

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Escola de Engenharia
Programa de Pós Graduação em Engenharia Elétrica

João Francisco Cristeli do Vale

**ESTUDO NUMÉRICO SOBRE O FENÔMENO DE
ELETROPORAÇÃO EM CÉLULAS ISOLADAS**

Belo Horizonte
2024

João Francisco Cristeli do Vale

ESTUDO NUMÉRICO SOBRE O FENÔMENO DE ELETROPORAÇÃO EM CÉLULAS ISOLADAS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Engenharia Elétrica.

Área de concentração: Sistemas de Computação e Telecomunicações

Linha de pesquisa: Antenas, Propagação de Ondas de Rádio e Eletromagnetismo Aplicado

Orientador: Jaime Arturo Ramírez

Belo Horizonte

2024

V149e Vale, João Francisco Cristeli do.
Estudo numérico sobre o fenômeno de eletroporação em células isoladas [recurso eletrônico] / João Francisco Cristeli do Vale. – 2024. 1 recurso online (125 f. : il., color.) : pdf.

Orientador: Jaime Arturo Ramírez.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia.

Apêndices e anexos: f. 85-125.

Bibliografia: f. 80-84.

1. Engenharia elétrica – Teses. 2. Correntes elétricas – Teses. 3. Modelagem matemática – Teses. 4. Células epiteliais – Teses. 5. Porosidade – Teses. I. Ramírez, Jaime Arturo. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Engenharia. III. Título.

CDU: 621.3(043)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA ELÉTRICA
FOLHA DE APROVAÇÃO

"Estudo Numérico Sobre O Fenômeno de Eletroporação em Células Isoladas"

João Francisco Cristeli do Vale

Tese de Doutorado submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Escola de Engenharia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Engenharia Elétrica. Aprovada em 25 de setembro de 2024. Por:

Prof. Dr. Jaime Arturo Ramirez
DEE (UFMG) Orientador

Prof. Dr. Renato Cardoso Mesquita
DEE (UFMG)

Prof. Dr. Elson José da Silva
DEE (UFMG)

Prof. Dr. Adroaldo Raizer
Depto Eng. Elétrica (UFSC)

Prof. Dr. Marcio Matias Afonso
Depto Eng. Elétrica (CEFET-MG)



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Antonio Borges Torres**, **Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 11/10/2024, às 18:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site

Resumo

Uma célula submetida a campos elétricos suficientemente intensos mas de curta duração apresenta a formação de poros, passagens aquosas transientes, em sua membrana. O fenômeno pode ser reversível, com o fechamento dos poros, ou irreversível com a morte da célula. Ambas as versões do fenômeno possuem diversas aplicações em medicina e biologia. Este trabalho visa o estudo e comparação de diferentes abordagens para o cálculo da corrente de eletroporação através de um modelo numérico da eletroporação em células isoladas submetidas a pulsos elétricos de microssegundos. Planeja-se obter três resultados principais para cada uma das abordagens: o número de poros, os raios dos poros e a diferença de potencial na membrana, incluindo suas respectivas distribuições espaciais e evoluções temporais. A partir de um estudo da literatura foram determinadas as equações que descrevem o fenômeno, sendo estas a equação de Smoluchowski que calcula a densidade dos poros e a equação de Laplace que descreve o potencial elétrico. É assumida a célula esférica, com membrana uniforme e com os meios envolvidos - meio externo, citoplasma e membrana celular - homogêneos. A célula é considerada isolada e submetida a um pulso elétrico entre duas placas paralelas. A partir destas suposições e das características conhecidas do fenômeno, foram desenvolvidas aproximações para as equações envolvidas de forma a facilitar sua implementação numérica. Devido à simplicidade da geometria optou-se pelo uso do método das diferenças finitas no domínio do tempo, que permite tratar com facilidade as características temporais do problema. Foram desenvolvidas aproximações por diferenças finitas das equações estudadas, as quais devem ser resolvidas de forma acoplada. Foi implementado um modelo de simulação numérica bidimensional completo para a eletroporação da célula, baseado em uma aproximação assintótica da equação de Smoluchowski para o cálculo do número de poros e seus raios e uma aproximação em diferenças finitas para a equação de Laplace para o cálculo do potencial. Esta simulação foi validada de acordo com a literatura, obtendo resultados condizentes qualitativa e quantitativamente com os esperados. A partir desta simulação foi estudada a modelagem da corrente através dos poros, comparando dois modelos amplamente utilizados na literatura e analisando o possível impacto em aplicações. Foram encontradas diferenças significativas nos resultados, sendo recomendado o uso do modelo de fluxo de íons, em especial para simulações curtas em que os poros não atingem tamanhos muito grandes.

Palavras-chave: eletroporação; FDTD; métodos numéricos; eletromagnetismo; engenharia elétrica; células biológicas

Abstract

A cell subjected to sufficiently intense electric fields of short duration displays the formation of pores, transient aqueous pathways, in its membrane. The phenomenon can be reversible, with the closure of the pores, or irreversible resulting in cell death. Both versions of the phenomenon have various applications in medicine and biology. The main goals of this thesis are to study and compare different approaches for the calculation of the electroporation current through a numeric model of electroporation in single cells subjected to microsecond electric pulses. Three main results are planned for each approach: the number of pores, the pore radii, and the transmembrane potential difference, including their respective spatial distributions and time evolutions. From a review of the literature the main equations that describe the phenomenon were determined, i.e. the Smoluchowski equation that calculates the pore density and the Laplace equation that describes the electric potential. A complete bidimensional numeric simulation model for the cell electroporation was implemented, based in an asymptotic approximation of the Smoluchowski equation for the calculation of the number of pores and their radii and a finite difference approximation for the Laplace equation for the potential calculation. It is assumed that the cell is spheric, with an uniform membrane and the relevant media - external medium, cytoplasm and cell membrane - homogenous. The cell is assumed isolated and subjected to an electric pulse between two parallel plates. From those assumptions and the known characteristics of the phenomenon, approximations for the relevant equations were developed in order to simplify their numerical implementation. Due to the simplicity of the geometry the finite differences in time domain method was chosen as it allows easy modeling of the temporal characteristics of the problem. Finite difference approximations of the equations were developed and solved for the coupled system. This simulation was validated with results qualitatively and quantitatively consistent with the literature. Using this simulation the electroporation current modeling was studied, comparing two models broadly used in literature and analysing the possible impact in applications. Meaningful differences in the results were found, and the ion flux model is recommended, specially for short simulations in which the pores do not grow to large sizes.

Keywords: electroporation; FDTD; numerical methods; electromagnetism; electrical engineering; biological cells

Lista de ilustrações

Figura 1 – Ilustração da estrutura interna de uma célula.	19
Figura 2 – Camada dupla de lipídios típicos em uma solução aquosa de eletrólitos.	22
Figura 3 – Camada dupla de lipídios e surgimento dos poros	22
Figura 4 – Energia de formação dos poros para diversos potenciais	23
Figura 5 – Potencial de múltiplos pulsos	25
Figura 6 – Modelo da célula	35
Figura 7 – Cubeta para Eletroporação	36
Figura 8 – Diferença de potencial na membrana	38
Figura 9 – Continuidade da corrente na membrana	39
Figura 10 – Discretização do domínio	43
Figura 11 – Modelo da célula	49
Figura 12 – Discretização do domínio	50
Figura 13 – V_m ao longo do tempo em várias posições	52
Figura 14 – V_m comparado a aproximação exponencial	53
Figura 15 – Número de poros ao longo do tempo para várias posições na célula	54
Figura 16 – Raio do maior poro em cada posição da célula, ao longo do tempo	55
Figura 17 – Distribuição espacial do número e raio dos poros	55
Figura 18 – Estágios da eletroporação, potencial	56
Figura 19 – Estágios da eletroporação, raio dos poros	57
Figura 20 – Figura 2 de [1]	58
Figura 21 – Figura 1 de [1]	59
Figura 22 – Geometria de [2]	61
Figura 23 – V_{mem} para o modelo de [2]	61
Figura 24 – Figura 6A de [2]	62
Figura 25 – $N(t)$ para o modelo de [2]	62
Figura 26 – Figura 6B de [2]	63
Figura 27 – Comparação de V_m com diferentes métodos para a divisão $\theta = 0^\circ$, para o caso de teste 1	65
Figura 28 – Comparação de V_m com diferentes métodos para a divisão $\theta = 0^\circ$, para o caso de teste 2	66
Figura 29 – Comparação de I_p com diferentes métodos para a divisão $\theta = 0^\circ$, para o caso de teste 1	67
Figura 30 – Comparação de I_p com diferentes métodos para a divisão $\theta = 0^\circ$, para o caso de teste 2	67
Figura 31 – Potencial através da membrana ao longo de sua extensão após 9 μs , para o caso de teste 1	68

Figura 32 – Potencial através da membrana ao longo de sua extensão após 40ns, para o caso de teste 2	68
Figura 33 – Número de poros de todos os tamanhos para a divisão $\theta = 0^\circ$, para o caso de teste 1	69
Figura 34 – Número de poros para a divisão $\theta = 0^\circ$, para o caso de teste 2	70
Figura 35 – Número de poros ao longo da membrana após 9 μ s para o caso de teste 1	70
Figura 36 – Número de poros ao longo da membrana após 150ns para o caso de teste 2	71
Figura 37 – Raio do maior poro para a divisão $\theta = 0^\circ$	72
Figura 38 – Raio do maior poro para as divisões $\theta = 0^\circ$ e $\theta = 45^\circ$	72
Figura 39 – Raio do maior poro ao longo da membrana após 9 μ s	73
Figura 40 – Crescimento dos poros para o modelo de [2]	74
Figura 41 – Raios dos poros para o modelo de [2]	75
Figura 42 – Número de poros para a divisão $\theta = 0^\circ$, para o caso de teste 2 com poros de raio fixo	75
Figura 43 – Número de poros ao longo da membrana após 150ns para o caso de teste 2 com poros de raio fixo	76
Figura 44 – Numeração dos pontos do domínio	88
Figura 45 – Potencial aproximado utilizado para o cálculo da eletroporação	94
Figura 46 – Representação da membrana discretizada	94
Figura 47 – Número de poros em toda a membrana ao longo do tempo	95
Figura 48 – Raio máximo dos poros ao longo do tempo	95
Figura 49 – Número de poros ao longo do tempo para polos opostos	96
Figura 50 – Continuidade da corrente na membrana	98

Lista de tabelas

Tabela 1 – Sumário da literatura	32
Tabela 2 – Parâmetros das equações gerais da eletroporação	34
Tabela 3 – Parâmetros do modelo	37
Tabela 4 – Parâmetros das equações aproximadas da eletroporação	42
Tabela 5 – Discretização do problema	50
Tabela 6 – Parâmetros do modelo	58
Tabela 7 – Comparação dos resultados com a referência [1]	60
Tabela 8 – Sumário dos casos de teste	64
Tabela 9 – Parâmetros do modelo	93

Lista de abreviaturas e siglas

FDTD	Diferenças Finitas no Domínio do Tempo (Finite Difference Time Domain)
MD	Dinâmica Molecular
FEM	Método dos Elementos Finitos (Finite Elements Method)
MOSFET	Transistor de efeito de campo de metal-óxido-semicondutor (Metal-oxide-semiconductor field-effect transistor)
IGBT	Transistor bipolar de porta isolada (Insulated-gate bipolar transistor)

Lista de símbolos

$n(r_p, t)$	Densidade de poros em função do raio dos poros e do tempo
t	Tempo
r_p	Raio dos poros
N	Número de poros
$S(r_p)$	Termo fonte para criação de poros hidrofílicos em função de seu raio
$\varphi(r_p, t)$	Energia de formação dos poros em função do raio dos poros
D	Constante de difusão dos poros
k	Constante de Boltzmann
T	Temperatura absoluta
v_c	Taxa de flutuação volumétrica
$U(r_p)$	Energia associada aos poros na ausência de um potencial aplicado
a_p	Constante associada à membrana
V_m	Diferença de potencial através da membrana
σ_o	Condutividade elétrica do meio externo
σ_m	Condutividade elétrica da membrana
σ_c	Condutividade elétrica do citoplasma
σ_{oc}	Condutividade elétrica da membrana da organela
σ_{om}	Condutividade elétrica do citoplasma da organela
ε_o	Permissividade elétrica do meio externo
ε_m	Permissividade elétrica da membrana
ε_c	Permissividade elétrica do citoplasma
R_1	Raio externo da célula
R_2	Raio interno da célula

V_{mem}	Potencial no interior da membrana celular
V_o	Potencial no meio externo
V_c	Potencial no citoplasma
r	Coordenada cartesiana radial
θ	Coordenada cartesiana axial
ϕ	Coordenada cartesiana azimutal
\vec{E}	Intensidade do campo elétrico aplicado
τ	Constante de tempo do potencial na membrana segundo a equação de Schwan de primeira ordem
r_k	Raio do poro de índice k
r_*	Raio mínimo de poros hidrofílicos
r_h, r_t	Constantes para velocidade de advecção
α	Coefficiente para taxa de criação de poros
β	Energia da repulsão estérica
γ	Energia de borda
F_{max}	Força elétrica máxima para tensão na membrana
S_{eff}	Tensão mecânica efetiva da membrana
S_0	Tensão mecânica da membrana sem poros
S'	Energia por área da interface hidrocarboneto-água
N_0	Densidade de poros no equilíbrio
q	Constante para criação de poros em função do raio de energia mínima e do raio mínimo do poro para condução
V_{ep}	Tensão característica da eletroporação
A_p	Área total de todos os poros
A	Área da superfície da célula
Δt	Divisão de tempo para cálculo numérico
n	Índice da divisão de tempo

Δr	Divisão do raio para cálculo numérico
i	Índice da divisão de raio
$\Delta \theta$	Divisão do ângulo para cálculo numérico
j	Índice da divisão de ângulo

Sumário

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Introdução	15
1.2	Relevância	16
1.3	Contribuições	17
1.4	Organização	17
2	REVISÃO DA LITERATURA	19
2.1	Descobertas iniciais	20
2.2	Física do fenômeno	21
2.3	Simulação numérica	25
2.4	Aplicações e relevância	29
2.5	Conclusão	30
3	MODELOS E MÉTODOS	33
3.1	Equações gerais da eletroporação	33
3.2	Modelo da Célula	35
3.3	Cálculo do potencial na membrana	37
3.4	Equações simplificadas	40
3.4.1	Aproximações para o potencial na membrana	40
3.4.2	Aproximações para a densidade de poros	41
3.5	Aproximação por FDTD	42
3.5.1	Discretização do domínio	42
3.5.2	Discretização da Equação de Smoluchowski aproximada	43
3.5.3	Discretização da Equação de Laplace	44
3.5.4	Tratamento da condição de interface na membrana	45
3.6	Cálculo da corrente de eletroporação	46
3.6.1	Cálculo da corrente através do modelo de parâmetros concentrados	46
3.6.2	Cálculo da corrente através do modelo de fluxo de íons	47
3.7	Conclusão	48
4	RESULTADOS	49
4.1	Definição do problema e das grandezas de interesse	49
4.2	Simulação da eletroporação em um célula isolada	51
4.2.1	Potencial na membrana	51
4.2.2	Número de poros e raios dos poros	53
4.2.3	Estágios da eletroporação	55

4.2.4	Validação dos resultados	57
4.2.4.1	Comparação com o trabalho de W. Krassowska e P. D. Filev	58
4.2.4.2	Comparação com o trabalho de P. Lamberti et al	60
4.3	Comparação dos métodos para o cálculo das correntes	64
4.3.1	Potencial através da membrana	64
4.3.2	Número de poros	69
4.3.3	Raio dos poros no caso 1	71
4.3.4	Raio dos poros no caso 2	73
4.3.5	Análise da diferença entre as abordagens	76
4.3.6	Impacto nas aplicações	77
4.3.7	Conclusões da análise	77
5	CONCLUSÕES	79
5.1	Avaliação dos resultados	79
5.2	Atividades futuras	80
	REFERÊNCIAS	81
	APÊNDICE A – CÁLCULO DO POTENCIAL	86
A.1	Desenvolvimento das equações de recorrência para a equação de Laplace	86
A.2	Resolução da equação de Laplace através de diferenças finitas	87
A.2.1	Validação para condição de Dirichlet simples	89
	APÊNDICE B – SIMULAÇÃO DO PROCESSO DE ELETROPO- RAÇÃO	91
B.1	Desenvolvimento das equações de recorrência para a aproximação assintótica da Equação de Smoluchowski	91
B.2	Validação com potencial aproximado	92
	APÊNDICE C – FORMULAÇÃO DA CONDIÇÃO DE INTERFACE NA MEMBRANA	98
C.1	Equações de continuidade de corrente	98
C.2	Interface membrana-citoplasma	100
C.3	Interface membrana-meio externo	101
	ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO	104

1 Introdução

1.1 Introdução

A eletroporação é um fenômeno que ocorre nas membranas de células biológicas quando submetidas a pulsos elétricos intensos com durações muito curtas. O fenômeno consiste na formação de poros, passagens aquosas transientes, que permitem o transporte de substâncias entre o interior da célula e o meio externo. Este processo pode ser reversível, com o fechamento dos poros e sobrevivência da célula, ou irreversível, com os poros crescendo até um tamanho crítico que resulta na morte da célula.

Embora exista ampla evidência experimental da existência dos poros, as escalas de tempo e tamanho reduzidos tornam difícil a observação direta do fenômeno. Além disto, embora exista um consenso na literatura sobre a natureza dos poros e sobre os aspectos qualitativos mais gerais de sua formação, o conhecimento sobre o processo ainda é bastante limitado e existem vários detalhes que não foram plenamente compreendidos. A elaboração e aperfeiçoamento de modelos teóricos é, assim, essencial para o avanço nesta área.

É geralmente aceito que os poros surgem como resultado de flutuações de energia térmica espontâneas na membrana, mas sua duração, tamanho e número são muito pequenos em condições normais. Contudo, quando submetida a um campo elétrico suficientemente intenso, esse processo se intensifica, criando um grande número de poros maiores e mais estáveis. Caso o campo elétrico seja interrompido antes que o crescimento dos poros cause a ruptura da membrana e morte da célula, os poros formados se fecham - embora as escalas de tempo para fechamento dos poros sejam bem maiores que as escalas de tempo de sua formação.

A grandeza utilizada para descrever a eletroporação de forma mais geral é a densidade de poros, que representa o número de poros com cada raio, em cada seção da membrana e em cada instante de tempo. A partir desta grandeza, é possível calcular outras grandezas de interesse como a área total dos poros, o transporte de substâncias através dos poros ou as propriedades elétricas e mecânicas da membrana.

Dada a grande complexidade dos modelos matemáticos teóricos que descrevem a formação dos poros, torna-se necessário o desenvolvimento de modelos numéricos para o cálculo da densidade de poros na membrana. Estas simulações apresentam diversas dificuldades, como a grande diferença de escala entre o tamanho da célula e a espessura da membrana que torna difícil a construção de uma malha precisa sem custo computacional proibitivo. As escalas de tempo também apresentam disparidades similares, visto que o

fechamento dos poros é um processo muito mais lento que sua formação.

O processo de eletroporação é dependente da diferença de potencial através da membrana, que altera as condições necessárias para o surgimento e crescimento de poros. Isto torna o cálculo do potencial um passo essencial para o estudo da eletroporação. Alguns modelos mais simples permitem o cálculo analítico do potencial, para casos limitados. Contudo, para analisar a distribuição espacial dos poros e evolução do processo, torna-se necessário o uso de modelos mais complexos para o cálculo do potencial. Um fator adicional de complexidade é o acoplamento das equações elétricas e de surgimento dos poros, uma vez que a eletroporação afeta as propriedades elétricas da membrana - os poros permitem a passagem de íons, tornando a membrana mais condutiva.

1.2 Relevância

O processo de eletroporação possui diversas aplicações, várias delas já utilizadas comercialmente. A eletroporação reversível pode ser aplicada para absorção de medicamentos pelas células ou para inserção e extração de material genético, enquanto a eletroporação irreversível pode ser utilizada para destruir células sem aumento de temperatura. Uma boa compreensão do fenômeno é importante para o desenvolvimento de protocolos mais eficientes para estas aplicações, como a escolha de duração e intensidade dos pulsos ou o posicionamento dos eletrodos.

Os modelos desenvolvidos para a eletroporação são de grande complexidade, sendo difícil obter soluções analíticas mesmo para os casos mais simples. Através de simulações numéricas é possível resolver, com grande precisão e riqueza de detalhes, problemas complexos envolvendo a distribuição espacial dos poros e sua evolução temporal. Estas simulações podem ser utilizadas para validar os modelos teóricos, comparando os resultados com medições experimentais, ou para realizar previsões de grandezas que ainda não podem ser observadas diretamente.

O modelo de células isoladas é frequentemente utilizado para representar suspensões esparsas de células, como as utilizadas em diversos experimentos de eletroporação: uma cultura de células em meio líquido é colocada em cubetas para ser submetida aos pulsos, para posterior observação. Nestes experimentos, a distância entre as células geralmente é grande o suficiente para que elas sejam modeladas isoladamente. Esta simplificação não é válida para células em arranjos densos, como tecidos e órgãos, em que as células próximas afetam a distribuição do campo elétrico. Contudo, a simplicidade deste modelo permite que ele seja usado para compreender as características mais fundamentais do fenômeno, que podem ser generalizadas para geometrias mais complexas e específicas.

1.3 Contribuições

Embora o fenômeno de eletroporação tenha sido amplamente estudado, sua compreensão ainda é limitada. O desenvolvimento de modelos numéricos precisos e abrangentes é importante para complementar experimentos práticos e modelos analíticos puros, permitindo obter previsões e realizar análises mais detalhadas do fenômeno.

Embora diversos grupos tenham realizado simulações numéricas do processo de eletroporação, em muitos casos o modelo empregado simplifica aspectos significativos do fenômeno, como a distribuição espacial dos poros na membrana, as mudanças nas propriedades elétricas da célula devido ao surgimento dos poros ou a evolução transitória do potencial na membrana. Algumas simulações assumem geometrias ou formatos de pulsos específicos, obtendo resultados pouco gerais e difíceis de extrapolar para outros casos. Além disto, muitos dos programas desenvolvidos apresentam custos computacionais elevados, limitando ainda mais a aplicabilidade de tais modelos.

Este trabalho implementou um modelo consolidado na literatura e o utilizou para fazer uma análise aprofundada e do efeito da corrente de eletroporação no processo, comparando duas abordagens teóricas para o cálculo da corrente: a primeira baseada em parâmetros concentrados, a partir da geometria do poro, e a segunda baseada em um modelo do fluxo de íons através da membrana, usando uma barreira de energia para modelar as interações com as paredes do poro. A partir desta análise, concluiu-se que essas abordagens têm resultados muito diferentes, com claro impacto nas aplicações práticas, sendo um fator de extrema importância a ser considerado nos modelos desenvolvidos, e fez-se uma recomendação pelo não uso do modelo aproximado de parâmetros concentrados. O artigo científico [3] publicado a partir desta investigação encontra-se no [Apêndice A](#).

1.4 Organização

Este documento está dividido em cinco partes. No [Capítulo 1](#) apresenta-se de forma geral o fenômeno estudado, suas características principais e a relevância do tema como um todo. São estabelecidos os objetivos deste trabalho, estabelecendo seu escopo e as contribuições que se esperam de sua realização.

No [Capítulo 2](#) é revista a literatura disponível sobre o tema. A partir dos principais marcos históricos no estudo do fenômeno, contextualiza-se este trabalho dentro da área de pesquisa e de sua trajetória histórica. Sintetizando os principais pontos da bibliografia reunida, descrevem-se as bases teóricas que servem como ponto de partida para este trabalho e o atual estado da arte.

No [Capítulo 3](#) detalham-se o modelo adotado e as metodologias empregadas e planejadas para o desenvolvimento do trabalho. A partir das equações gerais que des-

crevem o fenômeno da eletroporação e das características conhecidas do modelo físico de uma célula são demonstradas as simplificações e aproximações necessárias para a implementação de um modelo numérico, bem como as estratégias adotadas e as características gerais da solução.

No [Capítulo 4](#) são apresentados os resultados obtidos neste trabalho, sua validação a partir dos princípios físicos conhecidos e resultados encontrados na literatura, e uma análise de seu significado e implicações.

No [Capítulo 5](#) realiza-se uma reflexão sobre o trabalho, os resultados obtidos e possíveis trabalhos futuros.

2 Revisão da Literatura

As células, que compõem todas as formas de vida, são envolvidas por uma membrana lipoprotéica semipermeável que contém o citoplasma e todas as organelas intracelulares, protegendo a célula e regulando a passagem de substâncias. A [Figura 1](#) ilustra uma célula animal típica. A estrutura básica da membrana é uma camada dupla de lipídios, permeada com proteínas responsáveis por diversos mecanismos de transporte de substâncias através da membrana. Do ponto de vista elétrico esta membrana é isolante, embora as proteínas possam transportar íons de forma controlada, e tanto o citoplasma quanto o meio celular externo típico são soluções aquosas eletrolíticas [4].

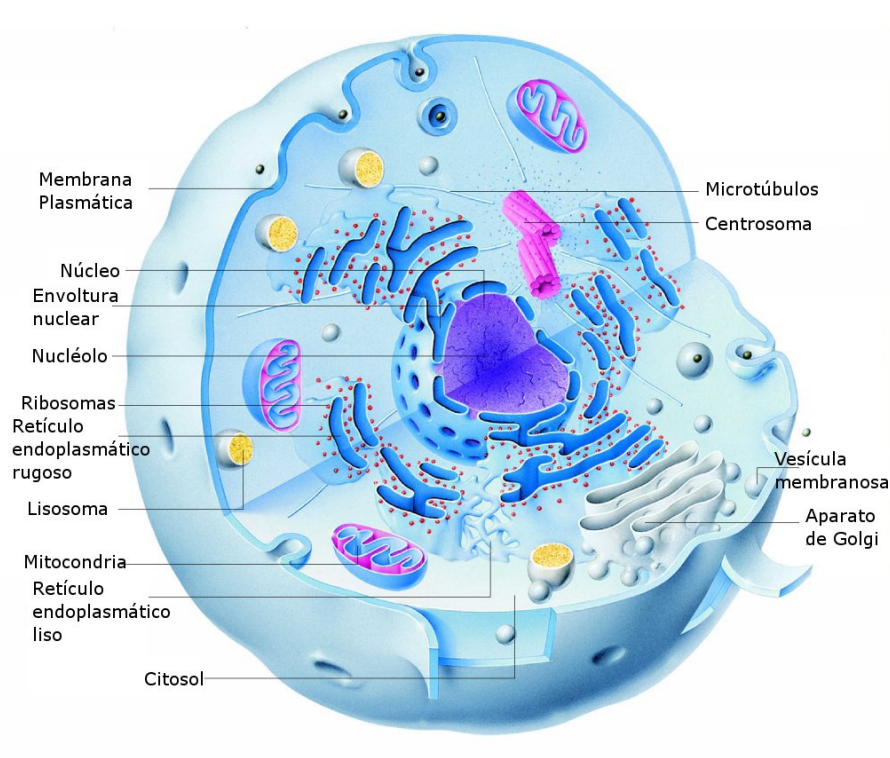


Figura 1 – Ilustração da estrutura interna de uma célula. Fonte: [5]

Quando exposta a campos elétricos intensos, a membrana celular apresenta um aumento súbito de sua condutividade elétrica e se torna permeável a substâncias que normalmente não penetram na célula, o que é atribuído à formação de canais aquosos - usualmente denominados poros - que permitem a livre passagem de íons e moléculas polares. O processo pode ser reversível, com o fechamento dos poros após um intervalo de tempo, ou irreversível, com a ruptura da membrana e consequente morte da célula. Este fenômeno é conhecido como eletroporação.

Neste capítulo é explorada a bibliografia existente sobre o campo de estudo, situando o trabalho atual dentro da área e apresentando as bases sobre as quais ele

está sendo desenvolvido. Para maior clareza, o capítulo é dividido em quatro seções. Na [seção 2.1](#) é apresentada a trajetória histórica do estudo da eletroporação, com os principais marcos na descoberta do fenômeno e as evidências experimentais que possibilitaram sua melhor compreensão. Na [seção 2.2](#) descreve-se de forma detalhada a atual compreensão sobre a física do fenômeno, incluindo os mecanismos que levam ao surgimento dos poros na membrana, as características conhecidas do processo e a influência do campo elétrico aplicado. Na [seção 2.3](#) discute-se a aplicação de técnicas de simulação numérica ao problema de eletroporação. Na [seção 2.4](#) discutem-se as principais aplicações práticas da eletroporação, bem como os equipamentos desenvolvidos para tal.

2.1 Descobertas iniciais

A eletroporação foi observada pela primeira vez para o nódulo de Ranvier, uma seção específica da membrana de células neurais excitáveis [6]. Os experimentos demonstraram um grande aumento da condutividade que não parecia estar ligado a nenhum comportamento celular conhecido até então. Posteriormente o fenômeno foi confirmado para outros tipos de células [7] e para pequenas vesículas formadas por membranas [8], o que forneceu a primeira confirmação de que o fenômeno está ligado diretamente à membrana e não a outras características celulares. O fenômeno se tornou conhecido na literatura como eletroporação ou eletropermeabilização e desde então foi extensivamente observado, embora a compreensão do fenômeno ainda seja incompleta.

Os poros, sendo de escala muito reduzida - alguns nanômetros no máximo - e sensíveis a perturbações, nunca foram observados diretamente. A microscopia ótica é incapaz de fornecer amplificação suficiente, enquanto a microscopia eletrônica exige preparações das amostras tais que interferem significativamente com as observações [9]. Contudo, existe ampla evidência experimental da existência dos poros: ao aplicar um campo elétrico a uma suspensão de células contendo um indicador como o iodeto de cálcio ou o azul de tripano, detecta-se posteriormente a presença deste no interior do citoplasma - o que não ocorreria em circunstâncias normais [10]. Podem ser utilizadas diversas substâncias, incluindo tintas fluorescentes que se ligam diretamente ao material genético, nanopartículas magnéticas, ou mesmo substâncias citotóxicas cujo efeito é a morte das células. [11]. O uso de diferentes indicadores permite estimar características do processo de eletroporação, como o diâmetro dos poros e as características do transporte para o interior da célula - que pode ocorrer simplesmente através de difusão ou por eletroforese, por exemplo. Contudo, estes métodos são incapazes de observar o processo de eletroporação enquanto este ocorre.

Com tecnologias modernas, além de monitorar o surgimento dos poros é possível acompanhar a variação do potencial na membrana e também a mudança de suas propriedades elétricas. Uma das maneiras pelas quais isto pode ser feito é o uso de mi-

croeletrodos para medir diretamente o potencial na membrana, usando uma micropipeta para inserir um eletrodo no interior da célula e outro no lado oposto da membrana. Contudo, este método é extremamente invasivo, afetando a estrutura da célula e interferindo diretamente na distribuição do campo elétrico. Outra forma, menos direta mas mais confiável, é o uso de tintas potenciométricas - substâncias fluorescentes cujo espectro luminoso varia de acordo com o potencial, indicando assim seu valor.

Métodos mais avançados permitem a captura de imagens durante o experimento, ao invés de apenas posteriormente, observando assim até mesmo a distribuição espacial e variação temporal dos indicadores e derivando informações mais detalhadas sobre os poros [10, 12, 13]. Técnicas óticas avançadas permitem até mesmo detectar alterações na estrutura da membrana diretamente, utilizando partículas dipolares que aderem aos lipídios da membrana, formando um sinal coerente para a membrana intacta mas gerando uma perturbação na presença de poros na escala de nanômetros, o que pode ser detectado e é menos dependente do transporte de substâncias [14]. Outros estudos usam membranas isoladas para observar mais facilmente o fenômeno [15]. Contudo, mesmo estes métodos ainda possuem uma resolução temporal baixa (na ordem de milissegundos ou segundos), que não é suficiente para modelar os estágios mais rápidos da eletroporação (formação e crescimento dos poros).

2.2 Física do fenômeno

Nas investigações iniciais sobre os efeitos de campos intensos sobre células, vários modelos foram elaborados para explicar as observações realizadas, em geral assumindo a compressão elástica da membrana e deformação da célula. Contudo, o modelo de poros aquosos transientes foi o que apresentou melhor capacidade de descrever os fenômenos observados, em especial a natureza estocástica da formação dos poros [16].

Os lipídios que formam a maior parte da membrana apresentam uma "cabeça" polar e "caudas" apolares, e na membrana são organizados em duas camadas cada uma com espessura de apenas um lipídio - ambas com as caudas em contato entre si e as cabeças voltadas para fora, conforme a [Figura 2](#).

Embora esse arranjo seja impermeável a moléculas polares como água e a íons, através de flutuações de energia é possível que a estrutura da membrana se altere temporariamente, formando espontaneamente poros altamente instáveis - com duração menor do que um nanossegundo - e diâmetros menores que um nanômetro. Embora este fenômeno ocorra espontaneamente em membranas celulares, é infrequente e não ocorre um transporte considerável de substâncias ou uma variação significativa das propriedades da membrana como um todo [12, 17, 16]. A [Figura 4](#) mostra a curva de energia necessária para a formação de poros, para diversos valores de tensão; observe que para potenciais a

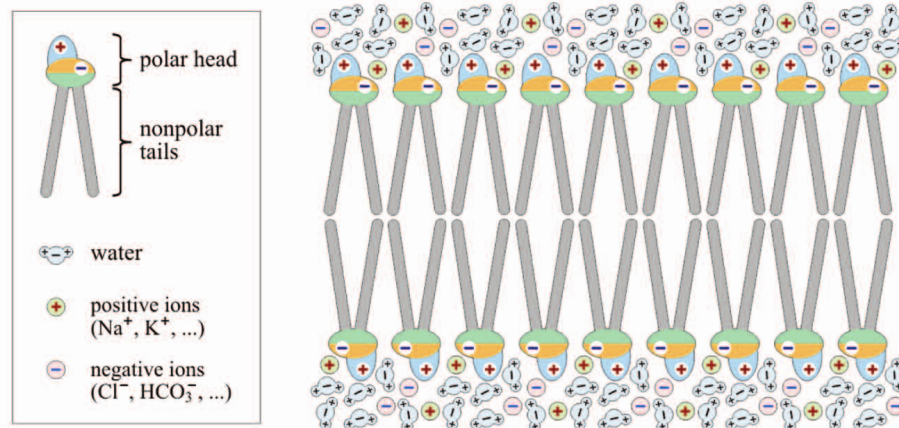


Figura 2 – Camada dupla de lipídios típicos em uma solução aquosa de eletrólitos. Fonte: [12]

partir de um certo valor, a energia necessária para o crescimento de poros diminui consideravelmente, o que possibilita que as perturbações na membrana se tornem poros de tamanho não desprezível.

Em poros com diâmetros menores que um nanômetro, o contato direto com as caudas apolares dos lipídios torna a condução de água e íons impossível, de forma que estes poros são categorizados como hidrofóbicos. Contudo, caso esses poros cresçam e atinjam um tamanho suficiente - em torno de meio nanômetro - antes de se fechar, a membrana se reorganiza de forma que as cabeças polares dos lipídios se voltam para o interior do poro, conforme a Figura 3. Estes poros são denominados hidrofílicos e permitem o transporte de substâncias, mas sua formação em condições normais está relacionada a uma energia relativamente alta [1].

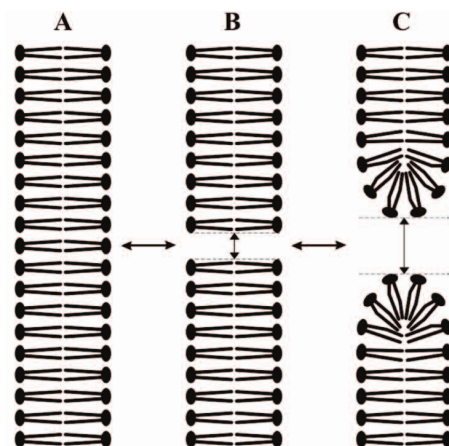


Figura 3 – Camada dupla de lipídios sem poros (A), com um poro hidrofóbico (B), com um poro hidrofílico (C). Fonte: [12]

Quando a membrana é exposta a um campo elétrico, a energia necessária para

a formação de poros se reduz significativamente, conforme pode ser visto na [Figura 4](#), propiciando o aparecimento de poros mais numerosos, de maior diâmetro e mais estáveis. Estes poros podem durar desde alguns milissegundos até vários minutos, mesmo após o fim da exposição ao campo elétrico, antes de se fechar novamente; assim, os poros são considerados metaestáveis. Caso o campo elétrico seja mantido por tempo o suficiente, contudo, é possível que os poros aumentem até atingir um tamanho crítico que resulta na ruptura da membrana e morte da célula, em um processo de eletroporação irreversível.

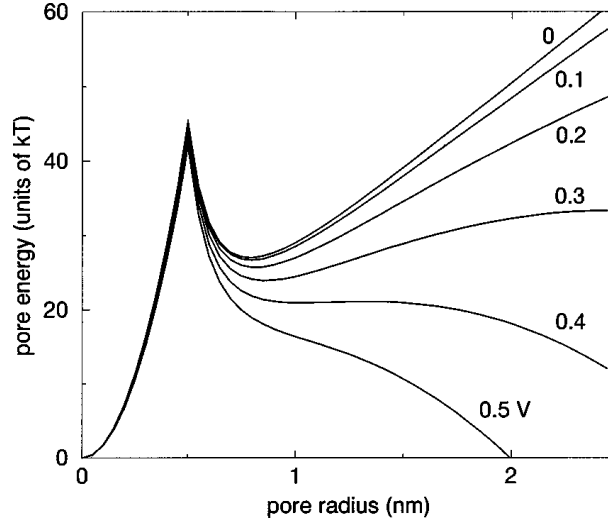


Figura 4 – Energia de formação dos poros para diversos potenciais. Fonte: [18]

O fenômeno pode ser descrito através da densidade de poros, $n(r_p, t)$, que descreve a densidade de poros com raio r_p em um instante de tempo t e é calculada de acordo com a equação de Smoluchowski [17]:

$$\frac{\partial n(r_p, t)}{\partial t} + D \frac{\partial}{\partial r_p} \left(-\frac{\partial \varphi(r_p, t)}{\partial r_p} \frac{1}{kT} - \frac{\partial n(r_p, t)}{\partial r_p} \right) = \frac{v_c}{kT} \frac{\partial \varphi(r_p, t)}{\partial r_p} e^{-\varphi(r_p)/kT} \partial r_p \quad (2.1)$$

onde D é a constante de difusão dos poros, k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, v_c é a taxa de flutuação volumétrica e $\varphi(r_p, t)$ é a função que descreve a energia dos poros:

$$\varphi(r_p, t) = U(r_p) - \pi a_p r_p^2 V_m^2(t) \quad (2.2)$$

onde $U(r_p)$ é o valor da energia na ausência de um potencial aplicado, a_p é uma propriedade da membrana e $V_m(t)$ é o potencial através da membrana. $U(r_p)$ é uma propriedade da membrana, associada aos raios de cada poro; a variação temporal da energia $\varphi(r_p, t)$ se deve às mudanças no potencial.

Para a ocorrência do processo de eletroporação, é necessário que o potencial através da membrana, V_m , atinja um valor de limiar mínimo com ordem de grandeza entre 0,1V

e 1V. Contudo, existem discordâncias na literatura sobre o valor exato deste potencial de limiar, que possivelmente varia para diferentes tipos de célula [10].

Como a membrana se comporta primariamente como um dielétrico em comparação ao meio intracelular e aos meios fisiológicos típicos, ao ser submetida a um campo elétrico ela se polariza gradualmente até atingir um estado estacionário. Assim, para pulsos mais longos que o tempo de carregamento da célula, é possível utilizar campos elétricos menos intensos, uma vez que a polarização da membrana atingirá seu potencial máximo; para pulsos menores, é necessária a aplicação de campos mais intensos para que a tensão de limiar seja atingida com apenas uma fração do valor de estado estacionário [12, 19].

Embora o surgimento e crescimento de poros continue durante todo o período de aplicação do campo elétrico, variações da condutividade elétrica e da tensão superficial da membrana limitam em certo grau o crescimento dos poros [17, 1]. Após a interrupção do campo elétrico o tamanho dos poros diminui rapidamente (em uma escala de microssegundos), mas se estabiliza em um mínimo local da função de energia. Assim, o fechamento completo dos poros é um processo particularmente lento, e grande número de pequenos poros persiste por períodos de tempo que podem ir de milissegundos a vários minutos [12].

Embora os primeiros estudos tenham se focado no uso de pulsos na faixa de microssegundos, estudos posteriores [20, 21, 22] estudaram o uso de pulsos ultra-curtos, na faixa de nanossegundos, mas mais intensos e demonstraram outros efeitos dependentes da duração e intensidade do pulso. As organelas no interior da célula, como mitocôndrias ou o núcleo, normalmente não são afetados pelos pulsos, pois são submetidos apenas a uma fração do potencial total. Contudo, a menor área superficial das membranas de organelas implica que o tempo de carregamento destas é muito menor. Assim, para estes pulsos ultra-curtos - em que a membrana celular externa não atinge um valor apreciável - o potencial na membrana das organelas pode atingir um valor mais alto que o da membrana externa, resultando na eletroporação apenas das organelas e não da membrana celular externa, possibilitando aplicações inteiramente novas para o fenômeno.

Tipicamente, os pulsos utilizados para eletroporação são retangulares. Contudo, quando os circuitos geradores de pulsos possuem tempos de subida e descida não desprezíveis, utilizam-se pulsos trapezoidais. Também é comum que os pulsos sejam unipolares, isto é, apenas pulsos positivos, embora algumas aplicações biológicas utilizem pulsos bipolares com o fim de reduzir a corrosão dos eletrodos. Alguns estudos também abordam o uso de outras formas de pulsos, como senóides moduladas ou pulsos exponenciais, de mais fácil geração mas altamente dependentes das características físicas da amostra [23, 24, 25].

Outro aspecto de interesse é o efeito da aplicação consecutiva de múltiplos pulsos. De forma simplificada, para casos em que o potencial não atinge o estado estacionário com um único pulso, caso o intervalo entre os pulsos seja relativamente pequeno é possível

que os pulsos subsequentes atinjam valores mais elevados que o pulso inicial, criando um potencial de forma serrilhada conforme visto na Figura 5 [24].

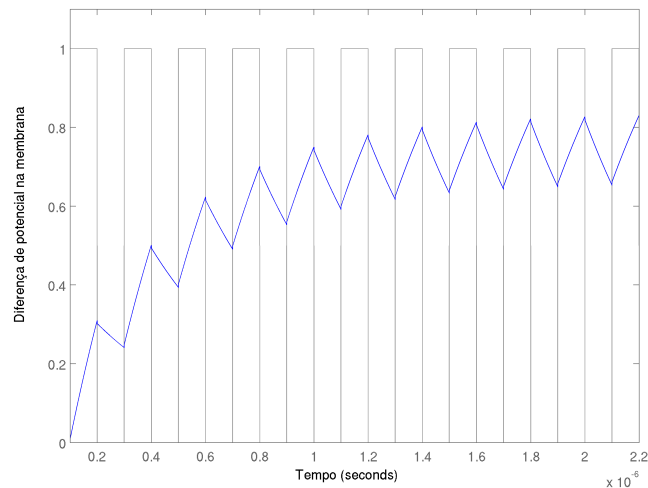


Figura 5 – Potencial através da membrana com a aplicação de múltiplos pulsos quadrados de 200ns.

Contudo, considerando a dinâmica da eletroporação - criação, aumento e fechamento dos poros - é possível que ocorram outros fenômenos de interesse, como uma dessensibilização parcial da membrana a poros subsequentes e alterações na viabilidade das células submetidas ao processo [2]. Em alguns casos, o uso de múltiplos pulsos ultra-rápidos pode ser utilizado para se realizar eletroporação irreversível com menor aquecimento [17] ou seletivamente [25].

Embora muitos dos experimentos e simulações iniciais tenham utilizado membranas planas, para células reais V_m também apresenta grande variação espacial ao longo da membrana. O potencial é máximo nos pontos em que a membrana é transversal ao campo aplicado, resultando no surgimento de poros maiores e mais numerosos nestas regiões. Além disto, a membrana apresenta um pequeno potencial de repouso V_{rest} , mantido através de mecanismos celulares, que se sobrepõe ao pulso aplicado mas é sempre normal à membrana (de forma que seu impacto sobre o potencial total varia espacialmente na célula) [1, 10].

2.3 Simulação numérica

Diversos modelos numéricos foram desenvolvidos para estudar a eletroporação. Devido à grande complexidade do fenômeno, estes modelos em geral lidaram apenas com alguns dos aspectos da eletroporação ou fizeram grandes simplificações, fornecendo resultados úteis mas que descrevem apenas parcialmente o fenômeno. Inicialmente os estudos

se concentravam no cálculo do potencial em trechos planos de membrana, seguindo os métodos experimentais da época para observação de eletroporação; estes resultados eram então generalizados para as membranas de células completas. Krassowska e Neu [26] desenvolveram uma das primeiras formulações gerais para o potencial em uma célula, baseada nas equações de Maxwell. Outros modelos utilizavam aproximações baseadas em parâmetros concentrados, modelando os diferentes meios como associações de capacitores e resistores, como visto em [16], [27], [22] e [25]. Estas aproximações em grande parte ignoravam as características espaciais do fenômeno, como a diferença entre o potencial em diferentes partes da membrana e consequente diferença na distribuição dos poros.

Os primeiros modelos desenvolvidos para eletroporação também descreviam de forma bastante simplificada o fenômeno em si, se concentrando na descrição dos efeitos observáveis do fenômeno - como mudanças na condução através da membrana, o valor mínimo de tensão necessário para induzir o fenômeno e as escalas de tempo envolvidas. Apenas com o desenvolvimento de melhores modelos teóricos para o fenômeno, como a teoria descrita na seção 2.2 para a formação de poros aquosos transientes, se tornou possível determinar matematicamente a densidade de poros, grandeza que descreve a quantidade de poros e seus raios. A partir desta teoria, Neu e Krassowska [18] desenvolveram uma aproximação assintótica que simplificava imensamente o cálculo numérico da densidade de poros. Esta aproximação assintótica, posteriormente aperfeiçoada em [28], foi aplicada em grande parte dos modelos numéricos para a eletroporação, como [27].

A princípio, os estudos se concentravam exclusivamente no cálculo do potencial na membrana ou da densidade de poros. O potencial era calculado ignorando as alterações de condutividade na membrana ou utilizando valores experimentais para estas alterações, ignorando a natureza acoplada do problema. Da mesma forma, o cálculo do número de poros utilizava aproximações para o potencial - como os modelos de parâmetros concentrados, aproximações exponenciais ou cálculos analíticos que ignoravam o efeito sobre o potencial do surgimento dos poros. Joshi et al. [17] criaram uma das primeiras simulações que calculava numericamente tanto o potencial quanto a densidade de poros, de forma acoplada, embora tenha em grande parte ignorado a distribuição espacial das grandezas. Krassowska e Filev [1] desenvolveram um modelo mais completo, calculando estas grandezas em todo o domínio através do método das diferenças finitas no domínio do tempo (FDTD) e obtendo assim resultados melhores para a distribuição do potencial e da densidade de poros ao longo da membrana, para cada instante de tempo. Ying e Henriquez [29] também desenvolveram um modelo para o cálculo do potencial, utilizando o método dos elementos finitos (FEM) com condições de contorno variantes no tempo. Ele utilizou um modelo para uma membrana excitável em que a corrente através da membrana varia de acordo com o potencial; esta variação foi modelada unicamente como consequência de canais de transporte ativo de íons da membrana e não como consequência do surgimento de poros, mas vários aspectos do problema são análogos ao estudo da eletroporação.

Com o uso de pulsos cada vez mais rápidos - e mais intensos - para a eletroporação, e a descoberta de que tais pulsos podiam afetar a membrana de organelas no interior da célula, tornou-se necessário o desenvolvimento de modelos para este aspecto do fenômeno também. Kotnik e Miklavcic [20] desenvolveram um modelo para o potencial em ambas as membranas, sem contudo calcular a densidade de poros ou considerar os efeitos da eletroporação sobre o potencial. Lamberti et al. [30, 2] desenvolveram um modelo numérico que resolve tanto o potencial quanto a densidade de poros, devidamente acoplados, através de um *software* comercial que utiliza o FEM. Em [31], outro modelo usando um *software* comercial é utilizado para analisar o efeito de trens de pulso em alta frequência (interessantes para eletroporação irreversível, visto que não ativam nervos ou músculos) na área total eletroporada e na distribuição espacial dos poros. Com o uso de pulsos rápidos, o impacto da frequência e duração do pulso se tornam fatores importantes na modelagem do fenômeno, como [25] em que é analisado o impacto da frequência na eletroporação de diferentes células.

Todos os modelos discutidos anteriormente consideraram o caso de uma célula isolada, sem a interferência de outras células próximas. Embora este seja o caso mais simples e modele adequadamente os experimentos típicos de eletroporação, em várias situações reais as células se encontram em tecidos ou soluções densas, em que os efeitos de outras células sobre o potencial não são insignificantes. Em [32], utilizou-se o FEM para calcular o potencial em grupos de células esféricas em arranjos regulares; em [33] utilizaram-se métodos similares mas foram considerados arranjos mais complexos. Em ambos os casos a regularidade da distribuição foi utilizada para permitir a simulação de unidades periódicas simples, ao invés de simular todas as células individualmente. Contudo, estes estudos se concentraram apenas na distribuição espacial do potencial, ignorando totalmente sua variação temporal e assumindo um campo elétrico contínuo no lugar de um pulso. Eles também não modelaram a densidade de poros nem tampouco seus efeitos sobre as propriedades da membrana. A análise da eletroporação foi feita apenas de maneira muito simplificada, contabilizando a área de membrana que atinge um potencial mínimo para ocorrência do fenômeno. Um modelo mais recente e mais completo pode ser visto em [34], em que se combinam várias aproximações para simular a eletroporação de um tecido desde o nível celular (usando uma simplificação do modelo assintótico de [18]) até o nível de tecido, utilizando a aproximação de uma unidade periódica contendo apenas frações de células.

Outra simplificação dos modelos anteriores é a suposição de células esféricas, o que não corresponde à forma real da vasta maioria das células existentes. Alguns estudos lidaram com células de formatos distintos mas ainda regulares, como esferóides achatados e ovais em [19, 35] ou elipsóides e cilindros em [36]. Um dos principais resultados de tais estudos, em especial [19], foi a descoberta de que o impacto da forma da célula sobre o potencial é relativamente pequeno para pequenas variações de formato, indicando que a

simplificação para células esféricas é razoável para muitos casos. Em [35] é estudado o impacto da orientação de células com formatos muito irregulares (células musculares, de forma alongada) na eletroporação, e em especial o impacto da duração dos pulsos para células com diferentes orientações.

Outros modelos, como [37], utilizaram imagens de células obtidas através de microscopia para desenvolver modelos numéricos de células irregulares. Este modelo utiliza seções horizontais da célula para desenvolver modelos tridimensionais, nos quais o potencial é calculado através do FEM. O método permitiu o uso de imagens contendo mais de uma célula, permitindo assim analisar tecidos ou outros casos de células não isoladas. Contudo, este modelo assumiu um campo elétrico contínuo (ignorando considerações temporais) e não calculou a densidade dos poros. Um modelo posterior, visto em [38], incorporou a variação temporal do campo e até mesmo o cálculo simplificado da densidade de poros para que seus efeitos sobre o campo elétrico fossem computados. Técnicas de obtenção de imagem ainda mais modernas, combinadas a avanços computacionais, permitiram o desenvolvimento de modelos ainda mais detalhados [13], simulando formas reais de células (irregulares) para múltiplas células e validando os resultados do modelo teórico com as observações (quais das células sofreram eletroporação). Contudo, estes modelos ainda são limitados em sua precisão, e o alto custo computacional torna proibitiva a simulação de testes mais longos.

Os dois principais métodos numéricos utilizados para o estudo da eletroporação, conforme visto nos casos estudados, são o método das diferenças finitas no domínio do tempo, FDTD, e o método dos elementos finitos, FEM. O método dos elementos finitos é de particular interesse para geometrias complexas, como células de formas irregulares ou agrupamentos de células. Contudo, embora tenha grande flexibilidade quanto às considerações espaciais do problema, a dinâmica temporal relativa à membrana - por exemplo, mudança de propriedades devido à eletroporação - é difícil de ser modelada. O problema pode ser resolvido em cada instante de tempo com condições de contorno não-lineares e variantes no tempo, mas frequentemente as características temporais são bastante simplificadas e em alguns casos são ignoradas completamente. Também deve ser notado que o FEM frequentemente é empregado por *softwares* comerciais, que são empregados quando não há interesse em desenvolver uma simulação completa mas apenas estudar outros aspectos do fenômeno.

Para células isoladas e de geometrias simples, contudo, o método das diferenças finitas é de mais fácil implementação. A resolução explícita em cada instante de tempo das equações diferenciais envolvidas permite tratar mais naturalmente a dinâmica do processo de eletroporação e suas alterações resultantes nas propriedades da membrana. Assim, quando não se deseja analisar as interações entre múltiplas células nem se modelar células com formas altamente irregulares, em geral este é o método de escolha.

Em ambos os métodos, uma das principais dificuldades envolvidas é a espessura extremamente pequena da membrana em comparação ao tamanho da célula - em torno de três ordens de grandeza de diferença. Isto torna necessário o uso de uma malha muito fina para modelar a membrana, aumentando imensamente o custo computacional. Uma das formas de evitar este problema é considerar a membrana como uma interface de espessura nula e aplicar as condições de interface apropriadas de acordo com as propriedades elétricas da membrana, como visto em [1, 29, 12, 37, 39]. Esta também foi a abordagem utilizada nos trabalhos de nosso grupo [3].

É importante ressaltar que, ao menos de forma qualitativa, os diversos modelos desenvolvidos estão geralmente em concordância com os resultados experimentais obtidos na literatura e com as previsões das teorias estabelecidas. Contudo, devido às severas limitações das observações práticas - por exemplo, a impossibilidade de se observar diretamente os poros - e ao conhecimento limitado sobre vários dos processos biofísicos envolvidos, é difícil validar completamente os resultados quantitativos. Os modelos também são altamente dependentes dos parâmetros utilizados para as equações, muitos dos quais não podem ser medidos e devem ser calculados utilizando modelos teóricos ou podem ser medidos com pouca exatidão - algumas vezes, apenas sua ordem de grandeza é conhecida com algum grau de certeza. Dada ainda a grande variedade de células distintas, casos específicos e condições variáveis, muitas das aproximações e simplificações utilizadas podem não se aplicar a qualquer caso, e a generalidade dos vários modelos é limitada. Estas limitações, contudo, não reduzem o valor destes modelos para o estudo da eletroporação ou sua importância para ampliar a compreensão do fenômeno e desenvolver novas e melhores aplicações.

2.4 Aplicações e relevância

A compreensão precisa dos mecanismos da eletroporação, e especialmente os efeitos dos pulsos elétricos utilizados, são de extrema importância para aplicar o fenômeno de forma prática. A eletroporação tem diversas aplicações, em uma variedade de áreas, tanto em sua forma irreversível quanto reversível.

A eletroporação irreversível é utilizada primariamente quando se deseja destruir células sem aquecimento - devido à curta duração dos pulsos elétricos aplicados, o aumento de temperatura é relativamente pequeno. Isto é de interesse para a esterilização de alimentos ou instrumentos sensíveis, por exemplo [9, 40, 41, 42]. A técnica também pode ser aplicada em tecido vivo para provocar a ablação não-térmica, que destrói o tecido alvo sem causar grandes danos aos tecidos adjacentes próximos [17]. Em [25], estuda-se o impacto da frequência de pulsos para eletroporação irreversível em alta frequência (H-FIRE), com a possibilidade de não apenas minimizar o dano térmico a tecidos adjacentes

mas de modular a frequência para eliminar seletivamente apenas células cancerígenas ou apenas alguns tipos de célula.

A eletroporação reversível é utilizada para introduzir ou extrair substâncias diversas no interior de células, como a introdução de material genético - eletrotransferência de genes - ou medicamentos para destruição de células cancerígenas - eletroquimioterapia) [9]. A eletroquimioterapia permite reduzir os efeitos colaterais da quimioterapia convencional, ao introduzir o medicamento nas células eletroporadas sem efeitos negativos nos tecidos não submetidos aos pulsos elétricos.

Diversos circuitos distintos foram desenvolvidos para a geração dos pulsos necessários. Em geral, capacitores são utilizados para obter uma tensão suficientemente alta e circuitos de chaveamento eletrônico são utilizados para disparar e interromper os pulsos. Isto requer capacitores de alto valor, para evitar quedas de tensão significativas durante a aplicação do pulso, e chaves eletrônicas (MOSFETs ou IGBTs) rápidas. Além disto, é necessário que estes componentes suportem as altas tensões dos pulsos [23].

Para pulsos com duração de nanossegundos ou inferiores, contudo, o tempo de desligamento das chaves de alta tensão se torna proibitivamente alto. Para contornar esta limitação, em geral utiliza-se o atraso de linhas de transmissão para formar pulsos quadrados de duração apropriada; contudo, ainda é necessário utilizar chaves com tempo de acionamento rápido, e torna-se necessário casar a impedância da carga à das linhas de transmissão.

Além das dificuldades associadas às especificações dos componentes, o projeto de geradores de pulso para eletroporação também requer considerações especiais quanto à reprodutibilidade dos pulsos, aos eletrodos utilizados, protocolos de aplicação e segurança dos operadores e, quando aplicável, dos pacientes. Presentemente existem modelos de eletroporadores disponíveis comercialmente tanto para aplicações médicas quanto industriais.

Considerando a grande diversidade das aplicações e as dificuldades da criação de circuitos eletroporadores, o estabelecimento de protocolos de eletroporação adequados é de suma importância. Isto torna extremamente importante a elaboração de modelos teóricos, em especial simulações numéricas, que embasem tais equipamentos e protocolos.

2.5 Conclusão

Desde a descoberta da eletroporação, os modelos criados para descrever o fenômeno foram constantemente refinados através de novas observações experimentais e simulações. Apesar das dificuldades de observação e da grande complexidade dos modelos físicos, hoje existe um consenso na literatura sobre os mecanismos do fenômeno e suas

características gerais. Várias aplicações práticas já foram desenvolvidas e são empregadas comercialmente.

Na área de simulações numéricas, foram desenvolvidos vários modelos para situações diversas, como a análise espacial de geometrias complexas ou o estudo detalhado da dinâmica temporal da eletroporação. Contudo, muitas destas simulações ainda são restritas a casos específicos e incapazes de modelar o fenômeno em toda sua complexidade. Assim, o desenvolvimento de novos e melhores modelos tem muito a contribuir ao estudo teórico da eletroporação.

A [Tabela 1](#) sumariza alguns dos principais marcos da literatura recente sobre o fenômeno.

Referência	V_m		$n(\mathbf{r}, t)$	Células
[34] Dermol-Černe e Miklavčič (2018)	FEM, acoplado		Aproximação assintótica	Múltiplas, 3d, esférica
[35] Dermol-Černe et al. (2020)	Software acoplado	comercial,	Aproximação assintótica	Única, 3d, esferóide oval
[13] Chiapperino et al. (2020)	Software acoplado	comercial,	Aproximação assintótica	Múltiplas, 3d, irregulares
[3] Vale e Ramirez (2022)	FDTD, acoplado		Aproximação assintótica	Isolada, 2d, esférica
[31] Ding et al. (2023)	Software acoplado	comercial,	Aproximação assintótica	Múltiplas, 3d, esférica
[25] Milestone et al. (2023)	FDTD, acoplado		Equação completa	Isolada, 3d, esférica

Tabela 1 – Sumário da literatura

Referência	V_m	$n(r, t)$	Células
[26] Krassowska e Neu (1994)	Formulação geral	Não calcula	Isoladas, 2d
[32] Susil, Šemrov e Miklavčič (1998)	FEM, estado estacionário	Não calcula	Múltiplas, 3d, esféricas
[18] Neu e Krassowska (1999)	Não calcula	Desenvolve aproximação assintótica	Não se aplica
[27] Joshi e Schoenbach (2000)	Aproximação por parâmetros concentrados	Aproximação assintótica	Isolada, 2d, esférica
[19] Kotnik e Miklavčič (2000)	Ignora efeitos dos poros	Não calcula	Isolada, 2d, esférica
[17] Joshi et al. (2001)	Analítica, acoplada, ignora considerações espaciais	Aproximação assintótica	Isolada, 2d, esférica
[36] Gimsa e Wachner (2001)	Analítica, ignora efeitos dos poros	Não calcula	Isolada, 2d, cilíndrica e elipsoidal
[33] Pavlin, Pavselj e Miklavčič (2002)	FEM, estado estacionário	Não calcula	Múltiplas, 3d, esféricas
[22] Schoenbach et al. (2004)	Aproximação por parâmetros concentrados	Não calcula	Isolada, 2d, esférica
[20] Kotnik e Miklavčič (2006)	Solução analítica no domínio da frequência	Não calcula	Célula esférica isolada
[28] Neu e Krassowska (2006)	Não calcula	Aperfeiçoa aproximação assintótica	Não se aplica
[37] Pucihar et al. (2006)	FEM, estado estacionário	Não calcula	Múltiplas, 3d, irregulares
[29] Ying e Henriquez (2007)	FEM, acoplado a mudanças na membrana	Não calcula	Isolada, 2d, esférica
[1] Krassowska e Filev (2007)	FDTD, acoplado	Aproximação assintótica	Isolada, 2d, esférica
[38] Pucihar, Miklavčič e Kotnik (2009)	FEM, acoplado	Aproximação assintótica	Múltiplas, 3d, irregulares
[30] Lamberti et al. (2013)	Software acoplado	comercial, Aproximação assintótica	Isolada, 2d, esférica
[2] Lamberti et al. (2015)	Software acoplado	comercial, Aproximação assintótica	Isolada, 2d, esférica

3 Modelos e Métodos

Neste capítulo são discutidos os modelos empregados para o estudo da eletroporação, bem como os métodos adotados neste trabalho. O capítulo está dividido em seis partes, iniciando com as premissas básicas dos modelos físicos, analisando as características do modelo para determinar as simplificações possíveis e por fim fazendo as considerações relativas à implementação numérica.

Na [seção 3.1](#) são apresentadas as equações gerais do fenômeno de eletroporação, que descrevem o surgimento e crescimento dos poros na membrana de acordo com os modelos biofísicos consolidados na literatura. Na [seção 3.2](#) descreve-se o modelo adotado para a célula isolada, com as simplificações pertinentes de sua geometria e os parâmetros adotados para o sistema. Na [seção 3.3](#) são apresentadas as equações de Maxwell, empregadas no modelo desenvolvido anteriormente com o propósito de calcular o potencial na membrana celular. Na [seção 3.4](#) desenvolvem-se simplificações e aproximações das equações gerais com o intuito facilitar sua resolução numérica. Analisa-se também a validade de tais aproximações para o modelo a ser estudado. Na [seção 3.5](#) apresentam-se as características específicas da implementação numérica, incluindo a discretização do domínio e das equações já apresentadas e as escolhas de projeto realizadas. Por fim, na [seção 3.6](#) é feita uma discussão das duas abordagens utilizadas para o cálculo da corrente nos poros.

3.1 Equações gerais da eletroporação

Os modelos mais atuais descrevem a formação espontânea de poros isolados como resultado de flutuações térmicas e mecânicas na membrana [12, 18], sendo que aos poros de cada raio está associado um valor de energia. A aplicação de um campo elétrico altera a função que associa a energia a um determinado raio de poro, tornando mais fácil a formação e crescimento dos poros à medida que a energia associada a raios maiores diminui.

Os poros inicialmente são hidrofóbicos, não condutores, devido às moléculas polares nas paredes dos poros. Eles se tornam hidrofílicos quando aumentam de tamanho até atingir um raio mínimo [17]. Como apenas os poros condutores são de interesse, considera-se usualmente que os poros possuem um tamanho mínimo e os poros hidrofóbicos - com raios menores que o mínimo - são ignorados, reduzidos apenas a um termo fonte que resulta na criação de poros significativos (hidrofílicos) [1].

O processo de eletroporação é geralmente analisado utilizando a equação de Smoluchowski, uma equação diferencial parcial que descreve o surgimento e crescimento dos

poros. A grandeza de interesse é a função densidade de poros, $n(r_p, t)$, que descreve a distribuição de poros no espaço de seus raios e no tempo [17]:

$$\frac{\partial n(r_p, t)}{\partial t} + D \frac{\partial}{\partial r_p} \left(-\frac{\partial \varphi(r_p, t)}{\partial r_p} \frac{1}{kT} - \frac{\partial n(r_p, t)}{\partial r_p} \right) = S(r_p); \quad (3.1)$$

onde D é a constante de difusão dos poros, k é a constante de Boltzmann, T é a temperatura absoluta, $\varphi(r_p, t)$ é a função que descreve a energia dos poros e $S(r_p)$ é o termo fonte representando a criação e destruição dos poros hidrofílicos.

O termo fonte é dado por:

$$S(r_p) = \frac{v_c}{kT} \frac{\partial \varphi(r_p, t)}{\partial r_p} e^{-\varphi(r_p)/kT} \partial r_p \quad (3.2)$$

onde v_c é a taxa de flutuação volumétrica.

A energia associada aos poros de cada raio $\varphi(r_p, t)$ é dada por:

$$\varphi(r_p, t) = U(r_p) - \pi a_p r_p^2 V_m^2(t) \quad (3.3)$$

onde $U(r_p)$ é o valor da energia na ausência de um potencial aplicado, a_p é uma propriedade da membrana e $V_m(t)$ é o potencial através da membrana. $U(r_p)$ é uma propriedade da membrana, associada aos raios de cada poro; a variação temporal da energia $\varphi(r_p, t)$ se deve às mudanças no potencial.

Como pode ser visto pela Equação (3.3), a determinação do potencial através da membrana $V_m(t)$ é uma etapa essencial para o cálculo da densidade de poros, sendo um dos fatores cruciais para determinar a distribuição espacial dos poros e sua evolução temporal.

Os valores utilizados para os diversos parâmetros estão na [Tabela 2](#).

Tabela 2 – Parâmetros das equações gerais da eletroporação

Parâmetro	Significado Físico	Valor
T	Temperatura absoluta	310 K
D	Constante de difusão dos poros	5×10^{-14} m ² /s
a_p	Constante da membrana	$6,9 \times 10^2$ F/m ²
v_c	Taxa de Flutuação Volumétrica	2×10^{38} s/m ³

Fonte: Valores obtidos de [18] e [1]

3.2 Modelo da Célula

Para este trabalho, considera-se inicialmente o problema de uma célula isolada em um meio de suspensão, entre duas placas paralelas entre as quais é aplicado o campo elétrico, conforme indicado na Figura 6. A suposição de uma célula isolada pode ser feita quando as células estão suficientemente distantes entre si, de forma que a influência de cada uma sobre o campo elétrico seja desprezível na proximidade de outras células. Esta condição não é verdadeira para células em tecidos ou em agrupamentos densos, mas pode ser aplicada para suspensões pouco densas de células como as que são frequentemente utilizadas em experimentos de eletroporação. Além disto, a simplicidade deste modelo permite uma melhor compreensão geral do fenômeno, uma vez que independe do arranjo espacial específico das células em cada caso.

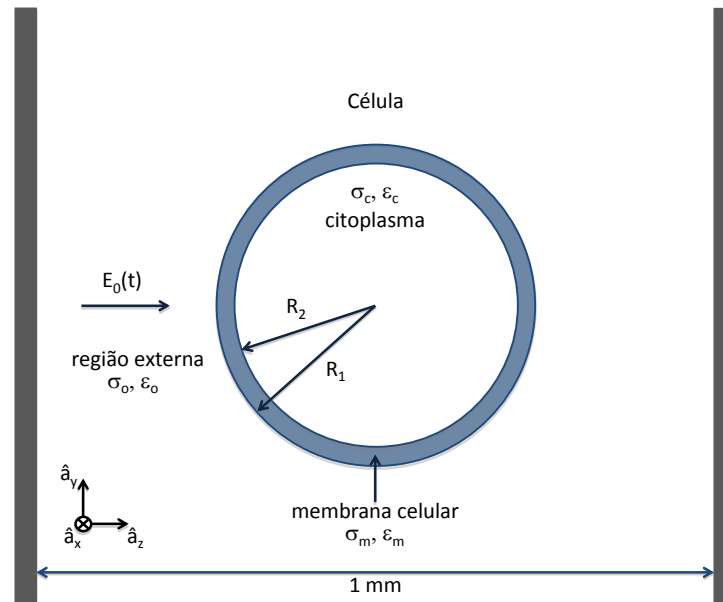


Figura 6 – Modelo da célula (não está em escala)

O interior da célula, a membrana e o meio externo são caracterizados por suas condutividades σ_c , σ_m e σ_o e por suas permissividades ϵ_c , ϵ_m e ϵ_o , respectivamente. A célula possui raio externo R_1 , com uma distância R_2 do centro até a membrana. A espessura da membrana h pode ser expressa por

$$h = R_1 - R_2 \quad (3.4)$$

O pulso elétrico aplicado possui módulo igual a $E_0(t)$ e direção perpendicular às placas (\vec{a}_z).

A suposição de placas paralelas também modela adequadamente as cubetas frequentemente utilizadas para experimentos de eletroporação, como as que podem ser vistas

na Figura 7. A suposição do campo uniforme entre placas paralelas também é razoável para outras situações em que os eletrodos sejam grandes em relação à célula e estejam posicionados a uma distância suficiente desta. Contudo, estas condições notavelmente não se aplicam a experimentos utilizando microeletrodos e outras formas de aplicação de campo elétrico, além de outras situações em que as células não estejam isoladas.



Figura 7 – Cubeta para eletroporação. Fonte: [43]

Uma das principais vantagens da suposição de um campo elétrico uniforme é que o problema apresenta simetria rotacional ao longo do eixo \hat{z} , que é a direção de aplicação do campo elétrico. Isto permite reduzir o problema a duas dimensões, o que representa uma grande redução na complexidade do problema.

Por conveniência, opta-se por considerar o caso de uma célula perfeitamente esférica. Embora essa suposição seja uma óbvia simplificação, que não se aplica à maior parte das células em tecidos, é uma aproximação suficiente para células em suspensão, sendo assim adequada para o modelo de células isoladas empregado. Também se ignoram eventuais distorções da forma da célula durante o processo, por exemplo compressão ou alongamento devido a forças elétricas durante o processo de eletroporação, devido à curta duração do pulso elétrico em comparação com os tempos necessários para alterações mecânicas significativas.

Considera-se também que a membrana celular possui espessura uniforme, uma suposição razoável para a maior parte das células, e que tanto a membrana quanto o citoplasma e o meio externo são substâncias homogêneas. Embora esta seja uma evidente simplificação, a grande diferença entre as propriedades da membrana e dos demais meios torna as diferenças internas nestes meios pouco significativas. Além disto, o conhecimento

limitado sobre os valores das propriedades físicas de cada parte da célula limita a precisão com que é possível descrever o sistema; mesmo os parâmetros do modelo simplificado são de difícil determinação.

Foram utilizadas duas células distintas para testes, com parâmetros obtidos de diferentes referências. As propriedades para ambas as células estão listadas na [Tabela 3](#).

Tabela 3 – Parâmetros do modelo

Parâmetro	Significado Físico	Valor de [1]	Valor de [2]
σ_c	Condutividade do citoplasma	0,455 S/m	1,31 S/m
σ_o	Condutividade do meio externo	5 S/m	1 S/m
ϵ_o	Permissividade do meio externo	$6,4 \times 10^{-10}$ F/m	$7,1 \times 10^{-10}$ F/m
ϵ_c	Permissividade do citoplasma	$6,4 \times 10^{-10}$ F/m	$5,3 \times 10^{-10}$ F/m
σ_m	Condutividade da membrana	10×10^{-9} S/m	$5,6 \times 10^{-5}$ S/m
ϵ_m	Permissividade da membrana	5×10^{-11} F/m	$1,1 \times 10^{-10}$ F/m
R_1	Raio externo da célula	50 μm	3,307 μm
R_2	Raio interno da célula	49,995 μm	3,3 μm

Fonte: Valores dos parâmetros obtidos de [1] e [2]

Considerando que no modelo escolhido os objetos de interesse podem ser descritos como esferas e cascas esféricas, optou-se por utilizar um sistema de coordenadas esféricas com a origem no centro da célula. Desta forma, as várias camadas do modelo (meio externo, membrana celular, citoplasma celular, membrana da organela e citoplasma da organela) podem ser representadas facilmente como intervalos da coordenada raio.

3.3 Cálculo do potencial na membrana

Para o cálculo da diferença de potencial na membrana, definem-se três potenciais distintos: o potencial no meio externo $V_o(r, \theta, t)$, o potencial no citoplasma celular $V_c(r, \theta, t)$ e o potencial no interior da membrana $V_{\text{mem}}(r, \theta, t)$. A diferença de potencial na membrana V_m pode ser então expressa como a diferença entre os potenciais nas interfaces interna e externa da membrana, como visto na [Figura 8](#).

Assim, define-se V_m como:

$$V_m = V_c(R_2, \theta) - V_o(R_1, \theta) \quad (3.5)$$

O potencial no interior da célula pode ser obtido a partir das equações de Maxwell, considerando que não há campo magnético no domínio do problema:

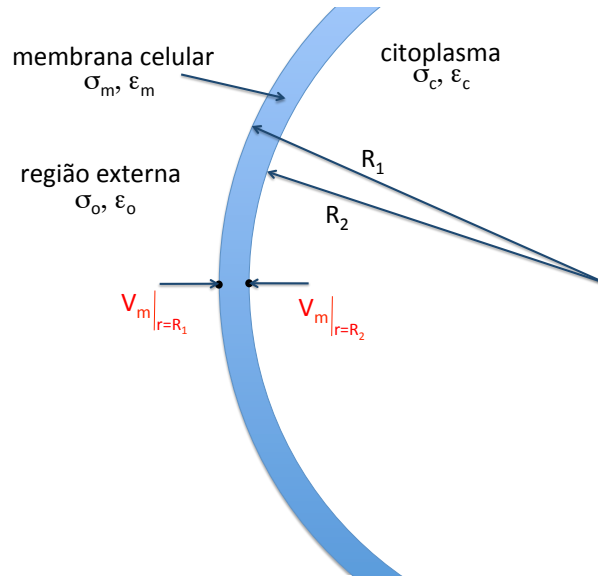


Figura 8 – Diferença de potencial na membrana

$$\begin{aligned}\nabla \cdot \vec{E} &= \frac{\rho}{\epsilon} \\ \nabla \times \vec{E} &= 0\end{aligned}\quad (3.6)$$

Considerando-se a escala reduzida do problema, com distâncias da ordem de micrômetros, o tempo de propagação dos campos é desprezível em relação aos tempos envolvidos no fenômeno, de forma que é possível tratá-lo como um problema eletrostático resolvido a cada passo de tempo. Assim, a equação de interesse entre as equações de Maxwell é a lei de Gauss:

$$\nabla \cdot \vec{E} = \frac{\rho}{\epsilon} \quad (3.7)$$

Sabendo-se que o rotacional do campo elétrico é nulo, a partir da Equação (3.6) é possível definir uma grandeza potencial escalar da qual ele é o gradiente:

$$\vec{E} = -\nabla V \quad (3.8)$$

A partir da definição de potencial escalar elétrico é possível substituir a Equação (3.8) na Equação (3.7) e obter a equação de Poisson para o potencial escalar elétrico V :

$$\nabla^2 V(r, \theta, t) = -\frac{\rho}{\epsilon} \quad (3.9)$$

em que ρ é a densidade volumétrica de cargas e ϵ é a permissividade elétrica do meio. Assumindo que no caso estudado não existem distribuições volumétricas de carga, a equação de Poisson se reduz à equação de Laplace:

$$\nabla^2 V = 0 \quad (3.10)$$

Assim, o potencial em cada parte da célula pode ser calculado resolvendo separadamente a equação de Laplace para aquela divisão do domínio:

$$\begin{aligned}\nabla^2 V_c &= 0 \\ \nabla^2 V_{mem} &= 0 \\ \nabla^2 V_o &= 0\end{aligned}\tag{3.11}$$

O problema possui uma condição de contorno para V_o baseado no efeito decrescente da célula sobre o campo elétrico com o aumento da distância - longe da célula, o potencial tende ao campo elétrico entre duas placas paralelas:

$$V_o(r, \theta, t) = -E_0(t)r\cos(\theta), r \rightarrow \infty\tag{3.12}$$

onde $E_0(t)$ é a intensidade do pulso elétrico aplicado, r a distância do centro da célula e θ o ângulo polar em relação à direção do pulso aplicado (coordenada axial).

Além disto, o problema tem condições de interface baseadas na continuidade do potencial e da corrente nas interfaces entre os meios. Conforme a [Figura 8](#), a continuidade do potencial é dada por:

$$\begin{aligned}V_c(R_2, \theta, t) &= V_{mem}(R_2, \theta, t) \\ V_o(R_1, \theta, t) &= V_{mem}(R_1, \theta, t)\end{aligned}\tag{3.13}$$

Também deve ser atendida a condição de continuidade de corrente, como visto na [Figura 9](#).

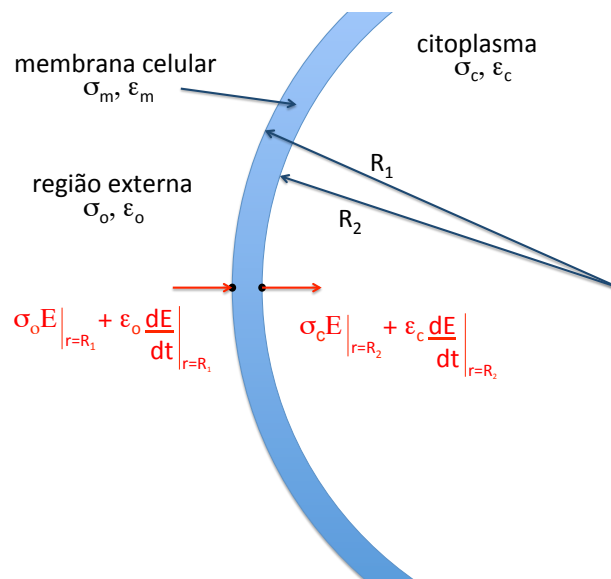


Figura 9 – Continuidade da corrente na interface dos meios com a membrana

Assim, a condição pode ser expressa por:

$$-\hat{n} \cdot (\sigma_c \nabla V_c) = -\hat{n} \cdot (\sigma_o \nabla V_o) = C_m \frac{\partial V_m}{\partial t} + \sigma_m (V_m - V_{rest}) \quad (3.14)$$

onde $-\hat{n}$, C_m , V_{rest} e σ_m são respectivamente o vetor normal unitário da superfície, a capacitância, o potencial de repouso e a condutividade da membrana. Esta equação possui dois termos: a corrente capacitiva (de deslocamento) e a corrente de condução através da membrana. É importante notar que durante o processo de eletroporação ocorre a passagem de íons através dos poros, de forma que se torna necessário incluir um termo I_p para representar a corrente de eletroporação.

3.4 Equações simplificadas

3.4.1 Aproximações para o potencial na membrana

A equação de Laplace em coordenadas esféricas pode ser expandida para:

$$\nabla^2 V(r, \theta) = \frac{\partial^2 V}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial V}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 V}{\partial \theta^2} + \frac{\cos \theta}{r^2 \sin \theta} \frac{\partial V}{\partial \theta} = 0 \quad (3.15)$$

Para um domínio suficientemente simples é possível obter uma solução analítica para a equação de Laplace, como visto em [19, 36, 17]. Contudo, tais soluções frequentemente ignoram certas considerações espaciais importantes, como a presença do potencial de repouso da membrana, e por estarem acopladas ao cálculo da corrente de eletroporação ainda requerem resolução numérica.

Uma expressão bem estabelecida na literatura é a equação de Schwan, que descreve o potencial de estado estacionário na membrana. Várias soluções analíticas usam a equação de Schwan como forma de validação parcial de seus resultados: assumindo uma membrana completamente isolante, de espessura desprezível e ignorando variações temporais, a solução analítica da Equação (3.15) pode ser simplificada para a equação de Schwan.

$$V_m = \frac{3}{2} E_0 r \cos \theta \quad (3.16)$$

Para análise do período transiente, a equação de Schwan de primeira ordem pode ser utilizada para pulsos com duração maior que 1 microssegundo e meios com condutividades significativamente maiores que a condutividade da membrana.

$$V_m = \frac{3}{2} E R_1 \cos \theta \left[1 - e^{-t/\tau} \right] \quad (3.17)$$

onde

$$\tau = \tau_m = \frac{R_1 \varepsilon_m}{2h \frac{\sigma_c \sigma_o}{\sigma_c + 2\sigma_o} + R_1 \sigma_m} \quad (3.18)$$

Estas equações aproximadas, embora demasiadamente simplificadas para a maioria dos casos, podem ser combinadas a simulações numéricas para reduzir o esforço computacional exigido. Por exemplo, em [1] a Equação (3.17) é utilizada para calcular o potencial na membrana antes do surgimento do primeiro poro, e apenas a partir de então o potencial é calculado numericamente levando em consideração as alterações das propriedades.

3.4.2 Aproximações para a densidade de poros

A Equação de Smoluchowski, Equação (3.1), não possui solução analítica e sua resolução numérica é particularmente complexa. Em [18, 28, 1] é desenvolvida uma aproximação assintótica que reduz o problema a um conjunto de equações diferenciais ordinárias, facilitando seu tratamento numérico. Neste caso, caracteriza-se o processo através da densidade de poros $N(t)$:

$$N(t) = \int_0^\infty n(r, t) dr \quad (3.19)$$

Esta aproximação separa a Equação (3.1) em duas equações, uma referente à criação e destruição de novos poros - com um raio mínimo r^* - e outra referente à variação de tamanho dos poros.

$$\frac{dN}{dt} = \alpha e^{(V_m/V_{ep})^2} \left(1 - \frac{N}{N_{eq}(V_m)} \right) \quad (3.20)$$

$$N_{eq}(V_m) = N_0 e^{q(V_m/V_{ep})^2} \quad (3.21)$$

$$\frac{dr_k}{dt} = U(r_j, V_m, S_{eff}), j = 1, 2, \dots, K \quad (3.22)$$

em que

$$U(r, V_m, S_{eff}) = \frac{D}{kT} \left[\frac{V_m^2 F_{max}}{1 + r_h/(r + r_t)} + 4\beta \left[\frac{r^*}{r} \right]^4 \frac{1}{r} \right] + \frac{D}{kT} [-2\pi\gamma + 2\pi S_{eff} r] \quad (3.23)$$

Nesta aproximação, N_{eq} é o número total de poros e r_k é o raio de um poro individual de índice j . N_0 é a densidade de poros no equilíbrio, q é uma constante para criação de poros em função do raio de energia mínima e do raio mínimo do poro para condução, V_{ep} é a tensão característica da eletroporação, F_{max} é a força elétrica máxima para tensão na membrana unitária, r_h e r_t são as constantes para velocidade de advecção,

α é o coeficiente da taxa de criação de poros, β é a energia da repulsão estérica, γ é a energia de borda e S_{eff} é a tensão mecânica efetiva da membrana, dada por:

$$S_{\text{eff}}(A_p) = 2S' - \frac{2S' - S_0}{1 - A_p/A} \quad (3.24)$$

em que A_p é a área total de todos os poros (considera-se que os poros possuem forma perfeitamente circular para cálculo da área), A é a área da superfície da célula, S_0 é a tensão mecânica da membrana sem poros e S' é a energia por área da interface hidrocarboneto-água.

Estas expressões são convenientes para serem implementadas numericamente; contudo, sua validade é limitada a um intervalo de condições e propriedades que foram assumidas durante sua derivação. Notadamente, a aproximação assume constantes de tempo elétricas na escala de nanossegundos, tornando-a inadequada para o tratamento de fenômenos intra-celulares através de nanopulsos. Uma nova aproximação deve ser obtida para o tratamento adequado destes casos.

A [Tabela 4](#) lista os valores dos parâmetros destas equações, complementando a [Tabela 2](#).

Tabela 4 – Parâmetros das equações aproximadas da eletroporação

Parâmetro	Significado Físico	Valor
N_0	Densidade de poros no equilíbrio	$1,5 \times 10^9 \text{ 1/m}^2$
q	Constante para criação de poros	2,4606
V_{ep}	Tensão característica da eletroporação	0,258 V
r^*	Raio mínimo de poros hidrofílicos	$0,51 \times 10^{-9} \text{ m}$
r_h	Constante para velocidade de advecção	$0,97 \times 10^{-9} \text{ m}$
r_t	Constante para velocidade de advecção	$0,31 \times 10^{-9}$
α	Coeficiente da taxa de criação de poros	$1 \times 10^9 \text{ 1/(m}^2\text{s)}$
β	Energia da repulsão estérica	$1,4 \times 10^{-19} \text{ J}$
γ	Energia de borda	$1,8 \times 10^{-11} \text{ J/m}$
F_{max}	Força elétrica máxima para tensão na membrana unitária	$0,7 \times 10^{-9} \text{ N/V}^2$
S'	Energia por área da interface hidrocarboneto-água	$2 \times 10^{-2} \text{ J/m}^2$
S_0	Tensão mecânica da membrana sem poros	$1 \times 10^{-6} \text{ J/m}^2$

Fonte: Valores obtidos de [\[18\]](#) e [\[1\]](#)

3.5 Aproximação por FDTD

3.5.1 Discretização do domínio

Devido à geometria do problema, opta-se por uma discretização baseada em coordenadas esféricas, reduzido a duas dimensões devido à simetria rotacional do problema,

$$r_j^{n+1} = r_j^n + A_{pg1} \frac{(r_j^n + r_t)}{r_j^n + r_t + r_n} F_{max} V_m^2 + \quad (3.29)$$

$$+ A_{pg1} \left[A_{r1} \frac{1}{(r_j^n)^5} + 2\pi\sigma_{eff} r_j^n \right] - A_{r2}$$

$$A_{pg1} = \frac{D\Delta t}{kT} \quad (3.30)$$

$$A_{r1} = 4\beta(r_*)^4 \quad (3.31)$$

$$A_{r2} = A_{pg1} 2\pi\gamma \quad (3.32)$$

onde o índice n indica o passo de tempo. O subíndice k na Equação (3.25) indica a divisão angular da membrana, enquanto o subíndice j na Equação (3.29) indica o raio do poro.

O desenvolvimento destas expressões está detalhado no [seção B.1](#).

3.5.3 Discretização da Equação de Laplace

A equação de Laplace em coordenadas esféricas pode ser convertida para uma equação de diferenças utilizando o seguinte esquema de discretização:

$$\begin{aligned} r_i &= i\Delta r, \quad i = 0, 1, 2, 3, \dots \\ \theta_j &= j\Delta\theta, \quad j = 0, 1, 2, 3, \dots \end{aligned} \quad (3.33)$$

que resulta em:

$$\begin{aligned} V(i, j) &= \frac{1}{2 \left(1 + \frac{1}{(i\Delta\theta)^2}\right)} \times \left[\left(1 + \frac{1}{i}\right) V(i+1, j) + \left(1 - \frac{1}{i}\right) V(i-1, j) + \right. \\ &\quad \left. \left(\frac{1}{(i\Delta\theta)^2} + \frac{\cos j\Delta\theta}{2i^2\Delta\theta \sin j\Delta\theta} \right) V(i, j+1) + \right. \\ &\quad \left. \left(\frac{1}{(i\Delta\theta)^2} - \frac{\cos j\Delta\theta}{2i^2\Delta\theta \sin j\Delta\theta} \right) V(i, j-1) \right] \end{aligned} \quad (3.34)$$

Contudo, para evitar singularidades nos polos, é necessário aplicar a seguinte condição para os pontos equivalentes a $\theta = 0^\circ$ e $\theta = 180^\circ$:

$$\begin{aligned} V(i, 0) &= \frac{1}{2 \left(1 + \frac{1}{(i\Delta\theta)^2}\right)} \times \left[\left(1 + \frac{1}{i}\right) V(i+1, 0) + \left(1 - \frac{1}{i}\right) V(i-1, 0) \right] \\ V(i, j_{max}) &= \frac{1}{2 \left(1 + \frac{1}{(i\Delta\theta)^2}\right)} \times \left[\left(1 + \frac{1}{i}\right) V(i+1, j_{max}) + \right. \\ &\quad \left. \left(1 - \frac{1}{i}\right) V(i-1, j_{max}) \right] \end{aligned} \quad (3.35)$$

A derivação destas equações pode ser vista no [seção A.1](#).

3.5.4 Tratamento da condição de interface na membrana

A condição de interface descrita pela Equação (3.14) não é usual e requer tratamento especial. A Prof. Wanda Krassowska Neu, autora de [1], gentilmente forneceu suas notas pessoais quanto à resolução deste problema. A partir destas notas, foram obtidas as equações em diferenças finitas para os pontos da membrana, para os pontos na interface da membrana com o citoplasma:

$$\begin{aligned}
& \left[2 \left(1 + \frac{1}{(i_{R_2} \Delta \theta)^2} \right) - \frac{2C_m \Delta r}{\sigma_c \Delta t} \left(-1 + \frac{1}{i_{R_2}} \right) \right] V(i_{R_2}, j) + \\
& \frac{2}{\sigma_c} \left(1 + \frac{1}{(i_{R_2} \Delta \theta)^2} \right) \left(\frac{C_m}{\Delta t} V_m(j) + \sigma_m V_m(j) + I_{ep} \right) = \\
& 2V(i_{R_2}, j+1) - \frac{2C_m \Delta r}{\sigma_c \Delta t} \left(1 - \frac{1}{i_{R_2}} \right) V(i_{R_2}, j-1) + \\
& \frac{1}{(i_{R_2} \Delta \theta)^2} \left(1 - \frac{\Delta \theta \cot(j \Delta \theta)}{2} \right) V(i_{R_2} - 1, j) + \\
& \frac{1}{(i_{R_2} \Delta \theta)^2} \left(1 + \frac{\Delta \theta \cot(j \Delta \theta)}{2} \right) V(i_{R_2} + 1, j)
\end{aligned} \tag{3.36}$$

E para os pontos na interface da membrana com o meio externo:

$$\begin{aligned}
& \left[-2 \left(1 + \frac{1}{(i_{R_1} \Delta \theta)^2} \right) + \frac{2C_m \Delta r}{\sigma_o \Delta t} \left(1 + \frac{1}{i_{R_1}} \right) \right] V(i_{R_1}, j) + \\
& \frac{2}{\sigma_o} \left(1 + \frac{1}{(i_{R_1} \Delta \theta)^2} \right) \left(\frac{C_m}{\Delta t} V_m(j) + \sigma_m V_m(j) + I_{ep} \right) = \\
& 2V(i_{R_1}, j-1) + \frac{2C_m \Delta r}{\sigma_o \Delta t} \left(1 + \frac{1}{i_{R_1}} \right) V(i_{R_1}, j+1) + \\
& \frac{1}{(i_{R_1} \Delta \theta)^2} \left(1 - \frac{\Delta \theta \cot(j \Delta \theta)}{2} \right) V(i_{R_1} - 1, j) + \\
& \frac{1}{(i_{R_1} \Delta \theta)^2} \left(1 + \frac{\Delta \theta \cot(j \Delta \theta)}{2} \right) V(i_{R_1} + 1, j)
\end{aligned} \tag{3.37}$$

Em que i_{R_2} e i_{R_1} representam os índices correspondentes à divisão do raio em que se localizam os limites respectivamente interno e externo da membrana.

Em contraste com a Equação (3.34), estas equações incluem termos correspondentes à corrente, tanto na forma dos coeficientes σ e C_m quanto diretamente através da corrente de eletroporação I_{ep} . Além disto, embora alguns destes termos relativos à corrente sejam dependentes do potencial nos pontos vizinhos (incluindo pontos no lado oposto da membrana), há também termos que dependem diretamente da diferença de potencial na membrana V_m e da corrente de eletroporação, os quais são calculados separadamente e

impostos como condições no algoritmo. Por fim, deve ser notado que esta equação inclui a dependência temporal do problema, que não se manifesta nas equações para o interior dos domínios.

Detalhes sobre a derivação desta condição podem ser vistos no [Apêndice C](#).

3.6 Cálculo da corrente de eletroporação

Embora inicialmente se assuma que os diversos meios são homogêneos, com propriedades físicas idênticas em toda sua extensão, esta suposição não é apropriada para as propriedades elétricas da membrana, devido às alterações decorrentes da eletroporação. Em especial, a condução de íons através dos poros altera a condutividade da membrana, que inicialmente é quase totalmente isolante. Como a densidade de poros é diferente para cada seção da membrana, e se altera a cada instante de tempo, é necessário que a corrente conduzida através dos poros seja calculada numericamente durante a simulação. Esta alteração, por sua vez, afeta a diferença de potencial na membrana, tornando o cálculo destas grandezas fortemente acoplado. Este trabalho considera dois modelos para a corrente através dos poros, ou corrente de eletroporação.

3.6.1 Cálculo da corrente através do modelo de parâmetros concentrados

Em [1, 34] é utilizada uma aproximação baseada na geometria dos poros. O poro é aproximado pela associação em série de duas resistências:

$$i_p = \frac{V_m}{R_p + R_i} \quad (3.38)$$

onde R_p é a resistência do cilindro que representa o poro. A partir da lei de Ohm:

$$R_p = \frac{h}{\pi \sigma r_p^2} \quad (3.39)$$

e R_i é uma resistência não linear de entrada que modela a corrente não uniforme na interface entre um meio condutor de grandes dimensões e um cilindro condutor estreito, inserido em uma superfície isolante. Seguindo [44]:

$$R_i = \frac{1}{2\sigma r_p}. \quad (3.40)$$

A principal vantagem dessa abordagem é sua simplicidade. Contudo, ela tem a desvantagem de não representar efeitos mais complexos, como a interação entre cargas e a parede do poro.

A partir disto, é possível obter um valor equivalente para a condutividade na membrana, que engloba tanto a condução através das seções intactas da membrana quanto a corrente de eletroporação naquela divisão da membrana:

$$\sigma_{eq}(t, \theta) = \frac{\sigma_m}{A_t} - \sum_{j=1}^{K^\theta} \frac{\Delta A}{A_t} \left(\frac{R_1 - R_2}{\pi \sigma_c (r_j^\theta)^2} + \frac{1}{2\sigma_c r_j^\theta} - \sigma_m \right) \quad (3.41)$$

onde $K^{\theta, \varphi}$ é o número de poros na seção considerada da membrana, ΔA é a área do poro individual e A_t é a área total da seção da membrana. Contudo, para simplicidade na implementação, em geral o termo da corrente de eletroporação é tratado separado das componentes estáticas da condutividade, como pode ser visto nas Equações (3.36) e (3.37) em que usa-se o termo i_p .

3.6.2 Cálculo da corrente através do modelo de fluxo de íons

Nesta aproximação, a corrente é calculada como o fluxo de íons através de eletroporos, como descrito em [45]. Essa abordagem usa uma variação da equação de Nernst-Planck, que descreve o transporte ativo (devido ao potencial elétrico) e passivo (osmose e difusão) de substâncias através da membrana. Modelando o transporte de íons através do poro causado pela diferença de potencial, ele deriva uma relação entre tensão e corrente para cada poro.

Essa abordagem foi utilizada em [17], mas o modelo não considerava adequadamente a distribuição espacial do potencial na célula. A mesma abordagem foi utilizada para uma simulação mais completa em [30, 2] usando um *software* comercial de elementos finitos. A formulação usada corresponde àquela apresentada em [30].

A corrente em um poro de raio r_p é dada por:

$$i_p = V_m \frac{\pi \sigma \frac{r_p^2}{h} (1 - e^{-V_m^*})}{e^{-V_m^*} \frac{w_0 e^{(w_0 + nV_m^*) + nV_m^*}}{w_0 + nV_m^*} - \frac{w_0 e^{(w_0 - nV_m^*) - nV_m^*}}{w_0 - nV_m^*}} \quad (3.42)$$

onde w_0 é a barreira de energia dentro do poro que modela a interação entre os íons e a parede do poro, q_e é a carga do elétron, n é o tamanho relativo da entrada dos poros (com valor de 0,15) e V_m^* é um potencial normalizado dado por:

$$V_m^* = V_m \frac{q_e}{kT} \quad (3.43)$$

3.7 Conclusão

Este capítulo apresentou os modelos a serem utilizados para o desenvolvimento deste trabalho, partindo das equações gerais que descrevem os fenômenos envolvidos, da geometria do problema e das propriedades dos materiais e meios. As suposições realizadas e escolhas de projeto foram devidamente justificadas com base no conhecimento prévio das áreas envolvidas e do fenômeno da eletroporação. Foram então desenvolvidas simplificações que permitiram chegar a um conjunto de equações aproximadas, as quais podem ser utilizadas para o cálculo numérico das grandezas de interesse: a diferença de potencial na membrana, o número de poros e o raio dos poros. Foram então estudadas diferentes abordagens para o cálculo da corrente nos poros, um elemento crucial das simulações.

4 Resultados

Este capítulo descreve os resultados obtidos. O capítulo está dividido em quatro partes. Na [seção 4.1](#) é apresentada uma definição detalhada do problema e dos resultados de interesse. Na [seção 4.2](#) são analisados e validados os resultados obtidos para a simulação de uma célula isolada em duas dimensões, usando coordenadas esféricas. Na [seção 4.3](#) são analisados os resultados para cada uma das aproximações para a corrente de eletroporação, comparando os dois métodos.

4.1 Definição do problema e das grandezas de interesse

O problema a ser resolvido é uma simulação bidimensional, em coordenadas esféricas, da eletroporação em uma célula isolada submetida a um pulso elétrico retangular. A célula é aproximada como uma esfera com membrana de espessura uniforme, sendo os três meios (citoplasma, membrana e meio externo) homogêneos, como pode ser visto na [Figura 11](#):

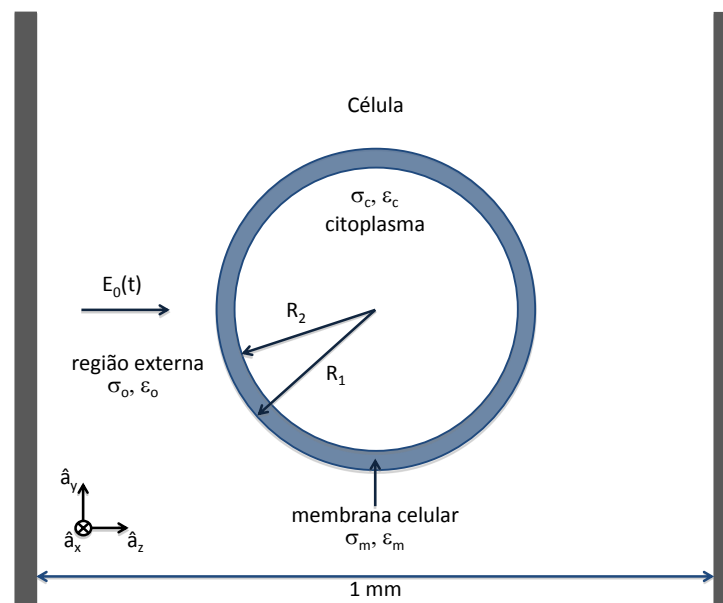


Figura 11 – Modelo da célula (não está em escala)

É aplicado um pulso elétrico entre as placas paralelas. De acordo com a literatura os poros levam em torno de 1ms para atingir seus valores máximos, e devido à diferença de várias ordens de magnitude nas escalas de tempo o custo computacional para simular todas as etapas do processo é muito elevado. As etapas iniciais são de maior interesse, e poucas aplicações usam pulsos longos o bastante para atingir o raio máximo dos poros.

São simulados dois pulsos distintos: um pulso retangular de valor igual a 40kV/m e duração de 9 μ s e um pulso trapezoidal de valor igual a 1,3MV/m, com 10ns de tempo de subida, 30ns de duração no valor máximo, e 10ns de tempo de descida. Para o pulso retangular são simulados os 9 μ s de duração do pulso, e para o pulso trapezoidal 150ns iniciando com o começo do pulso e persistindo por 100ns após seu término.

Para cada caso é utilizada uma célula de parâmetros distintos (como visto na Tabela 3), mas com o mesmo número de divisões. As células são discretizadas conforme a Figura 12.

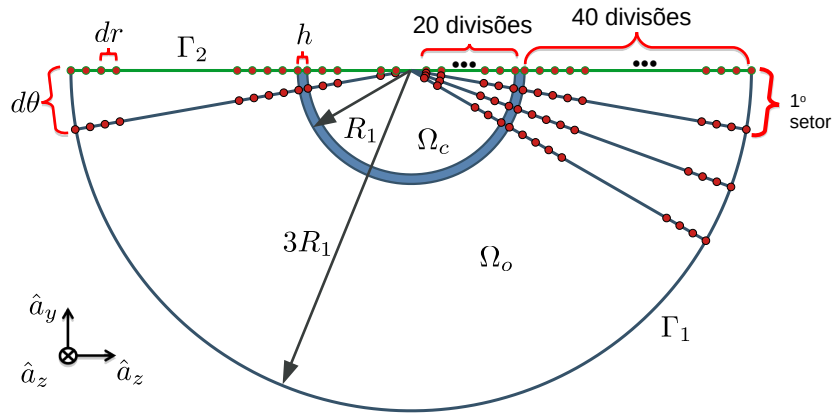


Figura 12 – Discretização do domínio

Devido à uniformidade do campo entre duas placas paralelas e sua distância da célula, assume-se que o campo elétrico distante da célula é conhecido, e não é necessário representar as placas na discretização. Seu efeito é modelado como uma condição de contorno de Dirichlet na fronteira Γ_1 .

Os valores das divisões espaciais e do passo de tempo são dados pela Tabela 5.

Tabela 5 – Discretização do problema

Grandeza discreta	Valor para o caso 1	Valor para o caso 2	Número de divisões
$d\theta$	2,8125°	2,8125°	64
dr	2,5 μ m	0,165 μ m	60
dt	1,5ns	0,025ns	6000

A principal grandeza de interesse da eletroporação é a densidade de poros na membrana $n(r_p, \theta, t)$, representada como um conjunto de todos os poros, com seus respectivos raios, para cada divisão angular da membrana. Também de interesse é o valor da diferença de potencial através da membrana, uma grandeza essencial para a modelagem do processo de eletroporação. Neste modelo, para cada divisão angular da membrana há um par de vetores registrando os raios de todos os poros naquela divisão e o número de poros com

cada raio registrado. Assim, são obtidos três resultados principais: o número de poros N , o raio dos poros r_j , e o potencial na membrana V_m . Estas grandezas devem ser analisadas quanto a sua distribuição espacial na membrana (ou seja, para cada valor de θ) e evolução temporal.

4.2 Simulação da eletroporação em um célula isolada

A simulação foi desenvolvida em múltiplas etapas, cada uma validada individualmente e então combinadas, de forma a assegurar o correto funcionamento da simulação final. Primeiramente, foram feitas duas simulações independentes: uma para o potencial e uma densidade de poros. Partindo do cálculo analítico do potencial, foi desenvolvida uma simulação numérica da equação de Laplace em diferenças finitas com as condições de contorno e interface do problema (contudo, sem considerar a ocorrência da eletroporação e consequente alteração das propriedades da célula). O desenvolvimento desta simulação, em diversas etapas, pode ser visto detalhadamente no [Apêndice A](#).

A seguir, a densidade de poros foi simulada assumindo um potencial aproximado, não acoplado ao surgimento de poros, como pode ser visto em detalhes no [Apêndice B](#). Assim, verifica-se a implementação das equações da eletroporação de forma independente da simulação do potencial. Embora os resultados quantitativos não sejam facilmente comparáveis a uma referência, as características do processo em seus primeiros instantes (antes que o surgimento dos poros cause o potencial a divergir do aproximado) permitem verificar a presença de grandes erros tanto nas equações quanto no programa computacional desenvolvido.

A seguir, estas simulações foram combinadas em uma simulação completa da eletroporação. Esta foi então validada em comparação com resultados estabelecidos na literatura, em especial [1] e [2], que utilizam a mesma metodologia. O tempo de simulação é menor do que 20 segundos em computador Ryzen 5 5600G com 32GB de RAM. Estes resultados são apresentados a seguir, enquanto os resultados parciais se encontram nos apêndices.

4.2.1 Potencial na membrana

Esta etapa foi, por simplicidade, verificada apenas para o caso de teste 1 (célula de 50 μ s e pulso trapezoidal). A [Figura 13](#) mostra a evolução do potencial na membrana em cinco pontos distintos da membrana, separados por 45° uns dos outros.

Com o surgimento dos primeiros poros, o potencial sofre uma abrupta queda devido à passagem de corrente através dos poros (fazendo com que a membrana deixe de se comportar predominantemente como um material isolante). Após a queda, o potencial atinge um patamar estável de equilíbrio. Nota-se que embora o potencial inicialmente

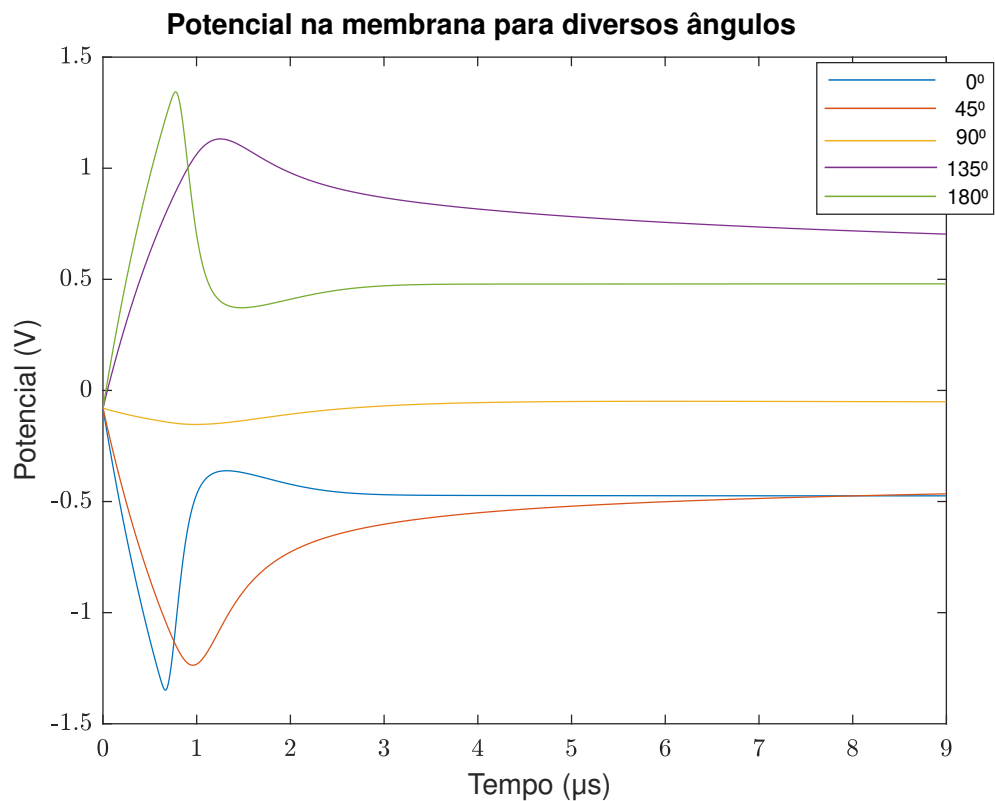


Figura 13 – Evolução do potencial através da membrana ao longo do tempo para várias posições na célula

seja maior nos polos da célula, a grande concentração de poros que surge rapidamente nesta região causa uma maior queda, enquanto as regiões intermediárias entre os polos e o centro da célula apresentam uma queda menor. Nota-se também que o potencial em 90° é, previsivelmente, próximo de nulo (há uma pequena diferença devido ao potencial de repouso da membrana) e o limiar da eletroporação não é atingido em nenhum momento.

A Figura 14 compara o potencial real simulado com a aproximação exponencial que representa uma célula intacta (sem o surgimento de quaisquer poros). Este gráfico permite visualizar o efeito da condução de corrente através dos poros, em comparação com o potencial induzido em uma célula perfeitamente isolante.

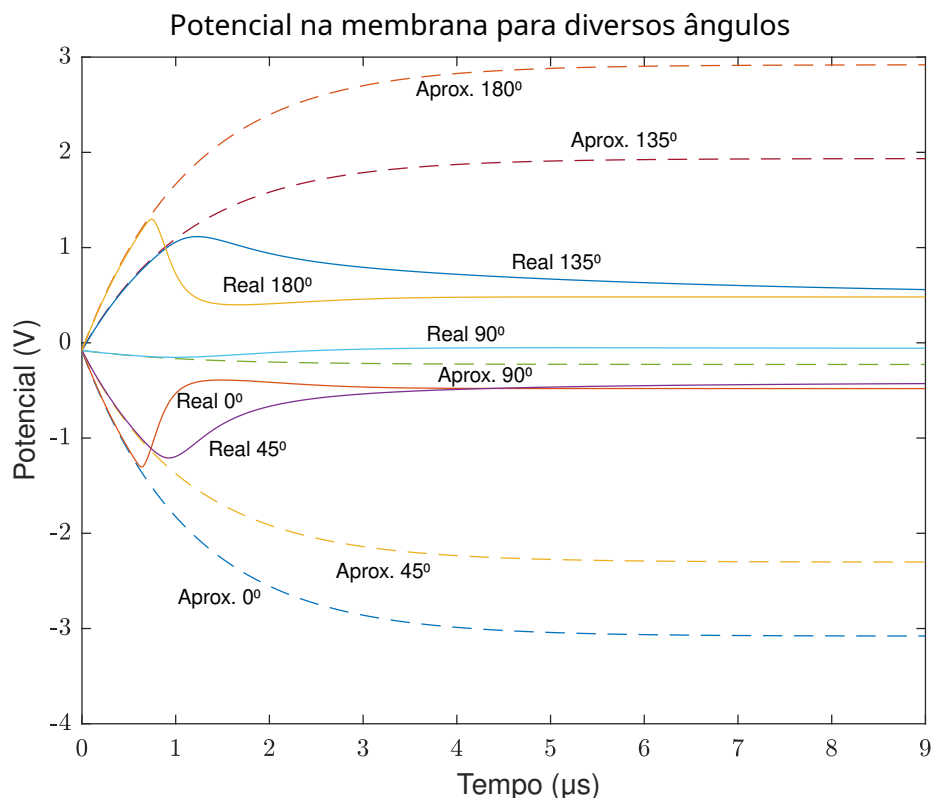


Figura 14 – Evolução do potencial através da membrana comparado à aproximação exponencial

4.2.2 Número de poros e raios dos poros

Novamente, por simplicidade esta etapa foi verificada apenas para o caso de teste 1. O primeiro poro surge em $0,49\mu\text{s}$ e a fase de criação de poros vai até aproximadamente $1,75\mu\text{s}$. A divisão com maior número de poros, correspondente a 0° , contém 10213 poros. A Figura 15 mostra a evolução do número de poros em cada divisão da membrana. Observa-se que a grande maioria (ou mesmo totalidade) dos poros surge em um pequeno intervalo de tempo, com duração de alguns microssegundos, seguido por um estágio de evolução dos poros existentes durante o qual novos poros não são criados.

A Figura 16 mostra a evolução do raio dos poros, através do raio do maior poro naquela divisão da membrana em um dado instante de tempo. Observa-se que, embora os poros aumentem mais rapidamente nos polos da célula, eventualmente o menor potencial de estado estacionário faz com que este crescimento seja ultrapassado pelo dos poros nas regiões intermediárias (ao se aproximar de 90° o potencial se torna pequeno demais para causar o surgimento e crescimento de poros).

Especialmente, o processo de eletroporação é diferente para as divisões ao longo da membrana, como pode ser visto na Figura 17. Devido ao alinhamento com a direção do pulso aplicado, o potencial aumenta e atinge rapidamente o limiar (V_{ep}) nas regiões em torno dos polos $\theta = 0^\circ$ e $\theta = 180^\circ$. Isto causa a criação de um número muito grande

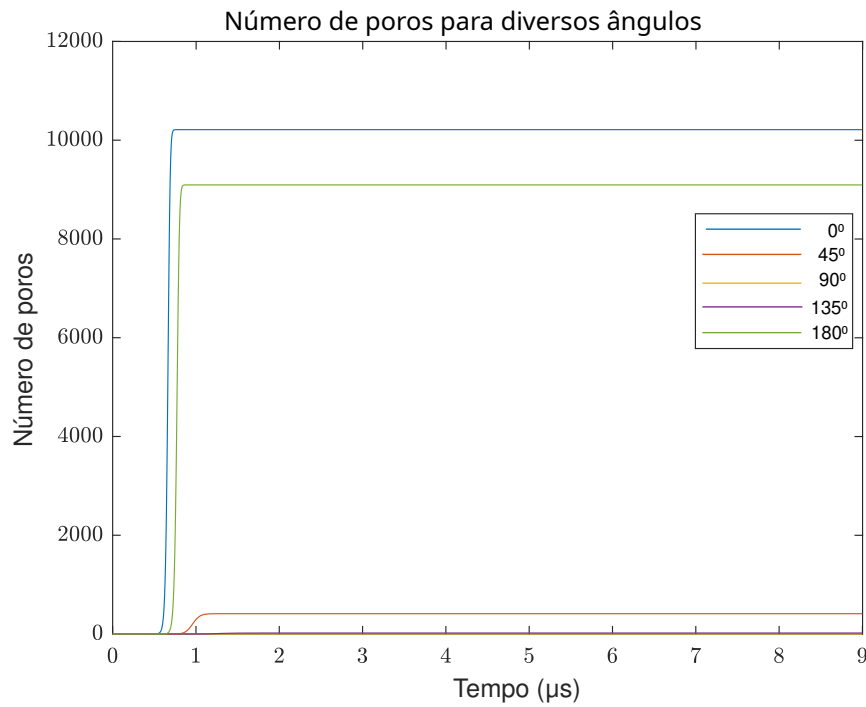


Figura 15 – Número de poros ao longo do tempo para várias posições na célula

de poros nessas regiões, como pode ser visto na [Figura 17](#). Os maiores poros surgem em $\theta = 129,9^\circ$ e sua vizinhança, e na outra metade da célula tem seu pico em $53,44^\circ$. Essas regiões tem menos poros que os polos, o que causa uma redução mais lenta do potencial durante o estágio de criação dos poros e conseqüentemente resulta em um crescimento mais rápido dos poros. Na região central da membrana, entre aproximadamente $\theta = 60^\circ$ e aproximadamente $\theta = 120^\circ$, o potencial nunca atinge o limiar necessário para a criação de poros e conseqüentemente nenhum poro é criado nessa região.

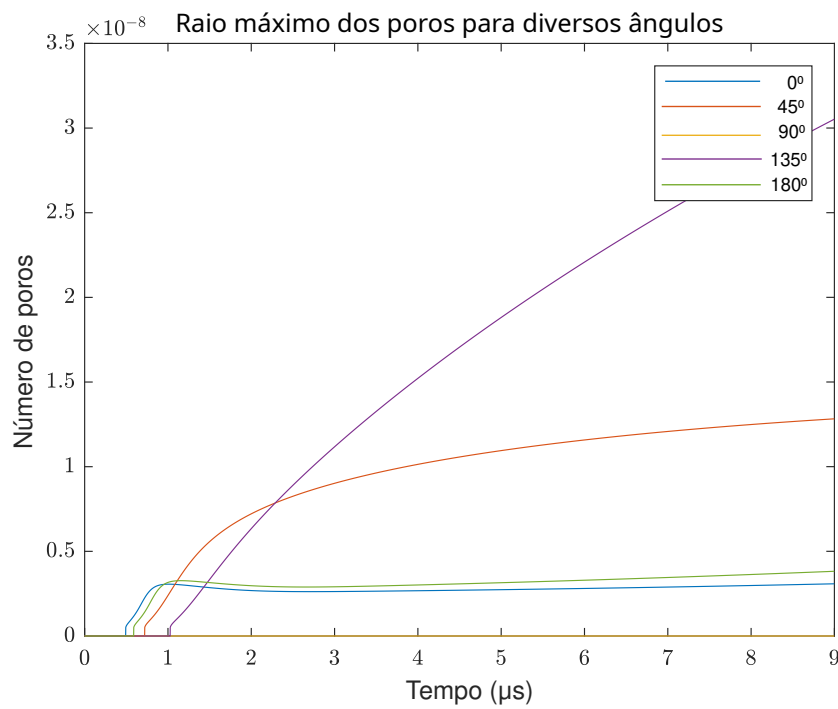


Figura 16 – Raio do maior poro em cada posição da célula, ao longo do tempo

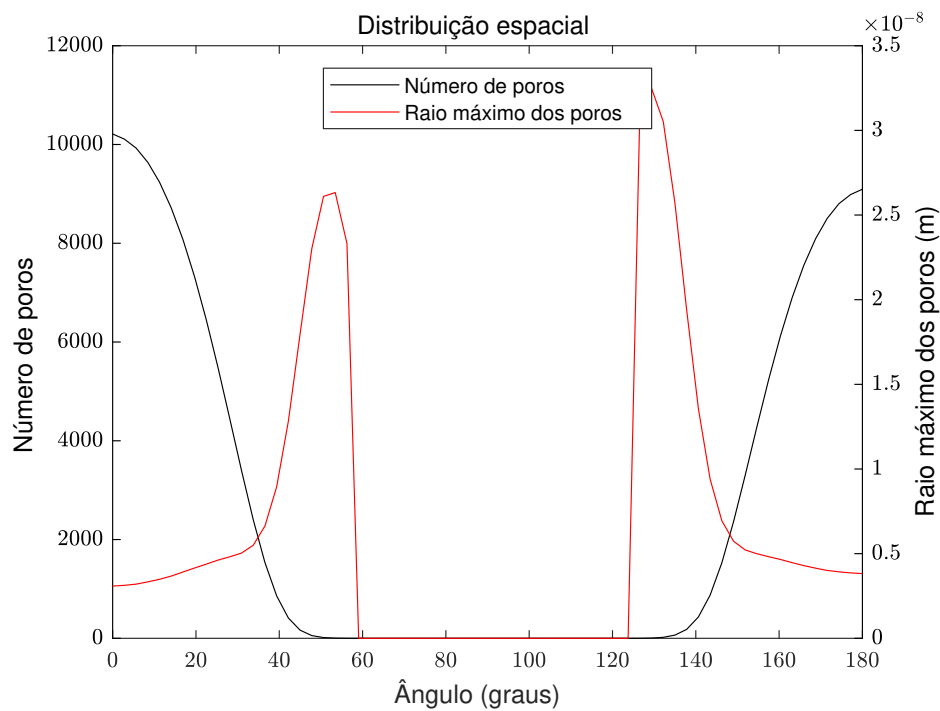


Figura 17 – Distribuição espacial do número de poros e raio máximo dos poros após 9 μs . Dados obtidos usando o método de parâmetros concentrados.

4.2.3 Estágios da eletroporação

Assim como anteriormente, esta etapa foi verificada apenas para o caso de teste 1, que apresenta um crescimento significativo dos poros. A eletroporação acontece em três

fases distintas, como pode ser visto nas Figuras 18 e 19: carregamento da membrana, criação de poros e crescimento dos poros. No primeiro estágio, a membrana ainda está intacta e se comporta principalmente como um dielétrico com perdas muito pequenas, sendo carregada pelo pulso aplicado até o valor de limiar de eletroporação de 1V. O primeiro poro é criado aos 49,45 ns, marcando o início do estágio muito rápido de formação de novos poros em que um número grande de novos poros é criado rapidamente. Todos os novos poros são criados com um raio de 0,51nm, que é o tamanho em que os poros se tornam condutores. À medida que corrente começa a ser conduzida pelos poros, o potencial cai e a criação de poros se desacelera. Após 1,75 μ s o potencial cai abaixo do limiar e a criação de poros cessa completamente, iniciando o período de crescimento dos poros em que novos poros não surgem mas os poros existentes continuam a crescer de tamanho pelo restante da simulação.

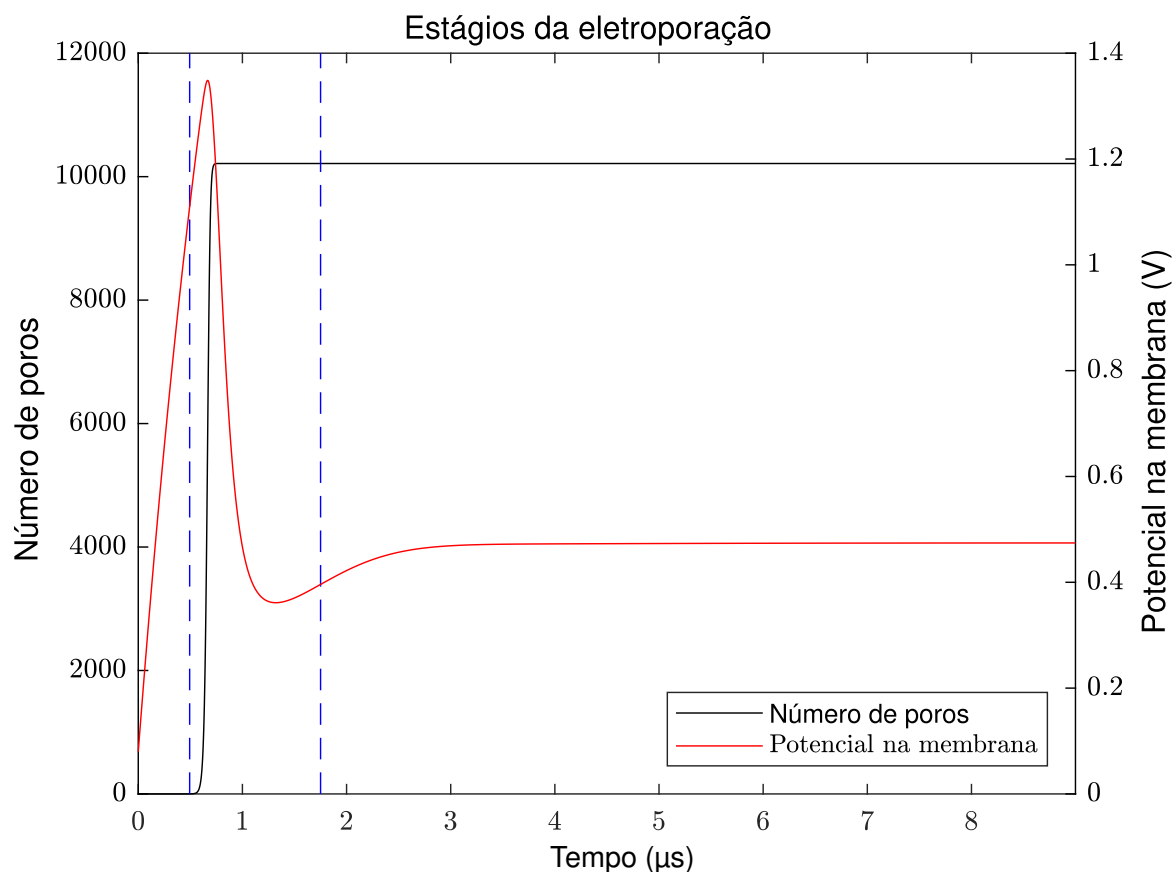


Figura 18 – Os três estágios da eletroporação, comparados com o número de poros e o potencial na membrana na divisão $\theta = 0^\circ$. Dados obtidos usando o método de parâmetros concentrados.

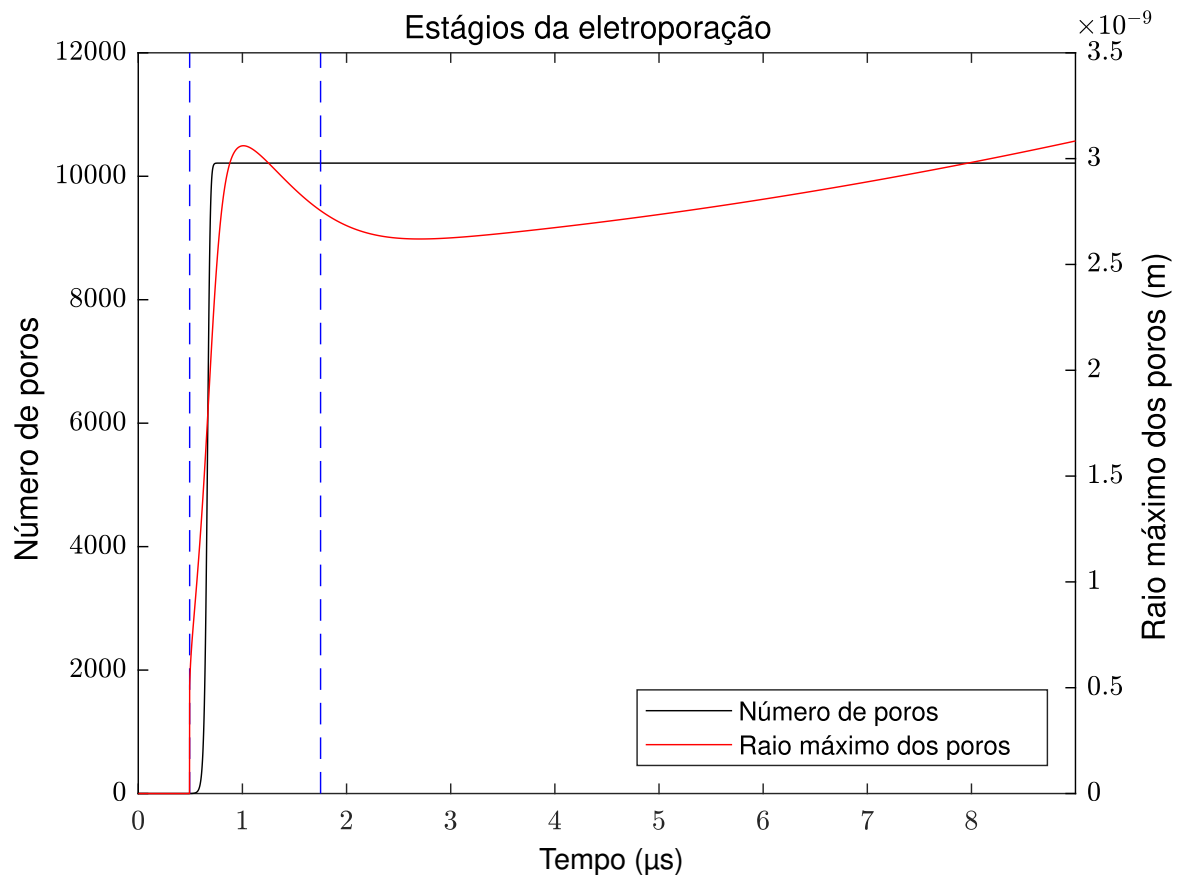


Figura 19 – Os três estágios da eletroporação, comparados com o número de poros e o raio máximo dos poros na divisão $\theta = 0^\circ$. Dados obtidos usando o método de parâmetros concentrados.

4.2.4 Validação dos resultados

Para validar a simulação desenvolvida, foram usados os resultados de [1] (caso 1) e [2] (caso 2), devido a utilizarem uma metodologia próxima à adotada neste trabalho e fornecerem resultados detalhados o suficiente para uma comparação quantitativa. Destes, o primeiro trabalho é a referência original para a aproximação assintótica e a abordagem empregada para a implementação do modelo, sendo assim extremamente próximo e apresentando resultados detalhados dos testes. O segundo, por sua vez, utiliza a simulação para complementar uma abordagem experimental, de forma que é apresentado um conjunto limitado de resultados relevantes para esta validação, além de fornecidos menos detalhes de implementação. Contudo, ainda é um dos resultados mais facilmente comparáveis encontrados na literatura.

As características da célula em cada um dos modelos estão apresentadas na Tabela 3, reproduzida aqui por conveniência.

Tabela 6 – Parâmetros do modelo

Parâmetro	Significado Físico	Valor de [1]	Valor de [2]
σ_c	Condutividade do citoplasma	0,455 S/m	1,31 S/m
σ_o	Condutividade do meio externo	5 S/m	1 S/m
ϵ_o	Permissividade do meio externo	$6,4 \times 10^{-10}$ F/m	$7,1 \times 10^{-10}$ F/m
ϵ_c	Permissividade do citoplasma	$6,4 \times 10^{-10}$ F/m	$5,3 \times 10^{-10}$ F/m
σ_m	Condutividade da membrana	10×10^{-9} S/m	$5,6 \times 10^{-5}$ S/m
ϵ_m	Permissividade da membrana	5×10^{-11} F/m	$1,1 \times 10^{-10}$ F/m
R_1	Raio externo da célula	50 μm	3,307 μm
R_2	Raio interno da célula	49,995 μm	3,3 μm

Fonte: Valores dos parâmetros obtidos de [1] e [2]

4.2.4.1 Comparação com o trabalho de W. Krassowska e P. D. Filev

A Figura 13 e Figura 15 são equivalentes à Figura 2(A) e 2(B) de [1], reproduzidas na Figura 20, embora os pontos escolhidos não sejam exatamente os mesmos. A figura Figura 16 é qualitativamente similar à Figura 2(D), embora a escala de tempo seja diferente.

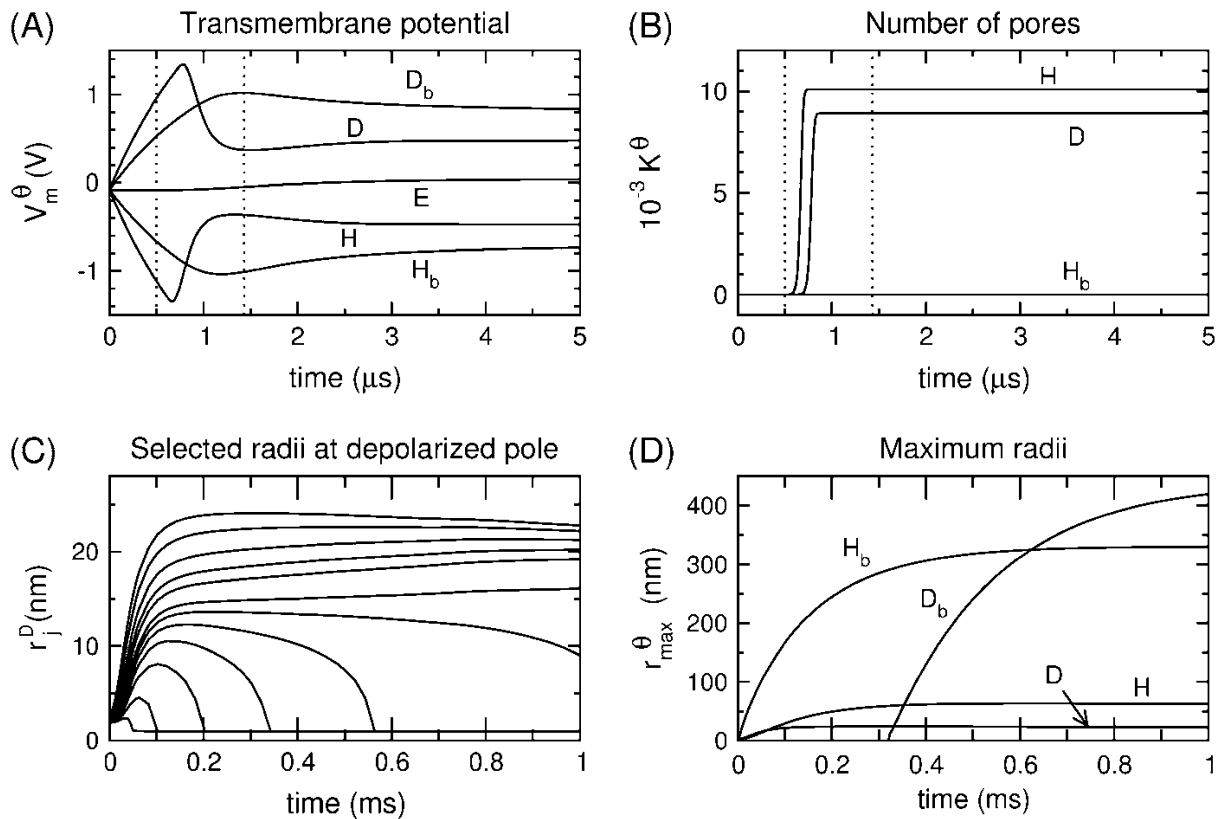


Figura 20 – Figura 2 de [1]

Na referência, além dos polos e do ponto ortogonal a estes, foram escolhidos poros representando "o limite da região eletroporada" (D_b e H_b) ao invés de escolher pontos

regularmente espaçados, conforme a Figura 21.

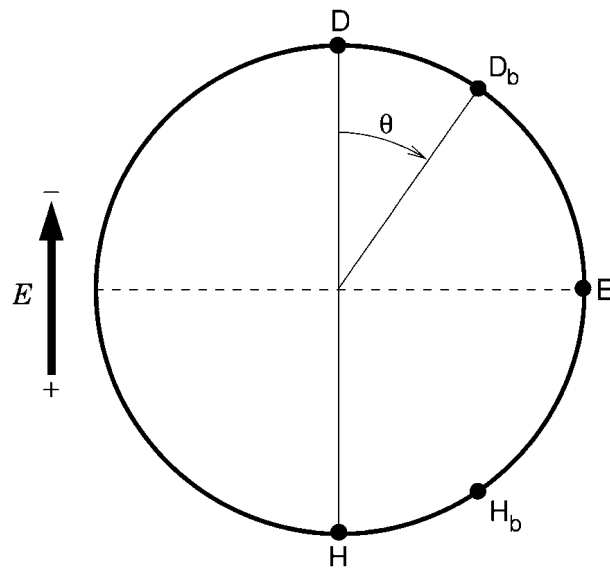


Figura 21 – Figura 1 de [1], descrevendo os pontos amostrados

Em [1], a fase de surgimento (nucleação) de novos poros vai de $0,51\mu\text{s}$ a $1,43\mu\text{s}$, com pouquíssimos poros surgindo posteriormente. Ao final desse intervalo, nenhum poro atingiu um raio superior a 5nm . Após o final da fase de nucleação, o total de poros na região hiperpolarizada ($\theta = 0^\circ$) é em torno de 10^4 poros, em torno de 9×10^3 na região despolarizada ($\theta = 180^\circ$).

Nas simulações deste trabalho, o primeiro poro surge em $0,49\mu\text{s}$ e continuam surgindo novos poros até aproximadamente $1,75\mu\text{s}$, com o primeiro poro atingindo $6,51\text{ns}$ nesse instante; após $1,43\mu\text{s}$, o maior poro possui raio de $5,25\text{nm}$. Na região hiperpolarizada o total de poros formados é 10213 , na região despolarizada é 9094 .

Estes valores são muito próximos, com as pequenas discrepâncias facilmente atribuídas a pequenas diferenças de implementação ou critérios para análise dos dados. Por exemplo, o surgimento do primeiro poro em [1] é calculado a partir de uma aproximação exponencial; apenas após o surgimento deste poro é utilizada a formulação completa, para reduzir o custo computacional. Na simulação não é utilizada esta aproximação, o que pode causar pequenas variações.

Também são adotados critérios diferentes para determinar o final do processo de surgimento dos poros. Em [1] avalia-se quando a criação relativa de poros é menor que 10^{-6} . Contudo, na simulação não foi possível aplicar este critério com sucesso para comparação porque o aumento no número de poros não é perfeitamente uniforme e o aumento relativo apresenta mínimos locais em diversos pontos. Assim, apenas verificou-se o instante em que surgiu o último poro nas divisões da membrana que foram amostradas.

A Tabela 7 sumariza os valores quantitativos descritos anteriormente.

Tabela 7 – Comparação dos resultados com a referência [1]

Parâmetro	Valor simulado	Valor da referência de acordo com [1]
Início do surgimento de poros	0,49 μ s	0,51 μ s
Final do surgimento de poros	1,75 μ s	1,43 μ s
Poros na região hiperpolarizada	10213	10000
Poros na região despolarizada	9094	9000
Raio máximo após 1,43 μ s	5,25nm	5nm

Desta forma pode-se verificar que, salvo pequenas variações devido a implementações e análises separadas, os resultados obtidos são condizentes tanto qualitativa quanto quantitativamente, resultando em números similares de poros, raios de poros similares, e instantes próximos para o início e fim do processo de surgimento de poros.

4.2.4.2 Comparação com o trabalho de P. Lamberti et al

O modelo da referência foi desenvolvido no *software* comercial de elementos finitos *Comsol Multiphysics*, implementando a equação assintótica (Equação 3.20) na interface com a membrana. O caso de estudo foi o impacto de trens de pulsos no processo de eletroporação, observando o efeito amortecido de pulsos sucessivos (de acordo com a frequência dos pulsos), com a simulação numérica complementando experimentos práticos. É de interesse notar que nesta referência foi adotado o modelo de corrente por fluxo de íons, ao contrário de [1] em que é empregado o modelo de parâmetros concentrados, então esta é a aproximação utilizada para comparação.

Embora tenham sido utilizados trens de pulsos, foram apresentados também os resultados do primeiro pulso, que são equivalentes à simulação de apenas um pulso. O pulso utilizado foi um pulso trapezoidal de 50ns (com 5ns de subida e de descida), muito mais rápido do que os utilizados em [1] (9 μ s); por este motivo, é ignorado o crescimento dos poros, assumindo que eles possuem um raio fixo de 0,76nm. A intensidade do pulso aplicado é de 1,3MV/m.

A geometria do modelo é descrita pela Figura 22. Como pode ser observado, foi utilizada uma célula esférica e isolada, com o potencial aplicado entre duas placas paralelas, assim como o adotado neste trabalho. Embora o modelo inclua o núcleo celular, os resultados são apresentados apenas para a membrana externa e para comparação é ignorada esta parte do modelo, considerando o interior da célula como citoplasma uniforme.

Embora a geometria seja equivalente, os valores para as propriedades (apresentados na Tabela 3) são bastante distintos. Particularmente, a célula é muito menor (raio de 3,307 μ m comparado com 50 μ m) e a condutividade da membrana é várias ordens de grandeza maior (5,6 $\times 10^{-5}$ S/m comparado com 10 $\times 10^{-9}$).

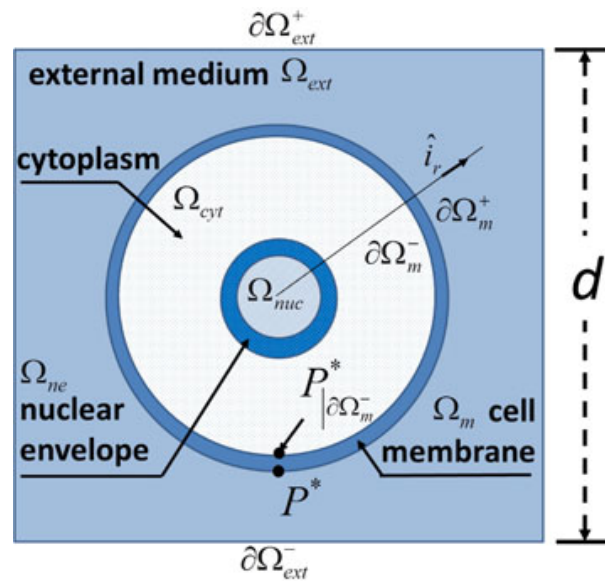


Figura 22 – Geometria da célula utilizado em [2]

Para a validação, foram alterados os parâmetros da célula conforme descrito acima. Para a discretização, foi mantido o mesmo número de divisões, de forma que $dr = 0,165\mu\text{m}$ e $d\theta = 2,8125^\circ$. É utilizado um passo de tempo de $0,025\text{ns}$, de forma que os mesmos 6000 passos simulam o intervalo desejado de 150ns . A simulação foi alterada para desconsiderar o crescimento dos poros, assumindo raio fixo de $0,76\text{nm}$, para reduzir diferenças de implementação entre os modelos.

A Figura 23 é equivalente à Figura 6(A) de [2], reproduzida na Figura 24.

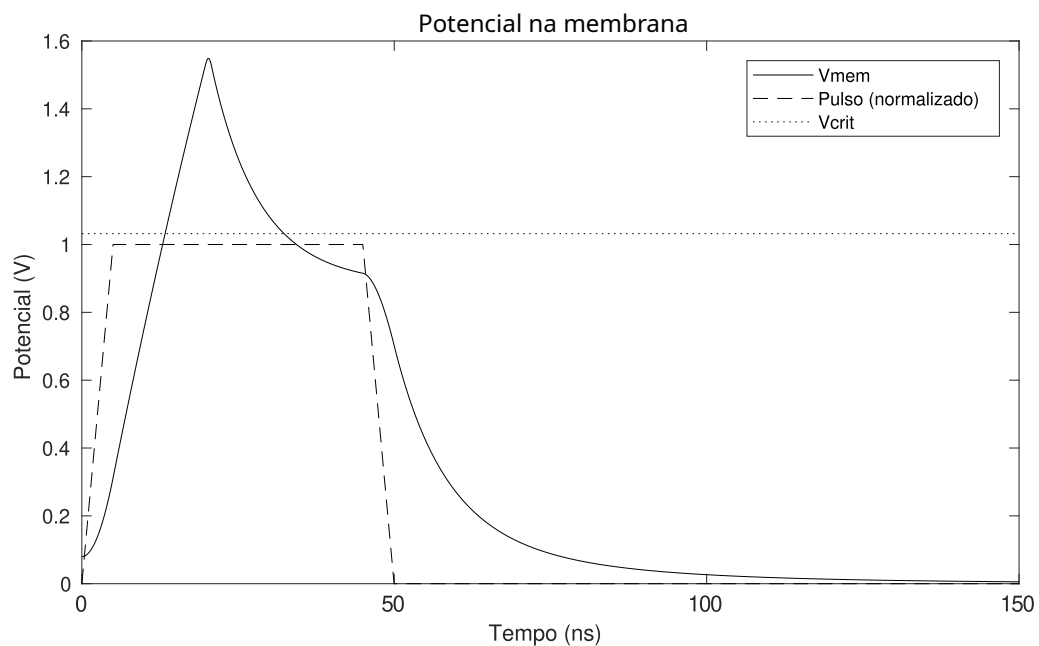


Figura 23 – Potencial na membrana para o modelo seguindo [2]

A Figura 25 é equivalente à Figura 6(B) de [2], reproduzidas na Figura 26. Note-

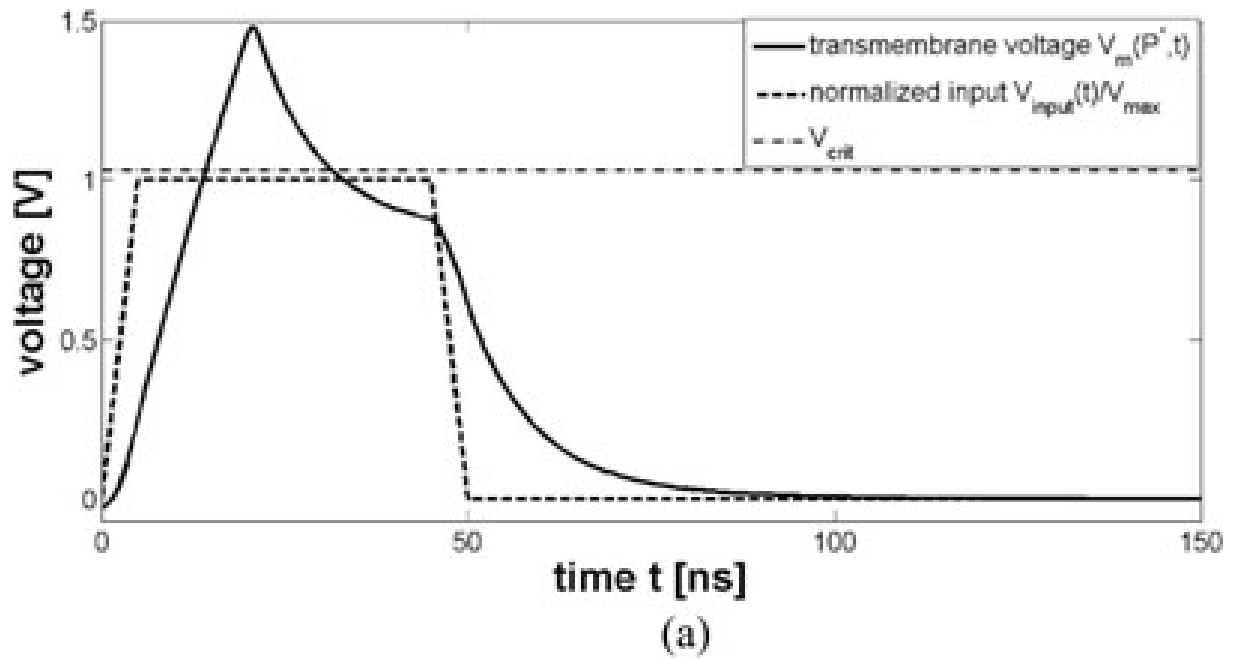


Figura 24 – Figura 6A de [2]

se primeiramente no lugar do número absoluto de poros é utilizada a densidade de poros $N(t)$, expressa em poros/ m^2 . Em segundo lugar, diferente das outras figuras neste trabalho, utiliza-se uma escala logarítmica para a ordenada. Ambas as escolhas foram feitas para facilitar a comparação com a referência.

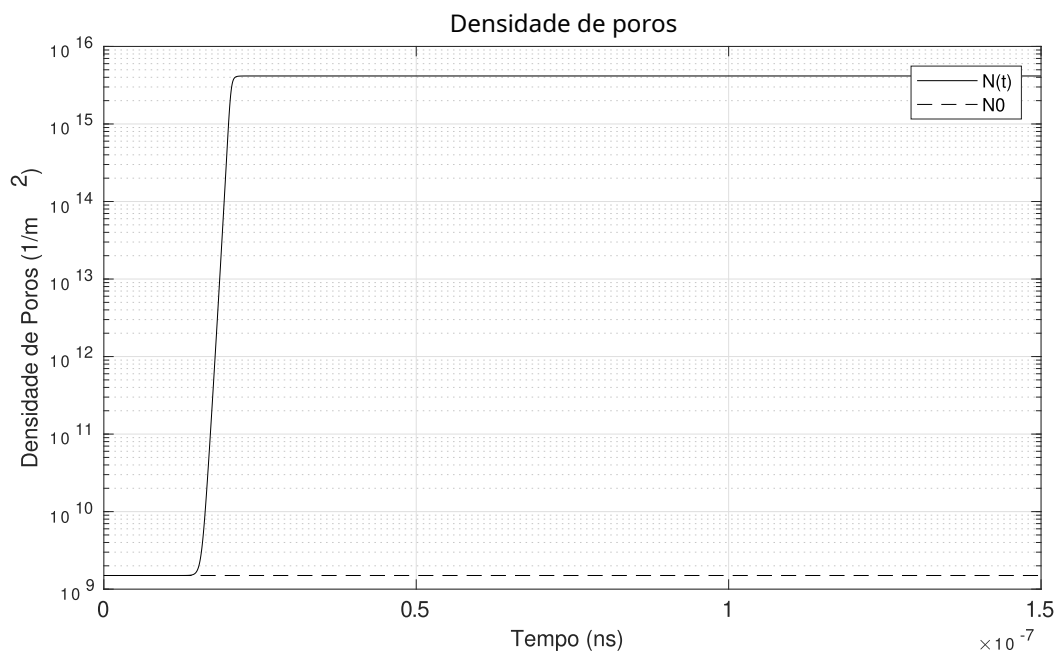


Figura 25 – Densidade de poros para o modelo seguindo [2]

De acordo com a Figura 24 (não são fornecidos valores no texto), V_{mem} atinge a tensão crítica de 1,032V aproximadamente aos 14ns, enquanto nos testes realizados isto

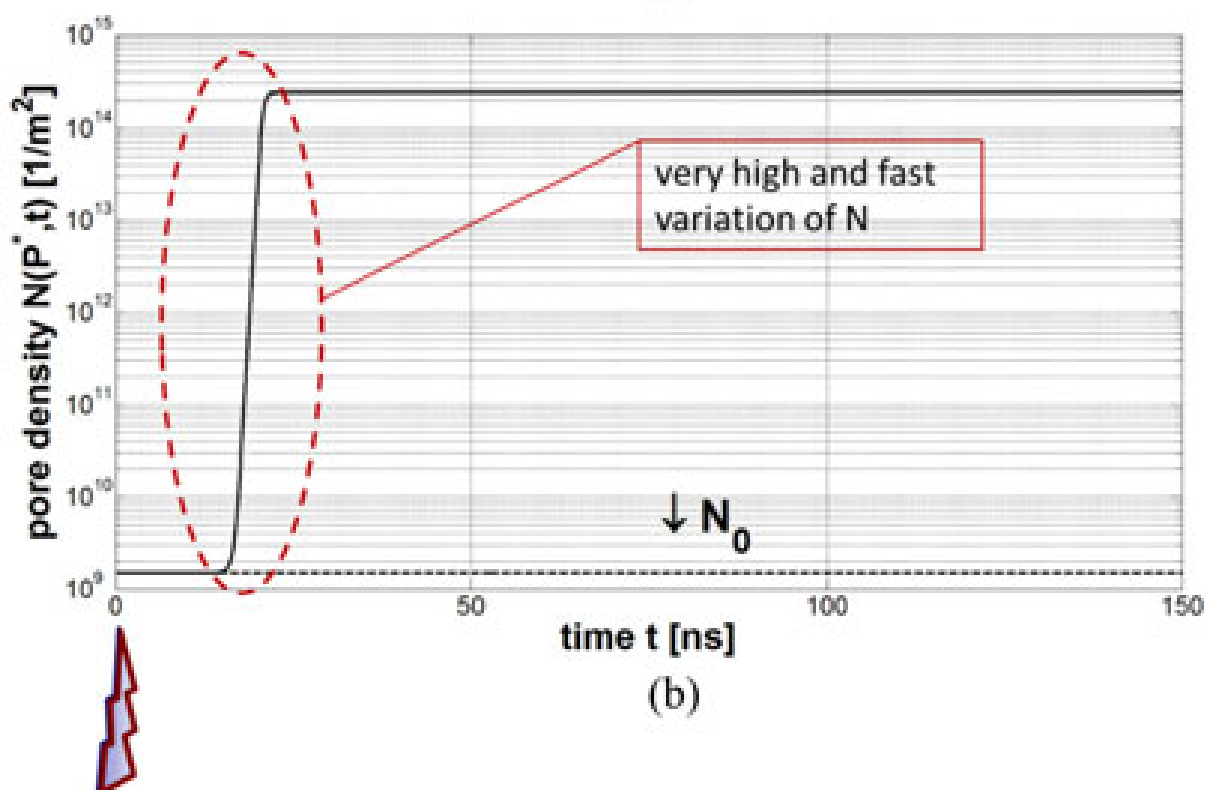


Figura 26 – Figura 6B de [2]

ocorre aos 13,33ns. A densidade de poros reportada é de aproximadamente $1,25 \times 10^{14}$, enquanto a obtida nos testes é de $4,16 \times 10^{15}$.

Qualitativamente, os resultados são muito próximos, exibindo os comportamentos típicos da eletroporação: carregamento do potencial até aproximadamente 1,5 vezes o valor do pulso aplicado, uma etapa rápida de surgimento de poros com queda do potencial, e eventual estabilização do potencial. Quantitativamente, o potencial parece atingir um pico ligeiramente mais elevado (1,549V no lugar de 1,5V, uma diferença de 3.25%). A densidade de poros obtida é em torno de 33 vezes maior que a referência, consideravelmente discrepante; contudo, uma diferença de ordens de magnitude não é inesperada dada a natureza exponencial da grandeza (menos de duas ordens de grandeza, comparadas com as 14 ordens de grandeza da variação). Em termos de número de poros, estas densidades equivaleriam a aproximadamente 134 poros e 4466 poros, respectivamente, para o tamanho da divisão utilizada na simulação; o valor da referência é bastante pequeno considerando o caso de teste anterior, em que surgiam em torno de 10000 poros. As diferenças de potencial e densidade de poros foram coerentes: um maior pico de potencial levou ao surgimento de mais poros antes da estabilização.

É possível que estas discrepâncias sejam devido a diferenças de implementação, tendo sido utilizados métodos numéricos distintos (FDTD e FEM) com diferentes discretizações. Além disto, o modelo construído na referência inclui a presença do núcleo,

e embora seu efeito tenha sido assumido desprezível essa suposição pode não ser completamente correta. Sem maiores detalhes sobre a simulação de [2], é difícil atribuir com certeza as diferenças quantitativas a uma causa específica. Contudo, embora os resultados não tenham concordado quantitativamente, a comparação qualitativa e a diferença relativamente pequena (considerando o crescimento exponencial) entre os resultados permitem uma validação parcial do modelo.

4.3 Comparação dos métodos para o cálculo das correntes

A simulação desenvolvida foi utilizada para testes utilizando as duas abordagens apresentadas na seção 3.6. Foram simulados dois casos de teste: o primeiro utiliza a célula e pulso obtidos de [1], e o segundo utiliza a célula e pulso obtidos de [2]. Note-se que diferente da subseção 4.2.4.2, não foi assumido um tamanho fixo dos poros, como será discutido na subseção 4.3.4. As principais características de cada caso estão sumarizados na Tabela 8:

Tabela 8 – Sumário dos casos de teste

Parâmetro	Caso de teste 1	Caso de teste 2
Raio da célula	50 μm	3,307 μm
Condutividade da membrana	10×10^{-9} S/m	$5,6 \times 10^{-5}$ S/m
Duração do pulso	6 μs	50 ns
Intensidade do pulso	40 kV/m	1,3 MV/m
Forma do pulso	Retangular	Trapezoidal

Os resultados obtidos são apresentados a seguir, com comparações tanto do potencial na membrana quanto no número e raio dos poros gerados.

4.3.1 Potencial através da membrana

A simulação para ambas as aproximações resultou em potenciais e densidades de correntes qualitativamente similares mas quantitativamente distintos. A variação temporal dessas grandezas pode ser vista nas Figuras 27 e 28 (potencial) e nas Figuras 29 e 30 (corrente). Estas figuras foram obtidas para uma única divisão angular em $\theta = 0^\circ$ e truncadas após 2 μs (caso de teste 1) e 50 ns (caso de teste 2) para melhor visualização dos fenômenos relevantes. A variação espacial do potencial pode ser vista nas Figuras 31 e 32, obtidas no instante final simulado (2 μs) e no início da queda do pulso aplicado (40ns) respectivamente.

As Figuras 27 e 28 mostram que o potencial na membrana atinge aproximadamente o mesmo valor de pico para as aproximações. A aproximação de parâmetros concentrados

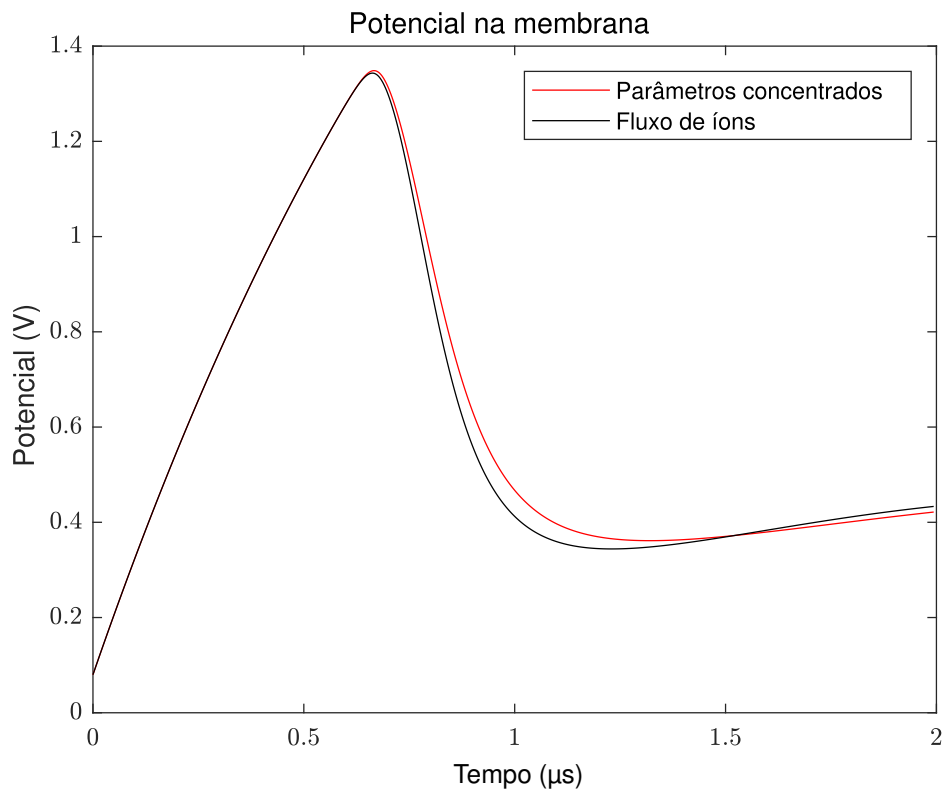


Figura 27 – Comparação de V_m com diferentes métodos para a divisão $\theta = 0^\circ$, para o caso de teste 1

resulta em um potencial maior, mas por menos do que 0,5% no caso 1 e 0,2% no caso 2. No entanto, a aproximação de fluxo iônico resulta em uma queda perceptivelmente mais rápida, em especial para o caso 1. Para o caso 1 isto é refletido pela queda igualmente mais rápida na corrente como visto na [Figura 29](#), mas no caso 2 a diferença vista na [Figura 30](#) é desprezível. Esta queda de potencial mais rápida tem impacto na taxa de criação de poros e eventual final do estágio de criação de poros.

No caso 1, Para $\theta = 0^\circ$ o potencial se estabiliza em aprox. 0,474V para parâmetros concentrados e 0,468V (em 6,622 μ s) para o fluxo iônico, diferença de aprox. 1,1% que, como será visto, afeta o estágio de crescimento dos poros. No caso 2, o pulso termina antes que ocorra a estabilização completa, mas em 40 ns (quando o pulso começa a decair) a aproximação de parâmetros concentrados atinge 0,951V e a de fluxo de íons atinge 0,942V, diferença de aprox. 0,96%.

Como pode ser visto na [Figura 31](#), para o caso 1 o valor no equilíbrio varia significativamente para diferentes divisões mas a abordagem de parâmetros concentrados resulta em valores maiores ao longo de quase toda a membrana. Contudo, para o caso 2 a diferença entre as duas abordagens é desprezível, indicando que após a etapa de criação de poros ambas as abordagens atingiram um valor estacionário muito próximo ao longo de toda a célula.

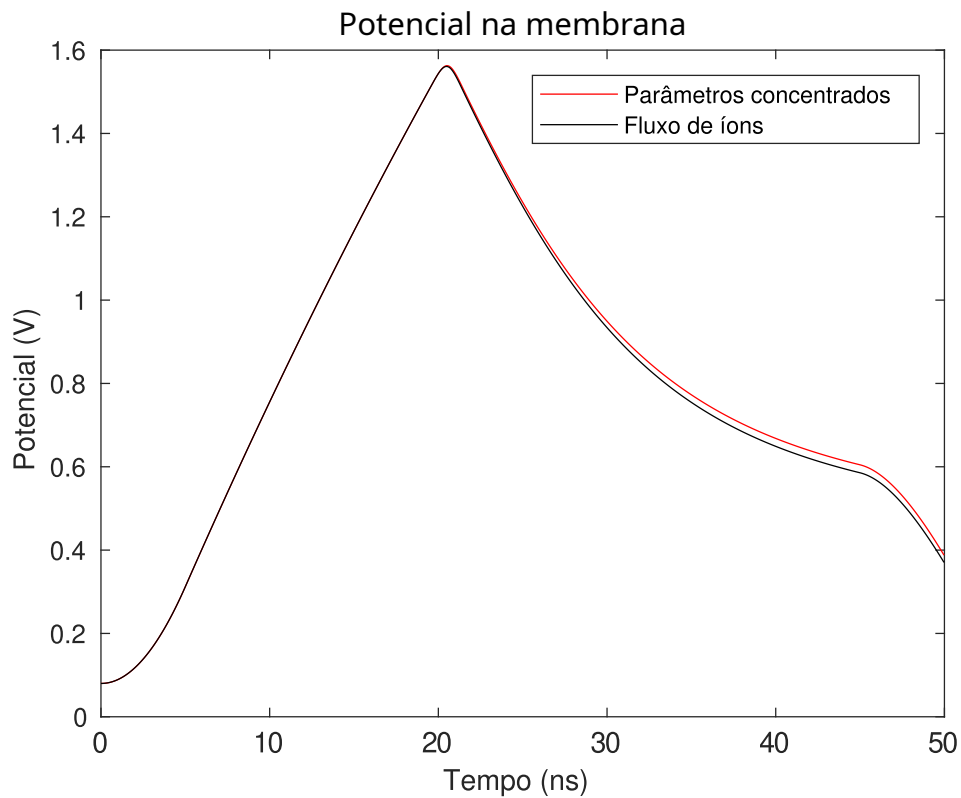


Figura 28 – Comparação de V_m com diferentes métodos para a divisão $\theta = 0^\circ$, para o caso de teste 2

Como pode ser facilmente visto na [Figura 29](#), para o caso 1 a aproximação de fluxo iônico resulta em um pico muito maior na densidade de corrente ($77,91 \text{ kA/m}^2$) do que a outra ($72,11 \text{ kA/m}^2$). Nos estágios iniciais a diferença entre as duas é proporcionalmente muito maior, até 23,1%, diminuindo após aproximadamente 600ns. A corrente de fluxo iônico também atinge seu pico e começa a cair antes. Para ambos os casos, após uma pequena oscilação a corrente em grande parte estabiliza com menos de 0,1% de diferença entre as aproximações após 4,143 μs . Contudo, a mesma diferença não é observada para o caso 2.

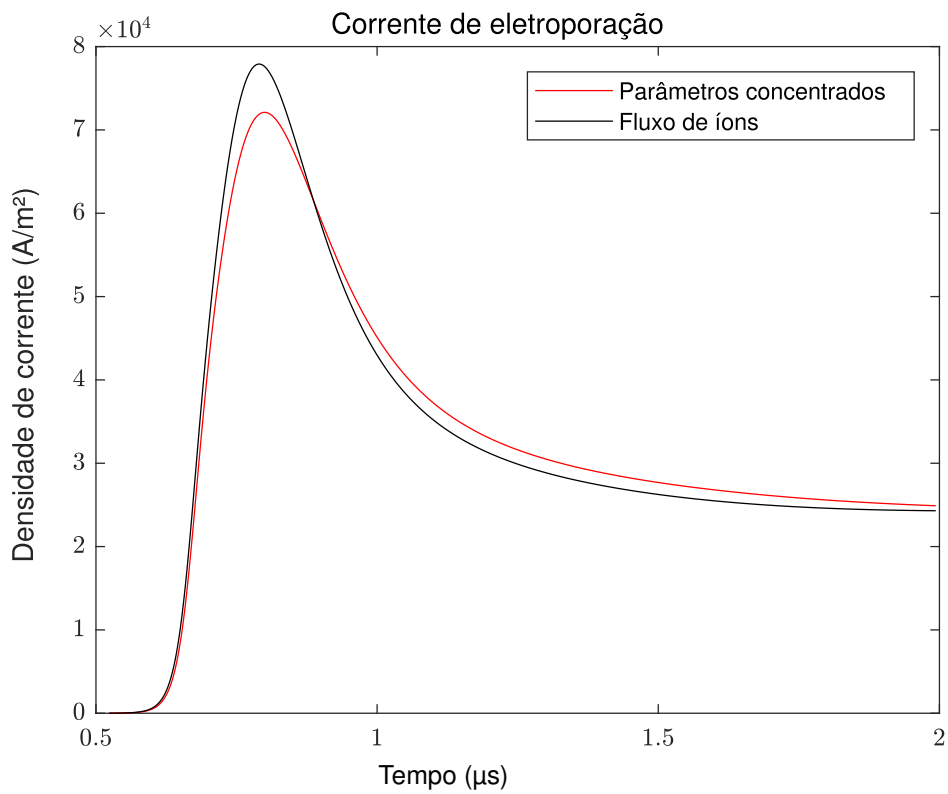


Figura 29 – Comparação de I_p com diferentes métodos para a divisão $\theta = 0^\circ$, para o caso de teste 1

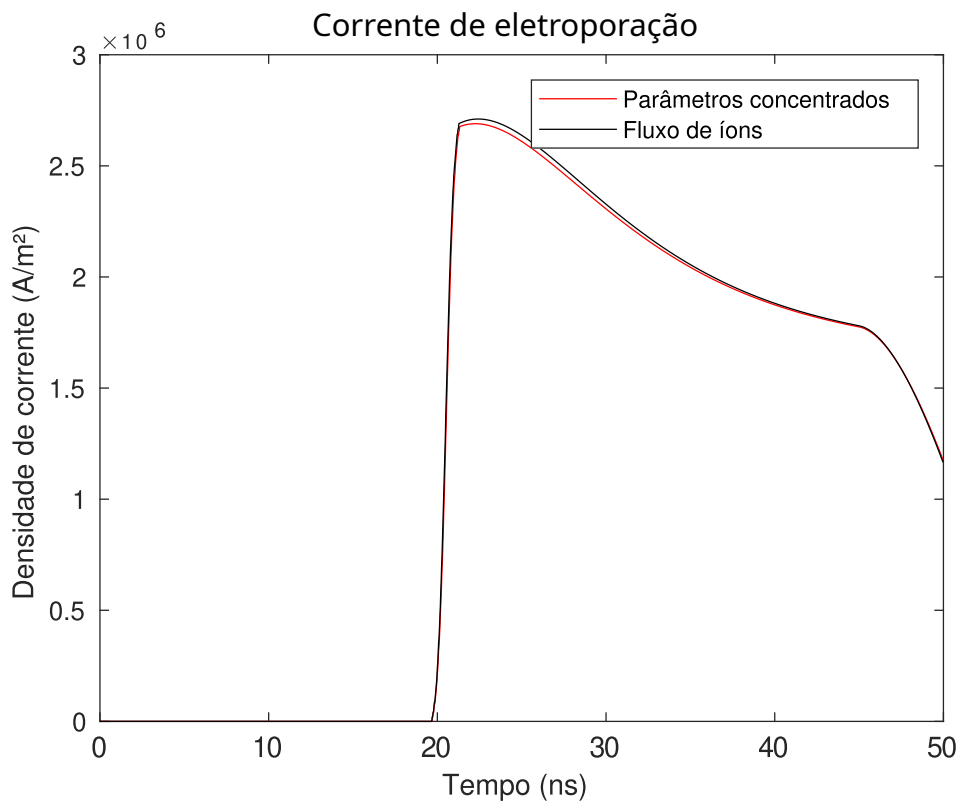


Figura 30 – Comparação de I_p com diferentes métodos para a divisão $\theta = 0^\circ$, para o caso de teste 2

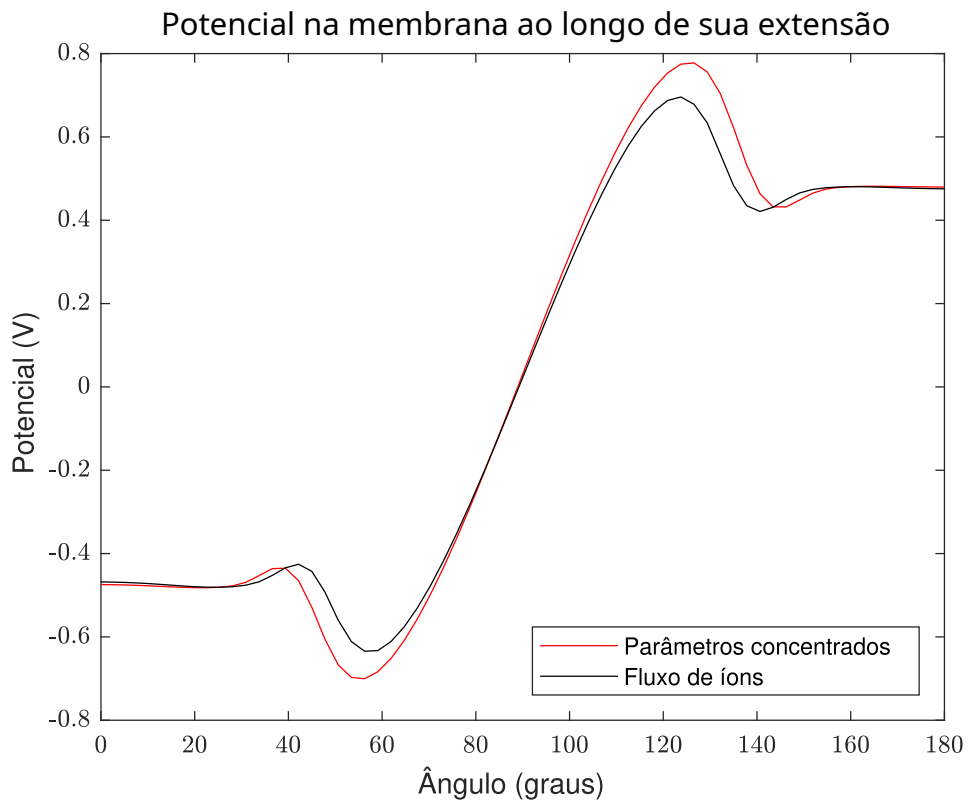


Figura 31 – Potencial através da membrana ao longo de sua extensão após 9 μ s, para o caso de teste 1

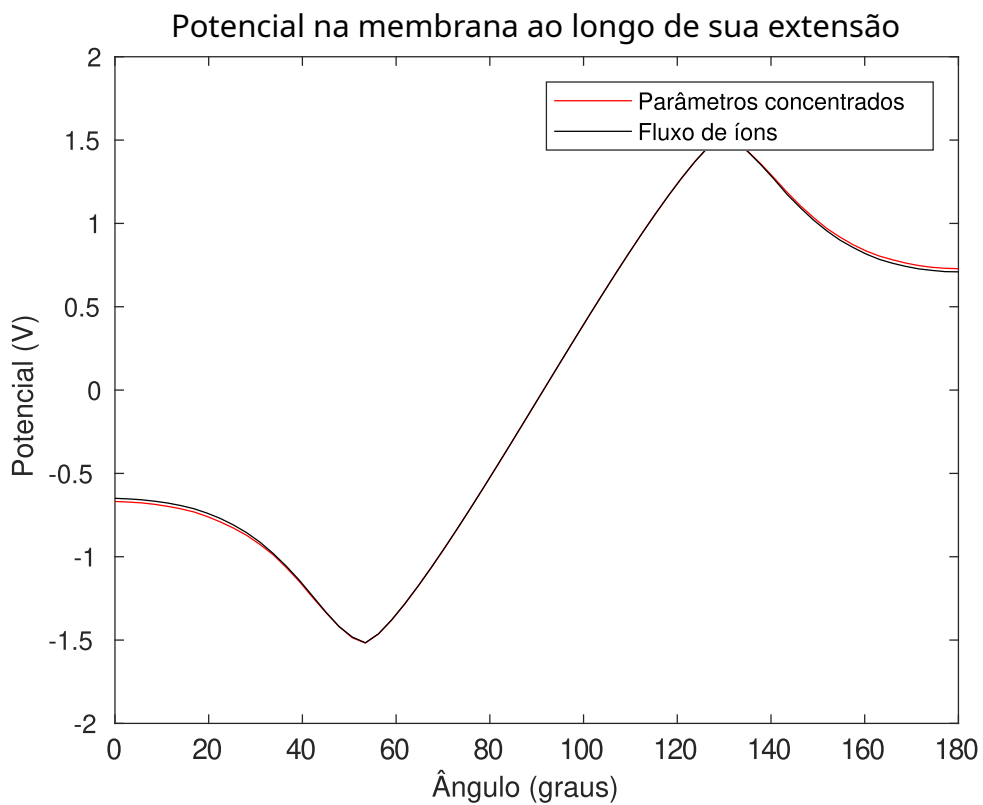


Figura 32 – Potencial através da membrana ao longo de sua extensão após 40ns, para o caso de teste 2

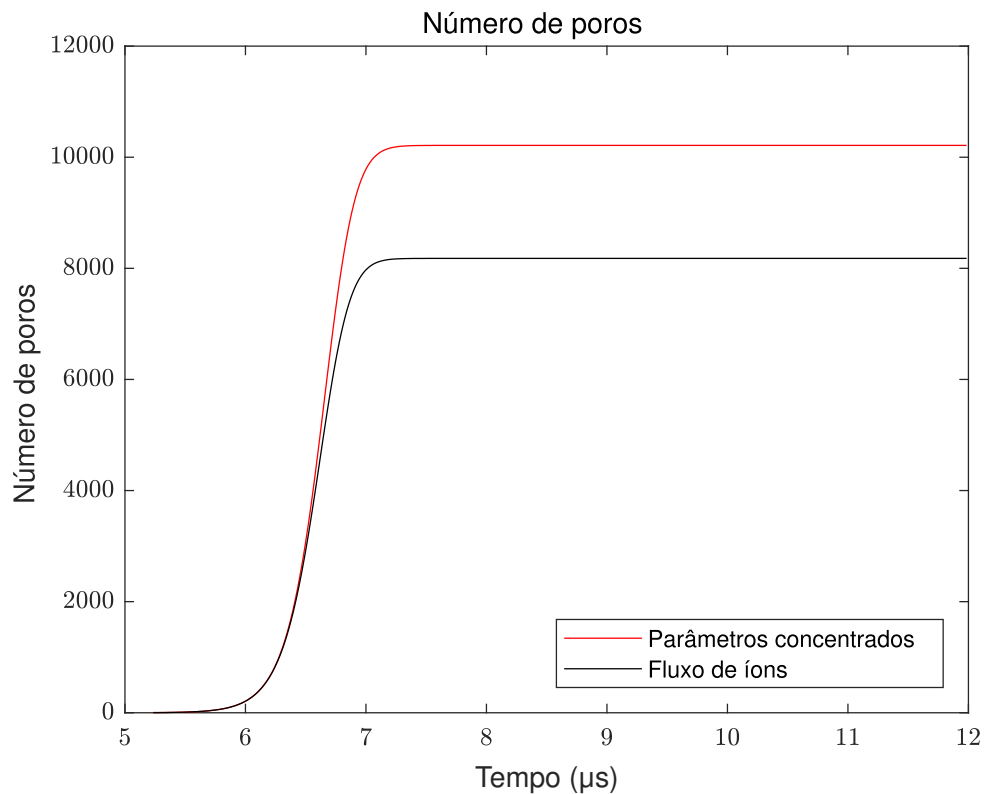


Figura 33 – Número de poros de todos os tamanhos para a divisão $\theta = 0^\circ$, para o caso de teste 1

4.3.2 Número de poros

O número de poros criados ao longo do tempo para a divisão $\theta = 0^\circ$ pode ser visto nas Figuras 33 e 34, enquanto o número de poros criados em toda a célula pode ser visto nas Figuras 35 e 36.

É fácil ver que a abordagem de parâmetros concentrados resulta na criação de um maior número de poros para ambos os casos de teste (e em toda a extensão da célula para o caso 1, e quase toda para o caso 2), mas com o caso 2 apresentando uma diferença significativamente menor entre as abordagens.

No caso 1, para ambas as abordagens o primeiro poro surge no mesmo instante, mas a taxa de criação de poros se torna diferente após algumas centenas de poros serem criados. Ao final da criação de poros, a aproximação de parâmetros concentrados resultou na criação de 2.034 poros a mais em $\theta = 0^\circ$. A diferença total na metade simulada da célula é de 37.904.

No caso 2, o comportamento é qualitativamente distinto, o que pode ser atribuído ao pulso mais rápido, que não apresenta tempo suficiente para o crescimento dos raios dos poros; como será visto posteriormente, as divisões intermediárias que apresentam picos de número de poros normalmente apresentariam um maior crescimento dos poros, o que reduz o potencial e reduz o surgimento de novos poros. Além disto, há uma única divisão

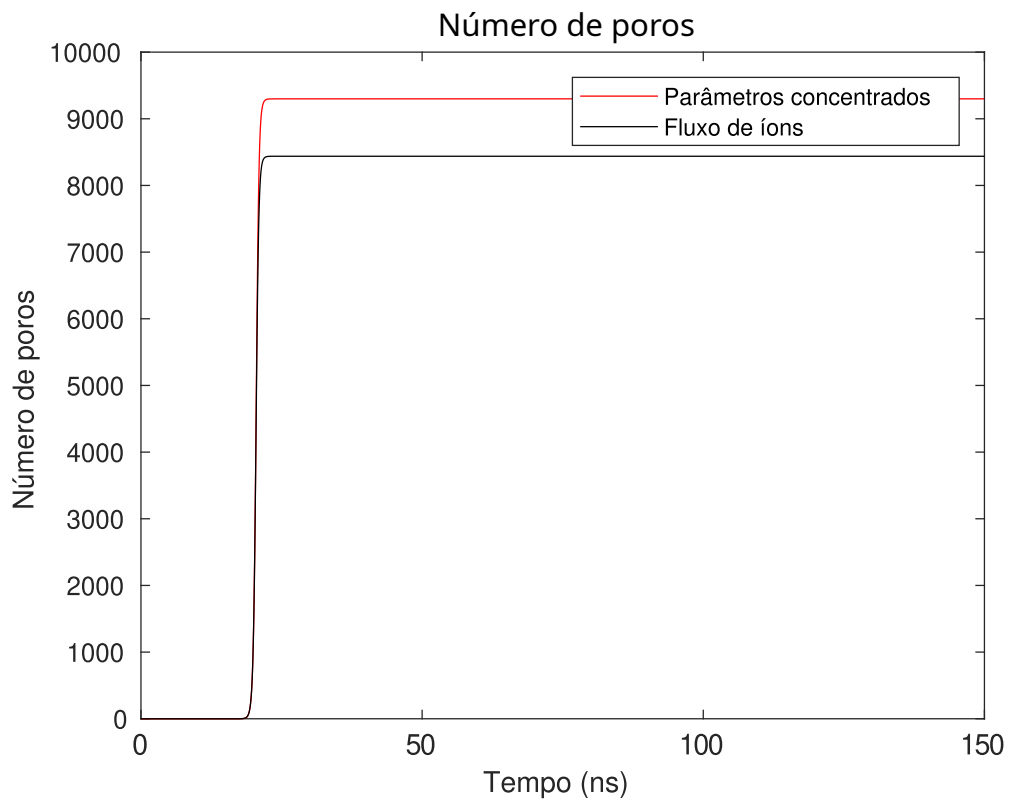


Figura 34 – Número de poros para a divisão $\theta = 0^\circ$, para o caso de teste 2

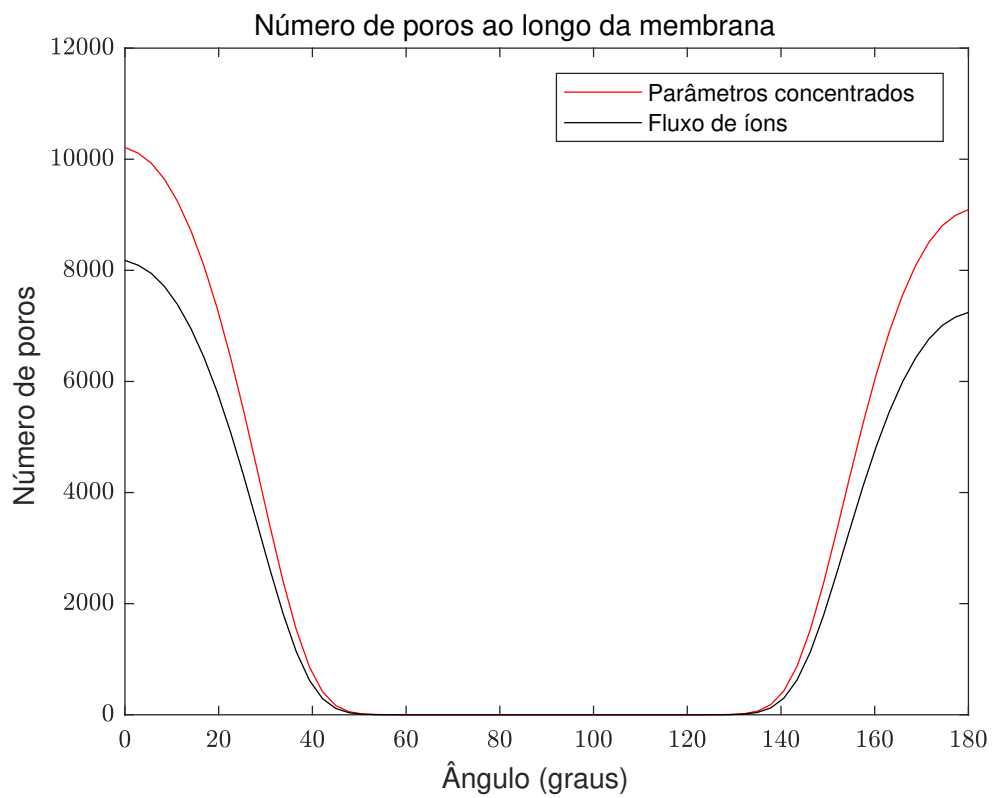


Figura 35 – Número de poros ao longo da membrana após $9\mu s$ para o caso de teste 1

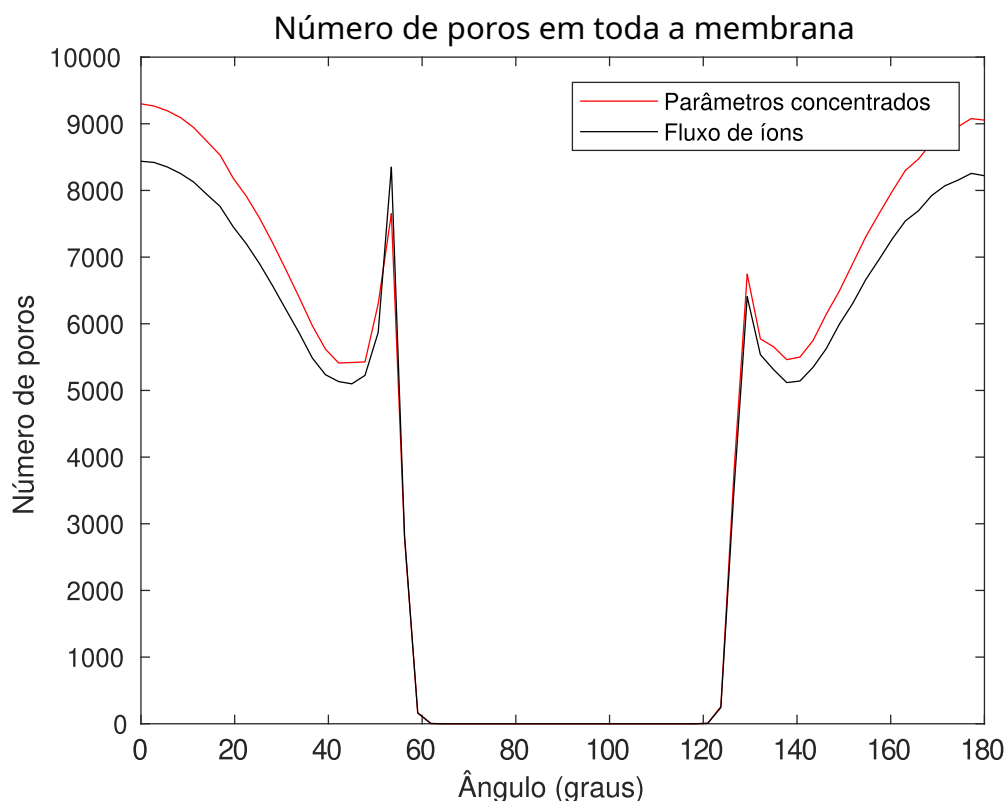


Figura 36 – Número de poros ao longo da membrana após 150ns para o caso de teste 2

em que o número de poros é maior para a aproximação de fluxo de íons. Na divisão $\theta = 0^\circ$, a diferença entre as aproximações é de apenas 861 poros; contudo, para todo o hemisfério, a diferença é de 4.448.872, um valor muito mais elevado que no caso 1. Os máximos locais de poros ocorrem em $53,44^\circ$ e $129,4^\circ$ (sendo esta a divisão anômala em que a aproximação de parâmetros concentrados resulta em menos poros), com 697 poros a menos e 338 poros a mais respectivamente. Estas observações sugerem que, embora os polos da célula ainda apresentem o maior total de poros, para pulsos mais curtos há números significativos de poros próximos aos limites da região eletroporada.

4.3.3 Raio dos poros no caso 1

O crescimento dos poros pode ser visto nas Figuras 37 e 38. A Figura 37 mostra apenas o raio máximo dos poros para a divisão $\theta = 0^\circ$ e é truncada em $5\mu\text{s}$ para melhor visualização dos estágios iniciais. A Figura 38 compara o crescimento de poros para duas divisões, $\theta = 0^\circ$ e $\theta = 45^\circ$, para os $9\mu\text{s}$ simulados. A distribuição de raios dos poros ao longo da membrana pode ser vista na Figura 39, que mostra os raios máximos para cada divisão após $9\mu\text{s}$. Note-se que apenas o caso 1 é considerado, já que o caso 2 assume poros de tamanho fixo.

Desses resultados, pode ser visto que a aproximação de parâmetros concentrados resulta não apenas em mais poros, mas também em crescimento mais rápido dos poros.

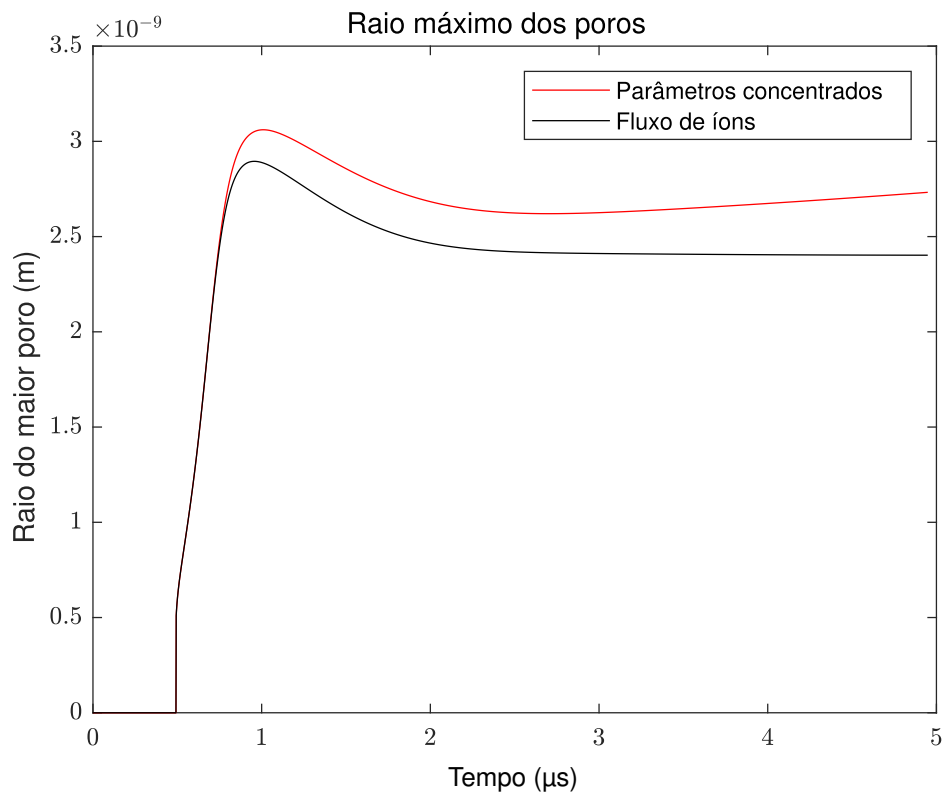


Figura 37 – Raio do maior poro para a divisão $\theta = 0^\circ$

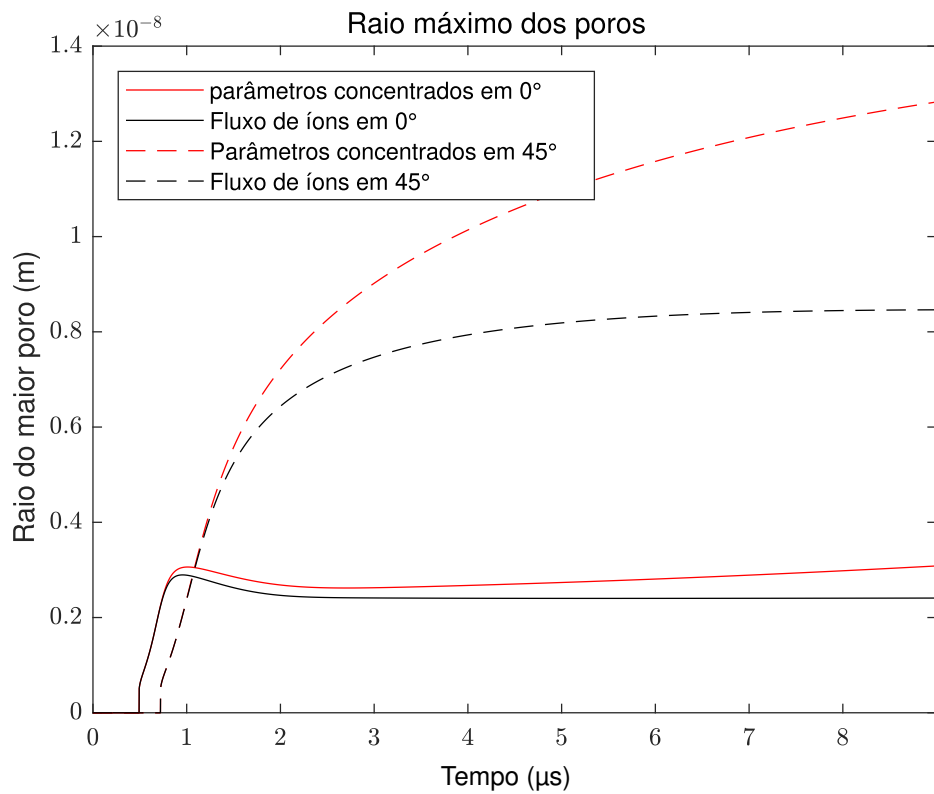


Figura 38 – Raio do maior poro para as divisões $\theta = 0^\circ$ e $\theta = 45^\circ$

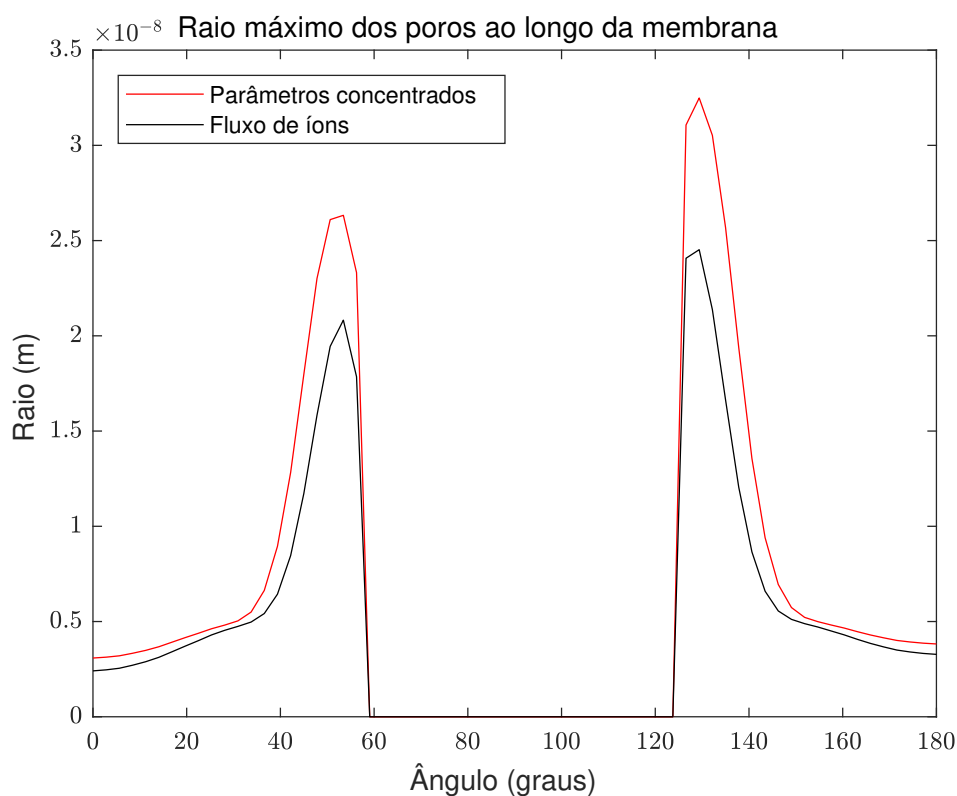


Figura 39 – Raio do maior poro ao longo da membrana após $9 \mu\text{s}$

Isto pode ser facilmente atribuído a um potencial mais alto em dois estágios: durante a criação de poros a queda de potencial acontece mais tarde, levando a um período em que a tensão é mais alta logo após a formação de muitos poros. Durante o crescimento dos poros, o potencial de equilíbrio é ligeiramente mais alto, causando um crescimento mais rápido durante um período extenso de tempo. Da mesma forma, o crescimento é mais rápido para poros próximos a $\theta = 53,44^\circ$ e $129,4^\circ$, com uma diferença progressivamente maior à medida que a simulação progride.

Deve ser notado que para a divisão $\theta = 0^\circ$ o raio dos poros tem um máximo local durante o estágio de criação dos poros, enquanto poros na divisão $\theta = 45^\circ$ crescem monotonicamente. Na primeira, o potencial aumenta muito rápido resultando em um crescimento acelerado, mas a queda súbita devido à criação de muitos poros resulta em uma pequena redução no raio.

4.3.4 Raio dos poros no caso 2

Esta comparação requer atenção especial, devido ao pequeno crescimento dos poros e a escolha entre assumir tamanho fixo dos poros ou calcular seus raios normalmente. Os raios calculados para as duas abordagens de cálculo de corrente são apresentados nas Figuras 40 e 41.

Observa-se que os poros em toda a célula apresentam valores muito próximos do

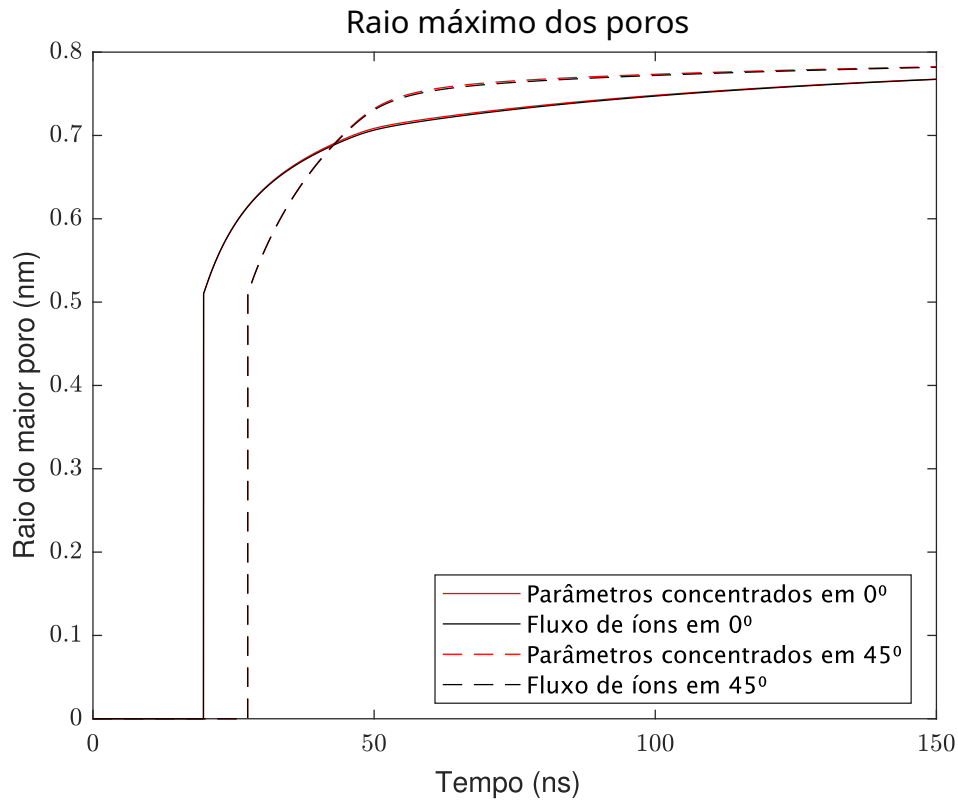


Figura 40 – Crescimento dos poros para a célula e pulso de [2]

valor fixo assumido (0,76nm), o que parece validar esta escolha de simplificação. Contudo, o tempo necessário para atingir este raio não é desprezível, e os raios menores durante a etapa rápida de criação dos poros resultam em grandes diferenças no número de poros calculados, como pode ser visto comparando a Figura 34 com a Figura 42 e a Figura 36 com a Figura 43.

Observa-se que especificamente os polos da célula apresentam número muito menor de poros (para $\theta = 0^\circ$, 5052 e 4466, comparados com 9299 e 8438 para as duas abordagens) quando o raio dos poros é assumido como fixo.

As duas abordagens para o cálculo da corrente apresentam diferenças desprezíveis quanto ao raio dos poros, em torno de 0,14%. Isto é coerente com o esperado, visto que o potencial na membrana é muito próximo para os dois casos e a duração curta não permite que quaisquer divergências na taxa de crescimento se manifestem.

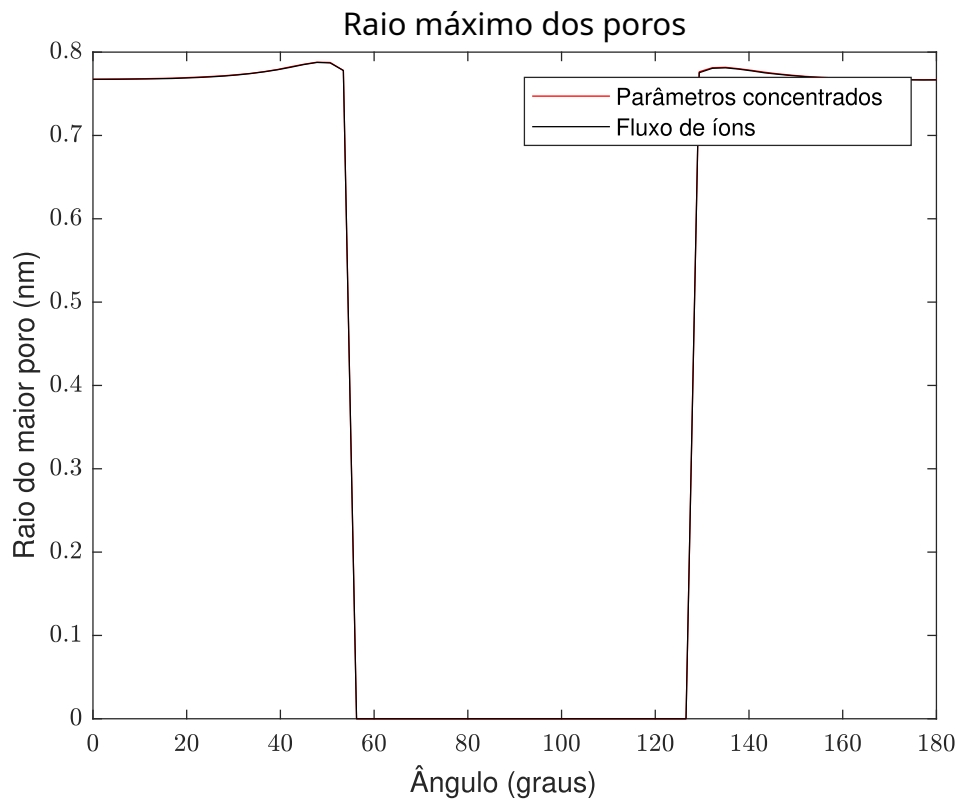


Figura 41 – Raios máximos dos poros para a célula e pulso de [2] após o final da simulação

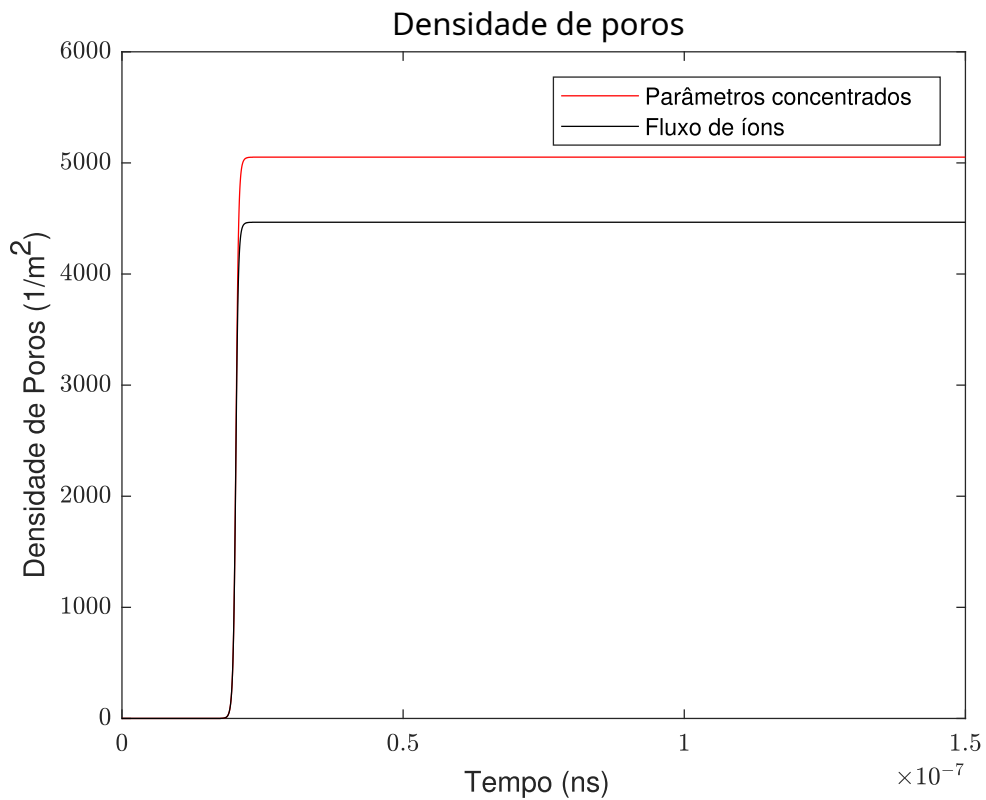


Figura 42 – Número de poros para a divisão $\theta = 0^\circ$, para o caso de teste 2 com poros de raio fixo

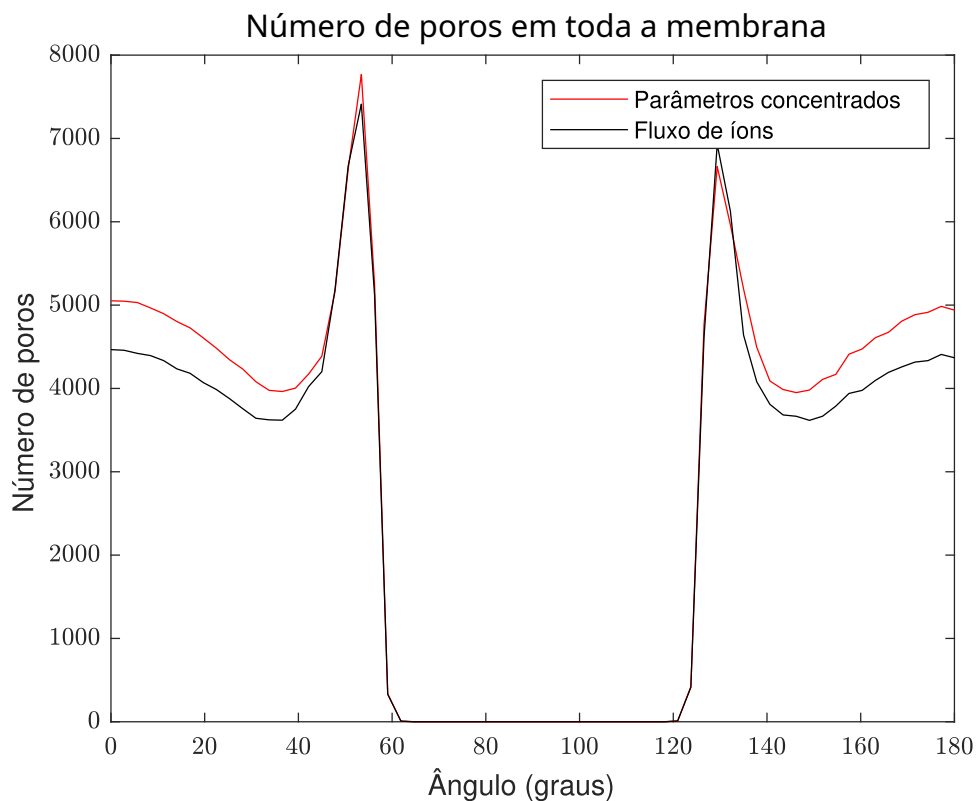


Figura 43 – Número de poros ao longo da membrana após 150ns para o caso de teste 2 com poros de raio fixo

4.3.5 Análise da diferença entre as abordagens

Pode ser deduzido que a corrente para cada poro obtida através da abordagem de fluxo de íons é significativamente menor do que a obtida por parâmetros concentrados para os estágios iniciais da eletroporação. Isto causa uma queda mais lenta no potencial através da membrana, com a membrana submetida a um potencial mais alto por um período mais longo de tempo. Isto por sua vez resulta em uma maior criação de poros e maior taxa de crescimento de poros durante o estágio curto de criação de poros.

Eventualmente, o sistema atinge um estado de quase equilíbrio, pois o sistema exibe um comportamento de "retroalimentação negativa": potencial elevado causa a formação e crescimento de poros, que por sua vez aumentam a corrente e causam a redução do potencial. Quando o potencial cai abaixo do limiar de criação de poros, novos poros param de surgir, terminando este estágio do processo. Apesar dos poros continuarem a crescer devido ao pequeno mas significativo potencial nesse equilíbrio, é um processo muito mais lento comparado com a criação súbita de milhares de poros e rápido aumento de seus raios. Assim, o impacto da etapa de destruição de poros na corrente de eletroporação não é observável nas escalas de tempo estudadas aqui. Apenas após muitos milissegundos vai resultar na redução de poros, com o fechamento completo dos poros levando ainda mais tempo, como visto por exemplo nas simulações similares em [1]. No entanto, pode

ser observado que o potencial de equilíbrio ligeiramente maior para a aproximação de parâmetros concentrados resulta em uma diferença progressivamente maior no raio dos poros durante o início da fase de crescimento dos poros.

O maior número de poros é observado para ambos os casos de teste, mesmo com parâmetros muito diferentes. Contudo, a diferença entre as abordagens é significativamente menor para o caso 2, indicando que o efeito é menos pronunciado para pulsos mais curtos (na ordem de nanossegundos), que geram um menor número de poros com tamanhos muito próximos. Embora a aproximação de parâmetros concentrados parta da suposição de poros grandes, e assim seja menos precisa para poros pequenos, a diferença entre as abordagens aumenta principalmente com a duração do pulso, sendo assim mais significativa para pulsos longos.

Por fim, a comparação do caso de teste 2 com o modelo de validação em que o tamanho dos poros é fixo indica que, embora não ocorra um crescimento significativo dos poros após a etapa de criação dos poros, o tamanho e crescimento dos poros durante esta etapa possui um grande impacto no número de poros criados para as duas abordagens.

4.3.6 Impacto nas aplicações

Como mencionado, muitas aplicações dependem fortemente do tamanho e número dos poros na membrana. Aquelas usando pulsos mais curtos, na ordem de nanossegundos, geralmente estão mais preocupadas com o número de poros do que com seus raios. Por outro lado, aquelas que requerem o transporte de substâncias com moléculas grandes têm sua principal preocupação com o raio dos poros. Para aplicações em que a condutividade é importante, bem como aquelas em que a morte ou viabilidade das células é a principal preocupação, ambas as grandezas são relevantes.

As diferentes aproximações para a corrente na membrana da célula resultam em diferenças significativas nessas grandezas, com um impacto óbvio nessas aplicações. A abordagem de parâmetros concentrados prediz a criação de mais poros e poros maiores, e conseqüentemente uma membrana mais condutiva com uma área eletroporada maior. Isto sugere que pulsos elétricos com menor intensidade e/ou duração devem ser usados para obter o mesmo efeito, comparado a pulsos preditos pela abordagem de parâmetros concentrados.

4.3.7 Conclusões da análise

As análises do cálculo da corrente na membrana com as abordagens consideradas apresentam diferenças quantitativas significativas e com impacto claro nas aplicações. Assim, conclui-se que são um elemento importante a ser considerado para a obtenção de resultados precisos para as aplicações, afetando o desenvolvimento de protocolos experi-

mentais, a viabilidade de aplicações e a modelagem do processo. Embora o método dos parâmetros concentrados seja mais simples, devido ao maior detalhe e embasamento físico recomenda-se o uso da aproximação de fluxo iônico.

5 Conclusões

Este capítulo apresenta as conclusões do trabalho desenvolvido bem como as perspectivas de futuros trabalhos. A [seção 5.1](#) avalia os resultados obtidos, enquanto a [seção 5.2](#) discute possíveis trabalhos futuros.

5.1 Avaliação dos resultados

Este trabalho compreendeu um profundo estudo da literatura sobre o fenômeno da eletroporação, do desenvolvimento de um modelo bidimensional completo e sua validação em comparação com a literatura. Este modelo foi então usado para estudar as diferenças entre dois modelos para o cálculo de uma grandeza crucial, a corrente de eletroporação, e seu potencial impacto no estudo do fenômeno. A análise da literatura permitiu desenvolver uma compreensão ampla sobre os mecanismos envolvidos na eletroporação, as principais teorias que descrevem o fenômeno, as características observadas experimentalmente e as necessidades e limitações das aplicações. Isto é essencial para o desenvolvimento de modelos que representem adequadamente o fenômeno, permitindo identificar os fatores de interesse e as simplificações possíveis e interpretar os resultados obtidos. A partir destes estudos foi desenvolvido o modelo teórico apresentado no [Capítulo 3](#), que fornece as ferramentas para uma simulação numérica da eletroporação em células isoladas.

A simulação desenvolvida obteve resultados consistentes com a literatura, tanto qualitativa quanto quantitativamente, e permite uma representação precisa e completa do fenômeno de eletroporação dado o conhecimento atual e os métodos disponíveis. Esta simulação combina várias etapas, as quais foram desenvolvidas e validadas separadamente para viabilizar o posterior desenvolvimento do modelo completo, de muito maior complexidade. Uma vez desenvolvido o modelo, passou-se ao estudo de duas abordagens para o cálculo da corrente, ambas amplamente utilizadas na literatura. Elas foram comparadas quanto a seu impacto nas grandezas de interesse e no processo como um todo, incluindo a evolução temporal e distribuição espacial das grandezas, em dois casos de teste distintos. A análise dos resultados numéricos detalhou as diferenças encontradas e explicou o impacto destas sobre as grandezas de interesse (potencial na membrana e densidade de poros, na forma do número e dos raios dos poros). Por fim, foi realizada uma análise sobre como as diferenças entre duas abordagens afetam as diversas aplicações do modelo, em particular para pulsos curtos (com poros de pequeno raio) em que uma das suposições da abordagem de parâmetros concentrados não é adequada. Conclui-se assim com uma recomendação pelo uso da abordagem menos simplificada devido a seu maior rigor teórico.

5.2 Atividades futuras

O estudo do fenômeno da eletroporação é um campo complexo e ainda pouco explorado, com um grande número de potenciais aplicações. Assim, existem diversas linhas de pesquisa que podem ser desenvolvidas a partir deste trabalho. Tendo sido implementado o modelo inicial, seu uso possibilitou estudar diversos casos de interesse e modelos representando uma grande diversidade de casos: diferentes células, diferentes protocolos de eletroporação (variando duração e intensidade do campo elétrico, forma de onda, número de pulsos aplicados e intervalo entre pulsos), diferentes métodos de aplicação de campo elétrico (microeletrodos ou células não isoladas, com células próximas atuando como fontes de campo) através de alterações nas condições de contorno. O modelo desenvolvido também pode ser estendido para o caso da célula com uma organela em seu interior, ou utilizar variações no sistema de coordenadas, por exemplo coordenadas esféricas, para representar células com diferentes formas. Estudos futuros também poderiam ser enriquecidos através de experimentos, em parceria com cientistas de outras áreas, para o estudo de casos de interesse direto e validação experimental dos resultados obtidos.

Referências

- 1 KRASSOWSKA, W.; FILEV, P. D. Modeling electroporation in a single cell. *Biophysical Journal*, v. 92, n. 2, p. 404 – 417, 2007. ISSN 0006-3495. Citado 25 vezes nas páginas 8, 10, 22, 24, 25, 26, 29, 32, 33, 34, 37, 41, 42, 45, 46, 51, 57, 58, 59, 60, 64, 76, 91, 93 e 96.
- 2 LAMBERTI, P. et al. The role of pulse repetition rate in nspef-induced electroporation: A biological and numerical investigation. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 62, n. 9, p. 2234–2243, Sept 2015. ISSN 0018-9294. Citado 16 vezes nas páginas 8, 9, 25, 27, 32, 37, 47, 51, 57, 58, 61, 62, 63, 64, 74 e 75.
- 3 VALE, J. F. C.; RAMIREZ, J. A. Evaluation of the current in the cell membrane for numerical simulations of electroporation. *Journal of Microwaves, Optoelectronics and Electromagnetic Applications*, Sociedade Brasileira de Microondas e Optoeletrônica e Sociedade Brasileira de Eletromagnetismo, v. 21, n. 1, p. 61–82, Jan 2022. ISSN 2179-1074. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/2179-10742022v21i11167>>. Citado 3 vezes nas páginas 17, 29 e 31.
- 4 ALBERTS, B. et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4. ed. [S.l.]: Garland Science, 2002. Citado na página 19.
- 5 PORTO, A. *Esquema básico de una célula eucariota animal*. 2012. Disponível em: <<https://commons.wikimedia.org/wiki/File:CelulaEucariotaAnimal.jpg>>. Citado na página 19.
- 6 STÄMPFLI, R. Reversible electrical breakdown of the excitable membrane of a ranvier node. *Ann. Acad. Brasil. Ciens*, v. 30, p. 57–63, 1958. Citado na página 20.
- 7 SALE, A.; HAMILTON, W. Effects of high electric fields on microorganisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, v. 148, n. 3, p. 781 – 788, 1967. ISSN 0304-4165. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304416567900529>>. Citado na página 20.
- 8 NEUMANN, E.; ROSENHECK, K. Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes. *The Journal of Membrane Biology*, v. 10, n. 1, p. 279–290, 1972. ISSN 1432-1424. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/BF01867861>>. Citado na página 20.
- 9 HABERL, S. et al. Cell membrane electroporation-part 2: the applications. *Electrical Insulation Magazine, IEEE*, v. 29, n. 1, p. 29–37, January 2013. ISSN 0883-7554. Citado 3 vezes nas páginas 20, 29 e 30.
- 10 REMS, L.; MIKLAVČIČ, D. Tutorial: Electroporation of cells in complex materials and tissue. *Journal of Applied Physics*, v. 119, n. 20, 2016. Disponível em: <<http://scitation.aip.org/content/aip/journal/jap/119/20/10.1063/1.4949264>>. Citado 4 vezes nas páginas 20, 21, 24 e 25.
- 11 BATISTA NAPOTNIK, T.; MIKLAVČIČ, D. In vitro electroporation detection methods – an overview. *Bioelectrochemistry*, v. 120, p. 166–182, 2018.

ISSN 1567-5394. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S156753941730395X>>. Citado na página 20.

12 KOTNIK, T. et al. Cell membrane electroporation- part 1: The phenomenon. *Electrical Insulation Magazine, IEEE*, v. 28, n. 5, p. 14–23, September 2012. ISSN 0883-7554. Citado 5 vezes nas páginas 21, 22, 24, 29 e 33.

13 CHIAPPERINO, M. A. et al. Experimental and numerical study of electroporation induced by long monopolar and short bipolar pulses on realistic 3d irregularly shaped cells. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 67, n. 10, p. 2781–2788, 2020. Citado 3 vezes nas páginas 21, 28 e 31.

14 MOEN, E. K. et al. Quantifying pulsed electric field-induced membrane nanoporation in single cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1858, n. 11, p. 2795–2803, 2016. ISSN 0005-2736. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273616302784>>. Citado na página 21.

15 SENDEL, J. T.; WALLACE, M. I. Imaging the dynamics of individual electropores. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, Proceedings of the National Academy of Sciences, v. 113, n. 19, p. 5281–5286, maio 2016. Citado na página 21.

16 WEAVER, J. C.; CHIZMADZHEV, Y. Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, v. 41, n. 2, p. 135 – 160, 1996. ISSN 0302-4598. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0302459896050623>>. Citado 2 vezes nas páginas 21 e 26.

17 JOSHI, R. P. et al. Self-consistent simulations of electroporation dynamics in biological cells subjected to ultrashort electrical pulses. *Phys. Rev. E*, American Physical Society, v. 64, p. 011913, Jun 2001. Citado 11 vezes nas páginas 21, 23, 24, 25, 26, 29, 32, 33, 34, 40 e 47.

18 NEU, J. C.; KRASSOWSKA, W. Asymptotic model of electroporation. *Phys. Rev. E*, American Physical Society, v. 59, p. 3471–3482, Mar 1999. Citado 8 vezes nas páginas 23, 26, 27, 32, 33, 34, 41 e 42.

19 KOTNIK, T.; MIKLAVCIC, D. Analytical description of transmembrane voltage induced by electric fields on spheroidal cells. *Biophysical Journal*, v. 79, n. 2, p. 670–679, 2000. Citado 4 vezes nas páginas 24, 27, 32 e 40.

20 KOTNIK, T.; MIKLAVCIC, D. Theoretical evaluation of voltage inducement on internal membranes of biological cells exposed to electric fields. *Biophysical Journal*, v. 90, n. 2, p. 480 – 491, 2006. ISSN 0006-3495. Citado 3 vezes nas páginas 24, 27 e 32.

21 GARNER, A. et al. Time domain dielectric spectroscopy measurements of hl-60 cell suspensions after microsecond and nanosecond electrical pulses. *Plasma Science, IEEE Transactions on*, v. 32, n. 5, p. 2073–2084, Oct 2004. ISSN 0093-3813. Citado na página 24.

22 SCHOENBACH, K. H. et al. Ultrashort electrical pulses open a new gateway into biological cells. *Proceedings of the IEEE*, v. 92, n. 7, p. 1122–1137, July 2004. ISSN 0018-9219. Citado 3 vezes nas páginas 24, 26 e 32.

- 23 REBERSEK, M. et al. Cell membrane electroporation-part 3: the equipment. *IEEE Electrical Insulation Magazine*, v. 30, n. 3, p. 8–18, May 2014. ISSN 0883-7554. Citado 2 vezes nas páginas 24 e 30.
- 24 KOTNIK, T.; MIKLAVCIC, D.; SLIVNIK, T. Time course of transmembrane voltage induced by time-varying electric fields - a method for theoretical analysis and its application. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, v. 45, n. 1, p. 3 – 16, 1998. ISSN 0302-4598. Citado 3 vezes nas páginas 24, 25 e 93.
- 25 MILESTONE, W. et al. Sinusoidal RF simulations for optimized electroporation protocols. *Journal of Applied Physics*, v. 133, n. 17, p. 174702, 05 2023. ISSN 0021-8979. Disponível em: <<https://doi.org/10.1063/5.0149241>>. Citado 6 vezes nas páginas 24, 25, 26, 27, 29 e 31.
- 26 KRASSOWSKA, W.; NEU, J. Response of a single cell to an external electric field. *Biophysical Journal*, v. 66, n. 6, p. 1768 – 1776, 1994. ISSN 0006-3495. Citado 2 vezes nas páginas 26 e 32.
- 27 JOSHI, R. P.; SCHOENBACH, K. H. Electroporation dynamics in biological cells subjected to ultrafast electrical pulses: A numerical simulation study. *Phys. Rev. E*, American Physical Society, v. 62, p. 1025–1033, Jul 2000. Disponível em: <<http://link.aps.org/doi/10.1103/PhysRevE.62.1025>>. Citado 2 vezes nas páginas 26 e 32.
- 28 NEU, J. C.; KRASSOWSKA, W. Singular perturbation analysis of the pore creation transient. *Phys. Rev. E*, American Physical Society, v. 74, p. 031917, Sep 2006. Citado 3 vezes nas páginas 26, 32 e 41.
- 29 YING, W.; HENRIQUEZ, C. S. Hybrid finite element method for describing the electrical response of biological cells to applied fields. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 54, n. 4, p. 611–620, April 2007. ISSN 0018-9294. Citado 3 vezes nas páginas 26, 29 e 32.
- 30 LAMBERTI, P. et al. nspef-induced effects on cell membranes: use of electrophysical model to optimize experimental design. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, v. 20, n. 4, p. 1231–1238, August 2013. ISSN 1070-9878. Citado 3 vezes nas páginas 27, 32 e 47.
- 31 DING, L. et al. A single-cell electroporation model for quantitatively estimating the pore area ratio by high-frequency irreversible electroporation. *Applied Sciences*, v. 13, n. 3, 2023. ISSN 2076-3417. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2076-3417/13/3/1808>>. Citado 2 vezes nas páginas 27 e 31.
- 32 SUSIL, R.; ŠEMROV, D.; MIKLAVČIČ, D. Electric field-induced transmembrane potential depends on cell density and organization. *Electro-and magnetobiology*, Taylor & Francis, v. 17, n. 3, p. 391–399, 1998. Citado 2 vezes nas páginas 27 e 32.
- 33 PAVLIN, M.; PAVSELJ, N.; MIKLAVČIČ, D. Dependence of induced transmembrane potential on cell density, arrangement, and cell position inside a cell system. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 49, n. 6, p. 605–612, June 2002. ISSN 0018-9294. Citado 2 vezes nas páginas 27 e 32.

- 34 DERMOL-ČERNE, J.; MIKLAVČIČ, D. From cell to tissue properties - modeling skin electroporation with pore and local transport region formation. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 65, n. 2, p. 458–468, 2018. ISSN 0018-9294. Citado 3 vezes nas páginas 27, 31 e 46.
- 35 DERMOL-ČERNE, J. et al. Short microsecond pulses achieve homogeneous electroporation of elongated biological cells irrespective of their orientation in electric field. *Scientific Reports*, v. 10, n. 1, p. 9149, Jun 2020. ISSN 2045-2322. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-65830-3>>. Citado 3 vezes nas páginas 27, 28 e 31.
- 36 GIMSA, J.; WACHNER, D. Analytical description of the transmembrane voltage induced on arbitrarily oriented ellipsoidal and cylindrical cells. *Biophysical Journal*, v. 81, n. 4, p. 1888 – 1896, 2001. ISSN 0006-3495. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006349501758407>>. Citado 3 vezes nas páginas 27, 32 e 40.
- 37 PUCIHAR, G. et al. Numerical determination of transmembrane voltage induced on irregularly shaped cells. *Annals of Biomedical Engineering*, v. 34, n. 4, p. 642, 2006. ISSN 1573-9686. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10439-005-9076-2>>. Citado 3 vezes nas páginas 28, 29 e 32.
- 38 PUCIHAR, G.; MIKLAVČIČ, D.; KOTNIK, T. A time-dependent numerical model of transmembrane voltage inducement and electroporation of irregularly shaped cells. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, v. 56, n. 5, p. 1491–1501, May 2009. ISSN 0018-9294. Citado 2 vezes nas páginas 28 e 32.
- 39 HAO, X.-Z. et al. A 3-d multiphysics modeling of electroporation excited by a single pulse. *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, v. 30, n. 2, p. 546–555, 2023. Citado na página 29.
- 40 KOTNIK, T. et al. Electroporation-based applications in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, v. 33, n. 8, p. 480 – 488, 2015. ISSN 0167-7799. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167779915001249>>. Citado na página 29.
- 41 ARAÚJO, E. J. de. *Otimização de um Sistema de Esterilização de Líquidos por Aplicação de Pulsos de Alta Tensão*. Qualificação — PPGEE, 2017. Citado na página 29.
- 42 ARAUJO, E. J.; LOPES, I. J. S.; RAMIREZ, J. A. Numerical study of treatment chambers for single and multi-stage pulsed electric field systems. *IET Science, Measurement & Technology*, v. 15, n. 4, p. 385–397, 2021. Disponível em: <<https://ietresearch.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1049/smt2.12040>>. Citado na página 29.
- 43 WHEELER, R. *Cuvettes for electroporation. These are plastic with aluminium electrodes and a lid. They hold a maximum of 400 µl*. 2006. Disponível em: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Electroporation_Cuvettes.jpg>. Citado na página 36.
- 44 NEWMAN, J. LBNL Report, *RESISTANCE FOR FLOW OF CURRENT TO A DISK*. 1965. Disponível em: <<https://escholarship.org/uc/item/96z6t5r3>>. Citado na página 46.

- 45 BARNETT, A. The current-voltage relation of an aqueous pore in a lipid bilayer membrane. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, v. 1025, n. 1, p. 10 – 14, 1990. ISSN 0005-2736. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000527369090184P>>. Citado na página 47.
- 46 MOMOH, O.; SADIKU, M.; AKUJUOBI, C. Solution of axisymmetric potential problem in spherical coordinates using exodus method. *Session 4P3 Novel Mathematical Methods in Electromagnetics 2*, p. 673, 2010. Citado 2 vezes nas páginas 87 e 89.

APÊNDICE A – Cálculo do potencial

A.1 Desenvolvimento das equações de recorrência para a equação de Laplace

Embora seja possível obter soluções analíticas para o potencial na membrana quando as propriedades elétricas são constantes, a corrente de eletroporação depende do surgimento dos poros, que não pode ser resolvido analiticamente. Assim, o potencial na membrana deve ser calculado numericamente, de forma acoplada ao cálculo da densidade de poros. Por este motivo, iniciou-se o desenvolvimento de uma simulação para o potencial no domínio descrito na [subseção 3.5.1](#). Para isso, faz-se necessário primeiramente discretizar a equação de Laplace em coordenadas esféricas, dada pela Equação (3.15) (repetida aqui por conveniência).

$$\nabla^2 V(r, \theta) = \frac{\partial^2 V}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial V}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 V}{\partial \theta^2} + \frac{\cos \theta}{r^2 \sin \theta} \frac{\partial V}{\partial \theta} = 0$$

Aplicando diferenças finitas centrais às derivadas, chega-se a:

$$\begin{aligned} \frac{\partial^2 V}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial V}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 V}{\partial \theta^2} + \frac{\cos \theta}{r^2 \sin \theta} \frac{\partial V}{\partial \theta} &= \frac{2}{i\Delta r} \frac{(V_{i+1,j} - V_{i-1,j})}{2\Delta r} \\ &+ \frac{(V_{i+1,j} - 2V_{i,j} + V_{i-1,j})}{(\Delta r)^2} + \frac{1}{i^2(\Delta r)^2} \frac{(V_{i,j+1} - V_{i,j} + V_{i,j-1})}{(\Delta \theta)^2} \\ &+ \frac{\cos(j\Delta \theta)}{i^2(\Delta r)^2 \sin(j\Delta \theta)} \frac{(V_{i,j+1} - V_{i,j-1})}{2\Delta \theta} = 0 \end{aligned} \quad (\text{A.1})$$

Esta equação pode ser manipulada, separando os valores em cada divisão do domínio, para chegar a:

$$\begin{aligned} \nabla^2 V(r, \theta) &= \frac{\left[\left(\frac{i+1}{i} \right) V_{i+1,j} + \left(\frac{i-1}{i} \right) V_{i-1,j} + \left(\frac{2 \tan(j\Delta \theta) - \Delta \theta}{2i^2(\Delta \theta)^2 \tan(j\Delta \theta)} \right) V_{i,j+1} + \left(\frac{2 \tan(j\Delta \theta) + \Delta \theta}{2i^2(\Delta \theta)^2 \tan(j\Delta \theta)} \right) V_{i,j-1} \right]}{(\Delta r)^2} \\ &+ \frac{-2i^2(\Delta \theta)^2 - 2}{(\Delta \theta)^2(\Delta r)^2 i^2} V_{i,j} = 0 \end{aligned} \quad (\text{A.2})$$

A qual por sua vez chega à Equação (3.34), repetida aqui:

$$\begin{aligned}
 V(i, j) = & \frac{1}{2 \left(1 + \frac{1}{(i\Delta\theta)^2}\right)} \times \left[\left(1 + \frac{1}{i}\right) V(i+1, j) + \left(1 - \frac{1}{i}\right) V(i-1, j) + \right. \\
 & \left. \left(\frac{1}{(i\Delta\theta)^2} + \frac{\cos j\Delta\theta}{2i^2\Delta\theta \sin j\Delta\theta} \right) V(i, j+1) + \right. \\
 & \left. \left(\frac{1}{(i\Delta\theta)^2} - \frac{\cos j\Delta\theta}{2i^2\Delta\theta \sin j\Delta\theta} \right) V(i, j-1) \right]
 \end{aligned}$$

Contudo, observa-se que esta equação é indefinida para três pontos do domínio:

$$\begin{aligned}
 i &= 0 \\
 j &= 0 \\
 j &= j_{max} = \frac{\pi}{\Delta\theta}
 \end{aligned} \tag{A.3}$$

Para eliminar este problema, usa-se a abordagem vista em [46]. O primeiro caso pode ser resolvido excluindo-se do domínio a origem. Como a região de interesse se localiza na membrana, não se faz necessário conhecer o valor do potencial na origem.

As singularidades para os valores extremos de j podem ser tratadas considerando-se a simetria do problema ao longo das linhas $\theta = 0^\circ$ e $\theta = 180^\circ$. Nestas linhas de simetria, pode-se aplicar a condição de que $\frac{\partial V}{\partial \theta} = 0$, eliminando da equação os termos que causam a singularidade. Chega-se assim à Equação (3.35), repetida aqui.

$$\begin{aligned}
 V(i, 0) &= \frac{1}{2 \left(1 + \frac{1}{(i\Delta\theta)^2}\right)} \times \left[\left(1 + \frac{1}{i}\right) V(i+1, 0) + \left(1 - \frac{1}{i}\right) V(i-1, 0) \right] \\
 V(i, j_{max}) &= \frac{1}{2 \left(1 + \frac{1}{(i\Delta\theta)^2}\right)} \times \left[\left(1 + \frac{1}{i}\right) V(i+1, j_{max}) + \right. \\
 & \left. \left(1 - \frac{1}{i}\right) V(i-1, j_{max}) \right]
 \end{aligned}$$

A.2 Resolução da equação de Laplace através de diferenças finitas

Passou-se a seguir à implementação do código que resolve a equação de Laplace em coordenadas esféricas. Para isto, primeiramente foi necessário atribuir a cada ponto do domínio um índice linear. A numeração é obtida percorrendo todos os poros a partir do interior, primeiro na direção θ e depois na direção r . Assim, obtém-se um índice dado por:

$$k = (i-1) * (j_{max}) + (j) \tag{A.4}$$

A Figura 44 ilustra a numeração dos pontos do domínio, para um caso simplificado em que o domínio é dividido em menos partes.

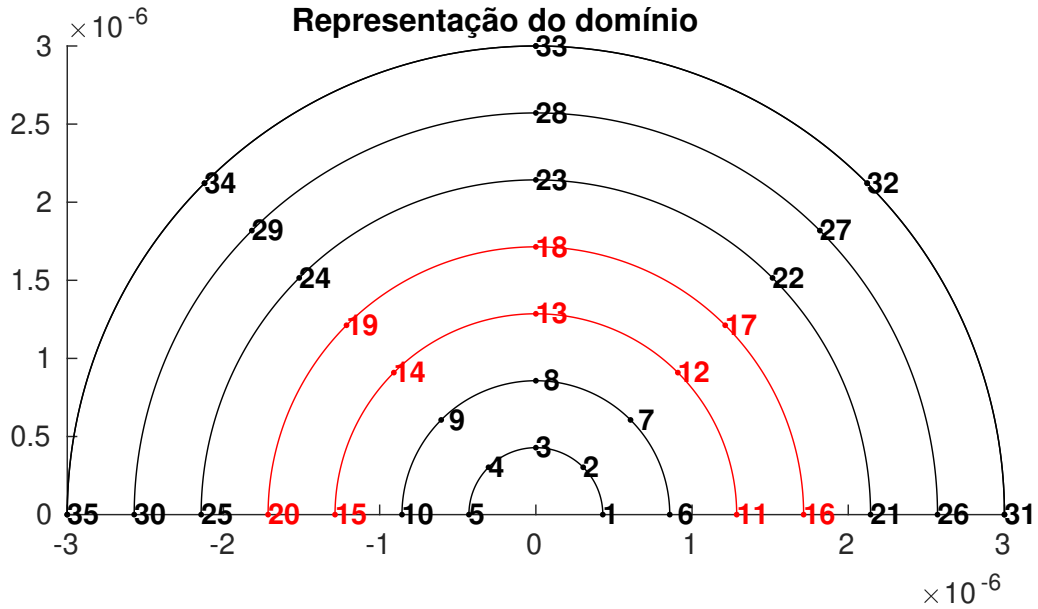


Figura 44 – Exemplo da numeração dos pontos do domínio, para uma discretização com menos pontos (membrana não está em escala)

A partir desta indexação, foi construída uma matriz de equações lineares para o potencial em cada ponto, correspondendo ao sistema:

$$\mathbf{Ax} = \mathbf{b} \tag{A.5}$$

A matriz \mathbf{A} tem dimensões $k_{\max} \times k_{\max}$ consistindo de k_{\max} equações contendo k_{\max} variáveis. O valor do potencial é conhecido em i_{\max} destes pontos, correspondendo às condições de contorno do problema (valor do pulso nos limites do domínio). Os vetores \mathbf{b} e \mathbf{x} possuem dimensão $k_{\max} \times 1$ cada um.

Estas equações são da forma:

$$\sum_{k=1, l=1}^{k=k_{\max}, l=k_{\max}} a_{k,l} x_k = b_l \tag{A.6}$$

Para cada ponto interno do domínio, existem 5 termos para esta equação, correspondendo ao próprio ponto e aos seus 4 vizinhos imediatos ao longo das coordenadas r e θ . Assim, temos para cada ponto k no interior do domínio equações da forma:

$$a_{k,k-1}x_{k-1} + a_{k,k+1}x_{k+1} + a_{k,k-j_{max}}x_{k-j_{max}} + a_{k,k+j_{max}}x_{k+j_{max}} + (-1)x_k = 0 \quad (\text{A.7})$$

Para pontos localizados nos contornos do domínio, esta equação pode ser modificada de acordo. Os pontos nas linhas correspondentes a $\theta = 0^\circ$ e $\theta = 180^\circ$ não dependem dos pontos adjacentes na coordenada j , resultando em:

$$a_{k,k-j_{max}}x_{k-j_{max}} + a_{k,k+j_{max}}x_{k+j_{max}} + a_{k,k}x_k = 0 \quad (\text{A.8})$$

E nos limites externos do domínio, sendo o potencial conhecido (condição de contorno de Dirichlet), tem-se simplesmente:

$$x_k = b_k \quad (\text{A.9})$$

Substituindo os termos da Equação (3.34) nas Equações A.7 e A.8 é possível obter todos os valores não-nulos de $a_{k,l}$ e construir a matriz \mathbf{A} . Este processo só precisa ser feito uma vez e a matriz resultante é utilizada para resolver o sistema em todos os instantes de tempo futuros.

O vetor \mathbf{b} é construído de acordo com as condições de contorno e interface. Em cada instante de tempo, é necessário construir novamente o vetor, à medida que o pulso elétrico se altera e a membrana se carrega. No caso de uma condição de contorno de Dirichlet, como na Equação (A.9), o valor de b_k é igual ao valor do potencial naquele ponto conforme dado pelo pulso elétrico aplicado (Equação (3.12)). A aplicação das condições de interface na membrana é mais complexa e será discutida em detalhes na [Apêndice C](#).

Uma vez construídas as matrizes, o sistema pode ser resolvido de qualquer maneira usual; a forma escolhida foi através do operador `\` (inversão e pré-multiplicação) do Matlab. A matriz \mathbf{A} pode ser invertida uma única vez e o resultado pode ser pré-multiplicado pelo vetor \mathbf{b} correspondente a cada instante de tempo, reduzindo o custo computacional do problema.

A.2.1 Validação para condição de Dirichlet simples

Para testar a implementação da equação de Laplace em diferenças finitas, foi realizado um teste do algoritmo resolvendo o problema do potencial entre duas esferas concêntricas (de raios r_a e r_b) com potenciais constantes de valores V_0 e 0 , conforme visto em [46]. Este problema tem uma solução conhecida:

$$V(r) = V_0 \frac{\left[\frac{1}{r_a} - \frac{1}{r} \right]}{\left[\frac{1}{r_a} - \frac{1}{r_b} \right]} \quad (\text{A.10})$$

O algoritmo implementado foi testado no MatLab com uma discretização reduzida ($i_{\max} = 5$ e $j_{\max} = 5$) e comparado, em cada ponto, ao resultado analítico dado pela Equação (A.10). Os valores obtidos foram idênticos (erros menores que 10^{-14} para todos os pontos).

É importante notar que este teste ignora as condições de interface na membrana e os aspectos temporais do problema, resolvendo apenas para condições de contorno de Dirichlet em um domínio homogêneo.

APÊNDICE B – Simulação do processo de eletroporação

B.1 Desenvolvimento das equações de recorrência para a aproximação assintótica da Equação de Smoluchowski

Foi desenvolvida uma simulação para o cálculo do número de poros formados na membrana e de seus raios, utilizando expressões aproximadas para o potencial. Esta simulação usa a aproximação assintótica da equação de Smoluchowski, desenvolvida por Krassowska et al. [1].

Primeiramente, discretiza-se a Equação (3.20), repetida a seguir por conveniência.

$$\frac{dN}{dt} = \alpha e^{(V_m/V_{ep})^2} \left(1 - \frac{N}{N_{eq}(V_m)} \right)$$

$$N_{eq}(V_m) = N_0 e^{q(V_m/V_{ep})^2}$$

Aplica-se a esta equação uma aproximação das derivadas através de diferenças finitas centrais, resultando em:

$$\frac{N^{n+1} - N^n}{\Delta t} = \alpha e^{(V_m/V_{ep})^2} - \left(\frac{N^{n+1} + N^n}{2} \frac{\alpha}{N_0} e^{(1-q)\frac{V_m}{V_{ep}}} \right) \quad (\text{B.1})$$

Que pode ser reordenada para chegar a:

$$N^{n+1} \left(1 + \frac{\Delta t \alpha}{2N_0} e^{(1-q)\frac{V_m}{V_{ep}}} \right) = N^n \left(1 - \frac{\Delta t \alpha}{2N_0} e^{(1-q)\frac{V_m}{V_{ep}}} \right) + \alpha e^{\frac{V_m}{V_{ep}}} \Delta t \quad (\text{B.2})$$

do que resulta a equação (3.25), repetida aqui por conveniência:

$$N_k^{n+1} = \left(\frac{(1 - u_n(V_m))}{1 + u_n(V_m)} N_k^n + \frac{A_{exp1} e^{(V_m/V_{ep})^2}}{1 + u_n(V_m)} \right) \quad (\text{B.3})$$

$$u_n(V_m) = A_{exp2} e^{(1-q)(V_m/V_{ep})^2} \quad (\text{B.4})$$

$$A_{exp1} = \alpha \Delta t \quad (\text{B.5})$$

$$A_{exp2} = \frac{\Delta t \alpha}{2N_0} \quad (\text{B.6})$$

Também foi discretizada a Equação (3.22), repetida a seguir:

$$\frac{dr_k}{dt} = U(r_k, V_m, S_{eff}), k = 1, 2, \dots, K \quad (\text{B.7})$$

$$U(r, V_m, S_{eff}) = \frac{D}{kT} \left[\frac{V_m^2 F_{max}}{1 + r_h/(r + r_t)} + 4\beta \left[\frac{r_*}{r} \right]^4 \frac{1}{r} \right] + \frac{D}{kT} [-2\pi\gamma + 2\pi S_{eff}r] \quad (\text{B.8})$$

A equação de recorrência para r_k foi desenvolvida utilizando diferenças finitas adiantadas no lugar de centrais; isto foi feito porque nesta equação há a presença de termos inversamente proporcionais a r_k . Assim, ao se expandir este termo (que se refere ao valor central do intervalo, e é aproximado pela média dos valores inteiros anterior e posterior) seria obtida uma equação polinomial de segunda ordem, o que é indesejável para esta equação. Utilizando-se diferenças finitas adiantadas elimina-se este problema, embora perca-se precisão no resultado. Aplicando a aproximação por diferenças finitas adiantadas, chega-se a:

$$\frac{r_k^{n+1} - r_k^n}{\Delta t} = \frac{D}{kT} \left[\frac{V_m^2 F_{max}}{1 + r_h/(r_k^n + r_t)} + 4\beta \left[\frac{r_*}{r_k^n} \right]^4 \frac{1}{r_k^n} \right] \quad (\text{B.9})$$

A partir da qual é obtida facilmente a Equação (3.29), repetida aqui por conveniência:

$$\begin{aligned} r_k^{n+1} &= r_k^n + A_{pg1} \frac{(r_k^n + r_t)}{r_k^n + r_t + r_n} F_{max} V_m^2 + \\ &+ A_{pg1} \left[A_{r1} \frac{1}{(r_k^n)^5} + 2\pi\sigma_{eff} r_k^n \right] - A_{r2} \\ A_{pg1} &= \frac{D\Delta t}{kT} \\ A_{r1} &= 4\beta(r_*)^4 \\ A_{r2} &= A_{pg1} 2\pi\gamma \end{aligned}$$

B.2 Validação com potencial aproximado

Para um primeiro teste da solução da equação de Smoluchowski aproximada, utilizou-se uma expressão aproximada para o potencial no lugar do cálculo numérico acoplado da eletroporação e da diferença de potencial da membrana. Isto simplifica o problema e permite um teste independente da simulação do potencial, validando esta etapa em um caso parcial antes do desenvolvimento da simulação completa.

Foi utilizada uma aproximação exponencial do potencial, descrita por:

$$V_{mem}(t) = 1,5E_0(t)(1 - e^{-\frac{t}{\tau}}) \quad (\text{B.10})$$

Onde o valor da constante de tempo τ pode ser dado pela seguinte expressão, vista em [1] - outros autores apresentam valores distintos mas similares para a constante.

$$\tau = \tau_2 = R_1 C_M \left(\frac{1}{\sigma_c} - \frac{1}{\sigma_o} \right) \quad (\text{B.11})$$

Para esta simulação, os valores adotados para as propriedades da célula foram distintos daqueles utilizados na simulação final, tendo sido realizado o teste antes da adoção dos valores finais (e, sendo esta validação apenas qualitativa, não se considerou necessário um novo teste com os novos valores). Os parâmetros utilizados são mostrados na [Tabela 9](#).

Tabela 9 – Parâmetros do modelo

Parâmetro	Significado Físico	Valor
σ_c	Condutividade do citoplasma	3,0 <i>times</i> 10^{-1} S/m
σ_o	Condutividade do meio externo	3,0 <i>times</i> 10^{-1} S/m
σ_m	Condutividade da membrana	3,0 <i>times</i> 10^{-7} S/m
ϵ_o	Permissividade do meio externo	6,4 <i>times</i> 10^{-10} F/m
ϵ_c	Permissividade do citoplasma	6,4 <i>times</i> 10^{-10} F/m
ϵ_m	Permissividade da membrana	4,4 <i>times</i> 10^{-11} F/m
R_1	Raio externo da célula	1,0000 <i>times</i> 10^{-5} m
R_2	Raio interno da célula	0,9995 <i>times</i> 10^{-5} m

Fonte: Todos os valores dos parâmetros obtidos de [24]

Foram utilizados pulsos quadrados com duração de 1 μ s. A amplitude do campo elétrico aplicado foi assumida como aproximadamente 100000V/m, resultando num potencial aplicado de 1V nas proximidades da célula.

O potencial na membrana durante cada instante da simulação pode ser visto na [Figura 45](#).

A membrana foi discretizada em 128 seções com mesmo tamanho, conforme visto na [Figura 46](#), para o cálculo do número de poros e seus raios em cada uma das divisões.

O potencial em cada seção é dado por:

$$V_m(\theta, t) = V_m(t) \times \cos(\theta) \quad (\text{B.12})$$

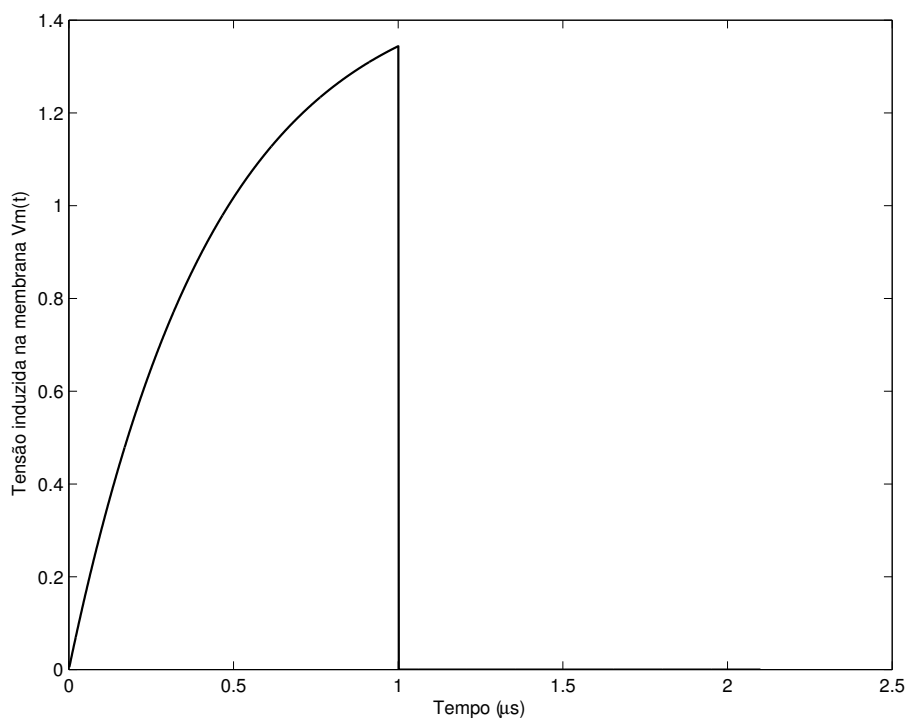


Figura 45 – V_m aproximado, não acoplado, utilizado para o cálculo da eletroporação na membrana

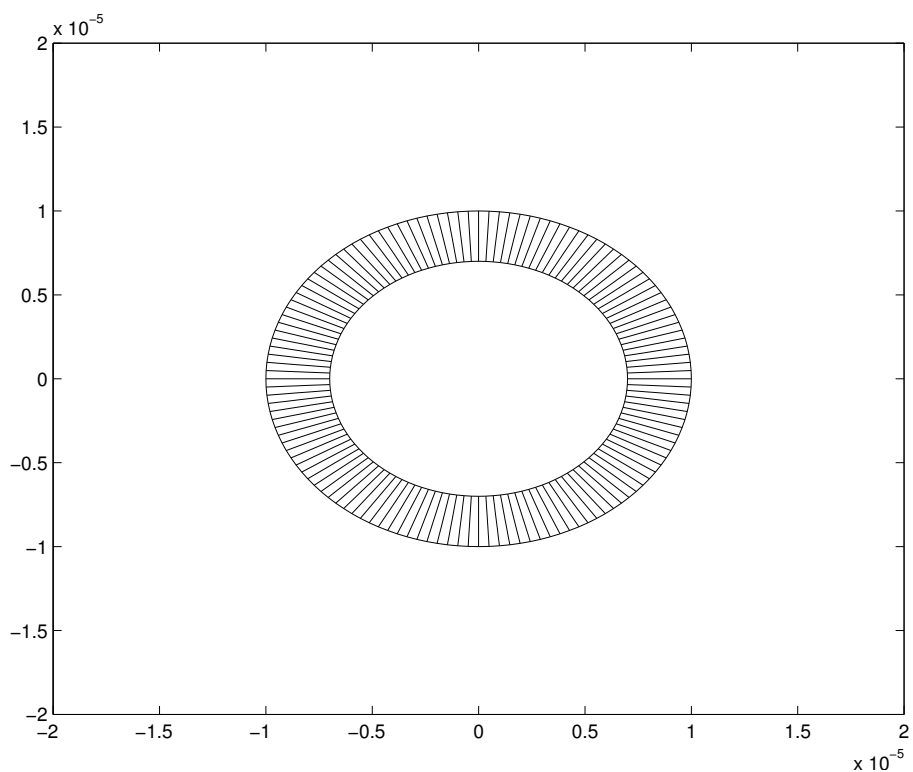


Figura 46 – Representação da membrana discretizada (a espessura da membrana não está em escala)

O número total de poros ao longo do tempo, somando os poros de cada divisão, pode ser visto na [Figura 47](#):

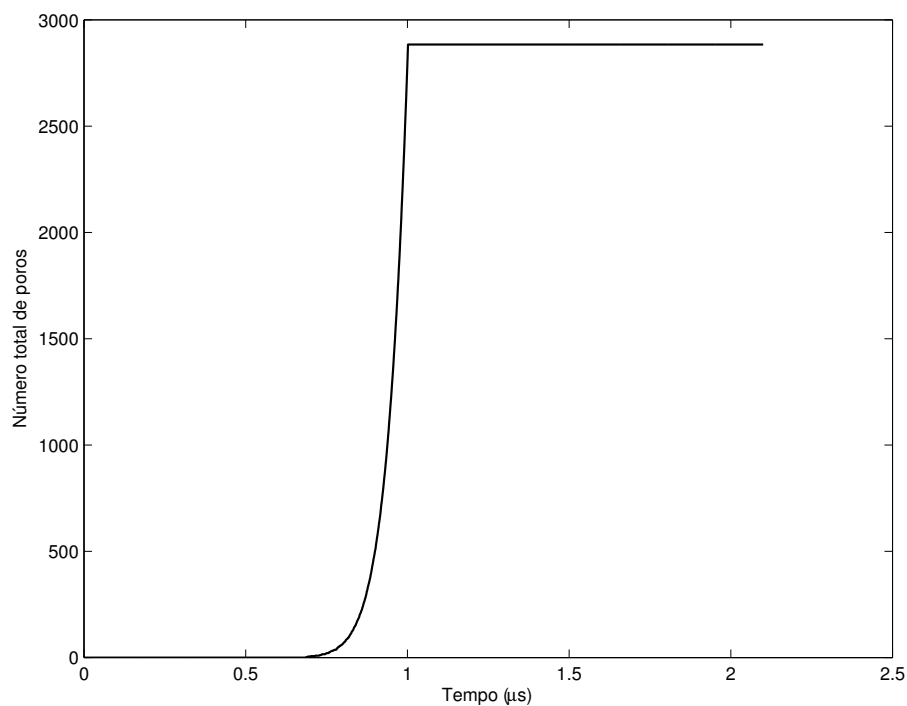


Figura 47 – Número de poros em toda a membrana ao longo do tempo

O raio máximo encontrado ao longo do tempo, considerando todos os poros, pode ser visto na [Figura 48](#):

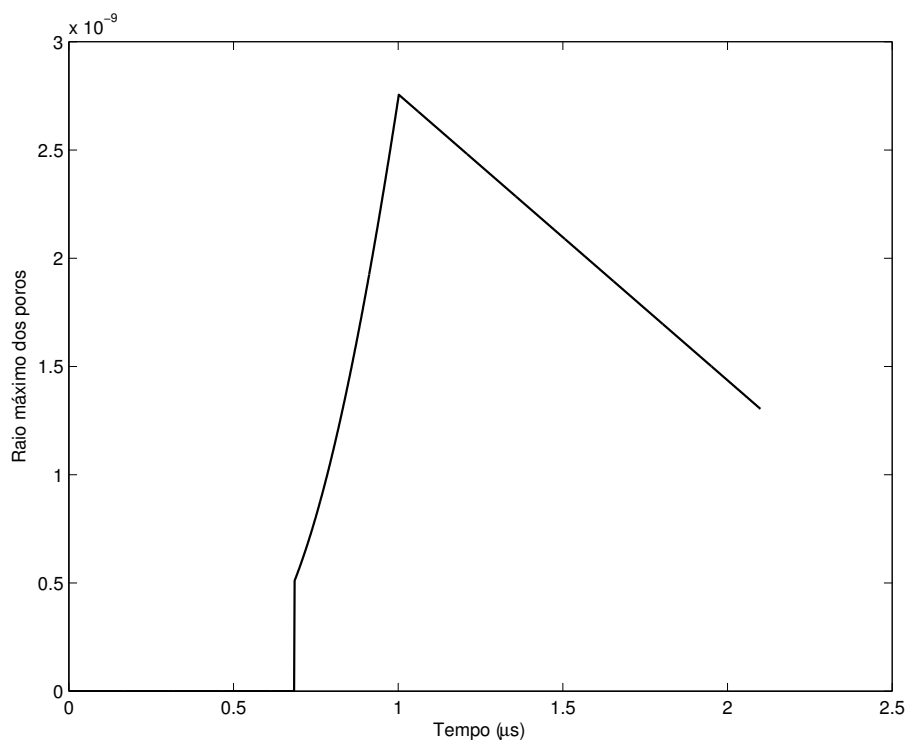


Figura 48 – Raio máximo dos poros ao longo do tempo

Contudo, é importante notar que o número de poros e seus raios não é igual para cada divisão. Para $\theta = 90^\circ$ e $\theta = 270^\circ$ não ocorreu o surgimento de nenhum poro,

tendo a maior parte dos poros se concentrado nas regiões em que o campo elétrico incide perpendicularmente à membrana, $\theta = 0^\circ$ e $\theta = 180^\circ$, que também tiveram os poros com maiores raios. Isto é evidente considerando a Equação (B.12), que resulta em diferença de potencial nula e máxima para estes respectivos casos.

Contudo, devido à existência de um potencial de repouso V_{rest} na membrana os potenciais não são simétricos em ambos os polos da célula, uma vez que V_{rest} é sempre orientado radialmente e assim é somado ou subtraído de V_m em diferentes posições. Isto cria uma diferença entre os polos $\theta = 0^\circ$ e $\theta = 180^\circ$, conforme visto na Figura 49:

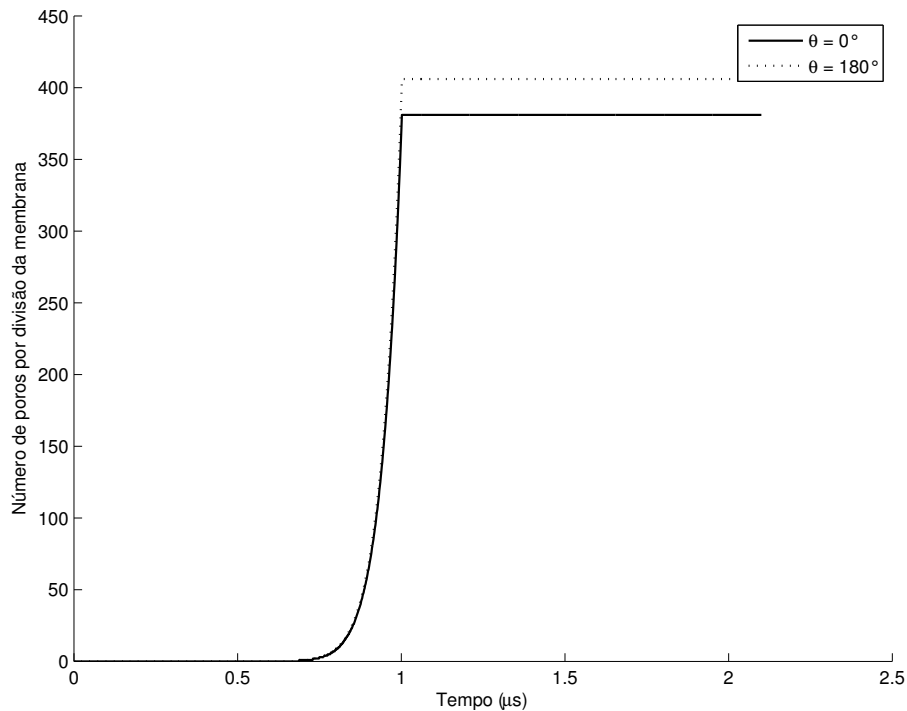


Figura 49 – Número de poros ao longo do tempo para as divisões correspondentes aos dois polos opostos

Todos estes resultados demonstram as características conhecidas do fenômeno de eletroporação. Na Figura 47, é possível observar as três etapas do processo: carregamento da membrana, em que o potencial ainda é insuficiente para causar o surgimento de poros; formação de poros, em que o número de poros aumenta significativamente; e evolução dos poros, em que o número de poros se mantém constante mas os tamanhos dos raios variam.

Na Figura 48 é possível observar que os raios dos poros aumenta muito mais rapidamente durante a aplicação do pulso em comparação com a posterior redução dos raios quando se interrompe o pulso. Também pode ser visto que, embora os poros sejam reduzidos a seu tamanho mínimo, eles não se fecham imediatamente. Isto também concorda com as observações e previsões do fenômeno.

Além destas observações, é importante notar que estes resultados são qualitativamente similares aos encontrados em [1] - embora quantitativamente os resultados sejam

necessariamente distintos, dada a natureza aproximada do teste que modela apenas parcialmente o fenômeno.

APÊNDICE C – Formulação da condição de interface na membrana

Para a simulação do fenômeno, é necessário aplicar duas condições de interface: a continuidade de corrente e de potencial. A continuidade de corrente em particular requer tratamento especial para obtenção de uma aproximação em diferenças finitas, cuja derivação será vista neste apêndice. A condição pode ser vista na [Figura 50](#) :

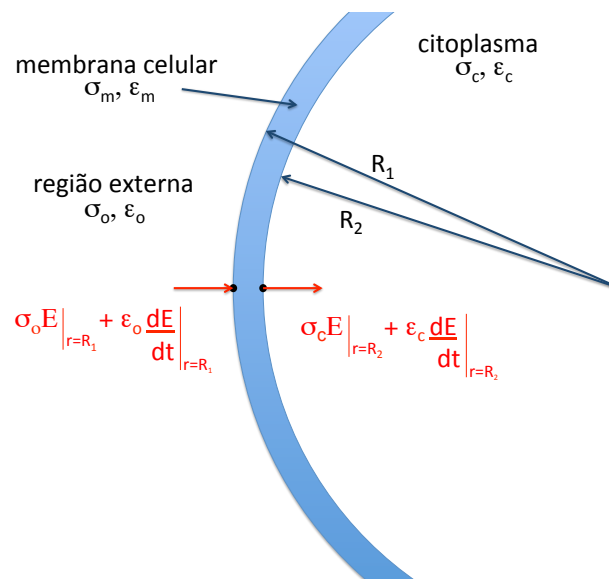


Figura 50 – Continuidade da corrente na interface dos meios com a membrana

A equação que descreve esta condição é a Equação (3.14), repetida aqui por conveniência:

$$-\hat{n} \cdot (\sigma_c \nabla V_c) = -\hat{n} \cdot (\sigma_o \nabla V_o) = C_m \frac{\partial V_m}{\partial t} + \sigma_m (V_m - V_{rest})$$

C.1 Equações de continuidade de corrente

Primeiramente, é necessário discretizar as equações de continuidade. Repete-se por conveniência as definições das correntes no citoplasma e no meio externo:

$$I_c = \hat{n} \cdot (-\sigma_c \nabla V_c)$$

$$I_o = -\hat{n} \cdot (\sigma_o \nabla V_o)$$

$$I_c = -\sigma_c \frac{\partial V_c}{\partial r}$$

$$I_o = -\sigma_o \frac{\partial V_o}{\partial r}$$

Devido à continuidade de corrente (Equação 3.14), pode-se definir:

$$I_c = I_o = C_m \frac{\partial V_m}{\partial t} + I_{ep} \quad (\text{C.1})$$

Desta forma, obtém-se a expressão a seguir para $\frac{\partial V_c}{\partial r}$, na interface entre o citoplasma e a membrana:

$$\frac{\partial V_c}{\partial r} = -\frac{1}{\sigma_c} \left(C_m \frac{\partial V_m}{\partial t} + I_{ep} \right) \quad (\text{C.2})$$

e de forma equivalente na interface entre a membrana e o meio externo:

$$\frac{\partial V_o}{\partial r} = -\frac{1}{\sigma_o} \left(C_m \frac{\partial V_m}{\partial t} + I_{ep} \right) \quad (\text{C.3})$$

Pela definição de V_m , tem-se:

$$\frac{\partial V_m}{\partial t} = \frac{\partial V_c}{\partial t} - \frac{\partial V_o}{\partial t} \quad (\text{C.4})$$

Discretizando-se em relação ao tempo, obtém-se:

$$\frac{\partial V_m}{\partial t} = \frac{V_c^n - V_c^{n-1}}{\Delta t} - \frac{V_o^n - V_o^{n-1}}{\Delta t} \quad (\text{C.5})$$

onde o índice n corresponde ao instante de tempo. Finalmente, podemos expressar $\frac{\partial V}{\partial r}$ em termos das várias componentes discretizadas:

$$\frac{\partial V}{\partial r} = -\frac{1}{\sigma_c} \left(C_m \frac{V_{i,j}^n - V_{i-1,j}^n}{\Delta t} - C_m \frac{V_{i,j}^{n-1} - V_{i-1,j}^{n-1}}{\Delta t} + I_{ep} \right) \quad (\text{C.6})$$

$$\frac{\partial V}{\partial r} = -\frac{1}{\sigma_o} \left(C_m \frac{V_{i+2,j}^n - V_{i+1,j}^n}{\Delta t} - C_m \frac{V_{i+2,j}^{n-1} - V_{i+1,j}^{n-1}}{\Delta t} + I_{ep} \right) \quad (\text{C.7})$$

Por simplicidade na notação, havendo vários índices para a grandeza, será utilizado apenas V para indicar o potencial na região correspondente (V_c e V_o), sendo óbvio pelo contexto a qual se refere em cada caso.

C.2 Interface membrana-citoplasma

Neste caso, $i-1$ se localiza inteiramente dentro da célula, sendo i e $i+1$ os pontos interno e externo da membrana.

Usando a expansão em série de Taylor:

$$V_{i-1,j} = V_{i,j} - \frac{\partial V}{\partial r} \Delta r + \frac{\partial^2 V}{\partial r^2} \frac{(\Delta r)^2}{2} \quad (\text{C.8})$$

Colocando em evidência a derivada de segunda ordem, obtém-se:

$$\frac{\partial^2 V}{\partial r^2} = \frac{2V_{i-1,j} - 2V_{i,j}}{(\Delta r)^2} + \frac{\partial V}{\partial r} \frac{2}{\Delta r} \quad (\text{C.9})$$

Substituindo na Equação (3.15):

$$\frac{2V_{i-1,j} - 2V_{i,j}}{(\Delta r)^2} + \frac{\partial V}{\partial r} \frac{2}{\Delta r} + \frac{2}{R_2} \frac{\partial V}{\partial r} + \quad (\text{C.10})$$

$$\frac{1}{(R_2 \Delta \theta)^2} (V_{i,j+1} - 2V_{i,j} + V_{i,j-1}) + \frac{\cot \theta_0}{2R_2^2 \Delta \theta} (V_{i,j+1} - V_{i,j-1}) = 0 \quad (\text{C.11})$$

Multiplicando por $(\Delta r)^2$:

$$2V_{i-1,j} - 2V_{i,j} + \left(2\Delta r + 2 \frac{(\Delta r)^2}{R_2} \right) \frac{\partial V}{\partial r} + \quad (\text{C.12})$$

$$\left(\frac{\Delta r}{R_2 \Delta \theta} \right)^2 (V_{i,j+1} - 2V_{i,j} + V_{i,j-1}) + \quad (\text{C.13})$$

$$\left(\frac{\Delta r}{R_2 \Delta \theta} \right)^2 \frac{\Delta \theta \cot \theta_0}{2} (V_{i,j+1} - V_{i,j-1}) = 0 \quad (\text{C.14})$$

É possível então obter uma expressão para $\frac{\partial V}{\partial r}$ neste ponto do domínio, em termos do potencial nos pontos adjacentes:

$$- \left(2\Delta r + 2 \frac{(\Delta r)^2}{R_2} \right) \frac{\partial V}{\partial r} = \quad (\text{C.15})$$

$$(2V_{i-1,j} - 2V_{i,j}) + \left(\frac{\Delta r}{R_2 \Delta \theta} \right)^2 (V_{i,j+1} - 2V_{i,j} + V_{i,j-1}) + \quad (\text{C.16})$$

$$\left(\frac{\Delta r}{R_2 \Delta \theta} \right)^2 \frac{\Delta \theta \cot \theta_0}{2} (V_{i,j-1} - V_{i,j+1}) \quad (\text{C.17})$$

Substituindo a Equação C.6 na Equação C.15, obtém-se:

$$(2V_{i-1,j} - 2V_{i,j}) + \left(\frac{\Delta r}{R_2 \Delta \theta} \right)^2 (V_{i,j+1} - 2V_{i,j} + V_{i,j-1}) + \quad (\text{C.18})$$

$$\left(\frac{\Delta r}{R_2 \Delta \theta} \right)^2 \frac{\Delta \theta \cot \theta_0}{2} (V_{i,j-1} - V_{i,j+1}) = \quad (\text{C.19})$$

$$\frac{1}{\sigma_c} \left(2\Delta r + 2 \frac{(\Delta r)^2}{R_2} \right) + \left(C_m \frac{V_{i,j}^n - V_{i-1,j}^n}{\Delta t} - C_m \frac{V_{i,j}^{n-1} - V_{i-1,j}^{n-1}}{\Delta t} + I_{ep} \right) \quad (\text{C.20})$$

Após reordenar novamente para colocar em evidência os vários pontos do domínio no instante de tempo atual, é possível obter uma expressão do tipo:

$$A_{ij}V_{i,j} + A_{inj}V_{i-1,j} + A_{ipj}V_{i+1,j} + A_{ijn}V_{i,j-1} + A_{ijp}V_{i,j+1} = B \quad (\text{C.21})$$

onde:

$$A_{ij} = -2 - 2 \left(\frac{\Delta r}{R_2 \Delta \theta} \right)^2 - \frac{C_m}{\sigma_c \Delta t} \left(2\Delta r + 2 \frac{(\Delta r)^2}{R_2} \right) \quad (\text{C.22})$$

$$A_{inj} = 2 \quad (\text{C.23})$$

$$A_{ipj} = \frac{C_m}{\sigma_c \Delta t} \left(2\Delta r + 2 \frac{(\Delta r)^2}{R_2} \right) \quad (\text{C.24})$$

$$A_{ijn} = \left(\frac{\Delta r}{R_2 \Delta \theta} \right)^2 \left(1 - \frac{\Delta \theta \cot \theta_i}{2} \right) \quad (\text{C.25})$$

$$A_{ijp} = \left(\frac{\Delta r}{R_2 \Delta \theta} \right)^2 \left(1 + \frac{\Delta \theta \cot \theta_i}{2} \right) \quad (\text{C.26})$$

$$B = \frac{1}{\sigma_c} \left(2\Delta r + 2 \frac{(\Delta r)^2}{R_2} \right) + \left[\frac{C_m}{\Delta t} (V_{i,j}^{n-1} - V_{i-1,j}^{n-1}) + I_{ep} \right] \quad (\text{C.27})$$

Em que (C.24) corresponde ao ponto que está na interface com o meio externo. Observe que todos os valores usados para os coeficientes são constantes ao longo da simulação, e que os valores para B são conhecidos por utilizar apenas os valores do potencial no instante de tempo anterior.

O mesmo processo pode ser repetido para o meio externo, com resultados similares.

C.3 Interface membrana-meio externo

Neste caso, $i+2$ se localiza inteiramente fora da célula, sendo i e $i+1$ os pontos interno e externo da membrana.

Usando a expansão em série de Taylor:

$$V_{i+2,j} = V_{i,j} + \frac{\partial V}{\partial r} \Delta r + \frac{\partial^2 V}{\partial r^2} \frac{(\Delta r)^2}{2} \quad (\text{C.28})$$

Colocando em evidência a derivada de segunda ordem, obtém-se:

$$\frac{\partial^2 V}{\partial r^2} = \frac{2V_{i+2,j} - 2V_{i,j}}{(\Delta r)^2} - \frac{\partial V}{\partial r} \frac{2}{\Delta r} \quad (\text{C.29})$$

Substituindo na Equação (3.15):

$$\frac{2V_{i+2,j} - 2V_{i,j}}{(\Delta r)^2} - \frac{\partial V}{\partial r} \frac{2}{\Delta r} + \frac{2}{R_1} \frac{\partial V}{\partial r} + \quad (\text{C.30})$$

$$\frac{1}{(R_1 \Delta \theta)^2} (V_{i,j+1} - 2V_{i,j} + V_{i,j-1}) + \frac{\cot \theta_0}{2R_1^2 \Delta \theta} (V_{i,j+1} - V_{i,j-1}) = 0 \quad (\text{C.31})$$

Multiplicando por $(\Delta r)^2$:

$$2V_{i+2,j} - 2V_{i,j} + \left(-2\Delta r + 2\frac{(\Delta r)^2}{R_1} \right) \frac{\partial V}{\partial r} + \quad (\text{C.32})$$

$$\left(\frac{\Delta r}{R_1 \Delta \theta} \right)^2 (V_{i,j+1} - 2V_{i,j} + V_{i,j-1}) + \quad (\text{C.33})$$

$$\left(\frac{\Delta r}{R_1 \Delta \theta} \right)^2 \frac{\Delta \theta \cot \theta_0}{2} (V_{i,j+1} - V_{i,j-1}) = 0 \quad (\text{C.34})$$

É possível então obter uma expressão para $\frac{\partial V}{\partial r}$ neste ponto do domínio, em termos do potencial nos pontos adjacentes:

$$- \left(-2\Delta r + 2\frac{(\Delta r)^2}{R_1} \right) \frac{\partial V}{\partial r} = \quad (\text{C.35})$$

$$(2V_{i+2,j} - 2V_{i,j}) + \left(\frac{\Delta r}{R_1 \Delta \theta} \right)^2 (V_{i,j+1} - 2V_{i,j} + V_{i,j-1}) + \quad (\text{C.36})$$

$$\left(\frac{\Delta r}{R_1 \Delta \theta} \right)^2 \frac{\Delta \theta \cot \theta_0}{2} (V_{i,j-1} - V_{i,j+1}) \quad (\text{C.37})$$

Substituindo a Equação C.6 na Equação C.35, obtém-se:

$$(2V_{i+2,j} - 2V_{i,j}) + \left(\frac{\Delta r}{R_1 \Delta \theta} \right)^2 (V_{i,j+1} - 2V_{i,j} + V_{i,j-1}) + \quad (\text{C.38})$$

$$\left(\frac{\Delta r}{R_1 \Delta \theta} \right)^2 \frac{\Delta \theta \cot \theta_0}{2} (V_{i,j-1} - V_{i,j+1}) = \quad (\text{C.39})$$

$$\frac{1}{\sigma_o} \left(-2\Delta r + 2\frac{(\Delta r)^2}{R_1} \right) + \left(C_m \frac{V_{i,j}^n - V_{i+1,j}^n}{\Delta t} - C_m \frac{V_{i,j}^{n-1} - V_{i+1,j}^{n-1}}{\Delta t} + I_{ep} \right) \quad (\text{C.40})$$

Após reordenar novamente para colocar em evidência os vários pontos do domínio no instante de tempo atual, é possível obter uma expressão do tipo:

$$A_{ij}V_{i,j} + A_{inj}V_{i-1,j} + A_{ipj}V_{i+1,j} + A_{ijn}V_{i,j-1} + A_{ijp}V_{i,j+1} = B \quad (\text{C.41})$$

onde:

$$A_{ij} = -2 - 2 \left(\frac{\Delta r}{R_1 \Delta \theta} \right)^2 + \frac{C_m}{\sigma_c \Delta t} \left(2\Delta r + 2 \frac{(\Delta r)^2}{R_1} \right) \quad (\text{C.42})$$

$$A_{inj} = -\frac{C_m}{\sigma_c \Delta t} \left(-2\Delta r + 2 \frac{(\Delta r)^2}{R_1} \right) \quad (\text{C.43})$$

$$A_{ipj} = 2 \quad (\text{C.44})$$

$$A_{ijn} = \left(\frac{\Delta r}{R_1 \Delta \theta} \right)^2 \left(1 - \frac{\Delta \theta \cot \theta_i}{2} \right) \quad (\text{C.45})$$


$$A_{ijp} = \left(\frac{\Delta r}{R_1 \Delta \theta} \right)^2 \left(1 + \frac{\Delta \theta \cot \theta_i}{2} \right) \quad (\text{C.46})$$

$$B = \frac{1}{\sigma_o} \left(-2\Delta r + 2 \frac{(\Delta r)^2}{R_1} \right) + \left[-\frac{C_m}{\Delta t} (V_{i,j}^{n-1} - V_{i+1,j}^{n-1}) + I_{ep} \right] \quad (\text{C.47})$$

Em que (C.43) corresponde ao ponto que está na interface com o meio interno. Observe que todos os valores usados para os coeficientes são constantes ao longo da simulação, e que os valores para B são conhecidos por utilizar apenas os valores do potencial no instante de tempo anterior.

ANEXO A – Artigo publicado

Evaluation of the Current in the Cell Membrane for Numerical Simulations of Electroporation

João F. C. Vale , Jaime A. Ramírez 

Graduate Program in Electrical Engineering - Federal University of Minas Gerais (UFMG) - Av. Antônio Carlos 6627, 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil. joaofcv@yahoo.com.br, jramirez@ufmg.br

Abstract— This study presents a rigorous numerical analysis of the current in the cell membrane, subjected to a uniform electric field, and its impact in the pore formation. The numerical model considers a single cell composed of uniform membrane and cytoplasm, in a suspension medium. The current in the cell membrane is calculated using two different approaches. The first uses a lumped parameters approach based on the geometry of the pore, while the second describes the flow of ions through the pore considering the interaction with the pore walls as an energy barrier. The formation and growth of the pores is solved using an asymptotic approximation of the Smoluchowski's equation. The electrical potential induced in the cell membrane, which is coupled with the current in the membrane, is resolved in spherical coordinates using the finite difference method. The two approaches have qualitatively similar results but significant quantitative differences in the number and radii of pores. The ionic flow approach has resulted in the formation of fewer pores and reduced pore growth. Approximately 38,000 fewer pores are created, a 21% difference, and the largest pores are approximately 8nm smaller, a 24% difference. Thus, this approach results in a less conductive membrane and smaller electroporated area.

Index Terms— Biological cell, Electromagnetics, Finite Difference Methods, Numerical simulation.

I. INTRODUCTION

A cell subjected to electric fields of sufficient strength but short duration exhibits the formation of pores, transient aqueous pathways, in its membrane, a phenomenon known as electroporation. This process can be reversible, with subsequent pore resealing, or irreversible with cell death [1]. Both versions of the phenomenon have several applications in medicine and biology [2]. While there is vast evidence of the process, the small size and transient nature of pores have made direct observation impossible so far. Thus, theoretical models are necessary to further our understanding of the electroporation process. A variety of numerical models that describe pore formation and growth in single cells [3]-[6] and in cell arrangements [7], [8] has been implemented.

Electroporation models are directly dependent on calculation of the transmembrane potential, V_m , and the current in the cell membrane, which are dependent of each other. While it is possible to obtain analytical solutions for an unchanging membrane, the formation of conducting pores significantly

changes the membrane properties. Thus, it is necessary to numerically solve the transmembrane potential simultaneously with the calculation of the pore density in order to accurately model the effects of electroporation.

The usual way of modeling this decrease in transmembrane potential, resulting from the increasing permeability, is by calculating an electroporation current through the pores [3], [4], [7], [9], [10] and treating intact areas of the membrane as uniform. This approach allows the modeling of the entire electroporation process in the scale of cells. Another possible way is molecular dynamics simulation, as seen in [11], [12], that models in detail the movement and energy of molecules in the membrane. However, the latter is limited to simulating small areas of the membrane, in the order of nanometers, and very simple bilayers (composed of only a few types of lipids) that don't correspond to real cell membranes [13] and the method has considerable computational cost even for relatively short simulations. This makes the method insufficient for simulations of the entire electroporation process.

It is possible to indirectly monitor the transport through the membrane by analyzing the intake of a marker substance, such as fluorescent dyes that bind to genetic material, membrane non-permeable dyes, magnetic nanoparticles, or cytotoxic substances [14]. This allows to discern whether electroporation has occurred, and gives a rough estimate of the size of the pores based on the dimensions of the transported molecules, but usually does not allow the observation of the process. Using more advanced methods such as rapid videoimaging systems, it is even possible to observe the temporal variation and spatial distribution of markers [15], [16]. Advanced optical techniques can also be used to detect changes in the membrane structure directly [17]. However, these methods have a low temporal resolution (in the order of seconds) that is not sufficient to model the fast stages of electroporation, particularly the formation and growth of the pores.

Other techniques are used to observe evidence of electroporation, such as using micropipettes to directly observe current flow through the membrane. This method allows for one of the best temporal resolutions (in the order of microseconds) and more direct observation, and has been used to obtain many electric and electroporation parameters used in theoretical and numerical models. However, the method is of difficult execution and, while it can be applied to small patches of the membrane, is still not able to observe individual micropores [14]. Thus, for most applications numerical simulation is the only available method for modeling the phenomenon with sufficient detail. In general, the most important parameters to model are the number of pores, their radii and distribution in the membrane.

The number of pores in the cell is especially important when using shorter pulses, with duration of few microseconds or less, as pore growth is a slower process and short pulses usually result in a large number of small pores with little variation in size. In some cases such as [7], the simulation is only run for a few nanoseconds and only the number of pores is considered. For longer pulses, a small number of very large pores is responsible for most of the transport of substances, but the fast creation of small pores is still responsible for a sudden increase in the cell membrane permeability in the early stages and the number of relatively large pores is important in general [3].

The size of the pore is a limiting factor for determining what substances can be introduced or removed from the cell [18]. Smaller molecules, like propidium iodide (2nm) that is used as an indicator of the creation of pores [6], can enter through relatively small pores. Conversely, bigger molecules like proteins and genetic code require much larger pores, though for those cases additional, non-passive transport mechanisms are also an important factor [2]. Thus, the pore radius plays a crucial role in the success of many applications. The number and size of the pores, in the form of the total electroporated area, are also an important information to determine cell survival for applications that use reversible electroporation. As more and especially bigger pores are formed, cell leakage may cause cell death [2], [4]. For some applications, such as microbial deactivation in food [19] and tumor treatment, achieving this threshold earlier is desired so that ohmic heating is minimized.

Accurate modeling of the current in the cell membrane is necessary for obtaining a good estimation of the size and number of pores, which is necessary in many applications. It is also important to choose the characteristics of the pulse, to build an appropriate circuit and to establish experimental protocols. However, due to the impossibility of measuring the current directly in this scale, the modeling must rely on rigorous physical modeling of the process.

The contribution of this work is an evaluation of the current in the cell membrane, using a numerical model based on an asymptotic approximation of the Smoluchowski's equation [20] and the Laplace's equation for the electric potential. Both systems of equations are solved using the finite difference method in spherical coordinates. Two approaches for calculating the current through the pores, i.e. the lumped parameter and the ionic flow, are implemented and compared. The main results are reported in terms of the transmembrane potential, the electroporation current, the number of pores in the membrane and the radii of the pores. The two approaches result in large differences in the number of pores and their radii.

The paper is organized as follows. The models and methods section describes the biological context of electroporation, the geometry of the problem, the fundamental equations employed to model the electroporation phenomenon, the theoretical basis for the two approximations of current in the cell membrane and the implementation details of the numerical simulation. The results section presents a comparison between the two currents in terms of the temporal evolution of the number, size and distribution of the pores in the cell membrane. It also analyses the implication of those results for practical applications of electroporation process. Finally, the conclusion summarizes the findings drawn from this work. In Appendix A, further details are given on the derivation of the equations.

II. MODELS AND METHODS

A. History and theory of electroporation

Evidence of electroporation was first observed in 1958 [21] as a sudden and unexplainable increase in conductivity of some membranes. While many hypotheses were formulated in the following decades (weaver), it is now generally a consensus that the increase in membrane permeability is the

result of the formation of transient aqueous pathways (pores) in the membrane [1], [13].

The current theoretical models assume that initial pore formation happens due to energy fluctuations in the membrane. Without an applied electric field, pores are formed spontaneously, but due to their small size (smaller than 1nm) and instability (lasting less than 1ns) no significant transport occurs. The applied electric field lowers the energy threshold necessary for the creation of larger and more stable pores. A minimum transmembrane potential of approximately 1V is necessary in order to observe electroporation, with the fast creation of a large number of pores (the pore creation stage lasts a few nanoseconds). Once created, the pores continue to grow for as long as the external electric field is maintained. Thus, if the electric field is applied for a long enough time, uncontrolled pore growth can lead to membrane rupture and cell death. Conversely, if the electric pulse is sufficiently short, the pores can spontaneously reseal and the cell can survive. After the electric field is interrupted, the pores will shrink quickly (on the scale of microseconds), but will not fully reseal for a much longer time (in the scale of seconds or even minutes) [3].

Pores are initially created in a hydrophobic state, in which the polar molecules in the membrane restrict the passage of water and soluble substances. As the pore grows, reorientation of the molecules causes the pore to become hydrophilic (conducting). Most models ignore the hydrophobic stage, assuming that pores are created with a minimum size of 0.51 nm, the size at which pores become hydrophilic [1], [3].

B. Geometry of the problem

The numerical model considers the problem of a single cell in a sparse suspension, such that there is no effect from nearby cells. The cell is assumed perfectly spherical; while that is an obvious simplification and is inaccurate for cells in tissues or clusters, it is a sufficient approximation for cells in suspensions, which are usually approximately spherical [22], [23].

The model is divided into three regions, as can be seen in Fig. 1: cytoplasm, membrane, and external medium. Each of these regions is assumed to have uniform properties and the membrane to have uniform thickness. While these are also simplifications, they are necessary due to the difficulty of obtaining accurate measurements for those properties in greater detail.

The dimensions and properties used in the model are given by Table I. The cytoplasm and external medium are described by their electrical conductivities σ_c and σ_o respectively; the electrical permittivity is ignored due to the mostly conductive nature of those media. The membrane, however, is described by a surface conductance σ_m , capacitance C_m , and resting potential V_{rest} . The use of a conductance and capacitance instead of conductivity and permittivity follows [3]. While the formation of pores alters the area of the membrane, and consequently C_m , this effect is insignificant for the time scales considered as seen in [24].

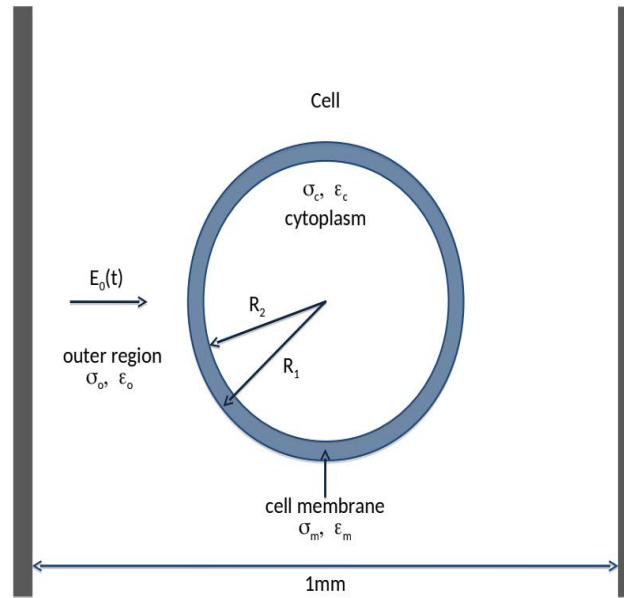


Fig. 1. Geometry of the problem (not to scale).

TABLE I. DIMENSIONS AND PROPERTIES OF THE CELL AS GIVEN BY [3]

Parameter	Physical meaning	Value
R_1	External radius	$50 \cdot 10^{-6}$ m
R_2	Internal radius	$49.995 \cdot 10^{-6}$ m
σ_o	External medium conductivity	5 S/m
σ_c	Cytoplasm conductivity	0.455 S/m
C_m	Membrane capacitance	10^{-2} F/m ²
σ_m	Membrane conductivity	2 S/m ²
V_{rest}	Membrane resting potential	-0.08 V

The electric pulse is applied between two parallel plates, as seen in Fig. 1. It consists of a single square pulse with duration of $9\mu\text{s}$ and intensity of 40kV/m , following the methodology of [3]. This pulse is convenient as it allows the observation of the membrane charging process before the electroporation threshold is reached, the short pore formation period, and also the beginning of the much longer pore growth period. The plates are much bigger than the size of the cell and are treated as infinite planes, resulting in a uniform electric field in the \hat{z} direction.

The problem can be reduced to two dimensions, considering the rotational symmetry of the electric field around the \hat{z} axis. The problem can be further reduced to only a half-sphere, though not to a quarter sphere because the superposition of the applied electrical field with the rest potential of the membrane acts differently on each pole of the cell. This is discussed next.

C. Electroporation equations

The electroporation process is generally described by the Smoluchowski's equation that describes pore formation and growth in terms of the pore density function $n(r_p, t)$, as seen in [1], [3]:

$$\frac{\partial n(r_p, t)}{\partial t} + D \frac{\partial}{\partial r_p} \left(\frac{-\partial \varphi(r_p, t)}{\partial r_p} \frac{1}{kT} - \frac{\partial n(r_p, t)}{\partial r_p} \right) = S(r_p) \quad (1)$$

where r_p is the pore radius, D is the pore diffusion constant, k is the Boltzmann constant and T is the absolute temperature. $S(r_p)$ is the source term representing the creation and destruction of pores:

$$S(r_p) = \frac{v_c}{kT} \frac{\partial \varphi(r_p, t)}{\partial r_p} e^{-\varphi(r_p)/kT} dr \quad (2)$$

where v_c is the fluctuation rate. $\varphi(r_p, t)$ is the function that describes pore energy, given by:

$$\varphi(r_p, t) = U(r_p) - \pi a_p r_p^2 V_m^2(t) \quad (3)$$

where $U(r_p)$ is the energy value with no applied potential, a_p is a property of the membrane and V_m is the transmembrane potential.

In this work, an asymptotic approximation of the Smoluchowski's equation is used [20]. Following [3], equations (1)-(3) are rearranged into a form that directly outputs the number of pores N and the radius of the pores r_j , which are convenient for implementing the simulation directly using finite differences.

The rate of pore formation in the cell membrane, based on the equilibrium pore number N_{eq} , is given by [3]:

$$\frac{dN}{dt} = \alpha e^{(V_m/V_{ep})^2} \left(1 - \frac{N}{N_{eq}(V_m)} \right) \quad (4)$$

where N is the number of pores, α is the creation rate coefficient, V_m is the transmembrane potential, V_{ep} is the characteristic voltage of electroporation. The equilibrium pore number N_{eq} is given by:

$$N_{eq}(V_m) = N_0 e^{q(V_m/V_{ep})^2} \quad (5)$$

where N_0 is the equilibrium pore density for $V_m = 0$ and q is a constant for the pore creation rate.

The rate of growth for the radius of each of the K individual pores already created is given by:

$$\frac{dr_j}{dt} = U(r_j, V_m, S_{eff}), j = 1, 2, \dots, K \quad (6)$$

in which the source term U is defined by

$$U(r, V_m, S_{eff}) = \frac{D}{kT} \left[\frac{V_m^2 F_{max}}{1+r_h/(r+r_t)} + 4\beta \left[\frac{r}{r_x} \right]^4 \frac{1}{r} \right] + \frac{D}{kT} [-2\pi\gamma + 2\pi S_{eff}r] \quad (7)$$

with D being the pore radius diffusion coefficient, k the Boltzmann constant, T the absolute temperature, F_{max} the maximum electrical force for $V_m = 1V$, r_h and r_t constants for the advection velocity, β the energy associated with steric repulsion, γ the edge energy, r_x is the minimum pore radius for conducting pores and S_{eff} is the effective membrane tension given by:

$$S_{eff}(A_p) = 2S' - \frac{2S' - S_0}{1 - A_p/A} \quad (8)$$

where A_p is the combined electroporated area (adding all the pores) and A is the total membrane area, S' is the tension of the hydrocarbon-water interface and S_0 is the tension of the membrane

without pores. The values of all the constants and parameters are given by Table II.

TABLE II. PARAMETERS OF THE ASYMPTOTIC SMOLUCHOWSKI'S EQUATION AS GIVEN BY [3]

Parameter	Physical meaning	Value
k	Boltzman constant	$1.38 \cdot 10^{-23} \text{ J/K}$
T	Absolute temperature	300 K
N_0	Equilibrium pore density	$1.5 \cdot 10^9 \text{ 1/m}^2$
D	Pore radius diffusion coefficient	$5 \cdot 10^{-14} \text{ m}^2/\text{s}$
q	Constant for pore creation rate	2.4606
V_{ep}	Characteristic voltage of electroporation	0.258V
r_x	Minimum pore radius	$0.51 \cdot 10^{-9} \text{ m}$
r_h	Constant for advection velocity	$0.97 \cdot 10^{-9} \text{ m}$
r_t	Constant for advection velocity	$0.31 \cdot 10^{-9} \text{ m}$
α	Creation rate coefficient	$1 \cdot 10^9 \text{ 1/(m}^2\text{s)}$
β	Steric repulsion energy	$1.4 \cdot 10^{-19} \text{ J}$
γ	Edge energy	$1.8 \cdot 10^{-11} \text{ J/m}$
F_{max}	Max electric force for $V_m = 1 \text{ V}$	$0.7 \cdot 10^{-9} \text{ N/V}^2$
S'	Tension of hydrocarbon-water interface	$2 \cdot 10^{-2} \text{ J/m}^2$
S_0	Tension of membrane without pores	$1 \cdot 10^{-6} \text{ J/m}^2$

D. Calculation of the transmembrane potential

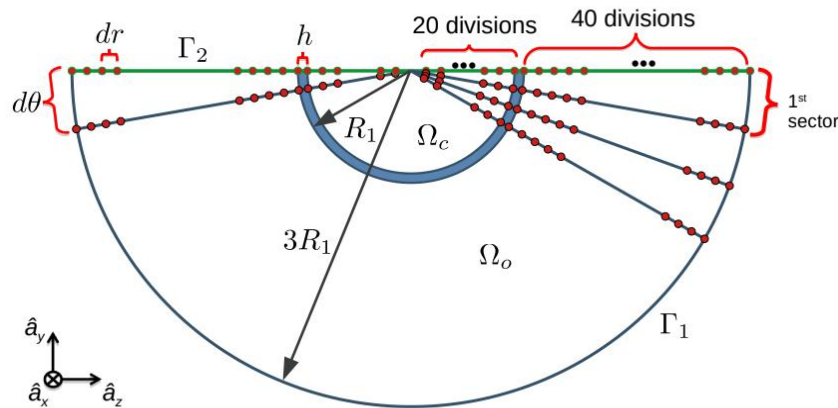


Fig. 2. Discretization of the problem (not to scale).

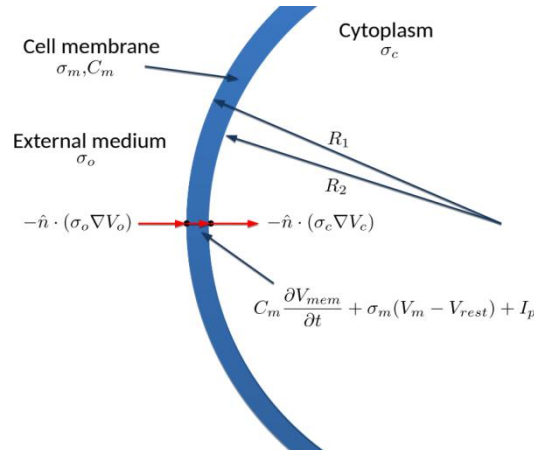


Fig. 3. Current continuity and cell properties (not to scale).

The transmembrane potential, V_m , is the difference between the potential on both sides of the membrane:

$$V_m(\theta) = V_c(r, \theta)|_{r=R_2} - V_o(r, \theta)|_{r=R_1} \quad (9)$$

in which V_c is the potential in the cytoplasm and V_o is the potential in the external medium.

The potential in the external medium and inside the cell is obtained by solving the Laplace's equation at each time instant, according to:

$$\nabla^2 V_o = 0|_{\Omega_o} \quad (10)$$

$$\nabla^2 V_c = 0|_{\Omega_c} \quad (11)$$

The problem can be reduced to a half-sphere due to the symmetry of the problem, with a simple Neumann boundary condition in the symmetry axis Γ_2 . The problem has also a Dirichlet boundary condition in the limits of the domain Γ_1 (set as a semi-spherical shell with three times the pore radius). This boundary condition indicates that the electric field far from the cell converges to the electrical field between the parallel plates with value of $E_0(t)$, as given by:

$$V_o(t, r, \theta) = -E_0(t)rcos(\theta), r \rightarrow \infty \text{ in } \Gamma_1 \quad (12)$$

The interface conditions are given by the continuity of potential and current in the interface. The potential continuity is given by:

$$V_o|_{r=R_1} = V_{mem}|_{r=R_1} \quad (13)$$

$$V_c|_{r=R_2} = V_{mem}|_{r=R_2} \quad (14)$$

and the current by:

$$-\hat{n} \cdot (\sigma_c \nabla V_c) = -\hat{n} \cdot (\sigma_o \nabla V_o) = C_m \frac{\partial V_{mem}}{\partial t} + \sigma_m (V_m - V_{rest}) + I_p \quad (15)$$

in which I_p is the electroporation current, defined as the sum of the currents through each individual pore:

$$I_p(\theta) = \sum_{j=1}^{K(\theta)} \frac{i_p(r_j, V_m)}{\Delta A} \quad (16)$$

with i_p being the current for an individual pore, ΔA is the area for that section of the membrane and j being the index of individual pores within the group K of all pores in that division.

Fig. 3 illustrates the continuity of current in the problem. The presence of the I_p term in (15) causes V_m to depend strongly on the current through the pores, and consequently on the pore formation process. As a result, V_m must be calculated numerically, coupled with the pore formation simulation, and an approximation to calculate i_p must be used.

The finite difference method is chosen to solve the system of equations (10)-(11) due to its simplicity and the ability to easily model the domain. A spherical coordinate system is adopted to allow for more accurate representation of the spherical cell and the Laplace's equation is discretized using central differences.

The domain is discretized in 60 divisions on the r direction, 20 in the cytoplasm and 40 in the external medium, and 64 divisions in the θ direction [3], as represented in Fig. 2. The membrane,

however, is treated differently, as it is much thinner than the r division (5nm and 2.5 μ m respectively), and using a sufficiently fine discretization in the entire domain would greatly increase the computational cost. The membrane is treated as a single division, with length equal to membrane thickness h , between segments 20 and 21.

A system of equations is created using the coefficients of the discretized Laplace's equation, which is solved at each instant (with a time step of 1.5ns) for updated values of I_p . Equations (4) and (6) are discretized using forward differences and solved at each instant for the newly updated value of V_m , resulting in the updated number of pores and their respective radii. That, in turn, allows the calculation of I_p using the approximations described in sections II.D and II.E. This is detailed in Appendix A.

E. Lumped parameters approximation for the current through a pore

This approach is a simplification first proposed in [25] for the modeling of large pores. Due to the large radius of the pores, the non-ohmic interactions between the pore walls and the flowing charges were ignored. However, in later works such as [3] this assumption was not explicitly mentioned and later works by different groups, such as [7], used this simplification uncritically for the modeling of populations consisting entirely of small pores.

In this approximation, the current through each pore is calculated by the series association of two resistances:

$$i_p = \frac{V_m}{R_p + R_i} \quad (17)$$

where R_p is the resistance of a cylinder representing the pore. Using Ohm's law:

$$R_p = \frac{h}{\pi \sigma r_p^2} \quad (18)$$

and R_i is a non-linear input resistance that models the non-uniform current in the interface between a large conducting medium and a relatively narrow conducting cylinder embedded in a non-conducting surface, following the methodology found in [26]:

$$R_i = \frac{1}{2\sigma r_p} \quad (19)$$

where h is the membrane thickness, r_p is the pore radius and $\sigma = 2$ S/m is the conductivity of the solution filling the pore.

The main advantage of this approach is its simplicity. It uses a simple geometric model that does not require extensive knowledge of the pore formation mechanism. However, it has the disadvantage of not representing more complex effects, like interaction between charges and the pore walls.

F. Ionic flow approximation for the current through a pore

In this approximation, the current is calculated as the flow of ions through the electropores, as described in [27]. This approach uses a variation of the Nernst-Planck equation, that describes active (potential-driven) and passive (osmosis and diffusion) transport of substances through the membrane. By modeling the transport of ions across the pore caused by the potential difference, it derives a

relation between voltage and current for each individual pore.

This approach was used in [10], but the model failed to consider the spatial distribution of the potential in the cell. The same approach was used for a more complete simulation in [4], [22], using a commercial finite elements software. The formulation used in this paper follows that presented in [28].

The current on a pore of radius r_p is given by:

$$i_p = V_m \frac{\pi \sigma_p^2 (1 - e^{-V_m^x})}{e^{-V_m^x} w_0 e^{(w_0 + nV_m^x) + nV_m^x} w_0 e^{(w_0 - nV_m^x) - nV_m^x}} \quad (20)$$

where w_0 is the energy barrier inside the pore that models the interaction between the pore walls and the ions, q_e is the electron charge, n is the relative size of the pore entrance region and V_m^x is a normalized potential given by:

$$V_m^x = V_m \frac{q_e}{kT} \quad (21)$$

The parameters are given in Table II and Table III. This approach has the advantage of being more complete, with the inclusion of an energy barrier and a more detailed physical model for the conduction through the pore. Its main disadvantage is the increased complexity.

TABLE III. PARAMETERS FOR ION FLOW CALCULATION AS GIVEN BY [28]

Parameter	Physical meaning	Value
q_e	Electron charge	$1.602 \cdot 10^{-19}$ C
w_0	Energy barrier	$8.411 \cdot 10^{-19}$ J
n	Relative size of the entrance	0.15

G. Numerical implementation

The simulation was run for the duration of a single electrical pulse (9 μ s), simulating the pore formation and the start of the pore growth period but not the pore resealing – which happens on a much slower timescale, of milliseconds or even seconds, making simulation less practical. The pores created at each time instant and in each angular division of the membrane are treated as a single group for purposes of radius increase calculations.

III. RESULTS

A. General characteristics of the electroporation process

Electroporation happens in three distinct stages, as can be seen in Fig. 4 and Fig. 5: membrane charging, pore creation and pore growth. In the first stage, the membrane is intact and behaves mostly like a dielectric with very small losses, being charged by the applied pulse until the transmembrane potential reaches the electroporation threshold value of 1V. The first pore is created at 49.45ns, marking the start of the very fast pore formation stage in which a large number of new pores are created very quickly. All pores are created with a minimum radius of 0.51 nm, which is the size at which pores become conductive. As current starts being conducted through the pores, the potential

falls and pore creation slows down. After $1.75\mu\text{s}$ the potential falls below the threshold and pore creation stops completely, starting the pore growth stage in which no new pores are created but the existing pores continue to increase in size for the remaining duration of the simulation.

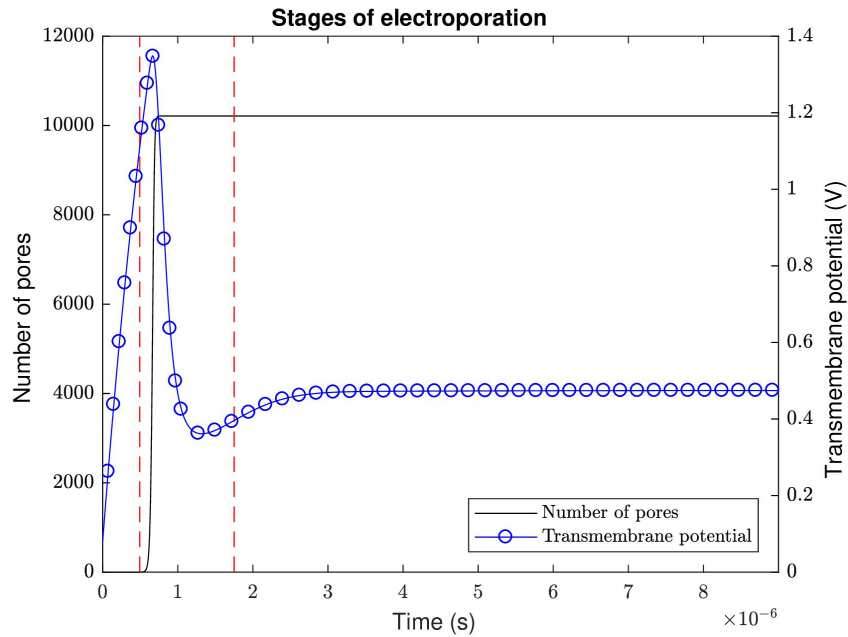


Fig. 4. The three stages of electroporation, compared with the number of pores and the transmembrane potential in the division $\theta = 0^\circ$. Data obtained using the lumped parameters method.

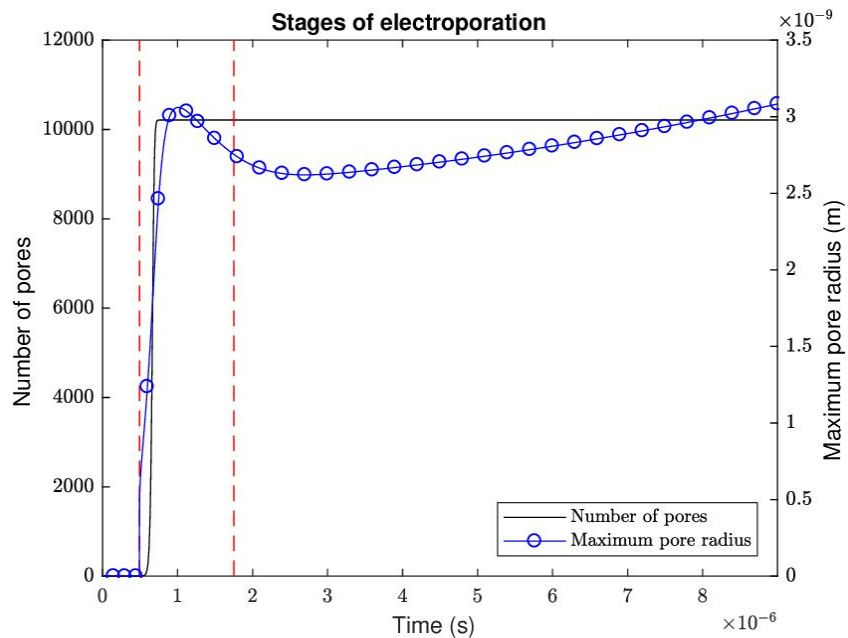


Fig. 5. The three stages of electroporation, compared with the number of pores and the maximum pore radius in the division $\theta = 0^\circ$. Data obtained using the lumped parameters method.

Spatially, the electroporation process differs as one moves along the membrane, as can be seen in Fig. 6. Due to the alignment with the direction of the applied pulse, the potential increases very quickly and reaches the threshold early in the regions around the poles $\theta=0^\circ$ and $\theta=180^\circ$. This causes

the creation of a very large number of pores in these regions, as can be seen in Fig. 6. The largest pores appear on $\theta=129.9^\circ$ and its vicinity, and on the other half of the cell the pore radius peaks on $\theta=53.44^\circ$. These regions have fewer pores than the poles, which causes the potential to fall more slowly during the pore creation stage and stabilize at a higher value during the pore growth stage and consequentially causes faster pore growth. In the central region of the membrane, from approximately $\theta=60^\circ$ to approximately $\theta=120^\circ$, the potential never increases above the threshold necessary for pore creation and as a result no pores are present in this region.

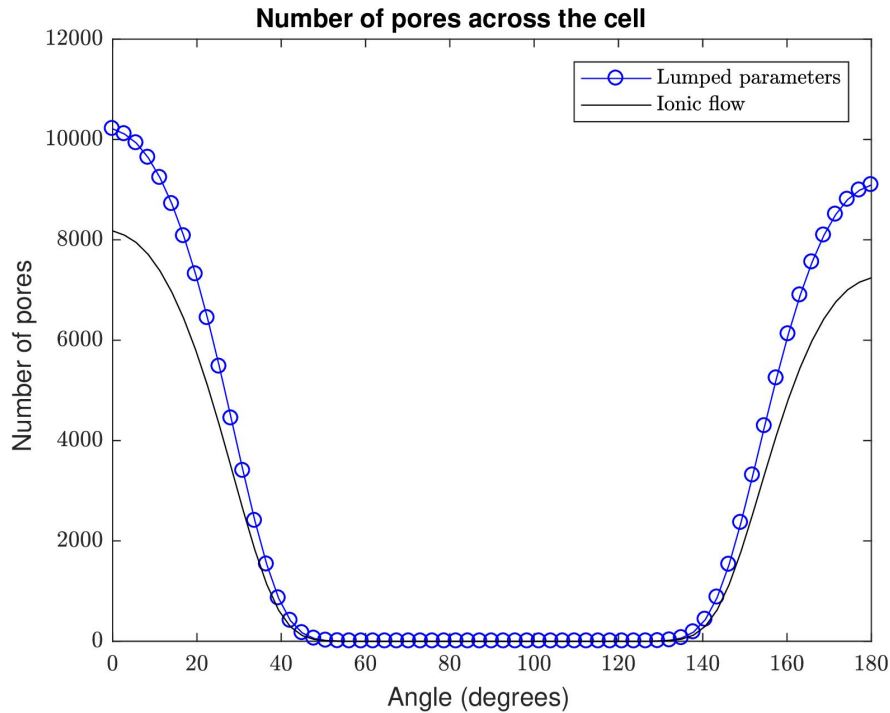


Fig. 6. Spatial distribution of the number of pores and maximum radius of pores after $9\mu\text{s}$. Data obtained using the lumped parameters method.

B. Transmembrane potential

The simulation for both approximations resulted in qualitatively similar but quantitatively different transmembrane potentials and electroporation currents. The temporal variation of those quantities can be seen on Fig. 7 and Fig. 8., taken for a single angular division at $\theta=0^\circ$ and truncated at $2\mu\text{s}$ for easier visualization of the relevant phenomena. The spatial variation of the transmembrane potential can be seen on Fig. 9, taken at the final time instant simulated.

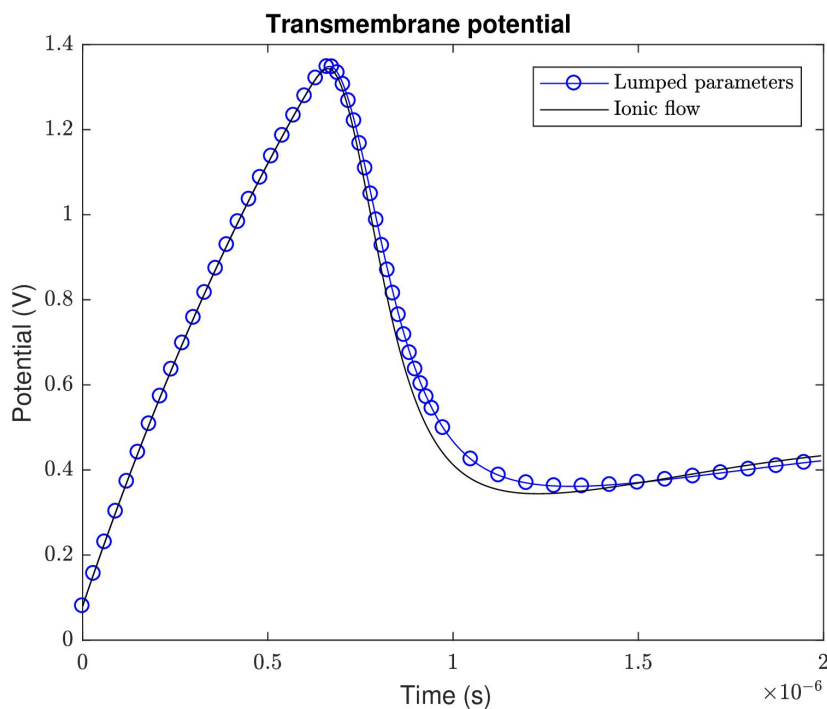


Fig. 7. Comparison of V_m with different methods for the division $\theta=0^\circ$.

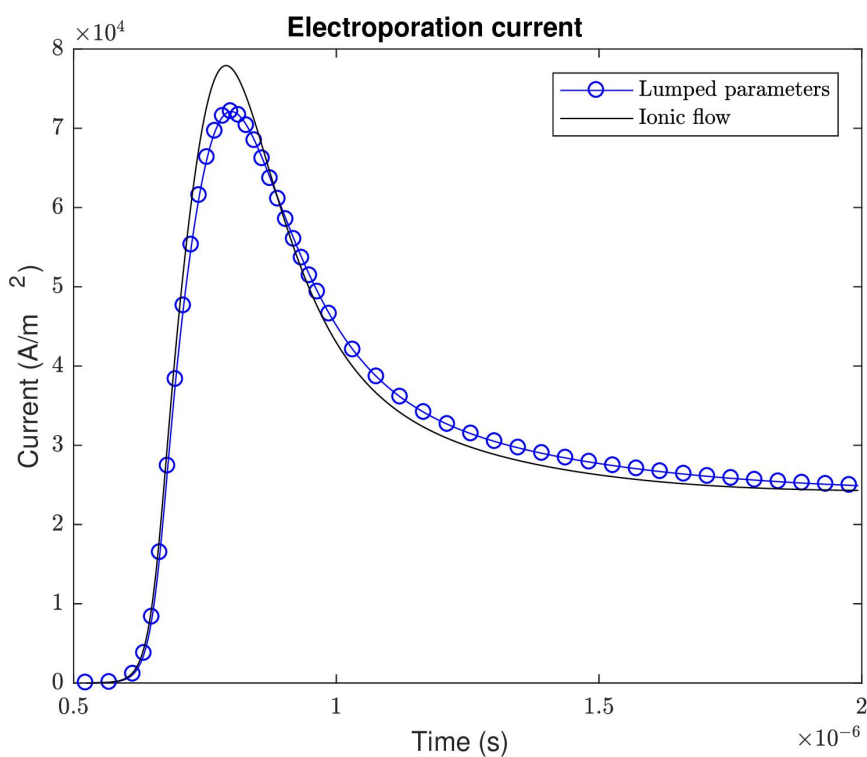


Fig. 8. Comparison of I_p with different methods for the division $\theta=0^\circ$.

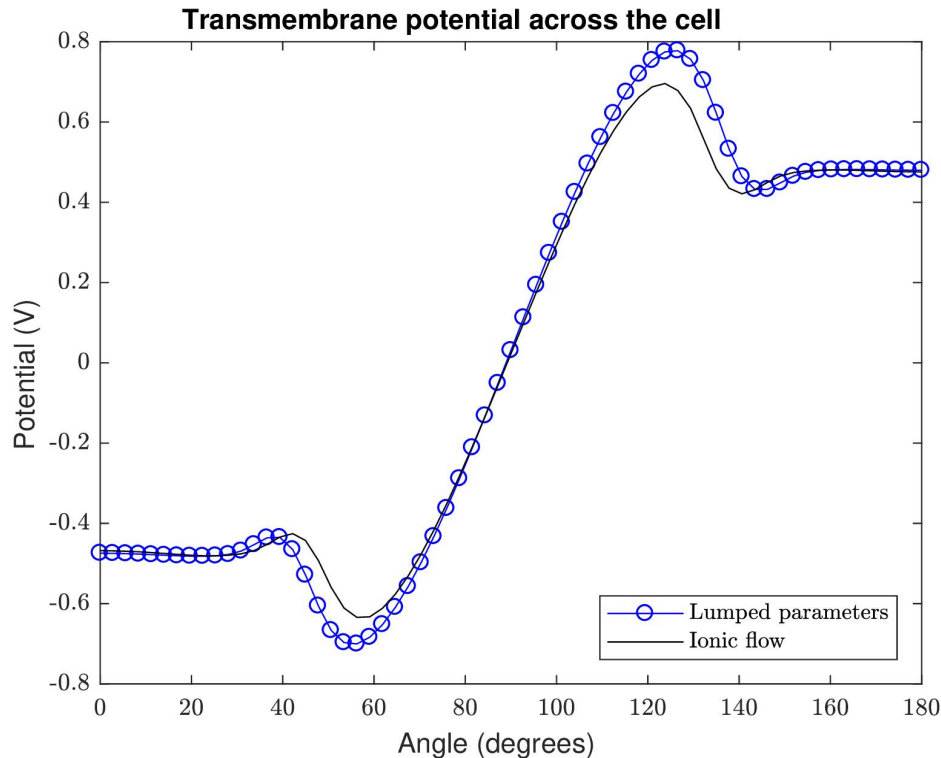


Fig. 9. Transmembrane potential across the membrane after $9\mu\text{s}$.

Fig. 7 shows that the transmembrane potential reaches approximately the same peak value. The lumped parameters approximation results in a bigger potential by less than a 0.5% difference, but the ionic flow approximation results in a noticeably faster drop. This is reflected by the similarly earlier fall in the current in Fig. 8, and impacts the rate of pore creation and eventual end of the pore creation stage. For the $\theta=0^\circ$ division, the potential stabilizes at approximately 0.474V for the lumped parameters approximation and 0.468V (at $6.622\mu\text{s}$) for the ionic flow, a difference of approximately 1.1% that, as will be seen, impacts the pore growth stage. As can be seen on Fig. 9, the equilibrium value varies significantly for different divisions but the lumped parameter approach results in larger values across the entire membrane.

As can be easily seen on Fig. 8, the ionic flow approximation results in a much larger current peak (77.91kA/m^2) than the lumped parameters approximation (72.11 kA/m^2). In the earlier stage the difference between the two is proportionally much larger, up to a 23.1% difference, decreasing after approximately 600ns. The ionic flow current also reaches its peak and starts decreasing earlier than the lumped parameters current. For both cases, after a brief oscillation the current mostly stabilizes with less than a 0.1% difference between the two approximations after $4.143\mu\text{s}$.

C. Number of pores

The number of pores created over time for the $\theta=0^\circ$ division can be seen on Fig. 10, while the number of pores created for the entire simulation can be seen on Fig. 11.

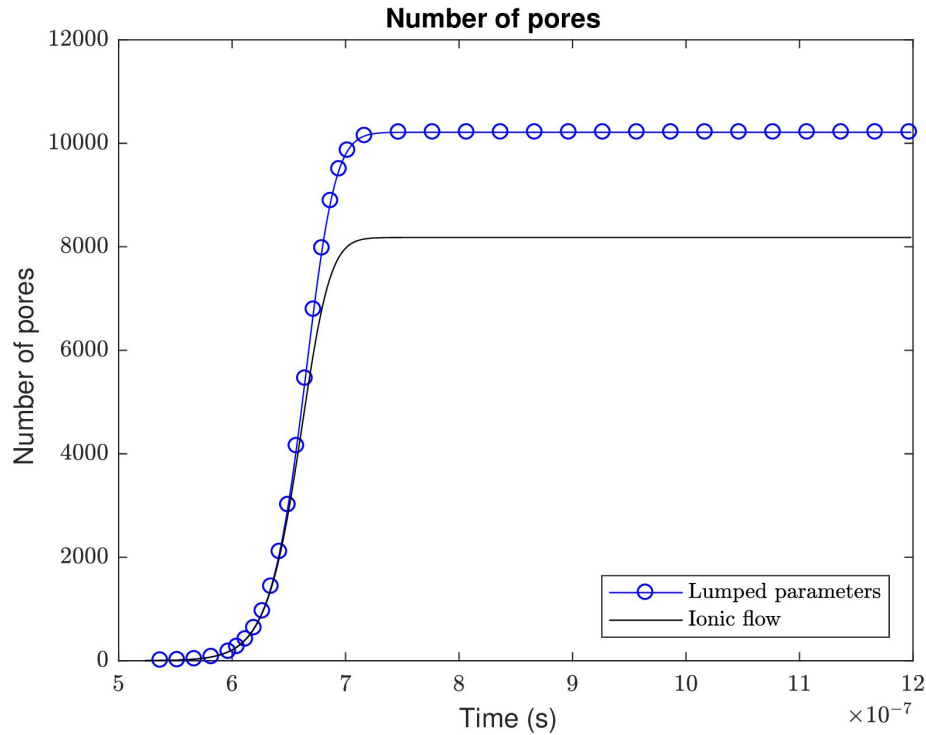


Fig. 10. Number of pores of all sizes for the division $\theta=0^\circ$.

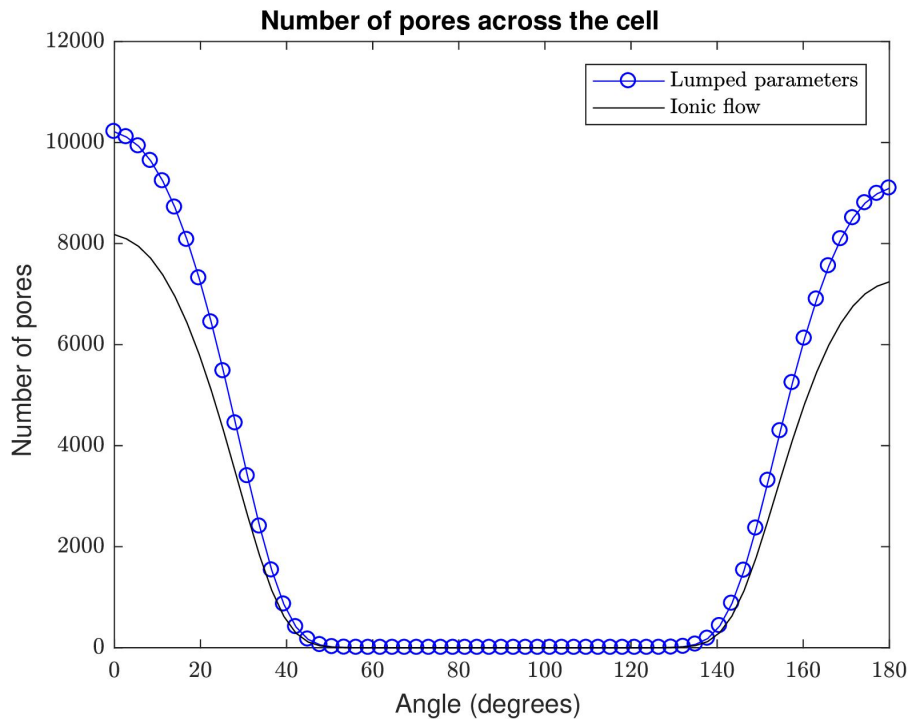


Fig. 11. Number of pores across the membrane after $9\mu\text{s}$.

It can be easily seen that the lumped parameters approximation results in the creation of a larger number of pores. For both approximations, the first pore appears at the same time instant, but the rate of pore creation becomes significantly different after a few hundred pores have been created. When the pore creation stops, the lumped parameters approach has resulted in the creation of 2,034 more

pores than the ionic flow approach in the $\theta=0^\circ$ division alone. The total difference is of 37,904 pores in the simulated half of the cell.

D. Pore radius

The pore growth can be seen on Fig. 12 and Fig. 13. Fig. 12 shows only the maximum pore radius for the division $\theta=0^\circ$ and is truncated at $5\mu\text{s}$ for better visualization of the early stages. Fig. 13 compares the pore growth for two divisions, $\theta=180^\circ$ and $\theta=45^\circ$, for the entire $9\mu\text{s}$ simulated. The pore radius distribution across the membrane can be seen on Fig. 14, that plots the maximum pore radius for each division after $9\mu\text{s}$.

From those results, it can be seen that the lumped parameters approach results in not only more pores, but also faster pore growth. This can be easily attributed to a higher transmembrane potential during two different stages: in the pore creation stage the decrease in the potential happens later for the lumped parameters approach, leading to a period where the voltage is higher right after the formation of many pores. During the pore growth stage the equilibrium potential is slightly higher, causing faster pore growth over an extended period of time. Likewise, pore growth is faster for pores near $\theta=129.9^\circ$ and $\theta=53.44^\circ$, with an increasing difference between regions as the simulation progresses.

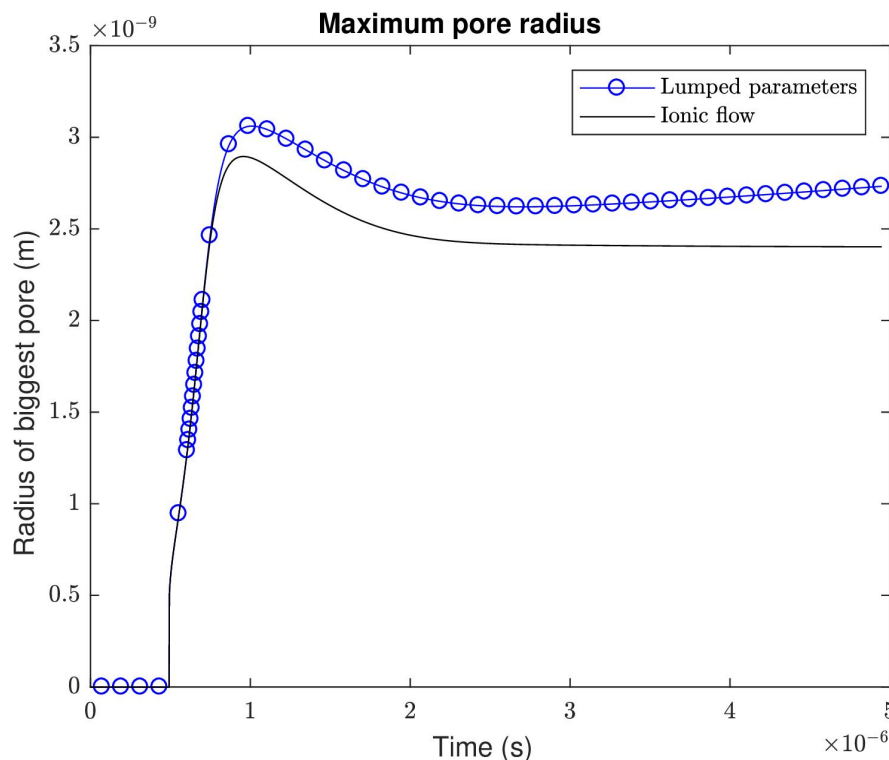


Fig. 12. Radius of the biggest pore for the division $\theta=0^\circ$.

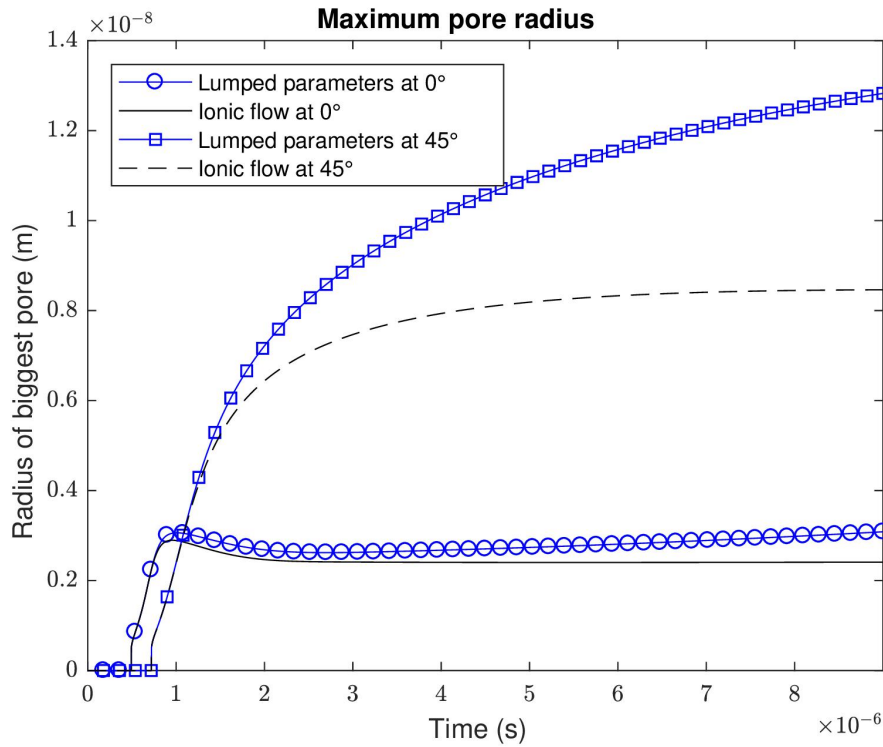


Fig. 13. Radius of the biggest pore for the divisions $\theta=0^\circ$ and $\theta=45^\circ$.

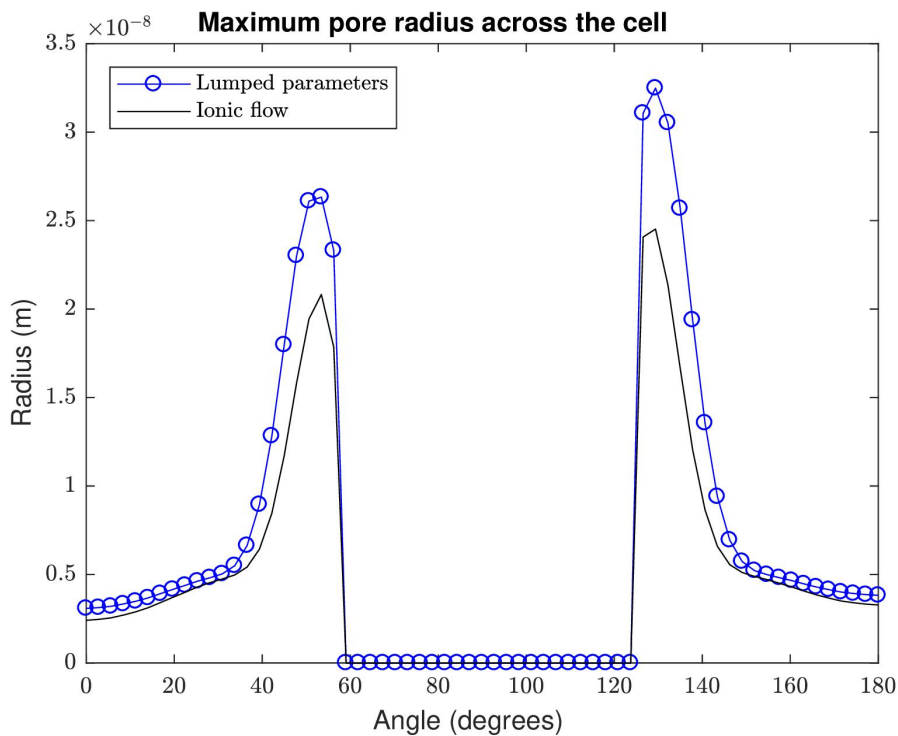


Fig. 14. Radius of the biggest pore across the membrane after $9\mu\text{s}$.

It should be noted that for the division $\theta=0^\circ$ the pore radius has a local maximum during the pore creation stage, while pores in division $\theta=45^\circ$ grow monotonically. In the former, potential increases very quickly resulting in fast pore growth, but the sudden drop in the potential due to the creation of a large number of pores results in a small shrinkage.

E. Analysis of the differences between the approaches

It can be deduced that the current obtained through the ionic flow approximation is significantly smaller than that obtained through the lumped parameters approximation for the early stages of the electroporation. This causes a slower drop in the transmembrane potential, with the membrane subjected to a higher potential for a longer time. This in turn results in higher pore creation and pore growth rates during the short pore formation stage.

Eventually, the system reaches a state of near equilibrium, as the system displays a "negative feedback" behavior: high potential causes the formation and growth of pores, which in turn increase the current causing the potential to decrease. As the potential falls below the pore creation threshold new pores stop being created, ending the pore creation stage. While the pores continue to grow due to the small but still significant potential in this equilibrium, it is a much slower process compared to the sudden creation of thousands of pores and fast increase in their radii and its impact on the electroporation current is not observable in the time scales of this study – after several milliseconds it will result in pore shrinkage, with complete pore resealing taking even longer, as seen for example in the similar simulations in [3]. However, it can be observed that the slightly higher equilibrium potential for the lumped parameters approximation results in an increasing difference in pore radius during the early parts of the pore growth stage.

F. Impact on applications

As mentioned, many applications are strongly dependent on the size and number of pores in the membrane. Those using shorter pulses, on the order of nanoseconds, are generally more concerned with the number of pores rather than with the pore radius. On the other hand, applications that require the transport of substances with large molecules have pore radius as a primary concern. For applications where the conductivity is important, as well as applications where cell death or viability are the main concern, both quantities are relevant.

The different approximations for the current in the cell membrane result in significant differences in those quantities, with an obvious impact in those applications. The ionic flow approach predicts the creation of more and larger pores, and consequently a more conductive membrane with a larger electroporated area. This suggests that electric pulses with lower intensity and/or shorter duration should be used to obtain the same effect, compared to the pulses predicted by the lumped parameters approach.

IV. CONCLUSION

The different approximations for the calculation of current through electropores have clear and significant quantitative effects on the simulation of the electroporation process. While they are qualitatively similar and display broadly the same overall characteristics such as the distinct stages of the process and the same spatial distribution, any application that relies on the accurate calculation of

electroporation characteristics must pay special attention to accurately modeling the electroporation current.

The lumped parameters approximation is a simpler theoretical model, that relies exclusively on geometric and average electrical properties. It estimates a larger current, especially for small (recently formed) pores, which results in less pores for all divisions of the membrane, smaller pore radius through the entire process and slower pore growth resulting in increasing differences over time.

The ionic flow approximation uses a more complex and comprehensive physical model to calculate the current through electropores. This results in a lower estimate for the current and consequent formation of more pores and faster pore growth.

The tests were run using Matlab, in an Intel i5-3210M with 8GB of RAM using Kubuntu Linux. The tests using the lumped parameters approach took approximately 45 seconds and those using the ionic flow approach took approximately 53 seconds. Thus, the lumped parameters approach is significantly faster, as expected, though the computational cost of the ionic flow approach is not prohibitive.

Both models are approximations derived from physical models, due to the impossibility of directly observing the current through individual pores. However, the assumptions, such as pores being relatively large and the energy barrier being negligible, made by the lumped parameters approximation are less general. Such assumptions might not be true for the starting stages of electroporation or for very short pulses, as pore growth is significantly slower than pore formation. The ionic flow approximation does not make those assumptions, and thus it is recommended despite its higher complexity and computational cost.

APPENDIX

As described in II.B, the electroporation process is described by (4)-(6), which are derived from an asymptotic approximation of Smoluchowski's equation.

In order to simulate the process, those equations are discretized using forward finite differences, with a discrete time step Δt .

The discretization of (4) results in:

$$N_k^{n+1} = \left(\frac{(1-u_n(V_m))}{1+u_n(V_m)} N_k^n + \frac{\alpha \Delta t e^{(V_m/V_{ep})^2}}{1+u_n(V_m)} \right) \quad (22)$$

where the superscript n is used to indicate the current time step. The auxiliary term u_n is given by:

$$u_n(V_m) = \frac{\Delta t \alpha}{2N_0} e^{(1-q)(V_m/V_{ep})^2} \quad (23)$$

while the discretization of (6) results in:

$$r_j^{n+1} = r_j^n + \frac{D \Delta t}{kT} \frac{(r_j^n + r_t)}{r_j^n + r_t + r_n} F_{max} V_m^2 + \frac{D \Delta t}{kT} \left[4\beta (r_x)^4 \frac{1}{(r_j^n)^5} + 2\pi \sigma_{eff} r_j^n \right] - 4\beta (r_x)^4 2\pi \gamma \quad (24)$$

The potential is obtained by solving the Laplace's equation (10). However, due to the geometry of the problem, spherical coordinates are used, and the expanded Laplace's equation is given in this coordinate system by:

$$\nabla^2 V(r, \theta) = \frac{\partial^2 V}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial V}{\partial r} + \frac{1}{r^2} \frac{\partial^2 V}{\partial \theta^2} + \frac{\cos \theta}{r^2 \sin \theta} \frac{\partial V}{\partial \theta} = 0 \quad (25)$$

By discretizing this equation using central finite differences, with divisions $\Delta\theta$ and Δr and indexes i and j respectively, we obtain:

$$V(i, j) = \frac{1}{2 \left(1 + \frac{1}{(i\Delta\theta)^2}\right)} \times \left[\left(1 + \frac{1}{i}\right) V(i+1, j) + \left(1 - \frac{1}{i}\right) V(i-1, j) \right. \\ \left. + \left(\frac{1}{(i\Delta\theta)^2} + \frac{\cos j \Delta\theta}{2i^2 \Delta\theta \sin j \Delta\theta}\right) V(i, j+1) + \left(\frac{1}{(i\Delta\theta)^2} - \frac{\cos j \Delta\theta}{2i^2 \Delta\theta \sin j \Delta\theta}\right) V(i, j-1) \right] \quad (26)$$

To prevent singularities, special treatment must be given to equations at the lines corresponding to $\theta=0^\circ$ and $\theta=180^\circ$, as seen in [29]. This is done by applying Neuman boundary conditions at the boundary Γ_2 and replacing $V(i, j+1) = V(i, j-1)$ in the equations above. This results in a slightly different equation given by:

$$V(i, 0) = \frac{1}{2 \left(1 + \frac{1}{(i\Delta\theta)^2}\right)} \times \left[\left(1 + \frac{1}{i}\right) V(i+1, 0) + \left(1 - \frac{1}{i}\right) V(i-1, 0) \right] \quad (27)$$

$$V(i, j_{max}) = \frac{1}{2 \left(1 + \frac{1}{(i\Delta\theta)^2}\right)} \times \left[\left(1 + \frac{1}{i}\right) V(i+1, j_{max}) + \left(1 - \frac{1}{i}\right) V(i-1, j_{max}) \right] \quad (28)$$

More importantly, the interface condition in the membrane also requires special treatment, as the potential in different media can not be used to calculate the potential on either side of the interface. Instead, the first term of the Taylor expansion for the current in the interface as a function of the potentials and properties of the same media is replaced in the interface condition equation (12). This results in a different set of equations for the points on the interface, as seen in:

$$\left[2 \left(1 + \frac{1}{(i_{R_2} \Delta\theta)^2}\right) - \frac{2C_m \Delta r}{\sigma_o \Delta t} \left(-1 + \frac{1}{i_{R_2}}\right) \right] V(i_{R_2}, j) \\ + \frac{2}{\sigma_o} \left(1 + \frac{1}{(i_{R_2} \Delta\theta)^2}\right) \left(\frac{C_m}{\Delta t} V_m(j) + \sigma_m V_m(j) + I_{ep} \right) = 2V(i_{R_2}, j+1) - \frac{2C_m \Delta r}{\sigma_o \Delta t} \left(1 - \frac{1}{i_{R_2}}\right) V(i_{R_2}, j-1) \quad (29) \\ + \frac{+1}{(i_{R_2} \Delta\theta)^2} \left(1 - \frac{\Delta\theta \cot(j\Delta\theta)}{2}\right) V(i_{R_2}-1, j) + \frac{1}{(i_{R_2} \Delta\theta)^2} \left(1 + \frac{\Delta\theta \cot(j\Delta\theta)}{2}\right) V(i_{R_2}+1, j)$$

$$\left[-2 \left(1 + \frac{1}{(i_{R_1} \Delta\theta)^2}\right) + \frac{2C_m \Delta r}{\sigma_c \Delta t} \left(1 + \frac{1}{i_{R_1}}\right) \right] V(i_{R_1}, j) \\ + \frac{2}{\sigma_c} \left(1 + \frac{1}{(i_{R_1} \Delta\theta)^2}\right) \left(\frac{C_m}{\Delta t} V_m(j) + \sigma_m V_m(j) + I_{ep} \right) = 2V(i_{R_1}, j-1) + \frac{2C_m \Delta r}{\sigma_c \Delta t} \left(1 + \frac{1}{i_{R_1}}\right) V(i_{R_1}, j+1) \quad (30) \\ + \frac{+1}{(i_{R_1} \Delta\theta)^2} \left(1 - \frac{\Delta\theta \cot(j\Delta\theta)}{2}\right) V(i_{R_1}-1, j) + \frac{1}{(i_{R_1} \Delta\theta)^2} \left(1 + \frac{\Delta\theta \cot(j\Delta\theta)}{2}\right) V(i_{R_1}+1, j)$$

Equations (27), (28), (29) and (30), taken for every point in the domain, create a system of equations that relates the potential at each point to the one in the nearby points. In the boundaries of the domain, a fixed value is imposed representing the current value of the applied pulse. This system is resolved at every time instant for the updated pulse value and also the updated electroporation

current. The resulting potential is used to solve the electroporation equations, with the corresponding electroporation current to be used in the next iteration.

ACKNOWLEDGMENT

This work has been supported by the Brazilian agencies Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

REFERENCES

- [1] T. Kotnik, P. Kramar, G. Pucihar *et al.*, “Cell membrane electroporation- part 1: The phenomenon,” *Electrical Insulation Magazine*, IEEE, vol. 28, no. 5, pp. 14–23, September 2012.
- [2] S. Haberl, D. Miklavcic, G. Sersa *et al.*, “Cell membrane electroporation-part 2: the applications,” *Electrical Insulation Magazine, IEEE*, vol. 29, no. 1, pp. 29–37, January 2013.
- [3] W. Krassowska and P. D. Filev, “Modeling electroporation in a single cell,” *Biophysical Journal*, vol. 92, no. 2, pp. 404–417, 2007.
- [4] P. Lamberti, S. Romeo, A. Sannino *et al.*, “The role of pulse repetition rate in nspef-induced electroporation: A biological and numerical investigation,” *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 62, no. 9, pp. 2234–2243, Sept 2015.
- [5] W. Ying and C. S. Henriquez, “Hybrid finite element method for describing the electrical response of biological cells to applied fields,” *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 54, no. 4, pp. 611–620, April 2007.
- [6] J. A. Ramirez, W. P. Figueiredo, J. F. C. Vale *et al.*, “Investigation of the electroporation effect in a single cell,” *COMPEL - The international journal for computation and mathematics in electrical and electronic engineering*, vol. 32, no. 5, pp. 1692–1706, 2013.
- [7] J. Dermol-Cwerner and D. Miklavcic, “From cell to tissue properties - modeling skin electroporation with pore and local transport region formation,” *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 65, no. 2, pp. 458–468, 2018.
- [8] R. Susil, D. Semrov, and D. Miklavcic, “Electric field-induced transmembrane potential depends on cell density and organization,” *Electro-and magnetobiology*, vol. 17, no. 3, pp. 391–399, 1998.
- [9] G. Pucihar, D. Miklavcic, and T. Kotnik, “A time-dependent numerical model of transmembrane voltage inducement and electroporation of irregularly shaped cells,” *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 56, no. 5, pp. 1491–1501, May 2009.
- [10] R. P. Joshi, Q. Hu, R. Aly *et al.*, “Self-consistent simulations of electroporation dynamics in biological cells subjected to ultrashort electrical pulses,” *Phys. Rev. E*, vol. 64, p. 011913, Jun 2001.
- [11] Q. Hu, Z. Zhang, H. Qiu *et al.*, “Physics of nanoporation and water entry driven by a high-intensity, ultrashort electrical pulse in the presence of membrane hydrophobic interactions,” *Phys. Rev. E*, vol. 87, p. 032704, Mar 2013.
- [12] V. Sridhara and R. Joshi, “Evaluations of a mechanistic hypothesis for the influence of extracellular ions on electroporation due to high-intensity, nanosecond pulsing,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, vol. 1838, no. 7, pp. 1793–1800, 2014.
- [13] A. A. Gurtovenko, J. Anwar, and I. Vattulainen, “Defect-Mediated Trafficking across Cell Membranes: Insights from in Silico Modeling,” *Chem Review*, vol. 110, pp. 6077–6103, 2010.
- [14] T. B. Napotnik and D. Miklavcic, “In vitro electroporation detection methods – An overview,” *Bioelectrochemistry*, vol. 120, pp. 166–182, 2018.
- [15] L. Rems and D. Miklavcic, “Tutorial: Electroporation of cells in complex materials and tissue,” *Journal of Applied Physics*, vol. 119, no. 20, 2016.
- [16] M. A. Chiapperino, L. Mescia, P. Bia *et al.*, “Experimental and Numerical Study of Electroporation Induced by Long Monopolar and Short Bipolar Pulses on Realistic 3D Irregularly Shaped Cells,” *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*, vol. 67, no. 10, pp. 2781–2788, Oct 2020.
- [17] E. K. Moen, B. L. Ibey, H. T. Beier *et al.*, “Quantifying pulsed electric field-induced membrane nanoporation in single cells,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, vol. 1858, no. 11, pp. 2795–2803, 2016.
- [18] T. Kotnik, W. Frey, M. Sack *et al.*, “Electroporation-based applications in biotechnology,” *Trends in Biotechnology*, vol. 33, no. 8, pp. 480–488, 2015.
- [19] E. J. Araújo, I. J. S. Lopes, and J. A. Ramirez, “Computational modeling approach for the optimisation of a pulsed electric field system for liquid foods,” *IET Science, Measurement & Technology*, vol. 13, pp. 337–345(8), May 2019.
- [20] J. C. Neu and W. Krassowska, “Asymptotic model of electroporation,” *Phys. Rev. E*, vol. 59, pp. 3471–3482, Mar 1999.
- [21] R. Stämpfli, “Reversible electrical breakdown of the excitable membrane of a ranvier node,” *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, vol. 30, pp. 57–63, 1958.
- [22] W. Krassowska and J. Neu, “Response of a single cell to an external electric field,” *Biophysical Journal*, vol. 66, no. 6, pp. 1768–1776, 1994.
- [23] T. Kotnik and D. Miklavcic, “Analytical description of transmembrane voltage induce by electric fields on spheroidal cells,” *Biophysical Journal*, vol. 79, no. 2, pp. 670–679, 2000.

- [24] A. Garner, N. Chen, J. Yang, J. Kolb *et al.*, “Time domain dielectric spectroscopy measurements of hl-60 cell suspensions after microsecond and nanosecond electrical pulses,” *Plasma Science, IEEE Transactions on*, vol. 32, no. 5, pp. 2073–2084, Oct 2004.
- [25] K.C. Smith, J.C. Neu, W. Krassowska, “Model of Creation and Evolution of Stable Electropores for DNA Delivery”, *Biophysical Journal*, vol 86, pp. 2813-2826, 2004.
- [26] J. Newman, “Resistance for flow of current to a disk,” *Journal of the Electrochemical Society*, vol. 113, no. 5, pp. 501–502, 1966.
- [27] A. Barnett, “The current-voltage relation of an aqueous pore in a lipid bilayer membrane,” *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, vol. 1025, no. 1, pp. 10 – 14, 1990.
- [28] P. Lamberti, V. Tucci, S. Romeo *et al.*, “nspef-induced effects on cell membranes: use of electrophysical model to optimize experimental design,” *IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*, vol. 20, no. 4, pp. 1231–1238, August 2013.
- [29] O. Momoh, M. Sadiku, and C. Akujuobi, “Solution of axisymmetric potential problem in spherical coordinates using exodus method,” *Session 4P3 Novel Mathematical Methods in Electromagnetics 2*, p. 673, 2010.