

DETERMINACIÓN DE COEFICIENTES DE TRANSFERENCIA DE CALOR EN SISTEMAS BIOLÓGICOS DURANTE EL ENFRIAMIENTO EN NITRÓGENO LÍQUIDO CONSIDERANDO RÉGIMENES DE EBULLICIÓN EN FILM Y NUCLEADA

Santos, M. V.^{1,3}; Sansinena, M.²; Chirife, J.² y Zaritzky, N. E.^{1,3}

¹ Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos-Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, CONICET, 116 y 47, La Plata (CP 1900).

² Facultad de Ciencias Agrarias, Pontificia Universidad Católica Argentina, Cap. Gral. Ramón Freire 183, (1426), Buenos Aires.

³ Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, UNLP, 47 y 115.

mvsantosd@gmail.com

Resumen. El proceso de criopreservación consiste en reducir la temperatura de la muestra hasta alcanzar el punto de estabilidad biológica. En particular la medición experimental de la curva temperatura versus tiempo es fundamental para el cálculo de velocidades de enfriamiento y para detectar si la muestra ha sido vitrificada o si ha sufrido un proceso de cambio de fase (congelación) en la cual se forman cristales de hielo. Cuando un objeto se sumerge en Nitrógeno Líquido (LN2) entra en un régimen de ebullición en film debido a las grandes diferencias de temperatura entre el objeto y el LN2 (ΔT). Este fenómeno ocurre debido a que el flujo de calor desde el objeto hacia el LN2 provoca la evaporación del nitrógeno en la cercanía del dispositivo generándose una capa de vapor aislante que retarda la transferencia de energía. Este fenómeno se lo conoce como efecto "Leidenfrost". Las curvas de flujo calórico versus ΔT (curvas de ebullición) para dispositivos empleados en criobiología no son frecuentes en la literatura; además dada las pequeñas dimensiones de los objetos existen limitaciones para la medición experimental de la temperatura versus tiempo. El conocimiento de esta información permite determinar los coeficientes de transferencia de calor que gobiernan el proceso de enfriamiento: ebullición en film, transición y nucleada. Para predecir los coeficientes de transferencia de calor es necesario modelar matemáticamente las ecuaciones diferenciales a derivadas parciales de la transferencia de energía aplicando condiciones de borde convectivas. En el presente trabajo se estimaron los coeficientes de transferencia de calor y las curvas de ebullición durante el enfriamiento de pajuelas plásticas conteniendo hielo (a temperaturas iniciales entre -2°C a -9°C) cuando se sumergían las muestras en LN2. Estos experimentos lograron detectar dos etapas en el proceso de ebullición, produciéndose primero ebullición en film y luego una transición a ebullición nucleada. Se utilizó un programa en elementos finitos mediante el software COMSOL para la predicción de la curva de temperatura versus tiempo que permitió estimar los coeficientes de transferencia de calor en cada régimen de ebullición. Se realizaron experimentos independientes utilizando pajuelas plásticas que contenían un fluido biológico (semen+extender) con el fin de corroborar los valores de coeficientes de transferencia encontrados previamente. En este caso el programa tiene en cuenta las propiedades variables con la temperatura en el fluido biológico, lo cual constituye un problema matemático altamente no-lineal y además un coeficiente de transferencia variable según el régimen de ebullición que ocurre en cada etapa del enfriamiento. Se realizó la validación del programa contrastando las experiencias de laboratorio con las predicciones numéricas, y se logró una excelente concordancia. La simulación computacional es una herramienta importante para la determinación de los coeficientes de transferencia de calor y para la optimización del proceso de criopreservación de dispositivos que contienen fluidos de interés biológico.

Palabras claves: criopreservación, simulación numérica, ebullición en film y nucleada, nitrógeno líquido, coeficientes de transferencia de calor.

INTRODUCCIÓN

El nitrógeno líquido es uno de los fluidos criogénicos más utilizados para la criopreservación de muestras biológicas. La medición de la temperatura en función del tiempo resulta útil para calcular velocidades de enfriamiento y determinar si la muestra logró una vitrificación o si sufrió un cambio de fase con la consecuente formación de cristales de hielo.

Cuando el nitrógeno líquido, cuya temperatura de saturación a 1 atmósfera es -196°C , entra en contacto con una muestra existe una diferencia de temperatura muy elevada ($>200^{\circ}\text{C}$) lo cual provoca la instantánea ebullición del líquido circundante; en este punto comienza un régimen de ebullición en film (Bui y Dhir, 1985; Suryanarayana, y Merte, 1972). El flujo de calor (q) desde el objeto hacia el nitrógeno líquido se ve disminuido debido a la presencia de una delgada capa o film de nitrógeno vapor que actúa como aislante retardando el enfriamiento. Al fenómeno de ebullición en film también se lo denomina “efecto Leidenfrost”. El objeto se enfría lentamente hasta alcanzar una temperatura donde el flujo de calor es mínimo (Temperatura de Leidenfrost, TL). A partir de este punto el film de vapor se desprende bruscamente y el flujo de calor aumenta de manera progresiva alcanzando un valor máximo donde se establece la transición de régimen a ebullición nucleada.

La curva de ebullición descrita por el flujo de calor (q) en función de la diferencia de temperatura ($\Delta T = T_{\text{pared}} - T_{\text{sat}}$) depende de varios factores relevantes tales como: i) el tipo de fluido criogénico y sus propiedades térmicas, ii) del material en contacto con el fluido y su rugosidad el cual afecta a su vez los sitios activos de nucleación y la TL iii) la posición relativa del objeto en el fluido criogénico (vertical, horizontal, ángulo de inclinación) y iv) la geometría del sólido (placas, esferas, cilindros, o geometrías irregulares).

En criobiología se utilizan ampliamente pajuelas plásticas que se sumergen en nitrógeno líquido para criopreservación de material biológico. La información experimental sobre las curvas de ebullición en estos dispositivos conteniendo muestras biológicas son escasas. Resulta importante determinar si el proceso de enfriamiento está gobernado por una ebullición en film o nucleada o si existe una combinación de ambos regímenes y estudiar el rango de ΔT donde cada régimen de ebullición se desarrolla.

Los objetivos del presente trabajo son: i) determinar mediante experimentos de laboratorio las curvas de temperatura vs. tiempo de pajuelas plásticas conteniendo hielo al sumergirlas en nitrógeno líquido para definir los regímenes de ebullición que gobiernan el proceso y aplicar un modelo de simulación numérica utilizando el método de los elementos finitos que calcule los coeficientes de transferencia de calor de cada etapa, ii) validar los coeficientes de transferencia calórica para pajuelas plásticas conteniendo un fluido biológico modelo (semen+extender bovino) el cual sufre un proceso de congelación al enfriarse y presenta propiedades termofísicas dependientes de la temperatura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Mediciones Experimentales

Las pajuelas plásticas cilíndricas comúnmente utilizadas para criopreservación de semen bovino se obtuvieron de AB Technology, Inc., Pullman, Washington, USA. El valor promedio de diámetro externo, longitud y espesor de pared fue $D=2.805\text{mm}$, $L=124\text{mm}$, $e=0.21\text{mm}$, respectivamente. Para determinar los coeficientes de transferencia de calor en la interfase correspondiente a la superficie plástica expuesta al nitrógeno líquido se llenaron las pajuelas con agua ultra-purificada mediante osmosis inversa y filtrada (Milli-Q, Milipore Corporation, MA, USA) teniendo un punto de fusión de $0 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$. Las historias térmicas se registraron mediante termocuplas tipo T (Cobre-Constantán) insertadas en el eje central de la pajuela conteniendo agua al inicio del experimento. La pajuela se suspendió en nitrógeno vapor sobre nitrógeno líquido en un tanque Dewar para generar los cristales de hielo. El hielo tiene propiedades termofísicas conocidas y medidas en el rango de -2 a -194°C (Choi y Okos, 1986, Choi y Bischof, 2010). Una vez alcanzada la región plateau donde ocurre el cambio de fase o congelación la pajuela se mantuvo en un baño termostático utilizando una solución de etilen-glicol (30%v/v) a una temperatura por debajo de -2°C y por encima de los -9°C . Luego

de alcanzar el equilibrio la pajuela se sumergió en nitrógeno líquido utilizando el canister. La ventaja de usar hielo en las pajuelas radica en que se evita el cambio de fase y por ende el hielo sólo se enfría en la pajuela entre -3°C a -194°C . La termocupla se conectó a un equipo de adquisición (TESTO, Alemania). Figuras a, b, c) muestran el Dewar junto con el equipo adquirente de temperatura utilizado en los experimentos y cómo se dispuso la termocupla dentro de la pajuela y su conexión al adquirente TESTO.

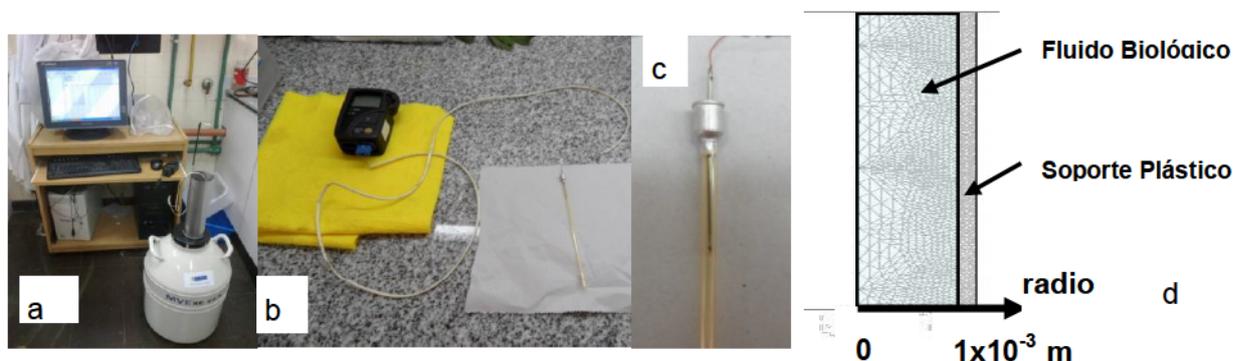


Figura 1. a) Tanque Dewar conteniendo nitrógeno líquido y la PC conectada al equipo de adquisición (TESTO). b) conexión del equipo TESTO a la pajuela plástica francesa y c) pajuela inicialmente rellena con agua ultra-purificada y conteniendo la termocuplas enhebrada para evitar el movimiento radial durante el experimento. d) Discretización espacial del dominio correspondiente al fluido biológico y del soporte plástico utilizando elementos triangulares. Cuerpo de Revolución sobre el eje $r=0\text{m}$.

Modelo Matemático

El sistema pajuela plástica y fluido interno se puede describir como dos cilindros concéntricos compuestos por materiales distintos; el fluido interno pudiendo ser hielo o células biológicas (semen+extender) y el soporte plástico. Las ecuaciones a derivadas parciales que representan la transferencia de energía en estado no estacionario para el fluido que será sometido al proceso de enfriamiento y/o congelación (Eq. 1) y el soporte plástico (Eq. 2) utilizando coordenadas radiales y axiales fueron ampliamente descriptos en Santos y col. (2013 a, b) siendo las ecuaciones:

$$\rho_s(T) C_{p_s}(T) \frac{\partial T}{\partial t} r = \frac{\partial}{\partial r} \left(k_s(T) r \frac{\partial T}{\partial r} \right) + \frac{\partial}{\partial z} \left(k_s(T) r \frac{\partial T}{\partial z} \right) \quad (1)$$

$$\rho_p C_{p_p} \frac{\partial T}{\partial t} r = \frac{\partial}{\partial r} \left(k_p r \frac{\partial T}{\partial r} \right) + \frac{\partial}{\partial z} \left(k_p r \frac{\partial T}{\partial z} \right) \quad (2)$$

Los subíndices \underline{s} corresponden a hielo o fluido biológico y \underline{p} al material plástico. Puede notarse que tanto el hielo como solución biológica presentan propiedades termofísicas dependientes de la temperatura. En el caso del soporte plástico las propiedades termofísicas (k_p , ρ_p , C_{p_p}) se consideraron constantes. El modelado de la solución biológica constituye un problema matemático altamente no lineal debido a los cambios abruptos en las propiedades termofísicas durante el cambio de fase (Santos y col., 2013 a y b, 2014). La temperatura inicial se consideró uniforme en ambos materiales. La condición de borde convectiva en la interfase de contacto plástico-nitrógeno líquido es:

$$-k_p \nabla T \cdot \underline{n} = h(T_{\text{pared}} - T_{\text{ext}}) \quad (3)$$

donde h es el coeficiente de transferencia de calor, k_p es la conductividad térmica del material plástico, T_{pared} es la temperatura en la superficie del material plástico en contacto con el nitrógeno líquido, T_{ext} es la temperatura externa (en este caso es la temperatura de saturación del nitrógeno líquido a presión atmosférica), \underline{n} es el vector normal unitario exterior

y ∇T es el gradiente de temperatura evaluado en la superficie.

Se utilizó una malla triangular con elementos de orden dos para discretizar los dominios (Fig. 1d). El número de elementos que constituyó el dominio interior conteniendo el fluido y el dominio exterior correspondiente al material plástico fue de 30656 y 23808, respectivamente. Todas las corridas numéricas se testearon para conocer su velocidad de cálculo, el máximo tiempo de CPU fue de 10min utilizando una PC Intel(R) Core(TM) i3 con una velocidad de procesador de 2.93 GHz y una memoria RAM de 4GB.

La discretización temporal se realizó aplicando Backward Euler Differentiation (orden mínimo 1 y máximo 5) con un escalón máximo de 1 s y un mínimo escalón inicial de 0.0001s.

El programa computacional calcula el perfil de temperatura en función del tiempo, en el dominio plástico y el fluido biológico durante el proceso de congelación, especialmente calcula la temperatura en la superficie plástica, la cual es utilizada para la predicción del flujo calórico aplicando la condición de borde convectiva.

Se codificó una subrutina para permitir la aplicación de un coeficiente de transferencia de calor h variable con el tiempo en lenguaje Matlab, la cual se acopló al programa principal desarrollado en el software comercial COMSOL AB. Esta subrutina resulta útil para la predicción de un h promedio para cada tipo de régimen de ebullición. Se propusieron diferentes valores de h para simular las curvas de temperatura versus tiempo y se compararon estas curvas con las curvas experimentales. Se seleccionó el coeficiente de transferencia de calor que minimizaba la Sumatoria de los Residuos al Cuadrado (SRC) (Eq. 4):

$$SRC = \sum (T_{\text{exp}} - T_{\text{pred}})^2 \quad (4)$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Experimentos de pajuelas plásticas conteniendo hielo

Los experimentos de pajuelas conteniendo hielo permitieron determinar con mayor rigurosidad los h al sumergir las muestras en nitrógeno líquido dado que al no existir cambio de fase el proceso fue claramente observado con el enfriamiento progresivo del hielo en el rango -2 a -196°C . La Figura 2a) muestra las curvas de temperatura versus tiempo asumiendo dos hipótesis distintas i) considerando la existencia de ebullición en film durante todo el experimento (valor único y constante de h), ii) asumiendo que existe una primer etapa donde se desarrolla ebullición en film continuando luego por una segunda etapa donde se desencadena la ebullición nucleada con valores marcadamente más altos de h .

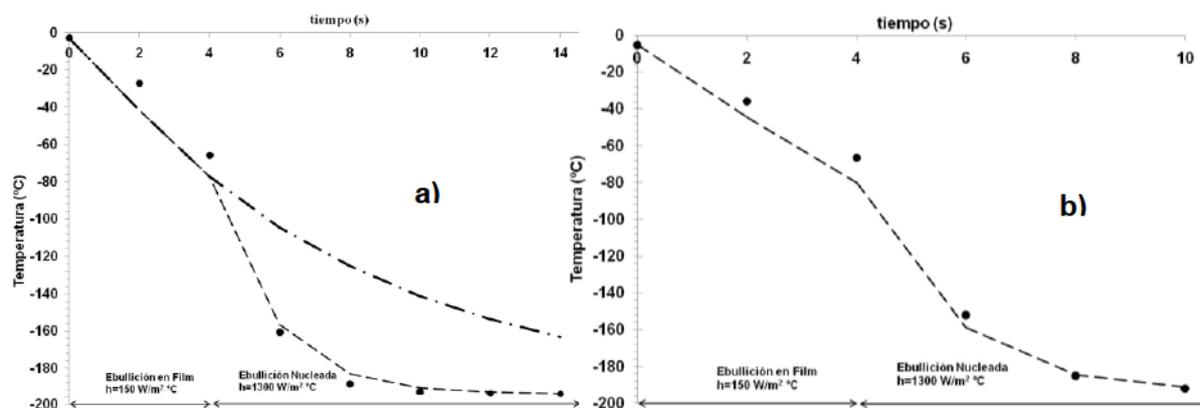


Figura 2 : a) Medición experimental de temperatura versus tiempo en la pajuela conteniendo hielo (●) a $r = 0.0008$ m, $L = 0.060$ m. Predicción numérica de la temperatura mediante simulación computacional considerando un h variable (- -); b) resultados de un replicado del experimento. La curva (— ● —) mostrada en a) se obtuvo considerando un valor único y constante de $h = 150 \text{ W/m}^2 \text{ } ^\circ\text{C}$ (régimen de ebullición en film) durante todo el experimento.

La Fig. 2 b muestra un replicado del experimento. Todas las mediciones de temperatura con las termocuplas tipo T tuvieron un error absoluto de 0.5°C . Como puede observarse existe una falta de ajuste entre la temperatura predicha por el modelo y la temperatura experimental cuando se utiliza un único valor de h correspondiente a un régimen de ebullición en film (Fig. 2 a). Sin embargo al suponer la existencia de dos regímenes de ebullición con dos valores de h durante el experimento se alcanza una excelente concordancia entre los resultados. La curva de enfriamiento de la pajueta conteniendo hielo muestra un cambio abrupto en su pendiente pudiendo atribuirse al cambio de régimen de ebullición, más específicamente a la transición de ebullición en film a nucleada. Durante la etapa de ebullición en film el ΔT se encuentra en su valor máximo y el h que mayor ajusta con los resultados experimentales es $h=150\text{ W/m}^2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Durante la ebullición nucleada se observa el cambio abrupto en la temperatura y el h que logró minimizar la SRC fue $h=1300\text{ W/m}^2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Validación del coeficiente de transferencia de calor utilizando Pajuelas conteniendo fluido biológico

La Fig.3a muestra las curvas experimentales de tiempo-temperatura utilizando el programa computacional en elementos finitos para pajuelas plásticas conteniendo semen+extender asumiendo la misma hipótesis que para pajuelas con hielo i) un único valor de h donde existe un régimen de ebullición en film durante todo el experimento ($h =150\text{ W/m}^2\text{ }^{\circ}\text{C}$), ii) considerando que hay una etapa de ebullición en film $h =150\text{ W/m}^2\text{ }^{\circ}\text{C}$ seguido de un régimen de ebullición nucleada $h = 1300\text{ W/m}^2\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Como puede observarse existe una excelente concordancia entre valores predichos y medidos de temperatura si se asume que existe una primera etapa de ebullición en film $h=150\text{ W/m}^2\text{ }^{\circ}\text{C}$ y luego en una segunda etapa un régimen de ebullición nucleada ($h=1300\text{ W/m}^2\text{ }^{\circ}\text{C}$). Las curvas además muestran una zona de meseta correspondiente al plateau de cambio de fase debido a la transformación de agua en hielo en la muestra con semen. Luego de esta etapa se observa un descenso abrupto similar al caso observado para pajueta conteniendo hielo y correspondería a la transición del régimen de ebullición. La Fig 3b muestra un replicado del experimento realizado para semen+extender, utilizando los h previamente calculados para el sistema de pajueta conteniendo hielo.

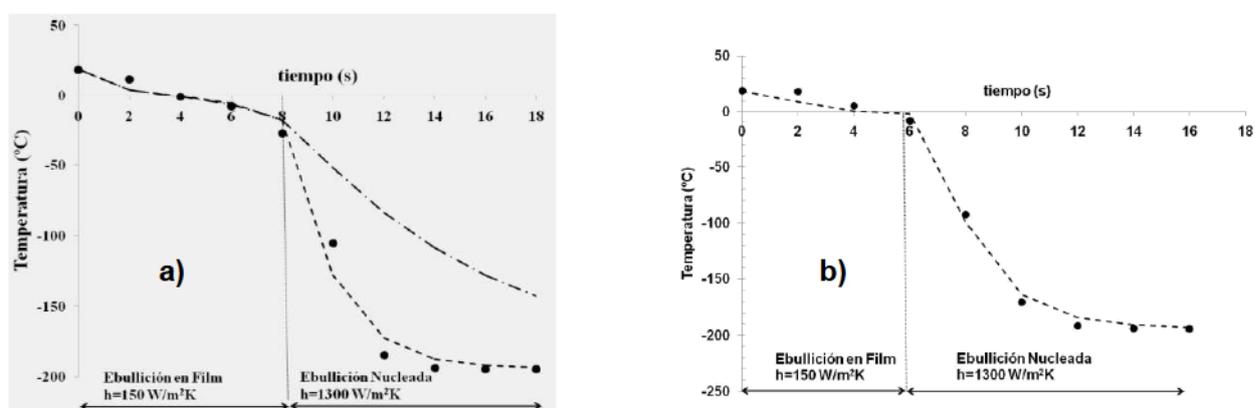


Figure 3: a) Curvas experimentales de tiempo-temperatura (●) pajueta conteniendo el fluido biológico sometido a congelación en $r= 0.0008\text{ m}$; $L=0.060\text{ m}$. Temperaturas predichas por el programa con valores de h variable (- -); b) resultados de un experimento en condiciones similares en $r=0.0004\text{ m}$ $L=0.0604\text{ m}$. La curva (— ● —) mostrada en a) se obtuvo considerando un solo valor fijo y constante de $h=150\text{ W/m}^2\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ebullición en film) durante todo el experimento.

CONCLUSIONES

Mediante la comparación de las curvas experimentales de temperatura-tiempo de pajuelas plásticas conteniendo hielo al sumergirse en nitrógeno líquido contra las predicciones numéricas aplicando el método de los elementos finitos se logró estimar los coeficientes de transferencia de calor que gobiernan el proceso de enfriamiento. Se codificó una subrutina específica en el programa principal que considera h variable a los efectos de tener en cuenta la existencia de dos regímenes de ebullición, primero en film y luego nucleada, cuando se sumergían las pajuelas en nitrógeno líquido. Estos coeficientes de transferencia de calor se validaron utilizando pajuelas plásticas con una suspensión de semen bovino +extender, el cual presenta un cambio de fase o congelación durante su inmersión en el fluido criogénico. En este último caso el programa numérico presentaba la complejidad adicional de ser un problema matemático no-lineal debido al cambio de fase donde las propiedades termofísicas de la suspensión biológica son fuertemente dependientes de la temperatura.

Una excelente concordancia entre los resultados numéricos y experimentales durante el enfriamiento de pajuelas conteniendo hielo y semen+extender corrobora los valores encontrados de coeficientes de transferencia de calor para el régimen de ebullición en film $h=150 \text{ W/m}^2 \text{ K}$ y para ebullición nucleada $h=1300 \text{ W/m}^2 \text{ K}$. La determinación de los h que gobiernan el proceso al sumergir pajuelas plásticas en nitrógeno líquido constituye un aspecto importante cuando se trata de optimizar protocolos para la criopreservación de material biológico, además resulta útil para el desarrollo de nuevas tecnologías y mejoras del diseño de dispositivos en el campo de la criobiología.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a las siguientes instituciones por su apoyo económico y financiero para el desarrollo del presente trabajo: Dto de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería de la Universidad Nacional de La Plata, a la Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Católica Argentina, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos (CIDCA-CONICET) y a la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCYT)-ARGENTINA.

REFERENCIAS

- Bui, T.D., y Dhir, V.K. Film boiling heat transfer on an isothermal vertical surface. *Heat Transfer Trans ASME* (1985) **107**:764–771.
- Choi, J., y Bischof, J.C. Review of biomaterial thermal property measurements in the cryogenic regime and their use for prediction of equilibrium and non-equilibrium freezing applications in cryobiology. *Cryobiology* (2010) **60**:52–70.
- Choi, Y., y Okos, M.R. *Effects of temperature and composition on the thermal properties of foods*. in: M. Le Magher, P. Jelen (Eds.), P. Food Eng. Appl., New York, 1986, pp. 93–103.
- Nishio, S., y Ozu, T. A study of natural-convection film boiling heat transfer of saturated liquids with long vapor film, 2rid Report, Verification of Model for Vertical Hates, (in Japanese), *Proc. of 25th National Heat Transfer Symposium of Japan* (1988) 283–285.
- Santos, M.V., Sansinena, M., Zaritzky, N., y Chirife, J. Mathematical prediction of freezing times of bovine semen in straws placed in static vapor over liquid nitrogen. *Cryobiology* (2013) **66**: 30-37.
- Santos, M.V., Sansinena, M., Zaritzky, N., y Chirife, J. How important are internal temperature gradients in french straws during freezing of bovine sperm in nitrogen vapor? *Cryoletters* (2013) **34**:158-65.
- Santos, M.V., Sansinena, M., Chirife, J., Zaritzky, N. Determination of heat transfer coefficients of biological systems during cooling in liquid nitrogen under film and nucleate pool boiling regimes. *Mecánica Computacional* (2014) **33**: 2759-2771
- Suryanarayana, N.V., y Merte Jr., H., Film boiling on vertical surfaces. *Heat Transfer Trans ASME* (1972) **94**:377–384