

MODELO DE REGULAÇÃO DOS
NUCLEOTÍDEOS EXTRACELULARES NO
LÍQUIDO SUPERFICIAL DAS VIAS
RESPIRATÓRIAS

TAUANNE DIAS AMARANTE

MODELO DE REGULAÇÃO DOS
NUCLEOTÍDEOS EXTRACELULARES NO
LÍQUIDO SUPERFICIAL DAS VIAS
RESPIRATÓRIAS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Física.

ORIENTADOR: JAFFERSON KAMPHORST LEAL DA SILVA
COORIENTADOR: GUILHERME JOSÉ DE MORAES GARCIA

Belo Horizonte

Março de 2012

Agradecimentos

Agradeço...

Ao Jafferson pela inteligência, experiência e bom humor.

Ao Guilherme pela calma, conhecimento e pelo sorriso.

A ambos pela paciência e prontidão.

Aos meus pais pelos genes e pelo amor. Imprescindíveis.

Plâncton e Pança, vocês não entendem o que faço, mas eu só entendo por causa de vocês.

Aos meus irmãos por serem as melhores pessoas do mundo.

Ao Lorenzo, por cada segundo.

À Mabel, segunda mãe.

Aos amigos, segunda casa... vivo um pouco em cada um... vivo um pouco porque cada um de vocês existe.

À Isabella, pelos dons autocadísticos e carinho.

À Beluga por ser um Basset Hound.

Aos amigos não físicos por não fazerem idéia do que eu faço e se empolgarem mesmo assim...

Ao Calvin, Haroldo e à Mafalda...

Aos amigos da física e do laboratório pela companhia e felicidade diária.

Ao CNPq, à Capes e à Fapemig pelo incentivo à pesquisa.

Ao Oscar Nassif de Mesquita e ao Marcelo Lobato Martins por terem participado da banca, contribuindo para a melhoria desse trabalho.

“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser conhecida.”

(Carl Sagan)

Resumo

Os nucleotídeos extracelulares desempenham um papel fundamental na regulação do transporte mucociliar e, dessa forma, são essenciais na defesa das vias respiratórias contra patógenos inalados. Os nucleotídeos adenosina trifostafato (ATP), adenosina difosfato (ADP) e adenosina monofosfato (AMP) são secretados pelo epitélio respiratório para o líquido superficial das vias respiratórias, onde são metabolizados por ecto-enzimas e transformados nos nucleosídeos adenosina (ADO) e inosina (INO) que, por sua vez, são absorvidos pelas células do epitélio respiratório. São as concentrações de ATP e ADO extracelulares que, ao ativar os receptores $P2Y_2$ e A_{2B} na membrana celular, regulam a taxa de secreção de muco, a frequência de batimento ciliar e a hidratação e viscosidade do muco.

Esta rede bioquímica de regulação das concentrações de ATP e ADO extracelulares foi recentemente descrita quantitativamente por um modelo computacional baseado em dados experimentais coletados em culturas de células do epitélio respiratório humano. Embora este modelo tenha reproduzido dados experimentais *in vitro*, ele não podia ser usado para investigar a regulação de nucleotídeos extracelulares *in vivo*, já que se baseou em culturas de célula contendo líquido a uma altura de $\sim 1500\mu\text{m}$, enquanto *in vivo* a altura do líquido superficial é da ordem de $30\mu\text{m}$.

Com o intuito de adaptar o modelo computacional para descrever o comportamento do sistema *in vivo*, selecionamos dados experimentais da literatura em que a rede de regulação foi investigada para alturas do líquido superficial variando de $14\mu\text{m}$ a $2730\mu\text{m}$. A nova versão do modelo, proposta neste trabalho, consiste na solução da equação de reação-difusão em coordenadas cilíndricas, com condições de contorno que expressam as reações catalisadas pelas ecto-enzimas na superfície do epitélio bronquial. O conjunto de equações diferenciais acopladas foi resolvido numericamente usando o método de volumes finitos. O método foi validado comparando a solução numérica com a solução analítica de dois casos particulares de condições de contorno: barreiras refletoras e fluxo constante em $z = 0$. Utilizando o modelo, investigamos o comportamento dos nucleotídeos após choque hipotônico, obtendo uma boa concordância com

os dados experimentais. Este modelo pode ser importante para o desenvolvimento de novas terapias para patologias respiratórias, especialmente da Fibrose Cística. Os indivíduos portadores dessa doença genética apresentam quadro de infecção pulmonar crônica devido a uma falha no transporte mucociliar, que inclui a desidratação do muco e a secreção de muco em excesso.

Abstract

Extracellular nucleotides play a key role in the regulation of mucociliary clearance and thus are essential in protecting the airways against inhaled pathogens. Adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP) and adenosine monophosphate (AMP) nucleotides are secreted by the respiratory epithelium to the airway surface liquid, where they are metabolized by ecto-enzymes and converted into the nucleosides adenosine (ADO) and inosine (INO) which in turn are absorbed by the cells of the respiratory epithelium. The concentrations of extracellular ATP and ADO, by activating the membrane receptors P2Y₂ and A_{2B}, regulate the mucus secretion rate, the ciliary beating frequency, and mucus hydration and mucus viscosity.

The biochemical network that regulates the concentrations of extracellular ATP and ADO was recently described quantitatively by a computer model based on experimental data collected in cultures of human respiratory epithelial cells. Although this model reproduced the experimental data, it could not be used to investigate the regulation of extracellular nucleotides *in vivo*, because it was based on cell cultures containing fluid at a height of $\sim 1500\mu\text{m}$, while *in vivo* the height of the airway surface liquid is approximately $30\mu\text{m}$.

Aiming to adapt the computer model to describe the behavior of the system *in vivo*, we selected from the literature experimental data where the regulatory network was investigated for liquid surface heights ranging from $14\mu\text{m}$ to $2730\mu\text{m}$. The new version of the model, proposed in this work, consists in the solution of the reaction-diffusion equation in cylindrical coordinates, with boundary conditions that express the reactions catalyzed by ectonucleotidases on the surface of the bronchial epithelium. The set of coupled differential equations was solved numerically using the finite volume method. The numerical solution was validated by comparing it with the analytical solution of two particular cases of boundary conditions: reflective barriers and constant flux at $z = 0$. Using the model, we investigate the behavior of the nucleotides after hypotonic challenge, the results are in good agreement with the experimental data. This model can be important for the development of new therapies for respiratory

pathologies, especially cystic fibrosis. Individuals with this genetic disease have chronic bacterial infection in the lungs due to a failure in mucociliary clearance, that includes mucus dehydration and excessive mucus secretion.

Lista de Figuras

1.1	Hipótese de desidratação do muco	3
1.2	Diagrama da rede de sinais bioquímicos que regula a hidratação do muco respiratório.	6
2.1	Diagrama esquemático de transporte e metabolismo dos nucleotídeos no ASL	9
2.2	Comparação das previsões modelo descrito na seção 2.1 com os dados experimentais	12
	(a) Concentração dos nucleotídeos após a adição de 100 μM de ATP .	12
	(b) Concentração dos nucleotídeos no estado estacionário	12
2.3	Concentração estacionária de ATP em culturas de células do epitélio bronquial humano, medida experimentalmente para diferentes volumes.	14
2.4	Concentração de ATP no tempo após choque hipotônico medida experimentalmente por diferentes técnicas	15
2.5	Concentração de ATP no tempo após o choque hipotônico na presença de inibidores das enzimas	18
2.6	Volume de controle	19
3.1	Comparação entre a solução numérica e a solução analítica com condição de fronteira de barreiras refletoras.	23
	(a) Plano $z = 0$	23
	(b) Plano $r = 0$	23
3.2	Comparação entre a solução numérica e a solução analítica com condição de fronteira de fluxo constante em $z = 0$	24
	(a) Plano $z = 0$	24
	(b) Plano $r = 0$	24
3.3	Convergência da solução numérica para $t = 300\text{s}$	25
	(a) Erro médio por ponto em função do passo no tempo (Δt)	25
	(b) Erro médio por ponto em função de Δr	25

3.4	Concentração média de ATP no volume após choque hipotônico prevista pelo modelo com difusão	26
3.5	Picos da concentração de ATP	27
	(a) Previsão do modelo	27
	(b) Experimental	27
3.6	Concentração média de ATP em $z = 0$ após choque hipotônico prevista pelo modelo com difusão	28
3.7	Concentração estacionária de ATP prevista pelo modelo com difusão	29
3.8	Concentração média de ADO no volume após choque hipotônico prevista pelo modelo com difusão	30
3.9	Concentração média de ADO em $z = 0$ após choque hipotônico prevista pelo modelo com difusão	30
3.10	Previsão do modelo com difusão para a concentração média em $z = 0$ de ATP, ADP, AMP, ADO e INO	31
3.11	Previsão do modelo com difusão para a concentração média no volume de ATP, ADP, AMP, ADO e INO	31
A.1	Volume de controle	35
A.2	“Metade” do volume de controle na fronteira $r=R$	38
A.3	“Metade” do volume de controle na fronteira $z=0$	40
A.4	“Metade” do volume de controle na fronteira $z = H$	43
A.5	Discretização em uma dimensão	47
A.6	Malha bidimensional	49

Lista de Tabelas

2.1	Parâmetros cinéticos que regulam as reações.	11
-----	--	----

Sumário

Agradecimentos	iii
Resumo	v
Abstract	vii
Lista de Figuras	ix
Lista de Tabelas	xi
1 Introdução	1
1.1 Motivação biológica: A Fibrose Cística e os nucleotídeos extracelulares	1
1.1.1 Fibrose Cística	1
1.1.2 Transporte mucociliar	4
1.1.3 Rede bioquímica que controla o transporte mucociliar: o papel dos nucleotídeos extracelulares	4
1.2 Proposta e estrutura do trabalho	6
2 Modelo computacional de reação e difusão de nucleotídeos em culturas de células do epitélio respiratório	8
2.1 Modelo de regulação dos nucleotídeos extracelulares sem difusão	8
2.2 Motivação para incluir difusão no modelo	13
2.3 Dados experimentais	13
2.4 Modelo de regulação dos nucleotídeos extracelulares com difusão	15
2.5 Método de volumes finitos	19
3 Resultados	22
3.1 Solução numérica versus solução analítica	22
3.1.1 Barreiras refletoras	22
3.1.2 Fluxo constante em $z=0$	23

3.1.3	Convergência da solução numérica	24
3.2	Resultados	25
3.2.1	Comparação das previsões do modelo proposto com os dados experimentais	25
3.2.2	Previsões adicionais do modelo com difusão	27
4	Conclusão	32
Apêndice A Solução numérica da equação de difusão em coordenadas cilíndricas pelo método de volumes finitos		
		34
A.1	Discretização da equação de difusão usando o método dos volumes finitos	34
A.2	Condições de contorno	37
A.2.1	Condição de contorno em $r=R$	37
A.2.2	Equação de discretização em $r=0$	40
A.2.3	Condição de contorno em $z=0$	40
A.2.4	Condição de contorno em $z=H$	42
A.3	Pontos extremos	44
A.3.1	Em $r=0$ e $z=0$	45
A.3.2	Em $r=R$ e $z=0$	45
A.3.3	Em $r=R$ e $z=H$	46
A.3.4	Em $r=0$ e $z=H$	46
A.4	Solução das equações discretizadas	46
A.4.1	Algoritmo TDMA para problemas unidimensionais	47
A.4.2	Algoritmo linha-por-linha para problemas bidimensionais	49
Apêndice B Solução analítica da equação de difusão em coordenadas cilíndricas		
		51
B.1	Equação de difusão com barreiras refletoras	51
B.1.1	Separação de variáveis	52
B.1.2	Resolvendo a equação em t	53
B.1.3	Resolvendo a equação em z	53
B.1.4	Resolvendo a equação em r	53
B.1.5	Solução geral	54
B.1.6	Solução analítica para uma condição inicial ortogonal às auto- funções	56
B.2	Equação de difusão com fluxo constante F em $z=0$	56
B.2.1	Solução geral	56
B.2.2	Solução analítica para uma condição inicial específica	59

Capítulo 1

Introdução

1.1 Motivação biológica: A Fibrose Cística e os nucleotídeos extracelulares

1.1.1 Fibrose Cística

A Fibrose Cística (FC) é uma das doenças genéticas mais comuns nos seres humanos, atingindo aproximadamente oitenta mil pacientes em todo o mundo. A Fibrose Cística afeta o sistema respiratório, o pâncreas, o intestino, as glândulas sudoríparas e o aparelho reprodutor [1]. As consequências mais severas dessa patologia estão relacionadas à infecção bacteriana crônica nas vias respiratórias. Nos pulmões a FC provoca a destruição dessas vias, levando o paciente à morte prematura [2]; atualmente a expectativa de vida desses pacientes é de 37 anos.

Essa doença se deve a uma mutação no gene CFTR que impede a proteína codificada por esse gene de atuar corretamente [3, 4]. Em indivíduos saudáveis, a proteína CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, reguladora da condutância iônica) atua tanto como canal de Cl^- como inibidor do canal epitelial de Na^+ (Epithelial Sodium Channel, ENaC), tendo, portanto, um papel fundamental na hidratação do ASL (Airway Surface Liquid), o líquido superficial das vias respiratórias.

Em condições normais, o transporte dos íons Cl^- e Na^+ através da membrana apical do epitélio respiratório ocorre da seguinte forma: o íon Cl^- é secretado através de dois canais, o canal CFTR e o canal ativado por cálcio (CaCC), enquanto o íon Na^+ é absorvido através do canal de Na^+ (ENaC) [5, 6]. Dado que o espaço entre as células é permeável aos íons Na^+ e Cl^- , absorção de Cl^- e secreção de Na^+ também ocorrem pelo caminho paracelular de acordo com o gradiente eletroquímico [7].

Inicialmente houve dificuldade em fazer a ligação entre o fenótipo da doença nos órgãos afetados, especialmente os pulmões, e a mutação na proteína CFTR. Uma das hipóteses sugeriria que a proteína mutada gerava uma síndrome inflamatória no epitélio [8], mas, além dessa hipótese ser incapaz de explicar a predisposição à infecção das vias respiratórias, experimentos fizeram com que fosse abandonada [9]. Outra hipótese supunha que a proteína CFTR normal funcionava como um receptor, promovendo a limpeza do epitélio e matando bactérias e que CFTR mutada não era capaz de fazê-lo. Como não foram encontradas evidências, essa suposição também foi abandonada [10, 2]. Outras teorias foram levantadas, porém estudos recentes [7, 11] indicam que a melhor hipótese que associa a mutação do gene CFTR ao fenótipo da Fibrose Cística é a de que a ausência da proteína CFTR induz a desidratação do muco e conseqüentemente a diminuição do transporte mucociliar (figura 1.1). Tal falha é causada pela deficiência no transporte iônico: a secreção de Cl^- fica restrita aos canais CaCCs e há uma absorção excessiva de Na^+ . Como conseqüência da diminuição de íons no ASL, a água é absorvida por osmose através das células para o sangue ocorrendo, assim, a desidratação do ASL [2, 5]. A desidratação do ASL provoca o colapso da camada periciliada, o aumento da concentração de muco e a adesão do muco à superfície das vias respiratórias. Como não há um transporte mucociliar adequado, as bactérias inaladas se acumulam no muco, gerando uma infecção bacteriana crônica nas vias aéreas.

As evidências experimentais a favor da hipótese da desidratação são:

- *In vitro*: Culturas de células epiteliais de pessoas saudáveis mantêm o volume de ASL adequado e regulam as concentrações de Na^+ e Cl^- , enquanto nas culturas de células de pacientes com FC há colapso do volume do ASL, absorção sem controle de Na^+ e baixa secreção de Cl^- [2].
- *In vivo*: Em ratos transgênicos com células modificadas para apresentar superexpressão de uma subunidade do canal ENaC e, assim, uma absorção exagerada de Na^+ , foram observados desidratação do ASL, obstrução das vias respiratórias e morte prematura [12, 13].
- Estudos clínicos: Inalação de solução salina hipertônica por pacientes com FC leva a uma melhora na função pulmonar, o que se acredita dever-se à hidratação do ASL em conseqüência do aumento na sua osmolaridade [13, 14].

Enquanto a hidratação do ASL depende da concentração de íons, o transporte de íons através dos canais depende da concentração extracelular de trifosfato de adenosina (ATP) e de adenosina (ADO), ou seja, as moléculas ATP e ADO são responsáveis por

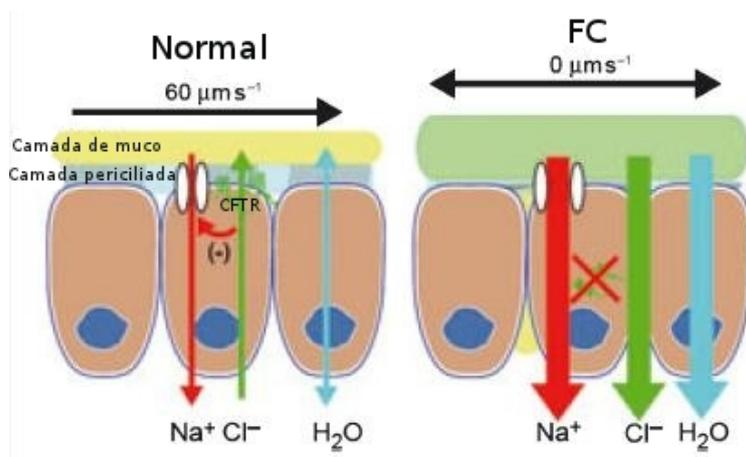


Figura 1.1: Hipótese de desidratação do muco devido à ausência da proteína CFTR. À esquerda: em indivíduos saudáveis, CFTR atua como canal de Cl^- e regula a absorção de Na^+ , promovendo a hidratação do ASL por osmose e transporte mucociliar adequado. À direita: em pacientes com FC, a ausência da proteína CFTR na membrana apical provoca superabsorção de Na^+ e falha na secreção de Cl^- e, em consequência, desidratação do muco e transporte mucociliar deficiente. Figura modificada de Boucher [13].

regular o volume do ASL. ATP é liberado pelas células epiteliais das vias respiratórias e se liga ao receptor P2Y_2 , o qual gera sinais intracelulares que resultam na inibição do canal ENaC e na ativação dos canais CFTR e CaCC (figura 1.2). Além disso, ATP é metabolizado pelas enzimas situadas na superfície das células produzindo ADO. ADO interage com receptores A_{2b} que ativam os canais CFTR e os induzem a inibir ENaC (figura 1.2) [2].

Em doenças crônicas, como a FC, a regulação de ATP e ADO é mais complexa devido ao recrutamento de células imunes e inflamatórias, as quais constituem fontes adicionais de nucleotídeos¹, ectonucleotidasas² e transportadores. A inflamação crônica das vias respiratórias de pacientes com FC estimula um enorme recrutamento de neutrófilos³, gerando danos extensos no pulmão e remodelação. Sabe-se que, durante a migração e ativação dos neutrófilos, são liberadas grandes quantidades de nucleotídeos, portanto é de se esperar que a concentração de purinas seja maior nas vias respiratórias de pacientes com FC. A partir de medidas experimentais *in vivo*, foi constatado que as concentrações de ATP e AMP nas secreções das vias respiratórias de pacientes com FC são ordens de grandeza maiores que em indivíduos saudáveis. Isso ocorre porque além

¹Nucleotídeos são compostos formados por açúcar (ribose ou desoxirribose), um grupo fosfato e uma base nitrogenada.

²Ectonucleotidasas são enzimas responsáveis por metabolizar nucleotídeos, localizadas na membrana celular e seus sítios de ativação são orientados para fora das células.

³Neutrófilos são células sanguíneas leucocitárias responsáveis pela defesa do organismo.

de liberar ATP, os neutrófilos são capazes de metabolizar ATP em AMP, mas não de converter AMP em ADO [15].

1.1.2 Transporte mucociliar

O epitélio das vias respiratórias é composto por diferente tipos de células: células caliciformes, células ciliadas e células basais. As células caliciformes são células de secreção mucosa, sendo o muco responsável por lubrificar a superfície luminal das vias respiratórias, proteger o epitélio e capturar partículas e patógenos inspirados. As células ciliadas, como o nome indica, são aquelas que possuem cílios e as células basais são responsáveis pela sustentação do epitélio. A primeira linha de defesa das vias respiratórias contra infecções é o transporte mucociliar. O transporte mucociliar é o mecanismo de retirada do material capturado pelo muco das vias respiratórias e consiste em: secreção de mucina, hidratação das vias respiratórias e batimento dos cílios [16].

As mucinas, glicoproteínas grandes secretadas no ASL por glândulas submucosas e células caliciformes, são componentes essenciais do transporte mucociliar. Sua função é de interceptar patógenos e toxinas e transportá-los para que sejam eliminados [16]. A secreção e composição anormais de mucina aumentam a gravidade das doenças obstrutivas das vias respiratórias, o que evidencia a sua importância [16].

Outro componente muito importante do transporte mucociliar é o batimento dos cílios. Cílios são estruturas móveis formadas essencialmente por dois microtúbulos centrais cercados por nove duplas de microtúbulos periféricos. Observou-se que na ausência de ATP intracelular o batimento dos cílios decai até parar completamente, provando a necessidade de ATP intracelular para que haja batimento dos cílios [16, 17]. Outros estudos [18, 19] mostraram que a frequência do batimento dos cílios é controlada pela concentração de ATP extracelular. É importante ressaltar que, enquanto o ATP intracelular atua como fonte de energia, ATP extracelular atua apenas como molécula sinalizadora.

1.1.3 Rede bioquímica que controla o transporte mucociliar: o papel dos nucleotídeos extracelulares

Os nucleotídeos de adenina (ATP, ADP e AMP) são liberados continuamente pelo epitélio das vias respiratórias no ASL e regulam funções biológicas importantes na defesa contra infecções, tais como: a secreção de muco, o transporte mucociliar e a hidratação do ASL [20, 21, 22].

Existem duas famílias de receptores responsáveis por mediar a ação dos nucleotídeos extracelulares: receptores P2X e receptores P2Y. Nas vias respiratórias, o receptor predominante é o P2Y₂, que é ativado de maneira similar por ATP e UTP (trifosfato de uridina), sendo o papel do ATP mais significativo porque sua concentração é bem superior à de UTP [22]. Subsequente à ocupação do receptor P2Y₂, se inicia a quebra dos fosfoinositídeos da membrana plasmática pela enzima fosfolipase C (PLC), gerando dois mensageiros secundários: inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) e diacilglicerol (DAG) (figura 1.2). DAG ativa as cascatas de sinalização dependentes da enzima PKC (proteína quinase C), enquanto IP₃ desencadeia o aumento na concentração de Ca²⁺ intracelular [22]. A ativação do receptor P2Y₂ promove a secreção de mucina, inibição do canal de Na⁺ ENaC e ativação do canal de Cl⁻ dependente de Ca²⁺ (CaCC) [22] (figura 1.2).

Na superfície do epitélio os nucleotídeos são desfosforilados em adenosina (ADO) e ADO é convertido em inosina (INO) pela enzima adenosina deaminase 1 (ADA₁). Três enzimas são responsáveis por catalizar a desfosforilação de ATP, ADP e AMP: NTPdases, NPPs e APs. Essas enzimas são chamadas de ectonucleotidases e agem de forma conjunta a fim de controlar a concentração dos nucleotídeos extracelulares [22].

ADO e INO são absorvidos pelo epitélio, retornando ao meio intracelular (citossol) através de transportadores de nucleosídeos⁴ chamados CNT3. A ação de ADO extracelular é mediada pelos receptores: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃, sendo que o receptor A_{2B} é o de maior expressão no epitélio das vias respiratórias. Este receptor é responsável por regular a frequência de batimento dos cílios e estimular a condutância do canal CFTR, assim como inibir o canal ENaC (figura 1.2).

As concentrações de ATP e ADO dependem das taxas de secreção, metabolismo e absorção de nucleotídeos [20, 21, 15]. Embora a concentração estacionária de ADO seja superior ao necessário para ativar o receptor A_{2B}, a concentração de estado estacionário do ATP no ASL de indivíduos saudáveis não é suficiente para ativar o receptor P2Y₂ [22].

Além do fluxo basal constante de ATP, a secreção de ATP é induzida por estímulos mecânicos (como o movimento do pulmão durante a respiração) ou dano celular [23]. Vimos que a concentração de ATP extracelular nas vias respiratórias de pacientes com FC é maior, ficando acima do mínimo necessário para ativar os receptores P2Y₂ [15].

Apesar de termos enfatizado a importância da rede purinérgica na hidratação e no transporte mucociliar das vias respiratórias, essa rede de sinalização é fundamental para diversos processos fisiológicos e patofisiológicos incluindo transmissão sináptica, percepção de dor e de toque, respostas vasomotoras, agregação de plaquetas, regulação

⁴Nucleosídeos diferem dos nucleotídeos por não possuírem o grupo fosfato.

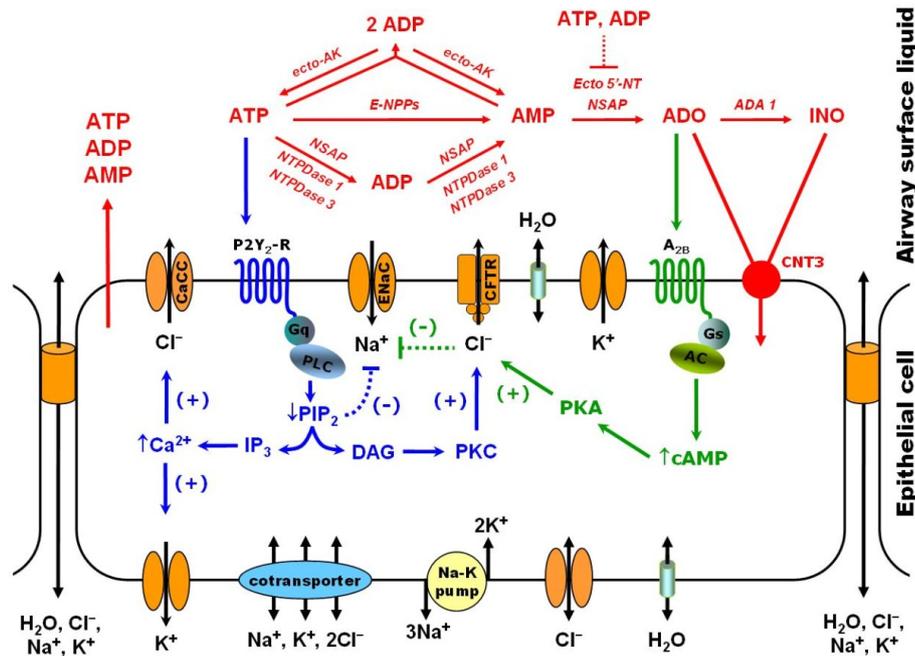


Figura 1.2: Diagrama da rede de sinais bioquímicos que regula a hidratação do muco respiratório.

do volume celular, defesa imunológica, proliferação celular, apoptose e na função renal [24].

1.2 Proposta e estrutura do trabalho

Como vimos, os nucleotídeos exercem um papel essencial na rede bioquímica que regula a hidratação das vias respiratórias e o transporte mucociliar. Recentemente foi elaborado um modelo computacional que busca descrever a regulação dos nucleotídeos extracelulares no epitélio respiratório [20, 21]. Tal modelo obteve sucesso em reproduzir dados experimentais de culturas de células epiteliais para volumes grandes de ASL e sua previsão de liberação de ADP e AMP pelo epitélio das vias respiratórias foi comprovada experimentalmente.

Buscando descrever o comportamento dos nucleotídeos extracelulares *in vivo* e investigar a disponibilidade de ATP e ADO para os receptores, construímos um modelo que se baseia em experimentos com altura do ASL comparável à altura *in vivo* e incluímos a difusão no modelo anterior.

A seguir descrevemos a estrutura desta dissertação. No capítulo 2, o modelo sem difusão [20, 21] e seus principais resultados são expostos, assim como a motivação e os dados experimentais para incluir a difusão no modelo. Em seguida, apresentamos

o modelo proposto de regulação dos nucleotídeos com difusão que tem como objetivo descrever a concentração dos nucleotídeos extracelulares no ASL *in vivo* e *in vitro*. No fim desse capítulo é feita uma descrição sucinta do método de volumes finitos, usado para solucionar numericamente as equações do modelo.

No capítulo 3, mostramos que a solução numérica da equação de difusão coincide com a solução analítica obtida para dois casos particulares de condições de contorno: (i) barreiras refletoras (ii) fluxo constante em $z = 0$ com demais barreiras refletoras. E, finalmente, comparamos os resultados do modelo proposto com os dados experimentais da literatura [25], obtendo boa concordância.

O método numérico usado para implementar o modelo e os cálculos para obter as soluções analíticas para os casos citados se encontram nos apêndices A e B, respectivamente.

Capítulo 2

Modelo computacional de reação e difusão de nucleotídeos em culturas de células do epitélio respiratório

2.1 Modelo de regulação dos nucleotídeos extracelulares sem difusão

Com o objetivo de compreender melhor o papel dos nucleotídeos extracelulares na hidratação das vias respiratórias e no transporte mucociliar, Zuo e colaboradores [21, 20] construíram um modelo matemático que descreve a variação da concentração dos nucleotídeos e nucleosídeos no tempo através de equações diferenciais acopladas. Cada equação tem a forma

$$\frac{d[N]}{dt} = \text{taxa de liberação} - \text{taxa de absorção} + \text{taxa das reações}, \quad (2.1)$$

sendo $[N]$ = concentração de ATP, ADP, AMP, ADO ou INO no líquido que cobre as vias respiratórias (ASL).

Para a construção do modelo foram feitas duas hipóteses que simplificam esse fenômeno biológico:

- Embora a maioria das ectonucleotidasas catalise tanto a desfosforilação de nucleotídeos de adenina quanto de uridina, o modelo se restringe a descrever os nucleotídeos de adenina porque a concentração relativa de nucleotídeos de uri-

dina é muito pequena (concentração de UTP $\sim 15\%$ da concentração de ATP [26]).

- Assumiu-se também que a concentração dos nucleotídeos é uniforme no ASL pois, devido à sua fina espessura ($\sim 30\mu\text{m}$), os nucleotídeos se difundem rapidamente.

O modelo leva em consideração a liberação de ATP no ASL pelas células epiteliais, a desfosforilação do ATP por enzimas em ADP, AMP e ADO, bem como a conversão de ADO em INO e a absorção desses nucleosídeos através do transportador CNT3 (figura 2.1). A inibição da hidrólise de AMP por ATP e ADP também foi incluída no modelo. Além disso, considerou-se a possibilidade de que ADP e AMP sejam secretados pelo epitélio, embora não existissem evidências experimentais quando o modelo foi desenvolvido [20].

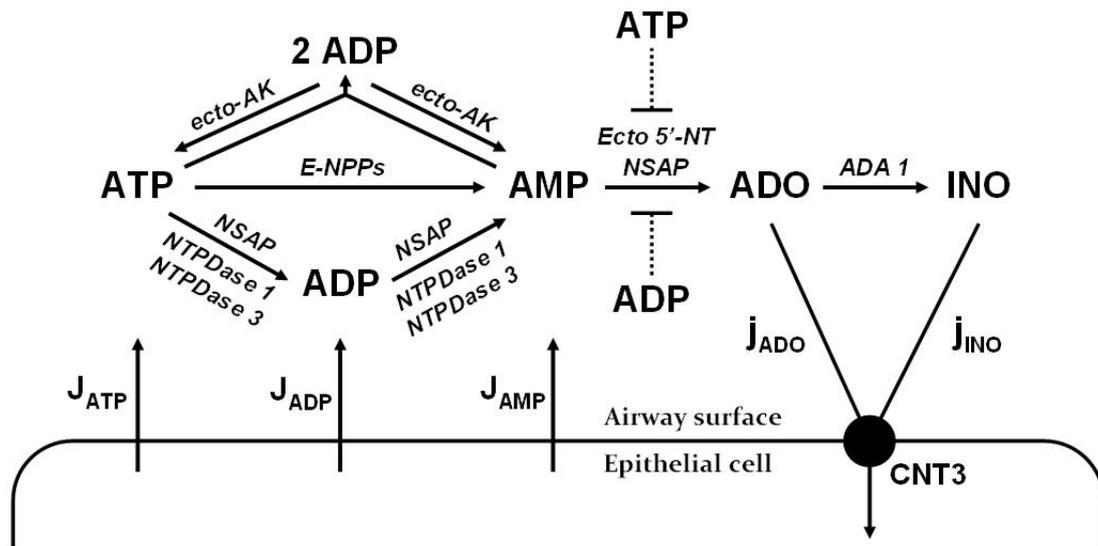


Figura 2.1: Diagrama esquemático de transporte e metabolismo dos nucleotídeos no ASL. As células do epitélio respiratório secretam ATP, ADP e AMP com taxas J_{ATP} , J_{ADP} e J_{AMP} , respectivamente. Os nucleotídeos são desfosforilados por ecto-enzimas em ADO e INO, e esses últimos são absorvidos pelo transportador CNT3 com taxas j_{ADO} e j_{INO} , respectivamente. As abreviações das enzimas incluídas no modelo são: NTPDases (Nucleoside triphosphate diphosphohydrolases), NSAP (tissue non-specific alkaline phosphatase), E-NPPs (Ecto-Nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterases), ecto 5'-NT ou CD73 (ecto 5'-nucleotidase), ecto-AK (ecto adenilase kinase), ADA1 (adenosine deaminase 1). Figura retirada de Garcia et al. [21].

Portanto, as equações que governam a variação dos nucleotídeos no tempo foram

expressas por

$$\frac{d[ATP]}{dt} = J_{ATP} - \nu_{AK} - \sum_{i=1,2,3,10} \nu_i, \quad (2.2)$$

$$\frac{d[ADP]}{dt} = J_{ADP} + 2\nu_{AK} + \sum_{i=1,2,3} \nu_i - \sum_{i=4,5} \nu_i, \quad (2.3)$$

$$\frac{d[AMP]}{dt} = J_{AMP} - \nu_{AK} - \sum_{i=6,7,8} \nu_i + \sum_{i=4,5,10} \nu_i, \quad (2.4)$$

$$\frac{d[ADO]}{dt} = -j_{ADO} + \sum_{i=6,7,8} \nu_i - \nu_9, \quad (2.5)$$

$$\frac{d[INO]}{dt} = -j_{INO} + \nu_9, \quad (2.6)$$

onde J e j são respectivamente as taxas de secreção de nucleotídeos e absorção de nucleosídeos, ν_i se refere às taxas das reações e os índices $i = 1, 2, \dots, 10$ se referem às várias reações químicas (ver tabela 2.1 e figura 2.1). Com exceção da hidrólise de AMP e da reação reversível ectoAK, foi considerado que as reações enzimáticas podem ser modeladas pela cinética de Michaelis-Menten [27]. Sendo assim, as taxas de hidrólise de ATP, ADP e ADO são dadas por

$$\nu_j = \frac{V_{max}^j [S]}{K_M^j + [S]}, \quad (2.7)$$

onde o índice j se refere às enzimas $j = 1 - 5, 9 - 10$ listadas na tabela 2.1, $[S]$ é a concentração do substrato da reação em questão, V_{max} é a velocidade máxima da reação e K_M é a constante de Michaelis.

Foi assumido que a reação reversível ($ATP + AMP \rightleftharpoons 2ADP$), catalisada pela enzima ectoAK, segue um Bi Bi mecanismo [28, 29] descrito por

$$\nu_{AK} = \frac{V_{max}^f}{1 + \frac{K_{ATP}^f}{[ATP]} + \frac{K_{AMP}^f}{[AMP]} + \frac{K_{ATP}^f K_{AMP}^f}{[ATP][AMP]}} - \frac{V_{max}^b}{1 + 2\frac{K_{ADP}^b}{[ADP]} + \left(\frac{K_{ADP}^b}{[ADP]}\right)^2}. \quad (2.8)$$

onde V_{max}^f é a velocidade máxima da reação $ATP + AMP \rightarrow 2ADP$, V_{max}^b é a velocidade máxima da reação $2ADP \rightarrow ATP + AMP$ e K_{ATP}^f , K_{ADP}^b , K_{AMP}^f são constantes. Observou-se experimentalmente que ATP e ADP inibem a hidrólise de AMP, pois competem para se ligar às enzimas que catalisam essa reação. Portanto, a taxa da hidrólise

Tabela 2.1: Parâmetros cinéticos que regulam as reações.

<i>Reação</i>	<i>Enzima/Transportador</i>	<i>Parâmetros</i>	<i>Experimental</i>	<i>Simulação [21]</i>
ATP → ADP+Pi	NTPDase 1/highTNAP	$V_{max}^{(1)}, K_M^{(1)}$	2.1, 12	6.3, 16.3
	NTPDase 3	$V_{max}^{(2)}, K_M^{(2)}$	8.1, 136	15.5, 114.9
	lowTNAP	$V_{max}^{(3)}, K_M^{(3)}$	14.1, 451	20.0, 418.0
ADP → AMP+Pi	NTPDase 1/highTNAP	$V_{max}^{(4)}, K_M^{(4)}$	1.4, 5	0.5, 2.8
	NTPDase 3/lowTNAP	$V_{max}^{(5)}, K_M^{(5)}$	9.1, 103	10.7, 83.9
AMP → ADO+Pi	Ecto 5'-NT	$V_{max}^{(6)}, K_M^{(6)}$	1.8, 14	1.7, 13.0
	highTNAP	$V_{max}^{(7)}, K_M^{(7)}$	4.2, 36	6.2, 27.2
	lowTNAP	$V_{max}^{(8)}, K_M^{(8)}$	9.8, 717	11.9, 694.9
	Feed forward inhibition	$K_{ATP}^{(in)}$	7	28.4
	Feed forward inhibition	$K_{ADP}^{(in)}$	10	20.4
ADO → INO	ADA1	$V_{max}^{(9)}, K_M^{(9)}$	0.6, 25	0.3, 17.0
ATP → AMP+PPi	E-NPPs	$V_{max}^{(10)}, K_M^{(10)}$	0.9, 22	1.2, 28.3
ATP+AMP → 2ADP	EctoAK (direta)	$V_{max}^{(f)}, K_{ATP}^{(f)}, K_{AMP}^{(f)}$	3.8, 23, N/A	2.2, 30.4, 24.7
ATP+AMP ← 2ADP	EctoAK (inversa)	$V_{max}^{(b)}, K_{ADP}^{(b)}$	1.8, 43	2.2, 61.8
fluxo de ATP	-	J_{ATP}	0.0012	0.0011
fluxo de ADP	-	J_{ADP}	-	0.0131
fluxo de AMP	-	J_{AMP}	-	0.0125
absorção de ADO	CNT3	$V_{max}^{(u,1)}, K_M^{(u,1)}$	0.12, 2.2	0.2, 1.2
absorção de INO	CNT3	$V_{max}^{(u,2)}, K_M^{(u,2)}$	-	0.2, 1.2

Sendo que J e V_{max} estão em unidades de $nmol/min/ml$ e K_M tem unidade de μM .

de AMP foi descrita pela cinética de Michaelis-Menten com inibição competitiva [29, 30]

$$v_j = \frac{V_{max}^j [AMP]}{K_M^j \left(1 + \frac{[ATP]}{K_{ATP}^{in}} + \frac{[ADP]}{K_{ADP}^{in}} \right) + [AMP]}, \quad (2.9)$$

onde o índice $j = 6, 7, 8$ e K_{ATP}^{in} e K_{ADP}^{in} são as constantes de inibição (vide tabela 2.1).

As taxas de absorção de ADO e INO devem considerar a competição desses nucleosídeos pelo mesmo transportador, dessa forma temos

$$j_{ADO} = \frac{V_{max}^{u,1} [ADO]}{K_M^{u,1} \left(1 + \frac{[INO]}{K_M^{u,2}} \right) + [ADO]}, \quad (2.10)$$

$$j_{INO} = \frac{V_{max}^{u,2} [INO]}{K_M^{u,2} \left(1 + \frac{[ADO]}{K_M^{u,1}} \right) + [INO]}, \quad (2.11)$$

onde $V_{max}^{u,1}$, $V_{max}^{u,2}$ são as velocidades máximas de absorção de [ADO] e [INO] respectivamente e $K_M^{u,1}$, $K_M^{u,2}$ são constantes.

Os parâmetros cinéticos das reações catalisadas pelas ectonucleotidasas foram ajustados para reproduzir a concentração dos nucleotídeos no tempo após a adição

de $100 \mu\text{M}$ de ATP ao líquido superficial (figura 2.2a) e a concentração estacionária dos nucleotídeos (figura 2.2b) observadas experimentalmente em culturas de células do epitélio bronquial humano. De forma geral, os parâmetros ajustados estão próximos de seus valores experimentais (tabela 2.1).

Esse modelo reproduziu várias observações experimentais, tais como: (1) a concentração do estado estacionário dos nucleotídeos não depende da altura do ASL (figura 2.3), (2) o impacto de inibidores das ectonucleotidases na concentração de estado estacionário, (3) as mudanças provocadas pela tensão mecânica na composição do ASL e (4) as diferenças existentes entre o epitélio nasal e bronquial nas concentrações no estado estacionário [21, 20]. A previsão mais importante do modelo foi a de que o epitélio respiratório secreta ADP e AMP no ASL [21, 20]. Tal previsão foi confirmada experimentalmente [31], mostrando como modelos computacionais podem contribuir para o entendimento de processos biológicos e, assim, contribuir para o surgimento de novas terapias para patologias (no caso a FC).

É importante destacar que o desenvolvimento desse modelo foi baseado em dados experimentais de culturas de células do epitélio bronquial humano com volume de líquido superficial $V = 350 \mu\text{l}$, ou seja, com altura do ASL $\sim 1500 \mu\text{m}$.

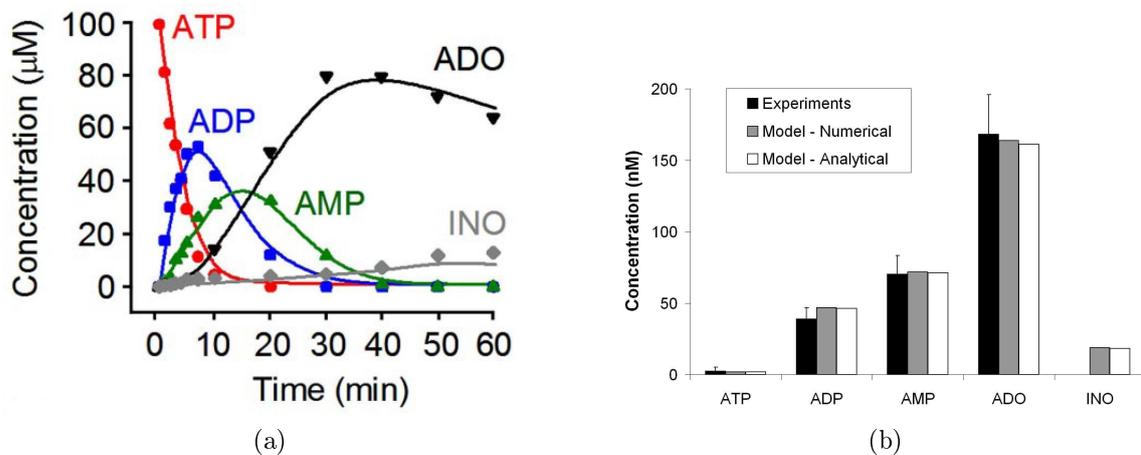


Figura 2.2: (a) Concentração dos nucleotídeos após a adição de $100 \mu\text{M}$ de ATP prevista pelo modelo sem difusão (linha) e medida experimentalmente (símbolos). (b) Concentração de estado estacionário medida experimentalmente (barras pretas) e prevista pelo modelo sem difusão por simulação numérica (barras cinzas) e por solução analítica (barras vazias). Figura retirada de Garcia et al. [21].

2.2 Motivação para incluir difusão no modelo

A pipetagem de amostras é uma técnica usual para medidas experimentais de concentração. Após a obtenção da alíquota, a concentração de substâncias químicas é medida em instrumentos, tais como luminometria off-line e cromatografia líquida de alta eficiência. Para obter dados da concentração de ATP em culturas de células do epitélio bronquial usando essa técnica, é necessária uma altura de líquido superficial *in vitro* muito superior à altura do ASL *in vivo* (de $\sim 30\mu\text{m}$). Embora se saiba que a concentração de ATP no ASL é suficiente para ativar o receptor P2Y₂ após certos estímulos fisiológicos *in vivo*, a concentração de ATP medida em culturas de células via pipetagem é muito inferior ao limiar de ativação do receptor P2Y₂ ($\sim 1\mu\text{M}$). Isto sugere que a concentração de ATP próximo da superfície das células é muito maior do que seu valor médio no ASL.

O modelo descrito na seção 2.1 foi baseado em dados experimentais obtidos por pipetagem de amostras, com altura do líquido superficial da ordem de $1500\mu\text{m}$. Assim, apesar de reproduzir bem a concentração dos nucleotídeos para grandes alturas de ASL, não está claro se o modelo reproduz o comportamento dos nucleotídeos *in vivo*.

Okada e colaboradores (2006) [25] usaram várias técnicas de medida para acessar a concentração de ATP *in vitro* para alturas do líquido da ordem da fina camada de ASL *in vivo* e os dados obtidos fornecem a primeira evidência experimental de que a concentração de ATP no ASL atinge o limiar necessário para ativar o receptor P2Y₂ após estímulo fisiológico.

Com o objetivo de investigar a regulação dos nucleotídeos *in vivo*, construímos um modelo que busca reproduzir o comportamento da rede bioquímica (figura 2.1) tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Usamos os dados experimentais para o ATP obtidos por Okada e colaboradores para validar o modelo e assim descrever o comportamento dos demais nucleotídeos *in vivo*.

2.3 Dados experimentais

Medidas experimentais *in vitro* foram feitas com o intuito de descrever a concentração de ATP no ASL [25]. Para simular o epitélio das vias respiratórias utilizou-se culturas primárias de células bem diferenciadas do epitélio bronquial humano. As culturas de células foram cultivadas a partir de biópsias cirúrgicas do tronco principal ou dos brônquios lobares de doadores saudáveis e cultivadas em suporte Transwell de 12 mm de diâmetro.

Okada e colaboradores [25] usaram três técnicas distintas para acessar a concen-

tração de ATP para diferentes volumes do ASL. Uma delas utiliza proteína A-luciferase do *Staphylococcus aureus* (SPA-luc) modificada de forma a ter a luminosidade emitida aumentada cem vezes. As luciferases são enzimas que transformam energia química em energia luminosa (bioluminescência). SPA-luc se liga à superfície das células primárias do epitélio bronquial humano possibilitando medir a concentração de ATP em tempo real na superfície da célula, ou seja, onde estão localizados os receptores $P2Y_2$. As outras técnicas permitem conhecer a concentração média de ATP no ASL, são elas: medidas em tempo real através de luciferase dissolvida no ASL e medidas de luminometria off-line de amostras pipetadas (volume do ASL $> 100\mu l$) e de micro-amostragem (volume do ASL $\leq 100\mu l$).

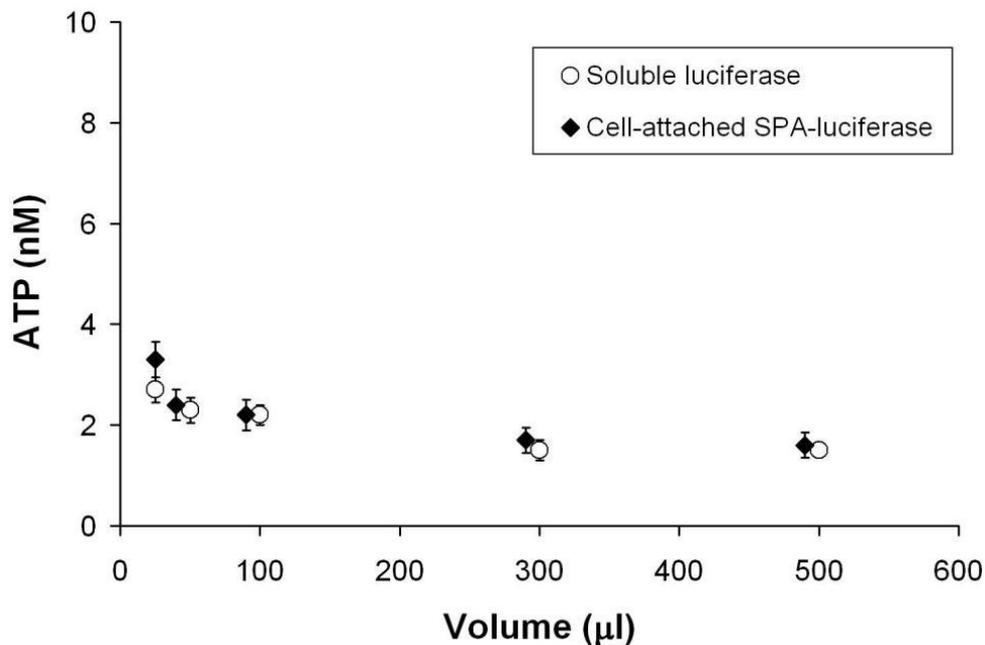


Figura 2.3: Concentração estacionária de ATP em culturas de células do epitélio bronquial humano, medida para diferentes volumes, usando luciferase solúvel dissolvida no ASL (círculos abertos) e SPA-luc presa às células (losangos sólidos). Figura retirada de Garcia et al. [21].

A secreção de ATP pode ser induzida por estímulos mecânicos, tais como vibração das culturas de células e variação na pressão de ar dentro das incubadoras, ou por variações no volume celular devido a um gradiente osmótico. Okada e colaboradores optaram por usar choque hipotônico de 33% (67% da osmolaridade normal), que causa um aumento abrupto de 33% no volume celular, para estimular a secreção de ATP. O choque hipotônico tem um papel fisiológico importante, pois *in vivo* glândulas secretam seu conteúdo hipotônico na superfície das vias respiratórias. O choque hipotônico é um estímulo de fácil reprodução experimental e possibilita medidas em tempo real.

A concentração de ATP após o choque hipotônico de 33% foi medida usando as três técnicas descritas (figura 2.4).

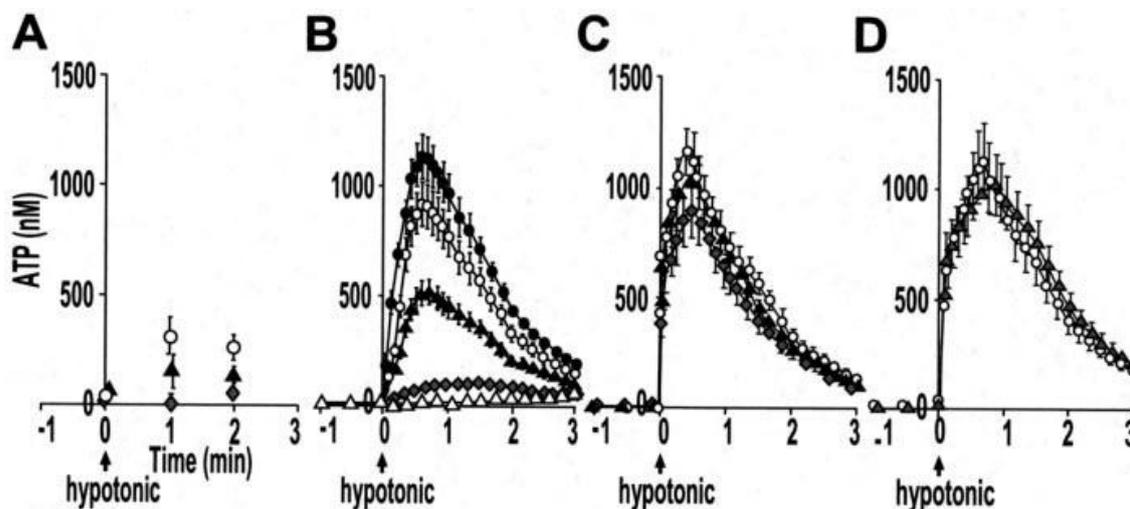


Figura 2.4: Secreção de ATP induzida por choque hipotônico em culturas de células primárias do epitélio bronquial humano, conforme medido por Okada e colaboradores [25]. As concentrações de ATP foram medidas por diferentes técnicas e vários volumes de ASL (500 μl (triângulos abertos), 300 μl (diamante cinza), 100 μl (triângulos sólidos), 50 μl (círculos abertos) e 25 μl (círculos sólidos)); A= luminometria off-line de amostras; B= luciferase solúvel; C=SPA-luc presa às células; D=SPA-luc presa às células por outras técnicas experimentais. Figura retirada de Okada et al. [25].

Observando esses gráficos, nota-se que as medidas realizadas na média do volume de ASL (gráficos A e B da figura 2.4) apontam que a concentração de ATP está inversamente relacionada com o volume do ASL, quanto maior o volume menor a concentração de ATP. Por outro lado, as medidas feitas usando SPA-luc presa às células indicam que a concentração de ATP próximo da superfície celular independe do volume. Através das medidas feitas com SPA-luc presa às células (figura 2.4 C) foi possível mostrar que a concentração de ATP na superfície ultrapassa o limiar de ativação do receptor P2Y₂ ($\sim 1 \mu\text{M}$).

2.4 Modelo de regulação dos nucleotídeos extracelulares com difusão

Uma das hipóteses do modelo descrito na seção 2.1 foi que a influência da difusão na determinação da concentração dos nucleotídeos e nucleosídeos extracelulares pode ser desprezada. Todavia, os dados experimentais de Okada e colaboradores [25] indicam

que a concentração de ATP após choque hipotônico depende da altura do ASL (sendo maior em $z = 0$).

A fim de mensurar o papel da difusão na concentração dos nucleotídeos no ASL, construímos um modelo que busca reproduzir os dados experimentais de ATP observados por Okada e colaboradores e que seja capaz de prever o comportamento *in vivo* de toda a rede de regulação de nucleotídeos no ASL (figura 2.1). Nosso modelo baseia-se na solução da equação de difusão

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D\nabla^2 c, \quad (2.12)$$

onde $c = [\text{ATP}], [\text{ADP}], [\text{AMP}], [\text{ADO}]$ e $[\text{INO}]$ (unidade de mol/m^3), t é o tempo (unidade de s) e $D = 4,6 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ é a constante de difusão do ATP [32]. Dados experimentais indicam que a constante de difusão é praticamente igual para ATP, ADP, AMP, ADO e INO. Portanto vamos assumir $D = 4,6 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ para todas as espécies químicas do modelo.

Visto que os recipientes em que as culturas de células foram cultivadas são cilíndricos, com raio $R = 6,0 \text{ mm}$, é mais apropriado desenvolver a equação acima em coordenadas cilíndricas. A altura H por sua vez depende do volume do ASL dos experimentos. Os dados experimentais nos quais o modelo se baseou foram obtidos com diferentes volumes, cujos valores variaram de 25 a $500 \mu\text{l}$. Para determinar a altura no modelo, foi assumido que a superfície superior do ASL é plana, de tal forma que $H = V/A$ (onde V é o volume e $A = \pi R^2$ a área superficial das culturas de células).

O fluxo de partículas através de uma fronteira é dado por $F = -D\nabla c \cdot \hat{\mathbf{n}}$, onde $\hat{\mathbf{n}}$ é um vetor unitário normal a essa fronteira. Tanto a secreção de ATP, ADP e AMP, quanto a absorção de ADO e INO ocorrem na superfície das células (fronteira $z = 0$). Como as enzimas também se localizam nessa fronteira, as condições de contorno em $z = 0$ são

$$-D \frac{\partial [\text{ATP}]}{\partial z} \Big|_{z=0} = J_{\text{ATP}} - \nu_{\text{AK}} - \sum_{i=1,2,3,10} \nu_i, \quad (2.13)$$

$$-D \frac{\partial [\text{ADP}]}{\partial z} \Big|_{z=0} = J_{\text{ADP}} + 2\nu_{\text{AK}} + \sum_{i=1,2,3} \nu_i - \sum_{i=4,5} \nu_i, \quad (2.14)$$

$$-D \frac{\partial [\text{AMP}]}{\partial z} \Big|_{z=0} = J_{\text{AMP}} - \nu_{\text{AK}} - \sum_{i=6,7,8} \nu_i + \sum_{i=4,5,10} \nu_i, \quad (2.15)$$

$$-D \frac{\partial [ADO]}{\partial z} \Big|_{z=0} = -j_{ADO} + \sum_{i=6,7,8} \nu_i - \nu_9, \quad (2.16)$$

$$-D \frac{\partial [INO]}{\partial z} \Big|_{z=0} = -j_{INO} + \nu_9. \quad (2.17)$$

Nas demais fronteiras dos cilindros em que são feitos os experimentos, as condições de contorno devem ser refletoras, pois os nucleotídeos não cruzam a superfície líquido-ar e tampouco atravessam o material do recipiente. Portanto, temos também as condições de contorno

$$\frac{\partial c}{\partial r} \Big|_{r=R} = 0, \quad (2.18)$$

$$\frac{\partial c}{\partial z} \Big|_{z=H} = 0. \quad (2.19)$$

As equações que modelam as taxas das reações enzimáticas e os fluxos são as mesmas consideradas no modelo anterior, eqs. (2.7), (2.8), (2.9), (2.10) e (2.11). Contudo, como estamos interessados na difusão, o local onde essas reações ocorrem se tornou relevante. As enzimas estão presas à membrana apical das células epiteliais, portanto as reações ocorrem na superfície da célula. Essa informação deve ser incluída nas equações que descrevem as taxas, para isso basta exigir que nessas equações as concentrações sejam dadas em $z = 0$. Por exemplo, na equação que descreve a taxa da cinética de Michaelis Menten, eq. (2.7), o substrato $[S]$ deve ser o substrato da reação na superfície, ou seja, devemos substituir $[S]$ por $[S](r, 0, t)$. Para implementar o modelo, foram usados os parâmetros cinéticos (V_{max} 's e K_M 's) obtidos na simulação do modelo da seção 2.1 (veja tabela 2.1), por ser um conjunto completo que reproduz a concentração estacionária experimental. Já que as reações ocorrem na superfície, no modelo com difusão os fluxos e V_{max} devem ter unidades do tipo concentração/tempo/área. Para usar os dados da tabela de J e V_{max} no modelo, é necessário multiplicá-los por (V/A) , onde $V = 0,35 \text{ ml}$ e $A = 1,12 \text{ cm}^2$ são respectivamente o volume e a área do ASL nos experimentos em que os parâmetros experimentais foram obtidos.

Como vimos, o choque hipotônico estimula a secreção de ATP. Para que o modelo reproduza os dados experimentais obtidos por Okada e colaboradores [25], é necessário que saibamos o fluxo de ATP (J_{ATP}) no tempo após o choque hipotônico. Podemos obter o fluxo a partir dos dados experimentais para a concentração de ATP no tempo exibidos na figura 2.5. Esses dados foram obtidos logo após o choque hipotônico, com

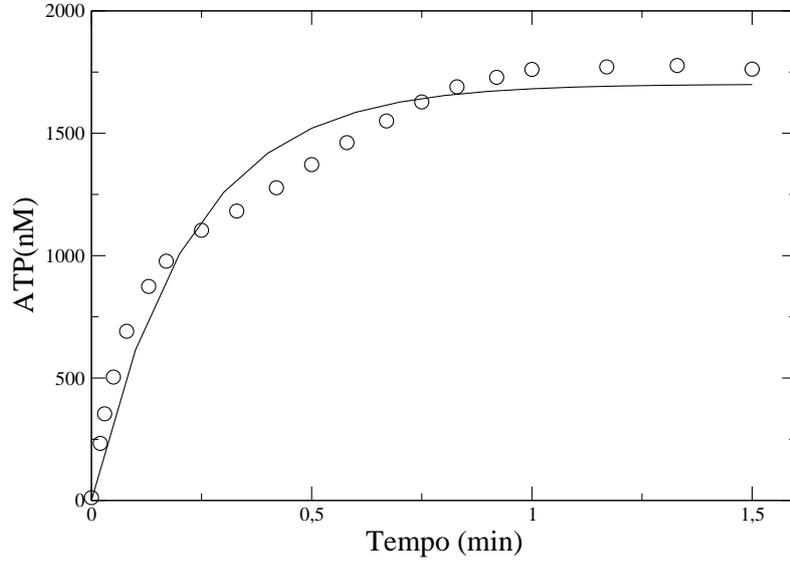


Figura 2.5: Concentração de ATP no tempo após o choque hipotônico na presença de inibidores das enzimas. Para obter o fluxo de ATP $J_{ATP}(t)$, uma mistura de inibidores das ectonucleotidasas foi adicionada à cultura de células e a concentração de ATP medida após o choque hipotônico. Símbolos: dados experimentais; curva: ajuste exponencial (eq. (2.20)).

a presença de inibidores das enzimas na cultura de células e as medidas foram feitas em tempo real usando luciferase solúvel. Já que na presença dos inibidores das enzimas $\frac{dN_{ATP}}{dt} = AJ_{ATP}(t)$, onde $N_{ATP} = V[ATP]$ é o número de mols de ATP no ASL, temos que $\frac{d[ATP]}{dt} = \frac{A}{V}J_{ATP}(t)$. Fitamos os dados experimentais da figura 2.5 usando o seguinte ajuste exponencial

$$[ATP] = c(t) = c_{\infty}(1 - e^{-\lambda t}) \quad (2.20)$$

onde os valores das constantes do ajuste são $c_{\infty} = 1701nM$ e $\lambda = 4,487min^{-1}$. Portanto, o fluxo de ATP após choque hipotônico é $J_{ATP}(t) = \frac{V}{A}\lambda c_{\infty}e^{-\lambda t}$ onde $V = 50\mu l$ e $A = 1,12cm^2$. Esse ajuste foi usado até o momento em que o fluxo dado por essa relação se torna inferior ao fluxo basal $J_{basal} = 6,25 \times 10^{-11}mol/s/m^2$ [21], a partir desse instante usamos o fluxo basal.

2.5 Método de volumes finitos

Para obter uma solução numérica para as equações do modelo proposto (seção 2.4), optamos pelo método dos volumes finitos. Esse é um método de discretização que permite transformar equações diferenciais parciais em um conjunto de equações algébricas [33]. O objetivo do método é substituir uma função contínua (no caso a concentração de ATP) por um sistema discretizado, ou seja, busca-se determinar o valor da função em um número finito de pontos. O conjunto desses pontos é chamado de rede. Espera-se que a solução discretizada se aproxime da solução exata ao aumentar o número de pontos na rede.

Nesse método, o domínio é dividido em volumes de controle, tal que exista um volume de controle ao redor de cada ponto da rede. Deve-se integrar a equação diferencial sobre cada um desses volumes. Sua vantagem em relação aos demais métodos numéricos para solução de equações diferenciais é que, para qualquer tamanho da rede, o fluxo de um volume de controle para outro se conserva, de forma que há consequente conservação de certas quantidades (no caso a massa) no volume total. Em outras palavras, as leis da física são obedecidas para cada volume de controle. Devido a essa característica o método dos volumes finitos é bastante utilizado para resolver problemas de transferência de calor e de difusão.

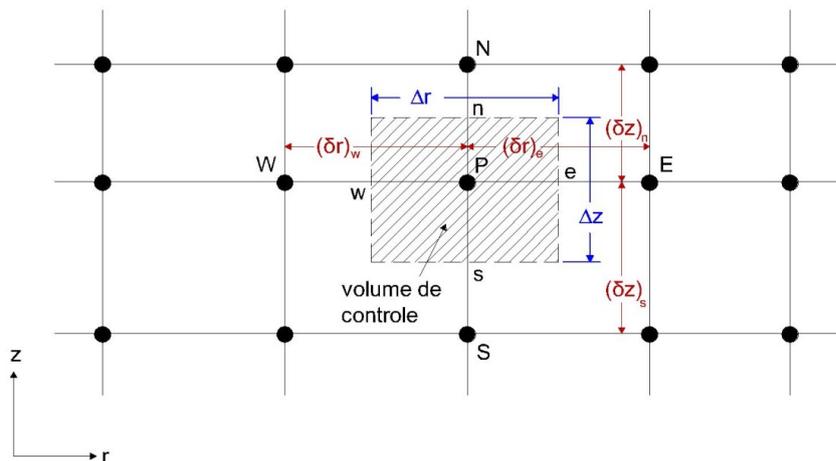


Figura 2.6: Volume de controle. É importante destacar que devido à simetria angular, o problema e, consequentemente, o volume de controle, são reduzidos a duas dimensões. Dessa forma, optamos por mostrar o volume de controle que vai ser utilizado, omitindo a parte em ϕ .

Temos abaixo uma síntese das equações discretizadas. O desenvolvimento dos cálculos para obtê-las e o algoritmo usado para implementá-las computacionalmente se

encontra no apêndice A.

Em resumo, a equação discretizada é:

$$a_P c_P = a_P^0 c_P^0 + a_E c_E + a_W c_W + a_N c_N + a_S c_S + b, \quad (2.21)$$

onde c_P é a concentração no ponto P da rede e c_E , c_W , c_N e c_S são as concentrações nos pontos vizinhos (veja figura 2.6). Os coeficientes são dados por

$$\begin{aligned} a_E &= \frac{Dr_e}{(\delta r)_e} \Delta z, & a_W &= \frac{Dr_w}{(\delta r)_w} \Delta z, \\ a_N &= \frac{D}{(\delta z)_n} \frac{(r_e + r_w)}{2} \Delta r, & a_S &= \frac{D}{(\delta z)_s} \frac{(r_e + r_w)}{2} \Delta r, \\ a_P^0 &= \frac{(r_e + r_w)}{2} \frac{\Delta r \Delta z}{\Delta t}, & b &= 0, \\ a_P &= a_E + a_W + a_N + a_S + a_P^0, \end{aligned}$$

onde

$$\begin{aligned} \Delta r &= r_e - r_w, & \Delta z &= z_n - z_s, \\ (\delta r)_e &= r_E - r_P, & (\delta z)_n &= z_N - z_P, \\ (\delta r)_w &= r_P - r_W, & (\delta z)_s &= z_P - z_S. \end{aligned}$$

É fácil entender a definição de cada um desses termos observando a figura 2.6. A equação acima é válida para todos os pontos da rede, exceto que

$$\begin{aligned} a_W &= 0 \text{ em } r = 0, & a_S &= 0 \text{ em } z = 0 \\ a_E &= 0 \text{ em } r = R, & a_N &= 0 \text{ em } z = H \\ (\delta r)_w &\text{ não existe em } r = 0, & (\delta z)_s &\text{ não existe em } z = 0, \\ (\delta r)_e &\text{ não existe em } r = R, & (\delta z)_n &\text{ não existe em } z = H. \end{aligned}$$

Naturalmente temos também que

$$\begin{aligned} r_W = r_w = r_P = 0 \quad \text{em } r = 0, & \quad z_S = z_s = z_P = 0 \quad \text{em } z = 0, \\ r_E = r_e = r_P = 0 \quad \text{em } r = R, & \quad z_N = z_n = z_P = 0 \quad \text{em } z = H. \end{aligned}$$

Apenas para os pontos na fronteira $z=0$, temos

$$\begin{aligned} b &= \frac{(r_w + r_e)}{2} \Delta r \frac{1}{\Delta t} \int_t^{t+\Delta t} F dt, \\ a_P &= a_E + a_W + a_N + a_P^0 + \frac{(r_w + r_e)}{2} \Delta r \sum_i \frac{V_m^i}{K_m^i + c_P}, \end{aligned}$$

onde F é o fluxo.

Usando uma rede com N_r pontos ao longo de r e N_z pontos ao longo de z , o número total de pontos na rede $N_{TOTAL} = N_r N_z$. Dado que temos uma equação no formato da eq. (2.21) para cada ponto da rede, o método dos volumes finitos consiste em substituir a equação diferencial (eq. (2.12)) por N_{TOTAL} equações algébricas. O método numérico para solução destas equações algébricas está descrito no apêndice A.

Capítulo 3

Resultados

3.1 Solução numérica versus solução analítica

Para validar a solução numérica via método de volumes finitos, vamos compará-la com a solução analítica da equação de difusão em coordenadas cilíndricas para dois casos particulares de condições de contorno: (i) barreiras refletoras; (ii) fluxo constante em $z = 0$, com demais fronteiras refletoras. O desenvolvimento das soluções analíticas se encontra no apêndice B.

3.1.1 Barreiras refletoras

A condição inicial escolhida para comparar a solução numérica com a analítica no caso de barreiras refletoras é dada por

$$c(r, z, 0) = c_\infty + K J_0 \left(\frac{y_{0i} r}{R} \right) \cos \left(\frac{j\pi z}{H} \right), \quad (3.1)$$

onde c_∞ e K são constantes, i e j são inteiros positivos, J_0 é a função de Bessel de primeira espécie de ordem zero e y_{0i} é a i -ésima raiz de $\frac{dJ_0}{dx}$ (ver apêndice B). A solução analítica para essa condição inicial é (ver subseção B.1.6)

$$c(r, z, t) = c_\infty + K J_0 \left(\frac{y_{0i} r}{R} \right) \cos \left(\frac{j\pi z}{H} \right) e^{-D \left[\frac{j^2 \pi^2}{H^2} + \frac{y_{0i}^2}{R^2} \right] t}. \quad (3.2)$$

Usamos os valores experimentais do raio $R = 6,0 \text{ mm}$ e da constante de difusão $D = 4,6 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ e escolhemos a altura $H = 4,46 \times 10^{-4} \text{ m}$ correspondente ao volume de $500 \mu\text{l}$ para fazer a comparação entre as soluções numérica e analítica. As

constantes escolhidas para construir as curvas foram $c_\infty = 1$, $K = 1$, $i = 2$ e $j = 3$, de forma que $y_{0i} = 3.83170597$. Como ilustrado na figura 3.1, a solução numérica está de acordo com a solução analítica.

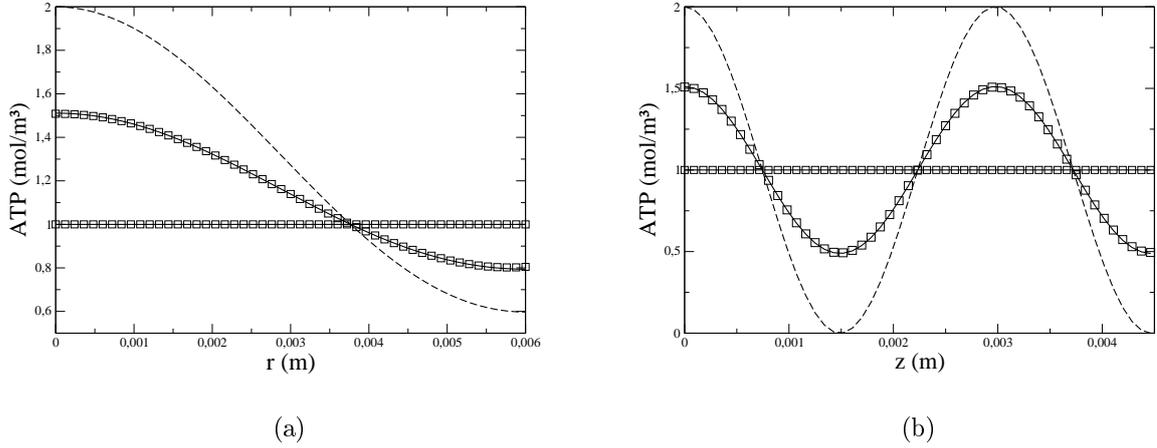


Figura 3.1: Comparação entre a solução numérica (símbolos) e a solução analítica (curvas) com condição de fronteira de barreiras refletoras. A condição inicial é dada pela curva tracejada. As demais curvas foram construídas no tempo $t = 300s$ e $t = 10^4s$ (estado estacionário). (a) Plano $z = 0$; (b) plano $r = 0$. Para obter a solução numérica usamos uma malha uniforme de 50×50 e $\Delta t = 0.1s$.

3.1.2 Fluxo constante em $z=0$

No caso em que a condição de fronteira é dada por fluxo F constante em $z = 0$ e demais barreiras refletoras, escolhemos a seguinte condição inicial para comparar as soluções numérica e analítica

$$c(r, z, 0) = B + \frac{F}{DH} \left(\frac{z^2}{2} - Hz \right) + K J_0(y_{0i}r/R) \cos \left(\frac{j\pi z}{H} \right), \quad (3.3)$$

onde B e K são constantes quaisquer e i e j são inteiros positivos. Nesse caso, a solução analítica é (veja subseção B.2.2)

$$c(r, z, t) = B + \frac{F}{DH} \left(\frac{z^2}{2} - Hz \right) + \frac{Ft}{H} + K J_0(y_{0i}r/R) \cos \left(\frac{j\pi z}{H} \right) e^{-D \left[\frac{j^2\pi^2}{H^2} + \frac{y_{0i}^2}{R^2} \right] t}. \quad (3.4)$$

Para testar se a solução numérica está de acordo com a solução analítica escolhamos novamente os valores experimentais $R = 6,0 \text{ mm}$, $D = 4,6 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ e $H = 4,46 \times 10^{-4} \text{ m}$. As constantes foram escolhidas arbitrariamente $B = 6$, $K = 1$, $i = 2$ e $j = 3$, assim como o fluxo $F = 10^{-6} \text{ mols/m}^2/\text{s}$. Nesse caso temos de novo que $y_{0i} = 3.83170597$. Conforme ilustrado na figura 3.2, as soluções numérica e analítica coincidem.

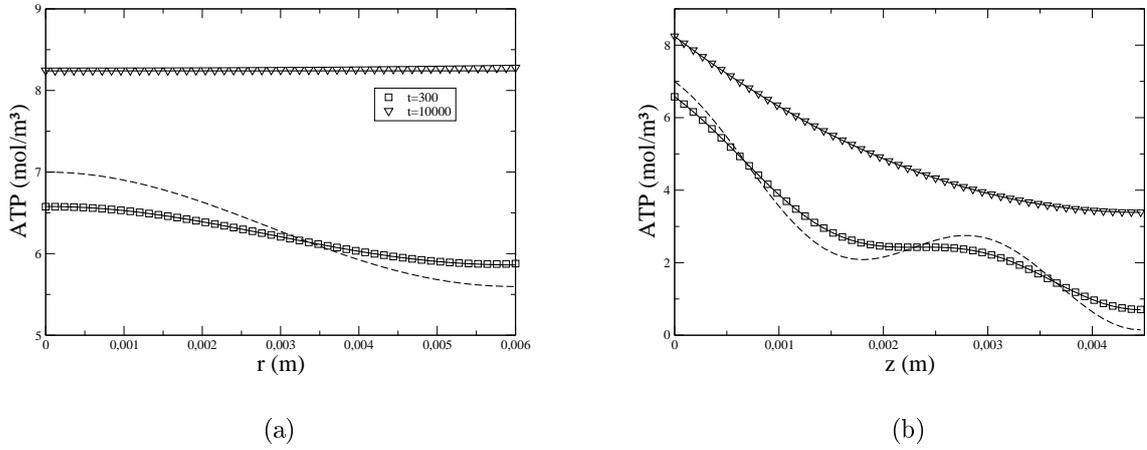


Figura 3.2: Comparação entre a solução numérica (símbolos) e a solução analítica (curvas) com condição de fronteira de fluxo constante em $z = 0$. A condição inicial é dada pela curva tracejada. As outras curvas foram construídas no tempo $t = 300s$ (quadrado) e $t = 10^4s$ (triângulo). (a) Plano $z = 0$; (b) Plano $r = 0$. Para obter a solução numérica usamos uma malha de 50×50 e $\Delta t = 0.1s$.

3.1.3 Convergência da solução numérica

A fim de estudar a convergência da solução numérica, definimos o erro médio por ponto, E , no tempo t como

$$E = \frac{1}{N_r N_z} \sum_{i=1}^{N_r} \sum_{k=1}^{N_z} |c_{\text{analítica}}(r_i, z_k, t) - c_{\text{numérica}}(r_i, z_k, t)| \quad (3.5)$$

onde N_r e N_z são, respectivamente, os números de pontos ao longo dos eixos r e z e $c_{\text{analítica}}$ e $c_{\text{numérica}}$ são as soluções analítica e numérica no ponto (r_i, z_k) da rede.

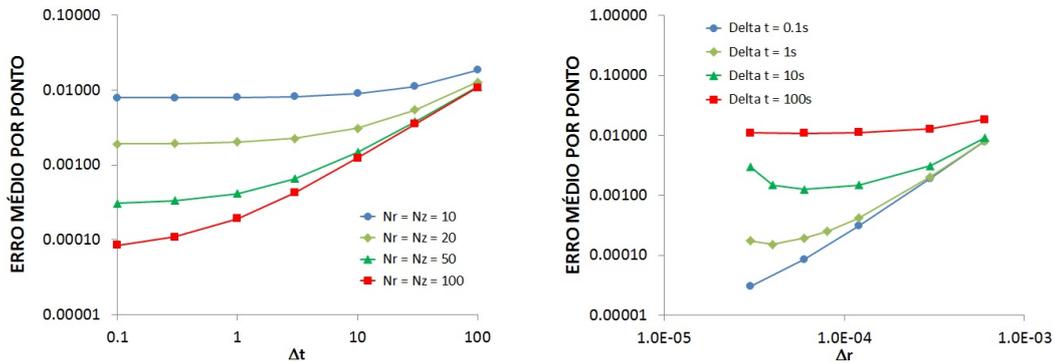
(a) Erro médio por ponto em função do passo no tempo (Δt)(b) Erro médio por ponto em função de Δr

Figura 3.3: Convergência da solução numérica para $t = 300s$. (a) Erro médio por ponto em função do passo no tempo (Δt) para alguns valores de Δr e Δz (com $N_r = N_z$); (b) Erro médio por ponto em função de Δr para alguns valores de Δt .

Esse estudo auxilia a estimar a densidade da malha necessária para a solução numérica convergir. Os resultados indicam que para reduzir o erro é necessário reduzir simultaneamente o passo no tempo e a distância entre os pontos da rede (figura 3.3).

3.2 Resultados

3.2.1 Comparação das previsões do modelo proposto com os dados experimentais

As previsões do modelo com difusão, descrito na seção 2.4, apresentam boa concordância com os dados experimentais obtidos por Okada e colaboradores [25]. O comportamento qualitativo da concentração média de ATP no volume previsto pelo modelo condiz com o observado experimentalmente, ou seja, tanto a previsão do modelo (figura 3.4), quanto os dados experimentais (gráfico B da figura 2.4), indicam que a concentração de ATP após o choque hipotônico está inversamente relacionada com o volume do ASL. Esse comportamento é esperado, já que quanto maior o volume do ASL mais diluído se encontra o ATP. No entanto, as curvas previstas pelo modelo atingem o valor máximo no tempo $t \sim 13s$ que é menor que o valor medido $t \sim 35s$.

Além disso, os valores máximos que a concentração média no volume atingem no modelo são bem inferiores aos obtidos experimentalmente usando luciferase solúvel. Essa diferença fica evidente quando comparamos os picos da concentração de ATP no modelo com os picos experimentais (figura 3.5), enquanto na previsão do modelo o pico para o volume de $25\mu l$ de ASL é de $\sim 350nM$, o valor experimental obtido usando

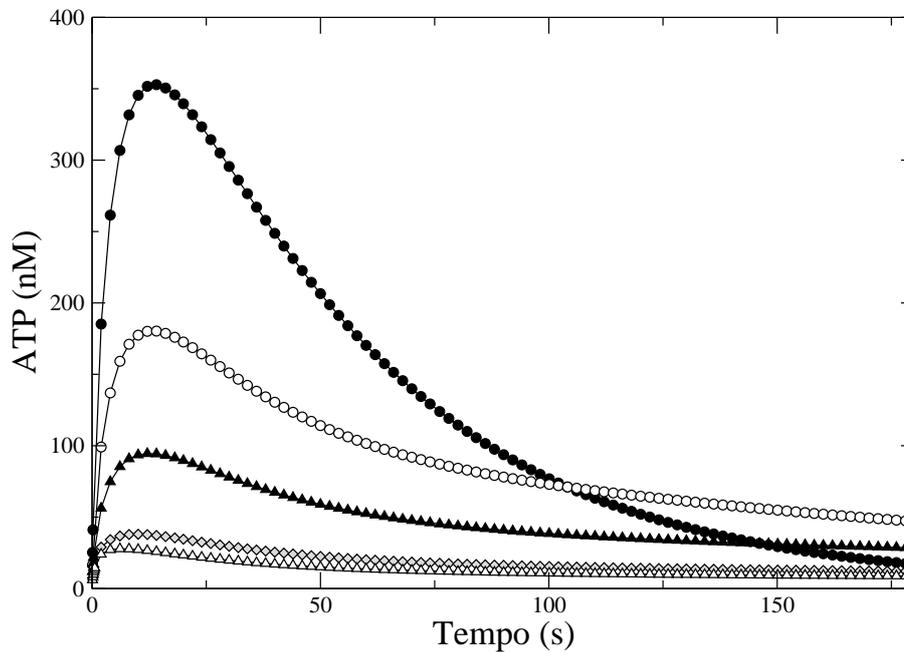


Figura 3.4: Concentração média de ATP no volume após choque hipotônico prevista pelo modelo com difusão para diferentes volumes ($500\mu\text{l}$ (triângulos abertos), $300\mu\text{l}$ (diamante cinza), $100\mu\text{l}$ (triângulos sólidos), $50\mu\text{l}$ (círculos abertos) e $25\mu\text{l}$ (círculos sólidos)).

luciferase solúvel é de $\sim 1200nM$.

Por outro lado, observando o gráfico A da figura 2.4, cujos dados foram obtidos por pipetagem de amostra (técnica que também fornece a média de $[ATP]$ no volume), percebe-se que os picos da concentração de ATP estão bem abaixo dos medidos com luciferase solúvel e, assim, bem mais próximos dos valores que o modelo prevê. Para volume do ASL de $50\mu\text{l}$, o pico medido por pipetagem de amostra é de $\sim 300nM$, e o previsto pelo modelo é de $\sim 180nM$.

A previsão da média da concentração de ATP em $z = 0$ (figura 3.6) tem boa concordância com os valores experimentais medidos com SPA-luc presa às células (gráfico C da figura 2.4). Os valores previstos sugerem que a concentração média em $z = 0$ não depende do volume e tal afirmação parece razoável ao observar as curvas experimentais. Nesse caso, a previsão do modelo se aproxima quantitativamente do comportamento da concentração experimental de ATP, se compararmos o pico previsto pelo modelo com o experimental, ambos indicam que para qualquer altura do ASL o valor máximo da

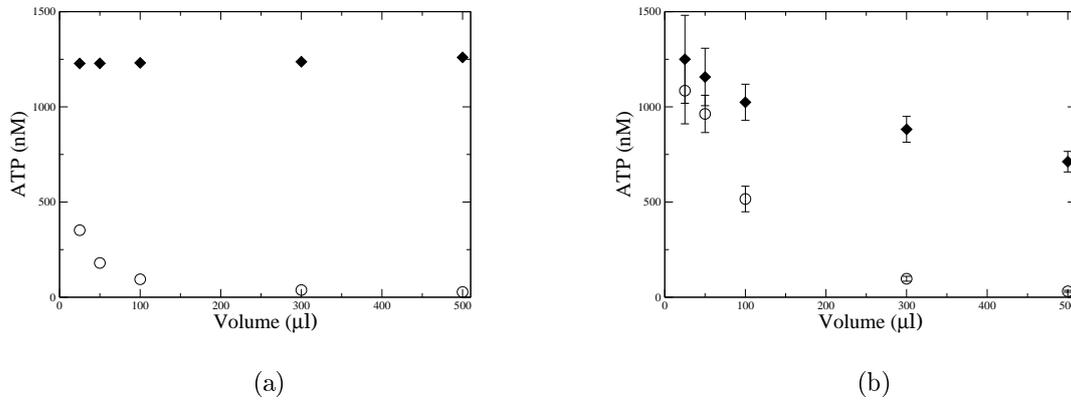


Figura 3.5: (a) Previsão do modelo para os picos da concentração média de ATP no volume (círculos vazios) e para picos da concentração média de ATP em $z = 0$ (diamantes sólidos). (b) Valores experimentais para os picos da concentração de ATP medidos com luciferase solúvel (círculos vazios) e medidos por SPA-luc presa às células (diamantes sólidos).

concentração média de ATP na superfície após o choque hipotônico é de ~ 1200 nM. Como o receptor $P2Y_2$ está situado na superfície da membrana apical e possui limiar de ativação da ordem de 1000 nM de ATP, a concentração de ATP após choque hipotônico é suficiente para ativá-lo. Contudo, há discrepância entre o tempo previsto para que a concentração de ATP na superfície atinja o máximo, $t \sim 3$ s (figura 3.6), e o tempo em que isso ocorre experimentalmente $t \sim 25$ s.

Os dados experimentais (figura 2.3) e os previstos pelo modelo sem difusão (figura 2.2b) sugerem que a concentração estacionária de ATP não depende do volume. A previsão do nosso modelo endossa essa observação, pois o valor obtido para a concentração estacionária de ATP além de ser igual para todos os volumes, é a mesma no volume e em $z = 0$ (figura 3.7). Cabe destacar que o valor obtido para a concentração estacionária de ATP usando o modelo com difusão é igual ao previsto pelo modelo sem difusão.

3.2.2 Previsões adicionais do modelo com difusão

Como vimos, ATP e ADO são importantes sinalizadores da rede bioquímica, sendo importante, assim, o conhecimento da disponibilidade dessas purinas no ASL. As medidas experimentais feitas por Okada e colaboradores [25] fornecem informações para volume comparável ao volume do ASL *in vivo* apenas para a concentração de ATP. Uma vez que o modelo reproduz boa parte dessas medidas, ele se torna uma ferramenta ade-

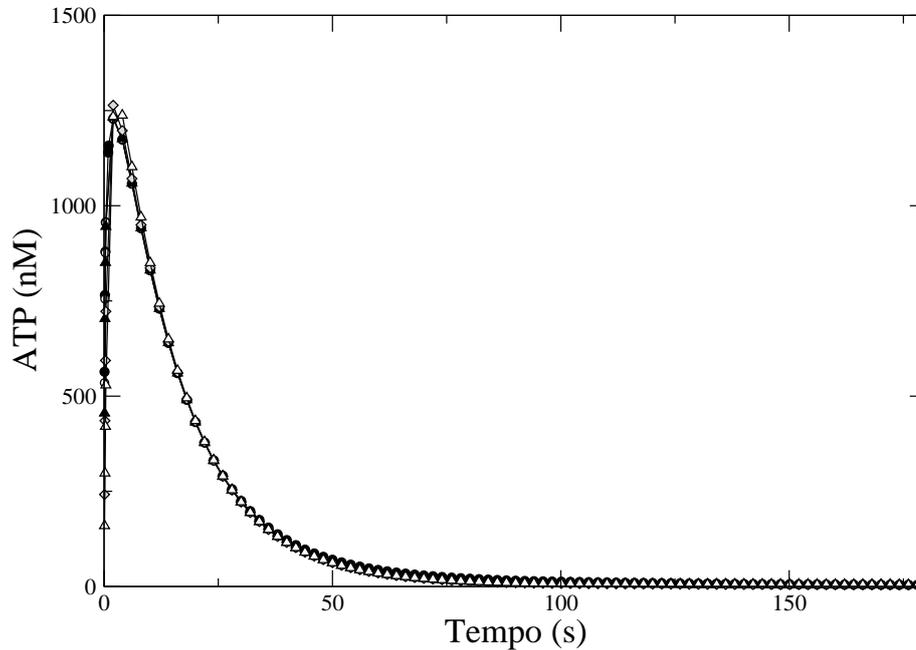


Figura 3.6: Concentração média de ATP na superfície ($z = 0$) após choque hipotônico prevista pelo modelo com difusão para diferentes volumes ($500\mu\text{l}$ (triângulos abertos), $300\mu\text{l}$ (diamante cinza), $100\mu\text{l}$ (triângulos sólidos), $50\mu\text{l}$ (círculos abertos) e $25\mu\text{l}$ (círculos sólidos)).

quada para investigar o comportamento de ADO no ASL *in vivo*. O comportamento previsto para ADO quando o ASL é submetido a choque hipotônico está exibido nas figuras 3.8 e 3.9. Assim como no caso do ATP, os valores máximos da concentração média de ADO no volume dependem inversamente do volume de líquido superficial (figura 3.8) e os picos para a concentração média de ADO em $z = 0$ (figura 3.9) coincidem, mostrando que a concentração máxima de ADO na superfície é independente do volume. É esperado que o pico de ADO ocorra em tempo posterior ao de ATP, já que ADO é metabólito. Nossos resultados sugerem que o valor máximo de $[ADO]_{z=0}$ é atingido 25s após o valor máximo de $[ATP]_{z=0}$.

Na subseção 1.1.3 vimos que a concentração de ADO no estado estacionário ($\sim 160nM$) é suficiente para ativar parcialmente o receptor A_{2B} . Entretanto, no estado estacionário, apenas $\sim 14\%$ dos receptores A_{2B} estão ativos. Essa estimativa foi obtida

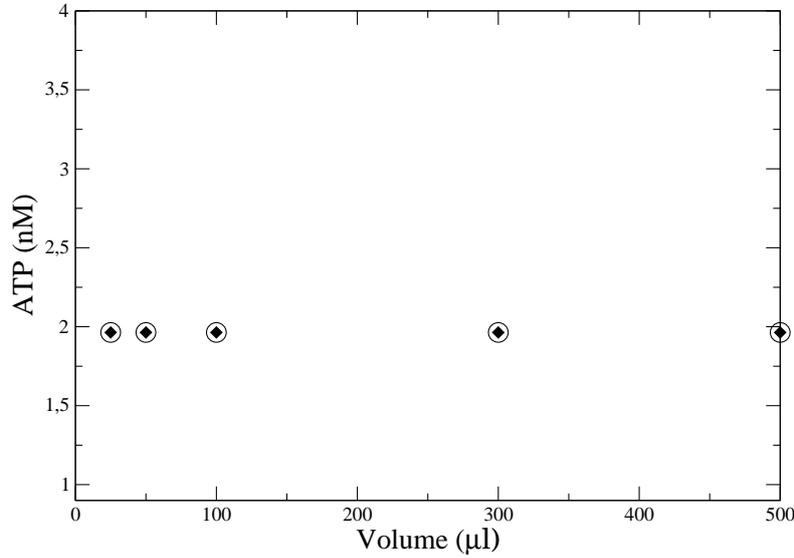


Figura 3.7: Concentração estacionária de ATP prevista pelo modelo com difusão; Média da concentração estacionária de ATP no volume (círculos vazios); Média da concentração estacionária de ATP em $z=0$ (diamantes sólidos)

assumindo que a atividade do receptor A_{2B} obedece à função de Michaelis Menten [27]

$$\frac{\text{ativação}}{\text{ativação máxima}} = \frac{[ADO]}{ED_{50} + [ADO]}, \quad (3.6)$$

onde $ED_{50} = 1 \mu M$ [34, 35] é o valor necessário para que a ativação atinja 50% da ativação máxima. Na figura 3.9 vemos que o choque hipotônico produz um grande aumento na concentração de adenosina no ASL em decorrência da secreção estimulada de ATP. O modelo prevê que após o choque hipotônico a concentração de ADO na superfície permanece acima do valor de ED_{50} para o receptor A_{2B} por um tempo de aproximadamente 50s, ou seja, durante $\sim 50s$ a ativação dos receptores A_{2B} é maior que 50%.

Como também estamos interessados em investigar o comportamento dos demais nucleotídeos e nucleosídeos *in vivo*, as figuras 3.10 e 3.11 mostram as concentrações de ATP, ADP, AMP, ADO e INO após choque hipotônico para volume do líquido superficial de $25\mu l$, cuja altura é da ordem da altura do ASL *in vivo*.

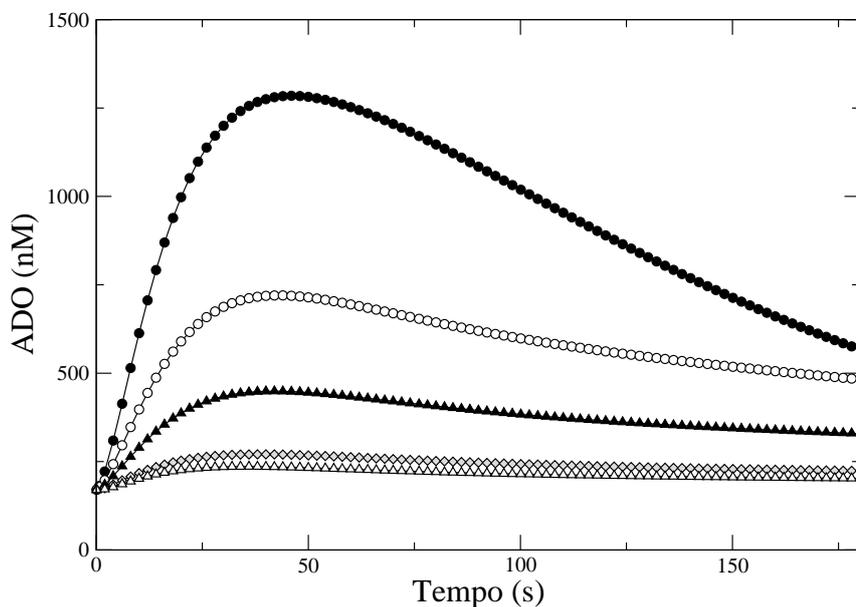


Figura 3.8: Concentração média de ADO no volume após choque hipotônico prevista pelo modelo com difusão para diferentes volumes ($500\mu\text{l}$ (triângulos abertos), $300\mu\text{l}$ (diamante cinza), $100\mu\text{l}$ (triângulos sólidos), $50\mu\text{l}$ (círculos abertos) e $25\mu\text{l}$ (círculos sólidos)).

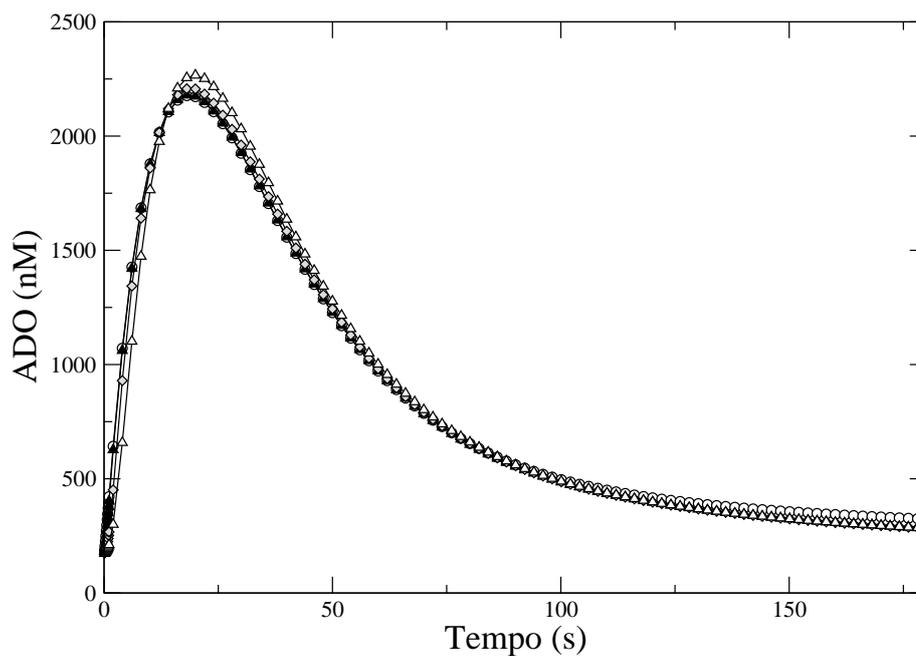


Figura 3.9: Concentração média de ADO na superfície ($z = 0$) após choque hipotônico prevista pelo modelo com difusão para diferentes volumes ($500\mu\text{l}$ (triângulos abertos), $300\mu\text{l}$ (diamante cinza), $100\mu\text{l}$ (triângulos sólidos) e $50\mu\text{l}$ (círculos abertos)).

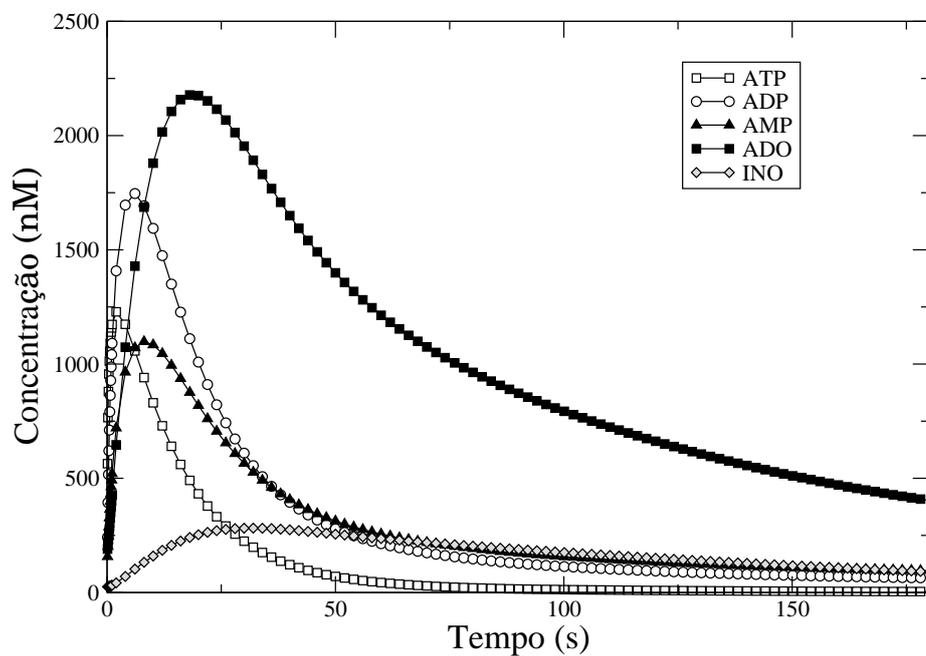


Figura 3.10: Previsão do modelo com difusão para a média na superfície ($z = 0$) da concentração de ATP, ADP, AMP, ADO e INO para volume de $25\mu\text{l}$ após o choque hipotônico

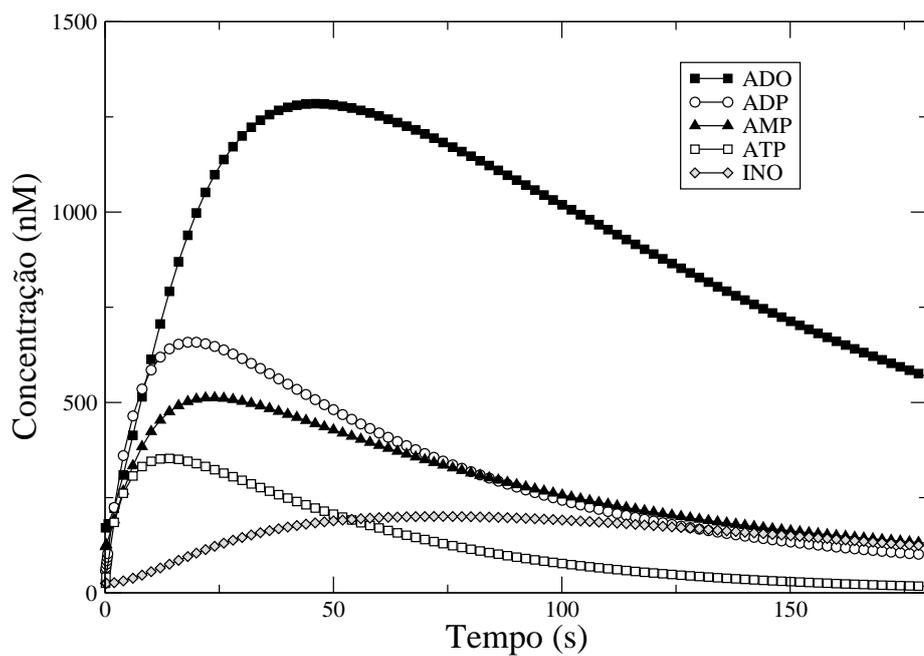


Figura 3.11: Previsão do modelo com difusão para a média no volume da concentração de ATP, ADP, AMP, ADO e INO em volume de $25\mu\text{l}$ após o choque hipotônico.

Capítulo 4

Conclusão

Devido à importância dos nucleotídeos extracelulares na rede bioquímica que regula o transporte mucociliar, foi proposto um modelo computacional que busca descrever o comportamento desses nucleotídeos no ASL *in vitro* e *in vivo*. O modelo foi baseado em dados experimentais da literatura para culturas de células do epitélio bronquial humano com altura do líquido superficial comparável à do ASL *in vivo* e fornece a concentração de ATP na superfície e no volume após o choque hipotônico para diferentes alturas de ASL.

O modelo proposto previu com êxito o comportamento qualitativo da concentração de ATP após choque hipotônico. Para a concentração média de ATP no volume, ele descreve corretamente a variação da concentração com o volume do ASL, porém os valores máximos que a concentração assume (picos) previstos ficam abaixo dos valores experimentais. As previsões feitas para a concentração média de ATP na superfície, por sua vez, reproduzem os dados experimentais, mostrando que a concentração de ATP ultrapassa o limiar de ativação do receptor $P2Y_2$ ($\sim 1\mu M$). Entretanto, o modelo prevê que o valor máximo da concentração de ATP é atingido em tempo inferior ao medido experimentalmente em ambos os casos.

Também foi possível fazer previsões para o comportamento após choque hipotônico das concentrações de ADP, AMP, ADO e INO no ASL *in vivo*. De acordo com o modelo, após o choque hipotônico a ativação por ADO dos receptores A_{2B} é superior a 50% da ativação máxima durante cerca de 50s.

A divergência encontrada entre os picos experimentais e os do modelo para a concentração de ATP pode estar associada à simplificação que fizemos de que o líquido do ASL tem a forma exata de um cilindro quando na realidade forma-se um menisco na superfície. Ora, conforme vimos, a concentração de ATP após choque hipotônico depende de z e a existência do menisco altera a distância da interface líquido-ar à

superfície do epitélio. O próximo passo será incluir o menisco no modelo para testar se isso corrige a discrepância entre os valores experimental e simulacional para a média volumétrica de ATP.

Modelos matemáticos como o proposto aqui são importantes pois permitem investigar quantitativamente fenômenos biológicos que são de difícil acesso experimental. A partir de suas previsões é possível direcionar os experimentos, assim como elaborar hipóteses baseadas nos resultados do modelo. O uso desse modelos é uma alternativa para avançar mais rápido e fazer descobertas em áreas que de outra forma exigiriam mais tempo e recursos. Em particular, o modelo descrito pode ser usado para investigar o papel de cada enzima na concentração de ATP e ADO. Para simular a inibição de uma enzima no modelo, basta anular o parâmetro V_{max} da reação catalisada pela enzima em questão. Por outro lado, para inibir uma única enzima experimentalmente é necessário desenvolver uma droga que impeça o seu funcionamento (inibidor). Portanto, o modelo é uma ferramenta útil para selecionar qual enzima deve ser inibida para se obter o maior aumento da concentração de ATP e ADO e, em consequência, melhor transporte mucociliar.

Outra perspectiva para o modelo consiste em implementá-lo usando os parâmetros cinéticos ($Km's$ e $V'_{max}s$) obtidos a partir de culturas de células de pacientes com Fibrose Cística com o objetivo de descrever a concentração dos nucleotídeos extracelulares no líquido superficial nesse indivíduos.

Apêndice A

Solução numérica da equação de difusão em coordenadas cilíndricas pelo método de volumes finitos

A.1 Discretização da equação de difusão usando o método dos volumes finitos

A equação de difusão

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 c \quad (\text{A.1})$$

em coordenadas cilíndricas, com simetria angular, torna-se

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left[\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial c}{\partial r} \right) + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right]. \quad (\text{A.2})$$

Para obter a equação discretizada, vamos integrar a equação acima no volume de controle, (figura A.1) (r varia de w a e , z varia de s a n e o ângulo varia de ϕ a $\phi + \Delta\phi$) e no intervalo de tempo t a $t + \Delta t$.

$$\int_s^n \int_w^e \int_\phi^{\phi+\Delta\phi} \int_t^{t+\Delta t} \frac{\partial c}{\partial t} r dt d\phi dr dz = D \int_t^{t+\Delta t} \int_s^n \int_w^e \int_\phi^{\phi+\Delta\phi} \left[\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial c}{\partial r} \right) + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right] r d\phi dr dz dt. \quad (\text{A.3})$$

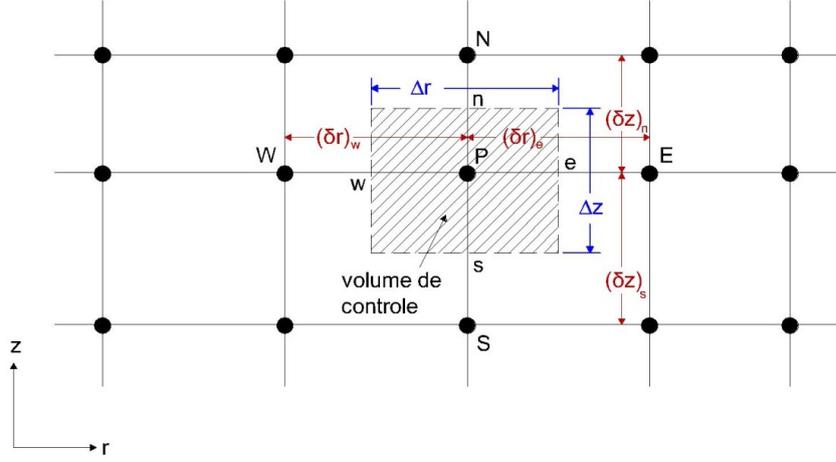


Figura A.1: Volume de controle. É importante destacar que devido à simetria angular, o problema e, conseqüentemente, o volume de controle, são reduzidos a duas dimensões. Dessa forma, optamos por mostrar o volume de controle que vai ser utilizado, omitindo a parte em ϕ .

Como nenhum dos integrandos depende de ϕ , a integral nessa variável resulta em $\Delta\phi$ em ambos os lados e pode, portanto, ser cancelada. Ficamos com

$$\int_s^n \int_w^e \int_t^{t+\Delta t} \frac{\partial c}{\partial t} r dt dr dz = D \int_t^{t+\Delta t} \int_s^n \int_w^e \left[\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial c}{\partial r} \right) + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right] r dr dz dt. \quad (\text{A.4})$$

Calculando agora as integrais do lado esquerdo da equação (A.4), temos que

$$\int_s^n \int_w^e \int_t^{t+\Delta t} \frac{\partial c}{\partial t} r dt dr dz = \int_s^n \int_w^e (c(t + \Delta t) - c(t)) r dr dz. \quad (\text{A.5})$$

Vamos assumir que a concentração, nesse caso, seja constante no volume de controle e que assumo o valor de c do ponto P da rede, c_P . Usando essa suposição e a notação $c(t) = c^0$ e $c(t + \Delta t) = c^1$ a equação acima pode ser reescrita como

$$\int_s^n \int_w^e (c^1 - c^0) r dr dz = (c_P^1 - c_P^0) \left(\frac{r_e^2}{2} - \frac{r_w^2}{2} \right) \Delta z = (c_P^1 - c_P^0) \frac{(r_e + r_w)}{2} \Delta r \Delta z, \quad (\text{A.6})$$

onde $\Delta z = z_n - z_s$ e $\Delta r = r_e - r_w$. Note que usamos a relação: $\frac{1}{2}(r_e^2 - r_w^2) = \frac{1}{2}(r_e + r_w)(r_e - r_w) = \frac{1}{2}(r_e + r_w)\Delta r$.

Calculando o lado direito da eq. (A.4) obtemos que

$$D \int_t^{t+\Delta t} \int_s^n \int_w^e \left[\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial c}{\partial r} \right) + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right] r dr dz dt = D \int_t^{t+\Delta t} \left[\left(r \frac{\partial c}{\partial r} \right) \Big|_w^e \Delta z + \frac{\partial c}{\partial z} \Big|_s^n \frac{(r_e + r_w)}{2} \Delta r \right] dt. \quad (\text{A.7})$$

Usando as definições da figura A.1, as derivadas da equação anterior podem ser aproximadas por

$$\begin{aligned} \left(\frac{\partial c}{\partial r} \right)_e &= \frac{c_E - c_P}{(\delta r)_e}, & \left(\frac{\partial c}{\partial r} \right)_w &= \frac{c_P - c_W}{(\delta r)_w}, & , \\ \left(\frac{\partial c}{\partial z} \right)_n &= \frac{c_N - c_P}{(\delta z)_n}, & \left(\frac{\partial c}{\partial z} \right)_s &= \frac{c_P - c_S}{(\delta z)_s} & . \end{aligned}$$

onde $(\delta r)_e = r_E - r_P$, $(\delta r)_w = r_P - r_W$, $(\delta z)_n = z_N - z_P$ e $(\delta z)_s = z_P - z_S$. Portanto, desenvolvendo as derivadas nos limites, o lado direito da eq. (A.4) se torna

$$D \int_t^{t+\Delta t} \left\{ \left[r_e \frac{(c_E - c_P)}{(\delta r)_e} - r_w \frac{(c_P - c_W)}{(\delta r)_w} \right] \Delta z + \left[\frac{(c_N - c_P)}{(\delta z)_n} - \frac{(c_P - c_S)}{(\delta z)_s} \right] \frac{(r_e + r_w)}{2} \Delta r \right\} dt. \quad (\text{A.8})$$

Agora é necessário fazer uma suposição sobre como c_P , c_E , c_W , c_S e c_N variam com o tempo de t a $t + \Delta t$. Muitas suposições são possíveis e algumas delas podem ser generalizadas da seguinte forma [33]

$$\int_t^{t+\Delta t} c_P dt = [f c_P^1 + (1 - f) c_P^0] \Delta t, \quad (\text{A.9})$$

em que f é um fator de peso entre 0 e 1. $f=0$ corresponde a uma equação totalmente explícita, $f=0,5$ leva ao esquema de Crank-Nicolson e $f=1$ ao esquema totalmente implícito. Escolhemos o esquema totalmente implícito, $f=1$, devido à estabilidade numérica, conforme explicado por Patankar [33]. Aplicando essa escolha à eq. (A.8) e igualando a (A.6), temos

$$(c_P^1 - c_P^0) \frac{(r_e + r_w)}{2} \frac{\Delta r \Delta z}{\Delta t} = D \left[r_e \frac{(c_E^1 - c_P^1)}{(\delta r)_e} - r_w \frac{(c_P^1 - c_W^1)}{(\delta r)_w} \right] \Delta z + D \left[\frac{(c_N^1 - c_P^1)}{(\delta z)_n} - \frac{(c_P^1 - c_S^1)}{(\delta z)_s} \right] \frac{(r_e + r_w)}{2} \Delta r. \quad (\text{A.10})$$

Rearranjando os termos obtemos

$$a_P c_P^1 = a_E c_E^1 + a_W c_W^1 + a_N c_N^1 + a_S c_S^1 + a_P^0 c_P^0, \quad (\text{A.11})$$

com os coeficientes dados por

$$\begin{aligned} a_E &= \frac{D r_e}{(\delta r)_e} \Delta z, \\ a_W &= \frac{D r_w}{(\delta r)_w} \Delta z, \\ a_N &= \frac{D}{(\delta z)_n} \frac{(r_e + r_w)}{2} \Delta r, \\ a_S &= \frac{D}{(\delta z)_s} \frac{(r_e + r_w)}{2} \Delta r, \\ a_P^0 &= \frac{(r_e + r_w)}{2} \frac{\Delta r \Delta z}{\Delta t}, \\ a_P &= a_E + a_W + a_N + a_S + a_P^0, \end{aligned}$$

onde $\Delta r = r_e - r_w$, $\Delta z = z_n - z_s$, $(\delta r)_e = r_E - r_P$, $(\delta r)_w = r_P - r_W$, $(\delta z)_n = z_N - z_P$ e $(\delta z)_s = z_P - z_S$.

A.2 Condições de contorno

A.2.1 Condição de contorno em $r=R$

A condição de contorno de parede refletora em $r=R$ é

$$\left. \frac{\partial c}{\partial r} \right|_{r=R} = 0. \quad (\text{A.12})$$

Vamos integrar a equação de difusão sobre “metade” do volume de controle adjacente

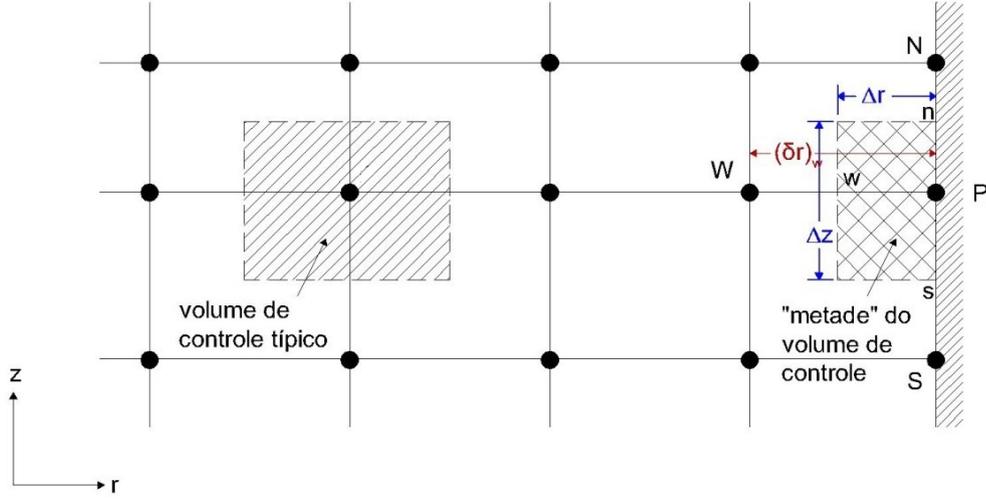


Figura A.2: “Metade” do volume de controle na fronteira $r=R$.

à fronteira $r = R$ (figura A.2) e utilizar a condição de contorno explicitamente nesse volume

$$\int_s^n \int_w^R \int_t^{t+\Delta t} \frac{\partial c}{\partial t} r dt dr dz = D \int_t^{t+\Delta t} \int_s^n \int_w^R \left[\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial c}{\partial r} \right) + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right] r dr dz dt. \quad (\text{A.13})$$

Na equação acima já eliminamos a integral em ϕ , devido à simetria angular conforme explicado na seção anterior.

Resolvendo o lado esquerdo da equação, obtemos

$$\int_s^n \int_w^R \int_t^{t+\Delta t} \frac{\partial c}{\partial t} r dt dr dz = (c_P^1 - c_P^0) \frac{(r_w + R)}{2} \Delta r \Delta z, \quad (\text{A.14})$$

onde $\Delta r = R - r_w$.

Devemos desenvolver também as integrais do lado direito da equação (A.13), que fornece

$$\int_t^{t+\Delta t} \int_s^n \int_w^R \left[\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial c}{\partial r} \right) + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right] r dr dz dt = \int_t^{t+\Delta t} \left[\left(r \frac{\partial c}{\partial r} \right) \Big|_w^R \Delta z + \frac{\partial c}{\partial z} \Big|_s^n \frac{(r_w + R)}{2} \Delta r \right] dt \quad (\text{A.15})$$

$$= \int_t^{t+\Delta t} \left\{ \left[R \frac{\partial c}{\partial r} \Big|_{r=R} - r_w \frac{(c_P - c_W)}{(\delta r)_w} \right] \Delta z + \left[\frac{(c_N - c_P)}{(\delta z)_n} - \frac{(c_P - c_S)}{(\delta z)_s} \right] \frac{(r_w + R)}{2} \Delta r \right\} dt. \quad (\text{A.16})$$

Aplicando a condição de contorno (A.12), vemos que o primeiro termo da integral acima é nulo. Assumindo o esquema totalmente implícito para integrar em t , a equação acima fica igual a

$$\left[-r_w \frac{(c_P^1 - c_W^1)}{(\delta r)_w} \right] \Delta z \Delta t + \left[\frac{(c_N^1 - c_P^1)}{(\delta z)_n} - \frac{(c_P^1 - c_S^1)}{(\delta z)_s} \right] \frac{(r_w + R)}{2} \Delta r \Delta t. \quad (\text{A.17})$$

Juntando os dois lados da equação, temos que

$$(c_P^1 - c_P^0) \frac{(r_w + R)}{2} \frac{\Delta r \Delta z}{\Delta t} = D \left[-r_w \frac{(c_P^1 - c_W^1)}{(\delta r)_w} \right] \Delta z + D \left[\frac{(c_N^1 - c_P^1)}{(\delta z)_n} - \frac{(c_P^1 - c_S^1)}{(\delta z)_s} \right] \frac{(r_w + R)}{2} \Delta r. \quad (\text{A.18})$$

Portanto, a equação discretizada para o ponto c_P na fronteira $r = R$ é dada por

$$a_P c_P^1 = a_W c_W^1 + a_N c_N^1 + a_S c_S^1 + a_P^0 c_P^0, \quad (\text{A.19})$$

cujos coeficientes são

$$\begin{aligned} a_W &= \frac{D r_w}{(\delta r)_w} \Delta z, \\ a_N &= \frac{D}{(\delta z)_n} \frac{(r_w + R)}{2} \Delta r, \\ a_S &= \frac{D}{(\delta z)_s} \frac{(r_w + R)}{2} \Delta r, \\ a_P^0 &= \frac{(r_w + R)}{2} \frac{\Delta r \Delta z}{\Delta t}, \\ a_P &= a_W + a_N + a_S + a_P^0, \end{aligned}$$

onde $\Delta r = R - r_w$, $\Delta z = z_n - z_s$, $(\delta r)_w = R - r_W$, $(\delta z)_n = z_N - z_P$ e $(\delta z)_s = z_P - z_S$. Note que a eq.(A.19) equivale à equação geral (A.11), se fizermos $r_e = r_P = R$ e $a_E = 0$.

A.2.2 Equação de discretização em $r=0$

Repetindo os cálculos feitos na subseção anterior para um volume de controle adjacente à $r = 0$, obtemos a equação geral (A.11) com $r_w = r_P = 0$ e $a_W = 0$.

A.2.3 Condição de contorno em $z=0$

A condição de contorno em $z = 0$ é (ver capítulo 2)

$$-D \frac{\partial c}{\partial z} \Big|_{z=0} = F - \frac{V_m c(0, r, t)}{K_m + c(0, r, t)}. \quad (\text{A.20})$$

Vamos prosseguir de maneira análoga ao que foi feito para a condição de contorno em $r = R$. Integrando a equação de difusão sobre “metade” do volume de controle adjacente à fronteira $z = 0$ (figura A.3), temos

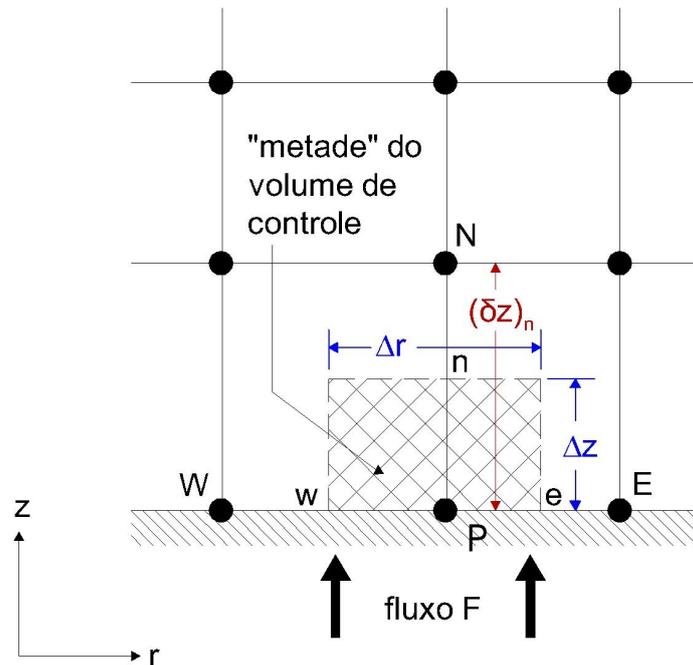


Figura A.3: “Metade” do volume de controle na fronteira $z=0$

$$\int_0^n \int_w^e \int_t^{t+\Delta t} \frac{\partial c}{\partial t} r dt dr dz = D \int_t^{t+\Delta t} \int_0^n \int_w^e \left[\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial c}{\partial r} \right) + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right] r dr dz dt, \quad (\text{A.21})$$

na qual já eliminamos a integral em ϕ .

Resolvendo o lado esquerdo da equação acima, temos que

$$\int_0^n \int_w^e \int_t^{t+\Delta t} \frac{\partial c}{\partial t} r dt dr dz = (c_P^1 - c_P^0) \frac{(r_w + r_e)}{2} \Delta r \Delta z, \quad (\text{A.22})$$

onde c_P é o ponto na fronteira $z = 0$ e $\Delta z = z_n - 0 = z_n$.

Resolvendo o lado direito da eq. (A.21), encontramos

$$D \int_t^{t+\Delta t} \int_w^e \int_0^n \left[\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial c}{\partial r} \right) + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right] r dr dz dt = \int_t^{t+\Delta t} D \left[\left(r \frac{\partial c}{\partial r} \right) \Big|_w^e \Delta z + \int_w^e \left(\frac{\partial c}{\partial z} \right) \Big|_0^n r dr \right] dt \quad (\text{A.23})$$

$$= \int_t^{t+\Delta t} \left[D \left(r_e \frac{(c_E - c_P)}{(\delta r)_e} - r_w \frac{(c_P - c_W)}{(\delta r)_w} \right) \Delta z + \int_w^e \left(D \frac{(c_N - c_P)}{(\delta z)_n} - D \frac{\partial c}{\partial z} \Big|_{z=0} \right) r dr \right] dt. \quad (\text{A.24})$$

Aplicando a condição de contorno, $-D \frac{\partial c}{\partial z} \Big|_{z=0} = F - \frac{V_m c(0,r,t)}{K_m + c(0,r,t)}$, na equação acima, o lado direito da eq. (A.21) fica igual a

$$\int_t^{t+\Delta t} \left[D \left(r_e \frac{(c_E - c_P)}{(\delta r)_e} - r_w \frac{(c_P - c_W)}{(\delta r)_w} \right) \Delta z + \int_w^e \left(D \frac{(c_N - c_P)}{(\delta z)_n} + F - \frac{V_m c(0,r,t)}{K_m + c(0,r,t)} \right) r dr \right] dt. \quad (\text{A.25})$$

Vamos assumir que $c(0,r,t)$ pode ser aproximado por c_P no volume de controle para integrar o último termo em r e obter

$$\int_t^{t+\Delta t} \left[D \left(r_e \frac{(c_E - c_P)}{(\delta r)_e} - r_w \frac{(c_P - c_W)}{(\delta r)_w} \right) \Delta z + \left(D \frac{(c_N - c_P)}{(\delta z)_n} + F - \frac{V_m c_P}{K_m + c_P} \right) \frac{(r_w + r_e)}{2} \Delta r \right] dt. \quad (\text{A.26})$$

Optando novamente pelo esquema totalmente implícito para integrar em t e igualando à eq. (A.22), obtemos

$$\begin{aligned} (c_P^1 - c_P^0) \frac{(r_w + r_e) \Delta r \Delta z}{2 \Delta t} = D \left[r_e \frac{(c_E^1 - c_P^1)}{(\delta r)_e} - r_w \frac{(c_P^1 - c_W^1)}{(\delta r)_w} \right] \Delta z \\ + \left[D \frac{(c_N^1 - c_P^1)}{(\delta z)_n} + \frac{1}{\Delta t} \int_t^{t+\Delta t} F dt - \frac{V_m c_P^1}{K_m + c_P^1} \right] \frac{(r_w + r_e)}{2} \Delta r. \end{aligned} \quad (\text{A.27})$$

Portanto a equação discretizada para os pontos de fronteira em $z = 0$ é dada por

$$a_P c_P^1 = a_E c_E^1 + a_W c_W^1 + a_N c_N^1 + a_P^0 c_P^0 + b. \quad (\text{A.28})$$

e os coeficientes dessa equação são

$$\begin{aligned} a_E &= \frac{D r_e}{(\delta r)_e} \Delta z, \\ a_W &= \frac{D r_w}{(\delta r)_w} \Delta z, \\ a_N &= \frac{D}{(\delta z)_n} \frac{(r_w + r_e)}{2} \Delta r, \\ a_P^0 &= \frac{(r_w + r_e) \Delta r \Delta z}{2 \Delta t}, \\ b &= \frac{(r_w + r_e)}{2} \Delta r \frac{1}{\Delta t} \int_t^{t+\Delta t} F dt, \\ a_P &= a_E + a_W + a_N + a_P^0 + \frac{V_m}{K_m + c_P^1} \frac{(r_w + r_e)}{2} \Delta r, \end{aligned}$$

onde $\Delta r = r_e - r_w$, $\Delta z = z_n$, $(\delta r)_e = r_E - r_P$, $(\delta r)_w = r_P - r_W$ e $(\delta z)_n = z_N - z_P$. Note que esta equação é idêntica ao caso geral (eq. (A.11)), caso $z_S = z_P = 0$ e $a_S = 0$.

A.2.4 Condição de contorno em $z=H$

A condição de contorno em $z = H$ é dada por

$$\left. \frac{\partial c}{\partial z} \right|_{z=H} = 0. \quad (\text{A.29})$$

Vamos integrar a equação de difusão sobre “metade” do volume de controle adjacente à fronteira de interesse (figura A.4), como mostrado abaixo

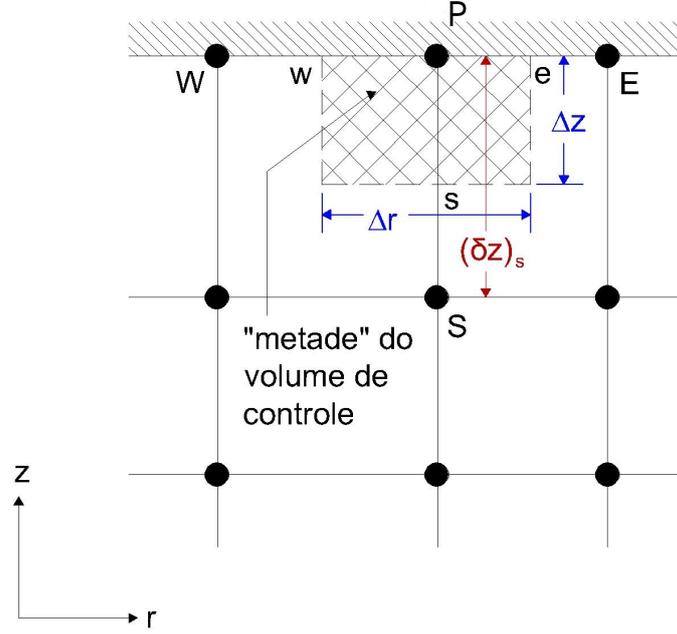


Figura A.4: “Metade” do volume de controle na fronteira $z = H$

$$\int_s^H \int_w^e \int_t^{t+\Delta t} \frac{\partial c}{\partial t} r dt dr dz = D \int_t^{t+\Delta t} \int_s^H \int_w^e \left[\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial c}{\partial r} \right) + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right] r dr dz dt. \quad (\text{A.30})$$

Nessa equação a integral em ϕ já foi eliminada devido à mesma consideração feita nas seções anteriores.

Resolvendo o lado esquerdo da eq. (A.30), temos

$$\int_s^H \int_w^e \int_t^{t+\Delta t} \frac{\partial c}{\partial t} r dt dr dz = (c_P^1 - c_P^0) \frac{(r_w + r_e)}{2} \Delta r \Delta z, \quad (\text{A.31})$$

onde $\Delta z = H - z_s$. A fim de resolver o lado direito da eq. (A.30), integramos primeiro em r e z , obtendo que

$$\int_t^{t+\Delta t} \int_w^e \int_s^H \left[\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial c}{\partial r} \right) + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right] r dr dz dt = \int_t^{t+\Delta t} \left[\left(r \frac{\partial c}{\partial r} \right) \Big|_w^e \Delta z + \frac{\partial c}{\partial z} \Big|_s^H \frac{(r_w + r_e)}{2} \Delta r \right] dt \quad (\text{A.32})$$

$$= \int_t^{t+\Delta t} \left\{ \left[r_e \frac{(c_E - c_P)}{(\delta r)_e} - r_w \frac{(c_P - c_W)}{(\delta r)_w} \right] \Delta z + \left[\frac{\partial c}{\partial z} \Big|_{z=H} - \frac{(c_P - c_S)}{(\delta z)_s} \right] \frac{(r_w + r_e)}{2} \Delta r \right\} dt. \quad (\text{A.33})$$

Ao aplicar a condição de contorno eq.(A.29) e integrar em t , assumindo o esquema totalmente implícito, o lado direito da eq. (A.30) fica dado por

$$D \left[r_e \frac{(c_E^1 - c_P^1)}{(\delta r)_e} - r_w \frac{(c_P^1 - c_W^1)}{(\delta r)_w} \right] \Delta z \Delta t + D \left[-\frac{(c_P^1 - c_S^1)}{(\delta z)_s} \right] \frac{(r_w + r_e)}{2} \Delta r \Delta t. \quad (\text{A.34})$$

Juntando os dois lados da equação e rearranjando os termos, obtemos

$$a_P c_P^1 = a_E c_E^1 + a_W c_W^1 + a_S c_S^1 + a_P^0 c_P^0 \quad (\text{A.35})$$

com os respectivos coeficientes dados por

$$\begin{aligned} a_E &= \frac{Dr_e}{(\delta r)_e} \Delta z, \\ a_W &= \frac{Dr_w}{(\delta r)_w} \Delta z, \\ a_S &= \frac{D}{(\delta z)_s} \frac{(r_w + r_e)}{2} \Delta r, \\ a_P^0 &= \frac{(r_w + r_e)}{2} \frac{\Delta r \Delta z}{\Delta t}, \\ a_P &= a_E + a_W + a_S + a_P^0. \end{aligned}$$

onde $\Delta r = r_e - r_w$, $\Delta z = H - z_s$, $(\delta r)_e = r_E - r_P$, $(\delta r)_w = r_P - r_W$ e $(\delta z)_s = H - z_S$. Note que se $z_n = z_P = H$ e $a_N = 0$, essa equação é igual ao caso geral (eq. (A.11)).

A.3 Pontos extremos

Temos que analisar separadamente os pontos da rede que envolvem mais de uma condição de contorno. Para esses pontos, situados nos quatro extremos da rede repetimos o procedimento realizado anteriormente, integrando, agora, a equação de difusão sobre “um quarto” do volume de controle. Como os cálculos são uma extensão direta dos explicitados para os demais pontos, apenas listamos os resultados.

A.3.1 Em $r=0$ e $z=0$

A equação discretizada para o ponto $r = 0$ e $z = 0$ é dada por:

$$a_P c_P^1 = a_E c_E^1 + a_N c_N^1 + a_P^0 c_P^0 + b \quad (\text{A.36})$$

onde

$$\begin{aligned} a_E &= \frac{D r_e}{(\delta r)_e} \Delta z, \\ a_N &= \frac{D}{(\delta z)_n} \frac{r_e}{2} \Delta r, \\ a_P^0 &= \frac{r_e}{2} \frac{\Delta r \Delta z}{\Delta t}, \\ b &= \frac{r_e}{2} \Delta r \frac{1}{\Delta t} \int_t^{t+\Delta t} F dt, \\ a_P &= a_E + a_N + a_P^0 + \frac{V_m}{K_m + c_P^1} \frac{r_e}{2} \Delta r, \end{aligned}$$

onde $\Delta r = r_e$, $\Delta z = z_n$, $(\delta r)_e = r_E$, e $(\delta z)_n = z_N$.

A.3.2 Em $r=R$ e $z=0$

A equação discretizada para o ponto $r = R$ e $z = 0$ é dada por:

$$a_P c_P^1 = a_W c_W^1 + a_N c_N^1 + a_P^0 c_P^0 + b \quad (\text{A.37})$$

onde os coeficientes são

$$\begin{aligned} a_W &= \frac{D r_w}{(\delta r)_w} \Delta z, \\ a_N &= \frac{D}{(\delta z)_n} \frac{(r_w + R)}{2} \Delta r, \\ a_P^0 &= \frac{(r_i + R)}{2} \frac{\Delta r \Delta z}{\Delta t}, \\ b &= \frac{(r_w + R)}{2} \Delta r \frac{1}{\Delta t} \int_t^{t+\Delta t} F dt, \\ a_P &= a_W + a_N + a_P^0 + \frac{V_m}{K_m + c_P^1} \frac{(r_w + R)}{2} \Delta r, \end{aligned}$$

onde $\Delta r = R - r_w$, $\Delta z = z_n$, $(\delta r)_w = R - r_W$ e $(\delta z)_n = z_N$.

A.3.3 Em $r=R$ e $z=H$

A equação discretizada para o ponto $r = R$ e $z = H$ é

$$a_P c_P^1 = a_W c_W^1 + a_S c_S^1 + a_P^0 c_P^0. \quad (\text{A.38})$$

Os coeficientes são dados por

$$\begin{aligned} a_W &= \frac{Dr_w}{(\delta r)_w} \Delta z, \\ a_S &= \frac{D}{(\delta z)_s} \frac{(r_w + R)}{2} \Delta r, \\ a_P^0 &= \frac{(r_w + R)}{2} \frac{\Delta r \Delta z}{\Delta t}, \\ a_P &= a_W + a_S + a_P^0, \end{aligned}$$

onde $\Delta r = R - r_w$, $\Delta z = H - z_s$, $(\delta r)_w = R - r_W$ e $(\delta z)_s = H - z_S$.

A.3.4 Em $r=0$ e $z=H$

A equação discretizada para o ponto $r = 0$ e $z = H$ é dada por

$$a_P c_P^1 = a_E c_E^1 + a_S c_S^1 + a_P^0 c_P^0. \quad (\text{A.39})$$

onde

$$\begin{aligned} a_E &= \frac{Dr_e}{(\delta r)_e} \Delta z, \\ a_S &= \frac{D}{(\delta z)_s} \frac{r_e}{2} \Delta r, \\ a_P^0 &= \frac{r_e}{2} \frac{\Delta r \Delta z}{\Delta t}, \\ a_P &= a_E + a_S + a_P^0, \end{aligned}$$

onde $\Delta r = r_e$, $\Delta z = H - z_s$, $(\delta r)_e = r_E$ e $(\delta z)_s = H - z_S$.

A.4 Solução das equações discretizadas

Para resolver as equações discretizadas e, assim, obter a concentração ao longo do tempo para todos os pontos da rede, usamos o “método linha por linha” que é uma

combinação do algoritmo de Thomas, também conhecido como TDMA (TriDiagonal-Matrix Algorithm), com o método de Gauss-Seidel [33]. O algoritmo TDMA fornece a solução exata para problemas unidimensionais. Em problemas bidimensionais veremos que o método TDMA é aplicado linha por linha e coluna por coluna, iterando várias vezes, até a solução convergir.

A.4.1 Algoritmo TDMA para problemas unidimensionais

Usando uma notação um pouco diferente da adotada na dedução das equações discretizadas, numeramos os pontos da rede (figura A.5) de 1 a N , sendo que os pontos 1 e N se referem aos pontos nas fronteiras.

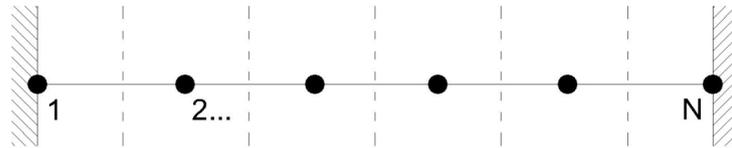


Figura A.5: Discretização em uma dimensão

As equações de discretização podem ser escritas como

$$a_i c_i = b_i c_{i+1} + g_i c_{i-1} + d_i, \quad (\text{A.40})$$

para $i = 1, 2, 3, \dots, N$, onde c_i é a concentração no ponto i e a_i, b_i, g_i e d_i são coeficientes constantes. Os pontos c_0 e c_{N+1} não possuem significado, dessa forma a equação acima para os pontos de fronteira deve ter $g_1 = 0$ e $b_N = 0$. Devido à imposição ao coeficiente $g_1 = 0$, a equação acima para $i = 1$, fornece c_1 em termos de c_2 . Já a equação para $i = 2$ relaciona c_1, c_2 e c_3 . Como c_1 pode ser expresso em função de c_2 , podemos escrever c_3 em termos de c_2 . Tal processo de substituição pode ser estendido até c_N ser expresso em termos de c_{N+1} . Mas, visto que o ponto c_{N+1} não existe, obtemos numericamente o valor de c_N . A seguir, fazemos substituições no sentido contrário para obter $c_{N-1}, c_{N-2}, \dots, c_1$, ou seja, c_{N-1} é obtido de c_N, c_{N-2} é obtido de c_{N-1} , etc, até c_1 ser obtido de c_2 .

Para implementar o método, vamos reescrever a eq. (A.40) na forma

$$c_i = P_i c_{i+1} + Q_i, \quad (\text{A.41})$$

onde P_i e Q_i são coeficientes constantes. A fim de obter esses coeficientes, vamos substituir a relação

$$c_{i-1} = P_{i-1}c_i + Q_{i-1} \quad (\text{A.42})$$

na eq. (A.40), para ficar com

$$a_i c_i = b_i c_{i+1} + g_i (P_{i-1} c_i + Q_{i-1}) + d_i. \quad (\text{A.43})$$

Rearranjando os termos da equação acima, temos

$$c_i = \frac{b_i}{(a_i - g_i P_{i-1})} c_{i+1} + \frac{d_i + g_i Q_{i-1}}{(a_i - g_i P_{i-1})}. \quad (\text{A.44})$$

Comparando essa equação com a eq. (A.41), obtemos as seguintes relações:

$$P_i = \frac{b_i}{(a_i - g_i P_{i-1})}, \quad (\text{A.45})$$

$$Q_i = \frac{d_i + g_i Q_{i-1}}{(a_i - g_i P_{i-1})}. \quad (\text{A.46})$$

Essas são relações de recorrência, pois fornecem P_i e Q_i em termos de P_{i-1} e Q_{i-1} . Para iniciar o processo de recorrência basta notar que para $i = 1$, as eqs (A.40) e (A.41) implicam que

$$P_1 = \frac{b_1}{a_1} \quad \text{e} \quad Q_1 = \frac{d_1}{a_1}. \quad (\text{A.47})$$

Por outro lado, no final da sequência, em $i = N$, sabemos que $b_N = 0$, de forma que a eq.(A.45) fornece $P_N = 0$ e a eq. (A.41) se reduz a

$$c_N = Q_N. \quad (\text{A.48})$$

Tendo determinado c_N , podemos iniciar a substituição no sentido contrário usando a eq. (A.42) para obter $c_{N-1}, c_{N-2}, \dots, c_2, c_1$.

Em resumo, o algoritmo TDMA, consiste em:

- 1- Calcular P_1 e Q_1 usando a eq.(A.47).
- 2- Usar as relações de recorrência (A.45) e (A.46) para obter P_i e Q_i para $i = 2, 3, \dots, N$.
- 3- Fazer $c_N = Q_N$
- 4- Usar eq. (A.41) para $i = N - 1, N - 2, \dots, 3, 2, 1$ para obter $c_{N-1}, c_{N-2}, \dots, c_3, c_2, c_1$.

A.4.2 Algoritmo linha-por-linha para problemas bidimensionais

Para solucionar as equações discretizadas em duas dimensões, vamos percorrer a malha aplicando o método TDMA linha por linha em uma das direções e, em seguida, linha por linha na outra direção, até que o método tenha sido empregado em todas as linhas em ambas as direções. Embora o método TDMA forneça a solução exata para problemas unidimensionais, métodos exatos em duas dimensões são computacionalmente pesados, mais lentos e, assim, pouco atraentes [33]. Vimos na subseção anterior que, ao utilizar o algoritmo TDMA para determinar o valor em um ponto, dependemos dos valores nos pontos vizinhos a ele. Nos problemas bidimensionais, como não possuímos o valor correto para os vizinhos situados na linha em que ainda não aplicamos o método, a melhor opção é utilizar o valor mais atualizado desses pontos, o que não é suficiente para obter o valor exato do ponto que desejamos determinar. Assim, para refinar a solução nos problemas bidimensionais, devem ser feitas várias iterações para cada passo de tempo.

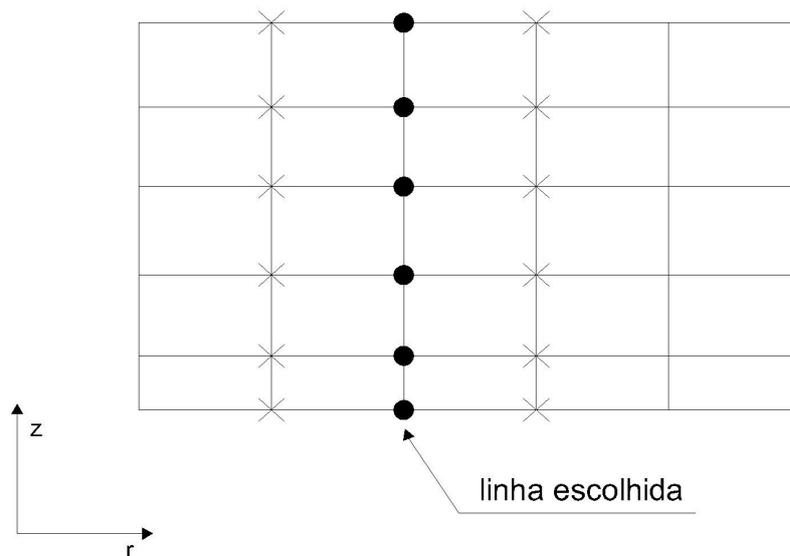


Figura A.6: Malha bidimensional.

O procedimento consiste em escolher inicialmente uma linha da malha (por exemplo na direção z , veja figura A.6), assumindo que são conhecidos os valores mais “atualizados” da concentração c nos pontos das linhas vizinhas e resolver a equação para os c 's ao longo da linha escolhida usando TDMA (figura A.6). Esse procedimento deve ser seguido para todas as linhas em uma direção (e.g., direção z) e repetido para as linhas na outra direção (e.g., direção r). Devemos repetir o processo o número de vezes necessário para se alcançar a convergência desejada, para cada passo de tempo.

Cabe ressaltar que os termos da equação que englobam os pontos vizinhos pertencentes às outras linhas, assim como o termo que possui a concentração no tempo anterior, devem ser incluídos na constante d_i da eq. (A.40). Por exemplo, se escolhermos variar primeiro na direção z , a identificação da eq. (A.11),

$$a_P c_P^1 = a_E c_E^1 + a_W c_W^1 + a_N c_N^1 + a_S c_S^1 + a_P^0 c_P^0, \quad (\text{A.49})$$

com a eq. (A.40),

$$a_i c_i = b_i c_{i+1} + g_i c_{i-1} + d_i, \quad (\text{A.50})$$

é feita da seguinte maneira:

$$a_i = a_P,$$

$$b_i = a_N,$$

$$g_i = a_S,$$

$$d_i = a_E c_E^1 + a_W c_W^1 + a_P^0 c_P^0.$$

Apêndice B

Solução analítica da equação de difusão em coordenadas cilíndricas:

(i) Barreiras refletoras

(ii) Fluxo constante em $z=0$

B.1 Equação de difusão com barreiras refletoras

O fenômeno da difusão pode ser descrito pela equação [36]

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D\nabla^2 c, \quad (\text{B.1})$$

onde c é a concentração, função da posição \vec{r} e do tempo t , e D é o coeficiente de difusão. No sistema internacional (SI), as unidades dessas grandezas são respectivamente mol/m^3 , m , s e m^2/s . Em coordenadas cilíndricas, com simetria angular, essa equação se torna

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \left[\frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial c}{\partial r} \right) + \frac{\partial^2 c}{\partial z^2} \right]. \quad (\text{B.2})$$

O fluxo F de partículas através de uma parede é dado por $F = -D\nabla c \cdot \hat{\mathbf{n}}$, onde $\hat{\mathbf{n}}$ é um vetor unitário normal à parede. Portanto, as condições de contorno para barreiras refletoras são

$$\left. \frac{\partial c}{\partial z} \right|_{z=0} = 0, \quad (\text{B.3})$$

$$\left. \frac{\partial c}{\partial z} \right|_{z=H} = 0, \quad (\text{B.4})$$

$$\left. \frac{\partial c}{\partial r} \right|_{r=R} = 0, \quad (\text{B.5})$$

onde R é o raio e H é a altura do cilindro.

B.1.1 Separação de variáveis

Usando o método de separação de variáveis [37] para buscar uma solução, propomos uma solução da forma

$$c(r, z, t) = \rho(r)Z(z)T(t). \quad (\text{B.6})$$

Substituindo a solução acima (B.6) na equação de difusão (B.2) e dividindo por $\rho Z T$ obtemos

$$\frac{1}{T} \frac{\partial T}{\partial t} = D \left[\frac{1}{\rho r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial \rho}{\partial r} \right) + \frac{1}{Z} \frac{\partial^2 Z}{\partial z^2} \right]. \quad (\text{B.7})$$

Cada termo desta equação depende apenas de uma variável. Como as variáveis variam independentemente umas das outras, cada termo deve ser igual a uma constante e, assim, ficamos com as seguintes equações:

$$\frac{1}{T} \frac{\partial T}{\partial t} = -\alpha, \quad (\text{B.8})$$

$$\frac{1}{Z} \frac{\partial^2 Z}{\partial z^2} = \beta, \quad (\text{B.9})$$

$$\frac{1}{\rho r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial \rho}{\partial r} \right) = \gamma = -\frac{\alpha}{D} - \beta. \quad (\text{B.10})$$

B.1.2 Resolvendo a equação em t

Na equação (B.8), escolhemos a constante negativa porque esperamos que a concentração fique constante após um tempo, em vez de aumentar indefinidamente ao longo do tempo. A solução da equação (B.8) é

$$T = Ae^{-\alpha t}, \quad (\text{B.11})$$

onde A é uma constante.

B.1.3 Resolvendo a equação em z

Como as condições de contorno são periódicas em z , podemos substituir β por $-\lambda^2$ na equação (B.9), de forma que a solução $Z(z)$ dessa equação e a derivada $\frac{\partial Z}{\partial z}$ são dadas por

$$Z = a \cos \lambda z + b \sin \lambda z, \quad (\text{B.12})$$

$$\frac{\partial Z}{\partial z} = -a\lambda \sin \lambda z + b\lambda \cos \lambda z. \quad (\text{B.13})$$

Impondo as condições de contorno na equação acima, temos

$$\left. \frac{\partial Z}{\partial z} \right|_{z=0} = 0 \Rightarrow b = 0,$$

$$\left. \frac{\partial Z}{\partial z} \right|_{z=H} = 0 \Rightarrow \sin \lambda H = 0 \Rightarrow \lambda = \frac{m\pi}{H},$$

onde $m = 1, 2, 3, \dots$ é um número inteiro. Portanto, β foi determinado, $\beta = -\lambda^2 = -\frac{m^2\pi^2}{H^2}$. Embora tenhamos assumido que $\beta < 0$, é possível mostrar que a hipótese $\beta > 0$, com as condições de contorno (eqs.(B.3) a (B.5)), leva à solução trivial $Z = 0$, já a hipótese $\beta = 0$ leva a solução trivial $Z = \text{constante}$.

B.1.4 Resolvendo a equação em r

Para solucionar a equação (B.10) supomos que $\gamma = -k^2$ e, em seguida, fazemos a mudança de variáveis $x = kr$ para obter

$$\frac{\partial^2 \rho}{\partial x^2} + \frac{1}{x} \frac{\partial \rho}{\partial x} + \rho = 0. \quad (\text{B.14})$$

A equação acima é uma equação de Bessel de ordem zero, cujas soluções, chamadas funções de Bessel de ordem zero, são [36]

$$J_0(x) = \sum_{j=0}^{\infty} \frac{(-1)^j}{j! \Gamma(j+1)} \left(\frac{x}{2}\right)^{2j}. \quad (\text{B.15})$$

A eq. (B.14) é uma equação diferencial de segunda ordem e, dessa forma, tem duas soluções linearmente independentes. Contudo, a solução linearmente independente da explicitada acima diverge em $r = 0$ e, portanto, deve ser descartada.

A solução deve satisfazer a condição de contorno

$$\left. \frac{\partial \rho}{\partial r} \right|_{r=R} = 0 \Rightarrow \left. \frac{dJ_0(x)}{dx} \right|_{x=kR} = 0.$$

Para a condição de contorno ser satisfeita, devemos fazer $kR = y_{0n} \Rightarrow k = y_{0n}/R$, para $n = 1, 2, 3, \dots$, onde y_{0n} é a n -ésima raiz de $\frac{dJ_0(x)}{dx} = 0$. É importante destacar que $\sqrt{r} J_0(y_{0n}r/R)$ forma uma base ortogonal completa de funções [36]. Como $\gamma = -k^2 = -(\frac{y_{0n}}{R})^2$, a partir da equação (B.10) vemos que a constante α é dada por

$$\alpha = D \left[\frac{m^2 \pi^2}{H^2} + \frac{y_{0n}^2}{R^2} \right]. \quad (\text{B.16})$$

B.1.5 Solução geral

Unindo os resultados obtidos acima e notando que a equação diferencial e suas condições de fronteira também são satisfeitas por uma solução constante, temos

$$\begin{aligned} c(r, z, t) = & c_{\infty} + \sum_{n=1}^{\infty} A_{0n} J_0(y_{0n}r/R) e^{-D \frac{y_{0n}^2}{R^2} t} \\ & + \sum_{n,m=1}^{\infty} A_{mn} J_0(y_{0n}r/R) \cos\left(\frac{m\pi z}{H}\right) e^{-D \left[\frac{m^2 \pi^2}{H^2} + \frac{y_{0n}^2}{R^2} \right] t}. \end{aligned} \quad (\text{B.17})$$

Para que a equação acima seja escrita de uma maneira mais conveniente para obter os coeficientes, definimos $\delta c(r, z, t) = c(r, z, t) - c_{\infty}$. A partir dessa definição e da

eq. (B.17), percebe-se que a constante c_∞ pode ser obtida fazendo $t \rightarrow \infty$. Como $\delta c(r, z, t \rightarrow \infty) = 0$, temos que $c_\infty = c(r, z, t \rightarrow \infty)$.

Visto que no caso de barreiras refletoras a massa dentro do cilindro é conservada, c_∞ é dado por

$$c_\infty = \frac{1}{V} \int c(r, z, 0) dV = \frac{1}{\pi R^2 H} \int_0^{2\pi} \int_0^R \int_0^H c(r, z, 0) r d\phi dr dz. \quad (\text{B.18})$$

onde $V = \pi R^2 H$ é o volume.

Para determinar os coeficientes A_{mn} a partir da condição inicial $c(r, z, 0)$, utilizamos a eq. (B.17) em $t = 0$ e a ortogonalidade das funções de Bessel e da função cosseno. Em $t = 0$ temos

$$\begin{aligned} \delta c(r, z, 0) &= c(z, r, 0) - c_\infty \\ &= \sum_{n=1}^{\infty} A_{0n} J_0(y_{0n} r/R) + \sum_{n,m=1}^{\infty} A_{mn} J_0(y_{0n} r/R) \cos\left(\frac{m\pi z}{H}\right). \end{aligned} \quad (\text{B.19})$$

Ao multiplicar ambos os lados da eq. (B.19) por $r J_0(y_{0n} r/R)$ e integrar em r e z , lembrando que [36]

$$\int_0^R r J_0(y_{0n} r/R) J_0(y_{0n} r/R) dr = \frac{R^2}{2} [J_0(y_{0n})]^2 \delta_{(n'n)}, \quad (\text{B.20})$$

obtemos os coeficientes A_{0n}

$$A_{0n} = \frac{2}{H R^2 [J_0(y_{0n})]^2} \int_0^H \int_0^R \delta c(r, z, 0) J_0(y_{0n} r/R) r dr dz. \quad (\text{B.21})$$

De modo semelhante, para determinar A_{mn} , basta multiplicar a eq. (B.19) por $r J_0(y_{0n} r/R) \cos\left(\frac{m'\pi z}{H}\right)$ e integrar em r e z . Temos assim,

$$A_{mn} = \frac{4}{H R^2 [J_0(y_{0n})]^2} \int_0^H \int_0^R \delta c(r, z, 0) J_0(y_{0n} r/R) \cos\left(\frac{m\pi z}{H}\right) r dr dz, \quad (\text{B.22})$$

onde usamos que

$$\int_0^H \cos\left(\frac{m\pi z}{H}\right) \cos\left(\frac{m'\pi z}{H}\right) dz = \frac{H}{2} \delta_{(m'm)}. \quad (\text{B.23})$$

B.1.6 Solução analítica para uma condição inicial ortogonal às autofunções

Os coeficientes A_{0n} e A_{mn} podem ser obtidos analiticamente no caso em que a condição inicial tem a forma

$$c(r, z, 0) = c_\infty + K J_0(y_{0i}r/R) \cos\left(\frac{j\pi z}{H}\right), \quad (\text{B.24})$$

onde K é uma constante e i e j são inteiros positivos. Neste caso, as equações (B.21) e (B.22) fornecem

$$A_{0n} = \delta_{0j} \delta_{ni} K = \begin{cases} 0 & \text{se } j \neq 0, \\ K \delta_{ni} & \text{se } j = 0, \end{cases}$$

$$A_{mn} = \delta_{mj} \delta_{ni} K = \begin{cases} 0 & \text{se } m \neq j \text{ ou } n \neq i, \\ K & \text{se } m = j \text{ e } n = i, \end{cases}$$

Substituindo esses coeficientes na eq.(B.17) temos que a solução analítica da equação de difusão em coordenadas cilíndricas e barreiras refletoras, para a condição inicial (B.24), é

$$c(r, z, t) = c_\infty + K J_0(y_{0i}r/R) \cos\left(\frac{j\pi z}{H}\right) e^{-D \left[\frac{j^2 \pi^2}{H^2} + \frac{y_{0i}^2}{R^2} \right] t}, \quad (\text{B.25})$$

onde i e j são inteiros positivos.

B.2 Equação de difusão com fluxo constante F em $z=0$

B.2.1 Solução geral

Para solucionar a equação de difusão em coordenadas cilíndricas com fluxo constante F em $z = 0$, a equação de difusão (B.2) deve ser resolvida com as condições de contorno iguais às do caso anterior de barreiras refletores, exceto em $z = 0$, onde a nova condição

de contorno é

$$-D \frac{\partial c}{\partial z} \Big|_{z=0} = F, \quad (\text{B.26})$$

onde F é o fluxo em $z = 0$, com unidade de $\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$.

Na tentativa de reduzir a nova condição de contorno à condição de contorno homogênea, buscamos uma solução da seguinte forma

$$c = c_p + c_h, \quad (\text{B.27})$$

onde c_p é uma solução particular que deve satisfazer à nova condição de contorno e c_h , portanto, deve obedecer às condições de contorno homogêneas.

Propomos a solução particular:

$$c_p(z, t) = \frac{F}{DH} \left(\frac{z^2}{2} - Hz \right) + \frac{Ft}{H} \quad (\text{B.28})$$

Vamos testar se essa solução de fato obedece os critérios desejados

$$\frac{\partial c_p}{\partial z} = \frac{F}{DH}(z - H) \begin{cases} \frac{\partial c_p}{\partial z} \Big|_{z=0} = -\frac{F}{D} \\ \frac{\partial c_p}{\partial z} \Big|_{z=H} = 0 \end{cases}$$

$$\frac{\partial c_p}{\partial t} = \frac{F}{H} = D \frac{\partial^2 c_p}{\partial z^2} = D \nabla^2 c_p. \quad (\text{B.29})$$

Conforme esperado, a solução particular, c_p , satisfaz às condições de contorno e à equação de difusão. Quanto a c_h , já sabemos a sua forma, pois na seção anterior resolvemos a equação de difusão com condições de contorno homogêneas. E, assim, ficamos com

$$\begin{aligned} c(r, z, t) &= c_p(z, t) + c_h(r, z, t) \\ &= \frac{F}{DH} \left(\frac{z^2}{2} - Hz \right) + \frac{Ft}{H} + A_0 + \sum_{n=1}^{\infty} A_{0n} J_0(y_{0n} r / R) e^{-D \frac{y_{0n}^2}{R^2} t} \\ &\quad + \sum_{n,m=1}^{\infty} A_{mn} J_0(y_{0n} r / R) \cos \left(\frac{m\pi z}{H} \right) e^{-D \left[\frac{m^2 \pi^2}{H^2} + \frac{y_{0n}^2}{R^2} \right] t}. \end{aligned} \quad (\text{B.30})$$

Vamos determinar os coeficientes da equação acima, a partir da concentração inicial $c(r, z, 0)$. Definindo $\delta c(r, z, 0) = c(r, z, 0) - \frac{F}{DH} \left(\frac{z^2}{2} - Hz \right) - A_0$, temos

$$\delta c(r, z, 0) = \sum_{n=1}^{\infty} A_{0n} J_0(y_{0n}r/R) + \sum_{n,m=1}^{\infty} A_{mn} J_0(y_{0n}r/R) \cos\left(\frac{m\pi z}{H}\right). \quad (\text{B.31})$$

Essa equação é idêntica à eq. (B.19) encontrada na seção anterior, portanto os coeficientes A_{0n} são dados pela eq. (B.21) e A_{mn} pela eq. (B.22). Cabe ressaltar que, embora esses coeficientes obedeam às mesmas equações do caso anterior, $\delta c(r, z, 0)$ é diferente, logo os coeficientes não são iguais aos do caso das barreiras refletoras.

Para calcular as integrais que determinam A_{0n} e A_{mn} , precisamos obter o valor da constante A_0 . Vamos usar o princípio da conservação de massa. Todas as fronteiras são barreiras refletoras, com exceção da fronteira $z = 0$ na qual há um fluxo constante F de partículas entrando no volume. Sendo assim, o número de mols de partículas dentro do cilindro é

$$N_{TOTAL} = N_0 + N_t, \quad (\text{B.32})$$

onde $N_0 = \int c(r, z, 0) dV$ é o número de mols no tempo $t = 0$ e $N_t = \pi R^2 t F$ é o número de mols que entrou pela fronteira em $z = 0$, cuja área é πR^2 , no intervalo de tempo $[0, t]$ devido ao fluxo F , de forma que

$$N_{TOTAL} = \int c(r, z, 0) dV + \pi R^2 F t. \quad (\text{B.33})$$

Por outro lado, usando a solução geral eq. (B.30) e a relação $N = \int c dV$, temos que no limite $t \rightarrow \infty$

$$c(r, z, t \rightarrow \infty) = \frac{F}{DH} \left(\frac{z^2}{2} - Hz \right) + \frac{Ft}{H} + A_0, \quad (\text{B.34})$$

$$N_{TOTAL} = \int c(r, z, t \rightarrow \infty) dV = \int_0^{2\pi} \int_0^R \int_0^H c(r, z, t \rightarrow \infty) r d\phi dr dz, \quad (\text{B.35})$$

$$N_{TOTAL} = -\frac{\pi R^2 F H^2}{3D} + \pi R^2 F t + A_0 \pi R^2 H. \quad (\text{B.36})$$

Comparando as expressões (B.33) e (B.36), temos que

$$A_0 = \frac{1}{V} \int c(r, z, 0) dV + \frac{FH}{3D}, \quad (\text{B.37})$$

onde $V = \pi R^2 H$ é o volume do cilindro.

B.2.2 Solução analítica para uma condição inicial específica

Os coeficientes A_{0n} e A_{mn} podem ser calculados analiticamente no caso em que a condição inicial tem a forma

$$c(r, z, 0) = B + \frac{F}{DH} \left(\frac{z^2}{2} - Hz \right) + K J_0(y_{0i}r/R) \cos \left(\frac{j\pi z}{H} \right), \quad (\text{B.38})$$

onde K e B são constantes quaisquer e i e j são inteiros positivos. Nesse caso ficamos com

$$\delta c(r, z, 0) = K J_0(y_{0i}r/R) \cos \left(\frac{j\pi z}{H} \right). \quad (\text{B.39})$$

Dessa forma, podemos calcular facilmente os coeficientes A_{0n} e A_{mn}

$$A_{0n} = \delta_{0j} \delta_{ni} K = \begin{cases} 0 & \text{se } j \neq 0 \\ K \delta_{ni} & \text{se } j = 0 \end{cases}$$

$$A_{mn} = \delta_{mj} \delta_{ni} K = \begin{cases} 0 & \text{se } n \neq i \text{ ou } m \neq j \\ K & \text{se } n = i \text{ e } m = j. \end{cases}$$

Escolhendo $j \neq 0$, temos que $A_{ij} = K$ é o único coeficiente não nulo. Substituindo a eq. (B.38) na eq. (B.37), obtemos que $A_0 = B$, portanto, a solução da equação de difusão em coordenadas cilíndricas com fluxo constante em $z = 0$ é

$$c(r, z, t) = B + \frac{F}{DH} \left(\frac{z^2}{2} - Hz \right) + \frac{Ft}{H} + K J_0(y_{0i}r/R) \cos \left(\frac{j\pi z}{H} \right) e^{-D \left[\frac{j^2 \pi^2}{H^2} + \frac{y_{0i}^2}{R^2} \right] t}. \quad (\text{B.40})$$

Referências Bibliográficas

- [1] S. D. Strausbaugh and P. B. Davis, “Cystic fibrosis: a review of epidemiology and pathobiology,” *Clinics in Chest Medicine*, vol. 28, no. 2, pp. 279–288, 2007.
- [2] R. C. Boucher, “Cystic fibrosis: a disease of vulnerability to airway surface dehydration,” *Trends in Molecular Medicine*, vol. 13, no. 6, pp. 231–240, 2007.
- [3] J. R. Riordan, J. M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, and J. L. Chou, “Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary dna,” *Science*, vol. 245, no. 4922, pp. 1066–73, 1989.
- [4] B. Kerem, J. Rommens, J. Buchanan, D. Markiewicz, T. Cox, A. Chakravarti, M. Buchwald, and L. Tsui, “Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis,” *Science*, vol. 245, no. 4922, pp. 1073–80, 1989.
- [5] S. H. Donaldson and R. C. Boucher, “Sodium channels and cystic fibrosis,” *Chest*, vol. 132, no. 5, pp. 1631–1636, 2007.
- [6] N. J. Willumsen, C. W. Davis, and R. C. Boucher, “Intracellular Cl^- activity and cellular Cl^- pathways in cultured human airway epithelium,” *American Journal of Physiology*, vol. 261, pp. C1033–C1044, 1991.
- [7] N. J. Willumsen and R. C. Boucher, “Shunt resistance and ion permeabilities in normal and cystic fibrosis airway epithelia,” *American Journal of Physiology*, vol. 256, pp. C1054–C1063, 1989.
- [8] A. Perez, A. C. Issler, C. U. Cotton, T. J. Kelley, A. S. Verkman, and P. B. Davis, “Cftr inhibition mimics the cystic fibrosis inflammatory profile,” *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, vol. 292, no. 2, pp. L383–95, 2007.
- [9] C. M. P. Ribeiro, A. M. Paradiso, U. Schwab, J. Perez-Vilar, L. Jones, W. Oneal, and R. C. Boucher, “Chronic airway infection/inflammation induces a Ca^{2+} -i-

- dependent hyperinflammatory response in human cystic fibrosis airway epithelia.,” *J Biol Chem*, vol. 280, no. 18, pp. 17798–806, 2005.
- [10] G. B. Pier, M. Grout, T. S. Zaidi, J. C. Olsen, L. G. Johnson, J. R. Yankaskas, and J. B. Goldberg, “Role of mutant *cftr* in hypersusceptibility of cystic fibrosis patients to lung infections,” *Science*, vol. 271, no. 5245, pp. 64–67, 1996.
- [11] R. C. Boucher, C. U. Cotton, J. T. Gatzky, M. R. Knowles, and J. R. Yankaskas, “Evidence for reduced cl^- and increased na^+ permeability in cystic fibrosis human primary cell cultures.,” *The Journal of Physiology*, vol. 405, no. 1, pp. 77–103, 1988.
- [12] M. Mall, B. R. Grubb, J. R. Harkema, W. K. O [U+02BC]Neal, and R. C. Boucher, “Increased airway epithelial na^+ absorption produces cystic fibrosis-like lung disease in mice.,” *Nature Medicine*, vol. 10, no. 5, pp. 487–493, 2004.
- [13] R. C. Boucher, “Evidence for airway surface dehydration as the initiating event in *cf* airway disease.,” *Journal of Internal Medicine*, vol. 261, no. 1, pp. 5–16, 2007.
- [14] S. H. Donaldson, W. D. Bennett, K. L. Zeman, M. R. Knowles, R. Tarran, and R. C. Boucher, “Mucus clearance and lung function in cystic fibrosis with hypertonic saline.,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 354, no. 3, pp. 241–250, 2006.
- [15] C. R. Esther, N. E. Alexis, and M. Picher, “Regulation of airway nucleotides in chronic lung diseases.,” *Subcell Biochem*, vol. 55, pp. 75–93, 2011.
- [16] A. Schmid, L. A. Clunes, M. Salathe, P. Verdugo, P. Dietl, C. W. Davis, and R. Tarran, “Nucleotide-mediated airway clearance.,” *Subcell Biochem*, vol. 55, pp. 95–138, 2011.
- [17] E. F. Vorhaus and I. J. Deyrup, “The effect of adenosinetriphosphate on the cilia of the pharyngeal mucosa of the frog,” *Science*, vol. 118, no. 3071, pp. 553–554, 1953.
- [18] D. Ovadyahu, D. Eshel, and Z. Priel, “Intensification of ciliary motility by extracellular *atp*.,” *Biorheology*, vol. 25, no. 3, pp. 489–501, 1988.
- [19] A. Tarasiuk, M. Bar-Shimon, L. Gheber, A. Korngreen, Y. Grossman, and Z. Priel, “Extracellular *atp* induces hyperpolarization and motility stimulation of ciliary cells,” *Biophysical Journal*, vol. 68, no. 3, pp. 1163–1169, 1995.

- [20] P. Zuo, M. Picher, S. F. Okada, E. R. Lazarowski, B. Button, R. C. Boucher, and T. C. Elston, “Mathematical model of nucleotide regulation on airway epithelia. implications for airway homeostasis,” *J Biol Chem*, vol. 283, no. 39, pp. 26805–19, 2008.
- [21] G. J. M. Garcia, M. Picher, P. Zuo, S. F. Okada, E. R. Lazarowski, B. Button, R. C. Boucher, and T. C. Elston, “Computational model for the regulation of extracellular atp and adenosine in airway epithelia.,” *Subcell Biochem*, vol. 55, pp. 51–74, 2011.
- [22] E. R. Lazarowski, J. I. Sesma, L. Seminario, C. R. Esther, and S. M. Kreda, “Nucleotide release by airway epithelia.,” *Subcell Biochem*, vol. 55, pp. 1–15, 2011.
- [23] B. Button, M. Picher, and R. C. Boucher, “Differential effects of cyclic and constant stress on atp release and mucociliary transport by human airway epithelia.,” *J Physiol*, vol. 580, no. 2, pp. 577–592, 2007.
- [24] Novak, “Purinergic signalling in epithelia.,” *Acta Physiologica*, vol. 202, pp. 501–522, 2011.
- [25] S. F. Okada, R. A. Nicholas, S. M. Kreda, E. R. Lazarowski, and R. C. Boucher, “Physiological regulation of atp release at the apical surface of human airway epithelia.,” *J Biol Chem*, vol. 281, no. 32, pp. 22992–23002, 2006.
- [26] S. H. Donaldson, E. R. Lazarowski, M. Picher, M. R. Knowles, M. Stutts, and R. C. Boucher, “Basal nucleotide levels, release, and metabolism in normal and cystic fibrosis airways,” *Mol Med*, vol. 6, pp. 969–982, 2000.
- [27] U. Alon, *An introduction to systems biology: design principles of biological circuits*, vol. 10. Chapman & Hall/CRC, 2007.
- [28] E. Valero, R. Varon, and F. Garcia-Carmona, “A kinetic study of a ternary cycle between adenine nucleotides.,” *FEBS J*, vol. 273, no. 15, pp. 3598–613, 2006.
- [29] D. Voet and J. G. Voet, *Biochemistry*. John Wiley & Sons, 2010.
- [30] L. Stryer, *Biochemistry*. Freeman, 4th ed., 1998.
- [31] S. M. Kreda, L. Seminario-Vidal, C. A. van Heusden, W. O’Neal, L. Jones, R. C. Boucher, and E. R. Lazarowski, “Receptor-promoted exocytosis of airway epithelial mucin granules containing a spectrum of adenine nucleotides.,” *J Physiol*, vol. 588, no. Pt 12, pp. 2255–67, 2010.

- [32] M. J. Hubley, B. R. Locke, and T. S. Moerland, “The effects of temperature, ph, and magnesium on the diffusion coefficient of atp in solutions of physiological ionic strength,” *Biochim. Biophys Acta*, vol. 1291, no. 2, pp. 115–121, 1996.
- [33] S. V. Patankar, *Numerical heat transfer and fluid flow / Suhas V. Patankar*. Hemisphere Pub. Corp. ; McGraw-Hill, Washington : New York :, 1980.
- [34] P. Huang, E. R. Lazarowski, R. Tarran, S. L. Milgram, R. C. Boucher, and M. J. Stutts, “Compartmentalized autocrine signaling to cystic fibrosis transmembrane conductance regulator at the apical membrane of airway epithelial cells.,” *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 98, no. 24, pp. 14120–5, 2001.
- [35] E. R. Lazarowski, R. Tarran, B. R. Grubb, C. A. van Heusden, S. Okada, and R. C. Boucher, “Nucleotide release provides a mechanism for airway surface liquid homeostasis.,” *J Biol Chem*, vol. 279, no. 35, pp. 36855–64, 2004.
- [36] E. Butkov, *Mathematical Physics*. Reading, MA: Addison-Wesley Publishing Company, 1968.
- [37] W. E. Boyce and R. C. DiPrima, *Elementary Differential Equations and Boundary Value Problems*. Wiley.