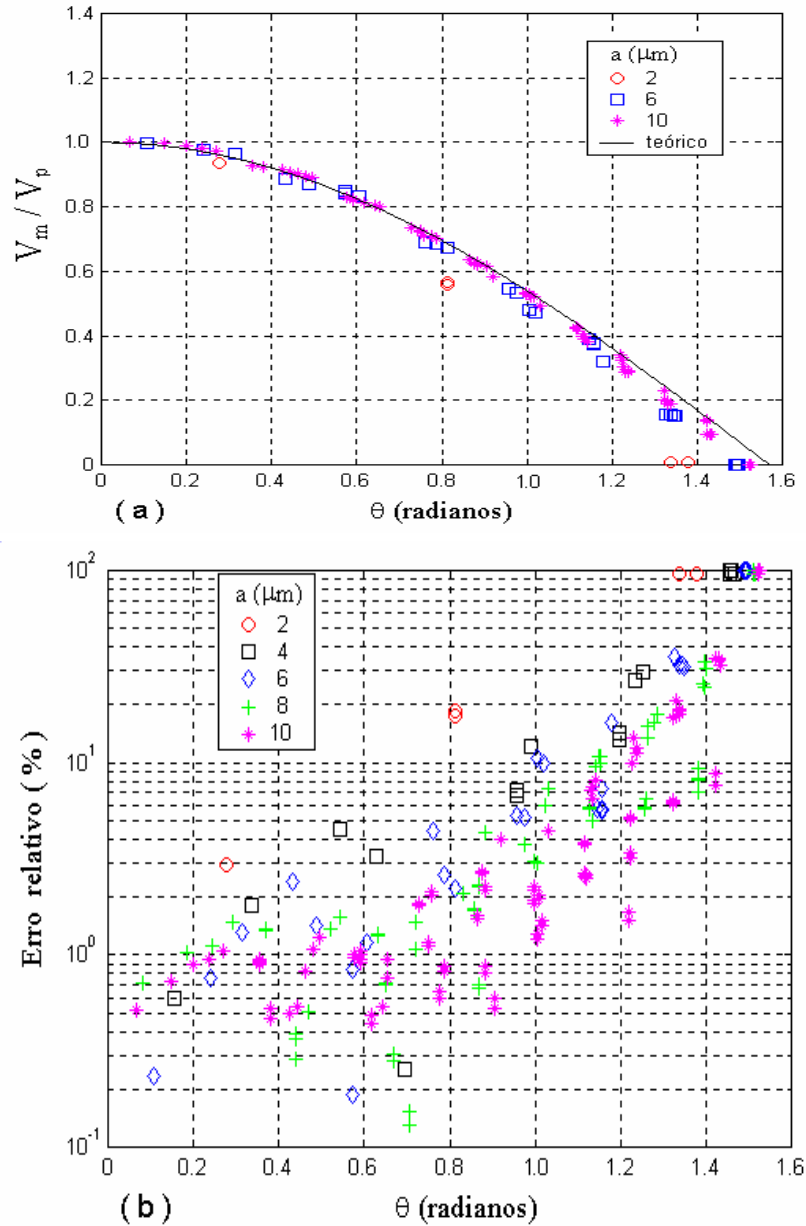


Figura 3.8 – Distribuição angular de potencial na membrana. (a) potencial normalizado para três tamanhos de membrana. A linha contínua representa a distribuição teórica co-senoidal. (b) erro em relação ao potencial teórico para diversos tamanhos de membrana.

O efeito da discretização sobre a variação no tempo do potencial de membrana também foi avaliado. De acordo com a equação (1.52), para uma excitação do tipo degrau, o potencial de membrana cresce exponencialmente, tendendo ao valor de regime permanente dado pela distribuição co-senoidal. O valor da constante de tempo é dado pela equação (1.53). A resposta obtida numericamente para todos os raios de 2 a 10mm, também tem a forma de exponencial crescente, e as constantes de tempo calculadas das curvas obtidas, são mostradas na Figura (3.10). Observa-se que a constante de tempo calculada numericamente apresenta a dependência linear esperada com o raio da membrana. Existe, contudo, um erro considerável em relação à previsão teórica, que na média dos cinco raios utilizados nessas simulações situa-se em torno de 22%. Observa-se também que o uso da malha de alta resolução em torno das membranas diminuiu apenas levemente o erro numérico.

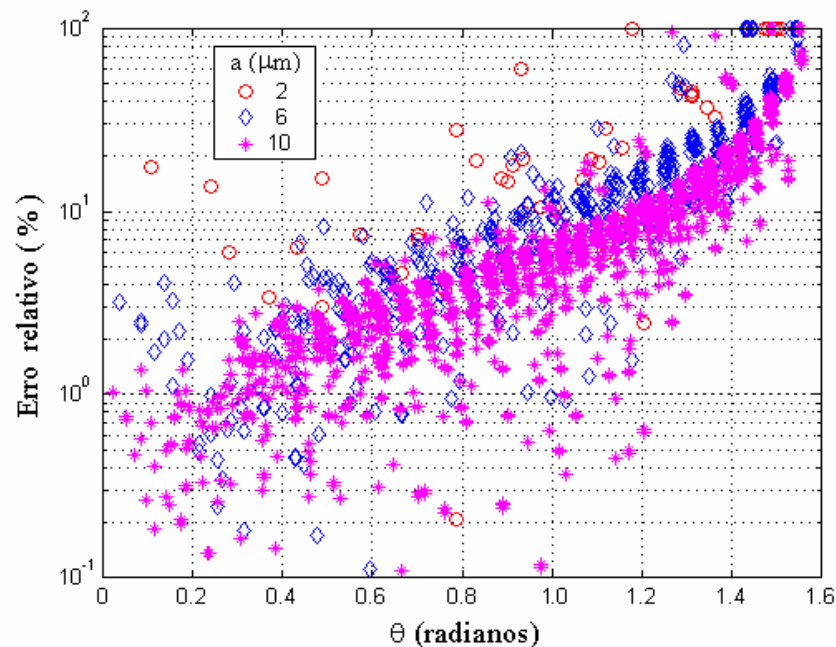


Figura 3.9 – Distribuição de erro no potencial em relação ao valor previsto teoricamente pela equação (1.52) para três membranas com raios diferentes em uma malha com região de alta resolução em torno da membrana. A malha regular é construída com blocos de aresta 1mm. A região de alta resolução é obtida dividindo-se cada bloco regular em torno da membrana em 27 blocos idênticos.

Então, a malha de alta resolução local em torno da membrana tem pouca influência na precisão do cálculo do potencial na membrana, tanto em relação à sua

variação no tempo quanto ao seu valor em regime permanente, no caso de uma célula isolada. Contudo, o que justifica o uso dessa discretização mais “fina”, de acordo com a discussão feita no capítulo 2, é a necessidade de representar pequenas distâncias entre membranas, nos espaços intersticiais nos tecidos. Nesse caso, certamente o uso de uma malha mais “fina” será fundamental para modelar a condução iônica nessas regiões, e isso influenciará decisivamente a precisão do cálculo. De qualquer modo, ao analisar agregados de células, não se pode esperar precisão melhor que aquelas obtidas neste estudo com células isoladas.

3.4.2) Tempo de Processamento

Ao realizar as simulações cujos resultados foram apresentados na seção anterior, uma das informações armazenadas em cada caso foi o tempo necessário para que o sistema computacional realizasse todas as iterações programadas, o que chamamos de tempo de simulação. A Figura (3.11) mostra os tempos de simulação como função do número de nós do circuito equivalente, para 2000 iterações realizadas. Nessa figura são apresentados os resultados obtidos em três situações diferentes de simulação, dependendo da malha ser regular (reg) ou de alta resolução (ar) e dos parâmetros usados no acelerador. O acelerador é um recurso computacional que criamos para aumentar a velocidade de processamento quando as variações de potencial entre as iterações são muito pequenas. Para acessar esse recurso é necessário especificar uma variação relativa mínima entre iterações e um número de iterações que serão aceleradas. Quando, entre duas iterações, a variação relativa de potencial em todos os nós do circuito for menor que o limite mínimo estipulado, o acelerador entra em ação, eliminando o cálculo do potencial nas próximas iterações, pelo número de iterações especificado. O potencial é então considerado constante durante esse período. Como o cálculo do potencial em cada nó do circuito é a fase mais demorada em cada iteração, esse recurso proporciona uma redução considerável no tempo de simulação. Isso se percebe claramente na Figura (3.11), ao aumentar o limiar de aceleração em 10 vezes. Um limiar maior é mais facilmente atingido e assim, o acelerador é disparado mais vezes, proporcionando maior velocidade de simulação.

Por outro lado, não se percebe nenhuma diferença no tempo de simulação, entre usar a malha regular ou com uma região de alta resolução em torno da

membrana. Como se sabe, os computadores apresentam diferentes velocidades de processamento, dependendo tanto das características de hardware, como tipo de processador central, tipo e quantidade de memória RAM instalada, etc; quanto das características de funcionamento do sistema

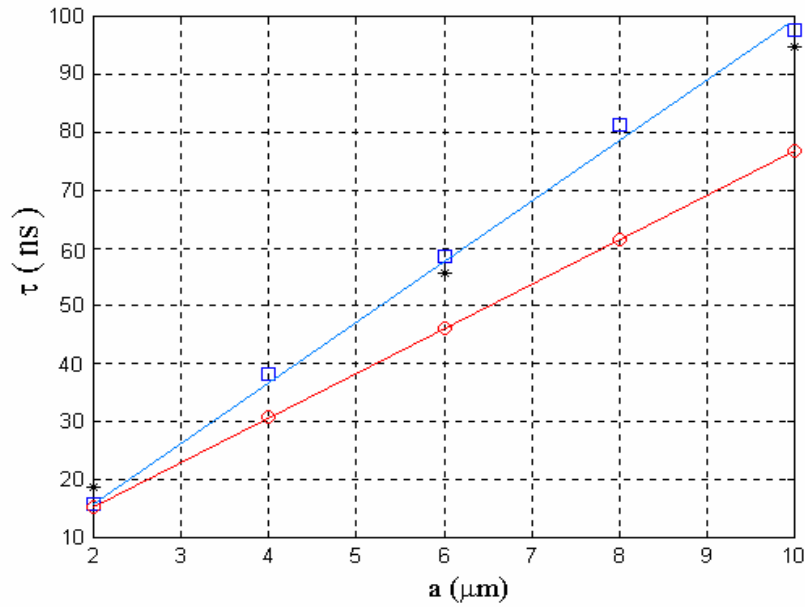


Figura 3.10 – Constante de tempo de carregamento da membrana como função de seu raio. (O) Valor teórico dado pela equação (1.53). (•) Valor numérico obtido com malha regular. (*) Valor numérico obtido com malha de alta resolução em torno da membrana.

operacional instalado. Além das características operacionais da máquina, outros fatores importantes na limitação da velocidade de processamento na simulação numérica, relacionam-se à forma de implementação do programa simulador. A linguagem de programação utilizada bem como o algoritmo implementado têm influência muito grande no desempenho do sistema computacional em uma simulação numérica. Toda essa complexidade torna a análise do desempenho do sistema computacional ao realizar uma simulação numérica, uma tarefa essencialmente empírica. Os resultados mostrados na Figura (3.11) são válidos apenas no computador que utilizamos e com o programa de simulação que criamos. Contudo, está claro que o uso do acelerador aumenta significativamente a velocidade de simulação. Notamos também que os valores 0.01 para o limiar de aceleração e 10 para

o número de iterações aceleradas constituem um compromisso muito bom entre velocidade e precisão.

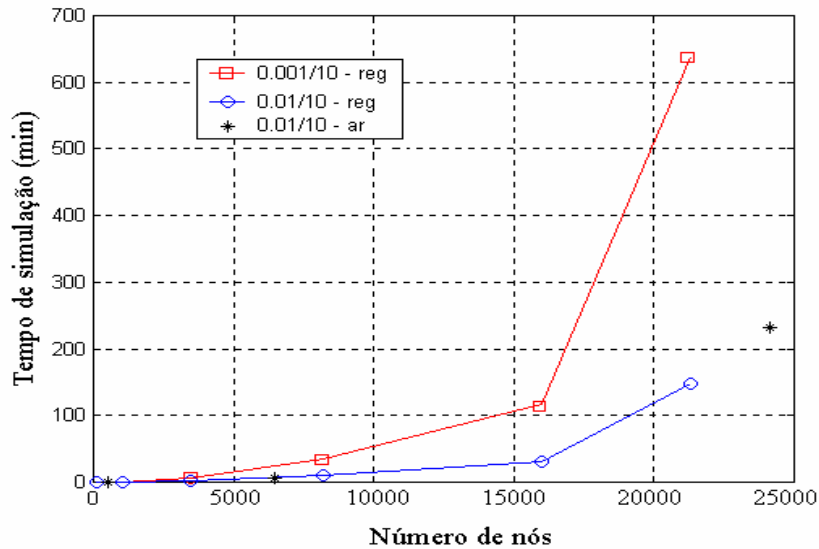


Figura 3.11 – Tempo de simulação como função do número de nós no circuito equivalente para as simulações discutidas na seção (3.4.1). reg - malha regular, ar - malha de alta resolução em torno da membrana. Os valores numéricos nas legendas indicam o limiar de aceleração e o número de iterações a acelerar. Nota-se que o aumento do limiar em 10 vezes proporciona uma grande redução no tempo de simulação.

3.5) CRITÉRIO PARA ESTABILIDADE DO MÉTODO ITERATIVO NO MODELO EM ESCALA DE TECIDO

A estabilidade no método iterativo para o modelo em escala de tecido depende da escolha de um passo de tempo (Δt) menor que os tempos de relaxação do material. Essas constantes de tempo estão relacionadas às bandas de dispersão **a**, **b** e **g** (ver Figura (2.6)) e à relaxação do condutor, representado pelos elementos ϵ_{\parallel} e S_s . Desconsiderando a banda **g**, cuja faixa de frequências associadas está muito além do escopo deste trabalho, sabemos que as bandas **a** e **b** apresentam tempos de relaxação bem maiores que a relaxação do condutor. Então, o fator limitante do passo de tempo é a constante de tempo $t_c = \epsilon_{\parallel} \epsilon_0 / S_s$ para o condutor. Entretanto, se nos basearmos no circuito equivalente de um meio, representado nesse caso apenas por c_{\parallel} e g_s entre cada par de nós, como mostra a Figura (3.12), observaremos que para cada capacitor

existe uma condutância paralela diferente de g_s , porque existem outros caminhos diferentes de g_s , pelos quais a corrente de descarga de c_{Ψ} pode circular.

Usando o conceito de constante de tempo de circuito aberto proposto por Gray e Searle [62], podemos obter uma boa estimativa da condutância paralela a qualquer capacitor c_{Ψ} , eliminando todos os outros capacitores do circuito, os quais serão substituídos por circuitos abertos, e associando as condutâncias g_s que fazem as conexões dos nós considerados com os seus vizinhos mais próximos. Supondo que todos as condutâncias são idênticas, essa aproximação leva ao valor $g_{eq} \approx 2.5 g_s$. Assim, a constante de tempo de relaxação do condutor é cerca de 40 % menor que o tempo t_c calculado acima. Consideramos então que essa deva ser a referência para escolha do passo de tempo para o método iterativo com o modelo em escala de tecido, ou seja, que $dt < 0.4t_c$.

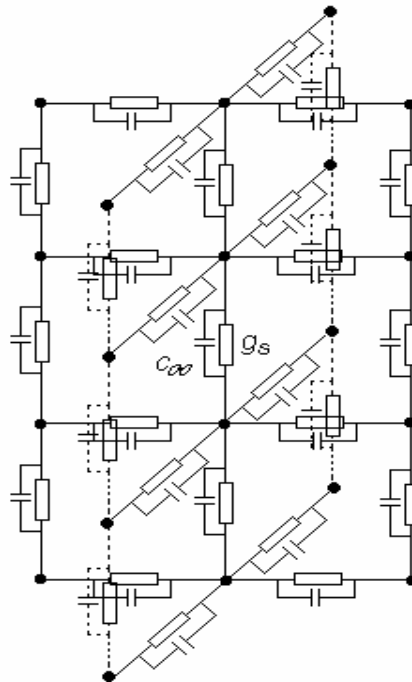


Figura 3.12 – Circuito equivalente em uma representação tridimensional de um material segundo o modelo em escala de tecido. Os ramos relativos às dispersões **a** e **b** foram ignorados porque apresentam tempos de relaxação muito altos comparados à relaxação do condutor.

3.6) LIMITE DE FREQUÊNCIA DO MCE

O MCE é um método aplicável a baixas e médias frequências. A modelagem do transporte elétrico no meio através de capacitâncias e condutâncias concentradas

pode fornecer resultados confiáveis apenas na faixa de frequências onde os efeitos indutivos e a perda por irradiação possam ser considerados desprezíveis.

Uma análise precisa das relações entre energia armazenada, dissipada e irradiada está além do escopo desse trabalho, porém uma estimativa do limite de frequência associado à perda por irradiação pode ser obtida considerando a teoria de irradiação de um dipolo elétrico oscilante. Segundo Jackson [50], em torno de um dipolo elétrico oscilante, existe uma região que se estende aproximadamente até um comprimento de onda, dentro da qual, o campo elétrico, apesar de variar no tempo, tem uma distribuição idêntica à de um dipolo estático. Essa região é chamada de zona próxima e dentro dela a energia irradiada é desprezível quando comparada com a energia armazenada. As ondas se formam na chamada zona afastada ou de radiação, distante da fonte por mais de um comprimento de onda. Polk [63] também discute essa questão afirmando que dentro de um raio inferior a um sexto do comprimento de onda de uma antena tipo dipolo curto, o campo é predominante não irradiante. Se aplicarmos o critério de que as dimensões físicas do tecido devem ser menores ou no máximo igual a um sexto do comprimento de onda do campo irradiante, para podermos aplicar os modelos de elementos concentrados, então teremos um critério para especificar a frequência máxima de validade do método. Por exemplo, usando a permissividade da água, que é a substância mais abundante em tecidos biológicos e especificando um volume padrão correspondente a uma esfera de raio 1cm, obtemos o limite de frequência de 566 MHz. Obviamente, para volumes maiores de tecido, o limite de frequência será menor.

O outro aspecto importante a considerar é a influência da indução magnética nas distribuições de potencial em um tecido excitado por campos elétricos. É esperado que essa influência seja pequena em frequências baixas, porque tanto a condutividade quanto a permeabilidade magnética de materiais biológicos são, em geral, pequenas. Mas qual é o limite de frequência para o qual o campo elétrico induzido por fluxo magnético variável em um tecido pode ser desprezado em comparação com o campo gerador da corrente? Uma análise simplificada pode nos conduzir à resposta. Consideremos um material homogêneo, de condutividade σ e permeabilidade μ , excitado por um campo elétrico uniforme E_0 variando no tempo com forma de onda senoidal. A Figura (3.13) mostra o esquema de análise. A corrente que se estabelece tem densidade $J = \sigma E_0$. Essa corrente produz um campo magnético na direção do

ângulo azimutal, e segundo a Lei de Ampere, seu módulo é dado por $H=Jr/2$, onde r é a distância do ponto considerado à origem. Se imaginarmos uma espira de forma retangular em um plano paralelo ao campo aplicado passando pela origem, conforme mostra a Figura (3.13b), podemos usar a Lei de Faraday para calcular o campo elétrico induzido pela variação do fluxo magnético através de sua área. A amplitude do campo induzido é dada por $E'_m = (\pi m_s / 2) r^2 f E_{om}$, onde f é a frequência e E_{om} é a amplitude do campo aplicado. Assim, usando $r = 1\text{cm}$, $s = 10\text{mS/cm}$ (um valor típico para tecidos biológicos), e especificando que o campo induzido não deve ser maior que 1% do campo aplicado a fim de podermos ignorar os efeitos indutivos, obtemos a frequência máxima de 50MHz. Este limite pode ser aumentado se for tolerado um efeito indutivo mais intenso, ou pode ser menor para amostras de maior volume. Por exemplo, para $r = 2\text{cm}$, o frequência máxima para 1% de indução cai para 12.5Mhz, mas se for tolerado até 10% de indução, o limite será 125MHz.

Por fim, devemos esclarecer duas questões: 1) Os limites calculados se aplicam exclusivamente na análise em escala de tecido, pois em escala celular as dimensões da amostra são no máximo de algumas centenas de micrometros, o que implica em limites muito maiores. 2) Considerando que a banda β de dispersão tem como maior contribuição a relaxação dipolar da água, que ocorre em frequências de microondas (cerca de 20GHz), o seu uso no modelo em escala de tecido, cuja aplicação estará normalmente limitada em frequência em no máximo 100 MHz, torna-se injustificável. Contudo, pode haver contribuições relevantes em frequências muito mais baixas associados à relaxação dipolar de grandes moléculas polares, como proteínas, e nesse caso, a banda β deverá ser considerada.

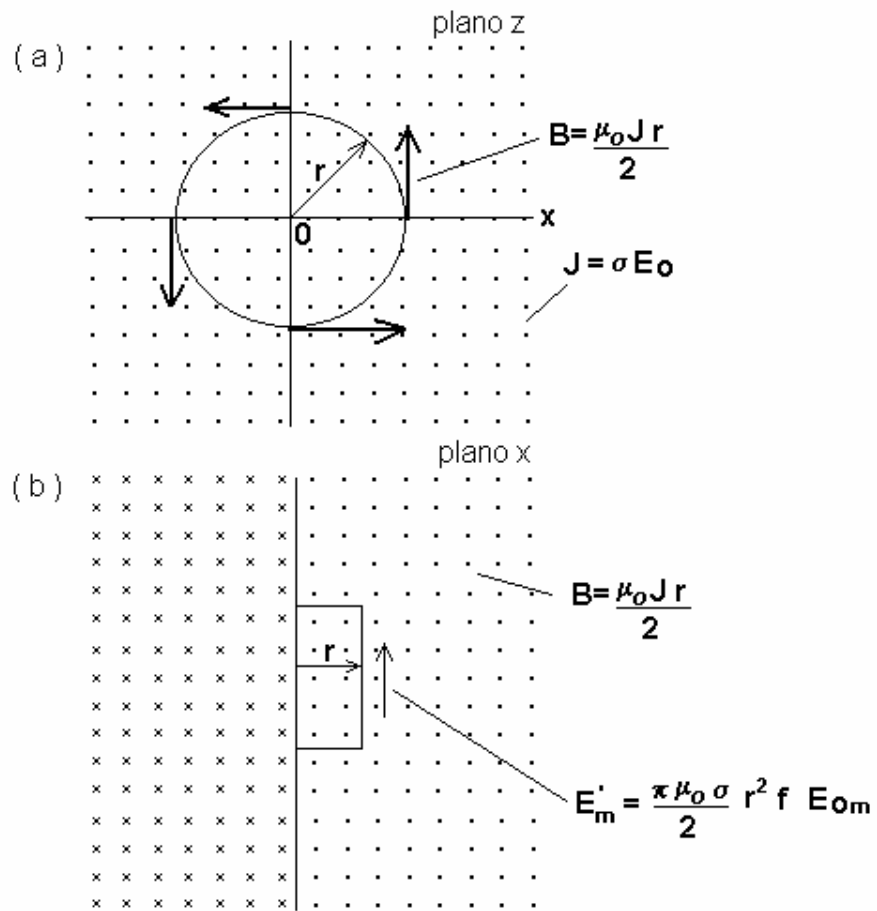


Figura 3.13 – Ilustração para o cálculo simplificado do efeito indutivo em tecidos biológicos. (a) plano azimuthal. O campo aplicado é perpendicular a esse plano. (b) plano longitudinal. O campo induzido tem a mesma direção do campo aplicado e amplitude proporcional.

CAPÍTULO 4 – APLICAÇÃO DO MCE EM SISTEMAS BIOLÓGICOS

A modelagem numérica de sistemas biológicos, envolvendo eletrólitos e células vivas, constitui uma tarefa de razoável complexidade. Uma das grandes dificuldades reside na representação da geometria das células. As formas reais das células são em geral muito complexas. Além disso, a relação entre o diâmetro ou comprimento de uma célula e a largura do espaço intersticial, dificulta a construção de uma malha de discretização que permita boa representação da condução e difusão nesses espaços muito estreitos e, ao mesmo tempo, não produza um sistema de equações muito grande. Contudo, as aplicações que apresentaremos nesta tese tratam de modelos simples de tecidos, onde as células são representadas por entidades geométricas regulares, como cilindros, esferas e paralelepípedos, representando por exemplo, células musculares, eritrócitos e células epiteliais, respectivamente. Assim, poderemos ter uma boa visão do poder de análise que o MCE proporciona, com a conveniência de contar com a regularidade e simetria dessas formas simples para facilitar a discretização.

4.1) TECIDO MUSCULAR

A Figura (4.1) mostra o modelo de músculo esquelético que usamos nesta análise. As fibras musculares são aproximadas por cilindros de base circular. Devido ao grande comprimento das fibras musculares, esta análise foi realizada apenas no plano perpendicular ao comprimento das fibras. A aglutinação de muitas fibras forma feixes e vários feixes reunidos formam o músculo. Em músculos reais, as fibras e os feixes se ligam entre si através de fibras reticulares de tecido conjuntivo [64]. Nesta análise, contudo, ignoramos o papel do tecido conjuntivo nas propriedades do meio e consideramos o espaço intra e extra celular preenchido somente por eletrólito. Os detalhes geométricos de um grupo de fibras são mostrados na quadro ampliado da Figura (4.1). Como já explicado no Capítulo 2, o modelo em escala celular considera que apenas a interação com as células vizinhas é relevante para a análise das propriedades de um agregado de células. Em virtude da simetria existente nessa estrutura de células circulares, o espaço analisado é exatamente aquele do quadro ampliado, limitado pelos planos A, B, C e D. O diâmetro das fibras foi fixado em $50\mu\text{m}$ (típico de músculo esquelético de cão [1]) e a separação mínima entre células vizinhas é $1\mu\text{m}$. A fibra marcada com o ângulo θ é a célula alvo, sobre a qual todos

os cálculos locais ou de valores médios macroscópicos serão realizados. As propriedades do meio que são relevantes nesta análise são mostradas na Tabela (4.1).

A malha de discretização foi construída com dois níveis de resolução, usando elementos quadrados. Como mostra a Figura (4.2), a malha de baixa resolução ocupa a maior área longe das membranas. A malha de resolução maior em torno das membranas, foi obtida dividindo-se cada quadrado “grande” em 25 quadrados menores. Isso significa uma melhoria na resolução por um fator de 5 em cada eixo. Com isso, a geometria do interstício celular pôde ser bem representada. Em toda a região retangular analisada existem 92 x 50 divisões nos eixos x e y , respectivamente, resultando em 4600 quadrados de aresta $h=1.75 \mu\text{m}$. Devido à alta concentração de nós na região em torno das membranas, o número total de nós na malha cresce para 12664.

O número de conexões de cada nó depende de sua posição na malha. Os nós nos planos de simetria fazem três conexões. Os nós “grandes” no volume podem fazer 4, 8, 12

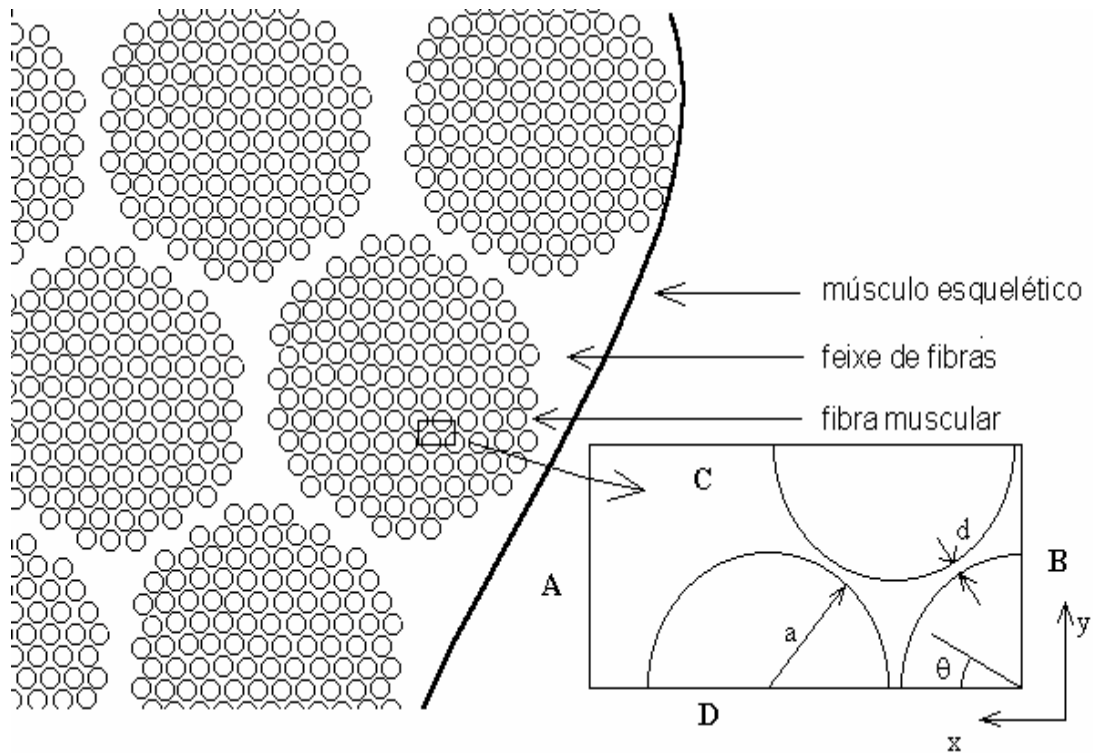


Figura 4.1 – Modelo de músculo esquelético em duas dimensões. A análise local dentro de um feixe é realizada na região retangular expandida. Nos planos A e B são fixados os potenciais de fonte. Os Planos C e D são superfícies de simetria, sobre as quais, as componentes perpendiculares do campo elétrico e das densidades de corrente se anulam. Para o músculo esquelético de cão, $a \approx 50 \mu\text{m}$ [1] e d foi fixado arbitrariamente em $1 \mu\text{m}$.

TABELA 4.1
 PROPRIEDADES ELÉTRICAS DO MEIO

Parâmetro	Valor
Densidade iônica	Na ⁺ 0.14 M (13.5 C/cm ³) Cl ⁻ 0.14 M (13.5 C/cm ³)
Mobilidade iônica na água ^a	Na ⁺ 5.2x10 ⁻⁴ cm ² V ⁻¹ s ⁻¹ Cl ⁻ 7.9x10 ⁻⁴ cm ² V ⁻¹ s ⁻¹
Coefficiente de difusão na água ^a	Na ⁺ 1.33x10 ⁻⁵ cm ² s ⁻¹ Cl ⁻ 2.03x10 ⁻⁵ cm ² s ⁻¹
Permissividade do eletrólito ^b	78
Capacitância de membrana ^c	10 ⁶ F/cm ²

A composição do líquido tecidual foi simplificada para apenas dois íons. Os valores entre parênteses são as densidades de carga.

^a Valores para 298 K [18].

^b Foi considerado apenas a contribuição da água.

^c Valor típico para membranas biológicas [1]

ou 16 conexões, dependendo do número de faces em contato com a região de alta resolução. Quando dois nós estão em faces opostas da membrana, a conexão entre eles é feita apenas pela capacitância de membrana.

As condições de contorno são especificadas na Figura (4.1). Nos planos A e B são fixados os potenciais de fonte. O plano B na verdade é um plano de simetria ímpar para as distribuições de potencial e densidade de carga, de modo que, para estabelecer o campo elétrico a partir de uma fonte simétrica de potenciais, basta aplicar um dos potenciais em A e manter o potencial em B no valor zero. Os planos C e D são superfícies de simetria par. Assim as componentes perpendiculares do campo elétrico e das densidades de corrente se anulam nesses planos.

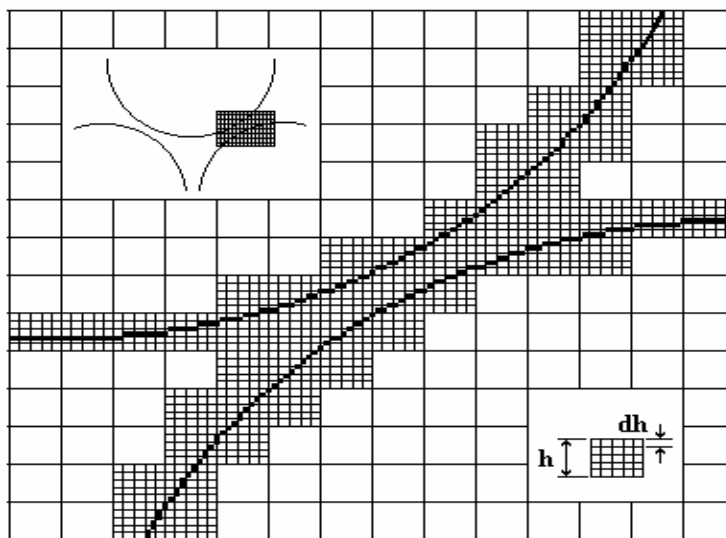


Figura 4.2 – Visão expandida de uma pequena região da malha de discretização.

4.1.1) Resultados Usando Degrau de Campo Elétrico

A estimulação do tecido com campo elétrico na forma de degrau foi testada na primeira simulação. O campo aplicado foi de 100 V/cm. Executamos 20000 iterações com passo de tempo de 0.3 ns, o que corresponde ao intervalo de tempo de 6 μ s. Na Figura (4.3) são mostradas as distribuições de potencial e módulo da corrente total no meio, ao final desse intervalo. Considera-se que o sistema tenha alcançado o estado de regime permanente, pois a constante de tempo de carregamento da membrana de uma célula isolada nesse eletrólito seria $\tau = 565$ ns, segundo a equação (1.63). Essas distribuições refletem claramente o papel das membranas em tecidos biológicos. Sendo praticamente isolantes, as membranas celulares suportam toda a diferença de potencial aplicada à célula (até o limite de ruptura) e, desse modo, o eletrólito interno da célula torna-se um volume equipotencial após o período transitório de carregamento da membrana. Esse período pode ser estimado como sendo aproximadamente 5τ , ou seja, cerca de 2.8 μ s. A corrente, por sua vez, tende a se concentrar nos espaços intersticiais. Embora não tenha sido mostrado, a corrente nos instantes iniciais distribui-se de maneira quase uniforme no volume. Isto ocorre porque as membranas estão inicialmente descarregadas, permitindo que o potencial aplicado se distribua de maneira quase uniforme no eletrólito. Com o carregamento gradual

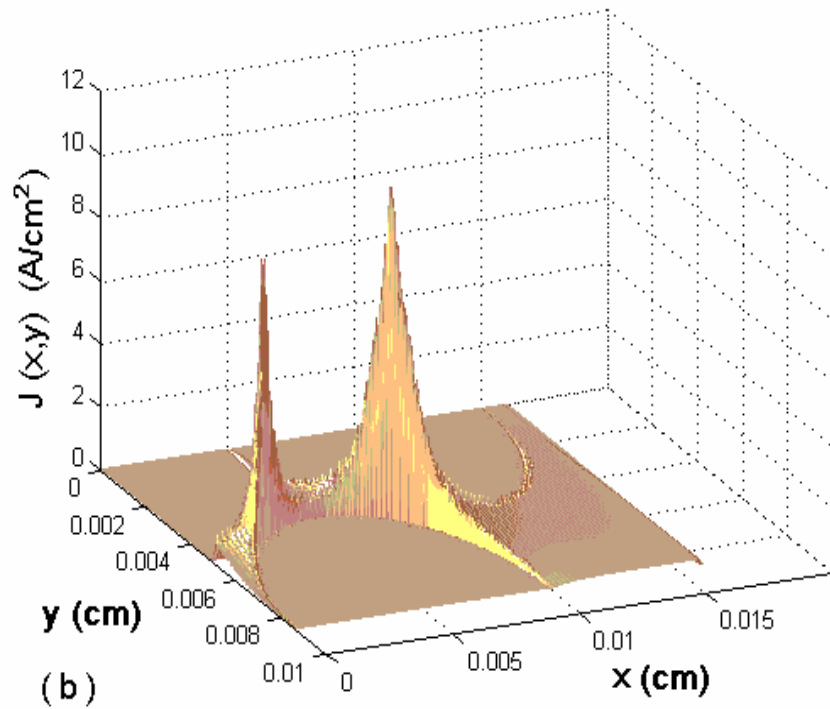
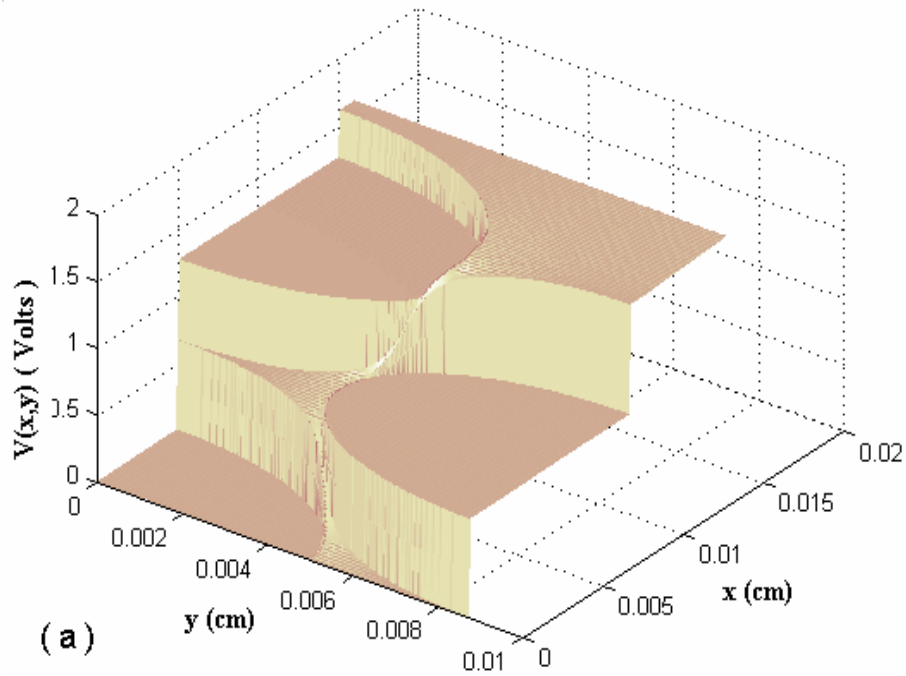


Figura 4.3 – Distribuições de (a) potencial e (b) corrente total no tecido muscular obtido por simulação numérica bidimensional com a aplicação de um degrau de campo elétrico de 100 V/cm durante 6 μ s.

das membranas no período 5τ , as correntes internas nas células tendem a zero e a corrente total circula apenas no espaço disponível externamente às células.

A Figura (4.4) mostra a distribuição angular de potencial na membrana para a célula alvo, na condição de regime permanente. Também são mostrados dois outros resultados: a simulação de uma célula isolada e a distribuição teórica definida pela equação (1.64). No caso da célula isolada, todos os detalhes da simulação são iguais aos do tecido, exceto pela ausência de células vizinhas.

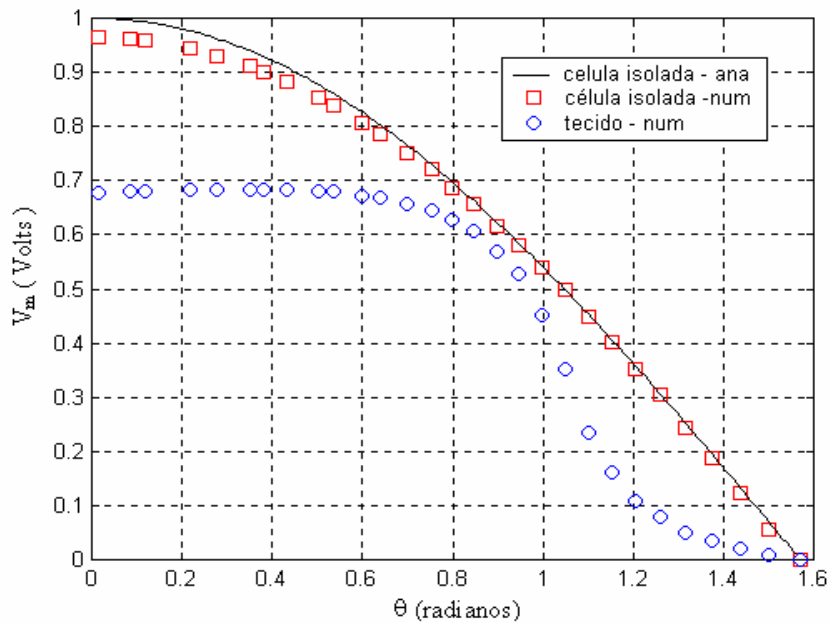


Figura 4.4 – Distribuição angular de potencial na membrana da célula alvo obtida com a aplicação de um campo elétrico com 100 V/cm de intensidade durante $6\mu s$. Também é apresentada a distribuição para uma célula isolada nas mesmas condições de simulação e a curva co-senoidal teórica dada pela equação (1.64).

Vemos que há muito boa concordância entre o resultado numérico e o modelo analítico para uma célula isolada. Contudo, a distribuição de potencial na célula cercada pelas vizinhas mais próximas é bem diferente. Observa-se uma forte distorção nas regiões de maior proximidade entre células. Esse efeito pode ser justificado pela redução da corrente iônica perpendicular à membrana nessas regiões devido à proximidade entre as células.

A Figura (4.5) mostra a variação no tempo do potencial de membrana na posição $\theta = 0$, para a célula alvo no tecido e para uma célula isolada. As linhas contínuas mostram

os modelos analíticos cujos parâmetros constante de tempo e potencial em regime permanente foram ajustados para obter a melhor representação possível dos resultados numéricos. O resultado analítico dado pelas equações (1.63) e (1.64) também é mostrado para comparação. Observa-se um erro de cerca de 3% na amplitude e 17% na constante de tempo para a célula isolada. Por outro lado, o potencial de membrana no tecido tem o comportamento de um processo de relaxação de segunda ordem com duas constantes de tempo bem diferentes. Nesse caso, podemos escrever a equação do potencial na forma:

$$V_m = V_1(1 - e^{-t/t_1}) + V_2(1 - e^{-t/t_2}) \quad (4.1)$$

O quadro de legendas na Figura (4.5) mostra os valores obtidos no ajuste dos modelos teóricos aos resultados numéricos.

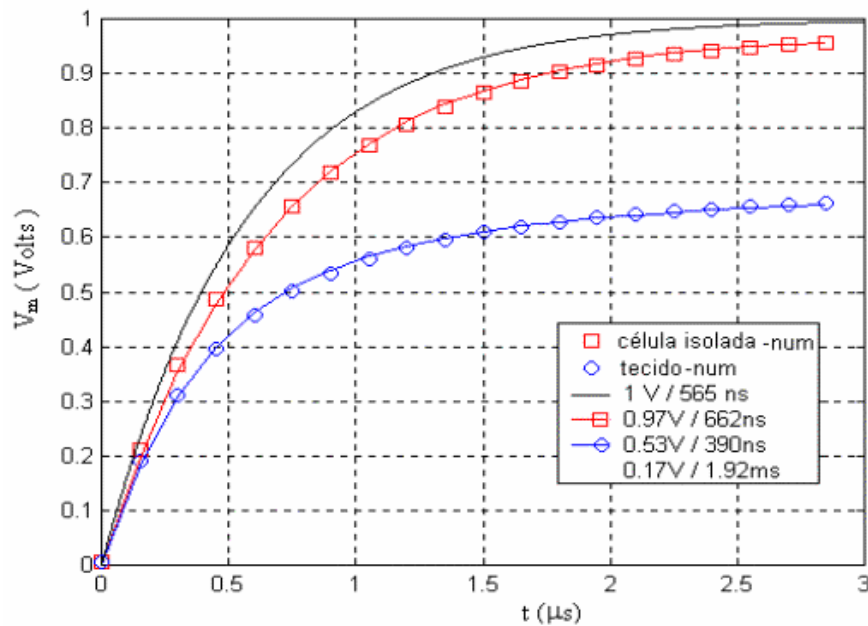


Figura 4.5 – Variação temporal do potencial de membrana em $\theta=0$ para uma excitação com campo elétrico de 100 V/cm. Os símbolos representam resultados de simulação. As linhas contínuas são obtidas de modelos de relaxação de primeira ordem para a célula isolada e de segunda ordem para o tecido. Os valores de potencial em regime permanente e constante de tempo foram ajustados para obter uma representação dos valores numéricos com erro médio mínimo. O quadro de legendas mostra os valores obtidos para esses parâmetros. A curva correspondente ao modelo analítico dado pelas equações (1.63) e (1.64) também é mostrada para comparação.

4.1.2) Resultados Usando Pulso de Campo Elétrico

No segundo experimento numérico o campo elétrico aplicado teve a forma de um pulso de 100 V/cm e duração de 30 ns. O objetivo dessa simulação é a análise de dispersão

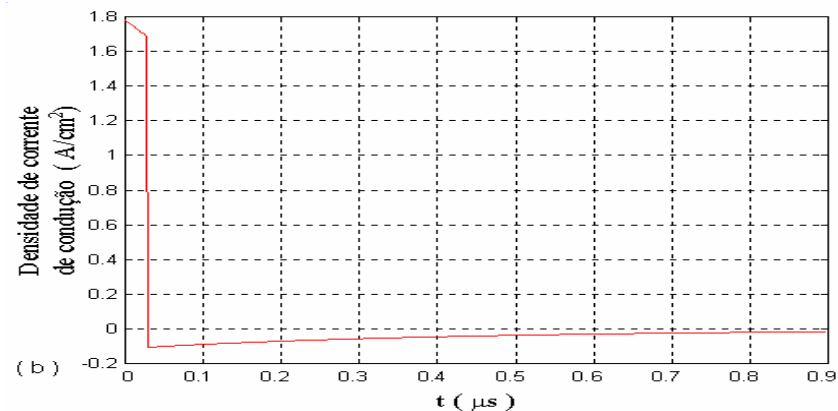
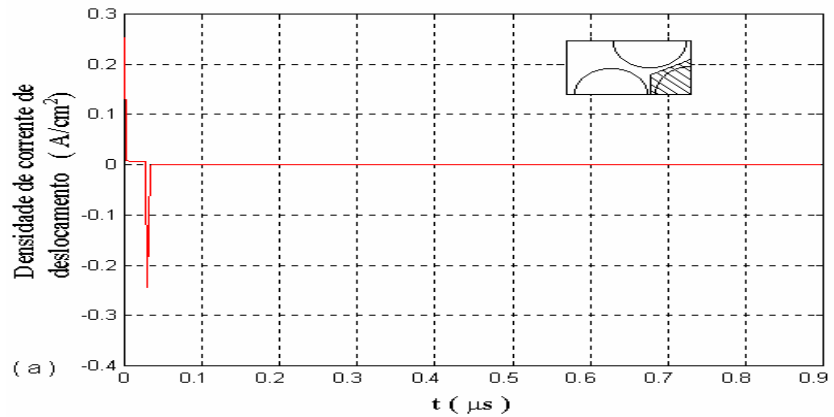
dielétrica no tecido. Definimos um volume efetivo em torno da célula alvo como sendo o volume interno da célula mais a fração de volume extra-celular que pode ser atribuída a cada célula no tecido. A Figura (4.6) mostra a variação no tempo das densidades médias de corrente de condução e deslocamento, bem como do campo elétrico médio no volume efetivo da célula alvo. Usando a análise de Fourier, os espectros de frequência da corrente total e do campo elétrico foram calculados e, com eles, a admitância específica do tecido foi obtida. Teoricamente seu valor pode ser escrito em termos da condutividade e da permissividade do meio, através da equação:

$$\mathbf{g}(\boldsymbol{\omega}) = \mathbf{J}(\boldsymbol{\omega}) / \mathbf{E}(\boldsymbol{\omega}) = \mathbf{s}(\boldsymbol{\omega}) + j\boldsymbol{\omega} \mathbf{e}_o \mathbf{e}(\boldsymbol{\omega}) \quad (4.2)$$

onde $\mathbf{J}(\boldsymbol{\omega})$ e $\mathbf{E}(\boldsymbol{\omega})$ são a densidade de corrente total e campo elétrico no domínio frequência, respectivamente. $\mathbf{s}(\boldsymbol{\omega})$ é a condutividade e $\mathbf{e}(\boldsymbol{\omega})$ a permissividade relativa no domínio frequência; $j = \sqrt{-1}$ e $\mathbf{e}_o = 8.85 \times 10^{-14}$ F/cm. A partir da equação (4.2) podemos obter $\mathbf{s}(\boldsymbol{\omega})$ e $\mathbf{e}(\boldsymbol{\omega})$ como funções de $\mathbf{g}(\boldsymbol{\omega})$. As expressões são as seguintes:

$$\mathbf{s}(\boldsymbol{\omega}) = \text{Re} [\mathbf{g}(\boldsymbol{\omega})] \quad (4.3)$$

$$\mathbf{e}(\boldsymbol{\omega}) = \text{Im} [\mathbf{g}(\boldsymbol{\omega})] / \boldsymbol{\omega} \mathbf{e}_o \quad (4.4)$$



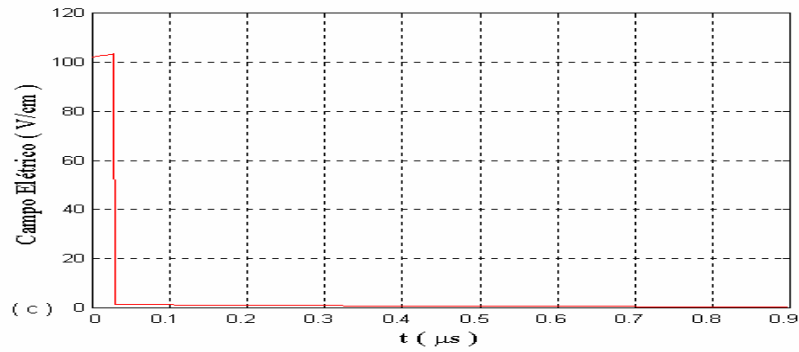


Figura 4.6 – Resposta do tecido à excitação na forma de pulso de campo elétrico com 100 V/cm e 30 ns de duração. (a) Densidade média de corrente de deslocamento (b) Densidade média de corrente de condução. (c) Campo elétrico médio. Os valores médios foram calculados no volume efetivo da célula alvo, mostrado na ilustração inserida no gráfico (a).

Os resultados obtidos para $\mathbf{s}(\omega)$ e $\mathbf{e}(\omega)$ são mostrados na Figura (4.7). As linhas contínuas nesses gráficos representam o modelo baseado na relaxação de primeira ordem. Essa teoria foi apresentada no Capítulo 1 e as equações para $\mathbf{s}(\omega)$ e $\mathbf{e}(\omega)$ são dadas por:

$$\mathbf{e}(\omega) = \mathbf{e}_\infty + \frac{\Delta \mathbf{e}}{1 + \omega^2 t^2} \quad (4.5)$$

$$\mathbf{s}(\omega) = \mathbf{s}_s + \frac{\Delta \mathbf{s} \omega^2 t^2}{1 + \omega^2 t^2}$$

(4.6)

onde as amplitudes de dispersão $\Delta \mathbf{s}$ e $\Delta \mathbf{e}$ estão relacionadas por:

$$\frac{\Delta \mathbf{e}}{\Delta \mathbf{s}} = \frac{t}{\mathbf{e}_o} \quad (4.7)$$

Os parâmetros $\Delta \mathbf{e}$, $\Delta \mathbf{s}$, \mathbf{s}_s e t , podem ser obtidos ajustando-se essas equações teóricas ao conjunto de valores numéricos. Assumindo $\mathbf{e}_\infty = 78$ (a permissividade da água), os valores obtidos são: $\Delta \mathbf{e} = 7.7 \times 10^4$, $\Delta \mathbf{s} = 1.72 \times 10^{-2}$ S/cm, $\mathbf{s}_s = 4.7 \times 10^{-4}$ S/cm e $t = 0.4 \mu\text{s}$.

O mecanismo responsável pela dispersão observada na Figura (4.7) é a polarização interfacial nas membranas das fibras musculares. Portanto, essa dispersão corresponde a banda β do músculo esquelético.

4.1.3) Análise em Escala de Tecido

As análises precedentes permitiram a caracterização local do tecido muscular dentro de um feixe de fibras. Contudo, a caracterização completa de um músculo exige a obtenção da resposta macroscópica em um volume que envolva vários feixes de

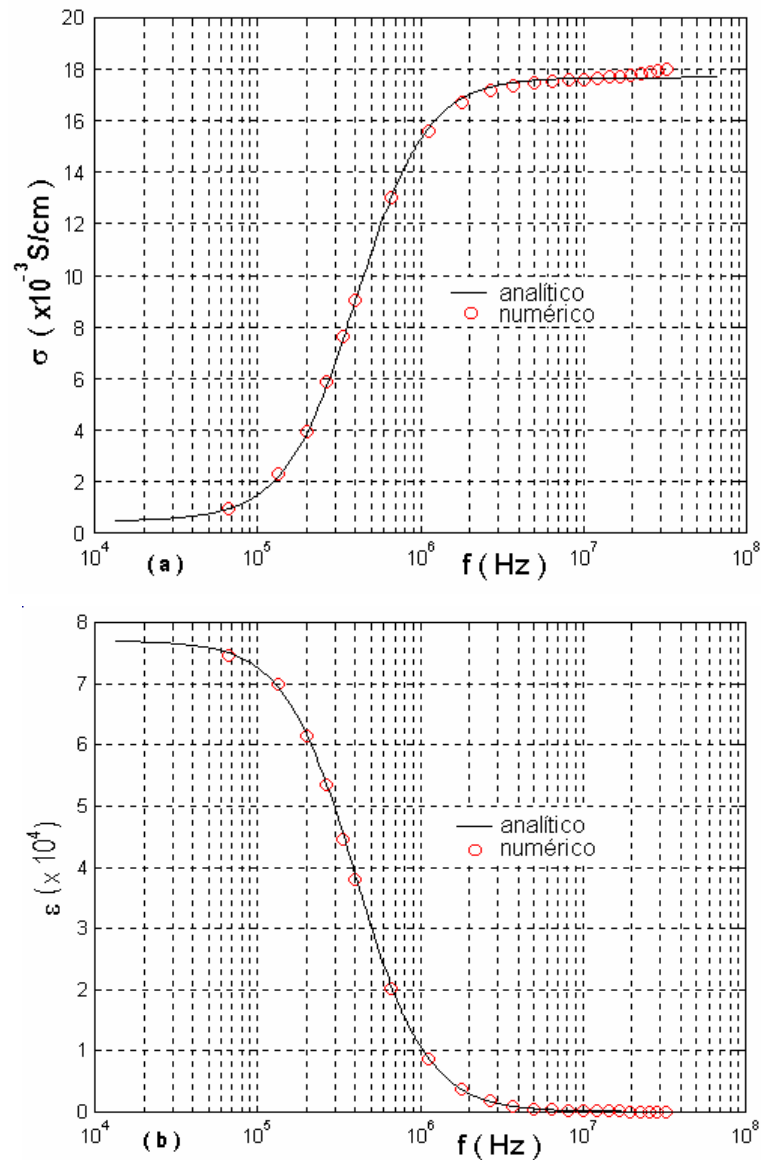


Figura 4.7 – Variação da (a) condutividade e (b) permissividade do tecido muscular com a frequência, obtida por análise numérica. As linhas contínuas representam o modelo baseado na relaxação de primeira ordem. O mecanismo responsável pela dispersão é a polarização interfacial das membranas das fibras musculares. As curvas representam então a banda β de dispersão para o músculo esquelético.

fibras musculares. A Figura (4.8) mostra o esquema usado nessa análise. Um conjunto de feixes de fibras é representado por estruturas cilíndricas homogêneas, cujas propriedades são aquelas obtidas na análise precedente, pelo menos, no que diz respeito à dispersão β . Esses feixes de fibras se conectam uns aos outros por meio de tecido conjuntivo, que para

as finalidades dessa análise, tem apenas as propriedades de um eletrólito. Com o objetivo de tornar esta análise mais realista, incluiremos os parâmetros da dispersão α para o músculo esquelético de cão, obtidos em [1] (Figura 7). As propriedades dos materiais envolvidos são mostradas na Tabela (4.2).

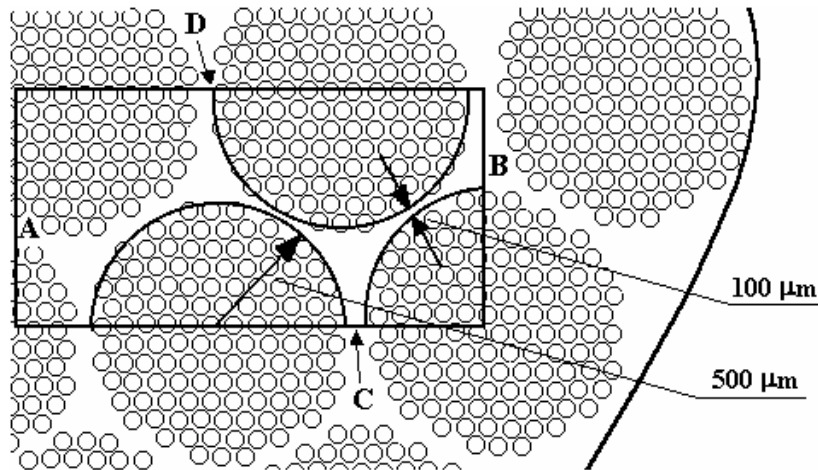


Figura 4.8 – Modelo de músculo esquelético usado na análise em escala de tecido. Um conjunto de feixes de fibras musculares é representado por estruturas cilíndricas separadas por eletrólito. As dimensões são indicadas. Os planos limitadores da região de análise são indicados. Eles têm as mesmas designações dos planos usados na análise em escala de célula. O potencial em B é mantido em 0 Volts.

A malha de discretização espacial foi construída com 75 divisões no eixo x e 40 no eixo y , totalizando 3000 quadrados iguais com aresta de 24 μm . Os planos indicados na Figura (4.8) têm a mesma significação daqueles usados na análise em escala celular. Devido a simetria, as componentes perpendiculares de campo e correntes se anulam sobre os planos C e D. Sobre o plano B o potencial é mantido Constante em 0 Volts. No plano A é aplicado o potencial de fonte no valor adequado para estabelecer o campo elétrico desejado. Nesta análise foi usado o método fasorial na faixa de frequências de 1 Hz a 100 MHz.

A Figura (4.9) mostra a distribuição de potencial e corrente total no tecido para o campo de amplitude 100 V/cm e frequência 1Hz. Percebe-se a tendência do potencial de se distribuir linearmente na direção x dentro dos feixes, o que nos permite concluir que o campo nessas regiões é uniforme. Nota-se também que o campo dentro dos feixes é maior que o campo nos espaços externos (endomísio). A corrente, por sua vez, circula

TABELA 4.2
 PROPRIEDADES ELÉTRICAS DO TECIDO

Meio	Propriedade	Valor
Feixe de fibras	Condutividade estática - S_s	4.7×10^{-4} S/cm
	Permissividade em altas frequências - ϵ_∞	78
	- dispersão α -	
	Dispersão da condutividade - $\Delta\sigma_\alpha$	5.5×10^{-5} S/cm
	Dispersão da permissividade - $\Delta\epsilon_\alpha$	1×10^6
	- dispersão β -	
	Dispersão da condutividade - $\Delta\sigma_\beta$	1.72×10^2 S/cm
	Dispersão da permissividade - $\Delta\epsilon_\beta$	7.7×10^4
Eletrólito	Condutividade estática - S_s	1.77×10^{-2} S/cm
	Permissividade em altas frequências - ϵ_∞	78

principalmente fora dos feixes, porque a condutividade estática do eletrólito é muito maior que a condutividade estática entre as fibras. Em altas frequências, o tecido torna-se homogêneo em relação à suas propriedades elétricas, já que a permissividade e a condutividade dentro dos feixes tende aos valores de permissividade e condutividade do eletrólito. Assim, o campo e a corrente se distribuem de maneira uniforme no volume do músculo em altas frequências.

Usando novamente o conceito de admitância específica do meio, os espectros da condutividade e da permissividade do tecido foram calculados, tendo por base os valores médios de corrente e campo no volume efetivo de um feixe de fibras (o feixe cortado pelos planos B e C na Figura (4.8)). Os resultados obtidos são mostrados na Figura (4.10). Observa-se no espectro de permissividade que as duas bandas de dispersão estão bem definidas. A banda α não aparece no espectro de condutividade porque $\Delta\sigma_\alpha$ é muito pequeno comparado às condutividades estáticas do feixe de fibras e do eletrólito.

4.1.4) Conclusões Sobre a Simulação do Músculo Esquelético

Comparando os espectros de condutividade e permissividade obtidos numericamente com resultados experimentais apresentados em [1], concluímos que a análise numérica fornece resultados completamente coerentes com a experimentação para o músculo esquelético, embora existam diferenças absolutas significativas, que evidenciam a necessidade de melhorar o modelo de tecido muscular que foi usado. Por exemplo, na

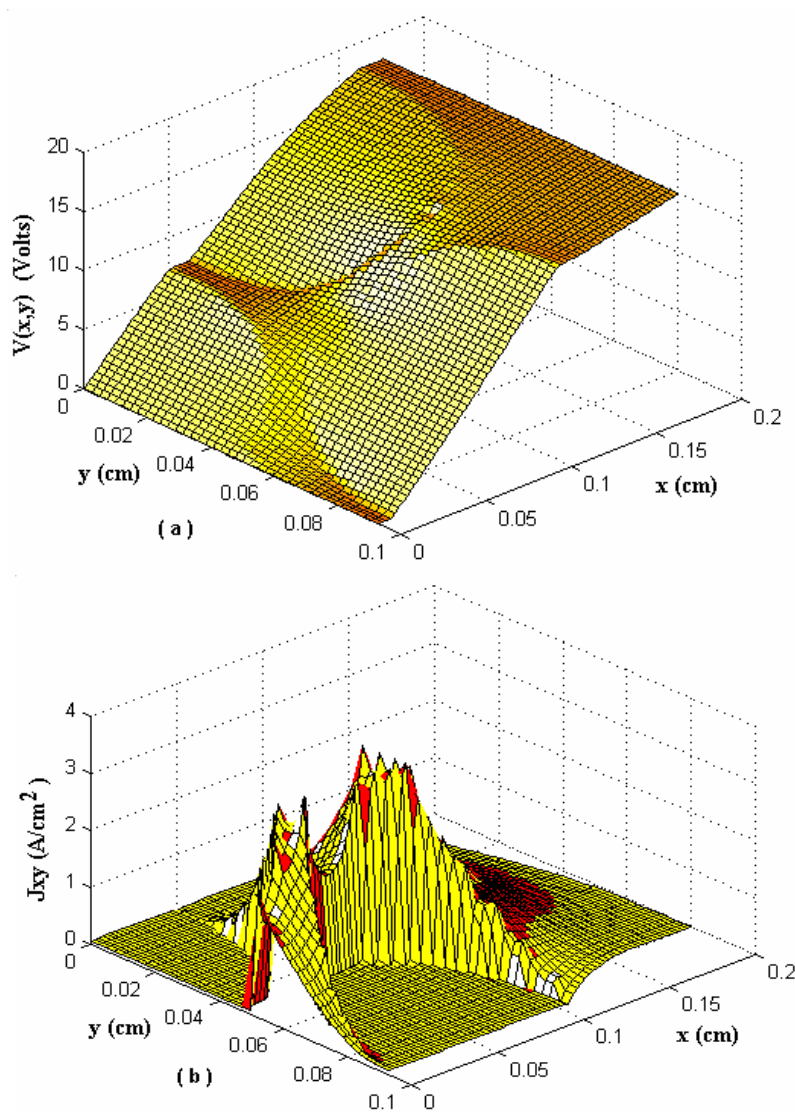


Figura 4.9 – Distribuições de (a) potencial e (b) módulo da densidade de corrente total no modelo de músculo esquelético perpendicularmente orientado em relação campo. Campo aplicado na direção x com amplitude 100 V/cm e frequência 1 Hz.

curva experimental mostrada em [1], observa-se que $\Delta e \approx 10^5$ na banda β e $S_s \approx 8 \times 10^{-4}$ S/cm, para o músculo esquelético de cão perpendicularmente orientado em relação ao campo. A curva de dispersão experimental apresenta uma frequência de corte próxima de 200kHz na banda β , o que corresponde ao tempo de relaxação em torno de $0.8 \mu s$. Os resultados numéricos correspondentes são: $\Delta e_b \approx 7.7 \times 10^4$, $S_s \approx 3 \times 10^{-3}$ S/cm e $t_b \approx 0.4 \mu s$. Fatores que influenciam nessas propriedades são: dimensões das fibras musculares;

distâncias entre fibras em um feixe; estrutura interna das fibras; constituição do eletrólito que envolve fibras e feixes, etc. Todos esses aspectos foram extremamente simplificados no modelo numérico do músculo esquelético, e mesmo assim, obtivemos uma resposta espectral comparável aos resultados experimentais.

Outro aspecto digno de nota é a quantidade de informações que o MCE oferece acerca das grandezas elétricas envolvidas na análise: Distribuições espaciais detalhadas de potencial, densidade de carga e correntes, obtidas no domínio do tempo ou da frequência, permitindo a caracterização completa de um material, tanto localmente quanto macroscopicamente.

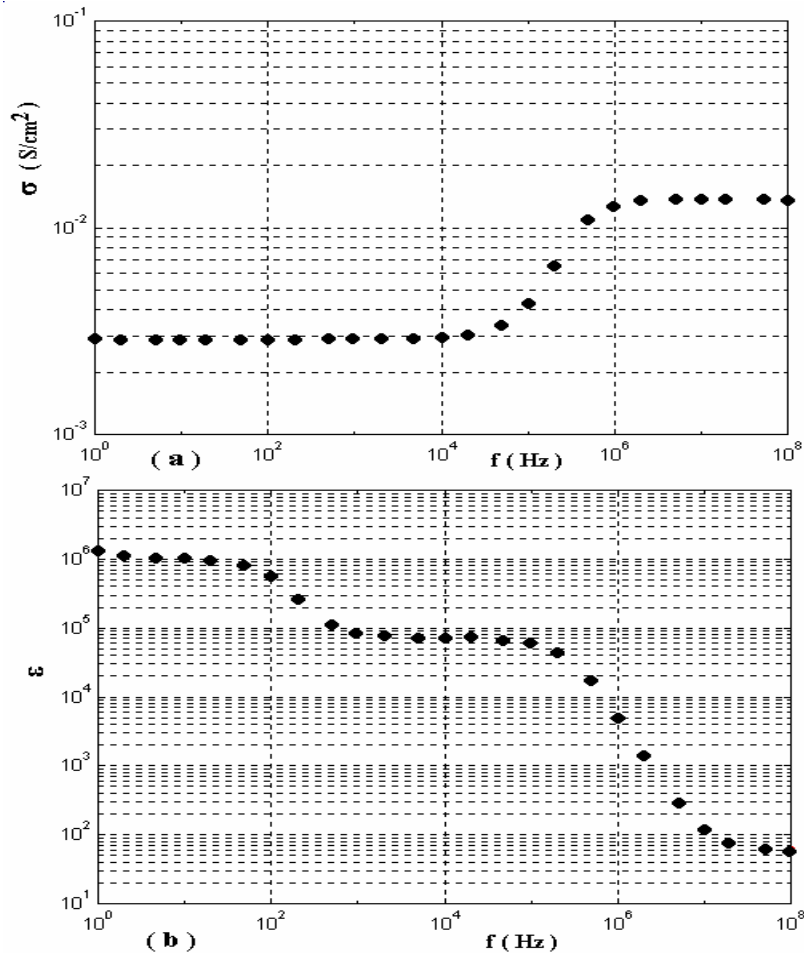


Figura 4.10 – Condutividade e permissividade do modelo de músculo esquelético perpendicularmente orientado em relação ao campo, obtidos na análise fasorial com o modelo em escala de tecido.

O exemplo do músculo esquelético ilustra muito bem a estratégia de análise aplicada na caracterização de grandes volumes de material biológico. Se o material é heterogêneo quanto às características estruturais das células ou quanto às propriedades elétricas do meio condutor, deve-se dividir o volume total em partes homogêneas (ou aproximadamente homogêneas), caracterizar cada parte separadamente com a análise em escala celular e finalmente, usando os modelos baseados na dispersão dielétrica, calcular a resposta global do meio.

Na análise em escala celular dentro do feixe de fibras musculares, não apareceu a dispersão característica da banda α . De fato, essa dispersão somente seria detectável se fosse fornecida a densidade de carga superficial agregada às membranas das fibras e se a resolução da malha permitisse calcular a distribuição de carga no eletrólito, em torno das fibras, em distâncias menores que o comprimento de Debye, que é da ordem de 1 nm para eletrólitos fisiológicos. Esta última condição pode ser extremamente difícil de ser atendida em problemas bidimensionais ou tridimensionais usando tamanhos reais de células, porque uma tal resolução espacial resulta em uma quantidade imensa de nós no circuito equivalente, o que inviabiliza o processamento computacional. Assim sendo, praticamente em todas as aplicações, os parâmetros da banda α deverão ser obtidos de resultados experimentais.

4.2) SUSPENSÃO DILUÍDA DE CÉLULAS ESFÉRICAS

A seguir apresentamos um estudo teórico com simulação numérica do processo de eletropermeabilização de células esféricas em suspensões eletrolíticas diluídas. Usamos um modelo de condução elétrica na membrana plasmática baseado nos modelos e resultados experimentais obtidos por Glaser et al. [41] para membranas lipídicas planas. Foram realizadas simulações em suspensões de diversas concentrações e com diferentes propriedades da membrana (descritas no modelo proposto). Como resultado das simulações e das análises posteriores, obtivemos informações sobre as distribuições de potencial e corrente na membrana plasmática, variação da condutividade da suspensão com a amplitude do campo aplicado e dependência do campo elétrico limiar com a fração volumétrica ocupada pelas células e com propriedades da membrana. Esses resultados esclarecem os eventos elétricos ligados ao processo de abertura de poros na membrana e permitem elaborar métodos para caracterização experimental da ruptura reversível de células em tecidos reais.

4.2.1) Modelagem Numérica da Suspensão de Membranas Esféricas Segundo o MCE

A Figura (4.11) mostra detalhes geométricos que são considerados na modelagem numérica da suspensão de membranas esféricas. A fim de minimizar o tamanho do sistema de equações, foi assumida uma organização regular das células, o que permitiu limitar a região analisada ao volume definido pelos planos de simetria mostrados. Nos planos $x=0$ e $x=X_m$ são definidos os potenciais de fonte (o potencial é considerado nulo em $x=0$). Os planos $y=0$, $y=L$, $z=0$ e $z=L$, são planos de simetria par para o potencial e densidade de carga, de modo que não há fluxo de carga ou campo através desses planos. O volume cúbico em torno da célula centrada em $(0,0,0)$ representa o volume efetivo ocupado por uma célula na suspensão. A razão entre o volume interno e o volume efetivo de uma célula é a fração volumétrica ($p=Vol_{cel}/Vol_{ef}$) ocupada pela célula na suspensão.

O raio da membrana foi especificado em $2.83 \mu\text{m}$, de modo que a esfera tem volume interno de $95\mu\text{m}^3$, que é o volume típico de eritrócitos humanos. A espessura da membrana foi especificada em 10nm . A malha de discretização espacial foi especificada com dois níveis de resolução. Inicialmente uma malha “larga” é definida com 35 divisões no eixo x , 10 no eixo y e 10 no eixo z . Isso gera 3500 blocos de volume no espaço de análise. Então, em torno das membranas é definida uma região de alta resolução, dentro da

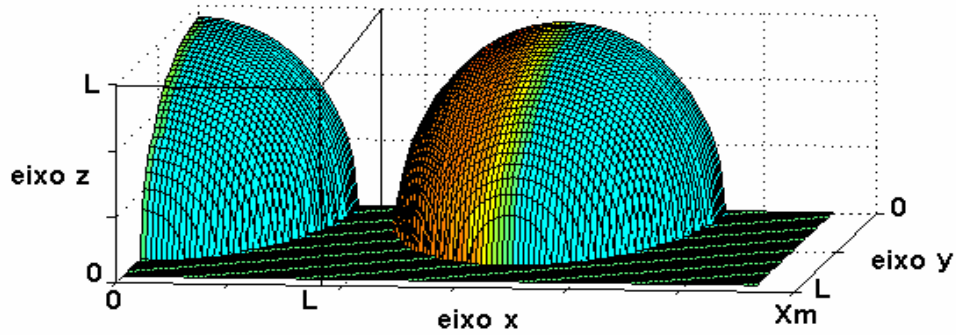


Figura 4.11 – Detalhes geométricos da suspensão de células esféricas. A organização regular das células permite definir planos de simetria que limitam a região de análise. O volume efetivo de uma célula é representado pelo cubo circunscrito à célula centrada em (0,0,0).

qual cada bloco da malha inicial é dividido em 27 blocos iguais, melhorando a resolução espacial nessa região por um fator de 3 em cada eixo. Isso é necessário para uma boa representação geométrica da membrana e do espaço intersticial entre células. O número final de blocos é de cerca de 15000, variando de acordo com a distância entre as células.

Todo o volume interno e externo às células é preenchido por eletrólito constituído de íons Na^+ e Cl^- dissolvidos em água na concentração 154 mM, que é a concentração total típica de íons no plasma humano. As propriedades do meio são as mesmas mostradas na Tabela (4.1) com exceção da concentração iônica, que neste caso, gera uma densidade de carga de 14.9 C/cm^3 .

O transporte iônico através da membrana foi modelado de forma compatível com a equação (1.65). Assumindo que a matriz lipídica intacta apresenta mobilidade iônica desprezível, todo o transporte iônico através da membrana se dá pelos poros. Assim, podemos interpretar macroscopicamente a taxa de criação de poros como uma taxa de crescimento da mobilidade iônica na membrana. Definimos então, a mobilidade iônica relativa na membrana como a razão entre a mobilidade iônica na membrana (m_m) e na água (m_w), ou seja:

$$I = \frac{m_m}{m_w} \quad (4.8)$$

Assumimos que seu valor é o mesmo para todos os tipos de íons considerados na análise e que varia no tempo segundo a equação:

$$\frac{dI}{dt} = a \exp(V_m / V_p)^2 \quad (4.9)$$

onde a e V_p são parâmetros característicos da membrana, aqui considerados como sendo constantes, embora possivelmente sejam dependentes da temperatura, conforme indica o modelo desenvolvido por Glaser *et al* [41]. Podemos obter uma estimativa desses parâmetros a partir de alguns resultados obtidos por Kinosita e Tsong [65] com eritrócitos humanos, que indicam uma proporção entre a condutância de membrana e a condutância do eletrólito da ordem de 10^{-3} quando as células são estimuladas com pulsos de campo elétrico de 4 kV/cm e duração de $2\mu\text{s}$. Esses valores sugerem uma taxa de 500 s^{-1} . De acordo com os autores o potencial limiar para geração de poros em eritrócitos é da ordem 1 V. Supomos também que para atingir o limiar de ruptura, o argumento da função exponencial deve ser da ordem de 6 para produzir uma variação mensurável na condutância da membrana. Obtemos então os valores $V_p \approx 0.4\text{ V}$ e $\alpha \approx 1$. A estimativa de V_p é comparável com o resultado obtido por Glaser *et al* para membranas planas (constante B da equação (1.65) igual a 4.8 V^2 [3]). O valor estimado de a , contudo, é muito pouco confiável, devido à enorme sensibilidade da função exponencial com as variações de V_p .

4.2.2) Condutividade e Potencial de Membrana em Células Intactas

O primeiro experimento realizado objetivou determinar as relações entre potencial de membrana, condutividade do meio, campo aplicado e fração volumétrica da suspensão, na ausência de ruptura, ou seja, mantendo-se $I=0$ independentemente do potencial de membrana. O campo foi aplicado como um degrau de amplitude 2kV/cm. Foram realizadas 11 simulações variando a fração volumétrica de 0 a 0.5, com 10000 iterações em cada caso, o que corresponde a um intervalo de tempo de $3\mu\text{s}$. A constante de tempo de carregamento da membrana, segundo a equação (1.53), é da ordem de $0.22\mu\text{s}$. Assim, os resultados a seguir são representativos do estado de regime permanente do sistema. A distribuição de potencial elétrico na membrana da célula alvo (aquela com centro em (0,0,0)) e a condutividade da suspensão foram obtidas a partir das distribuições de potencial e corrente no volume efetivo dessa célula. A condutividade foi obtida como a razão entre a densidade média de corrente e o campo elétrico médio dentro desse volume.

A Figura (4.12) mostra a distribuição de potencial na membrana para diversos valores da fração volumétrica. Essa distribuição corresponde ao oitante da superfície celular que é mostrada na Figura (4.11), mas é representativa de toda a célula em virtude

da simetria que existe em relação aos demais oitantes. Para uma célula isolada ($p=0$) vale a distribuição co-senoidal prevista pela equação (1) para $t \gg \tau$, o que é representado pela linha contínua. A boa concordância entre os resultados analítico e numérico para $p=0$ atesta a qualidade da modelagem e sugere confiabilidade nos resultados numéricos. Com o aumento da concentração de células observa-se a diminuição do potencial induzido principalmente na região dos pólos e um afastamento da forma co-senoidal. A Figura (4.13) mostra como o potencial no pólo da célula ($q=0$) e a condutividade estática da suspensão (condutividade para corrente contínua) dependem da fração volumétrica a . Ambas as curvas estão normalizadas em relação aos valores máximos que ocorrem em $p=0$. O valor máximo do potencial de membrana (V_{mo}) é dado pela equação (1.52) com $q=0$ e $t \gg \tau$ e a condutividade máxima da suspensão é a própria condutividade do eletrólito. Assim, temos:

$$V_{mo} = 1.5 a E_o \quad (4.10)$$

$$s_o = e \sum_i z_i c_i \mathbf{m} \quad (4.11)$$

onde z_i , c_i e \mathbf{m} são a valência, a concentração e a mobilidade dos íons no eletrólito, respectivamente. Nessa análise $V_{mo} = 0.85$ V e $s_o = 1.95 \times 10^{-2}$ S/cm.

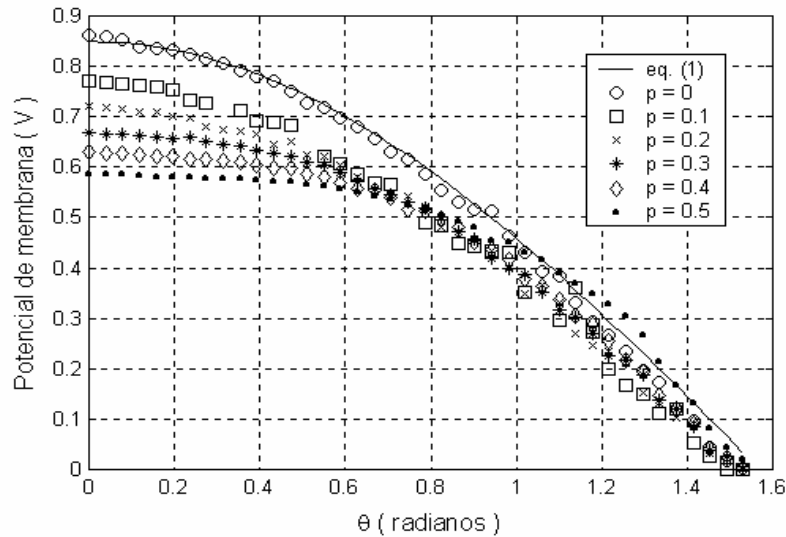


Figura 4.12 – Distribuição de potencial na membrana em um oitante da célula alvo para o campo de 2kV/cm e diversos valores da fração volumétrica. q é o ângulo entre o vetor de posição na membrana e a direção do campo aplicado.

As equações das retas que representam as tendências medianas dos resultados numéricos na figura (4.13) são:

$$S/S_o = 1 - 1.288 p \quad (4.12)$$

$$V_m/V_{mo} = 1 - 0.543 p \quad (4.13)$$

Nessa figura também é mostrado um resultado obtido a partir da teoria desenvolvida por Maxwell para a condutividade de uma suspensão diluída de partículas esféricas em líquido condutor [1]. Esse modelo tem sido utilizado por alguns autores para descrever a dependência da condutividade com o hematócrito no sangue [66][67], e pode ser expresso na forma:

$$\frac{S}{S_o} = \frac{1-p}{1+p/2} \quad (4.14)$$

A teoria desenvolvida por Maxwell, contudo, é baseada na hipótese de que a interação entre partículas na suspensão é desprezível, o que é válido apenas em concentrações muito baixas. Observa-se na Figura (4.13) que os modelos descritos pelas equações (4.12) e (4.14) começam a divergir significativamente a partir de $p=0.4$. Com essa fração volumétrica, a hipótese de partículas não interagentes certamente não é válida, como pode ser observado na Figura (4.12), pela distorção na distribuição angular do potencial de membrana em relação à forma co-senoidal. Apesar dos resultados numéricos refletirem a interação entre as células vizinhas e, nesse sentido serem mais representativos que o modelo descrito pela equação (4.14), também são baseados em uma hipótese simplificadora, nesse caso, a distribuição regular e periódica das células. Essa simplificação possivelmente introduz um erro na relação obtida entre condutividade e fração volumétrica, além do que, determina um limite para a fração volumétrica teórica em $p=0.52$.

Considerando que a equação (4.12) pode ser utilizada dentro dos limites da Figura (4.13), podemos obter a fração volumétrica de uma suspensão de concentração desconhecida a partir da medição das condutividades do eletrólito e da suspensão. Com esse valor e com a intensidade do campo aplicado, pode-se calcular com a equação (4.13), o potencial máximo de membrana nas células da suspensão. Por outro lado, se a intensidade mínima de campo para ruptura for conhecida para um determinado valor de fração volumétrica, então a equação (4.13) permite calcular o campo limiar para qualquer p no intervalo da Figura (4.13). A relação entre as intensidades de campo que produzem o

mesmo potencial máximo de membrana em suspensões de diferentes concentrações pode facilmente ser obtida a partir da equação (4.13), sendo dada por:

$$\frac{E_{o1}}{E_{o2}} = \frac{1.842 - p_2}{1.842 - p_1} \quad (4.15)$$

Observe que o limiar de ruptura deve aumentar em cerca de 37% com o aumento da fração volumétrica de 0 para 0.5.

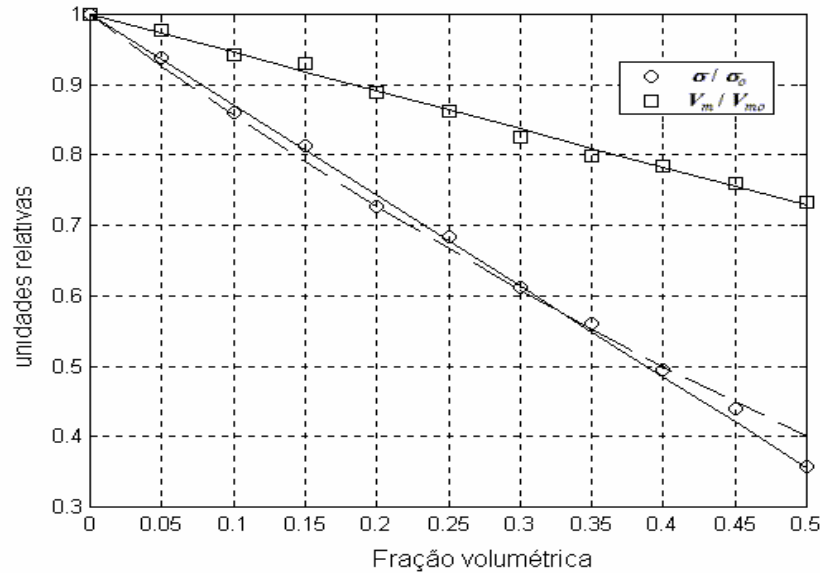


Figura 4.13 – Dependência do potencial de membrana e da condutividade da suspensão com a fração volumétrica. As escalas estão normalizadas em relação aos valores máximos V_{m0} e σ_0 . As linhas contínuas representam a tendência mediana dos resultados numéricos. A linha tracejada representa um modelo aproximado obtido a partir de uma teoria proposta por Maxwell para suspensões diluídas de partículas esféricas [1].

4.2.3) Limiar de Ruptura Dependente das Características da Membrana

No segundo experimento, em uma suspensão com $p=0.4$, o campo aplicado variou linearmente de 0 a 5kV/cm em 33.3 mil passos de tempo, correspondendo a 10 μ s. Foi observado o crescimento da corrente média no volume efetivo da célula e do potencial de membrana no pólo. Foram realizadas 7 simulações, onde o parâmetro V_p do modelo de condutância de membrana foi variado de 0.2 a 0.5 V a fim de se avaliar a sua influência no limiar de ruptura. As Figuras (4.14a) e (4.14b) mostram o comportamento da corrente de ruptura e do potencial de membrana como funções do tempo para diversos valores de V_p . Definimos a corrente de ruptura da suspensão de células como a diferença entre a corrente

real e a corrente esperada se não houvesse ruptura das membranas. O campo limiar de ruptura pode ser lido na escala horizontal superior em qualquer dos gráficos. A partir do limiar, a corrente aumenta intensamente e o potencial de membrana tende à “saturação”. Esse comportamento do potencial decorre do aumento da condutância de membrana, o qual compensa o aumento do campo aplicado pela queda de potencial no eletrólito circundante. Observa-se que o campo limiar e o potencial de saturação aumentam com V_p .

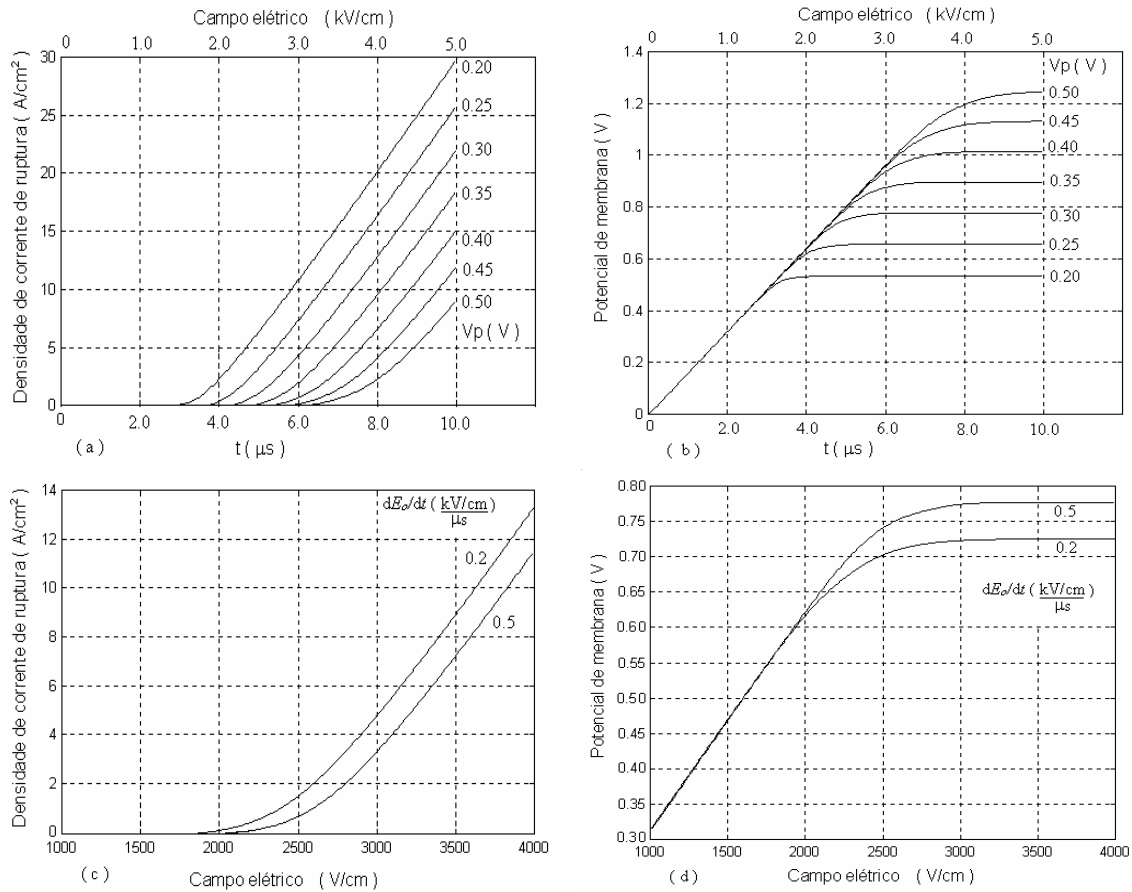


Figura 4.14 – Resposta a uma rampa de campo elétrico em uma suspensão com $p=0.4$. (a) densidade de corrente de ruptura e (b) potencial elétrico no pólo da célula como funções do tempo para uma derivada de campo de $0.5 \text{ kVcm}^{-1}/\mu\text{s}$. As curvas estão parametrizadas pela constante V_p . (c) densidade de corrente de ruptura e (d) potencial elétrico no pólo da célula com $V_p=0.3 \text{ V}$, como funções do campo para duas diferentes derivadas de campo.

Pelos resultados da Figura (4.14a) percebe-se que um experimento com rampa de potencial permite determinar o campo limiar de ruptura e estimar o parâmetro V_p da membrana celular. Entretanto, o campo limiar determinado desse modo é dependente da

taxa de crescimento do campo aplicado. As Figuras (4.14c) e (4.14d) mostram que diminuindo a taxa de variação do campo aplicado, tanto o campo limiar quanto o potencial de membrana diminuem. Isso pode ser entendido com base na equação (4.9), segundo a qual, o processo de variação da permeabilidade da membrana evolui de forma integrativa no tempo. Contudo, Kinoshita e Tsong [65] em seu experimento com eritrócitos humanos observaram que o limiar de ruptura em uma suspensão com $p=0.19$, era da ordem de 1.5 kV/cm para duas taxas de variação muito diferentes, 0.05 e 0.0125 kV cm⁻¹/μs (valores obtidos a partir de gráficos mostrados no artigo citado). Eles concluíram que o processo de formação de poros responde apenas à intensidade do campo aplicado mas não à sua derivada. Essa aparente contradição com os resultados deste estudo numérico pode ser explicada inicialmente usando a equação (4.15) para corrigir o valor obtido experimentalmente em $p=0.19$ para $p=0.40$. Isso resulta no limiar em torno de 1.72 kV/cm. Segundo a Figura (4.14c), o limiar de ruptura desloca-se de cerca de 2.2 para 1.9 kV/cm, com a diminuição da derivada de campo de 0.5 para 0.2 kV cm⁻¹/μs. Observando que os autores citados usaram derivadas muito menores, supomos que o limiar em torno de 1.72 kV/cm seja o valor assintótico para variações lentas de campo. Assim, concluímos que, se o modelo representado pela equação (4.9) for correto para descrever a evolução inicial da permeabilidade da membrana, então a derivada de campo também influencia o processo de ruptura.

4.2.4) Resposta ao Degrau e Distribuição de Permeabilidade na Membrana

No terceiro experimento uma suspensão com fração volumétrica 0.4 e com membranas de $V_p=0.3$ V, foram estimuladas com pulsos de campo elétrico de diversas amplitudes e duração de 20 μs. A Figura (4.15) mostra as variações no tempo da corrente média no volume efetivo e do potencial de membrana no pólo da célula. Nessas curvas observa-se a existência de duas fases com taxas de variação bem distintas que ficam evidentes com campos mais intensos: uma fase inicial rápida que dura cerca de 1μs e uma fase lenta que segue a partir desse intervalo inicial. Esse fato foi experimentalmente verificado por Kinoshita e Tsong [65] em suspensões de eritrócitos humanos. Eles atribuíram a fase rápida à criação de poros e a fase lenta à expansão dos poros criados. Como se observa na Figura (4.15b), inicialmente o potencial de membrana cresce muito rapidamente e isso é decorrente do acúmulo de íons nas faces da membrana, um processo que ocorre com constante de tempo de 0.22μs de acordo com a equação (1.53). Esse

potencial tende ao valor dado pela equação (4.10) e quando o campo aplicado é suficientemente intenso, o potencial induzido produz a eletropermeabilização da membrana com uma alta taxa de crescimento da mobilidade iônica. Isso justifica a fase rápida inicial. O crescimento da condutância da membrana, por sua vez, leva à redução gradual do potencial, e isso resulta na diminuição da taxa de variação da mobilidade, o que justifica a fase lenta observada. Essa análise explica também porque para campos relativamente fracos, próximos ao limiar de ruptura, a fase rápida não ocorre, existindo apenas uma fase lenta que leva a um estado tênue de ruptura (curva para $E_0=1.5$ kV/cm).

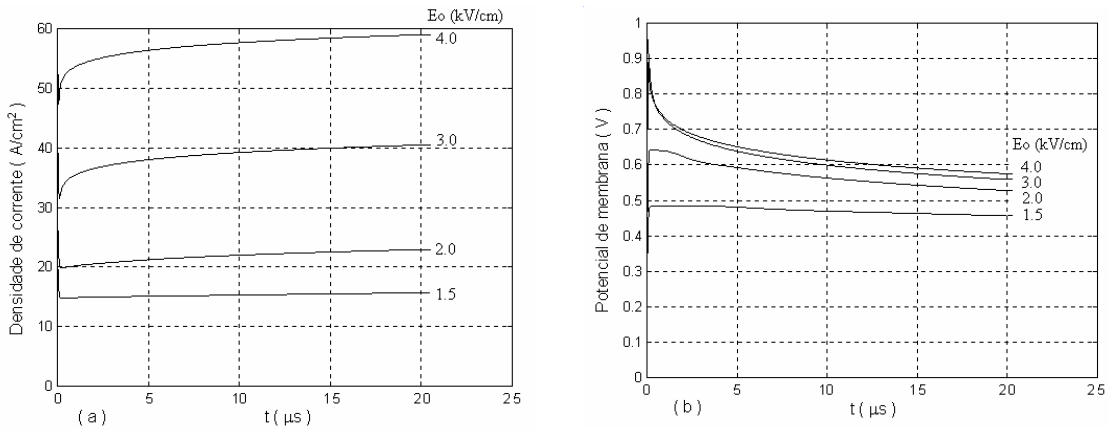


Figura 4.15 – (a) Corrente média e (b) potencial de membrana no pólo da célula como funções do tempo para pulsos de campo elétrico de várias amplitudes em uma suspensão com $p=0.4$ e membranas com $V_p=0.3$ V.

Na Figura (4.16) mostra-se a distribuição angular de potencial e mobilidade relativa na membrana no final do intervalo de $20 \mu s$ do pulso, para alguns valores de campo aplicado. A flutuação que se observa nos resultados, muito evidente para campos de 3 e 4 kV/cm, deve-se provavelmente às imperfeições da malha de discretização em torno da membrana. Nas curvas de I foram traçadas retas indicando as tendências dos resultados. Observa-se que para campos muito intensos, o potencial de membrana é praticamente uniforme em torno do pólo da célula, até cerca de 1 radiano. Nota-se também que o potencial no pólo é muito menor que o valor previsto para uma célula intacta e pouco sensível ao campo aplicado. Para o campo de 4kV/cm, por exemplo, o potencial previsto pela equação (4.10) é quase três vezes maior que o valor obtido para a célula eletropermeabilizada. A permeabilidade da membrana, por sua vez, se distribui de modo aproximadamente linear em relação ao ângulo de posição, tendo o valor máximo no pólo

da célula, e praticamente se anulando próximo de 1.2 radianos. Considerando o comportamento da corrente na Figura (4.15a) e a distribuição de mobilidade relativa na membrana para o campo de 1.5 kV/cm, concluímos que o limite mínimo detectável de permeabilização corresponde a uma mobilidade relativa da ordem de 10^4 no pólo da célula. Usando esse valor limite de mobilidade relativa como um critério para definir a área de membrana que foi efetivamente eletropermeabilizada, observamos que para 1.5 kV/cm o ângulo limite é aproximadamente 0.8 radianos, o que corresponde a uma área da calota esférica de valor 15% da área total da esfera. Assim, levando em conta os dois pólos da célula, a área permeabilizada é de 30%. Para o campo de 4 kV/cm, o ângulo limite é aproximadamente 1.15 radianos e a área calculada pelo mesmo critério sobe para cerca de 60%. Pela tendência das curvas na figura (4.16b) supomos que esse seja um valor limite independentemente do acréscimo que se faça no campo aplicado.

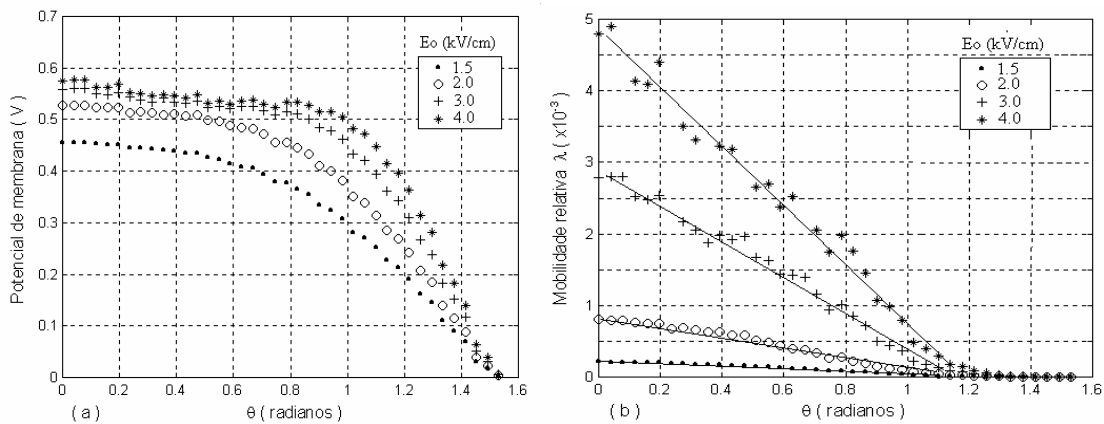


Figura 4.16 – distribuição angular de (a) potencial na membrana e (b) mobilidade relativa λ para alguns valores de campo aplicado na forma de pulso com duração de $20\ \mu\text{s}$ em uma suspensão com $p=0.4$ e $V_p=0.3\ \text{V}$. Linhas contínuas foram traçadas em (b) para ajudar na visualização.

4.2.5) Variação da Condutividade em Função do Campo Aplicado

O último experimento objetivou determinar a variação de condutividade da suspensão de células para diversos valores de campo aplicado na forma de pulsos com duração de $20\ \mu\text{s}$. Isso foi feito aplicando-se ao final de cada pulso de eletropermeabilização, um pulso de medição com amplitude muito menor, $100\ \text{V/cm}$ e duração $0.6\ \mu\text{s}$, e calculando a condutividade estática do meio pela relação entre a densidade média de corrente e o campo elétrico médio no volume efetivo da célula alvo ao

final desse pulso. A Figura (4.17) mostra a variação relativa da condutividade como função do campo de eletropermeabilização. A referência é a condutividade da suspensão antes da estimulação elétrica, cujo valor também foi obtido em uma simulação com pulso de medição de 100 V/cm e duração 0.6 μ s. Claramente o limiar de ruptura situa-se próximo de 1.7 kV/cm. Esse valor concorda bem com aquele obtido por Kinoshita e Tsong [14] para suspensão de eritrócitos, quando corrigido para a $p=0.4$ através da equação (4.15), conforme discutido anteriormente. De acordo com a discussão anterior sobre a dependência do limiar de ruptura com a derivada do campo aplicado, podemos entender que o limiar calculado a partir da variação da condutividade é um limiar “estático” que deve corresponder ao valor assintótico do limiar “dinâmico” discutido no item (4.2.2).

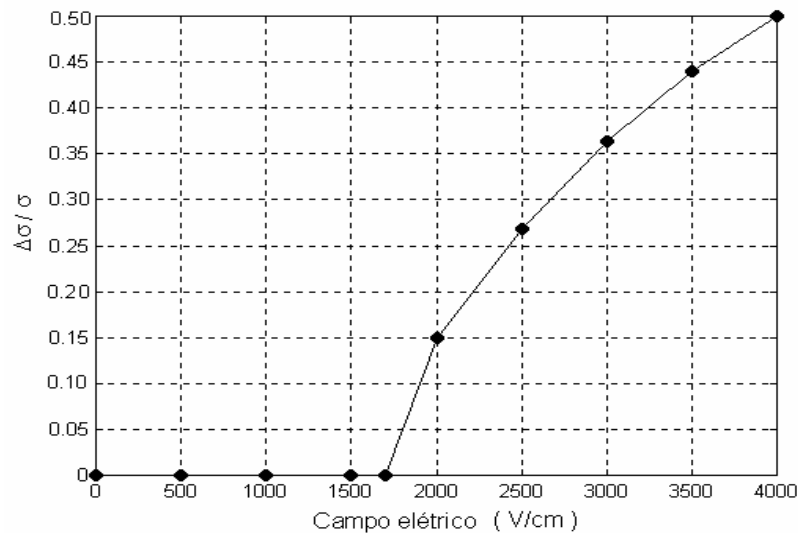


Figura 4.17 – Variação relativa da condutividade de uma suspensão de células com $p=0.4$ e $V_p=0.3$ V com pulsos de campo elétrico de várias intensidades e duração 20 μ s. A condutividade foi medida com pulsos de 100 V/cm e 0.6 μ s imediatamente antes e após o pulso de eletropermeabilização.

4.2.6) Conclusões Sobre o Estudo da Suspensão de Membranas Esféricas

Neste estudo usamos um modelo de permeabilidade de membrana celular baseado em resultados experimentais obtidos com membranas planas. Não há, absolutamente, nenhuma demonstração experimental da validade desse modelo para células reais. Contudo, muitos dos resultados obtidos são semelhantes àqueles publicados por Kinoshita e Tsong [65] com eritrócitos humanos. De qualquer modo, o presente estudo além de ilustrar muito bem a aplicação do MCE na modelagem da eletropermeabilização de células,

fornece subsídios para avaliação experimental da possível aplicação da equação (4.9) em células reais.

Podemos resumir assim as conclusões dessa série de simulações:

1) Em uma suspensão eletrolítica de membranas esféricas regularmente organizadas no espaço, a condutividade decresce linearmente com o aumento da fração volumétrica ocupada pelas células no intervalo de 0 a 0.5.

2) O potencial induzido no pólo da membrana também depende da fração volumétrica, decrescendo cerca de 37% em relação ao valor máximo (V_{m0}) dado pela equação (4.10), com o aumento da fração volumétrica de 0 para 0.5.

3) Usando as relações obtidas numericamente entre condutividade, potencial de membrana e fração volumétrica, pode-se obter a concentração da suspensão a partir de uma medida da condutividade e também, estimar o potencial de ruptura da membrana a partir da medição do campo limiar de ruptura.

4) O limiar de ruptura da suspensão depende da fração volumétrica. O parâmetro V_p do modelo de condutância de membrana determina um limiar de ruptura para o potencial de membrana e assim, através da curva de resposta à uma rampa de campo elétrico aplicado, é possível determinar um valor adequado para V_p . Esse valor, muito provavelmente está na faixa de 0.2 a 0.5 V para membranas celulares. O limiar de ruptura depende da derivada de campo, contrariamente à conclusão de Kinosita e Tsong [65], mas parece tender a um valor assintótico para campos de variação lenta. Esse valor situa-se em torno de 1.7 kV/cm para $p=0.4$.

5) Sob estimulação com pulsos de campo elétrico, a corrente que circula na suspensão apresenta um crescimento rápido em cerca de $1\mu s$, seguido por uma variação mais lenta. A partir dos resultados numéricos, inferimos que essa fase rápida se deve ao crescimento do potencial na membrana intacta devido ao acúmulo de cargas nas suas faces. A fase lenta a seguir seria uma consequência da redução do potencial devido à eletropermeabilização da membrana com consequente aumento da queda de potencial no eletrólito circundante.

6) O potencial de membrana na área eletropermeabilizada é pouco dependente do campo aplicado. Essa área, por sua vez, depende do campo e tende a um valor limite de cerca de 60% da área total da membrana, para campos muito intensos. Dentro dessa área, a mobilidade relativa na membrana se distribui de forma aproximadamente linear em relação ao ângulo q .

Essa série de simulações mostra que o MCE permite estudar detalhadamente o processo de eletropermeabilização em membranas biológicas. Contudo, o modelo descrito pela equação (4.9), sobre o qual se apóia grande parte das conclusões anteriores, carece de validação experimental para membranas celulares.

4.3) ELETRO-ESTIMULAÇÃO DE TECIDO COMPACTO DE CÉLULAS CÚBICAS

O estudo que apresentaremos agora mostra a aplicação do MCE na caracterização da estimulação elétrica de um tecido homogêneo e compacto de células cúbicas. O processo de eletropermeabilização das membranas, como na seção anterior, será modelado através do conceito de mobilidade relativa por meio das equações (4.8) e (4.9). Neste caso, contudo, será necessário obter uma descrição macroscópica da eletropermeabilização, que possa ser aplicada no modelo em escala de tecido. Tal modelo macroscópico permitirá que grandes volumes de tecido sejam analisados sob condições de polarização que produzam ruptura reversível das membranas.

4.3.1) Análise em Escala Celular

A Figura (4.18) mostra a estrutura microscópica do tecido, como um arranjo regular de cubos. A periodicidade dessa estrutura permite usar planos de simetria para limitar o volume analisado àquele mostrado com o tracejado. As células têm aresta de $20\mu\text{m}$ e os interstícios tem largura de 70nm . Inicialmente o material foi caracterizado com a análise em escala celular a fim de obter os parâmetros do modelo elétrico do tecido. A malha de discretização espacial foi construída de modo a obter uma transição gradual de blocos com largura mínima de 5nm no centro do interstício para $1\mu\text{m}$ no interior das células. Usamos, então uma progressão geométrica de razão dois. Essa progressão afeta apenas o eixo perpendicular às membranas em cada interstício. A estrutura obtida é semelhante àquela mostrada na Figura (2.10) (embora naquele caso a progressão representada seja linear).

Foram definidos 14161 nós, em uma estrutura tridimensional com 49 divisões no eixo x , 17 no eixo y e 17 no eixo z . As características elétricas do eletrólito e membranas são iguais às do exemplo 4.2 (“Suspensão diluída de células esféricas”).

Dois aspectos foram considerados na análise em escala celular:

A) Dispersão dielétrica do meio na ausência de eletropermeabilização;

B) Comportamento da condutividade estática com a ocorrência de eletropermeabilização das membranas.

Na análise do caso (A) usamos um pulso de campo na direção x , com amplitude de 100 V/cm e duração 6 μ s, o que corresponde a 2000 iterações com passo de tempo de 0.3 ns. Os espectros de condutividade e permissividade do material foram obtidos a partir da análise de Fourier da corrente média e campo elétrico médio na célula alvo (a célula marcada com a letra 'C'). Esses resultados são mostrados na Figura (4.19). Dessas curvas obtemos os parâmetros do modelo em escala de tecido para a banda β de dispersão. Esses parâmetros são: $s_s=5 \times 10^4$ S/cm, $\Delta s=1.9 \times 10^{-2}$ S/cm, $e_p=78$ e $\Delta e=1 \times 10^4$. A banda α de dispersão não é considerada nesta análise.

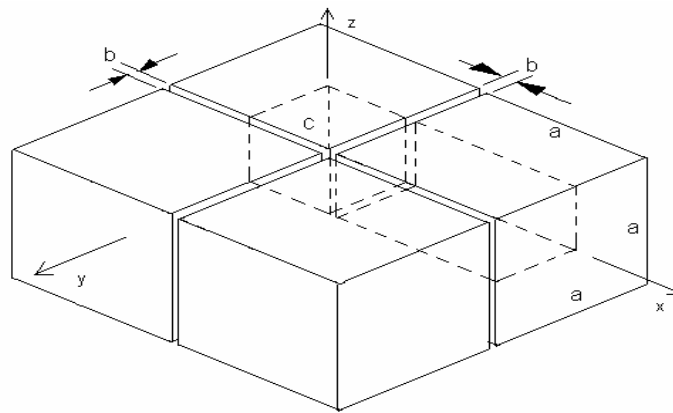
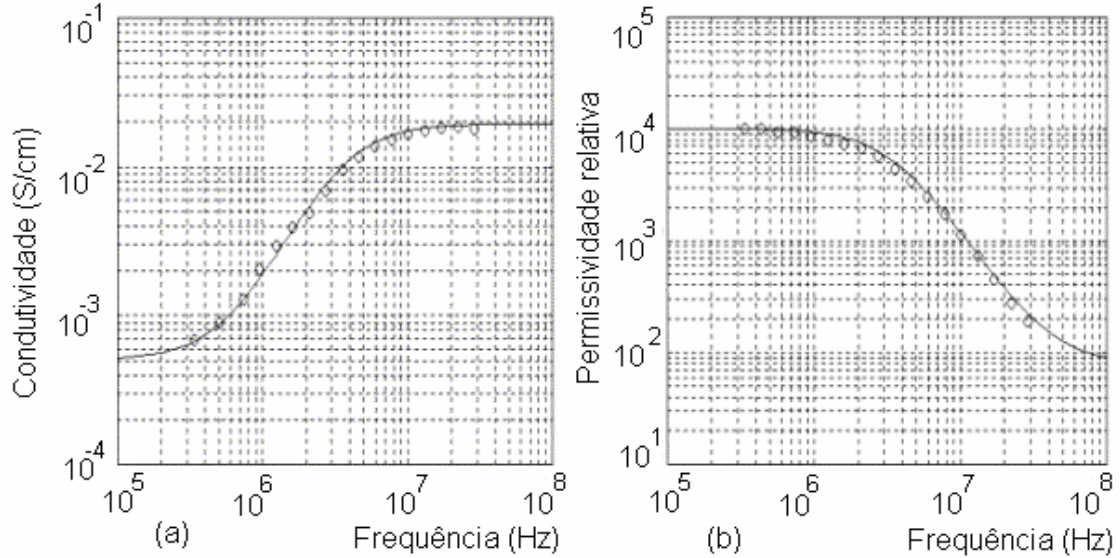


Figura 4.18 – Estrutura simplificada de um tecido de células cúbicas. As dimensões são $a=20 \mu\text{m}$ e $b=70\text{nm}$. Em virtude das simetrias, o volume analisado é limitado àquele definido pelo tracejado. A célula marcada com a letra 'C' é a célula alvo.

A análise da resposta do tecido na ocorrência de eletropermeabilização foi efetuada usando o modelo de mobilidade relativa na membrana descrito na seção (4.2.1) pelas equações (4.8) e (4.9). Os valores usados para os parâmetros do modelo são $a=1$ e $V_p=0.3\text{V}$. Fizemos simulações com três formas de onda diferentes para o campo aplicado: degrau, rampa e senóide. O objetivo desse estudo é determinar a influência da eletroestimulação na condutividade do meio e obter um modelo macroscópico que possa ser utilizado na análise em escala de tecido. Com esse fim desenvolvemos um modelo analítico aproximado, baseado na promediação espacial da condutividade, de maneira totalmente análoga ao método numérico. A Figura (4.20) mostra o esquema utilizado. Existem dois caminhos paralelos para circulação da corrente iônica: pelo interstício e

através da membrana. O interstício celular determina a condutividade estática do meio na ausência de eletropermeabilização, ou seja, a corrente em baixas frequências circula apenas



pelos espaços externos às células. Na ocorrência de eletropermeabilização, a condutividade aumenta devido à condução através da membrana.

Figura 4.19 – Espectros de (a) condutividade e (b) permissividade relativa do tecido. Os círculos indicam os resultados numéricos e a linha contínua é a aproximação segundo o modelo de primeira ordem. Os valores dos parâmetros de dispersão são: $s_s=5 \times 10^{-4}$ S/cm, $\Delta s=1.9 \times 10^2$ S/cm, $\epsilon_s=78$ e $\Delta \epsilon=1 \times 10^4$.

A condutividade média do meio pode ser facilmente obtida se a distribuição de campo for considerada uniforme tanto na membrana quanto no eletrólito. Com a aplicação do campo E_o paralelo a uma das faces da célula, a diferença de potencial que se estabelece ao longo da distância $a/2$, é $V_o=E_o a/2$. Definimos três condutâncias para modelar a condução iônica nessa estrutura: a condutância estática sem eletropermeabilização g_{so} , a condutância do eletrólito interno g_e e a condutância da membrana g_m . Na hipótese de campo uniforme, as condutâncias podem ser calculadas pelas expressões:

$$g_{so} = \frac{a^2}{a/2} s_s = 2a s_{so} \quad (4.16)$$

$$g_e = \frac{a^2}{a/2} s_e = 2a s_e \quad (4.17)$$

$$g_m = \frac{a^2}{h} s_m \quad (4.18)$$

onde h é a espessura da membrana. s_{so} é a condutividade estática do meio sem eletropermeabilização e s_e e s_m são as condutividades do eletrólito e da membrana

respectivamente. Ao escrever estas expressões, desprezamos as espessuras h e b , nos termos em que aparecem somadas com a aresta a da célula. Devido ao processo de eletropermeabilização, a condutância da membrana é uma função do tempo e do potencial aplicado (V_m). A condutância total do meio, de acordo com a Figura (4.20b), pode ser calculada pela associação dos elementos definidos acima. Obtemos desse modo:

$$g_s = g_{s_0} + \frac{g_e}{1 + g_e / g_m} = 2a \left[s_{s_0} + \frac{s_e}{1 + (2h/a)(s_e / s_m)} \right] \quad (4.19)$$

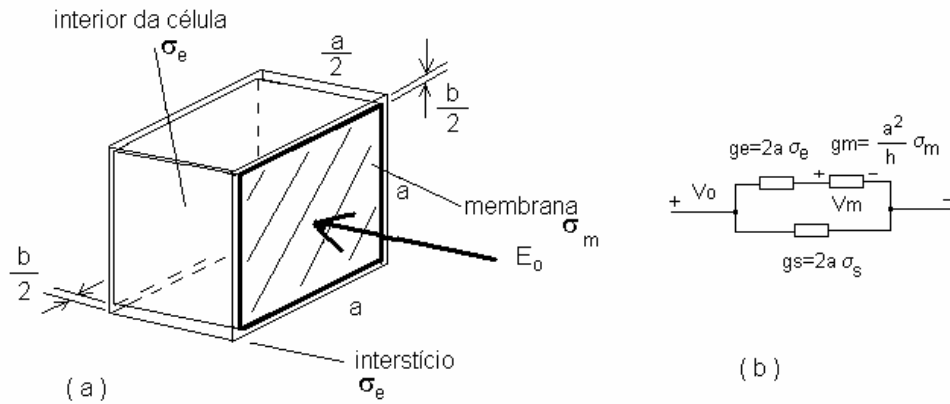


Figura 4.20 – Esquema utilizado na modelagem da condutância do tecido de células cúbicas. (a) estrutura de meia célula incluindo a membrana de uma das faces perpendiculares ao campo e interstício (a largura do interstício foi exagerada para facilitar a visualização). (b) circuito equivalente com condutâncias médias baseado na aproximação de campo uniforme em cada região. a é a aresta da célula, b é a largura do interstício e h é a espessura da membrana.

Aplicando a definição dada na equação (4.8), e supondo que a densidade média de carga entre as faces da membrana seja aproximadamente igual à densidade de carga no eletrólito, podemos estabelecer que:

$$\frac{s_m}{s_e} = \frac{m_m}{m_e} = 1 \quad (4.20)$$

Substituindo esta relação na equação (4.19), e dividindo ambos os lados por $2a$, que é a razão entre área e comprimento para meia célula, obtemos uma expressão para a condutividade média do meio que inclui o estado de permeabilização da membrana:

$$s_s = s_{s_0} + \frac{1}{1 + b} s_e \quad (4.21)$$

onde $b=2h/a$. Em virtude das aproximações aplicadas, essa equação não é exata. Duas correções podem ser imediatamente propostas para melhorar esse modelo. Em primeiro lugar, se considerarmos não desprezível a largura do interstício em comparação com a aresta da célula, devemos incluir no segundo membro da equação (4.21), a fração volumétrica ($p=Vol_{cel}/Vol_{ef}$), que relaciona o volume interno com o volume efetivo da célula, ou seja:

$$s_s = s_{s_0} + \frac{I}{I + b} p s_e \quad (4.22)$$

A outra correção pertinente diz respeito ao fato do campo não ser realmente uniforme em cada região. Esse fato pode significar que o parâmetro b não é exatamente igual a $2h/a$. Assim, propomos ajustar b de modo que o modelo analítico dado na equação (4.22) forneça resultados equivalentes aos resultados numéricos obtidos com o MCE (admitindo-se certa margem de erro, naturalmente).

Para completar o processo de cálculo analítico, devemos relacionar o potencial de membrana com o campo aplicado. De acordo com o esquema mostrado na Figura (4.20b), o potencial V_o desenvolvido sobre a célula divide-se entre eletrólito e membrana segundo a regra simples do divisor de tensão. Assim, temos para V_m :

$$V_m = \frac{V_o}{1 + g_m / g_e} = \frac{b}{b + I} \frac{a}{2} E_o = \frac{h}{b + I} E_o \quad (4.23)$$

Segundo a equação (4.9), a mobilidade relativa na membrana deve ser calculada como uma integral no tempo, pela expressão:

$$I = I_o + \int_0^t a \exp(V_m / V_p)^2 dx \quad (4.24)$$

onde $V_m(\mathbf{x})=V_m(t)$. Esta integral não tem solução analítica geral, portanto deve ser resolvida numericamente.

As Figuras (4.21), (4.22) e (4.23) comparam os resultados obtidos com os dois métodos (MCE e modelo analítico), para três formas de onda do campo aplicado: degrau, rampa e senóide. O melhor ajuste para os três casos foi obtido com $b=1.31*2h/a$. O modelo analítico reproduz com fidelidade o resultado numérico. A discrepância nos instantes iniciais se justifica plenamente como sendo devido ao transitório associado ao carregamento da membrana, algo que não está previsto no modelo analítico, já que ele se refere apenas ao comportamento da condutância estática. Esse comportamento transitório,

por outro lado, já está previsto no modelo em escala de tecido devido à presença da capacitância e condutância de dispersão.

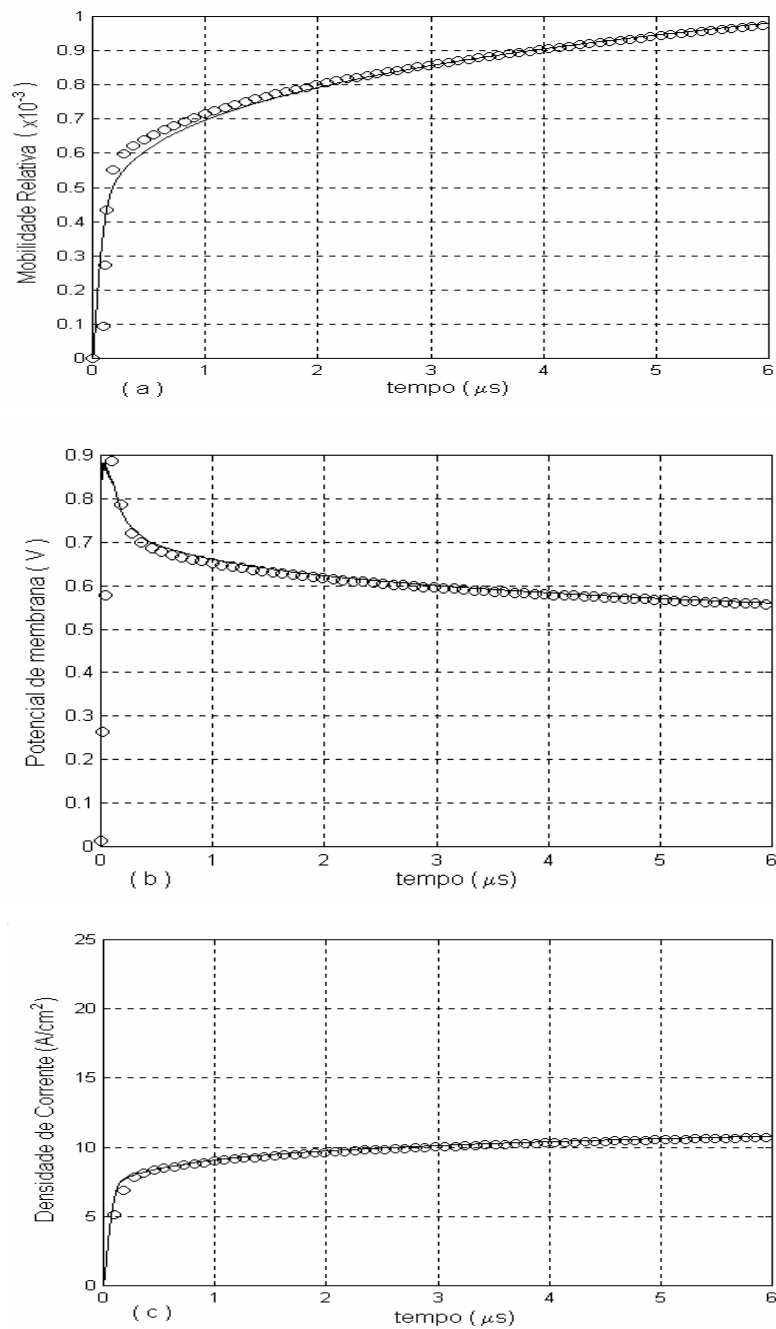


Figura 4.21 – Reposta do tecido à excitação com degrau de campo elétrico com amplitude de 1 kV/cm. O círculo indica o resultado numérico pelo MCE e a linha contínua indica a resposta obtida com o modelo analítico. (a) Mobilidade relativa na membrana. (b) Potencial de membrana. (c) Densidade média de corrente.

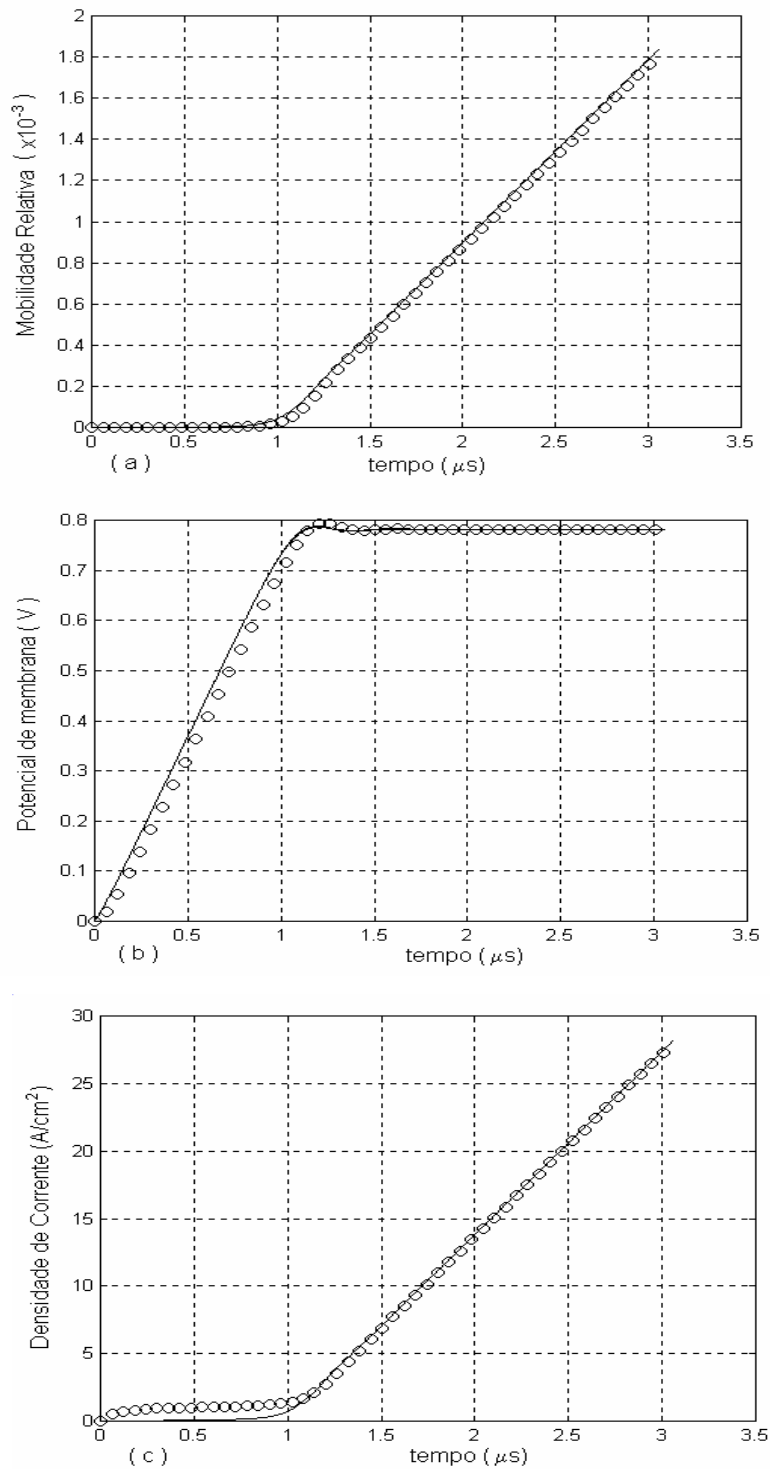


Figura 4.22 – Reposta do tecido à excitação com rampa de campo elétrico com inclinação 1 (kV/cm)/s. O círculo indica o resultado numérico pelo MCE e a linha contínua indica a resposta obtida com o modelo analítico. (a) Mobilidade relativa na membrana. (b) Potencial de membrana. (c) Densidade média de corrente.

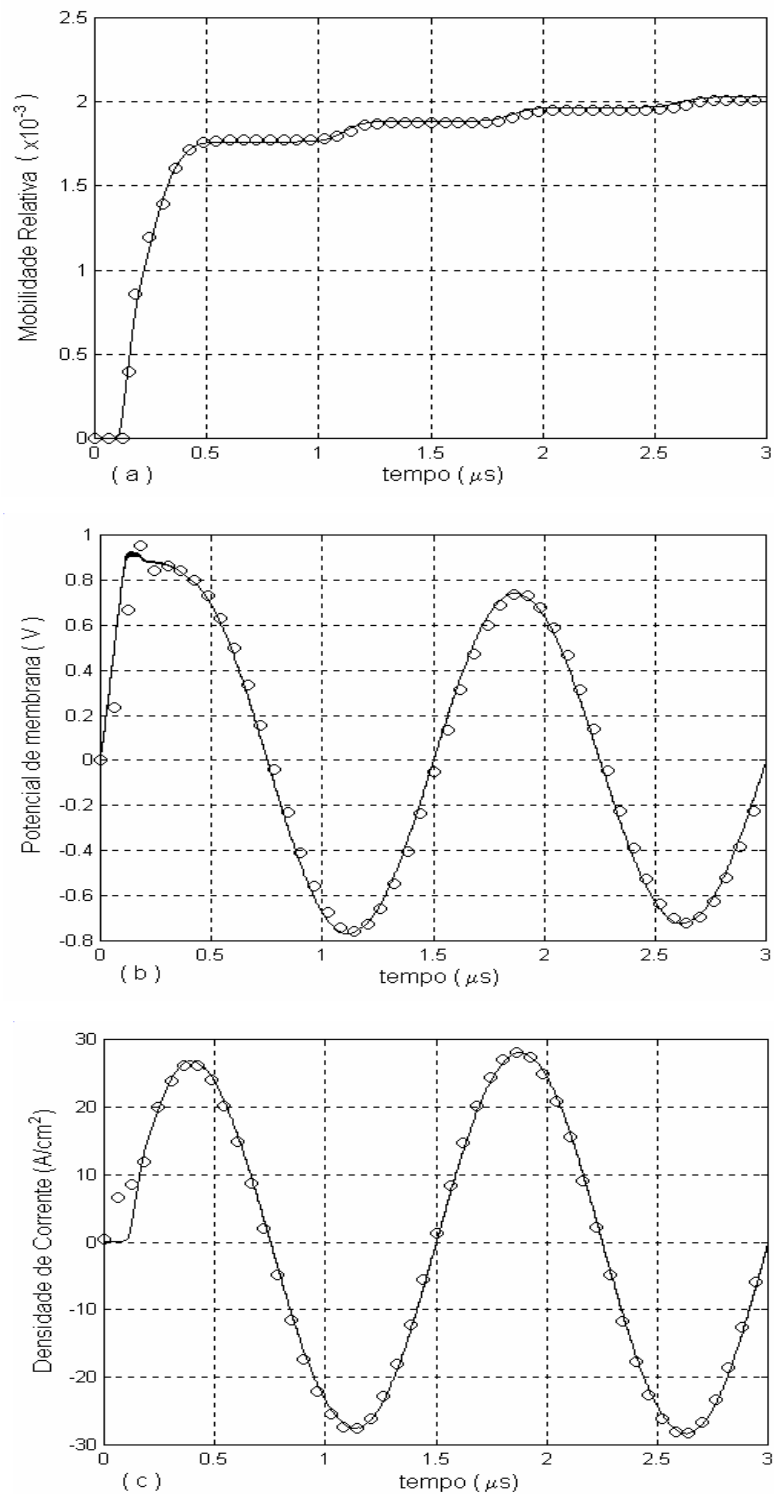


Figura 4.23 – Resposta do tecido à excitação com campo elétrico senoidal com amplitude de 2 kV/cm. O círculo indica o resultado numérico pelo MCE e a linha contínua indica a resposta obtida com o modelo analítico. (a) Mobilidade relativa na membrana. (b) Potencial de membrana. (c) Densidade média de corrente.

4.3.2) Análise em Escala de Tecido

A Figura (4.24) mostra os detalhes geométricos da simulação do tecido. Trata-se de um bloco na forma de paralelepípedo com dois eletrodos tipo agulha posicionados no centro e distantes 1cm um do outro. A profundidade de penetração é de 1cm. O esquema de discretização aplicado concentrou a maior parte dos nós no espaço entre os eletrodos, com elementos cúbicos de aresta 0.1cm. Conforme mostra a Figura(4.24b), foi usada uma progressão geométrica para aumentar gradualmente o tamanho dos elementos da malha nas posições mais afastadas em relação aos eletrodos. O mesmo tipo de discretização foi aplicado no eixo z . A malha final continha 9240 nós. A simulação consistiu na aplicação de pulsos simétricos de potencial elétrico entre os eletrodos e cálculo iterativo no domínio do tempo, usando a análise em escala de tecido, com os parâmetros de dispersão e de eletropermeabilização obtidos na análise em escala celular. O Passo de tempo utilizado foi de 0.3 ns.

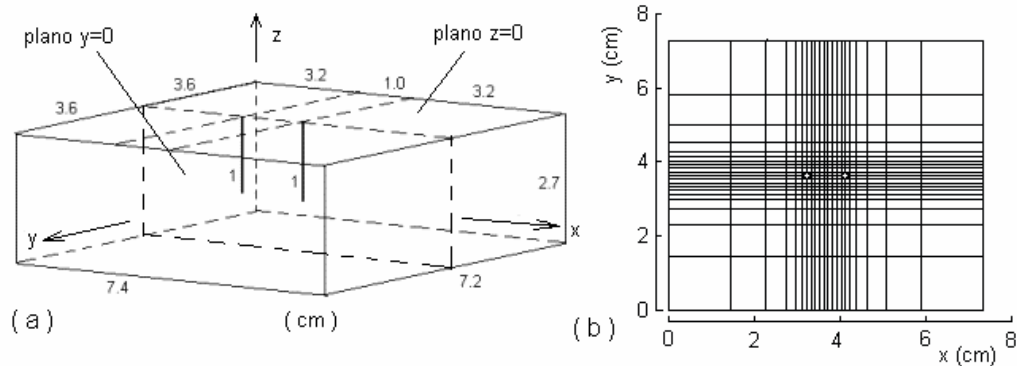


Figura 4.24 – Geometria de análise do tecido de células cúbicas. (a) Dimensões do tecido e posições dos eletrodos. (b) esquema de discretização utilizado. Na região entre os eletrodos, a distância entre nós é de 0.1 cm.

As Figuras (4.25) e (4.26) mostram as distribuições de potencial e corrente no plano $z = 0$, para a diferença de potencial aplicada de 800V (+400V / -400V), durante 10 μ s. As figuras comparam os resultados que se obtêm com e sem eletropermeabilização das membranas. A simulação que não leva em conta a ruptura reversível das membranas produz uma distribuição de potencial bem mais concentrada em torno dos eletrodos do que o cálculo com eletropermeabilização, onde o potencial resultante é mais distribuído. Mas, a maior diferença está no cálculo da corrente. A corrente obtida com o modelo de eletropermeabilização é muito maior que a obtida com as membranas intactas. Essa corrente é altamente localizada no espaço entre os eletrodos, o que indica que apenas um pequeno volume de tecido é efetivamente excitado até a condição de ruptura.

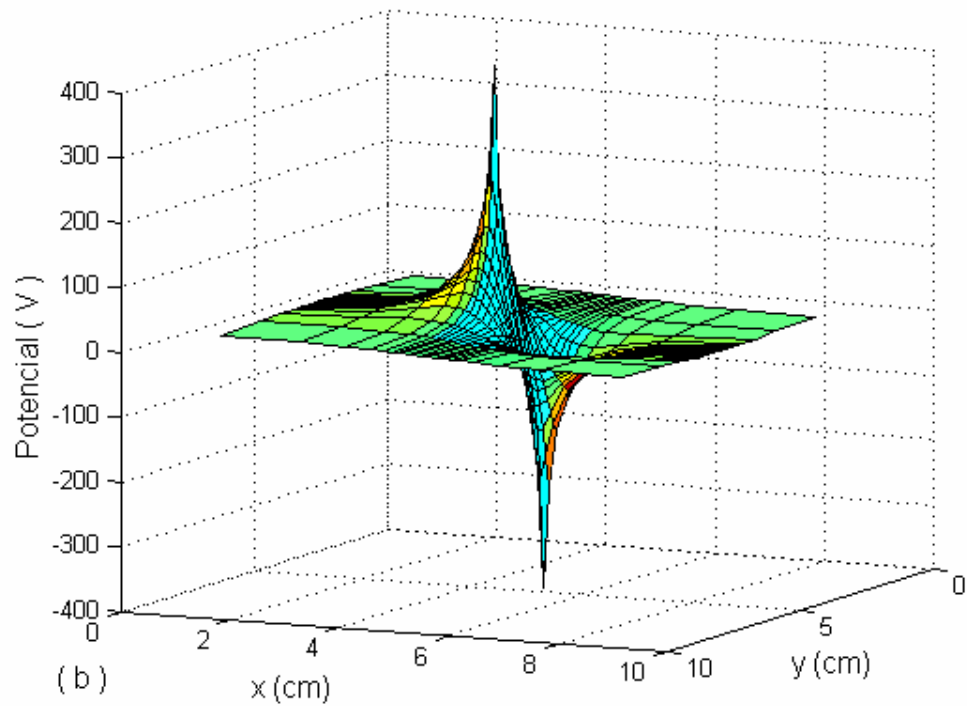
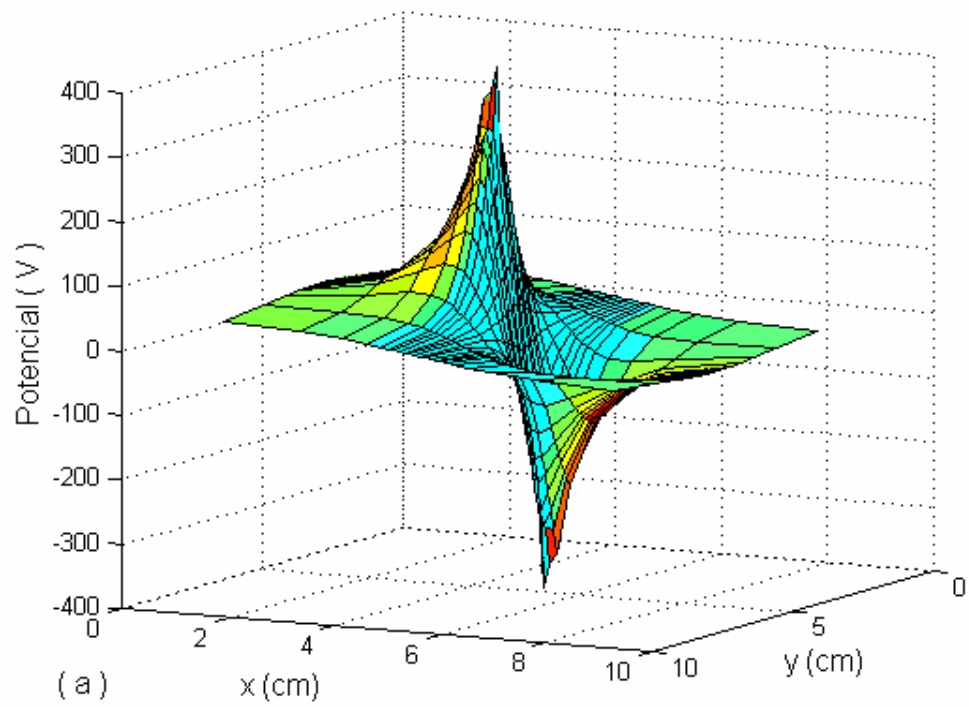


Figura 4.25 – Distribuição de potencial elétrico no plano $z=0$ do tecido para a diferença de potencial de 800V aplicada entre os eletrodos (+400V / -400V) durante $10\mu s$. (a) com eletroporabilização das membranas. (b) sem eletroporabilização das membranas.

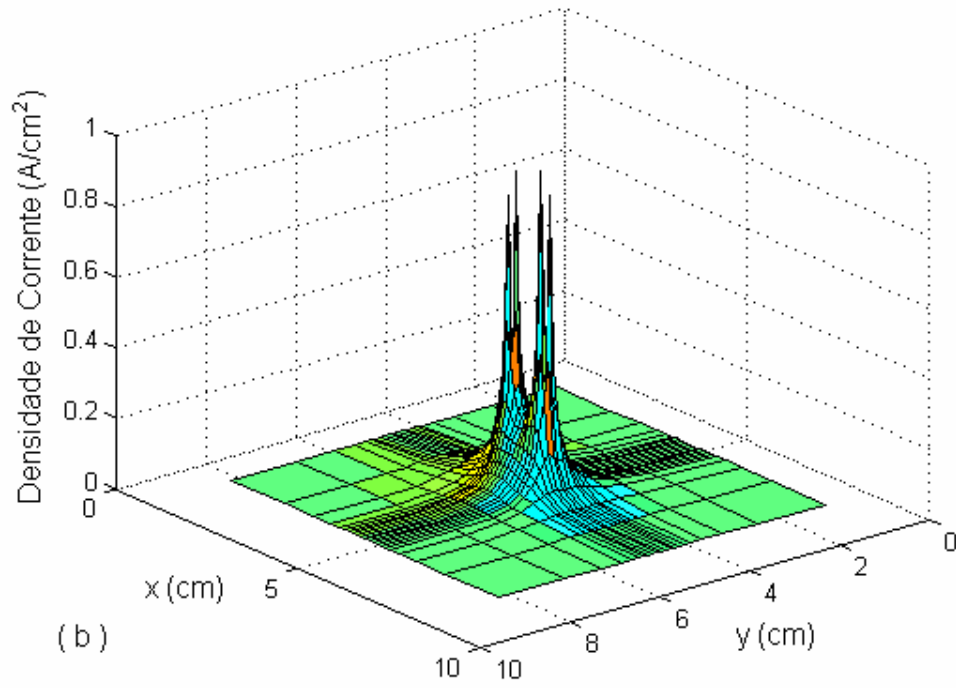
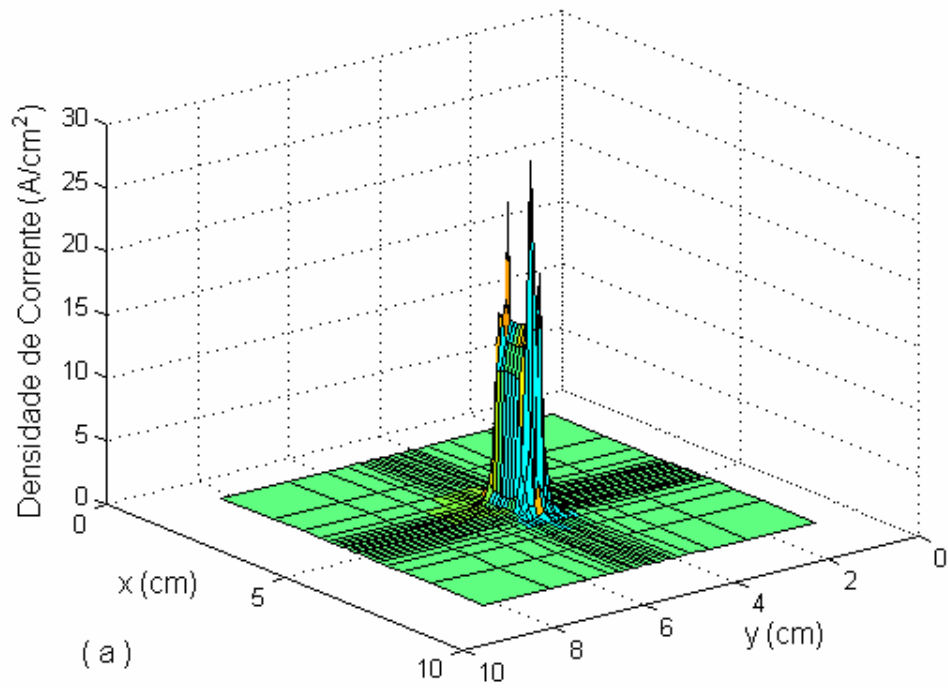


Figura 4.26 – Distribuição de corrente no plano $z=0$ do tecido para a diferença de potencial de 800V aplicada entre os eletrodos (+400V / -400V) durante $10\mu s$. (a) com eletropermeabilização das membranas. (b) sem eletropermeabilização das membranas.

As Figuras (4.27), (4.28) e (4.29) mostram as distribuições de campo elétrico em dois planos, o plano $z=0$ na superfície do tecido, e o plano $y=0$ que contém os eletrodos, para a diferença de potencial aplicada de 800V (+400V / -400V), durante 10 μ s. Estas figuras também comparam os resultados que se obtêm com e sem eletropermeabilização das membranas. As diferentes cores usadas delimitam regiões onde o campo é maior ou igual ao valor especificado nas legendas. É nítido que, devido à ruptura reversível, o campo elétrico se expande em todas as direções, envolvendo um volume maior que no caso

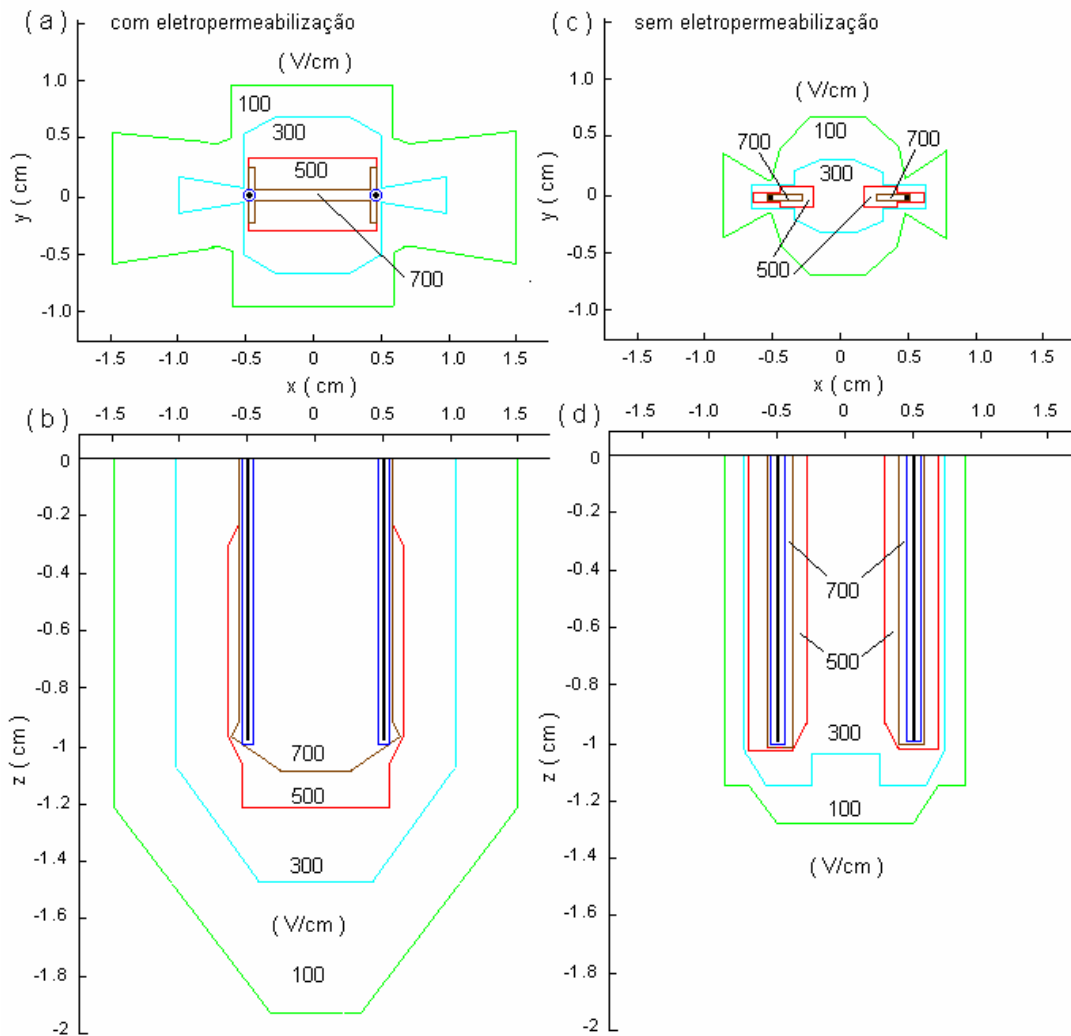


Figura 4.27 – Distribuição espacial da componente x do campo elétrico no tecido para a diferença de potencial de 800V aplicada entre os eletrodos (+400V / -400V) durante 10 μ s. As linhas delimitam regiões onde o campo é maior ou igual ao valor indicado. A localização dos eletrodos é indicada nas posições ± 0.5 cm. (a) Plano $z=0$ com eletropermeabilização. (b) Plano $y=0$ com eletropermeabilização. (c) Plano $z=0$ sem eletropermeabilização. (d) Plano $y=0$ sem eletropermeabilização.

das membranas intactas. Na Figura (4.27), por exemplo, as regiões de campo maior ou igual a 500 V/cm, obtidas sem considerar a ruptura das membranas, formam apenas “ilhas” isoladas em torno dos eletrodos. Com o modelo de eletropermeabilização, o volume correspondente a esse limite de campo forma um amplo “canal” entre os eletrodos. É evidente, então, que um cálculo de campo baseado apenas nas propriedades estáticas do tecido intacto não pode conduzir a resultados satisfatórios. Não pode, por exemplo, prever com precisão a extensão da região eletropermeabilizada.

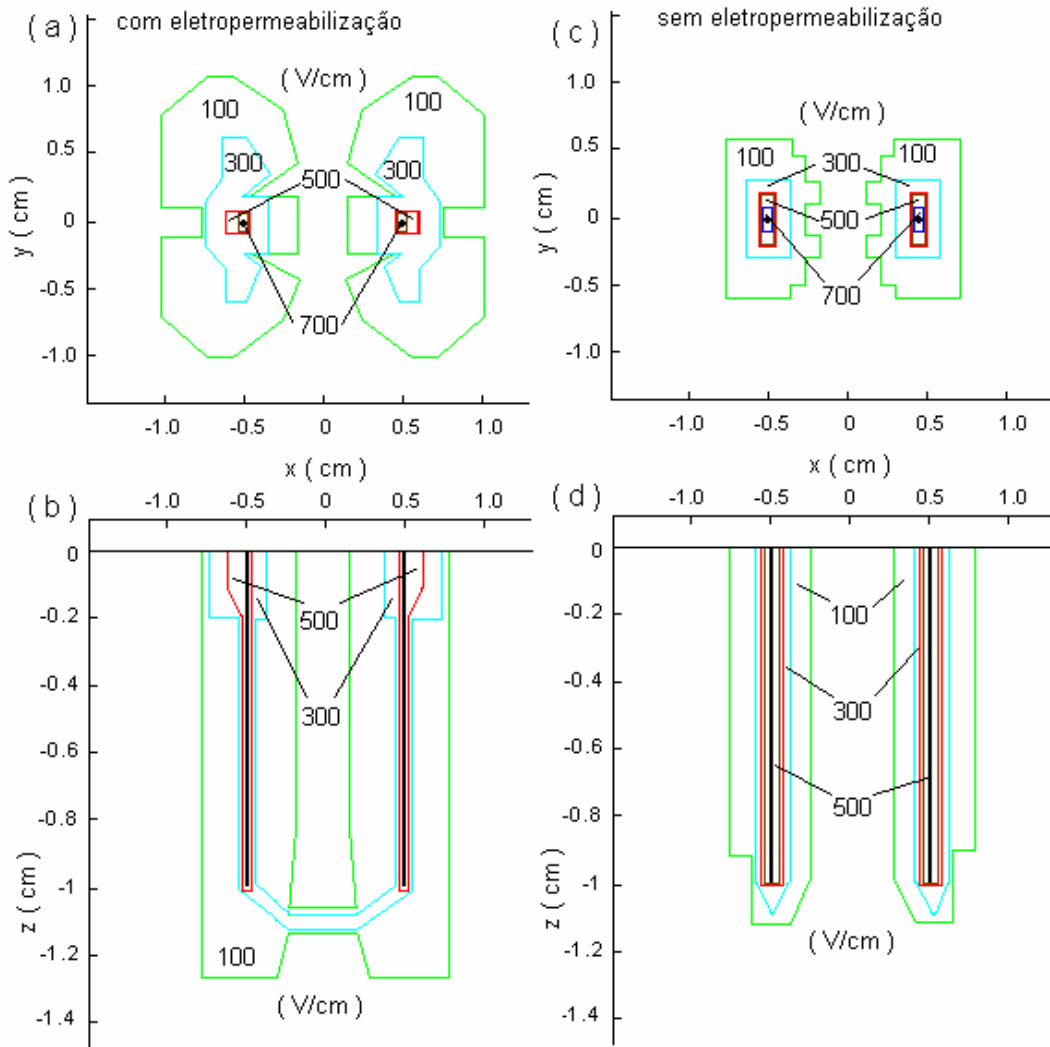


Figura 4.28 – Distribuição espacial da componente y do campo elétrico no tecido para a diferença de potencial de 800V aplicada entre os eletrodos (+400V / -400V) durante 10 μ s. As linhas delimitam regiões onde o campo é maior ou igual ao valor indicado. A localização dos eletrodos é indicada nas posições ± 0.5 cm. (a) Plano $z=0$ com eletropermeabilização. (b) Plano $y=0$ com eletropermeabilização. (c) Plano $z=0$ sem eletropermeabilização. (d) Plano $y=0$ sem eletropermeabilização.

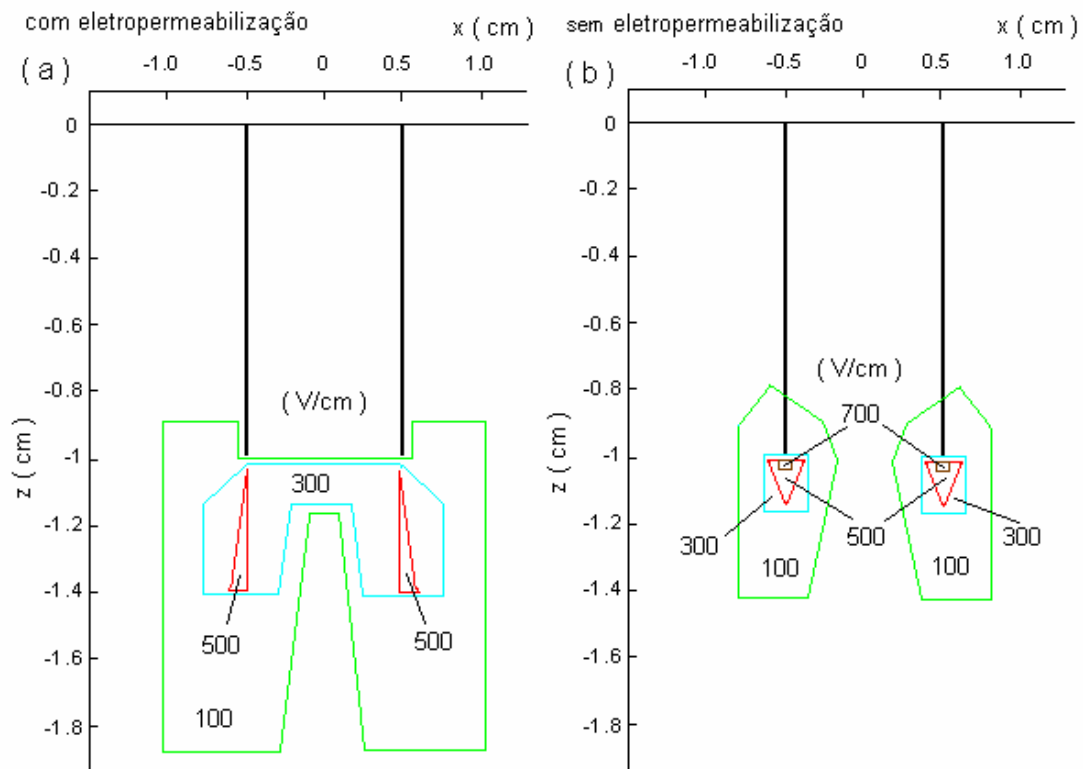


Figura 4.29 – Distribuição espacial da componente z do campo elétrico no tecido para a diferença de potencial de 800V aplicada entre os eletrodos (+400V / -400V) durante 10 μ s. As linhas delimitam regiões onde o campo é maior ou igual ao valor indicado. A localização dos eletrodos é indicada nas posições ± 0.5 cm. (a) Plano $y=0$ com eletropermeabilização. (b) Plano $y=0$ sem eletropermeabilização.

A Figura (4.30) mostra como a condutividade nas direções x e y se distribuem nos planos $z=0$ e $y=0$, como resultado da eletro-estimulação do tecido. A condutividade em qualquer posição deve estar entre 0.5 mS/cm, que é a condutividade estática do tecido intacto, e 19.5 mS/cm, que é a condutividade do eletrólito. O primeiro valor ocorre em posições longe dos eletrodos, onde o campo é insuficiente para eletropermeabilizar as membranas. Nessas regiões, o tecido pode ser considerado isotrópico. O segundo valor é o limite superior da condutividade que ocorre nas regiões próximas aos eletrodos, quando o aumento da permeabilidade faz com que as membranas praticamente não apresentem influência significativa no transporte iônico macroscópico. Pode-se observar na Figura (4.30) que na maior parte do espaço entre os eletrodos, o aumento da condutividade se dá apenas na direção x , ou seja, o tecido torna-se anisotrópico entre os eletrodos. Na direção

z , não há variação significativa de condutividade, a não ser em uma região relativamente pequena na extremidade dos eletrodos.

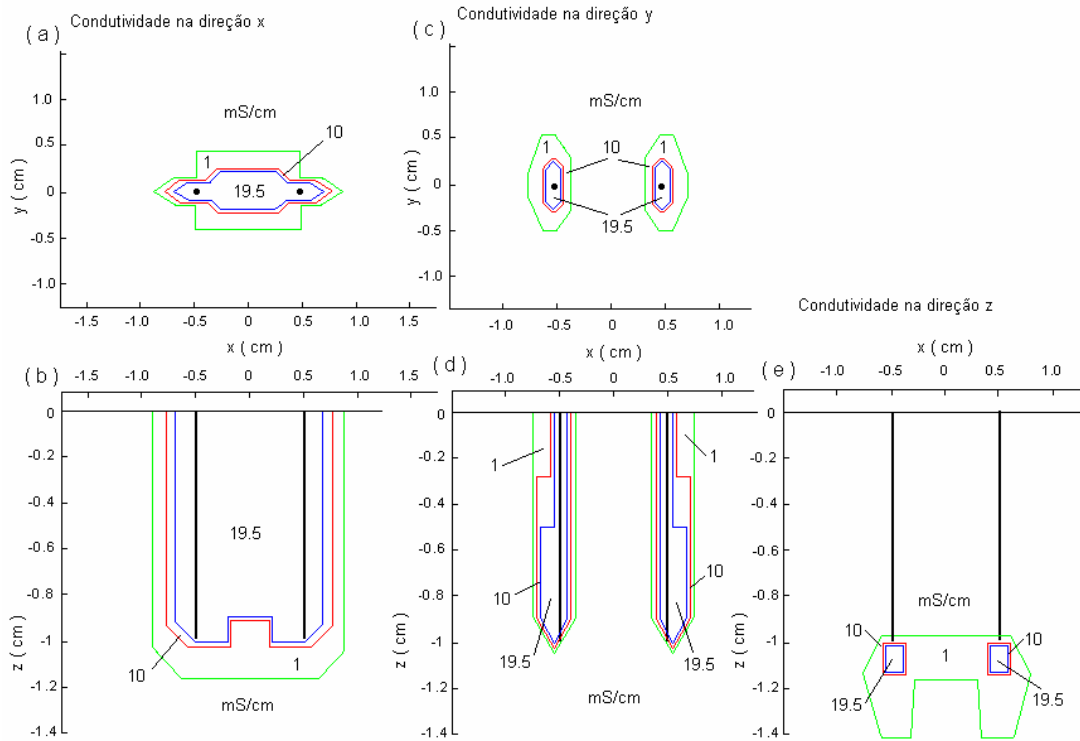


Figura 4.30 – Distribuição espacial da condutividade no tecido, para a diferença de potencial de 800V aplicada entre os eletrodos (+400V / -400V) durante 10 μ s. As linhas delimitam regiões onde a condutividade é maior ou igual ao valor indicado. A localização dos eletrodos é indicada nas posições ± 0.5 cm. (a) Condutividade na direção x no Plano $z=0$. (b) Condutividade na direção x no Plano $y=0$. (c) Condutividade na direção y no Plano $z=0$. (d) Condutividade na direção y no Plano $y=0$. (e) Condutividade na direção z no Plano $y=0$.

A Figura (4.31) compara a distribuição de campo e de condutividade na direção x no plano $z=0$. A maior parte da região eletropermeabilizada com condutividade máxima situa-se entre os eletrodos dentro do limite de 500V/cm, mas uma pequena parte situa-se entre os limites de 300 e 500V/cm, o que indica que o limiar de ruptura deve situar-se dentro dessa faixa de campo. Isso é coerente com o valor atribuído a V_p no modelo de mobilidade relativa, que projeta um limiar maior que 300V/cm, (V_p dividido pelo comprimento de meia célula).

É importante considerar que o fato da condutividade média do tecido alcançar um valor muito próximo da condutividade do eletrólito não significa que a membrana conduz “tão bem quanto o eletrólito”. Na verdade, segundo a equação (4.22), basta que $I \gg b$, para

que isso aconteça. No presente caso, $b=1.31 \times 10^{-3}$, e a condutividade média do tecido será praticamente igual à condutividade do eletrólito com $I \approx 10^{-2}$, o que significa que a mobilidade iônica na membrana é apenas 1% da mobilidade no eletrólito.

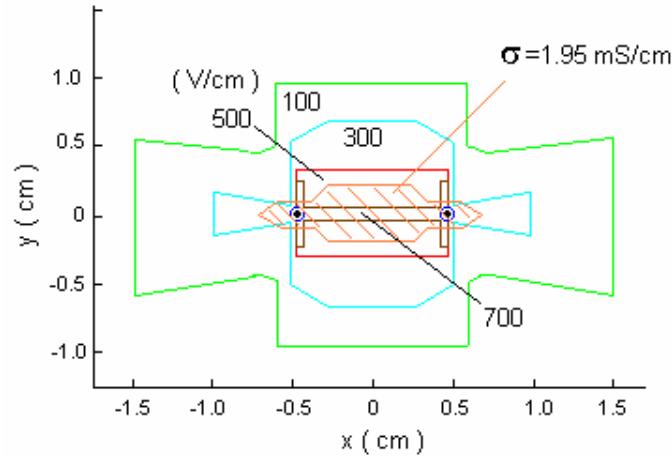


Figura 4.31 – Distribuição espacial de campo elétrico e condutividade na direção x no plano $z=0$, para a diferença de potencial de 800V aplicada entre os eletrodos (+400V / -400V) durante 10 μ s. As linhas delimitam regiões onde o campo é maior ou igual ao valor indicado. Apenas a região de máxima condutividade é indicada. A localização dos eletrodos é indicada nas posições ± 0.5 cm.

A Figura (4.32) mostra a condutância “efetiva” do tecido, calculada como a razão entre a corrente fornecida pela fonte e a diferença de potencial aplicada entre os eletrodos, como uma função do tempo, para vários potenciais. A linha tracejada indica o resultado obtido em uma simulação sem eletropermeabilização. A fase rápida de crescimento da condutância, com duração da ordem de 1 μ s, não é visível por estar superposta ao transitório de carregamento das membranas.

Para diferenças de potencial de 200 e 400 V, a variação de condutância é pequena. A condutância começa a crescer significativamente a partir de 600V e para 800 V torna-se cerca de 19 vezes a condutância do tecido intacto, no intervalo de 10 μ s. O valor obtido com 800 V corresponde a um condutor com a condutividade do eletrólito e seção transversal retangular com arestas 0.5cm na direção y e 1cm na direção z , conectando os eletrodos. É aproximadamente essa a descrição do canal de máxima condutividade que se observa na Figura (4.31).

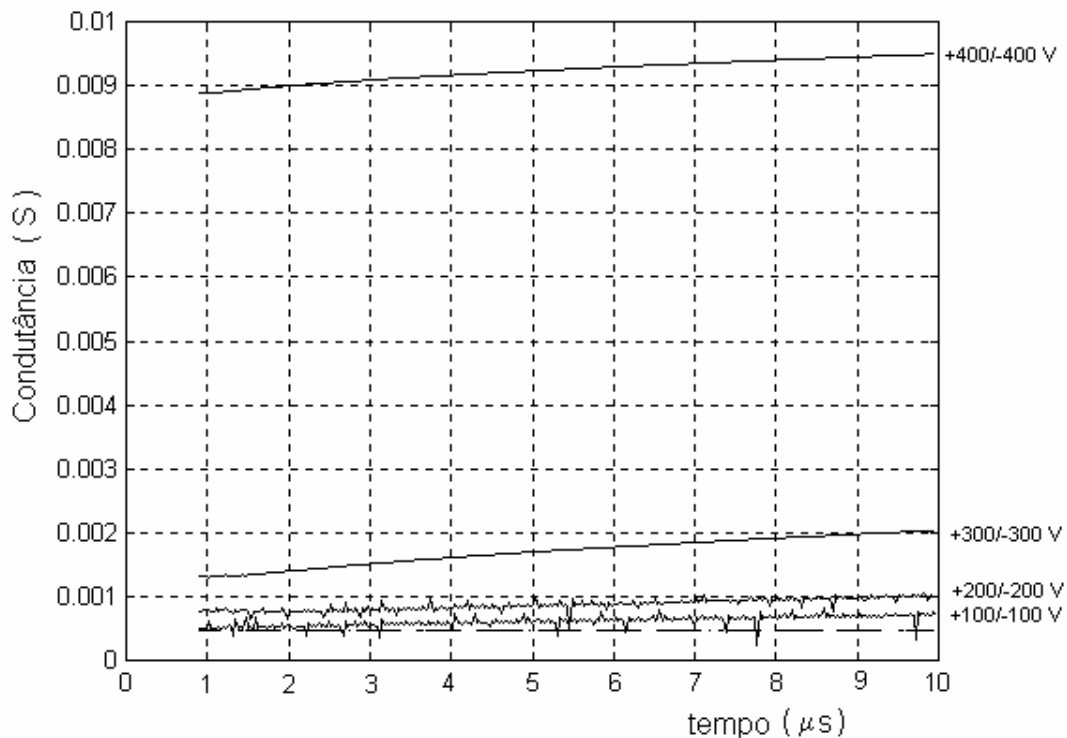


Figura 4.32 – Condutância da amostra de tecido como função do tempo para alguns potenciais aplicados. A linha tracejada indica a resposta obtida em uma simulação sem considerar a eletropermeabilização das membranas.

4.3.3) Conclusões Sobre o Experimento de Eletro-Estimulação de um Tecido

O presente estudo representa um outro importante exemplo de aplicação do MCE, principalmente em relação à forma integrada de utilização das duas abordagens do método: as análises em escala celular e em escala de tecido. Além disso, desenvolvemos um método para incorporar um modelo local de eletropermeabilização em um modelo macroscópico, que pode ser usado na análise de grandes volumes de tecido. As equações (4.22) e (4.23), contudo, foram obtidas sob condições válidas para uma estrutura periódica de células cúbicas. A aplicação delas em tecidos com geometrias muito diferentes é, portanto, questionável.

De qualquer modo, este exemplo permite observar que uma simulação numérica que não leve em conta a mudança dinâmica da condutividade do meio como consequência da eletro-estimulação, não pode conduzir a resultados satisfatórios. Com o aumento da condutividade o campo elétrico se expande para regiões mais distantes dos eletrodos. A corrente que se estabelece é muito maior no tecido eletropermeabilizado do que no tecido

intacto, e se concentra em um pequeno volume no espaço entre os eletrodos. Para potenciais suficientemente intensos forma-se um canal de condutividade máxima entre os eletrodos. A condutividade máxima é a condutividade do eletrólito.

Neste exemplo, há uma visível correlação entre a região de máxima condutividade e a região de campo elétrico que produz potenciais de membrana maiores que o parâmetro V_p do modelo de eletropermeabilização.

Com base no levantamento da condutância da amostra como função do tempo para diversos potenciais aplicados, concluímos que em experimentos práticos de eletroestimulação de tecidos biológicos, a monitoração da corrente de fonte pode ser um método simples e eficiente para diagnosticar o estado de eletropermeabilização do material. Além disso, um conjunto de curvas obtido para diversos valores de potencial aplicado pode permitir a determinação de parâmetros do modelo de eletropermeabilização para aquele tecido.

CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO, CONCLUSÕES E TRABALHOS FUTUROS

5.1) DISCUSSÃO

Esta tese tratou do desenvolvimento do Método do Circuito Equivalente para análise elétrica com simulação numérica em materiais biológicos. Ele é baseado na solução da equação da continuidade em um espaço discretizado e organizado na forma de um circuito elétrico de nós conectados com capacitâncias, condutâncias e fontes de corrente, que representam os diversos modos de transporte elétrico no meio.

A fim de obter uma descrição completa das propriedades de um meio, desenvolvemos circuitos equivalentes para análise em escala celular e em escala de tecido. O modelo em escala celular é aplicado na análise local das distribuições de potencial e densidades de cargas iônicas em volumes correspondentes a poucas células. Essa abordagem baseia-se na aproximação de que as características locais e as propriedades macroscópicas do material podem ser analisadas apenas considerando as interações entre as células vizinhas mais próximas. O modelo em escala celular é aplicado em volumes que envolvam muitas células e utiliza valores promediados de condutividade e permissividade para modelar os processos dispersivos do material. Esses valores promediados podem ser obtidos da análise local ou de experimentos.

O modelo em escala celular permite estudar com riqueza de detalhes como o campo elétrico e as correntes iônicas se distribuem em torno e dentro das células. Com a formulação em termos de elementos concentrados de circuito elétrico, é possível representar com facilidade o transporte elétrico em meios anisotrópicos, como os interstícios celulares. A inclusão da corrente de difusão como mecanismo de transporte relevante permite modelar corretamente o transporte iônico na presença de gradientes de concentração de íons.

O modelo em escala de tecido permite estudar os materiais que apresentam processos dispersivos associados à relaxação de primeira ordem, ou que possam ser aproximados por somatórios de bandas de relaxação de primeira ordem. Ele permite modelar com precisão a dependência das propriedades do material com a frequência.

Em ambas as abordagens, a especificação de condições de contorno e das condições de continuidade de campo e corrente em interfaces é facilitada pela modelagem na forma de elementos concentrados de circuito. Uma interface entre regiões de diferentes

condutividades e permissividades é descrita simplesmente como uma superfície de nós que conectam condutâncias e capacitâncias de diferentes valores. Uma superfície de contorno de um volume analisado pode ser definida através de nós que não têm conexão fora daquele volume ou nós com potenciais pré-definidos.

Diversas estratégias de discretização foram apresentadas, algumas de aplicação geral e outras de utilização mais específica. A abordagem de aplicação mais geral baseia-se em uma discretização básica com blocos de volume relativamente grandes, mas nunca maiores que um décimo do raio celular, e em divisões adicionais do espaço em blocos menores nas regiões críticas. Essas regiões geralmente estão associadas à membrana plasmática e aos interstícios celulares. Também aplicamos um conceito que denominamos discretização direcional, onde as arestas dos blocos variam segundo uma progressão definida ao longo de um eixo para estabelecer uma transição gradual entre duas regiões adjacentes com resoluções muito diferentes.

Três exemplos de aplicação do MCE em sistemas biológicos foram apresentados, demonstrando a versatilidade e potencialidade do método. Em cada iteração, a análise em escala celular pode fornecer as distribuições espaciais de potencial elétrico, densidade de carga de cada íon, correntes iônicas de condução e difusão de cada íon e campo elétrico em cada direção do sistema coordenado de referência. A promediação espacial das distribuições de corrente e campo elétrico no volume efetivo de uma célula permite obter, a partir da análise de Fourier, os espectros de condutividade e permissividade do meio. Com a análise em escala de tecido, no domínio do tempo ou da frequência, podem-se obter as distribuições de potencial, corrente total e campo elétrico.

A modelagem numérica do músculo esquelético mostra a conexão lógica entre análise em escala de tecido e análise em escala celular. Apesar da estrutura extremamente simples que usamos para representar a organização interna do músculo, a resposta espectral obtida se assemelha muito bem aos resultados experimentais segundo Foster e Schwan [1].

No estudo sobre a suspensão de células esféricas, foi incluída uma relação não linear referente ao transporte iônico na membrana em decorrência da eletropermeabilização. Essa inclusão foi muito facilitada pela característica do método de descrever o transporte elétrico por meio de elementos concentrados de circuito. Essa relação foi baseada nos estudos teóricos e experimentais realizados por Glauber et al com membranas planas [41]. Embora não tenha sido demonstrada a sua validade para

membranas celulares, o seu uso levou a resultados compatíveis com aqueles obtidos por Kinosita e Tsong para suspensões de eritrócitos [63].

No estudo sobre a eletro-estimulação de um tecido de células cúbicas, utilizamos um modelo que desenvolvemos para representar o efeito macroscópico da ruptura das membranas, o qual foi incorporado ao modelo em escala de tecido, descrevendo as variações da condutividade estática do material. Ficou claro que a variação espacial de condutividade na eletropermeabilização influencia fortemente a distribuição espacial de campo elétrico no meio.

Todos os três exemplos de aplicação do MCE em sistemas biológicos oferecem vários elementos para compreender os fenômenos elétricos em sistemas de células e eletrólitos, permitindo fazer previsões e propor experimentos para obtenção de características específicas desses materiais. Eles ilustram muito bem a importância e aplicabilidade dessa nova e interessante abordagem.

5.2) CONCLUSÕES

Baseado na exposição dos capítulos anteriores e na discussão acima, concluímos que:

- 1) O MCE tem uma fundamentação teórica formal, embora de simples concepção.
- 2) O MCE permite realizar análises tanto em escala celular quanto em escala de tecido.
- 3) O MCE fornece um grande conjunto de informações a respeito das grandezas elétricas de um material: Potencial, correntes, densidades de carga, campo elétrico, condutividade e permissividade macroscópica de um meio.
- 4) O MCE permite modelar com precisão a anisotropia local em torno de células em tecidos biológicos.
- 5) O MCE permite incorporar com facilidade efeitos não lineares nas propriedades do meio decorrentes da polarização aplicada (eg., a eletropermeabilização das membranas celulares).
- 6) O MCE é simples de entender e fácil de implementar em programas de simulação numérica.

Assim, concluímos que o MCE é o método de análise numérica de processos elétricos que apresenta todas as características exigidas para modelar com fidelidade o

comportamento elétrico de tecidos biológicos na faixa de frequências de validade de seus modelos.

5.3 TRABALHOS FUTUROS

Ao concluir esta tese precisamos responder três questões fundamentais relacionadas ao aproveitamento futuro deste trabalho de pesquisa:

Como o MCE pode ser comparado a outros métodos numéricos em eletromagnetismo?

A resposta a esta pergunta, infelizmente, não pode ser completamente objetiva. Sadiku e Peterson [68] ao considerar o problema de comparar métodos numéricos, declaram que é muito difícil um pesquisador conhecer profundamente todas as técnicas, ou pelo menos a maioria delas. Assim, muitas opiniões são meramente especulativas. Outro aspecto complicador é a definição de critérios aceitáveis para comparação. Alguns são objetivos, como a eficiência do método de discretização em representar geometrias complexas ou a demanda de tempo de processamento ou memória do sistema computacional. Outros, porém, são absolutamente subjetivos, como a facilidade de entender e implementar o algoritmo ou a natureza mais matemática ou mais física de sua formulação. Por exemplo, o método das diferenças finitas (normalmente abreviado por FDM) talvez ainda seja o mais popular dos métodos, dada a sua simplicidade tanto para entendê-lo quanto para implementá-lo. Uma das razões de tanta simplicidade está no formato retangular obrigatório de sua malha de discretização espacial, o que, por outro lado, é uma de suas maiores deficiências, pois não consegue representar muito bem certas geometrias complexas. Nesse sentido, o método dos elementos finitos (abreviadamente FEM) é superior, pois a geometria irregular de sua malha permite adequá-la facilmente a qualquer contorno. Mas o FEM tem uma formulação consideravelmente mais complexa e demanda maiores esforços na implementação dos algoritmos. Qual dos dois é melhor? Segundo Sadiku e Peterson [68], não existe consenso a esse respeito.

O MCE por sua vez, compartilha com o FDM o fato de aplicar a técnica de diferenças finitas para transformar equações diferenciais no domínio das variáveis contínuas, em equações algébricas no domínio discreto. As semelhanças, contudo acabam por aí. Na verdade, uma comparação direta entre esses métodos é no mínimo questionável, já que eles lidam com aspectos diferentes, embora interligados, das teorias dos sistemas

elétricos. O FDM (tanto quanto o FEM) resolvem as equações de campo de Maxwell. O MCE resolve a equação da continuidade e enfatiza não os campos, mas os processos de transporte elétrico. Essa é a razão por que o MCE é tão específico e otimizado para sistemas biológicos.

A maioria dos fenômenos elétricos importantes em baixas e médias frequências em tecidos biológicos envolve o movimento de íons, e isso se dá não apenas por condução, mas também por difusão. A anisotropia local em torno das membranas plasmáticas é outro aspecto que é facilmente modelado no MCE. Efeitos não lineares no transporte através da membrana podem ser facilmente incluídos na forma de impedâncias ou fontes de corrente não lineares. Isso foi demonstrado nos exemplos envolvendo eletropermeabilização no capítulo 4. A dispersão dielétrica está no âmago do modelo em escala de tecido que foi proposto. Por isso, no MCE, a dependência das propriedades do meio com a frequência é simples de ser modelada. Embora não tenhamos grande familiaridade com outros métodos numéricos, acreditamos que essas características não são compartilhadas por nenhuma outra técnica. Além disso, o MCE é um método físico e a matemática envolvida é simples. Por isso é de fácil entendimento e implementação.

O problema relativo à malha regular, que foi citado anteriormente como uma das limitações do FDM, foi superado no MCE com o método de criar regiões de alta resolução, conforme foi discutido no capítulo 2. As limitações mais importantes do MCE referem-se ao processamento do método iterativo no domínio tempo, tanto em escala celular quanto em escala de tecido, porque as exigências de tempo de processamento e memória de armazenamento temporário (RAM) são grandes. Outro limite importante é a máxima frequência de validade da análise em escala de tecido. O MCE não lida diretamente com as equações de Maxwell e muito menos com ondas eletromagnéticas. Por isso é limitado às aplicações em baixas e médias frequências onde a abordagem de circuito equivalente seja aplicável. Um valor de referência para o limite de frequência é 100MHz, de acordo com o que foi exposto no capítulo 3.

Quais são as aplicações práticas do MCE?

Atualmente existe um número significativo de aplicações práticas de campos e correntes elétricas em métodos terapêuticos e em pesquisa científica com tecidos vivos. A desfibrilação cardíaca, a eletro-estimulação muscular, a eletropermeabilização de membranas em eletroquimioterapia e em pesquisa biotecnológica, são alguns dos exemplos

mais importantes. Em virtude do crescente interesse pelo estudo dos efeitos biológicos de campos eletromagnéticos que se percebeu nas últimas décadas, a eletro-estimulação biológica tornou-se um campo do conhecimento científico em expansão e com amplas possibilidades práticas no futuro.

Nesse contexto, os métodos de análise numérica de campos ganham ênfase como auxiliares no estudo teórico e no planejamento de experimentos envolvendo campos e tecidos vivos. Nesta tese foi demonstrado que o MCE permite obter resultados tanto em escala celular quanto em grandes volumes de tecido. Dentro do seu limite de frequência, o MCE, portanto, pode servir como uma ferramenta de análise elétrica de grande valor prático, seja no estudo das distribuições espaciais de campo e correntes, seja na caracterização da dispersão dielétrica, ou seja na obtenção de parâmetros do meio que dependem do campo aplicado.

Em termos de aplicações terapêuticas, uma das grandes possibilidades em médio prazo, é o uso do MCE no planejamento da estimulação elétrica de tumores para aumentar a absorção de drogas químicas. O estudo da eletro-estimulação do tecido de células cúbicas mostrado no capítulo 4 é uma boa ilustração dessa possibilidade. Naturalmente, para se alcançar esse fim, será necessário desenvolver modelos completos e confiáveis do processo de eletropermeabilização de membranas lipídicas. Os resultados apresentados no capítulo 4 são apenas preliminares, porque se baseiam em um modelo incompleto, possivelmente válido apenas na fase inicial do processo. Tais resultados, contudo, são importantes, pois indicam a relevância da teoria da eletropermeabilização de membranas lipídicas na implementação prática da terapia e sinalizam o caminho de melhorias que deve ser seguido.

Qual é a perspectiva para o futuro?

O presente trabalho representa uma importante etapa vencida. Todo o formalismo físico e matemático do MCE foi estabelecido e uma grande quantidade de software foi produzida para implementá-lo. A continuação desse processo de desenvolvimento demandará novos esforços de pesquisa nos seguintes aspectos:

- 1) Melhoria dos algoritmos visando a redução na demanda de tempo e memória requerida na simulação.
- 2) Construção de interfaces de entrada e saída de dados que simplifiquem ao máximo a utilização por usuários que não sejam “experts” no assunto.

- 3) Análise teórica e experimental do processo de eletropermeabilização de células e tecidos visando o desenvolvimento de modelos completos e confiáveis desse processo.
- 4) Estudos com aplicação do MCE em sistemas realistas, envolvendo grandes estruturas biológicas, como no caso da estimulação do músculo esquelético e no estudo de desfibrilação cardíaca.
- 5) Inclusão dos processos de transporte ativo, transporte facilitado e canais excitáveis em membranas celulares.
- 6) Inclusão da eletroforese e da difusão molecular em tecidos, como um recurso de estimulação da transferência molecular em células eletropermeabilizadas.
- 7) Outros.

REFERÊNCIAS:

- [1] Foster, K.R. and Schwan, H.P., “Dielectric properties of tissues”, Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields., 2^a edição, CRC, 1995, 25-102.
- [2] Berg, H., “Electrostimulation of cell metabolism by low frequency electric and electromagnetic fields”, Bioelectrochemistry and Bioenergetics”, 1994, 31, 1-25.
- [3] Tenforde, T.S., “Biological interactions of extremely-low-frequency electric and magnetic Fields”, Bioelectrochemistry and Bioenergetics”, 1991, 25, 1-17.
- [4] Glaser, R., “Current concepts of the interactions of weak electromagnetic fields with cells”. Bioelectrochemistry and Bioenergetics”, 1992, 27, 255-268
- [5] Blank, M., “Biological effects of electromagnetic fields”. Bioelectrochemistry and Bioenergetics”, 1993, 32, 203-210.
- [6] Tsong, T.Y., “Electric activation of membrane enzymes: Cellular Transduction of High and Low Periodic Signals”, Biological Effects of Electric and Magnetic Fields, Vol.1, Academic Press, 1994, 143-164.
- [7] Weaver, J.C. and Chizmadzhev, Y., “Electroporation”, Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields., 2^a edição, ed. CRC, 1995, 247-274.
- [8] Tsong, T. Y., “On electroporation of cell membranes and some related phenomena”, Bioelectrochemistry and Bioenergetics”, 1990, 24, 291-295.
- [9] Zhelev, D.V. and Needham, D., “The influence of electric fields on biological and model membranes”, , Biological Effects of Electric and Magnetic Fields, Vol.1 , Academic Press, 1994, 105-142.
- [10] Weaver, J.C., “Electroporation of cells and tissues”, IEEE Transactions on Plasma Science, 2000, 28-1, 24-33.
- [11] Hofmann, G.A. , “Electroporation therapy: a new approach for the treatment of head and neck cancer”, IEEE Transactions of Biomedical Engineering , 1999, 46, 6, 752-758
- [12] Dev, S.B. et al, “Medical applications of electroporation”, IEEE Transactions on Plasma Science, 2000, 28-1, 206-223.
- [13] Rebersek, M. et al, “Electrochemotherapy with cisplatin of breast cancer tumour nodules in male patient”, annals of 3rd International Conference on Bioelectromagnetism, 2000, Bled – Slovenia.
- [14] Mir, L.M., “Therapeutic perspectives of in vivo cell electropermeabilization”. Bioelectrochemistry, 2000, 53,1-10.

- [15] Nordenstrom, B. E.W., "Electrostatic field interference with cellular and tissue function, leading to dissolution of metastases that enhances the effect of chemotherapy". Eur. J. Surg., 1994, 574, 121-135.
- [16] Pethig, R., "Dielectric properties of biological materials and medical applications". IEEE Transactions on Electrical Insulation, 1984, EI-19,5, 453-474.
- [17] Lin, J.C. e Gandhi, O.P., Computacional Methods for Predicting Field Intensity, Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields., 2ª edição, ed. CRC, 1995, 337-402.
- [18] Atkins, P.W., Physical Chemistry, 5ª edição, 1992, Oxford University Press, Cap. 24, 817-860.
- [19] Bottcher, C.J.F. e Bordewijk, P., Theory of Electric Polarization, 2ª edição, 1978, Elsevier Scientific Publishing Company, Vol.2 , Cap. 8, 1- 44.
- [20] Cole, K.S. e Cole, R.H., "Dispersion and absorption in dielectrics, I. Alternating current characteristic", J. Chem. Phys., 9, 341, 1941.
- [21] Atkins, P.W., Molecular Quantum Mechanics, 2ª edição, 1983, Oxford University Press, cap. 13, 349-376.
- [22] Schwan, H.P. *et al*, On the low-frequency dielectric dispersion of colloidal particles in electrolyte solution, J. Phys. Chem. , 1962, 66, 2626-2635.
- [23] McLaughlin, S., The electrostatic properties of membranes, Annu. Rev. Biophys. Chem., 1989, 18, 113-136
- [24] Cevc, G., Membrane electrostatics, Biochimica et Biophysica Acta, 1990, 1031-3, 311-382.
- [25] Schwarz,G., A Theory of the low-frequency dielectric dispersion of colloidal Particles in electrolyte solution, J. Phys. Chem., 1962, 66, 2636-2642.
- [26] Chew,W.C. e Sen, P.N., Dielectric enhancement due to electrochemical double Layer: thin double layer approximation, J. Chem. Phys., 1982, 77(9), 4683-4693.
- [27] Chew,W.C., "Dielectric enhancement and electrophoresis due to an electrochemical double layer: A uniform approximation, J. Chem. Phys., 1984, 80(9), 4541-4552.
- [28] Kinosita, K.Jr. e Tsong, T.Y., Voltage-Induced Pore Formation and Hemolysis of Human Erythrocytes, Biochimica et Biophysica Acta, 1977, 471, 227-242
- [29] Kinosita, K.Jr. et al, "Events of membrane electroporation visualized on a time scale from microsecond to seconds", Guide to Electroporation and Electrofusion, Academic Press, 1992, San Diego-California.

- [30] Neumann, E. e Rosenheck, K., "Permeability changes induced by impulses in vesicular membranes", *J. Memb. Biol.*, 10, 1972, 279-290.
- [31] Zimmermann, U., "Electrical hemolysis of human and bovine red blood cells", *J. Memb. Biol.*, 30, 1976, 135-152.
- [32] Kinosita, K.Jr. e Tsong, T.Y., "Hemolysis of human erythrocytes by a transient electric field", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74, 1977, 1923-1927.
- [33] Kinosita, K.Jr. e Tsong, T.Y., "Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane", *Nature (Lond.)*, 268, 1977, 438-441.
- [34] Kinosita, K.Jr. e Tsong, T.Y., "Voltage-induced pore formation and hemolysis of human erythrocytes", *Biochim. Biophys. Acta*, 471, 1977, 227-242.
- [35] Chang, D.C., "Structure and dynamics of electric field-induced membrane pores as revealed by rapid-freezing electron microscopy", *Guide to Electroporation and Electrofusion*, Academic Press, San Diego-California, 1992.
- [36] Parsegian, V.A., "Energy of an ion crossing a low dielectric membrane: solutions for four relevant electrostatic problems", *Nature*, 221, 1969, 844-846.
- [37] Weaver, J.C. e Chizmadzhev, Y., "Electroporation", *Handbook of Biological Effects of Electromagnetic Fields*, CRC, 1996, 247-274.
- [38] Richey, H.G.Jr., *Química Orgânica*, Prentice Hall do Brasil, Rio de Janeiro, 1986.
- [39] Gruenwald, B. et al, "The kinetics of the formation of rotational isomers in the hydrophobic tail region of phospholipid bilayers", *Biochim. Biophys. Acta*, 641, 311-319.
- [40] Tsong, T.Y., "Time sequence of molecular events in electroporation", *Guide to Electroporation and Electrofusion*, Academic Press, 1992, 47-61.
- [41] Glaser, R.W. et al, "Reversible electrical breakdown of lipid bilayers: formation and evolution of pores", *Biochim. Biophys. Acta*, 940, 1988, 275-287.
- [42] Weaver, J.C. e Mintzer, R.A., "Decreased bilayer stability due to transmembrane potentials", *Phys. Letters*, 86A, 1, 1981, 57-59.
- [43] Abidor, I.G. et al, "Electric breakdown of lipid membranes I. The main experimental facts and their qualitative discussion", *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 6, 1979, 37-52.
- [44] Litster, J.D., *Phys. Letters*, 53A, 1975, 193
- [45] DeBruin, K.A. e Krassowska, W., "Modelling electroporation in a single cell: I. Effects of field strength and rest potential", *Biophys. J.*, 77, 1999, 1213-1224.

- [46] Barnett, A. e Weaver, J.C., "Electroporation: a unified quantitative theory of reversible electrical breakdown and mechanical rupture in artificial planar bilayer membranes". *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, 25, 1991, 163-182.
- [47] Weaver, J.C. e Barnett, A., "Progress toward a theoretical model for electroporation mechanism: membrane electrical behavior and molecular transport", *Guide to Electroporation and Electrofusion*, Academic Press, 1992, 91-117.
- [48] Taupin, C. Et al, *Biochemistry*, 14, 1975, 4771-4775.
- [49] Weaver, J.C. e Chizmadzhev, Y.A., "Theory of electroporation – A review", *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 41, 1996, 135-160.
- [50] Jackson, D., "Eletrodinâmica Clássica", Guanabara Dois, 1983, Rio de Janeiro.
- [51] Reitz, J.R. et al, "Fundamentos da Teoria Eletromagnética", Ed. Campus, 1982, Rio de Janeiro.
- [52] Pastushenko, V.F. et al, "Electric Breakdown of bilayer lipid membranes II. Calculation of the membrane lifetime in the steady-state diffusion approximation". *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 6, 1979, 53-62.
- [53] DeBruin, K.A. e Krassowska, W., "Electroporation and shock-induced transmembrane potential in a cardiac fiber during defibrillation strength shocks". *Annals of Biomedical Engineering*, 26, 1998, 584-596.
- [54] DeBruin, K.A. e Krassowska, W., "Modelling electroporation in a single cell. II. Effects of ionic concentrations". *Biophysical Journal*, 77, 1999, 1225-1233.
- [55] Barnett, A., "The current-voltage relation of an aqueous pore in a lipid bilayer membrane", *Biochim. Biophys. Acta*, 1025, 1990, 10-14.
- [56] Zhou, Pei-Bai, *Numerical Analysis of Electromagnetic Fields*, Editora Spring Verlag, 1993, 88-90.
- [57] Sadiku, "Numerical techniques in electromagnetics", , , 135.
- [58] Dehler, M., "Status and future of the 3D MAFIA group of codes", *IEEE Transactions on Magnetics*, v26, 2, 1990, 751-754.
- [59] Gandhi, O.P., DeFord, J.F. e Kanai, H., "Impedance method for calculation of power deposition patterns in magnetically induced hyperthermia", *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v31, 10, 1984, 644-651.
- [60] Orcutt, N. e Gandhi, O.P., "Use of the impedance method to calculate 3-D power deposition patterns for hyperthermia with capacitive plate electrodes", *IEEE Transactions on Biomedical on Engineering*, v37, 1, 1990, 36-43.

- [61] Christopoulos, C., "The transmission-line modeling method", Oxford University Press, Oxford, 1995.
- [62] Gray, P.E. e Searle, C.L., "Electronic Principles", New York, Wiley, 1969.
- [63] Polk, C. "Introduction", Handbook of biological effects of electromagnetic fields, 2ª edição, CRC Press, 1996.
- [64] Junqueira, L.C. e Carneiro, J., "Histologia Básica", Guanabara Koogan, 9ª ed., 1999.
- [65] Kinosita, K. Jr. e Tsong, T.Y., "Voltage -induced conductance in human erythrocyte membranes", Biochimica et Biophysica Acta, 1979, 554, 479-497.
- [66] H.P. Schwan, "Electrical Properties of Blood and its Constituents: Alternating Current Spectroscopy", Blut, 1983, 46, 185 -197.
- [67] Trautman, E.D., Newbower, R.S., "A practical analysis of the electrical conductivity of blood", IEEE Transactions of Biomedical Engineering, BME-30, 3, 1983, 141-154.
- [68] Sadiku, M.N.O. e Peterson, A.F., "A comparison of numerical methods for computing electromagnetic fields", IEEE Proceedings – 1990 Southeastcon, session 2B1.