

DETERMINACIÓN DE COEFICIENTES DE TRANSFERENCIA DE CALOR DE CRYOTOP ABIERTO Y CERRADO BAJO DISTINTAS CONDICIONES DE CALENTAMIENTO

María V. Santos^{1,3}, Marina Sansinena², Jorge Chirife², y Noemí E. Zaritzky^{1,3}

¹Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos-Facultad de Ciencias Exactas, UNLP, CONICET, 116 y 47, La Plata (CP 1900).²Facultad de Ciencias Agrarias, Pontificia Universidad Católica Argentina, Av. Alicia Moreau de Justo 1500, C1107 CABA.³Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería, UNLP, 47 y 115.
mvsantosd@gmail.com

INTRODUCCION

Los dispositivos denominados Cryotop®, presentan a nivel internacional alta eficiencia en la vitrificación de material genético como son los ovocitos y embriones. Tienen un volumen muy pequeño para lograr la vitrificación durante el enfriamiento con nitrógeno líquido, minimizando la formación de hielo intracelular que puede ser letal para las células. El Cryotop® es uno de los más utilizados y está conformado por una delgada cinta de polipropileno sobre la cual se deposita una microgota de 0.1-0.2 µL. Las dimensiones tan pequeñas dificultan la medición de temperatura vs. tiempo. El proceso de calentamiento de muestras vitrificadas en dispositivos como el Cryotop® está gobernado por la transferencia de energía. Matemáticamente se puede describir este fenómeno mediante la resolución de la ecuación diferencial de conducción de calor en estado transiente. El coeficiente de transferencia de calor en la interfase (h) es un parámetro fundamental que interviene en la condición de contorno y está relacionado con las condiciones fluidodinámicas que existen en la interfase material biológico -fluido externo. En el caso de Cryotop® Seki and Mazur (2011) reportaron varios protocolos de calentamiento siendo el fluido externo agua, aire, o una solución de sacarosa (todos a una temperatura de 23°C). Estos autores demostraron que muestras vitrificadas sometidas a distintas velocidades de calentamiento sufrieron distinto grado de letalidad; por ende la velocidad de calentamiento es crítica ya que puede producirse recristalización y/o devitrificación de la solución biológica si esta velocidad es baja. Seki and Mazur (2011) diseñaron una termocupla de 50µm que permitió medir la historia térmica de muestras en Cryotop® bajo distintos protocolos de enfriamiento y calentamiento, demostrando que el calentamiento representa una etapa fundamental para evitar la formación de hielo. En literatura no existe información acerca de valores o rangos de h durante el calentamiento de muestras biológicas vitrificadas que se someten a distintos procesos de calentamiento (agua, aire o solución sacarosa). Además, estos valores no pueden calcularse a partir de correlaciones de números adimensionales como Nusselt vs. Reynolds ya que los dispositivos tienen geometría irregular y son heterogéneos (formados por plástico+microgota). Es por ello que el objetivo del presente trabajo es simular numéricamente la transferencia de energía durante el calentamiento de Cryotop® sometido a distintas condiciones operativas para obtener la temperatura predicha versus tiempo y comparar con los datos experimentales obtenidos por Seki and Mazur (2011). A partir de estas historias térmicas se busca calcular los h que representan cada protocolo y sistema teniendo en cuenta propiedades térmicas variables con la temperatura, geometría irregular y diferentes materiales (soporte plástico y hielo/agua vítrea para solución biológica).

MATERIALES Y MÉTODOS

El dispositivo Cryotop® consiste en un delgado film de polipropileno transparente de 0.7 mm de ancho, 20 mm de largo y 0.1 mm de espesor (Seki y Mazur, 2012; Jin y col.,2014), que está adherido a un soporte manual plástico resistente a procesos que involucran la utilización de nitrógeno líquido (NL). El strip (film) permite la carga de un mínimo volumen de solución (0.1-0.2 µL que contienen aproximadamente 4-8 ovocitos o embriones) para luego

ser sumergido en NL. Este dispositivo permite efectuar un enfriamiento ultrarrápido para alcanzar la vitrificación de la muestra. Las muestras se calientan con dos posibles metodologías: a) pueden estar en contacto directo con NL (sistema abierto) o b) pueden estar aisladas del NL ubicando el strip dentro de una capsula plástica (sistema cerrado, Cryotop® SC Kitazato Supply, Inc, JP) para minimizar contaminación potencial con microorganismos patógenos existentes en el fluido criogénico. Una vez vitrificadas las muestras, el protocolo de calentamiento que se utilice será un factor fundamental para determinar la viabilidad de las células (Mazur and Seki, 2011). En la Fig. 1 se muestra la geometría utilizada para la simulación numérica del proceso de calentamiento de Cryotop® y la posición de la termocupla diseñada por Kleinhans et al. (2007) para adquirir la historia térmica de la muestra con mínimo volumen. También se muestra la discretización espacial utilizada por el simulador COMSOL 3.5a para la simulación numérica.

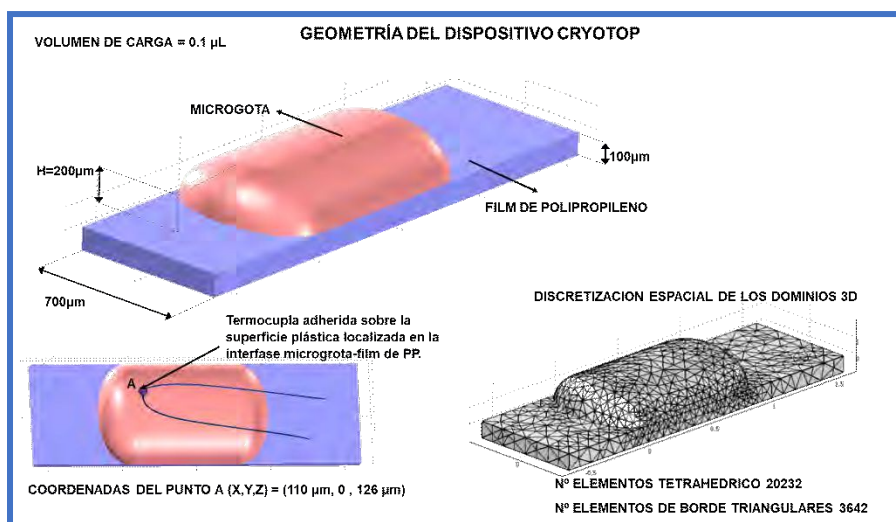


Figura 1. Cryotop® con un volumen de carga de 0.1 µL. Representación espacial de la geometría irregular 3D utilizando elementos tetraédricos y triangulares. Localización de la termocupla determinada mediante fotografías publicadas en el artículo de Kleinhansy col. (2010) cuya historia térmica fue simulada numéricamente en este trabajo.

Las velocidades de calentamiento experimentales reportadas por Seki y Mazur (2011) fueron seleccionadas para comparar con simulaciones numéricas con el fin de encontrar lo que las caracterizaban. Las muestras vitrificadas se retiraban del NL (temperatura inicial de -198°C) y se sometían a distintas condiciones de calentamiento. Las condiciones fueron para Cryotop® sistema abierto: a) muestra sumergida en solución de sacarosa a 23°C (Protocolo 1), muestra en aire a 23°C (Protocolo 2) y para Cryotop® sistema cerrado las condiciones fueron c) inmersión de la muestra en agua a 23°C (Protocolo 3) y d) exposición a aire a 23°C (Protocolo 4).

MODELADO MATEMÁTICO DE LA TRANSFERENCIA DE ENERGÍA

Las ecuaciones diferenciales que representan la transferencia de calor en un Sistema Cryotop® se pueden describir utilizando coordenadas cartesianas en 3D como:

$$\rho_s C_{p_s} \frac{\partial T}{\partial t} = -\nabla \cdot (k_s \nabla T) \quad \text{en } \Omega_1 \quad (1)$$

$$\rho_p C_{p_p} \frac{\partial T}{\partial t} = -\nabla \cdot (k_p \nabla T) \quad \text{en } \Omega_2 \quad (2)$$

donde T es la temperatura, ρ la densidad, Cp el calor específico, k la conductividad térmica. El efecto de la temperatura sobre las propiedades termofísicas de la solución biológica se

consideró en el modelo. Los subíndices s corresponden al dominio Ω_1 (microgota o solución biológica) y p al material plástico (Ω_2). La condición inicial en ambos dominios fue:

$$T_0 = -196^\circ\text{C} \quad \text{a} \quad t = 0 \quad \text{en} \quad \Omega_1 \quad \text{y} \quad \Omega_2 \quad (3)$$

La condición de borde convectiva para el material plástico y la microgota que están expuestas al medio externo (aire o medio líquido a 23°C) se expresa como :

$$-\mathbf{k}_p \nabla T \cdot \mathbf{n} = h (T - T_{\text{ext}}) \quad \text{en} \partial\Omega_1 (4)$$

$$-\mathbf{k}_s \nabla T \cdot \mathbf{n} = h (T - T_{\text{ext}}) \quad \text{en} \partial\Omega_2 (5)$$

donde h es el coeficiente de transferencia de calor en la interfase del sistema en $\partial\Omega_1$ (interfase del material plástico) y $\partial\Omega_2$ (interfase de la microgota); T es la temperatura de la superficie expuesta al fluido externo y T_{ext} es la temperatura externa que depende del protocolo utilizado para el calentamiento, n es el vector normal unitario externo.

Resulta interesante remarcar que el h correspondiente al dispositivo Cryotop® cerrado está formado por la suma de varias resistencias en serie: aire alrededor del strip que actúa como aislante, el espesor de la capsula plástica y el fluido externo que puede ser aire o medio líquido según el protocolo aplicado. Las ecuaciones diferenciales (1)-(5) que representan el proceso de calentamiento fueron resueltas numéricamente utilizando el método de los elementos finitos mediante el software COMSOL 3.5 AB Multiphysics (lic. 1048485). Para ver efecto del volumen de gota sobre el h se seleccionaron dos volúmenes generándose dos geometrías tridimensionales diferentes para realizar las simulaciones; volúmenes de microgota 0.1 y 0.2 μL .

PROPIEDADES TERMOFISICAS

Estimar correctamente las propiedades termofísicas de los materiales es fundamental para la simulación numérica del proceso. En el caso de protocolo 1 donde las velocidades de calentamiento son lo suficientemente altas como para asegurar que no existe devitrificación o recristalización se deben utilizar las propiedades de agua en estado vítreo, teniendo en cuenta su dependencia con la temperatura. En el caso de velocidades de calentamiento más bajas puede existir una recristalización y/o devitrificación con la consecuente formación de hielo en la muestra. Este fenómeno entonces indica que las propiedades térmicas que deben utilizarse para modelar son las de hielo, que a su vez cambian con la temperatura. El modelado matemático se realizó para los protocolos 2, 3 y 4 considerando que el fluido biológico era agua vítreo o hielo, comparando el valor de h para ambos casos. En la tabla 1 se muestran las propiedades termofísicas utilizadas en las simulaciones y su dependencia con la temperatura.

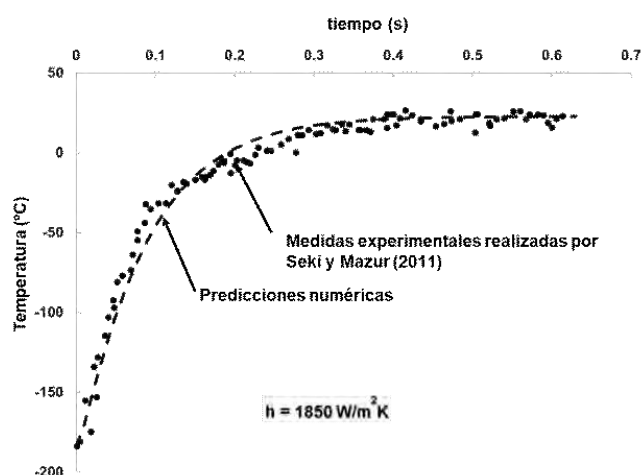
RESULTADOS Y DISCUSION

CALENTAMIENTO DE CRYOTOP® EN SOLUCION DE SACAROSA

En la Fig 2 se muestra la historia térmica experimental y la predicción numérica del modelo para el Protocolo 1 (Cryotop® sistema abierto expuesto a solución de sacarosa a 23°C). Para este sistema, Mazur y Seki (2011) reportaron la historia térmica completa, información sumamente relevante para su comparación con las temperaturas predichas numéricamente por nuestro modelo. Se puede observar que existe una excelente concordancia entre valores predichos y experimentales para un valor de $h = 1850 \text{ W/m}^2\text{K}$.

Tabla 1. Efecto de la temperatura en las propiedades termofísicas utilizadas en la simulación numérica

Material	Propiedades termofísicas			
	k (W/m ² K)	ρ (Kg/m ³)	Cp (J/kg K)	Referencia
Polipropileno	0.22 (-196°C , 23°C)	920 (-196°C , 23°C)	1900 (-196°C , 23°C)	Kleinhans y col. (2010)
Agua vitrea	1.1 (-196°C , 23°C)	940 (-196°C , 23°C)	1078.88 (-154.18 °C) 1120.55 (-150.77 °C) 1173.33 (-146.83 °C) 1216.11 (-142.99 °C)	Sugisaki y col. (1986); Angell (2008)
Hielo	2.22 (0 °C) 2.25 (-5 °C) 2.3 (-10 °C) 2.34 (-15 °C) 2.39 (-20 °C) 2.45 (-25 °C) 2.5 (-30 °C) 2.57 (-35 °C) 2.63 (-40 °C) 2.76 (-50 °C) 2.9 (-60 °C) 3.05 (-70 °C) 3.19 (-80 °C) 3.34 (-90 °C) 3.7 (-100 °C) 4.1 (-110 °C) 4.3 (-120 °C) 4.7 (-130 °C) 5.2 (-140 °C) 5.6 (-150 °C) 6 (-180 °C)	917.2 (0 °C) 924.13 (-50 °C) 929.3 (-100 °C) 931.0 (-150 °C)	2100 (0 °C) 1967 (-20 °C) 1833 (-40 °C) 1700 (-60 °C) 1566 (-80 °C) 1433 (-100 °C)	Choi y Bishof (2010); Petrenko y Whitworth (1999)

Fig. 2. Valores experimentales y predichos de temperatura versus tiempo para el protocolo 1 de calentamiento de Cryotop[®].

En la Fig. 3 se muestra la distribución de temperaturas en la microgota de 0.1 μ L sobre el Cryotop[®] luego de 0.1s de sumergido el sistema en solución de sacarosa a 23°C.

Se utilizó una malla tetraédrica con elementos de Lagrange de orden 2 para discretizar los dominios. El esquema de discretización temporal seleccionado fue Backward Euler con un mínimo de 1 y máximo de 5 utilizando un máximo intervalo de 0.1s y un intervalo inicial de 0.001s. Las tolerancias absolutas y relativas para cada paso de integración fueron 0.001 y 0.01, respectivamente.

Todas las corridas numéricas se testearon para cuantificar su velocidad de cálculo siendo el tiempo máximo de CPU menor a 5 minutos para un modelo 3D utilizando una PC Intel(R) Core(TM) i3 6300 con una velocidad de procesador de 3.80 GHz y una RAM de 4 GB.

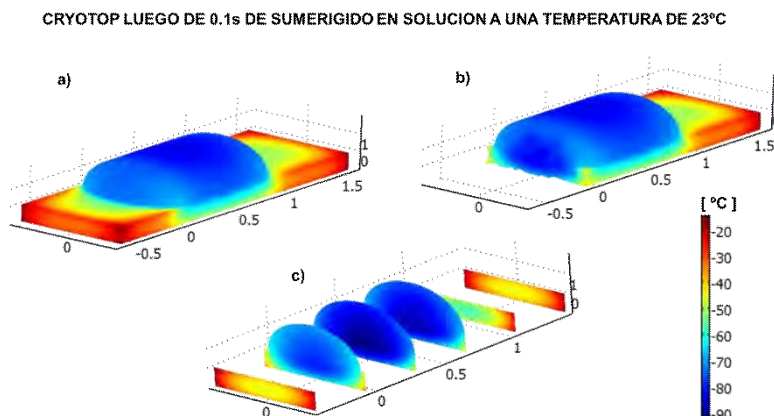


Figura 3. Distribución de temperaturas en una microgota de 0.1 μL luego de 0.1s sumergida en solución de sacarosa a 23 °C en a) superficie externa de la gota y film plástico b) vista interna de la gota $z=0$ c) vista a consecutivos planos sobre el eje axial del dominio para la visualización interna del perfil de temperaturas.

DETERMINACION DE COEFICIENTES DE TRANSFERENCIA DE CALOR EN CRYOTOP®ABIERTO Y CERRADO PARA CALENTAMIENTO EN AIRE Y AGUA

En el caso de los Protocolos 2, 3 y 4 los Mazur y Seki (2011) reportaron solamente las velocidades de calentamiento medidas experimentalmente (pendiente inicial de la curva temperatura versus tiempo). En la Tabla 2 se muestran los coeficientes de transferencia de calor y las velocidades de calentamiento predichos por el modelo de simulación para Cryotop® bajo distintas condiciones y utilizando distintas propiedades termofísicas (agua vítrea o hielo).

Tabla 2. Coeficientes de transferencia de calor (h), velocidades experimentales de calentamiento, y valores predichos utilizando un modelo de simulación computacional del Cryotop® considerando distintos protocolos de calentamiento, dos volúmenes de gota y dos sets de propiedades termofísicas del fluido biológico (hielo o agua vítrea).

Protocolo de calentamiento Cryotop®	Fluido simulado	Volumen de gota (μL)	Coefficiente de transferencia de calor h ($\text{W}/\text{m}^2 \text{K}$)	Velocidades de calentamiento predichas ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)	Velocidades de calentamiento experimentales (Mazur y Seki, 2011) ($^{\circ}\text{C}/\text{min}$)
P2 ABIERTO EN AIRE	hielo	0.1	90	7758	7850 \pm 415
		0.2	110	7828	
	Agua vítrea	0.1	120	7845	
		0.2	140	7868	
P3 CERRADO Con cápsula en agua	hielo	0.1	40	3985	4050 \pm 328
		0.2	50	4033	
	Agua vítrea	0.1	53	4157	
		0.2	60	4034	
P4 CERRADO Con cápsula en aire	hielo	0.1	5.5	642	612 \pm 40
		0.2	6	618	
	Agua vítrea	0.1	5.5	618	
		0.2	6.5	630	

Como puede observarse el protocolo 4 presentó las velocidades de calentamiento más bajas obteniéndose un coeficiente de transferencia de calor bajo, valores entre 5.5-6.5 $\text{W}/\text{m}^2\text{K}$. Esta baja performance se debe a la suma de resistencias en serie existentes (aire

circundante al strip, espesor plástico de la capsula y aire externo) lo cual puede provocar formación de hielo o devitrificación de la muestra. Experimentalmente Mazur y Seki (2011) encontraron que para P4 había una significativa reducción de la viabilidad de la muestra luego del calentamiento. Se puede observar que el efecto de las propiedades termofísicas (hielo o agua vítrea) no fue significativo debido al control externo de la transferencia de calor en este sistema. Asimismo, el volumen de carga (0.1 o 0.2 μ L) tampoco influyó en el valor de h obtenido. En el caso de P3 las velocidades son más altas dado que el fluido externo es agua líquida lo cual genera una mejor transferencia de calor hacia la muestra a calentar. En el caso de utilizar propiedades de hielo los h estaban en el rango entre 40-50 W/m²K; cuando se simuló considerando agua vítrea se obtuvieron valores más altos (entre 53-60 W/m²K). En el caso de P2 correspondiente a un sistema Cryotop[®] abierto en contacto con aire los h obtenidos fueron altos comparados con valores de h típicos de objetos sumergidos en aire estanco. Esto puede deberse a que el nitrógeno líquido adherido a la superficie del Cryotop[®] se evapora casi instantáneamente al levantar la muestra del baño criogénico y el sistema entra en contacto con aire a mayor temperatura rápidamente. El vapor de nitrógeno que se libera genera un flujo convectivo alcanzando velocidades de calentamiento altas que se traducen en valores más altos de h (>90 W/m² K).

CONCLUSIONES

Se estimaron los coeficientes de transferencia de calor para el sistema Cryotop[®] bajo distintos protocolos de calentamiento utilizando simulaciones numéricas mediante el método de los elementos finitos. Se consideró una geometría irregular 3D, sistema heterogéneo formado por strip de polipropileno y solución biológica cuyas propiedades térmicas eran variables con la temperatura. Se simularon cuatro protocolos de calentamiento con Cryotop[®] sistema cerrado y abierto con calentamiento en medio líquido y en aire. Las simulaciones numéricas se contrastaron con datos experimentales de temperatura versus tiempo publicadas dado que el sistema de mínimo volumen dificulta la medida experimental directa, encontrándose excelente concordancia con datos reportados de Mazur y Seki (2011). Se analizaron los mecanismos que gobernaban la transferencia de calor para cada protocolo; se consideraron escenarios de calentamiento bajo condiciones de equilibrio con formación de hielo (bajas velocidades de calentamiento) y condiciones de no-equilibrio (agua vítrea) para altas tasas de calentamiento. Los valores de h estimados para Cryotop[®] sistema abierto inmerso en solución de sacarosa (23°C), (el cual alcanza un 80% de viabilidad según Mazur y Seki, 2011) resultaron entre 1800-2200W/m² K. Valores más bajos de h se determinaron para los demás protocolos observándose una menor dependencia con el volumen de carga y propiedades termofísicas utilizadas (hielo o agua vítrea) en el modelo. Los valores de h estimados mediante simulación computacional para dispositivos de criopreservación no se han reportado en literatura en procesos de calentamiento. Estos parámetros resultan útiles para criobiólogos ya que permiten mejorar las tecnologías y protocolos de manipulación de muestras vitrificadas.

BIBLIOGRAFIA

- Angell C. A., Glass-Forming Properties Insights into Phases of Liquid Water from Study of Its Unusual Glass-Forming Properties, *Science* 319 (2008) 582.
- Choi J., 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* 60 (2010) 52–70.
- Jin B., Kleinhans F.W., Mazur P. Survivals of mouse oocytes approach 100% after vitrification in 3-fold diluted media and ultra-rapid warming by an IR laser pulse. *Cryobiology* 68 (2014) 419–430.
- Kleinhans F.W., Seki S., Mazur P., Simple inexpensive attainment and measurement of very high cooling and warming rates, *Cryobiology* 61 (2010) 231–233.

Mazur P., Seki S., Survival of mouse oocytes after being cooled in a vitrification solution to -196°C at 95° to 70,000°C/min and warmed at 610° to 118,000°C/min: A new paradigm for cryopreservation by vitrification, *Cryobiology*, 62 (2011) 1-7.

Petrenko V. F., Whitworth R. W., *Physics of ice*, Oxford University Press, Oxford, 1999.

Seki S., Mazur P., Ultra-Rapid Warming Yields High Survival of Mouse Oocytes Cooled to -196°C in Dilutions of a Standard Vitrification Solution. *PLoS ONE* 7 (4) (2012) e36058.

Sugisaki M., Suga H., Seki S., Calorimetric Study of the Glassy State. IV. Heat Capacities of Glassy Water and Cubic Ice. *Bulletin of the Chemical Society of Japan* 41 (1986) 2591-2599.