

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS – CCT
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA ELÉTRICA – DEE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA ELÉTRICA - PPGEEL**

Formação: Mestrado Profissional em Engenharia Elétrica

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO OBTIDA POR

Carlos Toshiyuki Matsumi

**PROJETO E CONSTRUÇÃO DE UM ELETROPERMEABILIZADOR
DE CÉLULAS BIOLÓGICAS**

Joinville
2009

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS – CCT
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA ELÉTRICA – DEE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ENGENHARIA ELÉTRICA - PPGEEL**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO PROFISSIONAL
Mestrando: CARLOS TOSHIYUKI MATSUMI – Engº Eletricista
Orientador: Prof. Dr. AIRTON RAMOS
Co-orientador: Prof. Dr. PEDRO BERTEMES FILHO
CCT/UDESC - JOINVILLE

**PROJETO E CONSTRUÇÃO DE UM ELETROPERMEABILIZADOR
DE CÉLULAS BIOLÓGICAS**

DISSERTAÇÃO APRESENTADA PARA
OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE
EM ENGENHARIA ELÉTRICA DA
UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA
CATARINA, CENTRO DE CIÊNCIAS
TECNOLÓGICAS – CCT, ORIENTADA
PELO PROF. DR. AIRTON RAMOS.

Joinville
2009

CARLOS TOSHIYUKI MATSUMI

PROJETO E CONSTRUÇÃO DE UM ELETROPERMEABILIZADOR DE CÉLULAS BIOLÓGICAS

‘Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Engenharia Elétrica – Automação Industrial e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Engenharia Elétrica da Universidade do Estado de Santa Catarina’.

Banca Examinadora:

Orientador:

Prof. Dr. Airton Ramos
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Membros:

Prof. Dra. Daniela Ota Hisayasu Suzuki
Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC

Prof. Dr. Pedro Bertemes Filho (Co-orientador)
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Prof. Dr. Fabio Rodrigues De La Rocha
Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC

Joinville, SC, Julho de 2009.

FICHA CATALOGRÁFICA

NOME: MATSUMI, Carlos Toshiyuki	
DATA DEFESA: 31/07/2009	
LOCAL: Joinville, CCT/UDESC	
NÍVEL: Mestrado	Número de ordem: 16 – CCT/UDESC
FORMAÇÃO: Engenharia Elétrica	
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Automação de Sistemas	
TÍTULO: “Projeto e Construção de um Eletropermeabilizador de Células Biológicas”	
PALAVRAS – CHAVE: Eletropermeabilização. Eletropermeabilizador. Amplificador de alta tensão. Condutividade de suspensão de células.	
NÚMERO DE PÁGINAS: 65p.	
CENTRO/UNIVERSIDADE: Centro de Ciências Tecnológicas da UDESC	
PROGRAMA: Pós-graduação em Engenharia Elétrica – PPGEEL	
Nº CAPES: 41002016012P-0	
ORIENTADOR: Dr. Airton Ramos	
CO-ORIENTADOR: Dr. Pedro Bertemes Filho	
PRESIDENTE DA BANCA: Dr. Airton Ramos	
MEMBROS DA BANCA: Dra. Daniela Ota Hisayasu Suzuki, Dr. Pedro Bertemes Filho e Dr. Fabio Rodrigues De La Rocha	

À Deus.
Aos meus filhos e minha esposa.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder o dom da vida e por ter me iluminado por mais esta fase da minha vida.

Ao meu Orientador, Prof. Dr. Airton Ramos, pela orientação, dedicação, amizade e pelos ensinamentos durante esta dissertação.

À Dra. Daniela, pela atenção, supervisão e orientação nos procedimentos experimentais realizados no Centro de Ciências Biológicas – CCB/UFSC.

A empresa ELETROSPARK em nome do Sr. Arlindo Benvenutti e Sr. Jair Sedrez, pelo apoio e amizade dispensados sempre que solicitados.

A empresa AMDS4, representante da LEM transdutores pela doação do transdutor, em nome do Sr. José Eduardo Antonio e Simone Antonio Ciambelli.

A SEMIKRON SEMICONDUTORES LTDA, em nome do Sr. Dirceu Soncini, pela doação do dissipador indispensável para este trabalho.

Ao colega de mestrado Rodrigo Alécio Stiz pela amizade e apoio durante o mestrado.

Ao bolsista Jean Ricardo Ruscak do Laboratório de Instrumentação Eletrônica e Biomédica do CCT-UDESC, pela amizade e auxílio no desenvolvimento do software.

A todos os colegas do IF-SC – Instituto Federal de Educação Tecnológica – Unidade Joinville, em especial à Profª Dra. Ana Barbara K. Sambaqui e Profº Msc. José Flávio Dums pelo apoio e compreensão dispensados sempre que solicitados.

Aos técnicos do IF-SC: José Adriano Damacena Diesel, Ludgério Pereira Neto e Márcio Roberto Nunes pelo auxílio.

A todos os amigos, que abdicaram de tão importante tempo da nossa amizade.

E principalmente, aos meus filhos Vinicius, Guilherme e Alexandre e à minha esposa, Fabiana pelo amor e carinho.

PRODUÇÃO ACADÊMICA

Artigos completos em Anais de Congresso

MATSUMI, C. T.; RUSCZAK, J. R.; RAMOS, A.; SUZUKI, D. O. H.; MARQUES, J. L.

B.; **Desenvolvimento de um eletroporador de células biológicas.** XXI Congresso

Brasileiro de Engenharia Biomédica, pg. 649-652, novembro de 2008. Salvador, Bahia.

RESUMO

Eletropermeabilização é o processo de aumento transitório da permeabilidade das membranas de células biológicas submetidas a campos elétricos intensos. Esta é uma técnica atualmente ainda em desenvolvimento e que possui importantes aplicações clínicas e tecnológicas tais como a eletroquimioterapia e a transferência genética. Os eletropermeabilizadores são equipamentos usados na geração e aplicação desses campos intensos. Esta dissertação apresenta o projeto, construção e teste de um eletropermeabilizador para uso em pesquisa biomédica. O equipamento proposto apresenta versatilidade e desempenho adequados para permitir a realização de diferentes tipos de ensaios com tecidos biológicos ou suspensões de células. É constituído de um gerador de tensão com forma de onda programável, um amplificador de alta tensão e alta corrente de saída e um sistema de transdução de tensão e corrente na amostra analisada. Tanto a geração de sinal quanto os valores medidos na carga são monitorados por um programa construído em ambiente *LabVIEW*[®] que aciona uma placa de aquisição de dados com 16 bits de resolução. O desempenho do sistema eletrônico desenvolvido atende completamente os requisitos de projeto. O amplificador pode fornecer até 500V de amplitude de tensão com 5A de corrente de carga durante intervalos de tempo suficientes para os ensaios de eletropermeabilização. A banda passante pouco maior que 100KHz e os tempos de resposta ao degrau da ordem de 1 μ s são adequados para a realização de experimentos com diferentes formas de onda e diferentes tamanhos de células. Uma importante aplicação do equipamento construído é exemplificada com um experimento de eletropermeabilização em suspensão de hemácia de rato, sendo demonstrada a ocorrência de aumento da condutividade da amostra durante a estimulação com campo elétrico de alta intensidade.

Palavras-chave: Eletropermeabilização. Eletropermeabilizador. Amplificador de alta tensão. Condutividade de suspensão de células.

ABSTRACT

Electropermeabilization is the process of transient increase in the permeability of biological membranes of cells subjected to intense electric fields. This technique is currently still in development and has important clinical and technological applications such as electrochemotherapy and gene transfer. Electroporator is the equipment used in the generation and application of such intense fields. This dissertation presents the design, construction and testing of an electroporator for use in biomedical research. The proposed equipment presents versatility and performance appropriate to allow for different types of experiments with biological tissues or cell suspensions. It consists of a voltage generator with programmable wave form, a high voltage amplifier with high output current capability and a system for transduction of voltage and current in the sample. Both the generation of signal as the measured values in the load are monitored by a program built in LabVIEW® environment that triggers a data acquisition card with 16 bits of resolution. The performance of the electronic system developed fully meets the requirements of project. The amplifier can deliver up to 500V and 5A to the load during a time interval enough for the testing of electropermeabilization. The bandwidth, slightly higher than 100kHz and the step response time of the order of 1 μ s are suitable for performing experiments with different waveforms and different sizes of cells. An important application of the equipment built is demonstrated with an experiment of electropermeabilization in suspension of red cells of rats. This result demonstrated the occurrence of increased conductivity of the sample during stimulation with high-intensity electric field.

Keywords: Electropermeabilization. Electroporator. High voltage amplifier. Conductivity of cell suspensions.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	OBJETIVOS	14
1.2	ESTRUTURA DO TRABALHO.....	14
2	ELETROPERMEABILIZAÇÃO E ELETROPERMEABILIZADORES.....	16
2.1	ELETROPERMEABILIZAÇÃO	16
2.2	TERAPIAS E TÉCNICAS DE APLICAÇÃO DA ELETROPERMEABILIZAÇÃO	18
2.2.1	<i>Eletroquimioterapia.....</i>	18
2.2.2	<i>Eletrotransferência ou Transferência genética</i>	19
2.2.3	<i>Eletroinserção</i>	19
2.2.4	<i>Eletrofusão</i>	19
2.2.5	<i>Administração de medicamentos via transdérmica</i>	20
2.2.6	<i>Eletroesterilização.....</i>	20
2.3	ELETROPERMEABILIZADORES	21
2.3.1	<i>Gerador de onda exponencial decrescente (Descarga capacitiva)</i>	22
2.3.2	<i>Geradores de onda quadrada.....</i>	22
2.3.3	<i>Gerador analógico unipolar de sinais arbitrários.</i>	24
2.3.4	<i>Gerador analógico bipolar de sinais arbitrários</i>	25
2.3.5	<i>Geradores modulares de alta tensão.....</i>	26
2.4	PROPOSTA DE UM SISTEMA ELETRÔNICO A SER APLICADO NA PESQUISA EM ELETROPERMEABILIZAÇÃO.....	28
3	PROJETO DO SISTEMA ELETRÔNICO.....	30
3.1	O AMPLIFICADOR.....	30
3.1.1	<i>Análise do Funcionamento do Amplificador</i>	31
3.1.2	<i>Análise do Amplificador</i>	32
3.1.3	<i>Potência dissipada no amplificador</i>	34
3.1.4	<i>Análise dinâmica do Amplificador</i>	36
3.2	FONTES DE ALIMENTAÇÃO DO AMPLIFICADOR	40
3.2.1	<i>Fonte de Alimentação Fixa.....</i>	40
3.2.2	<i>Fonte de Alimentação Ajustável</i>	40
3.3	SISTEMA DIGITAL DE GERAÇÃO E AQUISIÇÃO DE SINAIS	41
3.4	TRANSDUTOR DE TENSÃO E CORRENTE	43
3.5	IMAGEM DO SISTEMA COMPLETO DE ELETROPERMEALIZAÇÃO	45
4	MÉTODOS E RESULTADOS EXPERIMENTAIS.....	46
4.1	TESTE DO SOFTWARE	46
4.2	TESTES DO AMPLIFICADOR	49
4.2.1	<i>Resposta no tempo ao pulso de tensão</i>	49
4.2.2	<i>Resposta em freqüência para uma onda quadrada</i>	51
4.3	ESTABILIDADE TÉRMICA.....	53
4.4	CURVA DE RESPOSTA DO TRANSDUTOR DE TENSÃO.....	54
4.5	CURVA DE RESPOSTA DO TRANSDUTOR DE CORRENTE	55
4.6	EXPERIMENTO COM MATERIAL BIOLÓGICO	56
4.6.1	<i>Preparação das amostras e Estrutura de teste.....</i>	56
4.6.2	<i>Resultados.....</i>	57
5	CONCLUSÃO.....	61
6	REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	62

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Efeitos da exposição de células a um campo elétrico intenso. Modificado de Puc <i>et al</i> , 2004.....	17
Figura 2 - Representação esquemática de uma célula esférica de raio “a” e espessura de membrana “h”.....	17
Figura 3 - Etapas de funcionamento do gerador de forma de onda exponencial decrescente, 1 ^a Etapa - carga do capacitor, 2 ^a Etapa - descarga com a constante de tempo $\tau = (R // R_L) \cdot C$	22
Figura 4 - Gerador de pulsos quadrados com transistor, onde Q1 é um transistor MOSFET do tipo N.....	23
Figura 5 - Gerador de onda quadrada com transformador de pulso.....	23
Figura 6 - Gerador analógico unipolar de sinais arbitrários, onde Vin é a tensão de saída do gerador com forma de onda arbitrária.....	24
Figura 7 - Distorção do sinal para amplificação superior aos limites da região linear.	25
Figura 8 - Gerador analógico bipolar.	25
Figura 9 - Gerador modular de alta tensão, onde a tensão aplicada na amostra é a soma das tensões dos módulos utilizados.	26
Figura 10 - Representação esquemática de um sistema de geração e aquisição de sinal para estudo da eletropermeabilização de células biológicas.	29
Figura 11 - Diagrama esquemático do amplificador implementado.....	30
Figura 12 - Estrutura da metade do amplificador, composta de: (a) amplificador de tensão e (b) amplificador de potência.	31
Figura 13 - Associação em série e paralelo de resistores de 15k Ω /3 W para R1.....	32
Figura 14 - Análise “CC” das tensões e correntes do amplificador de tensão simulado.	33
Figura 15 - Circuito equivalente do pré-amplificador para análise “CA”.	34
Figura 16 - Resposta no tempo do amplificador. (a) onda senoidal. (b) onda quadrada.....	37
Figura 17 - Resposta no tempo para pulso positivo. (a) Detalhe da subida do sinal na carga. (b) Detalhe da descida do sinal na carga.....	38
Figura 18 - Resposta em freqüência do Amplificador, (a) Espectro de Módulo. (b) Espectro de Fase.....	39
Figura 19 - Fonte de alimentação Fixa ± 300 V.	40
Figura 20 - Fonte de alimentação Ajustável nos valores: $\pm 63, \pm 127, \pm 191, \pm 254$ e ± 325 V.....	41
Figura 21 - Placa PCI 6251 utilizada no sistema de geração e aquisição dos sinais.....	41
Figura 22 - Diagrama de blocos do programa de geração e aquisição dos sinais para o eletropermeabilizador em <i>LabVIEW</i> [®]	42
Figura 23 - Transdutor de Tensão com divisor resistivo e amplificador de instrumentação INA 111BP.	44
Figura 24 - Transdutor de Corrente por Efeito Hall LTSP 25-NP e amplificador de instrumentação INA111BP.	45
Figura 25 - Sistema de Eletropermeabilização contendo amplificador, fontes de alimentação, transdutores e sistema de geração e aquisição de sinais desenvolvidos em ambiente <i>LabVIEW</i> [®] para uma placa PCI-6251.	45
Figura 26 - Tela do usuário do aplicativo Gerador de Sinais 1.0	46
Figura 27 - Concatenação de três formas de onda, e apresentação da tela do usuário.....	47
Figura 28 - Pulso de onda quadrada com razão cíclica de 10%.....	48
Figura 29 - Implementação de forma de onda com fórmula matemática.	49
Figura 30 - Pulso retangular de 50 μ s aplicado em uma carga resistiva de 205,59 Ω . V _e em amarelo e V _s em vermelho.	50
Figura 31 - Tempo de subida para pulso retangular de 50 μ s. V _e em amarelo e V _s em vermelho.	50
Figura 32 - Tempo de descida para pulso retangular de 50 μ s. V _e em amarelo e V _s em vermelho.	51
Figura 33 - Resposta em freqüência do amplificador obtida pela análise de Fourier com onda quadrada de 1Hz.....	52
Figura 34 - Resposta em freqüência do amplificador obtida pela análise de Fourier com onda quadrada de 1kHz.....	53
Figura 35 - Verificação da Estabilidade Térmica do Amplificador de tensão.	54
Figura 36 - Curva de resposta do transdutor de tensão.....	55
Figura 37 - Curva de resposta do transdutor de corrente. Curva em cor preta para freqüência de 1 kHz e curva em vermelho para freqüência de 10 kHz.....	56
Figura 38 - Sistema de Eletrodos utilizado nos experimentos.....	57
Figura 39 - Formas de onda na Carga obtidas para a solução Kbr. Pulso com 100V e 500 μ s	58
Figura 40 - Tela do usuário com pulso retangular aplicado na solução com material biológico.....	58

Figura 41 - Comportamento da tensão e corrente na carga durante a aplicação do pulso de eletropermeabilização.....	59
Figura 42 - Comportamento da Condutividade da amostra.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Quadro Comparativo entre eletropermeabilizadores (Modificado de Puc <i>et al</i> , 2004)	26
Tabela 2 - Equipamentos comercialmente produzidos (Modificado de Puc <i>et al</i> , 2004), onde BT é baixa tensão, AT é alta tensão e NA é sem descrição.....	27
Tabela 3 - Características dos transistores.....	32
Tabela 4 - Potência dissipada nos transistores principais	35
Tabela 5 - Temperatura de junção máxima	36

1 INTRODUÇÃO

Eletropermeabilização é o fenômeno do aumento transitório da permeabilidade da membrana plasmática de células submetidas a campos elétricos intensos [Puc *et al*, 2004]. Estudos preliminares da eletropermeabilização datam de meados da década de 1950, e atualmente estão sendo pesquisadas aplicações em vários campos da biologia e medicina. As principais terapias e técnicas da aplicação de eletropermeabilização nestes campos estão sendo desenvolvidas em eletroquimioterapia, transferência genética, eletrofusão, eletroesterilização e administração de medicamentos via transdérmica. Apesar de o fenômeno ser conhecido há várias décadas, ainda não existe uma teoria definitiva para explicar conclusivamente os mecanismos físicos envolvidos na eletropermeabilização e eletrofusão de células.

No estudo da eletropermeabilização são necessários equipamentos especialmente projetados para gerar campos elétricos intensos. Estes equipamentos são denominados de eletropermeabilizadores. Existem diversos modelos de eletropermeabilizadores disponíveis atualmente no mercado. Eles se distinguem principalmente no modo de geração do sinal de estimulação e no controle de suas características (forma de onda, freqüência, amplitude e duração).

1.1 OBJETIVOS

Neste contexto, a proposta deste trabalho é o desenvolvimento de um sistema eletrônico ou eletropermeabilizador, incluindo construção e teste, com as características adequadas para a realização de pesquisas de caracterização da eletropermeabilização *in vitro* de suspensões de células e tecidos biológicos.

O desenvolvimento deste projeto envolve amplificadores de alta tensão, fontes de alimentação, circuitos de sensoriamento de tensão e corrente na carga e interfaces com o sistema de geração e aquisição de sinais que comanda o eletropermeabilizador.

A proposta detalhada deste trabalho será apresentada no capítulo seguinte após uma revisão dos modelos de eletropermeabilizadores e técnicas de eletropermeabilização, tendo assim um melhor entendimento do projeto a ser desenvolvido.

1.2 ESTRUTURA DO TRABALHO

Para o entendimento do projeto proposto, este trabalho está organizado em quatro capítulos, descrito sucintamente a seguir.

O Capítulo 2 apresenta a revisão bibliográfica necessária como base para o entendimento do projeto do eletropermeabilizador. Sendo assim, abordam as técnicas e aplicações mais conhecidas da eletropermeabilização, os eletropermeabilizadores comercialmente produzidos, descrevendo os modelos de forma sucinta, e ao final deste capítulo apresenta as características desejadas do equipamento que foi desenvolvido neste projeto.

O Capítulo 3 apresenta o desenvolvimento do projeto do eletropermeabilizador, dividido em amplificador, fontes de alimentação, sistema de sensoriamento e por fim o gerador de forma de onda arbitrária, necessário para o desenvolvimento da pesquisa em eletropermeabilização.

No capítulo 4 são apresentados os resultados obtidos experimentalmente que comprovam o correto funcionamento do sistema, bem como alguns resultados experimentais da eletropermeabilização de células de rato em suspensão eletrolítica.

Por fim, o Capítulo 5 apresenta as conclusões deste trabalho e as propostas para trabalhos futuros.

2 ELETROPERMEABILIZAÇÃO E ELETROPERMEABILIZADORES

A ruptura elétrica reversível da membrana celular por pulsos elétricos foi primeiro relatado por Stampfli em 1958, mas por algum tempo este trabalho passou despercebido. Aproximadamente uma década mais tarde, Sale e Hamilton relatam à destruição de microrganismos utilizando pulsos elétricos intensos [Miklavčič e Puc, 2006]. Em 1972, Neumann e Rosenheck relatam que pulsos elétricos induzem um grande aumento da permeabilidade da membrana em vesículas [Neumann e Rosenheck, 1972]. Estes estudos pioneiros motivaram uma série de novas investigações. Em 1982, Neumann, Ridder, Wang e Hofsneider, relatam que os genes do DNA podem ser transferidos para as células usando pulsos elétricos com formato exponencial [Neumann *et al*, 1982]. Poucos anos mais tarde, em 1987, Okino e Mohri, relatam que substâncias (sacarose, marcadores e íons) podem ser introduzidas em células vivas. E esta técnica pode ser utilizada para o aumento da citotoxicidade da bleomicina (droga quimioterápica), em condições *in vivo* e *in vitro*, utilizando pulsos elétricos [Okino e Mohri, 1987]. A partir deste tempo, os dados começaram a acumular-se mais rapidamente e sistematicamente. A maior parte dos trabalhos iniciais foi feita sobre células em condições *in vitro*, mas muitas aplicações são igualmente bem sucedidas na situação *in vivo*.

O estudo da eletropermeabilização e eletrofusão, nestas últimas décadas tem sido amplamente pesquisado em vários campos da biologia, bioquímica, oncologia e medicina. As suas aplicações são as mais diversas como, por exemplo: a transferência de plasmídeos (DNA) em plantas e animais [André *et al*, 2008] no aumento da eficiência das vacinas contra o câncer [Scott-Taylor *et al*, 2000], na eletroquimioterapia com a transferência de quimioterápicos para dentro das células tratando tumores de forma mais eficiente [Serša *et al*, 2008] na tecnologia embrionária [Ferber, 2001], pesquisa agrícola [Uemura e Isobe, 2002], entre outros. Estes estudos que envolveram a utilização da eletropermeabilização e a eletrofusão tem crescido exponencialmente desde meados de 1980, contudo, apesar de conhecidos há várias décadas ainda não existe uma teoria definitiva para explicar conclusivamente os mecanismos físicos envolvidos.

2.1 ELETROPERMEABILIZAÇÃO

A utilização da técnica da aplicação de pulsos elétricos de alta tensão em células e tecidos biológicos, conhecida como eletropermeabilização, tem despertado grande interesse desde os primeiros relatos publicados há várias décadas [Neumann e Rosenheck, 1972]. Eletropermeabilização é um fenômeno transitório que aumenta a permeabilidade da membrana plasmática celular. No estado de alta permeabilidade, a membrana plasmática permite a passagem de íons e moléculas que no estado normal da célula encontram grande obstáculo para atravessar a membrana. Além da introdução de diferentes substâncias para o citoplasma, a permeabilização da membrana celular permite a fusão celular ou inserção de proteínas na membrana celular, conforme mostra a Figura 1 [Puc *et al*, 2004].

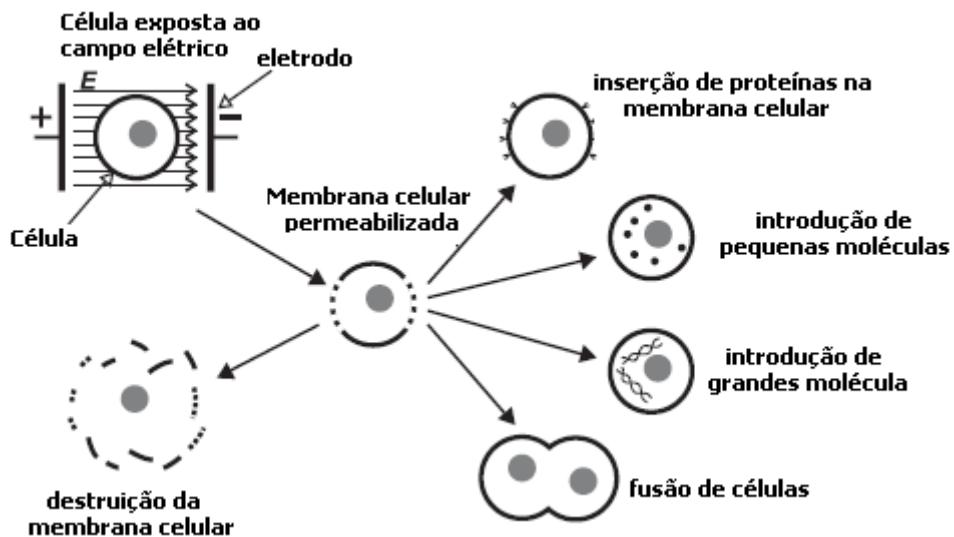


Figura 1 - Efeitos da exposição de células a um campo elétrico intenso. Modificado de Puc *et al*, 2004.

A eficácia da eletropermeabilização e suas aplicações dependem fortemente de parâmetros que podem ser divididos em campo elétrico (amplitude, duração, freqüência, repetição, número de pulsos e forma de pulso) [Rols e Tessie, 1998; Pavlin *et al*, 2008] e as características que definem o estado das células e as suas imediações (temperatura, pressão osmótica, tamanho e forma de células, etc) [Tessié *et al*, 1999]. Com os valores corretamente escolhidos dos parâmetros de campo elétrico, o processo de eletropermeabilização é reversível e a célula retorna ao seu estado fisiológico normal. Este processo pode demorar de minutos a horas. Se esses parâmetros ultrapassam certos limites (exemplo, amplitude dos pulsos demasiadamente alta ou duração do pulso muito longo), as células são irreversivelmente permeabilizadas e morrem (morte celular) [Tessié *et al*, 2008]. A permeabilização da membrana plasmática é atingida pela exposição da célula a um campo elétrico intenso de curta duração. A quantidade necessária a este processo é a diferença do potencial transmembrana induzida, o qual em primeira aproximação é proporcional ao produto da intensidade do campo elétrico aplicado com o raio da célula de acordo com a equação (2.1) e ilustrado pela Figura 2.

$$V_m = 1,5 \cdot a \cdot E_0 \cdot \cos \theta \left[1 - \exp(-t/\tau) \right] \quad (2.1)$$

onde V_m é o potencial transmembrana induzido, a é o raio da célula, E_0 é o campo elétrico uniforme aplicado, θ é o ângulo entre o vetor campo elétrico e o vetor posição da membrana, t é o tempo em segundos, e τ é a constante de tempo de carregamento da membrana.

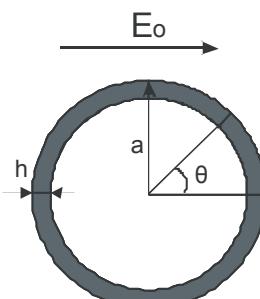


Figura 2 - Representação esquemática de uma célula esférica de raio “a” e espessura de membrana “h”.

Onde, E_0 é o campo elétrico aplicado; θ o ângulo entre a direção do campo elétrico e o vetor de posição na membrana.

Esta equação é correta apenas para células esféricas de raio muito maior que a espessura da membrana, em um campo elétrico uniforme e em um meio de alta condutividade, tal que, a corrente de deslocamento no eletrólito adjacente à membrana seja desprezível comparado à corrente de condução. O potencial transmembrana varia cossenoidalmente com o ângulo de incidência do campo na membrana. Quando o potencial alcança um valor limiar entre 0,2 a 0,5 Volts, ocorre a eletropermeabilização [Pucihar *et al*, 2006]. A intensidade do campo aplicado determina a área da membrana afetada pela eletropermeabilização, bem como a variação da condutância da membrana nesta região. Uma vez que o potencial transmembrana depende também do raio da célula, as células grandes são mais sensíveis ao campo que as células pequenas, ou seja, o campo elétrico deve ser mais intenso para células menores [Tessie *et al*, 1999]. Além disso, o potencial transmembrana induzido depende também da densidade de células e da disposição das células no volume da amostra, bem como da forma de onda, freqüência, intensidade e duração do campo elétrico. Ocorre que na eletropermeabilização a permeabilidade da membrana é aumentada pelo surgimento de poros não seletivos na matriz lipídica, os quais apresentam uma dinâmica própria de abertura e fechamento. Somando-se a isso o fato do potencial transmembrana apresentar uma dependência com a freqüência típica de um sistema de primeira ordem, conclui-se que o espectro de freqüências do campo aplicado tem importância fundamental no processo.

2.2 TERAPIAS E TÉCNICAS DE APLICAÇÃO DA ELETROPERMEABILIZAÇÃO

Atualmente, a eletropermeabilização é principalmente utilizada na pesquisa em biologia celular, eletroquimioterapia de tumores e biotecnologia [Sersa *et al*, 2006]. Em todas essas aplicações deseja-se que as células retornem ao estado normal depois da abertura de poros devido à aplicação do estímulo elétrico, ou seja, deseja-se que o processo seja reversível. Por outro lado, existem aplicações nas quais se deseja a morte celular, ou seja, a eletropermeabilização deve ser irreversível. Este é o caso da aplicação em tratamento da água e esterilização de alimentos, por exemplo.

2.2.1 *Eletroquimioterapia*

Este processo consiste na aplicação do campo elétrico para permeabilizar as membranas plasmáticas de células de um tecido cancerígeno, possibilitando a inserção de drogas quimioterápicas localmente sobre a área lesada, diminuindo a citotoxicidade do tratamento do câncer e aumentando a sua eficácia. Em 1987, Okino e Mohri, quando realizaram os primeiros experimentos *in vivo*, aplicaram um campo elétrico com pulso exponencial decrescente de 5000 V/cm em um tumor e administrado bleomicina (droga quimioterápica), obtiveram com este tratamento combinado uma redução de 17% da massa inicial do tumor após quatro dias [Okino e Mohri, 1987]. Seguindo a mesma sistemática, mas com aplicação *in vitro*, têm-se os experimentos realizados por Mir *et al*, foi aplicado oito pulsos de onda quadrada de 100 μ s e freqüência de 1 Hz e variando a intensidade do campo elétrico de 0 a 2000 V/cm [Mir *et al*, 1988]. Os resultados mostraram que o aumento da intensidade do campo elétrico aumenta a absorção das moléculas, mas também aumenta a morte celular. Diversos estudos realizados sobre a aplicação da eletroquimioterapia em tumores de humanos e animais resultaram em aperfeiçoamento da

técnica, tais como a melhoria na distribuição do campo elétrico nos tecidos com a alteração do posicionamento, orientação e formato dos eletrodos [Sersă *et al*, 1996; Županič *et al*, 2007].

2.2.2 *Eletrotransferência ou Transferência genética*

Um dos primeiros relatos de transferência genética foi publicado em 1982 [Neumann *et al*, 1982]. Com experimentos *in vitro* os autores transferiram genes de ratos utilizando células *lyoma* com a aplicação de um pulso de campo elétrico exponencial decrescente na ordem de 8000 V/cm. Este processo não-viral de transferência genética foi denominado de eletrotransferência. Nos estudos seguintes de eletrotransferência, diferentes formas de onda e intensidades de campo elétrico foram testadas. A eletrotransfrência *in vitro* pode ser obtida utilizando pulsos exponenciais decompostos, pulsos de onda quadrada de curta duração sobrepostos [Chang *et al*, 1982], pulsos de onda quadrada de longa duração de até 20 ms e com amplitudes de até 800 V/cm [Wolf *et al*, 1994]. Nos primeiros estudos *in vivo* da eletrotransferência, com pulsos de onda quadrada de longa duração foram utilizados pulsos de vários milissegundos com amplitudes de até 300 V/cm na eletrotransferência em músculo esquelético [Mir *et al*, 1999] e de 400 a 600V/cm na eletrotransferência em tumores [Bettan *et al*, 2000]. Outra abordagem recente é a combinação de pulsos de alta e pulsos de baixa tensão para o tratamento. O novo método baseia-se na aplicação de vários pulsos curtos de alta tensão (exemplo, 8 pulsos de 100 μ s com 1300 V/cm), que são seguidos por pulsos longos de baixa tensão (exemplo, 1 pulso de 100 ms com 100 V/cm) [Sātkauskas *et al*, 2002]. Este conceito sugere que pulsos curtos de alta tensão permeabilizam a membrana celular enquanto que os pulsos de baixa tensão têm efeitos eletroforéticos sobre o DNA, facilitando a interação do plasmídeo com a membrana celular.

2.2.3 *Eletroinserção*

Para ocorrer a permeabilização da membrana celular, a intensidade do campo elétrico deve exceder um valor crítico. Se a intensidade do campo é menor, porém próximo deste valor, é possível a inserção de diferentes proteínas na membrana celular de eritrócitos, tais como receptores CD4 e glicoporina [Mouneimne *et al*, 1989]. Este fato possibilitou a obtenção de enxertos em eritrócitos com receptores para atrair o vírus da AIDS e diminuir sua carga viral [Zeira *et al*, 1991]. Outro estudo mostra que a inserção de proteínas também pode ser realizada em células nucleadas, mas o campo elétrico deve acionar a permeabilização das células. O processo de inserção é um fenômeno de duas fases, Na primeira fase, logo após o pulso, ocorre à inserção espontânea de proteínas na região permeabilizada da membrana celular. Na segunda fase, as proteínas se difundem lentamente na membrana para alcançar a distribuição homogênea [Tessié, 1998].

2.2.4 *Eletrofusão*

Até agora, foram apresentados processos de eletropermeabilização que são utilizados para introduzir moléculas em uma célula ou na membrana plasmática. Mas a eletropermeabilização da membrana plasmática celular também pode resultar na fusão de células. Este processo tem sido denominado de eletrofusão. Os primeiros relatos de eletrofusão *in vitro* de células ocorreram em meados de 1980. Verificou-se que a fusão entre duas células ocorre apenas se elas estiverem em contato anterior ou imediatamente

após o processo de eletropermeabilização da membrana plasmática [Pilwat *et al*, 1981]. O contato das células pode ser obtido através do processo de dieletroforese por células vizinhas, seguido pela eletropermeabilização ou centrifugação da suspensão celular após a exposição a um campo elétrico [Tessié *et al*, 1986]. Em ambos os casos, as células devem ser permeabilizadas de forma reversível, caso contrário perdem a sua viabilidade, e não há eletrofusão. A eletrofusão no ambiente *in vitro* é possível devido à alta taxa de mobilidade das células em suspensão, enquanto que células em tecidos apresentam baixa taxa de mobilidade. Contudo a eletrofusão *in vivo* tem sido observada em tumores malignos dos melanócitos B16 (câncer de pele) [Mekid e Mir, 2000], bem como na fusão de células de tecido [Grasso *et al*, 1989]. O processo de eletrofusão representa uma abordagem bem sucedida na produção de vacinas e de anticorpos [Scott-Taylor *et al*, 2000].

2.2.5 Administração de medicamentos *via transdérmica*

A pele de um mamífero representa uma barreira notável por apresentar a camada córnea (*stratum corneum*). A camada córnea é a camada exterior da epiderme, composta por queratina (proteínas) e ceratina (células mortas). Portanto a administração transdérmica de medicamentos convencionais está limitada apenas às moléculas lipofílicas (moléculas solúveis em lipídios e hidrofóbicas), pois as moléculas polares não conseguem ultrapassar esta barreira. Para superar este problema, além do método de iontoporese, a eletropermeabilização foi apresentada como um novo método para a administração transdérmica de medicamentos. Ambos os métodos utilizam a aplicação do campo elétrico por processo direto ou indireto para a introdução da droga no corpo [Banga *et al*, 1999]. A diferença entre estes métodos é que a iontoporese age diretamente sobre a droga, enquanto que na eletropermeabilização o campo elétrico atua sobre a barreira, criando novas vias denominadas de regiões locais de transporte da droga que podem difundir-se por toda a pele e chegar a partes inferiores da derme [Pliquett e Gusbeth, 2004]. Esta eletropermeabilização causa mudança transitória na estrutura da pele, aumentando a magnitude do transporte da droga em uma escala de minutos. Se iontoporese for utilizada após a eletropermeabilização a eficácia é ainda maior, pois a droga é inserida de forma mais dinâmica pela área da pele permeabilizada [Lee *et al*, 2005]. Até o momento, a eletropermeabilização tem sido utilizada para a administração transdérmica de medicamentos em condições experimentais, no entanto, existem algumas tendências de realizar estes estudos em ambiente clínicos.

2.2.6 Eletroesterilização

A eletropermeabilização irreversível pode ser utilizada em aplicações onde necessariamente deseja-se a destruição de microrganismos, ou seja, na conservação dos alimentos e tratamento da água [Tessié *et al*, 2002]. Ainda assim, usando eletropermeabilização irreversível nestas aplicações significa que a substância tratada é exposta a um campo elétrico limitado porque é desejável que em seu tratamento não ocorram alterações em suas propriedades (exemplo mudança de sabor dos alimentos) e que não surjam derivados, devido ao campo elétrico exposto (exemplo, subprodutos causado pela eletrólise) [Uemura e Isobe, 2002].

2.3 ELETROPERMEABILIZADORES

Eletropermeabilizadores são equipamentos especialmente projetados para realizar experimentos e aplicações da eletropermeabilização de células e tecidos biológicos. No que diz respeito às características elétricas de funcionamento eles podem ser classificados em dois grupos: eletropermeabilizadores com saída em tensão e eletropermeabilizadores com saída em corrente. Os equipamentos com saída em tensão são mais utilizados devido à simplicidade do sistema elétrico e a facilidade de controle dos parâmetros de estimulação [Rols e Tessie, 1998].

A eficácia da eletropermeabilização em ambos depende da distribuição de campo elétrico na amostra tratada [Sersă *et al*, 1996]. Para alcançar o objetivo, deve-se utilizar um conjunto de eletrodos adequados (por exemplo, agulhas, placas paralelas, cubetas, etc) e um eletropermeabilizador que gere um sinal de tensão ou corrente exigida para a aplicação. Embora ambas as partes do equipamento mencionadas sejam importantes para a eficácia da eletropermeabilização, o eletropermeabilizador tem um papel mais complexo. Um importante desafio que se enfrenta durante a concepção do eletropermeabilizador é a caracterização da carga, que é reativa e não linear. Os valores de resistência e reatância da carga são definidos pela geometria dos eletrodos e pelas propriedades elétricas da amostra a ser tratada. Nas aplicações *in vitro*, as condições destes parâmetros que influenciam na impedância de carga podem ser bem controladas desde que o tamanho e a geometria da amostra sejam conhecidos. Por outro lado, nas aplicações *in vivo* ou em condições clínicas, dependendo do tamanho e da geometria a impedância da carga pode ser controlada até certo ponto, mas as propriedades elétricas do meio podem apenas ser estimadas. É praticamente impossível prever com precisão, durante o desenvolvimento do dispositivo quais serão as alterações nas propriedades elétricas da amostra, devido à exposição a campos elétricos intensos. Além da eletropermeabilização da membrana plasmática das células, que intensifica a condutividade elétrica da amostra, os pulsos elétricos também podem causar pelo menos mais dois efeitos conhecidos: o aquecimento e a contaminação eletrolítica da amostra [Kotnik *et al*, 2001]. Os eletropermeabilizadores, com saída de tensão e os com saída de corrente têm vantagens e desvantagens, mas aqueles com saída de tensão são mais utilizados em estudos de permeabilização *in vitro*, devido à maior facilidade de controle da forma de onda e intensidade do campo aplicado. Por exemplo, em estudos de eletropermeabilização *in vitro*, utilizam-se eletrodos que são placas paralelas de aço inoxidável com determinada área e distância entre elas. O campo elétrico “E” aplicado à amostra pode ser aproximado pela relação entre a tensão aplicada “U” e a distância “d” entre os eletrodos, conforme mostra a equação (2.2). Por sua vez, a impedância “Z” de carga é a relação entre a tensão aplicada “U” e a corrente elétrica “I”, que circula na amostra conforme mostra a equação (2.3). Logo, com o ajuste adequado da tensão aplicada e com a medição da corrente de carga, pode-se operar com o valor de campo desejado para a eletropermeabilização e calcular a variação da impedância de carga durante o processo [Miklavčič e Puc, 2006].

$$E = \frac{U}{d} \quad (2.2)$$

$$Z = \frac{U}{I} \quad (2.3)$$

2.3.1 Gerador de onda exponencial decrescente (Descarga capacitiva)

Esta é a técnica mais antiga utilizada para gerar sinais de eletropermeabilização, principalmente em ambiente *in vitro*. O dispositivo é constituído por uma fonte de alta tensão, capacitor, chave e resistência, apresentado na Figura 3. O dispositivo funciona em duas fases, carga e descarga, e gera uma forma de onda exponencial. Durante a primeira fase a chave está na posição 1 e o capacitor C_1 irá carregar até o valor V_o . Na segunda fase a chave é comutada para a posição 2, e a descarga do capacitor ocorre. A constante de tempo de descarga é dada por $\tau = (R // R_L) \cdot C_1$, onde R_L é o valor da resistência da amostra (carga).

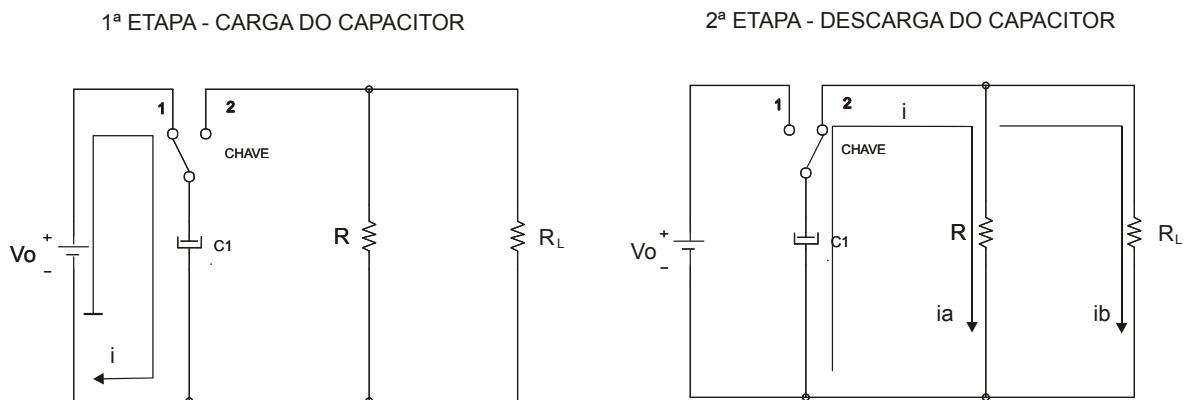


Figura 3 - Etapas de funcionamento do gerador de forma de onda exponencial decrescente, 1^a Etapa - carga do capacitor, 2^a Etapa - descarga com a constante de tempo $\tau = (R // R_L) \cdot C_1$.

A maioria dos equipamentos disponíveis comercialmente incorpora a resistência R em paralelo com a carga, com a finalidade de determinar com mais precisão o tempo de descarga, utilizando a condição que o valor de R seja muito menor que R_L (menor que um décimo de R_L). Neste caso a constante de tempo de descarga do capacitor pode ser aproximada para $\tau = R \cdot C$. O conceito apresentado é muito simples e os pulsos gerados podem ser usados para a transferência genética, uma vez que inclui a parte de alta tensão para permeabilização e baixa tensão para eletroforese. Contudo, este sistema apresenta poucos parâmetros de controle, apresentando uma forma de onda do campo aplicado, limitada taxa de repetição devido à constante de carga e descarga do capacitor e limitação do tempo de chaveamento mecânico. Além disso, o sistema produz picos de corrente de carga elevados, necessitando assim de circuito auxiliar para evitar falso-cerramento no chaveamento.

2.3.2 Geradores de onda quadrada

Para um melhor controle de amplitude, duração e freqüência do campo aplicado, um gerador de pulsos quadrados foi desenvolvido, conforme mostra a Figura 4. O dispositivo dispõe de uma fonte contínua de alta tensão de alimentação (V_o), mas a chave é substituída por um MOSFET (Metal Oxide Semiconductor Field Effect Transistor) de potência ou IGBT (Insulated Gate Bipolar Transistor). Com um sinal de comando adequado aplicado ao terminal “porta”, o MOSFET conduz na região triodo e a tensão V_o é aplicada na carga com uma pequena queda de tensão no transistor. Se a tensão entre os terminais “porta” e “fonte” tornar-se menor que a tensão limiar, o MOSFET entra em estado de corte e a tensão na carga se anula. A duração e repetição dos pulsos são totalmente controladas pelo circuito de comando.

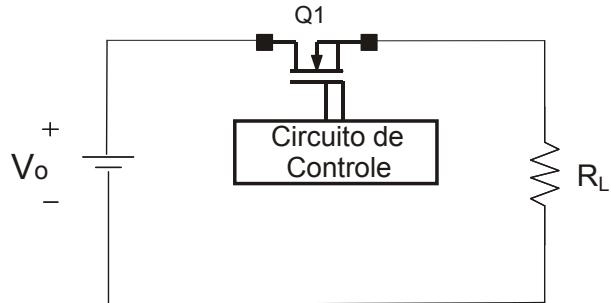


Figura 4 - Gerador de pulsos quadrados com transistor, onde Q1 é um transistor MOSFET do tipo N.

Via de regra, a fonte V_o é obtida de um retificador com filtro capacitivo. O processo descrito anteriormente pode ser usado para formar trem de pulsos de mesma amplitude e duração, se, durante o tempo de corte do transistor, o capacitor puder ser carregado até o valor de regime permanente. Este dispositivo possibilita a aplicação de pulsos com mesma duração (exemplo, 1 pulso de 10 μ s com amplitude de 100 V) e pulsos de duração variada (exemplo, 1 pulso de 10 μ s seguido de 5 pulsos de 1 μ s com amplitude de 100 V). As limitações deste equipamento referem-se às características dos componentes do circuito, tais como: 1) a amplitude máxima da tensão aplicada à amostra, que é limitada pela tensão de ruptura do MOSFET, 2) a corrente máxima na carga, que é limitada pela dissipação de potência no transistor, bem como pela constante de tempo de carga e descarga do capacitor da fonte de alimentação V_o . Apesar destes inconvenientes, geradores de pulsos quadrados ainda são muitos utilizados, especialmente em combinação com transformadores de pulso, conforme ilustrado na Figura 5.

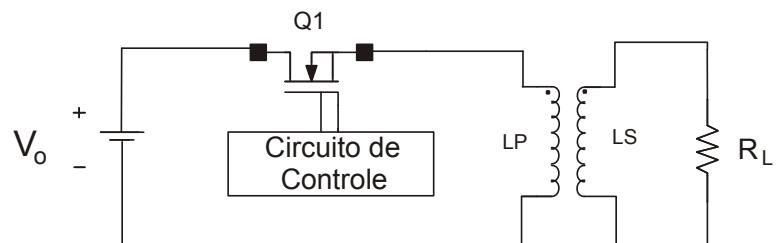


Figura 5 - Gerador de onda quadrada com transformador de pulso.

Os geradores de onda quadrada com transformador de pulso foram desenvolvidos para a produção de pulsos de alta tensão na carga a partir de pulsos de baixa tensão no primário. Assim, consegue-se gerar pulsos de alguns milhares de Volts de forma diferencial, limitando-se a corrente de saída com o projeto do transformador. O objetivo é obter saturação em determinadas condições e isolação da carga em relação à fonte de alimentação, oferecendo mais segurança nas aplicações *in vivo*. Apesar destas vantagens, as limitações deste dispositivo estão na flexibilidade do ajuste da forma de onda, duração e frequência dos pulsos, os quais são limitados pelas características do transformador. O desenvolvimento do transformador de pulso é complexo devido à relação não linear entre a indução magnética (B) e a intensidade do campo magnético (H) do seu núcleo. Além disso, circuitos auxiliares adicionais são necessários para desmagnetizar o transformador após o final do pulso.

2.3.3 Gerador analógico unipolar de sinais arbitrários.

Apesar dos geradores de pulsos quadrados e exponenciais decrescente terem suas limitações, são os equipamentos mais utilizados em eletropermeabilização. Contudo, determinados experimentos precisam de outras formas de onda, concatenação de dois ou mais pulsos com forma de onda, amplitude e duração diferentes, possibilidade de aplicação de pulsos repetitivos de mesmo intervalo ou intervalos diferentes de tempo. Para esta alta exigência de variação de parâmetros, o gerador analógico unipolar de sinais arbitrários foi desenvolvido conforme mostra a Figura 6.

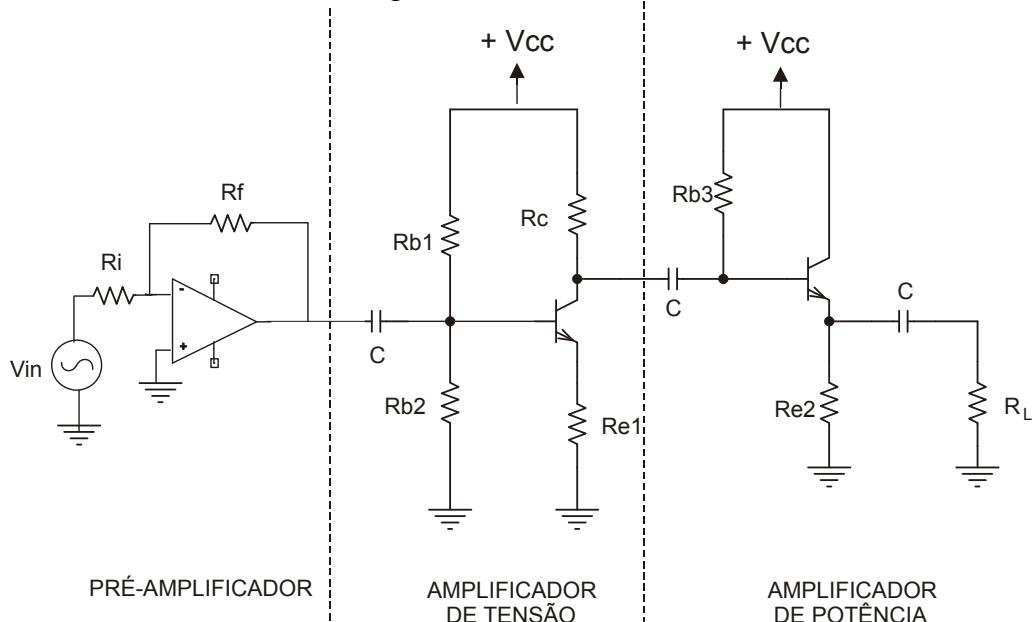
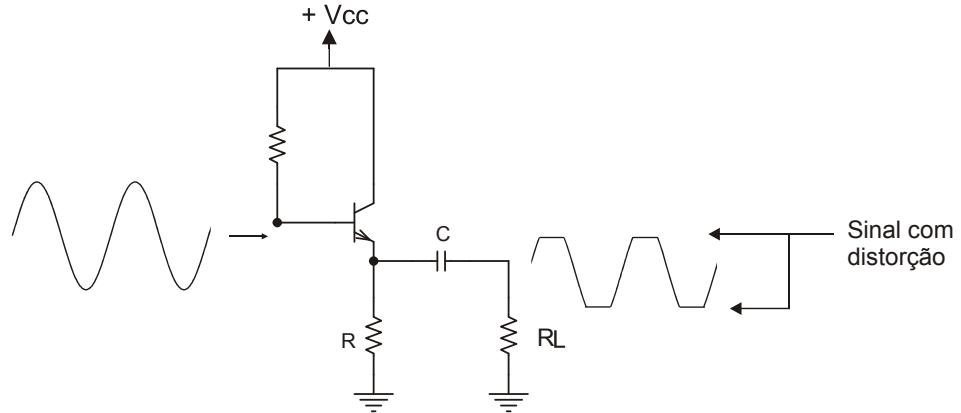


Figura 6 - Gerador analógico unipolar de sinais arbitrários, onde V_{in} é a tensão de saída do gerador com forma de onda arbitrária.

Para a geração de sinais arbitrários é necessário um gerador programável. Isto pode ser obtido com uma placa de conversão digital-analógica (D/A) em um microcomputador e um software dedicado para controlar uma saída analógica da placa, onde sinais descritos por equações matemáticas ou arquivos numéricos são gerados. Este sistema proporciona grande flexibilidade, permitindo o ajuste de todos os parâmetros da tensão aplicada na carga. Os estágios de amplificação analógica permitem obter os níveis de tensão e corrente desejados na amostra. Contudo, este sistema apresenta uma desvantagem devido às limitações dos componentes eletrônicos para tensões e correntes elevados (exemplo, transistores bipolares de potência e/ou MOSFET). A amplificação do sinal é limitada pela fonte de alimentação e pela dissipação de potência nos elementos ativos, que é significativa, pois eles operam na região linear. Ao extrapolar esta região de operação, ocorrem distorções na forma de onda (veja a Figura 7). Outra desvantagem deste sistema é a complexibilidade da construção e desenvolvimento dos circuitos em relação aos sistemas citados anteriormente.

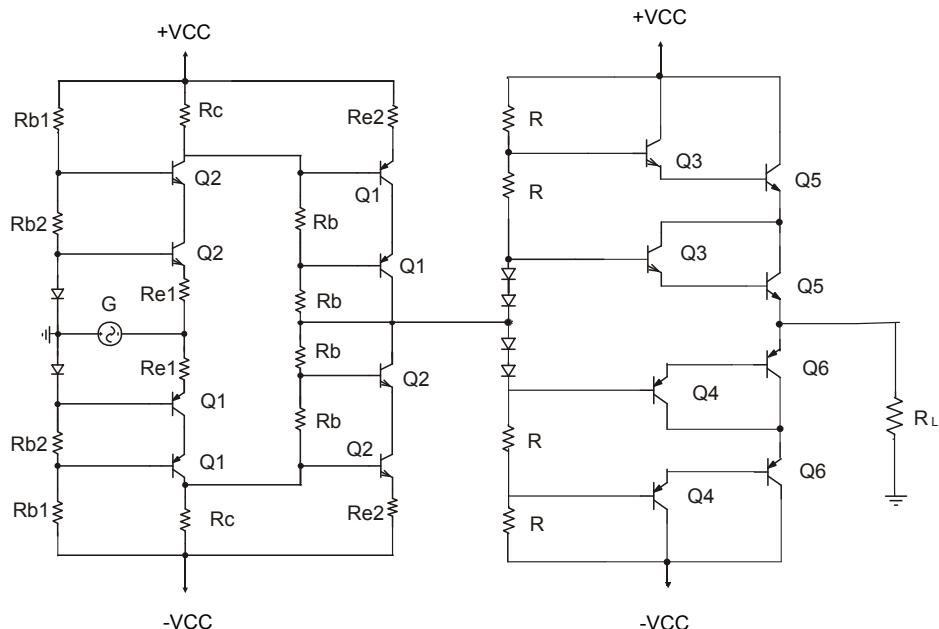


AMPLIFICADOR
DE POTÊNCIA

Figura 7 - Distorção do sinal para amplificação superior aos limites da região linear.

2.3.4 Gerador analógico bipolar de sinais arbitrários

O gerador analógico bipolar apresenta a vantagem de utilizar a alimentação simétrica, pois com isso possibilita a geração de tensões e correntes maiores na carga e com menor dissipação de potência nos transistores. Este gerador possui todas as vantagens de aplicação do gerador unipolar. A estrutura da configuração básica apresenta um estágio de amplificação de tensão (a), seguida de um amplificador de potência (b) classe AB ou classe B, conforme mostra a Figura 8. Esses amplificadores possuem uma configuração *push-pull* (transistores Q5 e Q6), onde cada semiciclo do sinal é amplificado por um determinado braço do amplificador. Os transistores são conectados em série (transistores Q5) para obter menor nível de tensão em cada dispositivo e em cascata (transistor Q3 e Q5) para obter maior ganho de corrente. Com isso pode-se obter altos níveis de tensão na carga e alta impedância de entrada no estágio de potência.



(a) Amplificador de Tensão

Figura 8 - Gerador analógico bipolar.

(b) Amplificador de Pôtencia

2.3.5 Geradores modulares de alta tensão

O gerador de onda quadrada modular de alta tensão consiste de geradores controlados individualmente e eletricamente isolados conforme mostra a Figura 9. O seu funcionamento é baseado no princípio de um convexo digital analógico e a amplitude da tensão aplicada na carga é a soma das fontes implementadas individualmente (fontes em configuração modular). As tensões das fontes individuais são iguais ($V1=V2=Vn=V0$) e podem participar na geração de um pulso a qualquer momento. Com um adequado controle do chaveamento dos transistores $Q1$ a Qn , este atua como interruptores que interligam os módulos em série para a obtenção de N diferentes níveis de tensão de saída proporcional ao valor $V0$. A desvantagem desta configuração está na complexibilidade de implementação do circuito de controle e dos custos elevados dos dispositivos necessários para a sua implementação.

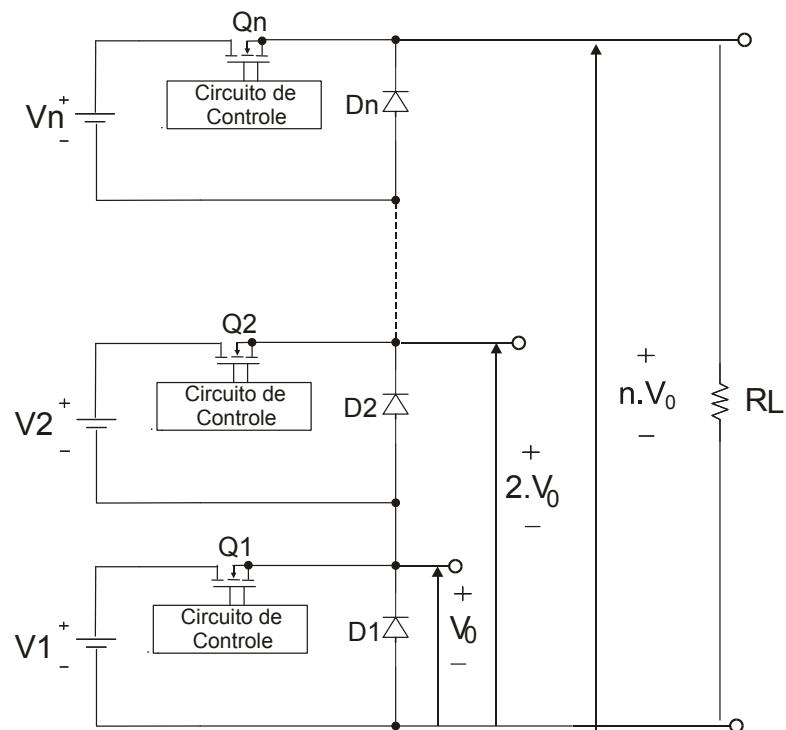


Figura 9 - Gerador modular de alta tensão, onde a tensão aplicada na amostra é a soma das tensões dos módulos utilizados.

A tabela 1 resume as vantagens e desvantagens dos sistemas descritos anteriormente.

Tabela 1 - Quadro Comparativo entre eletropermeabilizadores (Modificado de Puc *et al*, 2004).

Modelo	Vantagem	Desvantagem
Descarga por capacitor	-Projeto simples; -baixo custo.	- Pobre na flexibilidade dos parâmetros de estimulação.
Onda quadrada (transistor de potência)	-Projeto simples; -Controle de parâmetros de estimulação.	-Limitação da tensão e corrente de saída devido à tecnologia dos semicondutores.
Onda quadrada	-Muito seguro;	-Limitação nos parâmetros de

(transformador de pulso)	- pulsos com elevada tensão de saída; - Possibilidade de uso em ambiente de clínicas.	estimulação; - Projeto complexo do transformador de pulso.
Unipolar de sinal arbitrário	- Grande flexibilidade nos parâmetros de estimulação; - Forma de onda de sinal arbitrária.	- Limitação da tensão e corrente de saída devido à tecnologia dos semicondutores.
Bipolar de sinal arbitrário	- Grande flexibilidade nos parâmetros de estimulação; - Forma de onda de sinal arbitrária; - Tensões de saída mais elevada que o unipolar.	- Limitação da largura de banda; - Limitação da tensão e corrente de saída devido à tecnologia dos semicondutores.
Modular de alta tensão	- Pulso muito rápido; - Correntes e tensões elevadas.	- Custo muito elevado; - Projeto complexo para controle dos parâmetros de estimulação.

Um eletropermeabilizador para aplicação em pesquisa com células biológicas deve possuir algumas das vantagens indicadas na Tabela 1: geração de formas de onda arbitrárias (unipolares e bipolares) com possibilidade de ajuste de amplitude e freqüência, com pulso único ou trem de pulsos, capacidade para gerar tensões e correntes elevadas na carga e grande largura de banda para abranger uma ampla faixa de freqüências de aplicação.

Alguns equipamentos comercialmente produzidos são apresentados na Tabela 2, com as suas principais características e aplicações.

Tabela 2 - Equipamentos comercialmente produzidos (Modificado de Puc *et al*, 2004), onde BT é baixa tensão, AT é alta tensão e NA é sem descrição.

Fabricante / Produto	Características de Saída	Faixa de tensão [V]	Largura de pulso [s]	Aplicação	Tecnologia
BIORAD/ Micro Pulser	Exponencial	200 a 3000	$\tau = 1 \text{ a } 4.10^{-3}$	Bactéria, todo tipo de leveduras e células eucariota e procarióticas	Descarga por capacitor
BTX/ECM 630	Exponencial	BT: 10 a 500 AT: 50 a 2500	BT: $\tau = 25.10^{-6} \text{ a } 5$ AT: $\tau = 625.10^{-6} \text{ a } 78.10^{-3}$	Bactérias, leveduras, mamíferos, plantas, <i>in vivo</i>	Descarga por capacitor
BTX /ECM 2001	Onda Quadrada	BT: 10 a 500 AT: 10 a 3000	BT: $\tau = 10.10^{-6} \text{ a } 99.10^{-3}$ AT: $\tau = 1 \text{ a } 99.10^{-6}$	Mamíferos, plantas, eletro fusão	BT: onda quadrada AT: transformador de pulso CA: NA
CLONAID/R MX2010	Onda Quadrada	0 a 75	$f = 1 \text{ MHz}$	Transferência genética	Gerador de Onda

IGEA/ Cliniporator	Onda Quadrada	BT: 20 a 200 AT: 50 a 1000	BT: $\tau = 10 \cdot 10^{-6}$ a $20 \cdot 10^{-3}$ AT: $\tau = 30$ a $200 \cdot 10^{-6}$	Eletroquimiotera pia, Terapia Genética	Gerador Unipolar de sinal arbitrário
Quadrada					

A caracterização e modelagem da eletropermeabilização é uma importante área de pesquisa. Estudos experimentais da eletropermeabilização *in vitro* geralmente usam cubetas com espaçamentos de 1 ou 2 mm entre eletrodos. As tensões geralmente estão na faixa de 100 a 500 V e as correntes podem atingir picos de alguns Amperes em intervalos de centenas de microssegundos, a poucos milissegundos. A forma de onda, duração e freqüência da tensão aplicada são aspectos importantes do processo que devem ser ajustados. O equipamento utilizado deverá, portanto proporcionar amplas faixas de variação de parâmetros citados.

Comercialmente os geradores de onda arbitrária não podem fornecer amplitudes na faixa de várias centenas de Volts, que são necessárias para eletropermeabilização. Os amplificadores bipolares disponíveis comercialmente podem gerar sinais com tensão limitada de 400 Vpp, corrente máxima de 2 A, faixa de freqüência limitada em algumas dezenas de milhares de Hertz.

2.4 PROPOSTA DE UM SISTEMA ELETRÔNICO A SER APLICADO NA PESQUISA EM ELETROPERMEABILIZAÇÃO.

A proposta deste trabalho é o projeto, construção e teste de um sistema eletrônico, com as características adequadas para a realização de pesquisas de caracterização da eletropermeabilização. Este sistema deve permitir a geração de tensões com forma de onda arbitrária programadas em computador com amplitude máxima de 500 V, sendo capaz de alimentar uma carga de 100Ω com esta tensão por no mínimo 10ms que é o tempo máximo de estimulação. A freqüência máxima de onda senoidal a ser usada é de 100 kHz, o tempo de subida e descida da tensão na carga deve ser no máximo de 10 μ s sendo compatível com os tempos mínimos de estimulação desejados da ordem de 100 μ s. O sistema deve ainda permitir concatenar formas de onda diferentes para diferentes finalidades de teste. Outro recurso, fundamental para o equipamento proposto, é a medição da tensão e corrente na carga com a finalidade de avaliar a variação da impedância da carga durante o evento de eletropermeabilização.

A Figura 10 mostra uma representação esquemática do sistema proposto, onde os blocos indicados tem as seguintes funções: (1) Sistema computadorizado para programação e geração de sinais de tensão com forma de onda arbitrária (PC); (2) Geração de sinal, com conversor digital-analógico (D/A); (3) Amplificador e sistema de condicionamento da amostra de material biológico; (4) Transdutores de tensão e corrente na amostra; (5) Sistema de aquisição de Tensão e corrente com conversores analógico-digitais (A/D).

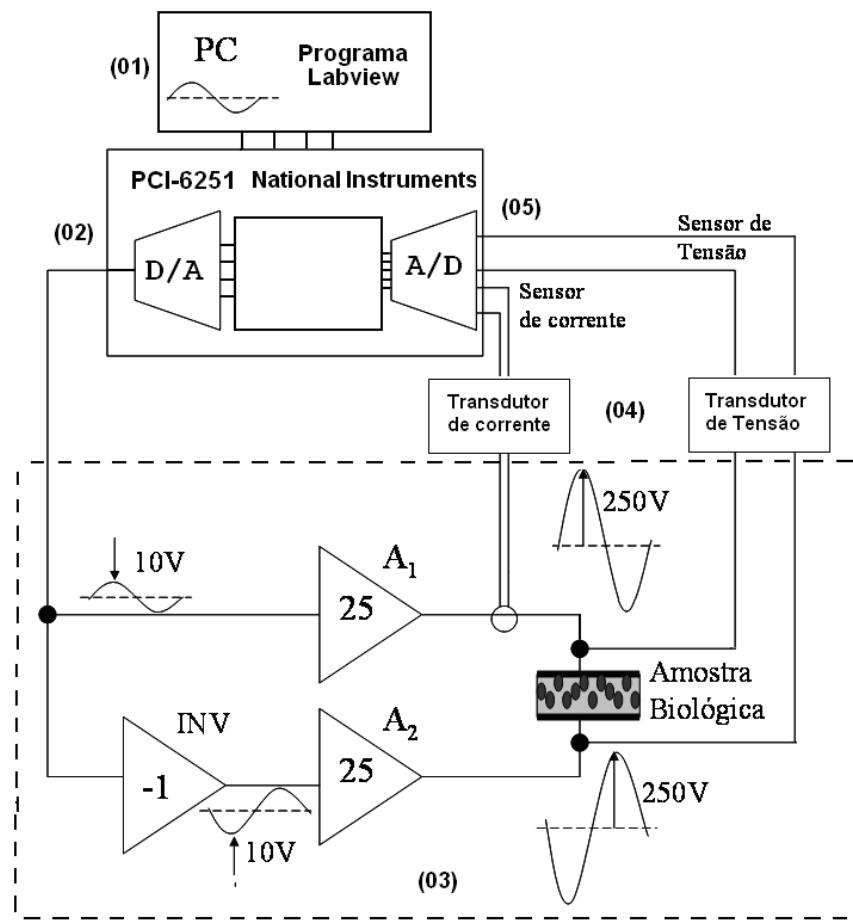


Figura 10 - Representação esquemática de um sistema de geração e aquisição de sinal para estudo da eletropermeabilização de células biológicas.

3 PROJETO DO SISTEMA ELETRÔNICO

O projeto do Eletropermeabilizador pode ser dividido em três etapas: 1) Amplificador e fontes de alimentação; 2) transdução de corrente e tensão na carga; 3) Geração e aquisição de sinais. Este capítulo descreve o funcionamento e o projeto dos circuitos eletrônicos utilizados.

3.1 O AMPLIFICADOR

O circuito de amplificação proposto e implementado é mostrado esquematicamente na Figura 11, sendo constituído por dois amplificadores idênticos A1 e A2. O amplificador A2 é acionado por um inverter de tensão, de modo que sua saída é invertida em relação ao amplificador A1. Assim o sinal fornecido pelo gerador é amplificado de forma complementar e aplicado na carga.

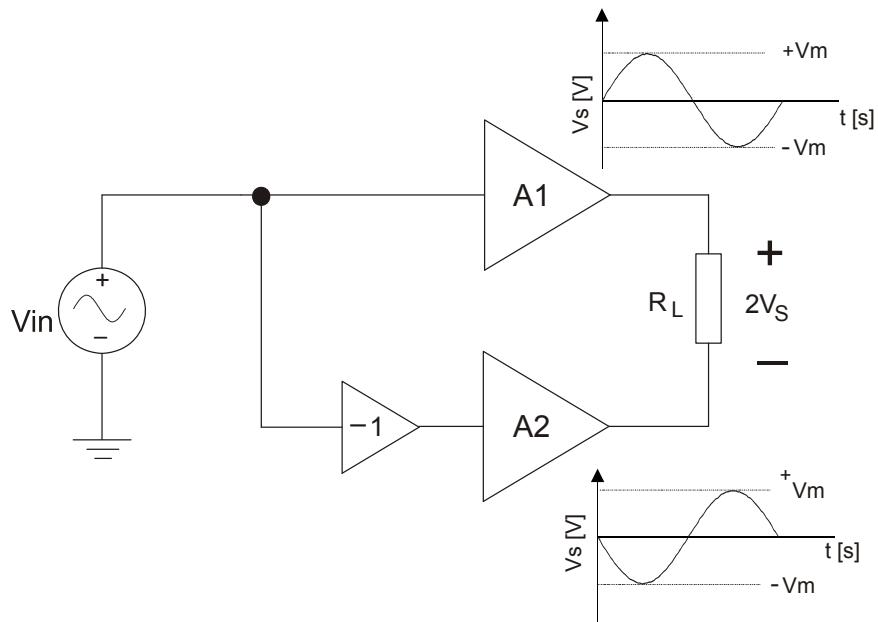


Figura 11 - Diagrama esquemático do amplificador implementado.

Esta estrutura complementar fornece um ganho total de 50 V/V (cada amplificador apresenta ganho de 25 V/V), necessário para amplificar um sinal de entrada com amplitude de ± 10 V para uma tensão de saída de ± 500 V, conforme requisito do projeto descrito anteriormente. Os amplificadores A1 e A2 são compostos por dois estágios: o amplificador de tensão, responsável por fornecer o ganho de 25 V/V; e o amplificador de potência, responsável por aplicar a tensão amplificada na carga e fornecer a corrente exigida por ela.

A estrutura detalhada desses amplificadores é apresentada na Figura 12. O amplificador de tensão opera em classe A, que é a estrutura com melhor linearidade e em configuração cascode que proporciona alta impedância de entrada com grande banda passante, pois o estágio base comum minimiza o efeito da capacitância de junção de coletor.

O amplificador de potência foi implementado na configuração *push-pull* classe AB, pois apresenta elevada corrente de saída; possui acoplamento direto da carga; minimização da corrente de polarização e *offset* de tensão na carga. Neste estágio utilizou-se a

associação série para reduzir a tensão reversa e a potência nos transistores e, também foi usado uma configuração *darlington* para obter alto ganho de corrente.

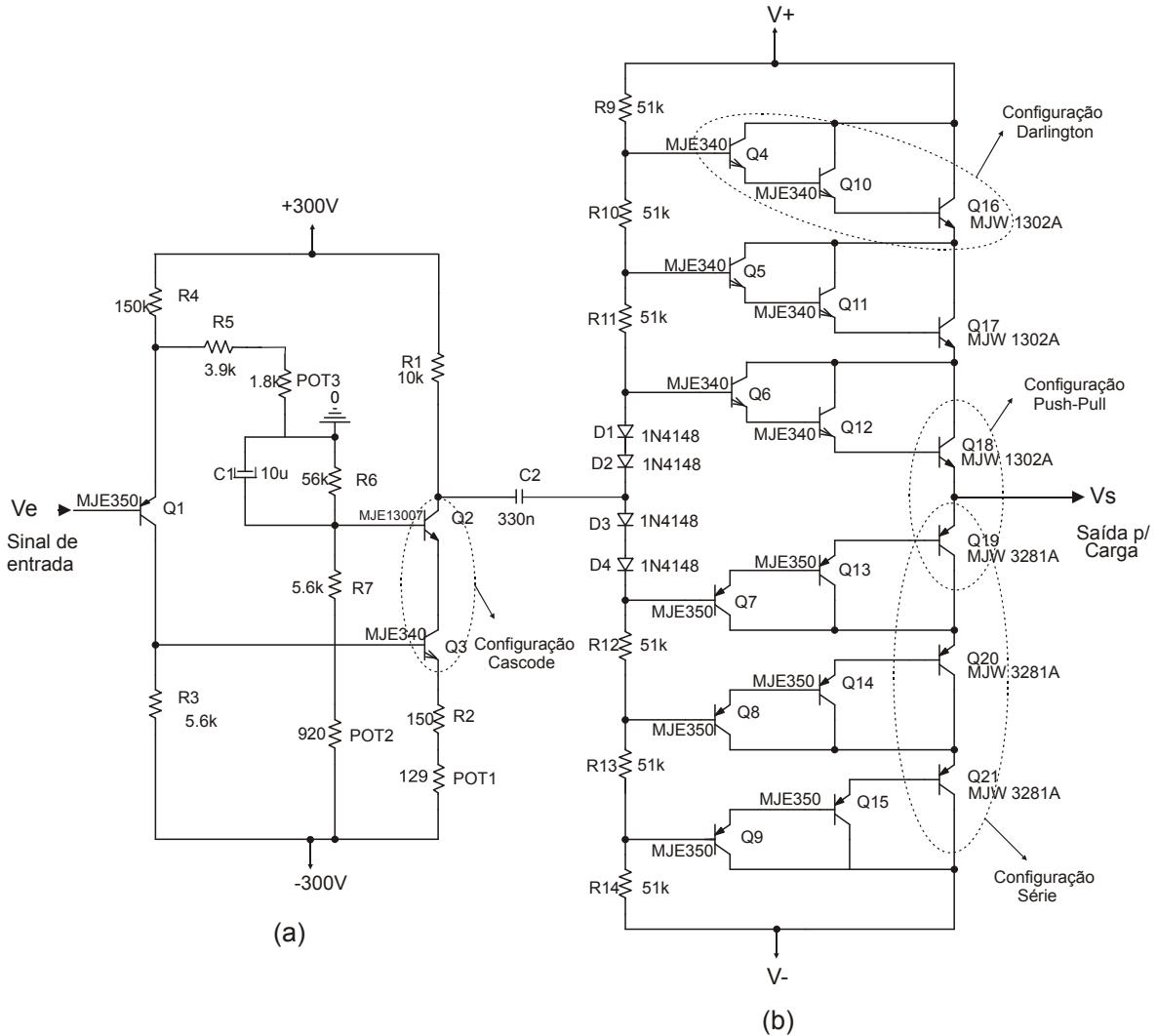


Figura 12 - Estrutura da metade do amplificador, composta de: (a) amplificador de tensão e (b) amplificador de potência.

3.1.1 Análise do Funcionamento do Amplificador

O estágio de amplificação de tensão é constituído pelo transistor Q1 (MJE350), responsável pelo acoplamento do sinal de entrada na base do transistor Q3 (MJE340) que está no nível de tensão de aproximadamente -290 V, e pelo estágio cascode de amplificação formado por Q2 (MJE13007) e Q3. A base do transistor Q2 está no nível de tensão -270 V e o seu coletor, acoplado ao capacitor C2, aproximadamente em zero volt. O capacitor C2 faz o acoplamento entre o amplificador de tensão e o amplificador de potência para o sinal de tensão alternada e evita o acoplamento “dc” que poderia gerar offset de tensão na carga.

Os potenciômetros POT1, POT2 e POT3 foram implementados para ajuste dos valores de resistências requeridas para o projeto, uma vez que estes valores não são encontrados comercialmente, e também para ajustes finais de bancada para a implementação prática.

O resistor R1, apresentado na Figura 13 é formado pela associação série e paralelo de resistores de $15\text{k }\Omega/3\text{ W}$, devido sua elevada dissipação de potência.

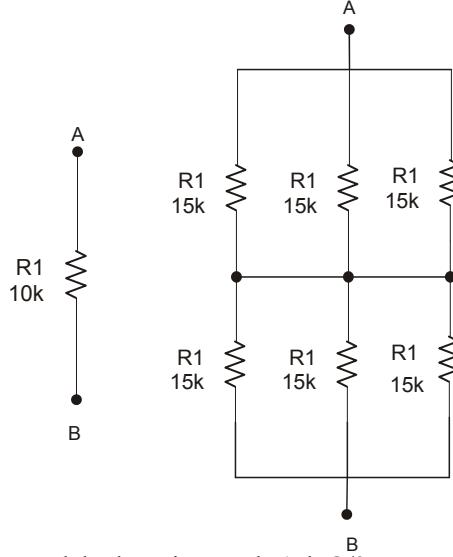


Figura 13 - Associação em série e paralelo de resistores de $15\text{k }\Omega/3\text{ W}$ para R1.

O amplificador de tensão foi projetado para o ganho de 25 V/V , proporcionando até 250 V no coletor do transistor Q2.

O estágio de potência é composto por duas partes simétricas e complementares, denominadas de “braço positivo” e “braço negativo”, onde a tensão de alimentação (V^+ e V^-) esta dividida igualmente. A divisão de tensão é determinada pela rede de resistores R9 a R14 conectada as bases dos transistores Q4 a Q9, respectivamente.

A configuração *darlington* com dois MJE340 e um MJW1302A no braço positivo e dois MJE350 e um MJW3281A no braço negativo, proporciona ganho de corrente nominal da ordem de 1.10^6 . Os diodos no ramo central determinam uma queda de tensão da ordem de $1,2\text{ V}$ entre o nó de entrada de sinal e a base do primeiro transistor, o que mantém o amplificador polarizado próximo da região linear, que caracteriza a classe AB de operação.

3.1.2 Análise do Amplificador

A Tabela 3 a seguir, apresenta as principais características dos transistores utilizados neste projeto.

Tabela 3 - Características dos transistores

Componente	V_{CE} (Reversa) (V)	I_C (A)	H_{FE}		F_T (MHz)
			Mínimo	Máximo	
MJE340*	300	0,5	30	240	---
MJE350*	300	0,5	30	240	---
MJE13007	700	8,0	8	40	14
MJW3281A*	230	15	50	200	30
MJW1302A*	230	15	50	200	30

* transistores complementares (NPN/PNP)

--- não informado

Valores retirados dos *datasheet* dos componentes [ON Semiconductor].

A Figura 14, apresentam as correntes e tensões de polarização obtidas pela análise “CC” do amplificador utilizando o simulador *PSPICE ORCAD 9.2*.

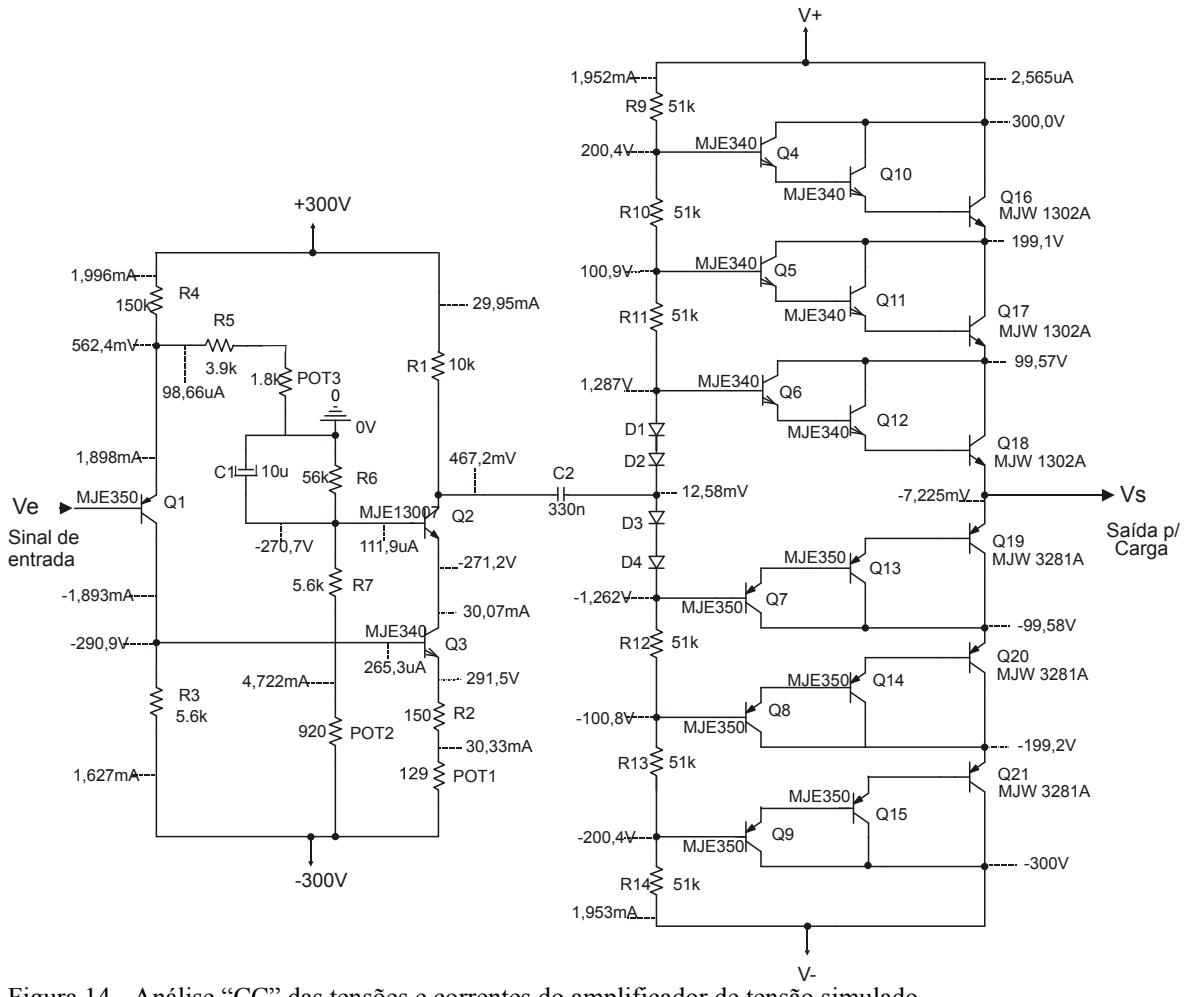


Figura 14 - Análise “CC” das tensões e correntes do amplificador de tensão simulado.

Uma vez que a excursão de sinal é determinada pela queda de tensão “CC” em R1 e pela queda de tensão na junção de coletor do transistor Q2, estes valores foram ajustados um pouco acima de 250 V para garantir que não haverá distorção de sinal. Assim, a corrente nominal de coletor de Q2 foi especificada no valor de 30 mA e a tensão de base de Q2 no valor de -270 V. A corrente de coletor de Q2 é determinada pela tensão na base de Q3, tensão de alimentação (-300 V) e resistência de emissor de Q3.

No estágio de potência a divisão de tensão nos resistores de base R9 a R14 determina uma tensão de polarização de 100 V em cada transistor.

A corrente de polarização de coletor nos transistores de potência é mantida em um valor muito baixo de pouco mais de 2,5 μ A para evitar a desnecessária dissipação de potência, mas mantendo os transistores próximos da região linear, com aplicação de aproximadamente 1,2 V sobre as três junções de emissor da composição *darlington* (Q6, Q12, Q18 e Q7, Q13, Q19).

O ganho de tensão do amplificador pode ser calculado através do circuito equivalente “CA” mostrado na Figura 15, onde “ R_i ” é a resistência de entrada do amplificador de potência e “ r_e ” é a resistência equivalente do modelo dinâmico da junção

de emissor, sendo dado aproximadamente por $r_e = \frac{V_T}{I_E}$, onde $V_T = \frac{K_B \cdot T}{e}$. Nesta expressão, “ I_E ” é a corrente de polarização de emissor, “ V_T ” é a tensão térmica, “ K_B ” é a constante de Boltzmann, “ e ” a carga elétrica elementar e “ T ” a temperatura absoluta. A tensão térmica para $T = 300$ K é aproximadamente 26 mV.

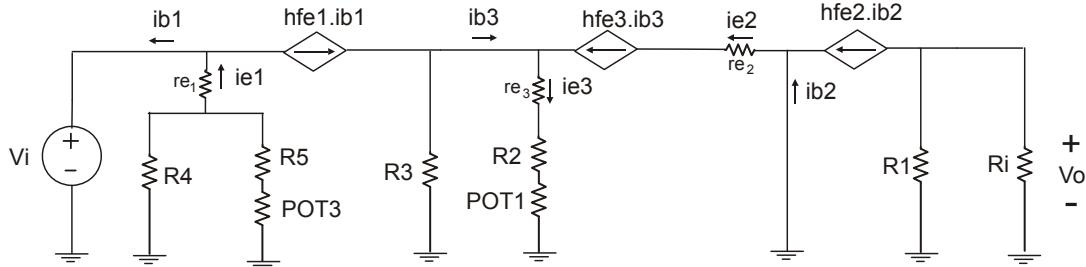


Figura 15 - Circuito equivalente do pré-amplificador para análise “CA”.

O ganho de tensão do amplificador (AV) obtido da análise deste circuito é dado pela equação (3.1):

$$AV = \frac{h_{fe1}}{1 + h_{fe1}} \cdot \frac{R_3 // [(R_2 + Pot_1 + r_{e3})(1 + h_{fe3})]}{[R_4 // (R_5 + Pot_3)] + r_{e1}} \cdot \left(\frac{h_{fe3}}{1 + h_{fe3}} \right) \cdot \left(\frac{h_{fe2}}{1 + h_{fe2}} \right) \cdot \left(\frac{R_1 // R_i}{R_2 + Pot_1 + r_{e3}} \right) \quad (3.1)$$

Substituindo-se os valores de resistências e ganhos de corrente nominais, obtém-se o valor teórico $AV = 29$ V/V, porém o valor obtido por simulação é de 25 V/V. Essa diferença provavelmente deve às diferentes estimativas dos parâmetros r_e e h_{fe} dos transistores feitos analiticamente em relação aos valores usados nos modelos dinâmicos do simulador PSPICE.

O capacitor C_2 de acoplamento entre os estágios determina a freqüência de corte inferior (f_c) da resposta em freqüência do ganho de tensão do amplificador. O valor de C_2 foi escolhido para que f_c fosse menor que 10 Hz. Para determinar a f_c utilizou-se a equação (3.2):

$$f_c = \frac{1}{2\pi(R_i + R_1) \cdot C} \quad (3.2)$$

Substituindo-se os valores na equação, obteve-se a f_c em 5,7 Hz.

3.1.3 Potência dissipada no amplificador

A potência média dissipada nos transistores operando em classe A é dada pela equação (3.3):

$$P = V_{CE} \cdot I_C + \frac{1}{T} \cdot \int_0^T V_{ce}(t) \cdot i_c(t) \cdot dt \quad (3.3)$$

onde, V_{CE} é a tensão “CC” entre coletor e emissor, I_C é a corrente “CC” de coletor, $V_{ce}(t)$ é o sinal de tensão entre coletor e emissor, $i_c(t)$ é o sinal de corrente de coletor

Para sinais senoidais, obtém-se o resultado, apresentado pela equação (3.4):

$$P = V_{CE} \cdot I_C - \frac{V_m \cdot I_m}{2} \quad (3.4)$$

onde, V_m é a amplitude do sinal de tensão entre coletor e emissor, I_m é a amplitude de sinal de corrente de coletor.

Logo, o valor máximo de potência dissipada é dado pela equação (3.5):

$$P_{máx} = V_{CE} \cdot I_C \quad (3.5)$$

Para os transistores operando em classe AB a potência média dissipada é aproximadamente dada pela equação (3.6):

$$P = V_{CE} \cdot I_{CC} + \frac{1}{T} \cdot \int_0^{T/2} v_{ce}(t) \cdot i_c(t) \cdot dt \quad (3.6)$$

onde, I_{CC} é o valor médio da corrente de coletor. Para sinais senoidais, tem-se a equação (3.7):

$$P = \frac{V_{CE} \cdot I_m}{\pi} - \frac{V_m \cdot I_m}{4} \quad (3.7)$$

Para uma carga resistiva no estágio de potência na qual o sinal de tensão na carga é dividido entre os três transistores em série em cada braço do amplificador, tem-se $I_m = \frac{3 \cdot V_m}{R_L}$. Com isso, a potência máxima ocorre quando $V_m = \frac{2}{\pi} V_{CE}$ e tem o valor dado pela equação (3.8):

$$P = \frac{3 \cdot V_{CE}^2}{\pi^2 \cdot R_L} \quad (3.8)$$

onde, $V_{CE} = \frac{V_{CC}}{3}$ e V_{CC} é a tensão de alimentação do amplificador.

A Tabela 4 apresenta os valores de potência dissipada para os principais elementos de dissipação no amplificador. Esses elementos requerem um esquema especial de dissipação que será apresentado a seguir. Os demais elementos do circuito dissipam muito pouco e não requerem qualquer tipo de proteção térmica.

Tabela 4 - Potência dissipada nos transistores principais

Transistor	Potência (W)
MJE13007	8,13
MJW3281A	60,79
MJW1302A	60,79

Todos os transistores listados na Tabela 4 são montados sobre a superfície de um mesmo dissipador. A potência total dissipada em regime permanente senoidal é de aproximadamente 745 Watts.

Foi utilizado o dissipador modelo P16-20 da SEMIKRON, que possui massa de 4,7 Kg e resistência térmica 0,25 °C/W.

Com este dissipador não seria possível utilizar o amplificador na potência máxima indicada acima em regime permanente. Contudo, o eletropermeabilizador deve ser usado apenas com formas de onda de curta duração, tipicamente de centenas de microssegundos a dezenas de milissegundos. Levando em conta o calor específico do alumínio (0,22 cal/g°C) e a massa do dissipador, pode-se estimar que este dispositivo possui uma capacidade térmica da ordem de 4,3 KJ/°C, o que proporciona uma constante de tempo para o aumento da temperatura do dissipador de cerca de 1000 segundos. Com isso, pode-se considerar que a temperatura do dissipador é constante e igual à temperatura do ar durante o intervalo de tempo de aplicação do pulso de tensão na carga. Assim, pode-se estimar a temperatura de junção (T_j) dos transistores durante este intervalo, considerando a temperatura do dissipador de 40°C, a resistência térmica entre junção e cápsula (R_{thjc}) e a resistência térmica de contato do transistor com o dissipador de aproximadamente 1 °C/W. Os valores obtidos são listados na Tabela 5.

Tabela 5 - Temperatura de junção máxima

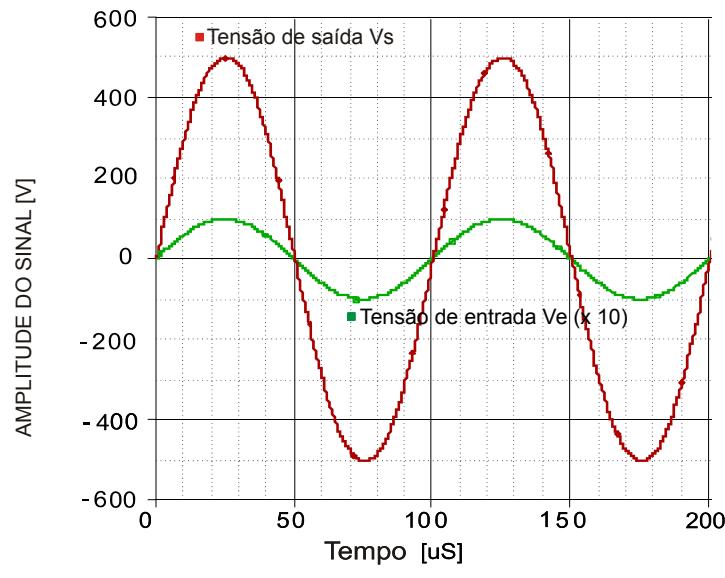
Transistor	R_{thjc} (°C/W)*	Potência (W)	T_j (°C)	$T_{j_{MAX}}$ (°C)*
MJE13007	1,56	8,13	60,81	150
MJW3281A	0,625	60,79	138,78	150
MJW1302A	0,625	60,79	138,78	150

* Valores retirados dos datasheet dos componentes [ON Semiconductor]

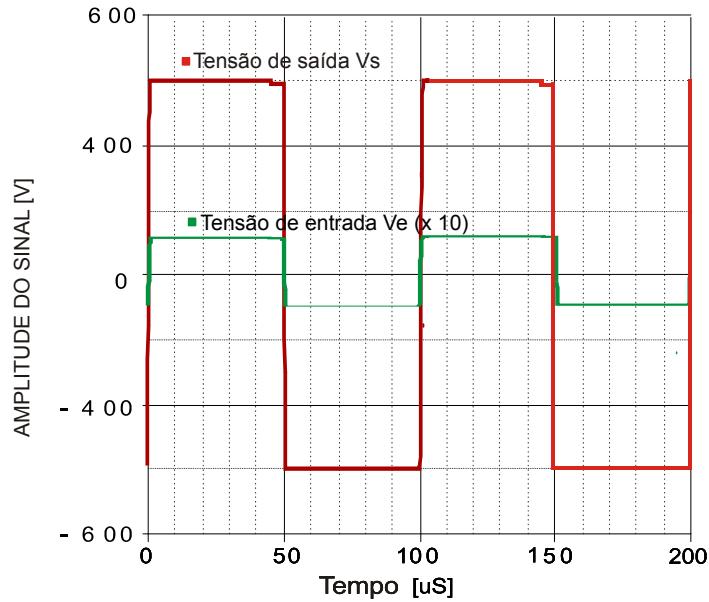
3.1.4 Análise dinâmica do Amplificador

A simulação dinâmica do Amplificador foi realizada com o programa PSPICE ORCAD 9.2 para a carga nominal de 100 Ω.

A Figura 16 apresenta a resposta do amplificador para sinal senoidal e quadrado. Observa-se que o ganho de tensão é de 50 V/V. Na Figura 17 o pulso quadrado na carga é mostrado com escala de tempo expandida e verifica-se que o tempo de resposta (de 10% a 90% de amplitude) é aproximadamente 1 μs e que o tempo de atraso (0 a 90% de amplitude) é cerca de 1,5 μs na subida e na descida do sinal.

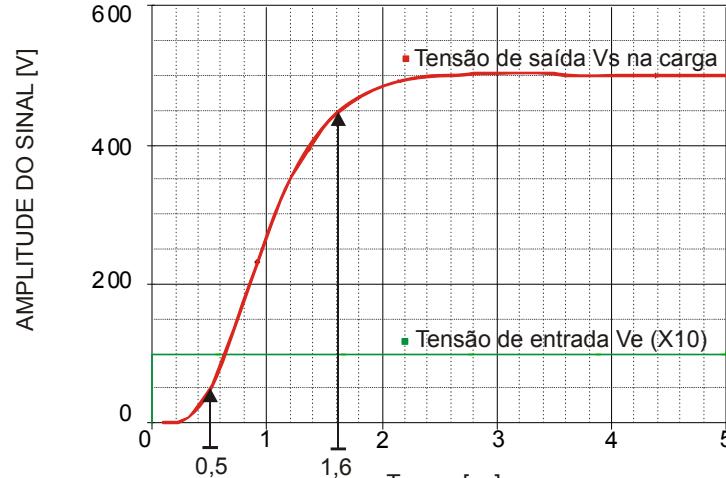


(a) ONDA SENOIDAL

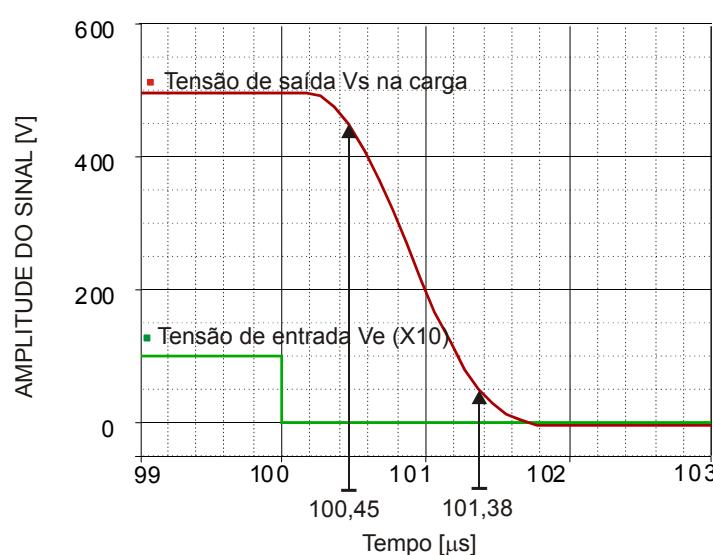


(b) ONDA QUADRADA

Figura 16 - Resposta no tempo do amplificador. (a) onda senoidal. (b) onda quadrada.



(a) Tempo de subida



(b) Tempo de descida

Figura 17 - Resposta no tempo para pulso positivo. (a) Detalhe da subida do sinal na carga. (b) Detalhe da descida do sinal na carga.

A resposta em freqüência do amplificador é mostrada na Figura 18. Observa-se que a largura de banda para o módulo do ganho com queda de -3 dB nos extremos é de aproximadamente 5 Hz a 250 kHz.

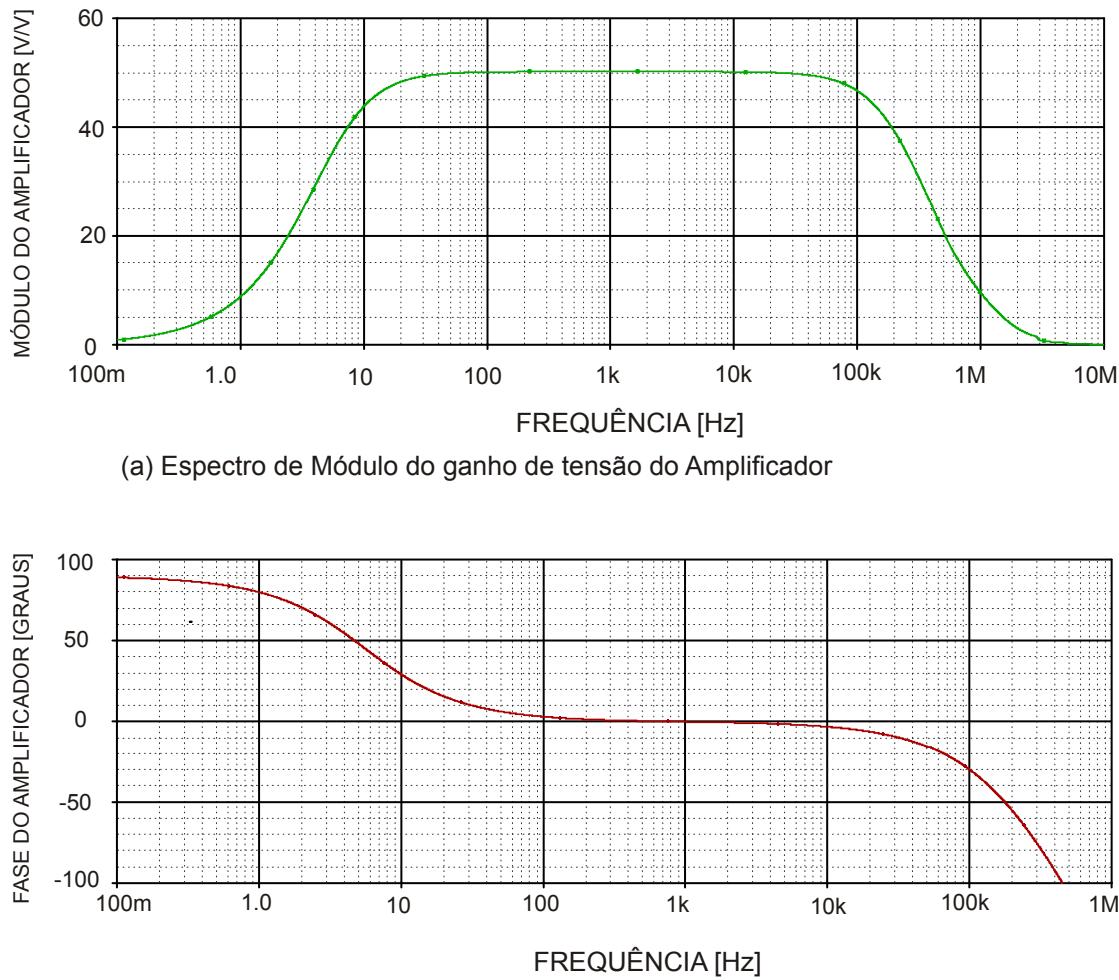


Figura 18 - Resposta em freqüência do Amplificador, (a) Espectro de Módulo. (b) Espectro de Fase.

3.2 FONTES DE ALIMENTAÇÃO DO AMPLIFICADOR

As fontes de alimentação foram projetadas para fornecer uma tensão fixa de ± 300 V para o amplificador de tensão e uma tensão ajustável de zero a ± 300 V para o amplificador de potência. O ajuste da tensão de alimentação do amplificador de potência permite minimizar a dissipação de potência nesse estágio.

3.2.1 *Fonte de Alimentação Fixa*

A Figura 19 mostra o esquema da fonte fixa de ± 300 V.

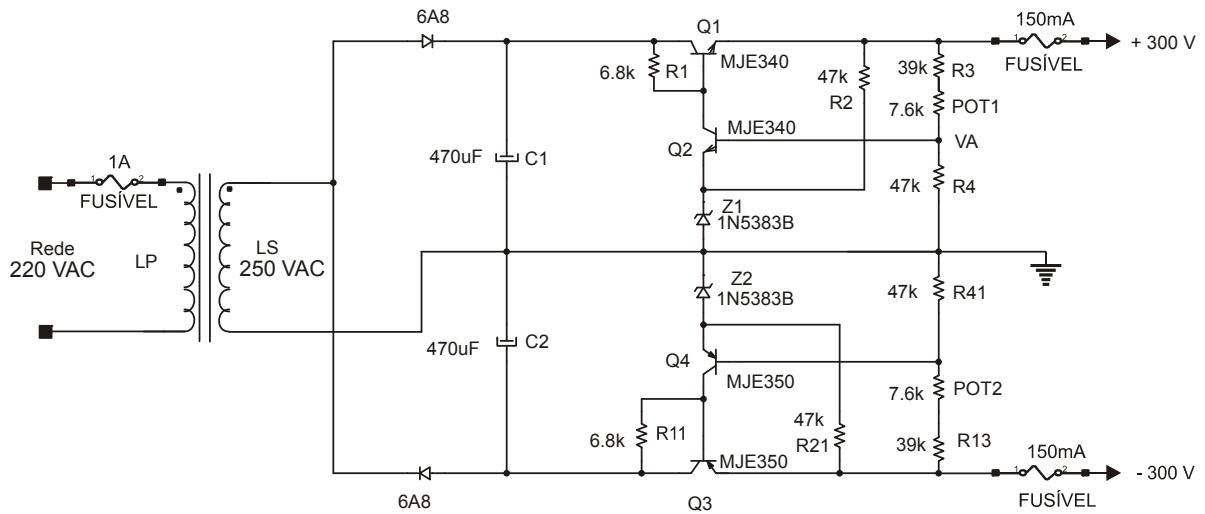


Figura 19 - Fonte de alimentação Fixa ± 300 V.

Trata-se de um retificador monofásico de meia onda simétrico que fornece cerca de ± 350 V de tensão contínua seguido de um regulador linear de tensão que estabiliza a tensão de saída em ± 300 V. O regulador é constituído de maneira convencional com transistor de passagem (MJE 340 e MJE 350) com realimentação através de divisor resistivo e comparação com tensão de referência de um zener (1N5383).

A corrente nominal de projeto é baixa, 150 mA, uma vez que essa fonte deve fornecer apenas a corrente de polarização do amplificador de tensão, da ordem de 30 mA, mais uma corrente “CA” da ordem de 28 mA no transistor Q2.

3.2.2 *Fonte de Alimentação Ajustável*

A Figura 20 mostra o esquema da fonte ajustável para o amplificador de potência. Foi utilizado um transformador com 5 derivações com os valores de tensão de 45, 90, 135, 180 e 230 V, e 5 relés para selecionar a tensão desejada a partir de uma chave de 5 pólos.

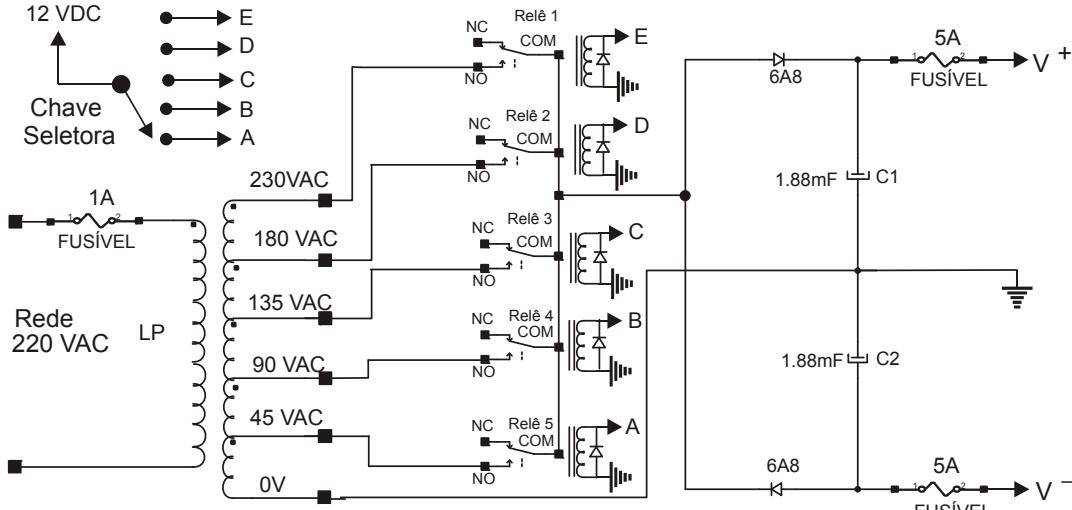


Figura 20 - Fonte de alimentação Ajustável nos valores: ± 63 , ± 127 , ± 191 , ± 254 e ± 325 V.

A tensão de saída (V^+ e V^-) de alimentação é obtida simplesmente com uma retificação e filtragem da tensão selecionada. O capacitor foi calculado para que a queda de tensão fosse no máximo de 30 V para a corrente de carga de 5 A durante o intervalo de tempo máximo de 10 ms.

3.3 SISTEMA DIGITAL DE GERAÇÃO E AQUISIÇÃO DE SINAIS

O sistema de aquisição de dados para a geração e medição dos sinais de tensão e corrente com forma de onda arbitrária foi desenvolvido no ambiente *LabVIEW*®, utilizando a placa de aquisição de dados PCI-6251 da *National Instruments*, instalada em um computador com processador Intel® Celeron® 2.8 GHz e 1 GB de memória RAM.

A Figura 21 mostra uma fotografia dessa placa e suas características fornecidas pelo fabricante [NATIONAL INSTRUMENTS] são descritas abaixo.



Figura 21 - Placa PCI 6251 utilizada no sistema de geração e aquisição dos sinais.

A placa possui 16 entradas independentes ou 8 entradas diferenciais; taxa de amostragem A/D de 1,25 MS/S; resolução de 16 bits; tensão máxima de entrada entre -10 V à +10 V e apresenta 2 saídas analógicas independentes com taxa de amostragem D/A de 2,86 MS/s; resolução de 16 bits; tensão máxima de saída entre -10 V a +10 V; corrente máxima total por canal de saída 5 mA.

A placa também apresenta 24 entradas ou saídas digitais; razão de clock máxima de 10 MHz; tensão máxima de entrada ou saída de 0 a 5 V; corrente máxima por canal de 24 mA, totalizando uma corrente máxima de 448 mA.

O programa foi desenvolvido para gerar uma forma de onda de tensão com as características desejadas no experimento de eletropermeabilização e para adquirir amostras da tensão e corrente na carga. Um diagrama de blocos desse aplicativo é mostrado na Figura 22.

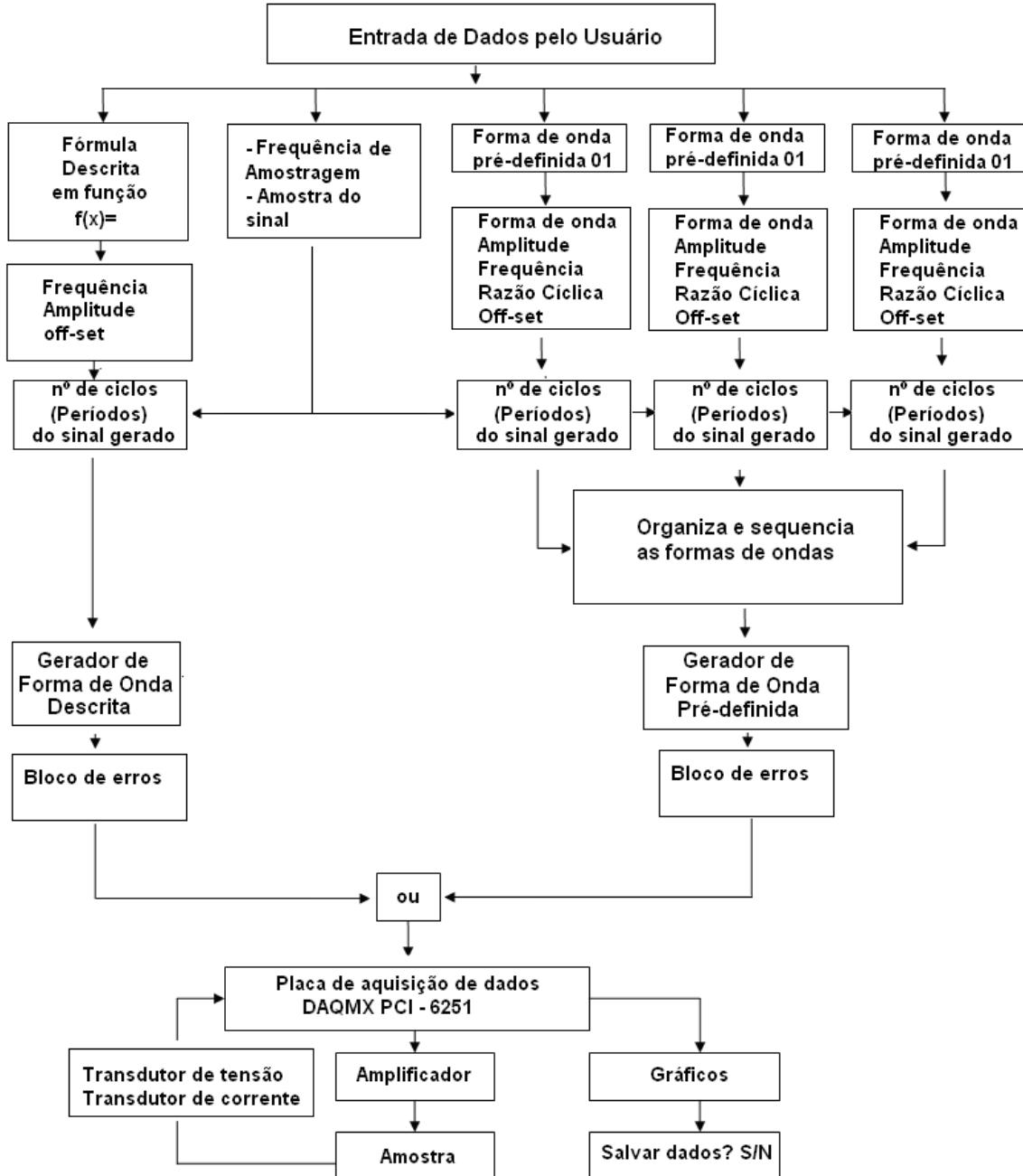


Figura 22 - Diagrama de blocos do programa de geração e aquisição dos sinais para o eletropermeabilizador em *LabVIEW*[®].

O gerador de sinais se destina a estimulação de materiais biológicos através de sinais elétricos com diferentes formas de onda, apresentando duas formas de gerar um sinal arbitrário: a primeira com formas de onda pré-programadas e a segunda com fórmula matemática. A freqüência máxima de amostragem é de aproximadamente 500 kHz para dois canais de entrada e 1,25 MHz para um canal. A amplitude é limitada em ± 10 V, decorrente das limitações da placa de aquisição PCI-6251. Para o desenvolvimento do gerador de forma de onda pré-programada, foi utilizado o bloco pronto básico de geração de forma de onda do *LabVIEW*[®], o qual apresenta em sua estrutura os seguintes parâmetros: amplitude, forma de onda (senoide, triangular, quadrada e dente de serra), *offset* e razão cíclica.

O gerador desenvolvido possibilita gerar um único sinal, e também gerar um sinal com até três formas de onda concatenadas com diferentes parâmetros. Para que esta concatenação de sinais seja possível, foi desenvolvido um bloco que organiza e sequencia as formas de onda. Este bloco sequencia cada forma de onda com seus parâmetros, anexando-os um após o outro, obtendo um sinal único concatenado para ser enviada a saída analógica da placa PCI-6251.

Para o gerador de fórmula, utilizou-se do bloco pronto de fórmula do *LabVIEW*[®], que possibilita descrever uma função matemática com sintaxe similar a utilizada em *Matlab*[®].

O bloco de freqüência de amostragem e amostra do sinal determina quantos ciclos (períodos) de um determinado sinal serão gerados e o número de amostras por ciclo.

Uma vez que o sinal seja definido em forma de onda, amplitude e demais parâmetros, este é verificado por um bloco de erros, que verifica as informações programadas antes do envio do sinal à saída analógica da placa PCI-6251. A verificação diz respeito aos limites de tensão, freqüência e número de amostras que a placa de aquisição suporta. Se a configuração do sinal for correta o envio é realizado. Caso contrário, o programa sinaliza o problema com uma mensagem de erro.

Para o envio do sinal à placa utilizou-se o bloco assistente DAQ do *LabVIEW*[®] para a geração de tensão analógica.

O sinal de tensão é enviado para a entrada do amplificador, que o amplifica com ganho de tensão 50 V/V e aplica na carga. Os transdutores de tensão e corrente conectados à carga medem os valores de tensão e corrente que são adquiridos por duas entradas analógicas da placa de aquisição. Para esta aquisição foi utilizada o bloco assistente DAQ do *LabVIEW*[®] para a aquisição de tensão analógica. Estes valores são exibidos em forma de gráficos de tensão na tela do usuário, podendo ser armazenados em arquivos.

O bloco de salvar dados e imagem armazena o sinal gerado e os sinais de tensão e corrente em arquivos distintos. As imagens podem ser salvas em formato jpg, .bmp ou metafile, e os dados em formato de arquivo texto.

3.4 TRANSDUTOR DE TENSÃO E CORRENTE

O transdutor de tensão desenvolvido é apresentado na Figura 23, e utiliza o amplificador de instrumentação INA 111BP [TEXAS INSTRUMENTS] e divisores resistivos para a redução da tensão de 500 V para aproximadamente 4,0 V na entrada diferencial. O ganho do amplificador de instrumentação é ajustado em 2,0 V/V.

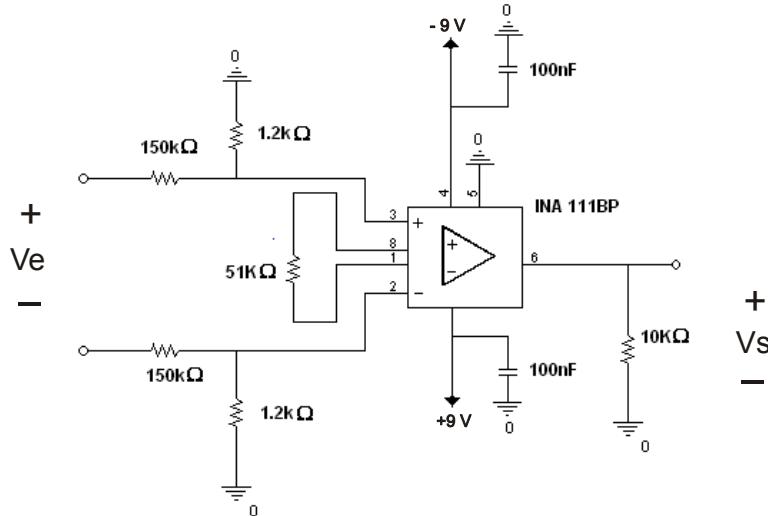


Figura 23 - Transdutor de Tensão com divisor resistivo e amplificador de instrumentação INA 111BP.

A relação de transferência deste transdutor segue a seguinte equação:

$$V_s = V_e \times \left(\frac{1,2 \cdot 10^3}{1,2 \cdot 10^3 + 150 \cdot 10^3} \right) \times \left(1 + \frac{51 \cdot 10^3}{51 \cdot 10^3} \right) \quad (3.9)$$

Os terminais de entrada (Ve) estão acoplados a carga a ser medida e a saída Vs é o sinal de tensão adquirido pela placa PCI-6251, devendo ser limitado a ± 10 V. Para garantir que a tensão de saída não será em nenhuma condição maior que 10 V (limite das entradas analógicas da placa de aquisição), foi usada a tensão de alimentação do amplificador de instrumentação de ± 9 V.

O transdutor de corrente, ilustrado na Figura 24, foi desenvolvido com os requisitos de obter adequada isolação da placa de aquisição de dados, largura de banda superior a 100 kHz e sensoriamento de corrente de até 5 A.

O transdutor LTSP 25-NP da empresa LEM foi o transdutor de efeito Hall com as melhores características encontradas para atender estes requisitos.

Algumas das características básicas do transdutor LTSP 25-NP são: corrente nominal de entrada para até 25 A; banda de freqüência típica de 300 kHz para -1 dB; isolação de 3 kV de tensão eficaz; tempo de resposta máxima de 150 ns; erro de linearidade máximo de 0,1% para corrente de 25 A de entrada.

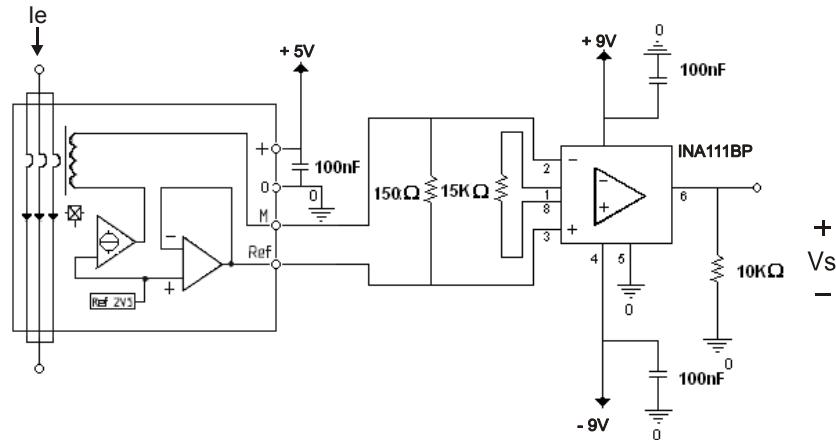


Figura 24 - Transdutor de Corrente por Efeito Hall LTSP 25-NP e amplificador de instrumentação INA111BP.

O transdutor de corrente LTSP 25-NP tem como sinal de entrada a corrente I_e a ser medida. A corrente de saída do transdutor, por sua vez, produz uma diferença de potencial no resistor de 150Ω que é amplificada com o amplificador de instrumentação INA111BP e aplicada em uma entrada analógica da placa PCI-6251.

A relação da tensão de saída (V_s) com a corrente de entrada I_e é dada pela equação (3.10):

$$V_s = I_e \times \left(\frac{12,5 \cdot 10^{-3}}{8,33} \times 150 \right) \times \left(1 + \frac{51 \cdot 10^3}{15 \cdot 10^3} \right) \quad (3.10)$$

3.5 IMAGEM DO SISTEMA COMPLETO DE ELETROPERMEALIZAÇÃO

A Figura 25 mostra o sistema completo de estudo da eletropermeabilização biológica desenvolvida neste projeto. O osciloscópio e as ponteiras de tensão e corrente foram usados para aferição do sistema com carga padrão de $205,59 \Omega$, medida com multímetro modelo MDM-8165 MINIPA.

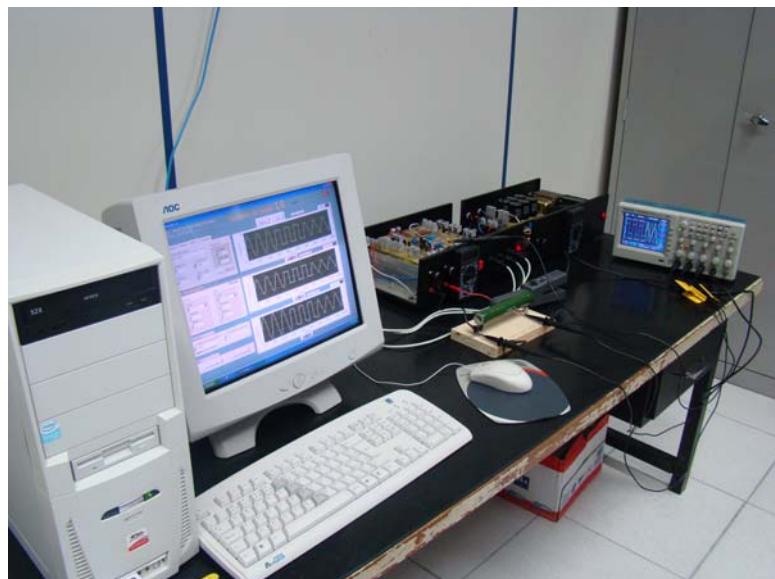


Figura 25 - Sistema de Eletropermeabilização contendo amplificador, fontes de alimentação, transdutores e sistema de geração e aquisição de sinais desenvolvidos em ambiente *LabVIEW*® para uma placa PCI-6251.

4 MÉTODOS E RESULTADOS EXPERIMENTAIS

Neste capítulo, serão apresentados os métodos usados e os resultados obtidos na avaliação do eletropermeabilizador desenvolvido. Serão avaliados o programa de comando do sistema, o ganho e resposta em freqüência do amplificador, a estabilidade térmica do amplificador e as respostas dos transdutores. Alguns resultados obtidos com solução eletrolítica padrão e com suspensão de células serão apresentados no final deste capítulo.

4.1 TESTE DO SOFTWARE

O software foi desenvolvido no ambiente de programação *LabVIEW 8.2* da *National Instruments®* e permite a geração de sinais com forma de onda arbitrária, concatenação de até três formas de ondas e geração de sinal descrito por fórmula matemática. A placa de aquisição utilizada para implementação do sistema eletrônico foi a PCI-6251, conforme descrito anteriormente. A Figura 26 apresenta a tela de usuário do aplicativo Gerador de Sinais 1.0.

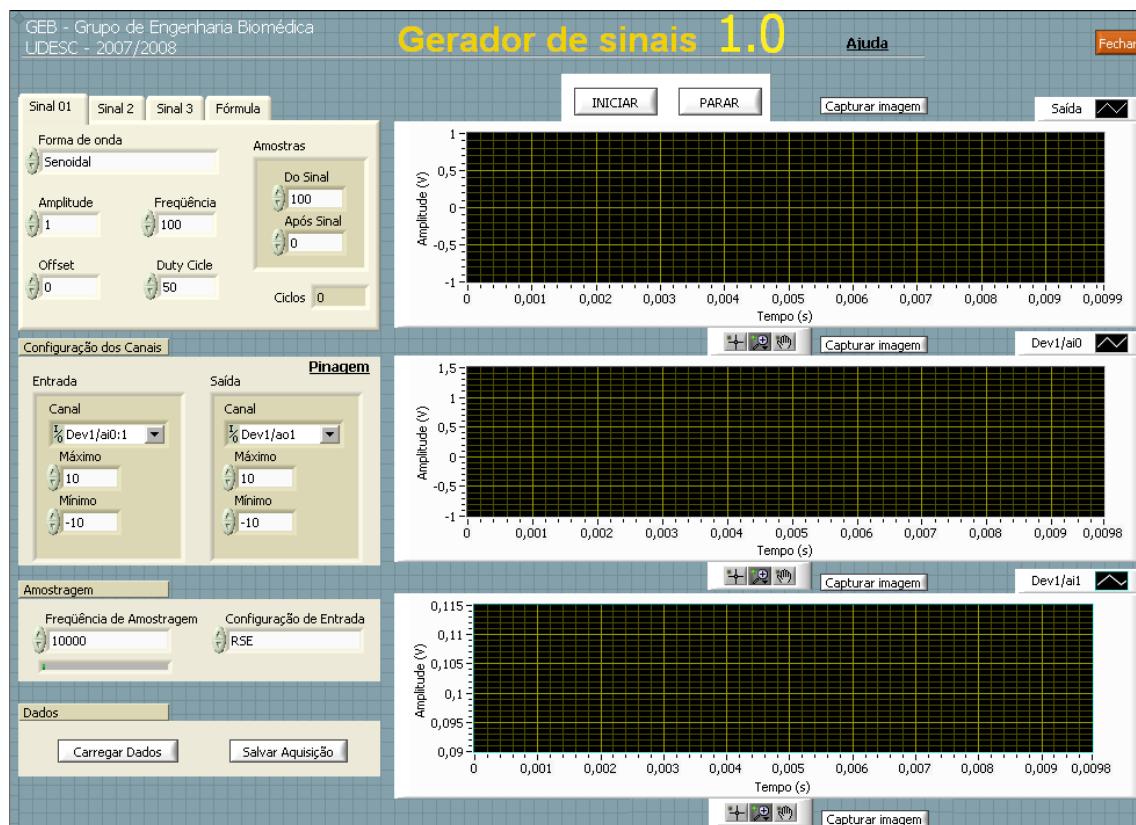


Figura 26 - Tela do usuário do aplicativo Gerador de Sinais 1.0

O software apresenta uma tela de usuário onde pode ser ajustada a forma de onda do sinal de tensão a ser gerada, sua amplitude, freqüência, *offset*, razão cíclica, número de amostras e freqüência de amostragem. Pode-se também configurar três sinais diferentes desse mesmo modo, e assim obter na saída uma sequência com três formas de onda programadas.

O programa permite ainda configurar quais entradas e saídas da placa de aquisição PCI-6251 serão usadas para acionar o eletropermeabilizador e fazer a aquisição dos sinais.

Para demonstrar as possibilidades de implementação do software, é apresentada na Figura 27 a concatenação de três formas de onda, onde o sinal 1 é uma senoide, o sinal 2 é uma onda quadrada e o sinal 3 é uma onda triangular. Para os três sinais a amplitude à 10 V, freqüência 1 kHz, número de amostras do sinal 600 e freqüência de amostragem 200 kHz. O sinal gerado após a amplificação é aplicado em uma carga resistiva de $205,59\ \Omega$,

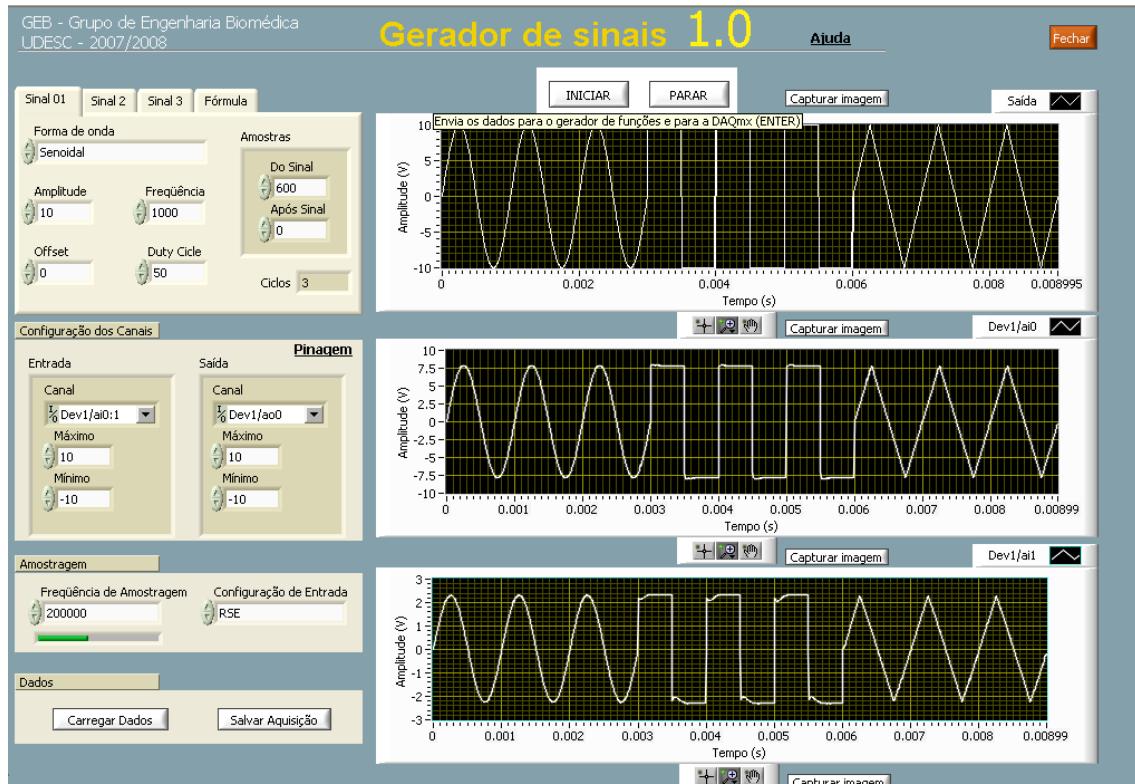


Figura 27 - Concatenação de três formas de onda, e apresentação da tela do usuário.

O gráfico “Saída” apresenta o sinal concatenado que é aplicado na carga, e o gráfico “Dev/ai0” e gráfico “Dev/ai1”, são os sinais de tensão lidos nas saídas dos transdutores de tensão e corrente, respectivamente.

O sinal gerado e os sinais adquiridos podem ser salvos no formato texto com o botão “Salvar Aquisição”. Cada configuração de um experimento realizado (forma de onda, amplitude, freqüência, número de amostras e freqüência de amostragem) é armazenada em um arquivo específico e pode ser recuperada para repetição do experimento através do botão “Carregar Dados”. As imagens de cada gráfico podem ser armazenadas em arquivo de imagem com o botão “Capturar Imagem”.

Outra possibilidade de aplicação do software é apresentada na Figura 28, onde o sinal implementado é um trem de pulsos com amplitude de 10 V. Para isso definiu-se o sinal com forma retangular, amplitude de 5 V e um offset de 5 V, freqüência de 1 kHz, freqüência de amostragem de 100 kHz, razão cíclica de 10% e 500 amostras do sinal.

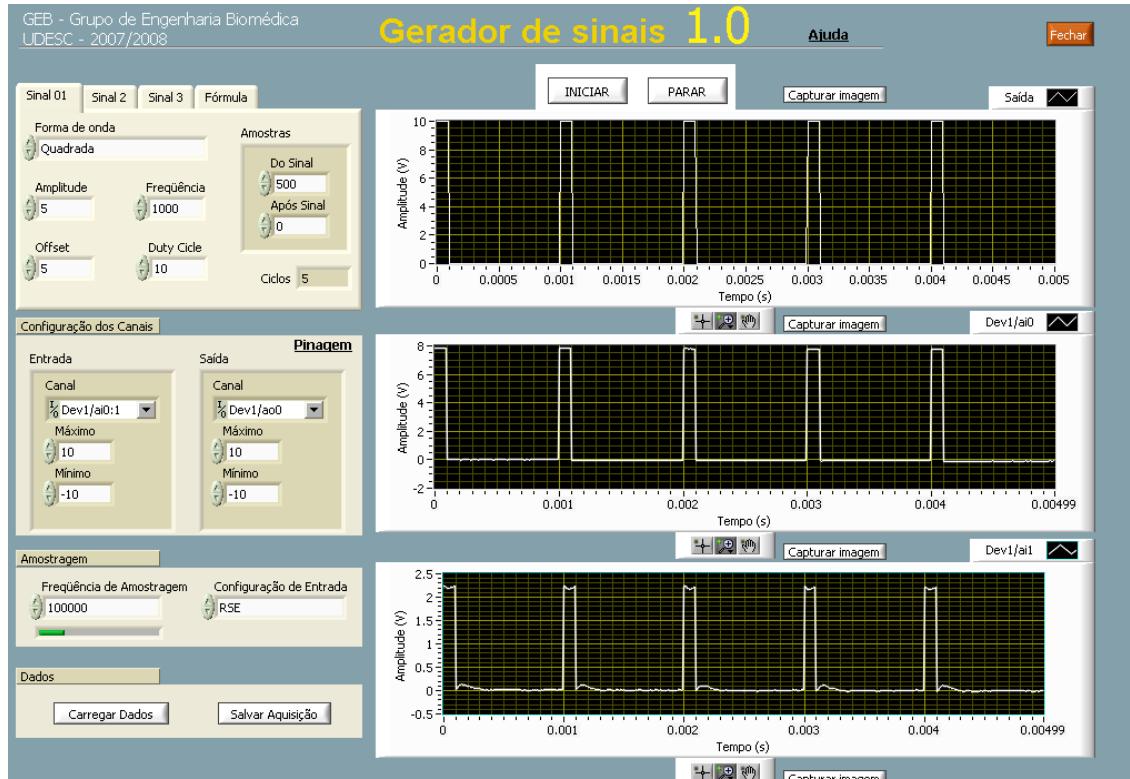


Figura 28 - Pulso de onda quadrada com razão cíclica de 10%.

Este sinal é utilizado no estudo da eletropermeabilização para verificar a persistência da permeabilização da célula, resultante de pulsos sucessivos aplicados com razão cíclica baixa.

Para a obtenção de forma de onda descrita por fórmula matemática, é necessário selecionar o ícone “Fórmula” da tela do usuário e na área “Equação” pode-se descrever qualquer equação com sintaxe similar à utilizada em *Matlab*®. A equação descrita na Figura 29, é a soma de quatro harmônicas de 1 kHz amortecidas exponencialmente com constante de atenuação 100 s^{-1} .

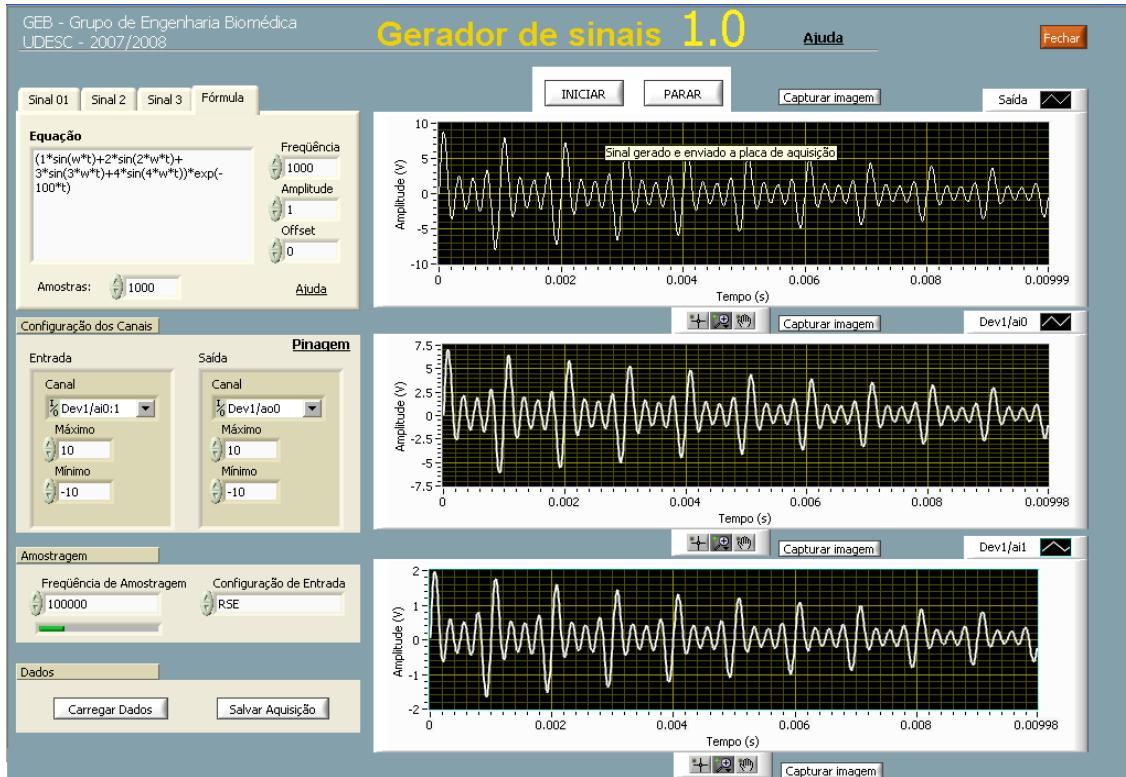


Figura 29 - Implementação de forma de onda com fórmula matemática.

4.2 TESTES DO AMPLIFICADOR

Para medir o ganho de tensão do amplificador utilizou-se o osciloscópio *Tektronics* modelo TDS2024B. O canal 1 do osciloscópio mostra o sinal aplicado na entrada V_e (ver Figura 14). A tensão na saída V_s do amplificador é medida com os canais 3 e 4 do osciloscópio (no modo de subtração), conectados nos terminais da resistência de carga.

4.2.1 Resposta no tempo ao pulso de tensão

A Figura 30, apresenta os resultados obtidos com a aplicação de um pulso retangular com amplitude 10 V e duração 50 μ s.

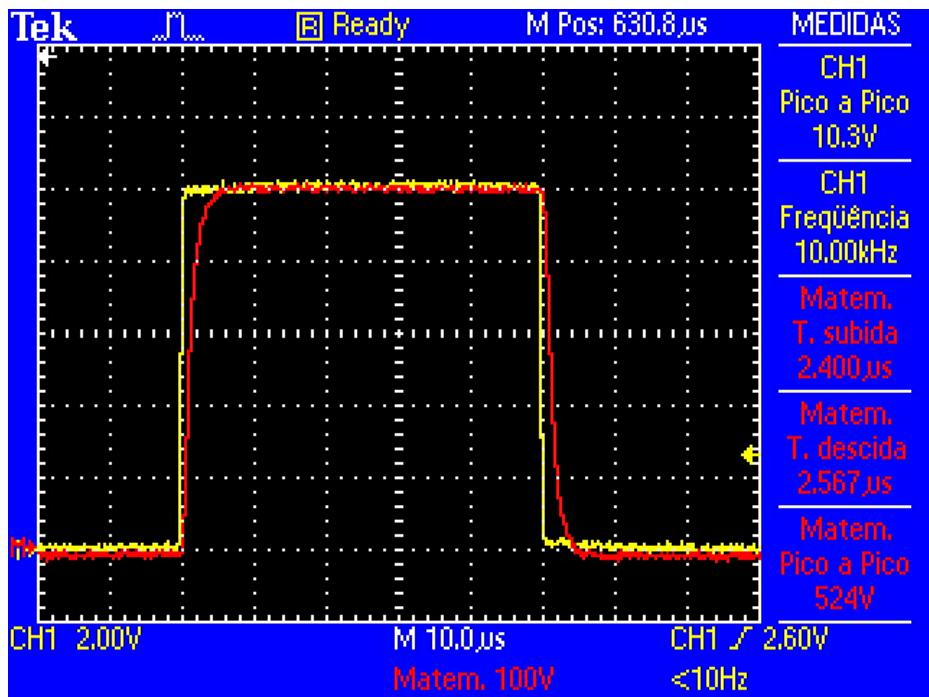


Figura 30 - Pulso retangular de 50 μ s aplicado em uma carga resistiva de 205,59 Ω . V_e em amarelo e V_s em vermelho.

Pode-se verificar pela relação do sinal de saída V_s com o sinal de entrada V_e , que o ganho do amplificador é de 50,87 V/V.

As Figuras 31 e 32 apresentam as mesmas formas de onda com escala de tempo expandida para melhor visualização dos transitórios de subida e descida do sinal na carga. Os tempos de subida e descida de 10% a 90% da tensão máxima são 1,4 μ s e 1,5 μ s respectivamente.

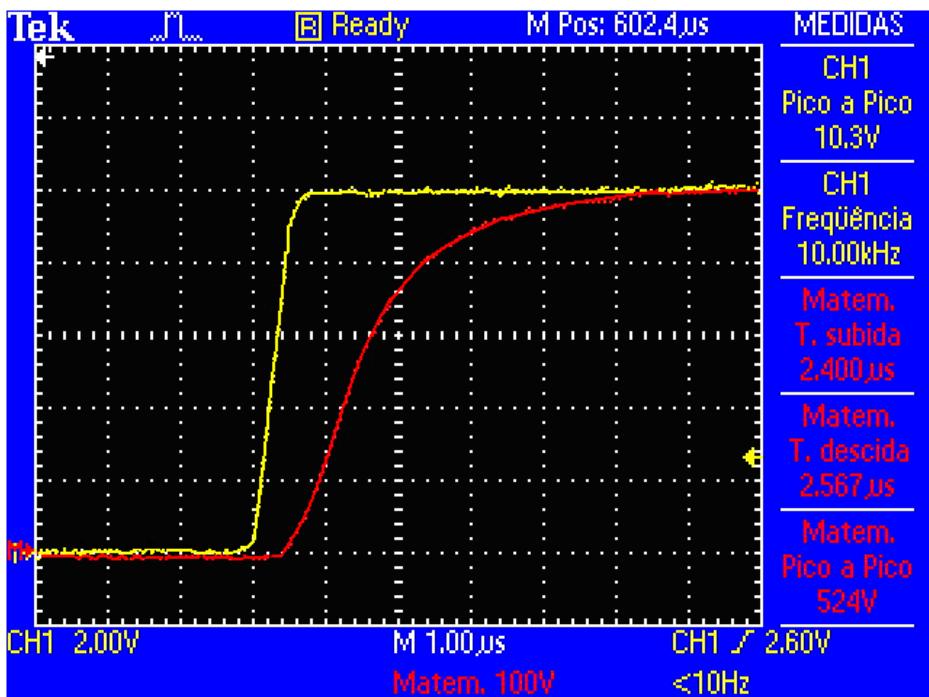


Figura 31 - Tempo de subida para pulso retangular de 50 μ s. V_e em amarelo e V_s em vermelho.

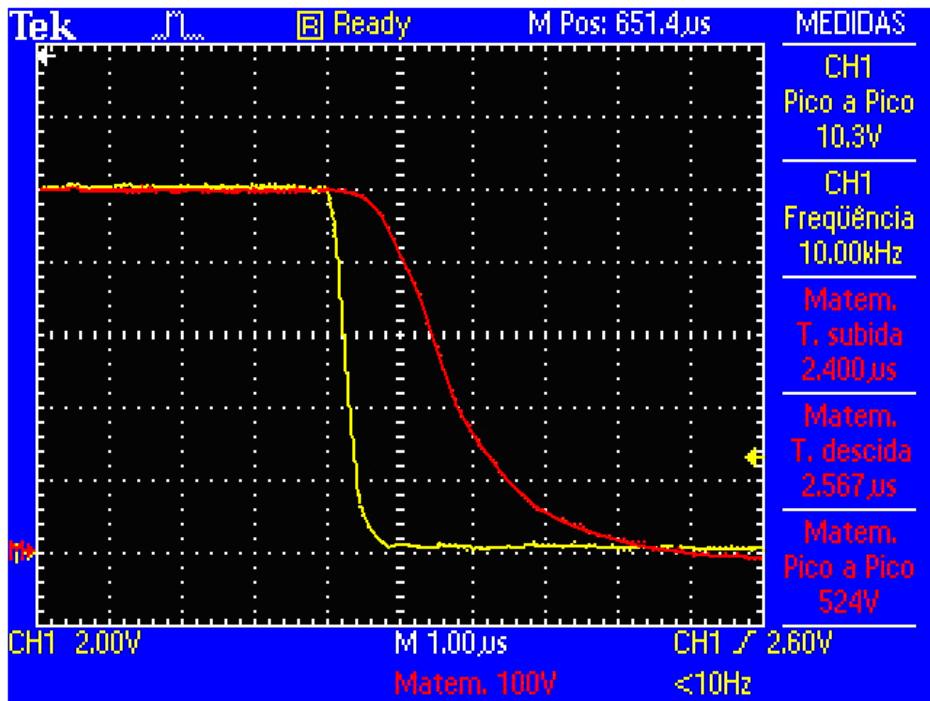


Figura 32 - Tempo de descida para pulso retangular de 50 μ s. V_e em amarelo e V_s em vermelho.

4.2.2 Resposta em freqüência para uma onda quadrada

A fim de obter a resposta em freqüência do amplificador na faixa de 1 Hz a 200 kHz, foram obtidas inicialmente as tensões de entrada e saída para excitação com onda quadrada, amplitude 10 V e duas freqüências fundamentais, 1 Hz e 1 kHz. Foram aplicados 20 períodos do sinal. No caso da onda de 1 Hz foi utilizada a freqüência de amostragem de 1 kHz e no caso da onda de 1 kHz, foi utilizada a freqüência de amostragem de 500 kHz.

A partir dos arquivos salvos das tensões de entrada $V_e(t)$ e saída $V_s(t)$, usou-se um algorítimo de cálculo de coeficientes de série exponencial de Fourier descrito pela equação (4.1):

$$\begin{aligned} C_n &= \sum_{m=1}^{N_a} V(m \cdot t_a) \cdot \exp(-j \cdot 2\pi \cdot n \cdot f_o \cdot m \cdot t_a) \\ &= \sum_{m=1}^{N_a} V_m \cdot \exp\left(-j \cdot 2\pi \cdot n \cdot m / N_a\right) \end{aligned} \quad (4.1)$$

onde, C_n é o coeficiente da n -ésima harmônica do sinal; f_o é a freqüência fundamental; N_a é o número de amostras por período; t_a é o tempo de amostragem $t_a = \frac{T_o}{N_a} = \frac{1}{N_a \cdot f_o}$; V_m é a m -ésima amostra do sinal no tempo.

O vetor de amostras por período de cada sinal usado neste cálculo foi obtido pela promediação dos 20 períodos amostrados no experimento. Foram usados 1000 amostras por período na freqüência de 1Hz e 500 amostras por período na freqüência de 1kHz.

Com estes coeficientes $C_n(V_e)$ e $C_n(V_s)$ para as tensões de entrada e saída respectivamente, o ganho de tensão no domínio da freqüência foi obtido pela equação (4.2)

:

$$A_v(f) = \frac{|C_n(V_s)|}{|C_n(V_e)|} [\angle C_n(V_s) - \angle C_n(V_e)] \quad (4.2)$$

As Figuras 33 e 34 apresentam o módulo e a fase do ganho do amplificador de 1 Hz a 200 kHz. Observa-se que a banda passante, considerando a queda de -3 dB no módulo do ganho, se estende de aproximadamente 5 Hz a 110 kHz.

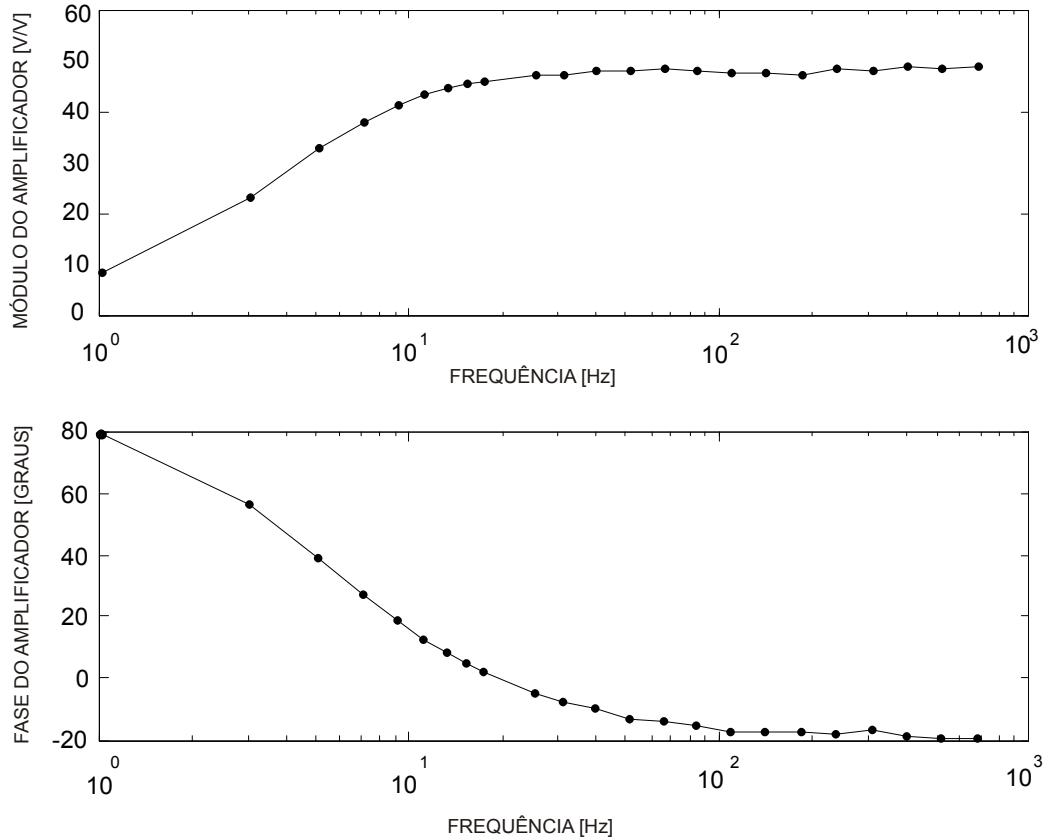


Figura 33 - Resposta em freqüência do amplificador obtida pela análise de Fourier com onda quadrada de 1Hz.

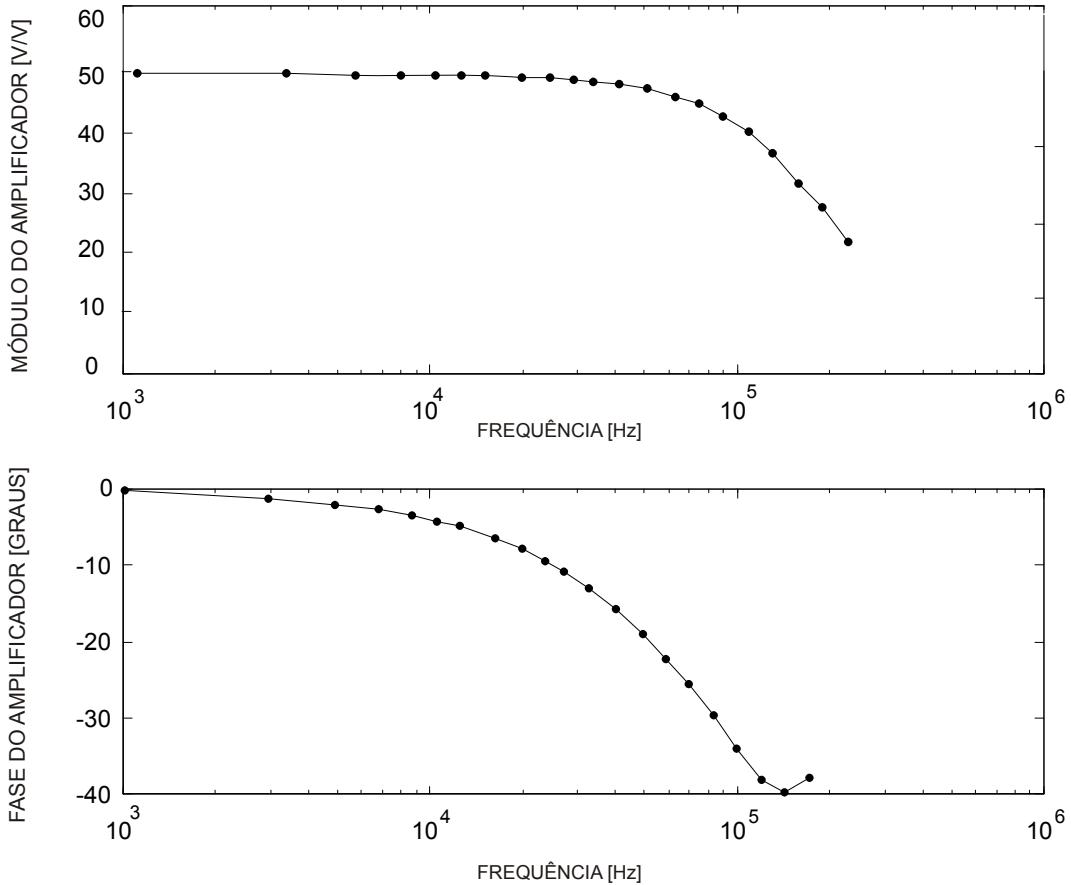


Figura 34 - Resposta em frequência do amplificador obtida pela análise de Fourier com onda quadrada de 1kHz.

4.3 ESTABILIDADE TÉRMICA

Uma vez que o Amplificador de tensão é polarizado como classe A, a sua estabilidade térmica é um importante aspecto de seu funcionamento, particularmente neste projeto, no qual a tensão V_{CB} de polarização de Q2 (ver Figura 14) é razoavelmente alta, em torno de 270 V. O aquecimento deste transistor provoca aumento da corrente de coletor e consequentemente à instabilidade térmica, ou seja, maior dissipação de potência. Contudo a presença da resistência de coletor de Q2 estabiliza termicamente a polarização deste transistor. O aumento da corrente de coletor devido ao aquecimento do transistor provoca maior queda de tensão em R1 e, com isso, diminui a tensão V_{CB} . A potência dissipada na polarização de Q2 é dada aproximadamente pela equação (4.3).

$$P = [(V_{cc} - V_B) - R1 \cdot I_c] \cdot I_c \quad (4.3)$$

Onde, V_{cc} é 300V, V_B é -270V e $R1$ é 10k Ω .

A potência máxima ocorre para $I_c = \frac{V_{cc} - V_B}{2 \cdot R1} \approx 28,5 \text{ mA}$. Mas, o transistor é polarizado com $I_c = 30 \text{ mA}$, ou seja, o ponto de operação situa-se à direita da corrente crítica, o que corresponde à região de estabilidade térmica de Q2. Se a corrente aumenta, a potência diminui. A Figura 35 mostra a variação no tempo da tensão de polarização de

coletor de Q2 obtida após ligar as fontes de alimentação do amplificador, sem a aplicação de sinal em sua entrada.

Para esta medição, foi usado o multímetro digital MINIPA modelo ET 2907, com comunicação serial para computador. Foram feitas 780 medições em intervalos de 1 segundo. Esta figura comprova a estabilidade térmica do amplificador.

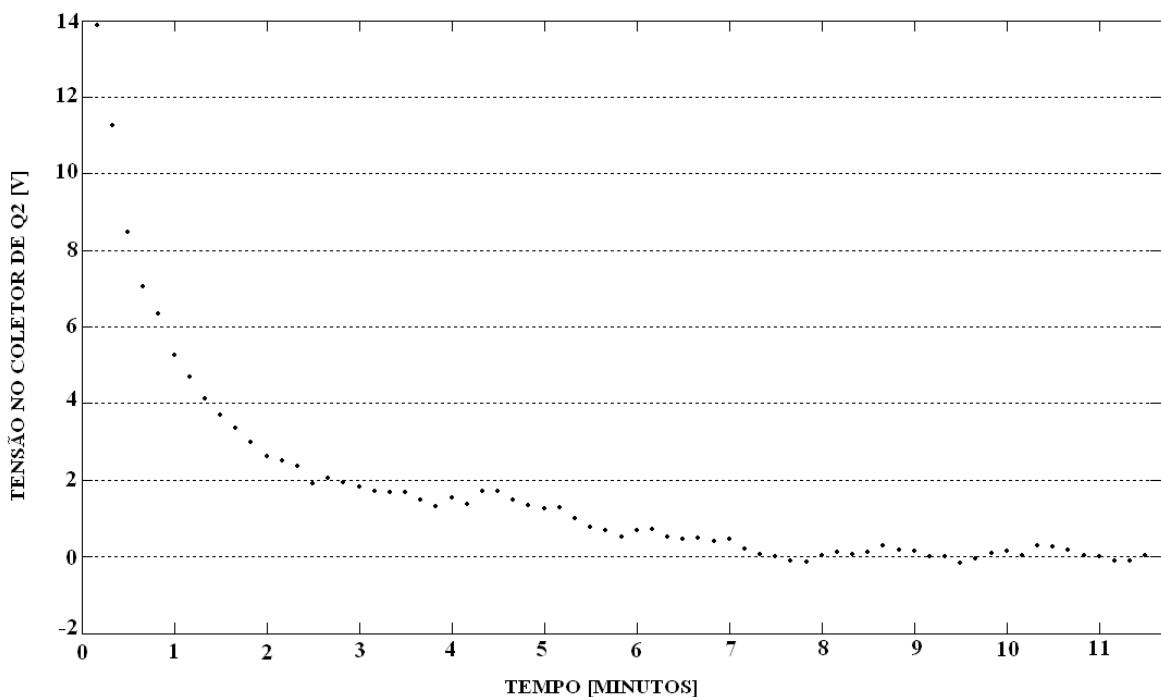


Figura 35 - Verificação da Estabilidade Térmica do Amplificador de tensão.

4.4 CURVA DE RESPOSTA DO TRANSDUTOR DE TENSÃO

A curva de resposta do transdutor de tensão foi obtida através da leitura feita com o programa do eletropermeabilizador em *LabVIEW®* e da medição do mesmo sinal na carga feita com o osciloscópio *Tektronics* modelo TDS 2024B. A carga utilizada foi à resistência de $205,59\ \Omega$ medida com o multímetro modelo MDM-8165 MINIPA. Foi usado sinal senoidal com amplitude variando de 50 a 500 V. A Figura 36 mostra os resultados obtidos.

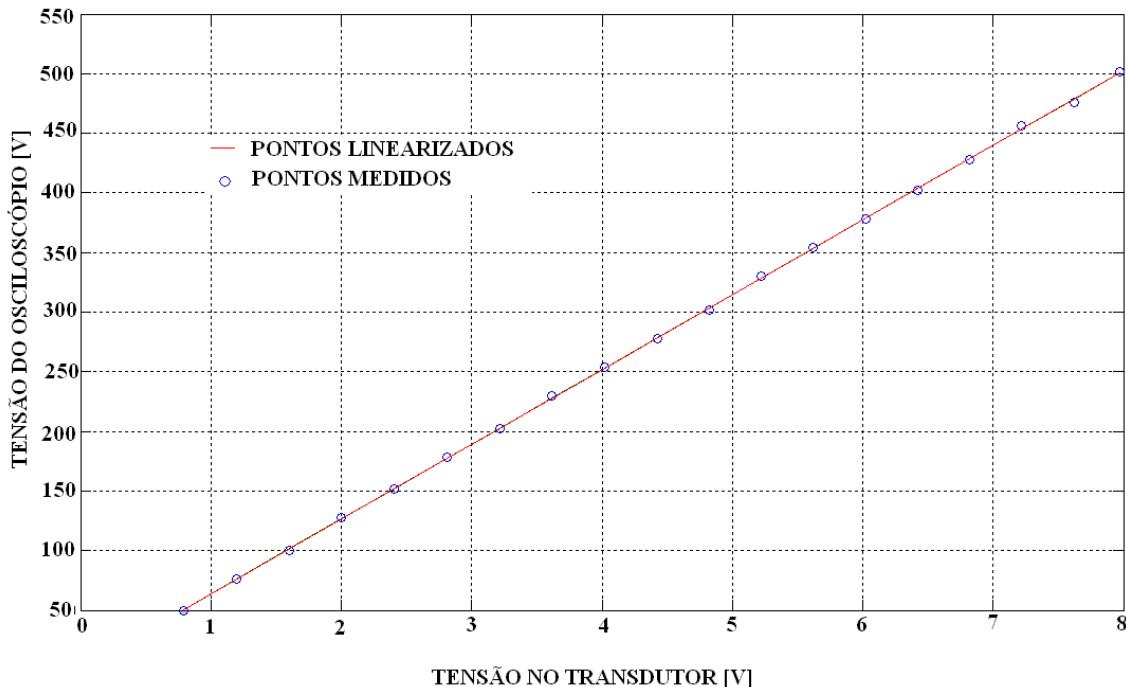


Figura 36 - Curva de resposta do transdutor de tensão

A linha contínua representa a aproximação linear obtido com o programa *polyfit* do *Matlab*[®]. Esta curva será usada para converter a tensão obtida no transdutor para o valor da tensão obtido na carga. A sua equação é dada por (4.4):

$$V_s = 62,67 \cdot V_m + 1,20 \quad [V] \quad (4.4)$$

O desvio máximo da curva de conversão do medidor em relação ao valor medido é 1,67% e ocorre na tensão de 50 V na carga. O desvio quadrático médio em relação ao fundo de escala de 500 V é 0,69%.

4.5 CURVA DE RESPOSTA DO TRANSDUTOR DE CORRENTE

A curva de resposta do transdutor de corrente foi obtida para a carga de 205,59 Ω, fazendo-se a leitura do transdutor com o programa do eletropermeabilizador em *LabVIEW*[®] e medindo a corrente com a ponteira de corrente *Fluke 80i-110S* conectada ao osciloscópio *Tektronics* modelo TDS 2024B. Foi usado onda senoidal de 1 kHz e 10 kHz, com amplitude variando de 50 a 500 V. A Figura 37 mostra as curvas obtidas. As linhas contínuas representam as aproximações lineares obtidas com o programa *polyfit* do *Matlab*[®]. Essas curvas são descritas pelas seguintes equações (4.5) e (4.6) a seguir:

- Para onda senoidal de 1 kHz:

$$I_s = 1,0399 \cdot I_e + 0,0490 \quad [A] \quad (4.5)$$

- Para onda senoidal de 10 kHz:

$$I_s = 1,0254 \cdot I_e + 0,0598 \quad [A] \quad (4.6)$$

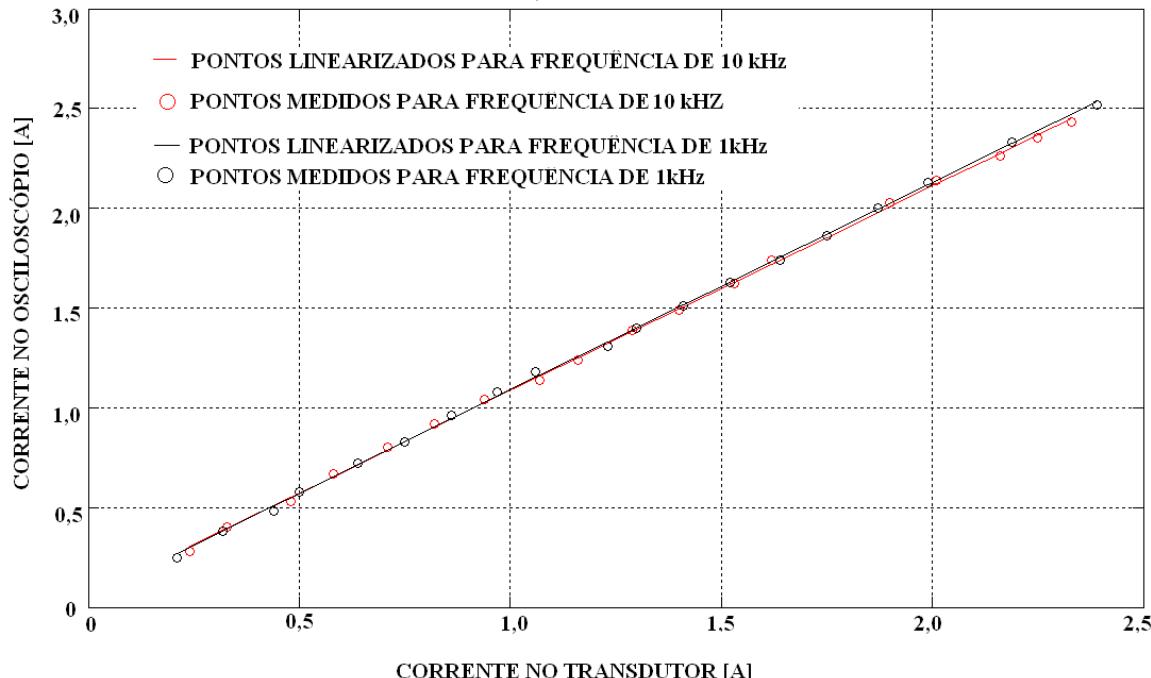


Figura 37 - Curva de resposta do transdutor de corrente. Curva em cor preta para freqüência de 1 kHz e curva em vermelho para freqüência de 10 kHz.

Para a curva de 1 kHz, o erro máximo é de 6,95% em 250 mA e o desvio quadrático médio em relação ao fundo de escala de 2,5 A é 2,06%. Para a curva de 10 kHz o erro máximo é de 9,25% em 280 mA e o desvio quadrático médio é 2,57% para o mesmo fundo de escala.

4.6 EXPERIMENTO COM MATERIAL BIOLÓGICO

Os experimentos com solução eletrolítica e material biológico foram realizados no Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina (CCB-UFSC), seguindo as recomendações éticas do Conselho Federal de Medicina Veterinária e Colégio Brasileiro de Experimentação Animal de acordo com o registro no Comitê de Ética PP00187/CEUA/UFSC.

4.6.1 Preparação das amostras e Estrutura de teste

As amostras de material biológico foram obtidas a partir de sangue de rato da espécie *Rattus Norvegicus*. Após retirado do animal, o sangue foi centrifugado a 3000 RPM durante quatro minutos a 24 °C (Eppendorf modelo 5451R). Após isso, o plasma foi retirado e as hemárias foram diluídas em solução eletrolítica isotônica Kbr com a seguinte composição: 13 mM de NaCl, 150 mM de sacarose, NaOH 14mM e pH de 7,4. Esta suspensão foi centrifugada nas mesmas condições anteriores e após drenar o plasma resultante diluído, as hemárias foram novamente resuspensas em solução Kbr. A concentração de células na suspensão foi obtida pela contagem de células em Câmara de Neubauer. A fração volumétrica obtida foi 0,19. A condutividade da solução Kbr foi medida com condutivímetro Metrohm modelo 712, sendo obtido o valor de 3,67 mS/cm.

A Figura 38 mostra o sistema de eletrodos usado na estimulação elétrica da amostra. Os eletrodos são de aço inoxidável e são separados por um distanciador de acrílico.

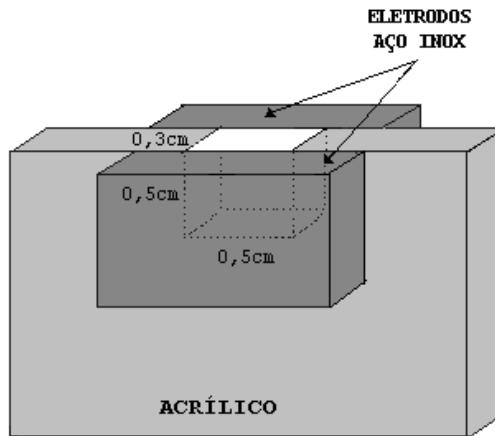


Figura 38 - Sistema de Eletrodos utilizado nos experimentos

A área dos eletrodos foi ajustada em $0,25 \text{ cm}^2$ e a espessura do separador em 0,3 cm. Para isso, usou-se um paquímetro Mitutoyo 150 mm. A relação entre a condutância da amostra e a sua condutividade é dada pela equação (4.7):

$$G = \frac{I_L}{V_L} = \sigma \cdot \frac{A}{d} = \frac{\sigma}{1,2} \quad (4.7)$$

onde, V_L é a tensão medida nos terminais de saída do eletropermeabilizador; I_L é a corrente medida na saída do eletropermeabilizador; σ é a condutividade da amostra em S/cm; A é a área dos contatos dos eletrodos com a amostra; d é a separação entre os eletrodos

Os experimentos foram realizados após 48 horas da coleta do sangue na temperatura ambiente de 24 °C. Durante o intervalo de tempo entre a preparação da suspensão de células e o experimento de eletropermeabilização, o material biológico foi mantido sob refrigeração na temperatura de 15 °C.

4.6.2 Resultados

Inicialmente foi realizada uma série de 5 medições apenas com a solução Kbr a fim de aferir o sistema de medição do eletropermeabilizador. Para isso, em cada medição foi aplicado um pulso retangular de 100 V, com duração de 500 μs e freqüência de amostragem de 100 kHz e foi medida a tensão e a corrente na carga. A Figura 39 mostra as formas de onda adquiridas em uma das medições.

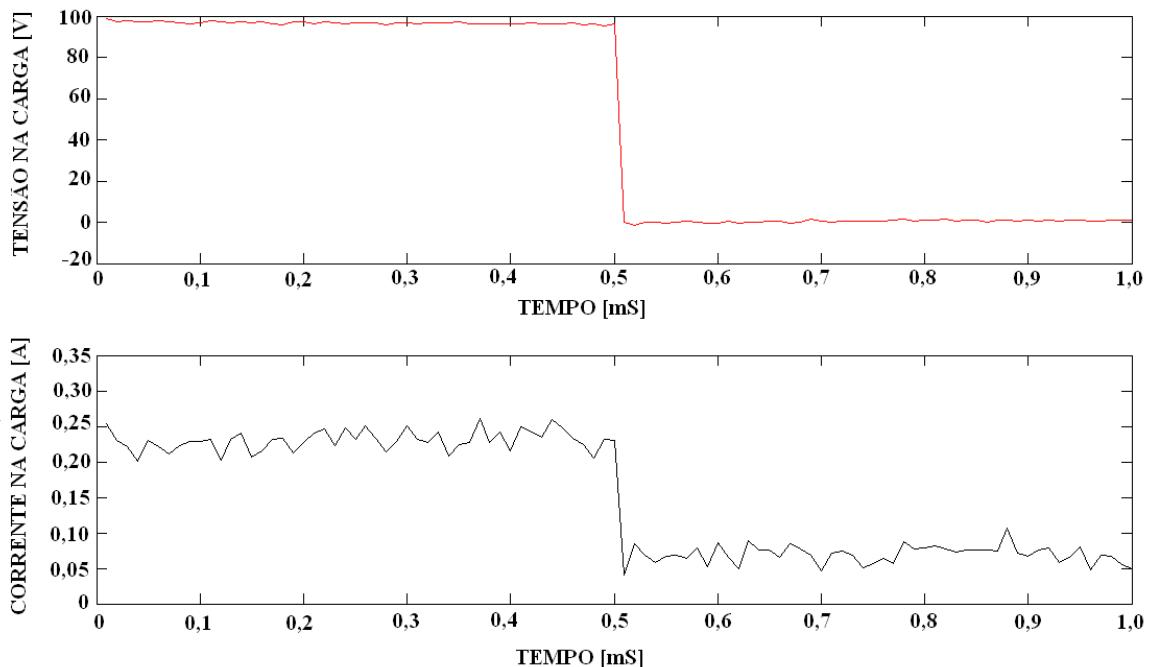


Figura 39 - Formas de onda na Carga obtidas para a solução Kbr. Pulso com 100V e 500μs

Após cada aplicação, foi feita a limpeza dos eletrodos para eliminação da camada eletrodepositada. A média dos cinco valores de condutância obtidos foi de 2,96 mS. Usando a condutividade da solução obtida com condutivímetro na equação(4.7) obtém-se o valor de referência de 3,06 mS. O erro em relação a essa referência é de 3,3%.

O experimento com suspensão de hemácias foi feito com a forma de onda de tensão mostrada na Figura 40. A tensão aplicada é formada pela concatenação de três pulsos: 100 V durante 1 ms; 500 V durante 250 μs; e 100 V durante 1 ms.

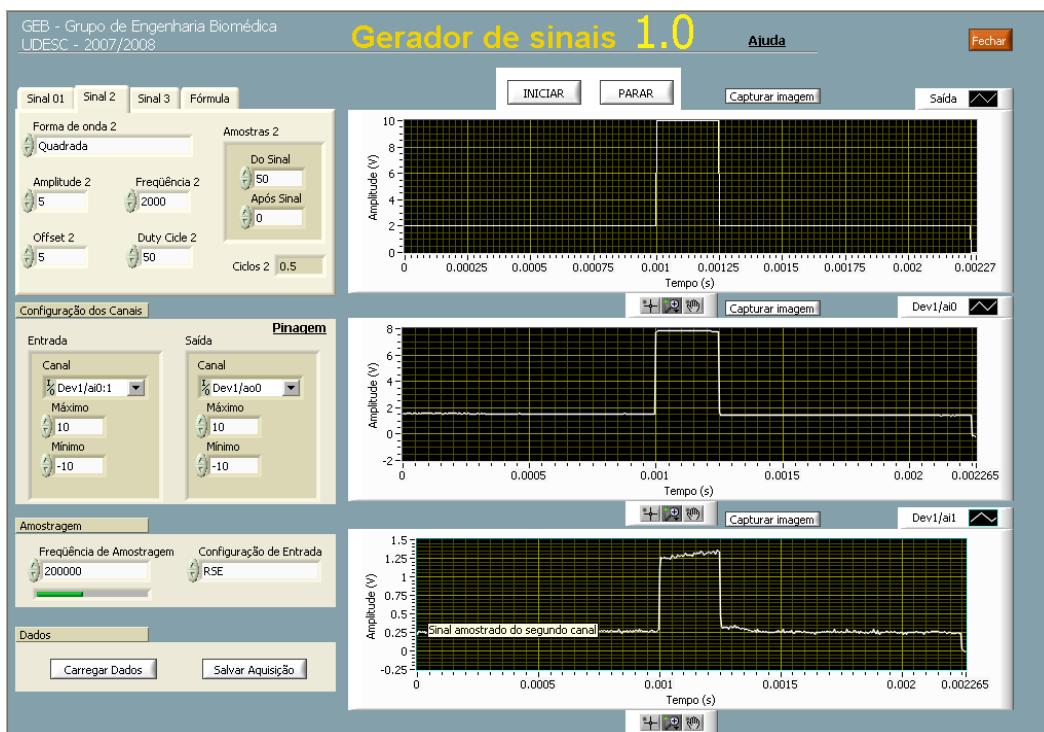


Figura 40 - Tela do usuário com pulso retangular aplicado na solução com material biológico.

O pulso de 500 V é responsável pela Eletropermeabilização das células. Os pulsos de 100 V servem para medir a condutividade da amostra antes e após a eletropermeabilização.

A forma de onda da corrente nesta figura apresenta uma inclinação positiva durante o tempo de aplicação do pulso de eletropermeabilização. Isto indica que a condutância da amostra está aumentando durante esse intervalo de tempo, o que significa que a eletropermeabilização realmente ocorre nas condições desse experimento. A Figura 41 mostra os gráficos de tensão e corrente na amostra durante o pulso de eletropermeabilização após filtragem digital em *Matlab*[®] com filtro Butterworth de segunda ordem com freqüência de corte de 20 kHz.

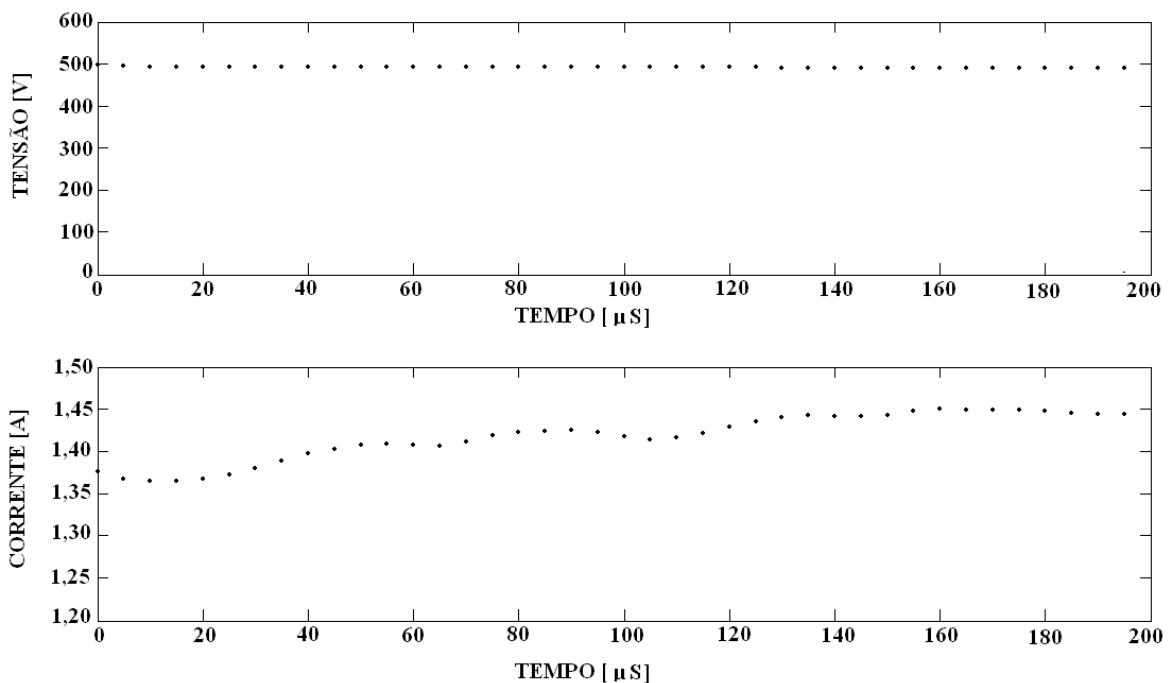


Figura 41 - Comportamento da tensão e corrente na carga durante a aplicação do pulso de eletropermeabilização.

Esta filtragem é necessária para reduzir a interferência nas formas de onda causadas pelo ruído de quantização do sistema de aquisição de dados e interferência eletromagnética do próprio amplificador nos transdutores do eletropermeabilizador. A Figura 42 mostra o comportamento da condutividade da amostra obtida usando-se a equação (4.7), durante o pulso de eletropermeabilização.

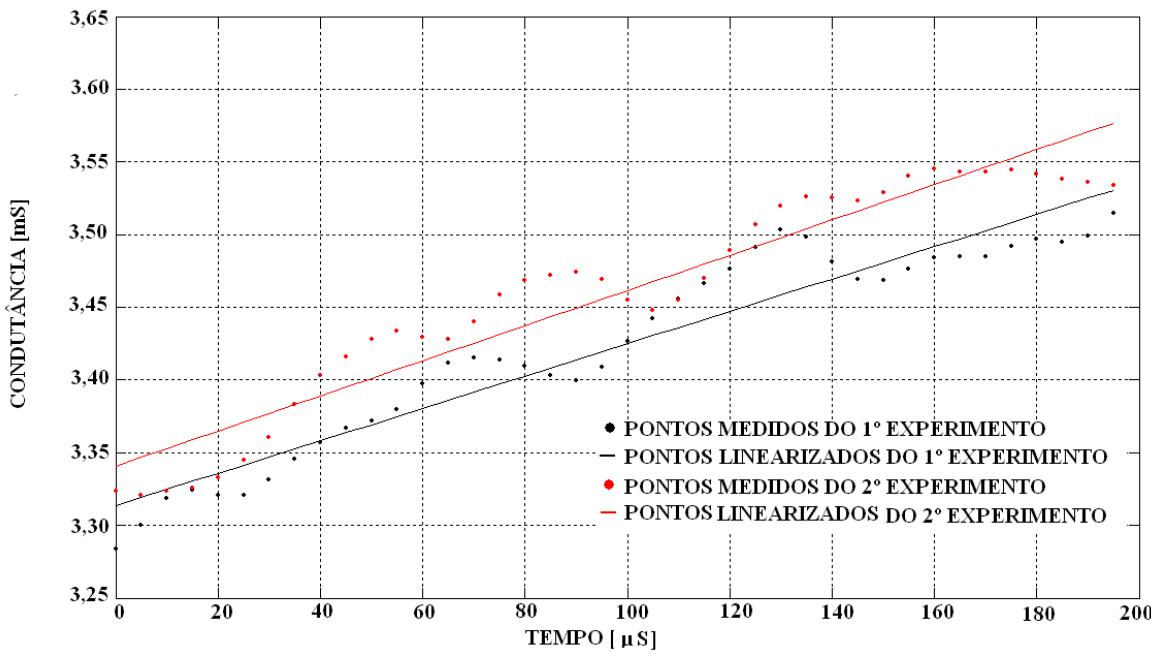


Figura 42 - Comportamento da Condutividade da amostra

Os dois resultados apresentados correspondem a dois experimentos de eletropermeabilização realizados com suspensão de hemárias consecutivamente nas mesmas condições de teste. As linhas retas correspondem à interpolação linear obtida com a função polyfit do programa *Matlab*®. Verifica-se claramente a tendência de aumento da condutividade da suspensão de células em decorrência do fenômeno de eletropermeabilização. Usando o resultado da interpolação e tomando-se a média das duas curvas mostradas. Verifica-se que a condutividade aumenta com taxa de aproximadamente 1,1 S/cm/s e que no intervalo de 200 μ s a variação de condutividade da amostra é de 6,8%.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi apresentado o projeto, construção e teste de um eletropermeabilizador de células biológicas. Os requisitos de projeto foram estabelecidos de modo que o equipamento apresente versatilidade e desempenho adequados para a realização de pesquisas de caracterização da eletropermeabilização de células e tecidos biológicos. O amplificador de tensão foi projetado em classe A para obter máxima linearidade. A estrutura cascode desse estágio permitiu obter máxima banda passante considerando as limitações dos transistores de potência utilizados. O estágio de saída classe AB *push-pull* apresenta alta impedância de entrada e opera com níveis elevados de tensão e corrente.

O desempenho do amplificador e das fontes de alimentação atendeu as exigências propostas neste trabalho. O equipamento pode fornecer até 500 V de tensão com até 5 A de corrente. Apresenta banda passante pouco maior que 100 kHz e tempos de resposta para pulsos retangulares de tensão da ordem de 1 μ s. Os transdutores de tensão e corrente desenvolvidos e utilizados neste projeto permitiram a medição da condutividade da amostra com precisão da ordem de 3,3%.

Outra característica importante deste projeto é o desenvolvimento do gerador de formas de onda programadas que permite implementar diferentes protocolos de testes.

No experimento de eletropermeabilização de células de rato suspensas em eletrólito demonstra que o equipamento desenvolvido neste projeto pode fornecer os níveis adequados de tensão e corrente e apresenta resolução e sensibilidade adequadas para a detecção das variações de condutividade que ocorrem em materiais biológicos durante o evento de eletropermeabilização.

Pode ser concluído que o eletropermeabilizador desenvolvido neste projeto é um equipamento versátil e apresenta o desempenho adequado para aplicação em pesquisas da eletropermeabilização biológica.

Os trabalhos futuros envolverão o uso do eletropermeabilizador na caracterização da eletropermeabilização de diferentes células animais e humanas, visando obter subsídios para a modelagem teórica deste fenômeno ainda não totalmente compreendido.

Outra aplicação futura de grande interesse é a eletroquimioterapia de tumores com diferentes intensidades, formas de onda e freqüências do campo aplicado, visando caracterizar as condições de estimulação que otimizam o efeito terapêutico dessa técnica.

6 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ANDRÉ, F.M.; GEHL, J.; SERŠA, G.; PRÉAT, V.; HOJMAN, P.; ERIKSEN, J.; GOLZIO, M.; ČEMAŽAR, M.; PAVSELJ, N.; Rols, M. P.; MIKLAVČIČ, D.; NEUMANN, E.; TEISSIÉ, J.; MIR, L.M. **Efficiency of High- and Low-Voltage Pulse Combinations for Gene Electrotransfer in Muscle, Liver, Tumor, and Skin.** Human Gene Therapy 19, p. 1261-1271, 2008.
- BANGA, A. K.; BOSE, S.; AND GHOSH, T. K. **Iontophoresis and electroporation: comparisons and contrasts.** Int. J. Pharmaceut. 179, p.1-19, 1999.
- BETTAN, M.; IVANOV, M. A.; MIR, L. M.; BOISSIERE, F.; DELAERE, P.; AND SCHERMAN, D. **Efficient DNA electrotransfer into tumors.** Bioelectrochemistry 52, p.83-90, 2000.
- CHANG, D. C.; GAO, P. Q. AND MAXWELL, B. L. **High efficiency gene transfection by electroporation using a radio frequency electric field.** Biochim. Biophys. Acta 1991, p.153-160, 1992.
- FERBER, D. **Gene therapy: safer and virus-free?** . Science 294, p. 1638–1642, 2001.
- GRASSO, R. J.; HELLER, R.; COOLEY, J. C. AND HALLER, E. M. **Electrofusion of individual animal cells directly to intact corneal epithelial tissue.** Biochim. Biophys. Acta 980, p.9-14, 1989.
- KINOSITA, K.; TSONG, T.Y. **Formation and resealing of pores of controlled sizes in human erythrocyte membrane.** Nature 268, p. 438–441, 1977.
- LEE, W. T.; SHIMIZU, K.; KURIYAMA, H.; TANAKA, H.; KJAERGAARD, J. AND SHU, S. **Tumor-dendritic cell fusion as a basis for cancer immunotherapy.** Otolaryngol. Head Neck Surg. 132, p.755-764, 2005.
- LEM - Data Sheet LTSP 25 –NP. Disponível em:
http://www.lem.com/hq/en/component/option,com_catalog/task,displaymodel/id,90.C3.19.000.0. Acesso em: 23 de agos. de 2008, 18:30:23.
- MEKID, H.; AND MIR, L. M. **In vivo cell electrofusion.** Biochim. Biophys. Acta 1524, p.118-130, 2000.
- MIKLAVČIČ, D.; PUC, M. **Electroporation.** In: Wiley Encyclopedia of Biomedical Engineering. New York. John Wiley & Sons Inc., p. 1-11, 2006.
- MIR, L. M.; BANOUN, H. AND PAOLETTI, C. **Introduction of definite amounts of nonpermeant molecules into living cells after electroporabilization: direct access to the cytosol.** Exp. Cell Res. 175, p.15-25, 1988.
- MIR, L. M.; BUREAU, M. F.; GEHL , J.; RANGARA, R.; ROUY , D.; CAILLAUD , J. M.; DELAERE , P.; BRANELLEC, D.; SCHWARTZ, B.; AND SCHERMAN , D. **High-**

efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. Proc. Natl. Acad. Sci. 96, p.4262-4267, 1999.

MOUNEIMNE, Y.; TOSI, P. F.; GAZITT, Y. AND NICOLAU, C. **Electroinsertion of xeno-glycophorin into the red blood cell membrane.** Biochem. Biophys. Res. Commun. 159, p.34-40, 1989.

NATIONAL INSTRUMENTS - Data Sheet Placa PCI -6251. Disponível em: <http://sine.ni.com/nips/cds/view/p/lang/en/nid/14124>. Acesso em: 20 de jan. de 2009, 15:12:54.

NEUMANN, E.; ROSENHECK K. **Permeability changes induced by electric impulses in vesicular membranes.** J. Membr. Biol. 10, p. 279-290, 1972.

NEUMANN, E.; RIDDER, M. S.; WANG, Y. AND HOF SCHNEIDER P. H. **Gene transfer into mouse lyoma cells by electroporation in high electric fields.** EMBO J.1, p. 841-845, 1982.

NEUMANN, E.; SOWERS, A.E.; JORDAN C.A. **Electroporation and Electrofusion in Cell Biology.** Plenum; New York, 1999.

OKINO, M.; MOHRI H. **Effects of high-voltage electrical impulse and an anticancer drug on in vivo growing tumors.** Jap. J. Cancer Res. 78, p. 1319-1321, 1987.

ON SEMICONDUCTOR - Data Sheet MJE 13007. Disponível em: <http://www.onsemi.com/PowerSolutions/product.do?id=MJE13007>. Acesso em: 18 de agos. de 2008, 13:35:45.

ON SEMICONDUCTOR - - Data Sheet MJW 3281A e MJW1302A. Disponível em: <http://www.onsemi.com/PowerSolutions/product.do?id=MJW1302A>. Acesso em: 18 de agos. de 2008, 14:25:25.

PAVLIN, M.; MIKLAVČIČ, D. **Theoretical and experimental analysis of conductivity, ion diffusion and molecular transport during cell electroporation - Relation between short-lived and long-lived pores.** Bioelectrochemistry 74, p.38-46, 2008.

PILWAT, G.; RICHTER, H. P.; AND ZIMMERMANN, U. **Giant culture cells by electric field-induced fusion.** FEBS Lett.133, p.169-174, 1981.

PLIQUETT, U. AND GUSBETH, C. **Surface area involved in transdermal transport of charged species due to skin electroporation.** Bioelectrochemistry 65, p.27-32, 2004.

PUC, M.; ČOROVIČ, S.; FISAR, K.; PETKOVŠEK, M.; NASTRAN, J.; MIKLAVČIČ, D. **Techniques of signal generation required for electroporation. Survey of electroporation devices.** Bioelectrochemistry 64, p.113- 124, 2004.

PUCIHAR, G.; KOTNIK, T.; VALIČ, B.; MIKLAVČIČ, D. **Numerical Determination of Transmembrane Voltage Induced on Irregularly Shaped Cells.** Annals of Biomedical Engineering, Vol. 34, No. 4, p. 642-652, 2006.

ROLS, M.P.; TESSIE, J. **Electropermeabilization of mammalian cells to macromolecules: control by pulse duration.** *Biophys.J.* 75, p. 1415-1423, 1998.

ŠATKAUSKAS, S.; BUREAU, M. F.; PUC, M.; MAHFOUDI, A.; SCHERMAN, D.; MIKLAVČIČ, D.; AND MIR, L. M. **Mechanisms of in vivo DNA electrotransfer: respective contributions of cell electropermeabilization and DNA electrophoresis.** *Molec. Ther.* 5, p.133-140, 2002.

SCOTT-TAYLOR, T. H.; PETTENGELL, R.; CLARKE, I.; STUHLER, G.; LA BARTHE, M. C.; WALDEN, P.; AND DALGLEISH, A. G. **Human tumour and dendritic cell hybrids generated by electrofusion: potential for cancer vaccines.** *Biochim. Biophys. Acta* 1500, p.265-267, 2000.

SEMIKRON - Disponível em: <http://www.semikron.com/internet/ds.jsp?file=913.html>. Acesso em: 18 de agos. de 2008, 19:15:55.

SERŠA, G.; ČEMAŽAR, M.; MIKLAVČIČ, D.; RUDOLF, Z. **Electrochemotherapy of tumours, Review.** *Radiol Oncol* 40, p. 163-174, 2006.

SERŠA, G.; ČEMAŽAR, M.; ŠEMROV , D. AND MIKLAVČIČ, D. **Changing electrode orientation improves the efficacy of electrochemotherapy of solid tumors in mice.** *Bioelectrochem. Bioenerg.* 39, p.61-66, 1996.

SERŠA, G.; MIKLAVČIČ, D.; ČEMAŽAR, M.; RUDOLF, Z.; PUCIHAR, G.; SNOJ, M. **Electrochemotherapy in treatment of tumours.** *Journal of Cancer Surgery EJSO* 34, p.232-240, 2008.

ST MICROELECTRONICS - Data Sheet MJE 340 e 350. Disponível em: <http://www.st.com/stonline/stappl/productcatalog/app?path=pages/stcom/PcStComPartNumberSearch.searchPartNumber&search=mje340>. Acesso em: 18 de agos. de 2008, 15:45:15.

TEISSIÉ, J. **Transfer of foreign receptors to living cell surfaces: the bioelectrochemical approach.** *Bioelectrochem. Bioenerg.* 46, p.115-120, 1998.

TEISSIÉ, J.; REYNAUD, J. A.; AND NICOLAU, C. **Electric-field-induced morphological alternations and fusion of hepatocytes.** *Bioelectrochem. Bioenerg.* 17, p.8-15, 1986.

TEISSIÉ, J.; ESCOFFRE, J. M.; ROLS, M. P.; GOLZIO, M. **Time dependence of electric field effects on cell membranes. A review for a critical selection of pulse duration for therapeutical applications.** *Radiol Oncol* 42, p.196-206, 2008.

TESSIÉ, J.; EYNARD, N.; GABRIEL, B.; ROLS, M.P. **Electropermeabilization of cell membranes.** *Adv.Drug Deliv. Rev.* 35, p. 3-19, 1999.

TESSIÉ, J.; EYNARD, N.; VERNHES, M. C.; BENICHOU, A.; GANEVA , V.; GALUTZOV, B.; AND CABANES, P. A. **Recent biotechnological developments of electropulsation. A prospective review.** *Bioelectrochemistry* 55 p.107-112, 2002.

TEXAS INSTRUMENTS - Data Sheet INA 111BP. Disponível em:
<http://focus.ti.com/docs/prod/folders/print/ina111.html>. Acesso em: 21 de agos. de 2008, 21:20:50.

UEMURA, K. AND ISOBE, S. **Developing a new apparatus for inactivating Escherichia coli in saline water with high electric field AC.** J. Food Eng. 53, p. 203-207, 2002.

WOLF, H.; ROLS, M. P.; BOLDT, E.; NEUMANN, E. AND TEISSIÉ, J. **Control by pulse parameters of electric field-mediated gene transfer in mammalian cells.** Biophys. J. 66, p.524-531, 1994.

ZEIRA, M.; TOSI, P. F.; MOUNEIMNE, Y.; LAZARTE, J.; SNEED, L.; VOLSKY, D. J.; NICOLAU, C. **Full-length CD4 electroinserted in the erythrocyte membrane as a long-lived inhibitor of infection by human immunodeficiency virus.** Proc. Nat. Acad. Sci. 88, p.4409-4413, 1991.

ŽUPANIČ, A.; RIBARIČ, S.; MIKLAVČIČ, D. **Increasing the repetition frequency of electric pulse delivery reduces unpleasant sensations that occur in electrochemotherapy.** Neoplasma 54 p. 3, 2007.