

# SIMULAÇÃO NUMÉRICA DE PROCESSOS DE SOLIDIFICAÇÃO EM SISTEMAS BINÁRIOS APLICADOS À CRIOPRESERVAÇÃO DE CÉLULAS

**Cristiano V. da Silva**

Departamento de Engenharia Mecânica – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS.  
Rua Sarmento Leite, 425, 90050-170 - Porto Alegre, RS, Brasil.  
E-mail: cristiano@mecanica.ufrgs.br

**Marcus V. A. Bianchi**

Johns Manville Technical Center, Littleton, CO 80127 – USA.  
E-mail: marcus\_bianchi@yahoo.com

**Resumo.** *A preservação e o armazenamento de células e tecidos têm sido largamente utilizados em pesquisa científica e aplicações clínicas. A compreensão do processo de solidificação de soluções salinas é fundamental para o desenvolvimento de novos protocolos de criopreservação. No presente estudo, o congelamento de uma solução de cloreto de sódio a 1% em massa é simulado. As equações de conservação de massa, quantidade de movimento, energia, e espécies químicas foram discretizadas e resolvidas numericamente utilizando-se o Método dos Volumes Finitos para um domínio bidimensional que contém a parede da bolsa plástica e a solução salina. A perda de água da célula foi calculada a partir da história de temperatura e concentração durante o processo de solidificação e verificou-se que, dependendo da posição inicial da célula na bolsa, a célula tem probabilidades de sobrevivência diferentes durante o processo.*

**Palavras chave:** *Solidificação, Criopreservação, Método dos Volumes Finitos, Células, Desidratação.*

## 1. Introdução

Processos de solidificação são bastante estudados nas mais variadas áreas de pesquisa. Estes processos podem acontecer tanto artificialmente como naturalmente, e possuem uma grande variedade de aplicações. Na indústria siderúrgica, por exemplo, o processo de solidificação de metais é de fundamental importância, pois controla a qualidade e as características dos produtos. Além disso, uma série de processos naturais incluem solidificação, tais como a formação de icebergs, rochas vulcânicas, granizo entre outros.

A preservação e o armazenamento de células biológicas (hemáceas e espermatozóides, por exemplo) vêm sendo muito usados em pesquisa científica e clínica. No entanto há uma contradição entre o conceito de preservação e as conclusões de resultados experimentais, que mostram que materiais criopreservados podem ser danificados durante o próprio processo de preservação. Quando as células são resfriadas a aproximadamente  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$ , tanto a célula quanto o material extracelular permanecem líquidos e super resfriados. Entre  $-5\text{ }^{\circ}\text{C}$  e  $-15\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelo se forma fora da célula, mas seu interior permanece super resfriado, provavelmente porque a membrana da célula bloqueia o crescimento de cristais de gelo no citoplasma (Lunardini, 1981). A água super resfriada no interior da célula tem, por definição, um potencial químico maior do que o da água na solução extracelular parcialmente congelada: assim a água que difunde da célula osmoticamente congela externamente à mesma. O que acontece depois depende da taxa de resfriamento da célula. Se a célula é resfriada muito rapidamente, a água intracelular não difunde tão rapidamente para o meio externo de forma a manter o equilíbrio; a célula se torna cada vez mais super resfriada e, eventualmente, gelo intracelular se forma ocasionando a morte da célula. Se por outro lado a célula é resfriada muito lentamente, a contração (devida à desidratação) e a exposição da célula por longo período de tempo a altas concentrações de eletrólitos (devidas à precipitação de gelo externo) antes que a concentração eutética seja atingida também pode danificar a célula (Mazur, 1984).

A maioria dos trabalhos disponíveis em processos de solidificação aplicados em criopreservação de tecidos, assumem a existência de uma taxa de resfriamento constante incidindo sobre as células, não resolvendo o processo de solidificação da solução, de modo que a validação da modelagem proposta para este trabalho se torna difícil. Entretanto, a validação para a fluido dinâmica e de transferência de calor do processo foi realizada através da simulação de casos bem conhecidos na literatura, obtendo-se bons resultados. A validação da modelagem de solidificação foi feita através da simulação de um caso semelhante ao resolvido por Bianchi e Viskanta (1994), também obtendo boa concordância. Viskanta et al. (1997) mostraram que mesmo considerando uma taxa de resfriamento constante externa à bolsa, a taxa de resfriamento local não é a mesma para todo o domínio, e que células em diferentes posições na bolsa sofrem diferentes variações de volume celular. Os autores apresentaram uma simulação de processos de solidificação de uma solução de cloreto de sódio em água a 1 % em massa, colocados em uma bolsa plástica de parede plana. Com a obtenção dos resultados de temperatura e concentração de sal, utilizam o modelo desenvolvido por Mazur (1963) para calcular a cinética de transporte de água predizendo o comportamento do volume celular. A resolução deste problema

foi feita sobre um domínio unidirecional, incluindo a bolsa, desprezando efeitos de convecção natural para diferentes taxas de resfriamento.

Diversos trabalhos desenvolveram modelos de perda de água das células a baixas temperaturas (Mazur, 1963; Mazur, 1990; Toner et al., 1990; Karlsson e Toner, 1996). Mazur and Koshimoto (2002) apresentam um estudo numérico sobre a cinética da perda de água em espermatozoides de ratos quando estes sofrem um processo de resfriamento com taxas de 250°C/min a 2000°C/min. Neste estudo eles obtiveram curvas de variação de volume celular de uma célula isolada, e submetida a variações de concentração e temperatura prescritas, não resolvendo o processo de solidificação da solução salina. Estas curvas, juntamente com dados experimentais, estimam a temperatura na qual ocorre o início da nucleação de cristais de gelo no interior de células super resfriadas, que por sua vez fornecem dados estatísticos para o início da formação destes cristais como uma função das taxas de resfriamento. Estes dados foram comparados com dados experimentais obtidos a partir de taxas de resfriamento onde sabidamente ocorre a formação de gelo intracelular e apresentaram boa concordância.

Low et al. (2003) realizaram a simulação numérica do processo de resfriamento de uma liga ternária contendo água, cloreto de sódio, agente crioprotetor e células em suspensão, no interior de uma bolsa plástica. O modelo “continuum” foi considerado. A história de temperaturas durante a mudança de fase, a perda de água intracelular e a variação volumétrica das células em diferentes posições são calculadas. Os resultados deste trabalho mostram que mesmo com taxas constantes de resfriamento impostas sobre a parede da bolsa, as células no interior da bolsa em diferentes posições sofrem diferentes taxas de resfriamento, confirmando o que foi dito por Viskanta et al. (1997). As maiores taxas de resfriamento ocorrem em regiões mais internas da bolsa, de modo que a variação do volume celular é dependente da posição na bolsa. Neste trabalho não foi resolvido o campo de concentrações no interior da bolsa.

Em outro trabalho, Mazur et al. (2005-a) realizaram um estudo experimental sobre as causas da formação de gelo intracelular em óvulos de ratos e de sapos, quando estes são submetidos a processos de criopreservação, relacionados à temperatura na qual este gelo começa a se formar. Dando continuação a este trabalho, Mazur et al. (2005-b) apresentaram um estudo experimental sobre o processo de criopreservação de óvulos de ratos em suspensão numa solução salina contendo 1 % e 1,5 % em massa de crioprotetor (etileno glicol). A solução é submetida a uma taxa de resfriamento de -50°C/min até atingir a temperatura de -70°C no final do processo. Eles verificaram que a temperatura na qual ocorre a formação de cristais de gelo extracelular, quando a solução é submetida a estas taxas de resfriamento, é dependente da concentração do crioprotetor. Além disso eles também verificaram que o início e fim da formação destes cristais ocorre em diferentes intervalos de tempo quando diferentes concentrações de crioprotetor são usadas. Nestes trabalhos não foram resolvidos os campos de temperaturas e de concentrações. Uma célula isolada foi analisada, não sendo resolvido o processo de solidificação da solução. Também foi considerado que a taxa de resfriamento imposta na parede da bolsa é a mesma que incide sobre as células dentro da solução.

O presente trabalho tem o objetivo de simular processos de solidificação de soluções salinas para um domínio bidimensional resolvendo as equações de energia, espécies químicas e quantidade de movimento. Os resultados obtidos são aplicados em processos de criopreservação de células, enfocando o problema que surge devido ao fluxo de soluto que ocorre através da membrana celular durante o resfriamento. Não é considerada a formação de gelo intracelular.

## 2. Formulação do modelo

Assumindo coordenadas cartesianas, as equações do modelo “continuum” de mistura compostas pelas equações de conservação de massa, de quantidade de movimento nas direções horizontal ( $x$ ) e vertical ( $y$ ), conservação de energia e de espécies químicas para um sistema de mudança de fase foram previamente desenvolvidas por Bennon e Incropera (1987) e, nestas coordenadas podem ser expressas da seguinte forma:

### 2.1. Conservação de massa

$$\frac{D}{Dt}(\rho_l) = 0 \quad (1)$$

onde  $\rho_l$  é a densidade da fase líquida,  $t$  é o tempo e  $D$  é a derivada material da densidade.

### 2.2. Conservação da quantidade de movimento

Para a direção horizontal,

$$\rho_l \frac{D\bar{V}}{Dt} = \bar{\nabla} \cdot (\mu_l \bar{\nabla} u) - \frac{\mu_l}{K_x}(u) - \frac{\partial P}{\partial x} \quad (2)$$

onde  $\mu_l$  é a viscosidade da fase líquida,  $K_x$  é a permeabilidade na região bifásica (“mushy region”) na sua respectiva direção,  $P$  é a pressão,  $\vec{\nabla}$  é o operador vetorial,  $x$  é a coordenada espacial na direção horizontal e  $u$  é a velocidade nesta direção.

Para a direção vertical

$$\rho_l \frac{D\vec{V}}{Dt} = \vec{\nabla} \cdot (\mu_l \vec{\nabla} v) - \frac{\mu_l}{K_y} (v) - \frac{\partial P}{\partial y} - \rho g [\beta_T (T - T_{in}) + \beta_S (C_l - C_{in})] \quad (3)$$

onde  $T_{in}$  e  $C_{in}$  são a temperatura e concentração inicial,  $\vec{V}$  é o vetor velocidade,  $T$  é a própria temperatura,  $C_l$  é a concentração de sal no líquido e  $C$  a concentração de mistura.  $\beta_T$  e  $\beta_S$  são os coeficientes de expansão térmica e de concentração de soluto, respectivamente. Aqui a permeabilidade da “mushy region” na direção vertical é definida por  $K_y$ ,  $y$  é a coordenada espacial na direção vertical e  $v$  é a velocidade nesta direção.

### 2.3. Conservação de energia

$$\begin{aligned} \rho_l c_\alpha \frac{DT}{Dt} = & \vec{\nabla} \cdot (\kappa_{ef} \vec{\nabla} T) - \vec{\nabla} \cdot [\varepsilon_l \rho_l (c_l - c_\alpha) \vec{V} T] - \vec{\nabla} \cdot [\varepsilon_e \rho_l (c_e - c_\alpha) \vec{V} T] - \vec{\nabla} \cdot [\varepsilon_\alpha \rho_l (h_l - h_\alpha) (\vec{V} - \vec{V}_\alpha)] \\ & - \rho_l \Delta h_{l \rightarrow \alpha} \frac{\partial \varepsilon_l}{\partial t} - \rho_l \Delta h_{e \rightarrow \alpha} \frac{\partial \varepsilon_e}{\partial t} - \frac{\partial}{\partial t} [\varepsilon_l \rho_l (c_l - c_\alpha) T] - \frac{\partial}{\partial t} [\varepsilon_e \rho_l (c_e - c_\alpha) T] \end{aligned} \quad (4)$$

onde  $c$  é o calor específico,  $\varepsilon$  é a fração volumétrica,  $h$  é a entalpia,  $\Delta h_{l \rightarrow \alpha}$  é a variação de entalpia do líquido para o sólido primário  $\alpha$  e  $\Delta h_{e \rightarrow \alpha}$  é a variação de entalpia do sólido eutético para o sólido primário ( $\alpha$ ). A condutividade térmica da mistura é definida como  $\kappa_{ef}$ . Os subíndices  $l, \alpha$  e  $e$  representam as fases líquida, e sólidas  $\alpha$  e eutética.

### 2.4. Conservação de espécies químicas

$$\rho_l c_\alpha \frac{DT}{Dt} = \vec{\nabla} \cdot (\varepsilon_l \rho_l D_l \vec{\nabla} C) - \vec{\nabla} \cdot [\varepsilon_l \rho_l D_l (C_l - C)] - \vec{\nabla} \cdot [\varepsilon_\alpha \rho_l (C_l - C_\alpha) (\vec{V} - \vec{V}_\alpha)] \quad (5)$$

onde  $D_l$  é a difusividade do sal no líquido.

A permeabilidade da “mushy region” que aparece nas equações de momento em  $x$  e  $y$  são baseadas na equação de Kozeny-Carman (Asai e Muchi, 1978).

Considerações inerentes ao modelo de equações apresentado acima: (i) propriedades termofísicas de cada fase constantes, (ii) escoamento laminar, (iii) comportamento newtoniano da fase líquida, (iv) escoamento na região bifásica seguindo a lei de Darcy, (v) permeabilidade isotrópica, (vi) aproximação de Boussinesq para o termo de empuxo, (vii) equilíbrio termodinâmico local, (viii) condutividade térmica efetiva calculada pelo modelo de resistências em paralelo, (ix) difusão de espécies desprezível na fase sólida, (x) coeficiente de partição da mistura igual a zero, (xi) densidade constante e igual a do líquido para evitar problemas de dilatação e contração durante o processo de solidificação. A condição de equilíbrio termodinâmico local permite o uso do diagrama de fase para fornecer a mistura e composições das fases, enquanto que a consideração de densidade constante durante o congelamento implica em desprezar efeitos de deformação das fases.

A equação da cinética da perda de água sofrida pelas células no resfriamento foi derivada em função da temperatura e da concentração do meio, e está definida da seguinte forma (Mazur, 1990):

$$\frac{dV}{dt} = L_p A \bar{R} T [(1 - C_{l,i}) - (1 - C_{e,i})] \quad (6)$$

onde a concentração de soluto intracelular  $C_{l,i}$  pode ser considerada constante para cada tipo de célula, e a concentração de soluto extracelular  $C_{e,i}$  é consequência dos fenômenos físicos que ocorrem no meio externo. No presente trabalho esta concentração é determinada pelo processo de solidificação. Na equação acima a variável  $A$  representa a área superficial de uma célula esférica,  $\bar{R}$  é a constante molar dos gases ideais,  $V$  é o volume de água intracelular, e  $L_p$  a permeabilidade hidráulica da membrana celular que é definida como:

$$L_p = L_p^g \exp \left[ \frac{-E^*}{R} \left( \frac{1}{T} - \frac{1}{T_g} \right) \right] \quad (7)$$

onde  $L_p^g$  é o coeficiente de permeabilidade hidráulica na temperatura de referência  $T_g$ , e  $E^*$  é a energia de ativação da penetração de água.

As equações diferenciais referentes ao modelo de mistura são discretizadas através do Método dos Volumes Finitos (Patankar, 1980). Deste modo as equações de conservação de espécies e de energia são acopladas com o modelo de mudança de fase (Bianchi, 1997), e a equação de energia acoplada também com as equações de quantidade de movimento, através dos termos de empuxo. A resolução do algoritmo para os valores nodais das frações volumétricas também necessita ser desenvolvida. Os valores dos fatores de relaxações usados na resolução das equações de energia, espécies e quantidade de movimento foram de 0,5, 0,7, e 0,5 respectivamente. Foi utilizado um coeficiente de subrelaxação para a correção da pressão de 0,8. O sistema de equações algébricas em volumes finitos obtido pelo procedimento de discretização foi resolvido usando o TDMA – “Tri-Diagonal Matrix Algorithm”, linha por linha, fazendo ainda uso da técnica de correção em bloco (Patankar, 1980; Maliska, 2003). O acoplamento pressão-velocidade foi resolvido pelo algoritmo SIMPLE – “Semi-Implicit Method for Pressure Linked Equations” também apresentado por Patankar (1980). A discretização dos termos de fonte da equação de conservação de espécies químicas foi baseada no trabalho de Prakash e Voller (1989). Já para as equações de energia e quantidade de movimento os termos de fonte foram discretizados em diferenças finitas, segundo Patankar (1980).

Para a resolução deste problema, após realizados testes de independência de malha, utilizou-se uma malha 100 volumes na direção horizontal por 90 volumes na direção vertical. O problema é resolvido de forma transiente, e os resultados de temperatura, velocidade, e concentração de espécies químicas são usados para o cálculo da cinética da perda de água das células através da Eq. (6). Esta equação foi resolvida através de integração utilizando-se a Regra do Trapézio (Hoffman, 1992).

Considera-se uma bolsa plástica retangular, na qual se encontra uma solução de cloreto de sódio em água, contendo células em suspensão. A fim de preservar as células presentes na solução, a bolsa é resfriada externamente com uma taxa de resfriamento controlada. O processo de solidificação se inicia, desprezando-se efeitos de não-equilíbrio, e eventualmente toda a solução já completamente solidificada, incluindo as células presentes na bolsa, atingem temperaturas baixas o suficiente para que virtualmente não haja reações químicas.

O foco do presente trabalho é o processo de solidificação e as conseqüências deste na sobrevivência das células. O problema então é, dada a geometria da bolsa, calcular a distribuição de temperaturas e de concentrações, e também campo de velocidades para se saber a posição das células a cada instante, para poder determinar a taxa de perda de água das células, e com isso o nível de sobrevivência das mesmas dentro da bolsa. Então idealiza-se a bolsa plástica, onde estão depositadas as células, como sendo uma cavidade bidimensional simétrica na direção horizontal, de largura  $2X_L$  e altura  $Y_L$ , como está mostrado na Fig. 1.  $e_L$  é a espessura da bolsa plástica.

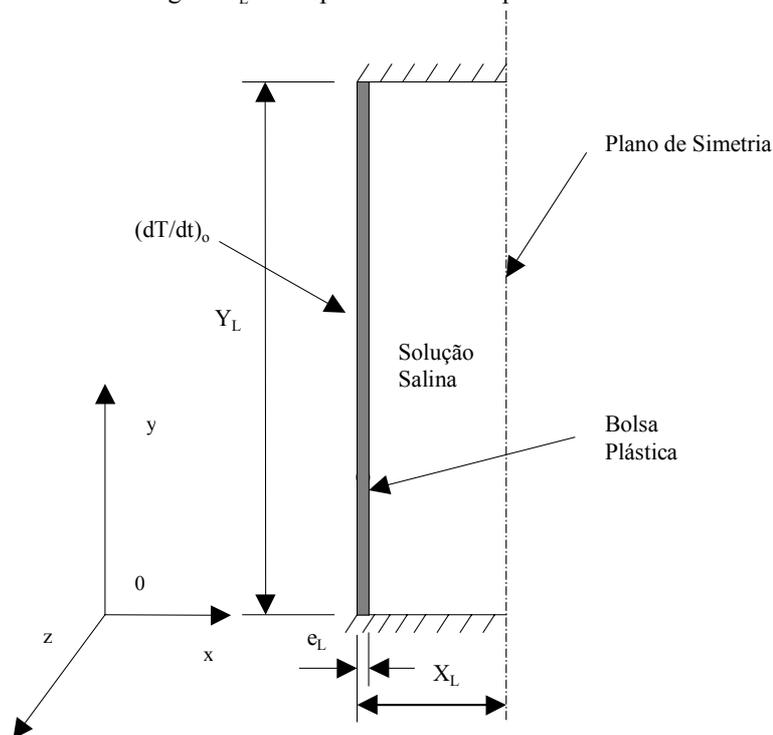


Figure 1. Bolsa plástica utilizada no processo de resfriamento (Meio domínio, contendo parede da bolsa).

As simulações foram desenvolvidas para dois casos, em ambos considerando-se a simetria do problema. Para estes dois casos a concentração de sal da solução é de 1% em massa. Para o caso I utiliza-se uma taxa de resfriamento constante de  $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  aplicada sobre a parede externa da bolsa, sendo a temperatura da solução salina igual a  $2^{\circ}\text{C}$ . Para o caso II utiliza-se a mesma taxa de resfriamento constante de  $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$  aplicada sobre a bolsa, sendo a temperatura da solução salina alterada para  $20^{\circ}\text{C}$ .

As propriedades termofísicas de soluções salinas, e demais grandezas usadas na resolução do problema foram retiradas de várias fontes (Bianchi e Viskanta, 1994; Mazur, 1963; Gebhart et al., 1988; Zaytsev e Aseyev, 1992), e estão compiladas nas Tabs. 1 e 2.

Tabela 1. Propriedades termofísicas das fases sólida, líquida e eutética.

Propriedades	Fase líquida ( <i>l</i> )	Fase Sólida ( $\alpha$ )	Fase Sólida (Eutética - <i>e</i> )
$c$ [kJ/kgK]	3911	1945	1690
$\rho$ [kg/m <sup>3</sup> ]	1007	1530	1530
$k$ [W/mK]	0,562	2,285	1,910
$D$ [m <sup>2</sup> /s]	$1,611 \times 10^{-9}$	-	-
$\mu$ [Pa/s]	$1,814 \times 10^{-3}$	-	-

Tabela 2. Propriedades termofísicas e grandezas usadas na resolução do problema.

Propriedades	Magnitude	Propriedades	Magnitude
$X_L$ [m]	$9,5 \times 10^{-3}$	$\Delta h_{l \rightarrow \alpha}$ [J/kg]	$333,7 \times 10^2$
$Y_L$ [m]	0,1	$\Delta h_{e \rightarrow \alpha}$ [J/kg]	$333,4 \times 10^2$
$e_L$ [m]	$5 \times 10^{-4}$	$k_{eff}$ [W/m K]	62,9
$\beta_T$ [1/K]	$1,968 \times 10^{-5}$	$\bar{R}$ [ $\mu\text{m}^3$ Pa/mol K]	$83,144 \times 10^{-5}$
$\beta_S$ [-]	$7,968 \times 10^{-3}$	$A$ [ $\mu\text{m}^2$ ]	3,04
$K_0$ [m <sup>2</sup> ]	$5 \times 10^{-11}$	$E^*$ [J/mol]	58,61
$g$ [m/s <sup>2</sup> ]	9,81	$V$ [ $\mu\text{m}^3$ ]	2,775
$T_{eut}$ [ $^{\circ}\text{C}$ ]	-21,1	$L_p^g$ [ $\mu\text{m}/\text{s Pa}$ ]	$1,095 \times 10^{-7}$
$T_{in}$ [ $^{\circ}\text{C}$ ]	2 ou 20	$T_g$ [K]	273,15
$C_{eut}$ [%]	23,3	$C_{in}$ [%]	1

### 3. Resultados

Para todos os casos é de fundamental importância verificar o posicionamento das células a cada instante de tempo, pois uma determinada célula pode percorrer um determinado caminho dentro da bolsa, e outra célula um caminho diferente, e com isso passar por histórias de temperaturas e concentrações também diferentes e terem logicamente, níveis de desidratação diferenciados.

A Fig. 2 mostra qualitativamente a situação para o tempo de solidificação de 250 segundos. Note que neste momento já existe fase eutética precipitada, uma vez que a linha “solidus” já percorreu parte do domínio, como pode ser visto na Fig. 2-d. Como a fase líquida, fora da região bifásica, tem uma espessura muito reduzida, as velocidades começam a ficar menores devido a presença da “mushy region”. É possível verificar que a recirculação envolve a “mushy region”, que tem uma permeabilidade menor, de forma a também diminuir a magnitude das velocidades. Como seria de esperar, o problema é unidirecional, ou seja, as linhas “liquidus” e “solidus” são planas. Embora a temperatura da parede  $-23^{\circ}\text{C}$  já seja inferior à temperatura do eutético  $-21,1^{\circ}\text{C}$ , a espessura de plástico funciona como um isolante térmico, causando um forte gradiente de temperatura no polietileno. É possível notar que na maior parte do domínio as velocidades são verticais, de forma que a linha “liquidus” se mantém plana, como pode ser visto na Fig. 2-d. Apenas próximo às paredes horizontais há componentes não verticais da velocidade. As isotermas e as isoconcentrações são verticais e acopladas entre si, uma vez que a difusividade de espécies químicas é pequena se comparada à difusividade térmica.

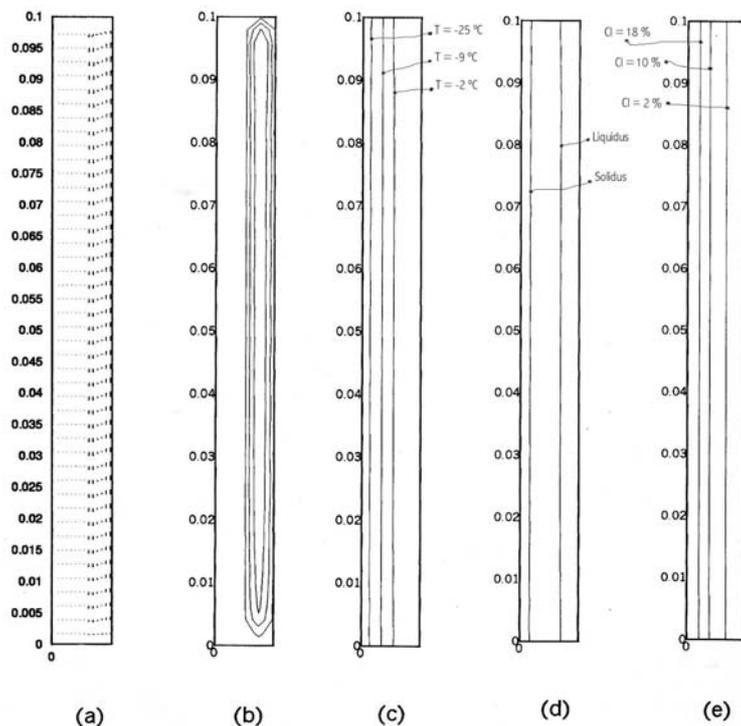


Figura 2 - Comportamento do processo de solidificação em  $t = 250$  s para o caso I: (a) Vetores velocidade, (b) Função de corrente, (c) Isotermas, (d) Posição da região bifásica, (e) Isoconcentrações.

A Fig. 3 mostra qualitativamente o comportamento do processo de solidificação para o tempo de 150 segundos.

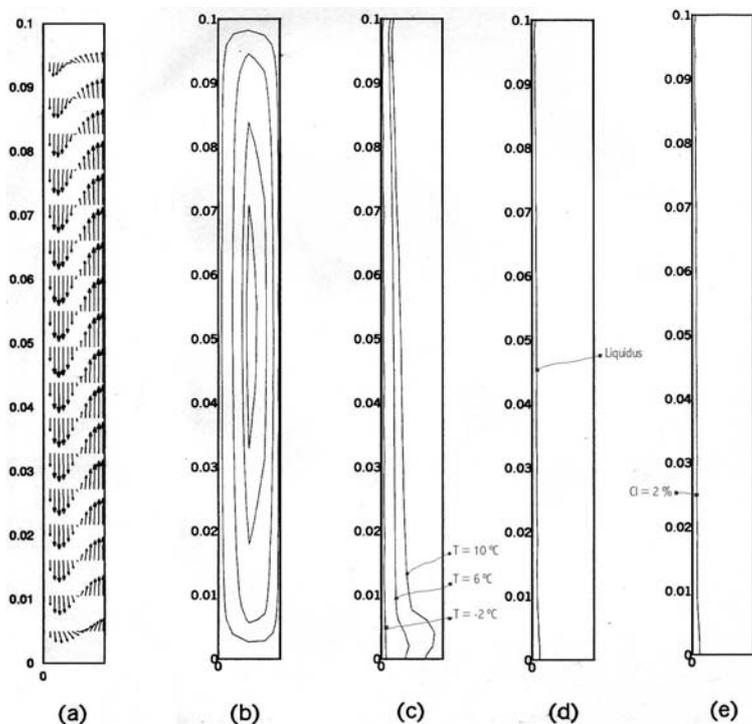


Figura 3 - Comportamento do processo de solidificação em  $t = 150$  s para o caso II: (a) Vetores velocidade, (b) Função de corrente, (c) Isotermas, (d) Posição da região bifásica, (e) Isoconcentrações.

Embora pareçam verticais na maior parte do domínio, as velocidades junto ao polietileno tem um componente horizontal na direção positiva de  $u$ . Observe também que os perfis de velocidade são diferentes dependendo da altura no domínio (Fig. 3-a). Como a advecção se torna importante devido à maior diferença de temperatura, note que para

este caso começam a aparecer deformações nas isotermas e linha “liquidus” (Fig. 3-c, e Fig. 3-d). A inclinação que aparece nestas figuras, é resultado da ação dos termos de empuxo. Devido à interação de líquido mais quente com a região bifásica no alto do domínio, a espessura desta região é menor naquela localidade do que seria se não houvesse escoamento. Note que na Fig. 3-c as duas isotermas mais à direita estão ainda na região líquida, uma vez que a temperatura “liquidus” é de  $-0,63^{\circ}\text{C}$ . É evidente, então, que há um resfriamento local nesta região devido ao escoamento que vem da região bifásica, que se encontra mais fria do que o líquido. É possível verificar que este mesmo escoamento altera o perfil de concentrações na Fig. 3-d.

As Figs. 4-a e 4-b mostram as trajetórias de algumas células depositadas na bolsa para os casos I e II, respectivamente, com referência à posição vertical inicial  $y/Y_L = 0,32$ . Pode-se observar que existe uma variação considerável da posição das células na direção  $y$  a partir da posição inicial. Já na direção  $x$  tem-se para a célula (42,30) que equívale as posições adimensionais ( $x/X_L = 0,18$ ;  $y/Y_L = 0,31$ ) um deslocamento quase despercebido com relação à variação de deslocamento na direção  $y$ , enquanto que para as demais células analisadas nesta figura não existe variação de posicionamento no sentido horizontal da bolsa. Note que as células (22,30), (42,30) e (62,30) que possuem posições adimensionais (0,18;0,31), (0,38;0,31), e (0,59;0,31), respectivamente, possuem uma trajetória descendente, enquanto que a célula (82,30) que equívale a (0,79;0,31) possui uma trajetória inversa. As células mais distantes da parede fria têm um movimento ascendente, enquanto as mais próximas têm um movimento descendente na maior parte do tempo de solidificação. No caso II pode-se melhor verificar a influência da convecção natural no processo de resfriamento.

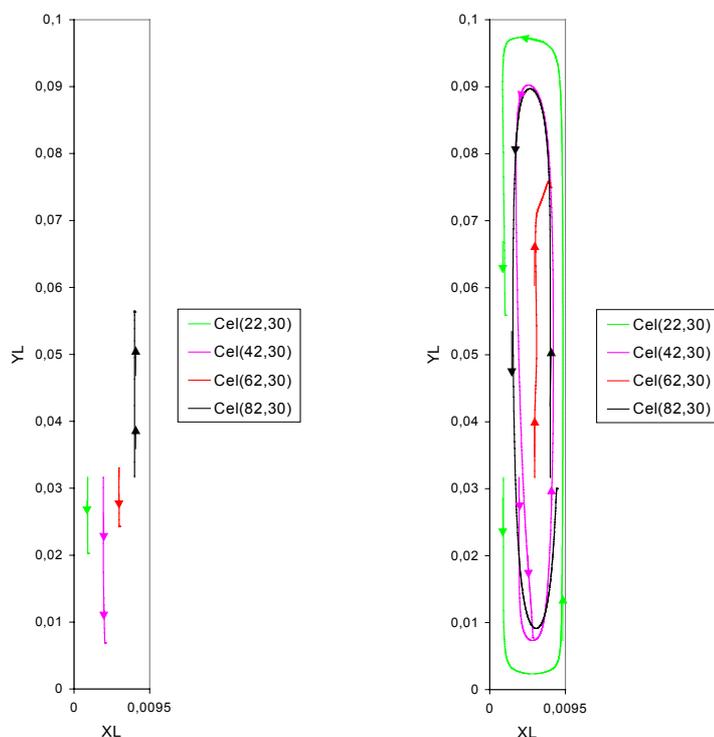


Figura 4 - Trajetória das células sobre o domínio durante o processo de resfriamento referente à posição inicial  $y/Y_L = 0,32$ : (a) Caso I, (b) Caso II.

Como um resultado final do processo de criopreservação de células pode-se observar nas Figs. 5-a e 5-b como foi o comportamento geral das células em relação a variação do volume intracelular devido a perda de água sofrida durante o processo para os casos I e II, respectivamente. Esta figura apresenta o volume final das células com relação à posição inicial destas células. Pode-se verificar na Fig. 5-a que a variação de volume celular não é homogênea para as diferentes posições iniciais das células. É possível notar que para valores de  $y/Y_L$  entre 0,2 e 0,7, as variações no perfil de variação de volume são muito pequenas, como se mostrou na Fig. 5-a. Por outro lado, fora deste intervalo vertical, nas partes inferiores e superiores a ele há diferenças maiores. É para estas células que os efeitos de advecção causada pela convecção natural são mais significativos. Na parte inferior, as células tendem a passar mais tempo por regiões de baixa

concentração de sal, uma vez que elas acompanham o escoamento, primeiramente mais horizontal até fazer o contorno e subir ao longo do eixo de simetria. Esta região demora mais a solidificar. Assim, as perdas de água são menores, como pode ser visto pela maior região de tonalidade vermelha. Na parte superior, por outro lado, acontece o oposto, uma vez que as células que ali se encontram percorrem o domínio na direção da frente de solidificação. Como ali as concentrações são maiores, há uma maior perda de água, ocasionando na maior diminuição de volume, como pode ser constatado pela região mais azulada no alto à esquerda.

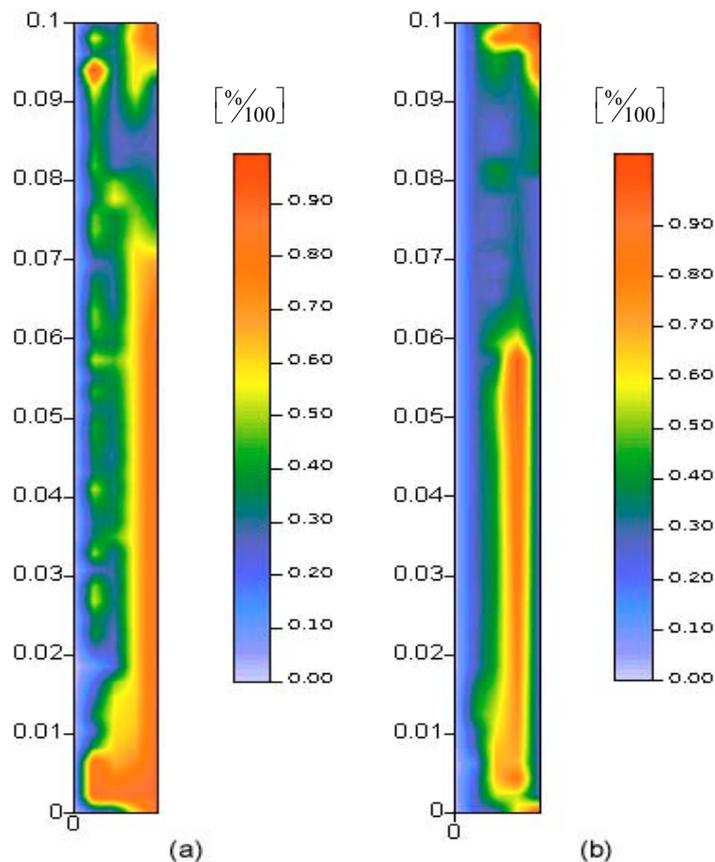


Figura 5 - Variação de volume celular dentro da bolsa, relacionadas as suas posições iniciais, ao final do processo de resfriamento: (a) Para o caso I, (b) Para o caso II.

Na Figura 5-b está ilustrada a variação do volume celular para o caso II na posição inicial das células na bolsa. Embora haja semelhanças com a figura correspondente do caso I (Fig. 5-a), há diferenças evidentes. Note primeiramente a região vermelha completamente envolvida por regiões onde a variação de volume foi maior, que se estende entre  $0 < \frac{y}{Y_L} < 0,6$ . Este volume de líquido teve uma variação de concentrações menor do que o restante do domínio, de forma que as taxas de perda de água foram conseqüentemente menores. Uma outra região na parte superior direita da bolsa também apresenta menores taxas de perda de água.

#### 4. Conclusões

Baseado nas investigações do processo de solidificação, as seguintes conclusões podem ser apresentadas:

1. Para uma temperatura inicial de 2°C e taxa de resfriamento considerada, -10°C/min, os efeitos das forças de empuxo são praticamente inexistentes e o problema pode ser considerado como unidirecional.
2. A distribuição de concentração também é afetada pela taxa de resfriamento, pois esta é fortemente dependente da temperatura. Quanto se tem um menor gradiente de temperatura, tem-se uma maior região ocupada com solução salina de concentração diferente e maior que a inicial.
3. As forças de empuxo passam a ter alguma influência nas distribuições de temperatura e concentração quando a temperatura inicial é elevada para 20°C. Neste caso, as linhas “liquidus” e “solidus” deixam de ser verticais e há um acúmulo de líquido frio com maior concentração de sal na parte inferior do domínio. Uma solução considerando o domínio unidimensional levaria a resultados questionáveis.

O problema de encolhimento por desidratação (crenação), que acontece devido ao fluxo de água através da membrana celular durante o processo de criopreservação de células foi estudado neste trabalho para os dois casos previamente descritos.

Baseado nos resultados obtidos pode-se escrever as seguintes conclusões:

- 1- Mesmo quando a advecção é desprezível, a variação do volume celular não é a mesma para todas as posições da bolsa. A taxa de resfriamento local varia para cada posição e é diferente da taxa de resfriamento imposta sobre a parede externa da bolsa seja constante.
- 2- Quanto maior for a taxa de resfriamento menor é a variação do volume celular, e pode-se dizer que maior é o nível de sobrevivência das células na bolsa. Para ambos os casos as células mais ao centro da bolsa obtiveram uma menor perda de água.
- 3- Quando a advecção é importante, o escoamento leva as células a regiões com diferentes temperaturas e concentrações. Assim, a perda de água da célula depende fortemente da posição inicial da célula no domínio.

## 5. Referências

- Asai, S. e I. Muchi (1978), Theoretical analysis and model experiments on the formation mechanism of channel-type segregation, Transactions ISIJ 18, pp.90–98.
- Bennon, W. D. e F. P. Incropera (1987), A continuum model for momentum, heat and species transport in binary solid-liquid phase change systems - I. model formulation, International Journal of Heat and Mass Transfer 30, pp. 2161–2170.
- Bianchi, M. V. A. (1997), Crystal Morphology and Gas Evolution during Solidification Processes, PhD thesis, Purdue University, West Lafayette, Indiana.
- Bianchi, M. V. A. e R. Viskanta (1994), On the morphology of ice crystals grown from ammonium chloride solutions, in Proceedings of the ASME International Mechanical Engineering Congress and Exposition, Vol. HTD 284, ASME, New York, pp. 323–331.
- Gebhart, B., Y. Jaluria, R. L. Mahajan e B. Sammakia (1988), Buoyancy-Induced Flows and Transport, Hemisphere, Washington.
- Hoffman, J. D. (1992), Numerical methods for engineers and scientists, McGraw-Hill, Inc.
- Karlsson, J. O. M. e M. Toner (1996), Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues, Biomaterials 17 (3), pp. 243–256.
- Low, D. W., L. Q. He, S. X. Cheng, J. P. Yu, e D.Y. Gao (2003). A numerical Study of cell behaviour in a ternary solution during the freezing process. *Cryoletters* 24 (3), pp. 161-170.
- Lunardini, V. J. (1981), Heat Transfer in Cold Climates, Liton, New York.
- Maliska, C. R. (2003), Transferência de Calor e Mecânica dos Fluidos Computacional, 2<sup>nd</sup> ed, Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., Rio de Janeiro, Brasil.
- Mazur, P. (1963), Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing, J. Gen. Physiol. 47, pp. 347–369.
- Mazur, P. (1984), Freezing of living cells: Mechanisms and implications', Cell Biophysics 17, 53–92.
- Mazur, P. (1990), Equilibrium, quasi-equilibrium, and non-equilibrium freezing of mammalian embryos, Am. J. Physiology. 16, pp.125–142.
- Mazur, P. e C. Koshimoto (2002). Is Intracellular Ice Formation the Cause of Death of Mouse Sperm Frozen at High Cooling Rates? *Biology of Reproduction*, 66, pp. 1485–1490.
- Mazur, P., S. Shinsuke, L. P. Irina, F.W. Kleinhans e E. Keisuke (2005-a). Extra- and intracellular ice formation in mouse oocytes. *Cryobiology* 51, pp. 29-53.
- Mazur, P., L. P. Irina, S. Shinsuke, F.W. Kleinhans e E. Keisuke (2005-b). Effects of hold time after extracellular ice formation on intracellular freezing of mouse oocytes. *Cryobiology* 51, pp. 235-239.
- Patankar, S. V. (1980), Numerical Heat Transfer and Fluid Flow, Hemisphere, New York.
- Prakash, C. e V. Voller (1989), On the numerical solution of continuum mixture model equations describing binary solid-liquid phase change, Numerical Heat Transfer 15, pp. 171–189.
- Toner, M., E. G. Cravalho e M. Karel (1990), Thermodynamics and kinetics of intracellular ice formation during freezing of biological cells', J. Appl. Phys. 67(3), pp. 1582–1593.
- Viskanta, R., M. V. A. Bianchi, J. K. Critser e D. Gao (1997), Solidification processes of solutions, Cryobiology 34, pp. 348–362.
- Zaytsev, I. D. e G. G. Aseyev, (1992), Properties of Aqueous Solutions of Electrolytes, CRC Press, Boca Raton.

**NUMERICAL SIMULATION OF THE SOLIDIFICATION OF BINARY SOLUTIONS APPLIED TO CRYOPRESERVATION OF BIOLOGICAL MATERIAL**

Cristiano V. da Silva

Department of Mechanical Engineering – UFRGS. Rua Sarmento Leite, 425, 90050-170

Porto Alegre, RS, Brazil.

E-mail: cristiano@mecanica.ufrgs.br

Marcus V. A. Bianchi

Johns Manville Technical Center, Littleton, CO 80127 – USA.

E-mail: marcus\_bianchi@yahoo.com

**Abstract.** Cryopreservation and banking of biological cells and tissue have been widely utilized in scientific research and clinical applications. Understanding of the solidification process of salt solutions is crucial to develop successful cryopreservation protocols. In the present study, freezing of a sodium chloride solution (1%) in a flat bag is simulated. Mass, momentum, energy, and species conservation equations were numerically solved using the Control Volume Method in a two-dimensional domain. Then, using the temperature and salt concentration data calculated, the kinetics of water loss from a model cell is predicted. The results show that, depending on the initial position of the cell in the bag, the history of water loss varies, and so does the cell preservation.

**Keywords:** Solidification, Cryopreservation, Control Volume Method, Cell, Mushy Region.