

**UNIVERSIDADE DO VALE DO RIO DOS SINOS - UNISINOS
UNIDADE ACADÊMICA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA MECÂNICA
NÍVEL MESTRADO**

GUILHERME DAHMER STEFFENON

**ESTUDO DA EVAPORAÇÃO DE FILME FINO DE NITROGÊNIO:
UMA METODOLOGIA DE VITRIFICAÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE
MATERIAL BIOLÓGICO**

**São Leopoldo
Setembro de 2022**

GUILHERME DAHMER STEFFENON

**ESTUDO DA EVAPORAÇÃO DE FILME FINO DE NITROGÊNIO:
UMA METODOLOGIA DE VITRIFICAÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE
MATERIAL BIOLÓGICO**

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção do título de Mestre em
Engenharia Mecânica, pelo Programa de Pós-
Graduação em Engenharia Mecânica da
Universidade do Vale do Rio dos Sinos -
UNISINOS

Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline Biancon Copetti

Co orientador: Prof. Dr. Jeferson Diehl de Oliveira

São Leopoldo
Setembro de 2022

S817e

Steffenon, Guilherme Dahmer.

Estudo da evaporação de filme fino de nitrogênio : uma metodologia de vitrificação para criopreservação de material biológico / Guilherme Dahmer Steffenon. – 2022.

73 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, 2022.

“Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline Biancon Copetti

Co orientador: Prof. Dr. Jeferson Diehl de Oliveira.”

1. Criopreservação. 2. Vitrificação. 3. CFD. 4. Evaporação de filme fino. I. Título.

CDU 66.0:544.3

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Bibliotecária: Amanda Schuster – CRB 10/2517)

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu pai Rogério, a minha mãe Carla, minha irmã Jacqueline e todos os demais familiares que me apoiaram e motivaram durante essa jornada.

Agradeço ao apoio da professora Jacqueline que me orientou ao longo desse período e me auxiliou nesse novo ramo de estudos que visa encontrar soluções que podem ajudar as pessoas no futuro.

Agradeço aos colegas de curso e bolsistas da faculdade que me auxiliaram ao longo de toda a pesquisa.

Agradeço a Hemocord por apoiar financeiramente o projeto e auxiliar com prontidão todas as necessidades presentes no trabalho.

Agradeço a Unisinos por disponibilizar um ambiente favorável para desenvolver esse trabalho tanto experimentalmente como numericamente.

RESUMO

A criopreservação celular é um ramo da ciência que descreve metodologias para conservar células vivas através do congelamento e conservação em temperaturas negativas. Tendo isso em vista, algumas pesquisas estudam o processo de congelamento celular das mais diferentes maneiras, podendo ele ser classificado entre congelamento lento e rápido (vitrificação). Com isto, o presente trabalho visa estudar experimentalmente o método de vitrificação por evaporação de filme fino de nitrogênio para criopreservação celular. Este estudo conta com uma comparação experimental entre o método de evaporação de filme fino e o método de imersão, utilizando nitrogênio líquido como refrigerante e água como amostra em ambos os casos. O estudo experimental utilizou diferentes seções de testes, com diferentes dimensões e composições, visando identificar o melhor layout para otimizar a taxa de resfriamento. Além do estudo experimental, o trabalho também desenvolveu uma metodologia numérica para descrever o processo estudado por meio de simulações computacionais em CFD utilizando o *software* Ansys Fluent ®. A simulação numérica estudada considerou uma geometria em 2D, utilizando método de turbulência $k-\omega$ e solidificação para simular todos os processos que ocorrem na evaporação de filme fino. Os resultados experimentais encontrados apresentaram uma maior taxa de congelamento nos métodos de imersão, apresentando valores de aproximadamente 900°C/min. Já o método de evaporação de filme fino, no melhor caso estudado encontrou cerca de 500 °C/min. Por fim, a simulação numérica também conseguiu prever o início do processo de congelamento, demonstrando os perfis de escoamento de nitrogênio, variação de temperatura e o processo de solidificação da amostra.

Palavras-chave: Criopreservação, Vitrificação, CFD, Evaporação de Filme Fino.

ABSTRACT

Cell cryopreservation is a branch of science that describes methodologies to preserve living cells through freezing and conservation at negative temperatures. With this in mind, some researchers study the process of cellular freezing in the most different ways, and it can be classified between slow and fast freezing (vitrification). So the present work aims to experimentally study the method of vitrification by thin film evaporation of nitrogen for cellular cryopreservation. This study has an experimental comparison between the thin film evaporation method and the immersion method, using liquid nitrogen as coolant and water as a sample in both cases. The experimental study used different test sections, with different dimensions and compositions, in order to identify the best layout to optimize the cooling rate. In addition to the experimental study, the work also developed a numerical methodology to describe the process studied through computer simulations in CFD using Ansys Fluent ® software. The numerical simulation studied considered a 2D geometry, using $k-\omega$ turbulence method and solidification method to simulate all the processes that occur in thin film evaporation. The experimental results showed a higher freezing rate in the immersion methods, presenting values of approximately $900^{\circ}\text{C}/\text{min}$. The thin film evaporation method, in the best case studied, found a freezing rate of $500^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Finally, the numerical simulation was also able to predict the beginning of the freezing process, demonstrating the nitrogen flow profiles, temperature variation and the solidification process of the sample.

Key-words: Cryopreservation, Vitrification, CFD, Thin Film Evaporation.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 2.1 – Esquema do processo de criopreservação de esperma..... | 17 |
| Figura 2.2 – Tipos de crioinjúrias..... | 19 |
| Figura 2.3 – Esquema do processo de criopreservação por congelamento lento | 23 |
| Figura 2.4 – Número de citações de vitrificação acumuladas entre 1980 e 2014. | 24 |
| Figura 2.5 – Dispositivo do método <i>Cryoloop</i> para a vitrificação de blastócitos | 26 |
| Figura 2.6 – Imagens do dispositivo para o método <i>Cryoloop</i> | 26 |
| Figura 2.7 – Método do <i>Open Pulled Straw</i> (OPS)..... | 28 |
| Figura 2.8 – Fotos dos ovócitos nas grades de cobre microscópicas antes do resfriamento em LN2 (a) e depois do reaquecimento após preservação (b)..... | 30 |
| Figura 2.9 – Variação do coeficiente de transferência de calor com o fluxo de calor para diferentes espessuras das espumas de cobre (a) e de níquel (b) | 36 |
| Figura 3.1 – Diagrama da bancada experimental de congelamento por evaporação de filme de nitrogênio..... | 37 |
| Figura 3.2 – Aparato experimental (sem os instrumentos de medição). | 38 |
| Figura 3.3 – Evaporador com placas lisas de cobre | 38 |
| Figura 3.4 – Evaporador com placa de cobre e superfície porosa de níquel | 39 |
| Figura 3.5 – Aparato experimental com os instrumentos de medição acoplados..... | 40 |
| Figura 3.6 – Molduras em PLA para a amostra (a); Peças de superfície de cobre e espuma metálica do evaporador B, antes e pós congelamento (b); Peças do evaporador C, antes e pós congelamento (c). | 41 |
| Figura 3.7 – Evaporador A: Placa de cobre e amostra (a), Evaporador B: Placa de cobre revestida com espuma de níquel e amostra (b) e Evaporador C: Placa de cobre revestida com espuma de níquel e amostra no PDMS (c) | 42 |
| Figura 3.8 – Imagem do vapor de nitrogênio entrando em contato com o evaporador..... | 42 |
| Figura 3.9 – Placa de cobre com espuma metálica porosa de níquel | 44 |
| Figura 3.10 – Condicionamento do evaporador na câmara de testes | 44 |
| Figura 3.11 – Diagrama do experimento do método por imersão em LN2..... | 45 |
| Figura 3.12 – Bancada de testes do congelamento por imersão | 46 |
| Figura 3.13 – Seções de teste utilizadas no método de imersão: Evaporador A (a) e Cápsula de PDMS (b)..... | 46 |
| Figura 3.14 – Domínio do sistema evaporador e bocal do jato de nitrogênio para simulação computacional..... | 47 |

| | |
|---|----|
| Figura 3.15 – Geometria 2D desenvolvida para a simulação | 48 |
| Figura 3.16 – Malha gerada para a simulação | 48 |
| Figura 3.17 – Malha aproximada da região de transição..... | 49 |
| Figura 3.18 – Malha da simulação no software <i>Ansys Fluent</i> | 50 |
| Figura 4.1 – Comportamento da temperatura e pressão durante o congelamento com o evaporador B..... | 52 |
| Figura 4.2 – Comportamento da temperatura para os 3 testes durante o congelamento da amostra no evaporador B | 53 |
| Figura 4.3 – Comportamento da temperatura e pressão durante o congelamento com evaporador C | 54 |
| Figura 4.4 – Comportamento da temperatura para os 3 testes durante o congelamento da amostra no evaporador C | 55 |
| Figura 4.5 – Variação da temperatura no resfriamento de amostras no evaporador B e o evaporador C através da evaporação de filme fino..... | 56 |
| Figura 4.6 – Cápsula de PDMS após o congelamento por imersão | 57 |
| Figura 4.7 – Evaporador A após o congelamento por imersão | 58 |
| Figura 4.8 – Comportamento da temperatura no congelamento por imersão com amostra em cápsula de PDMS | 58 |
| Figura 4.9 – Comportamento da temperatura no congelamento por imersão do evaporador A | 59 |
| Figura 4.10 – Comparativo de resfriamento entre o evaporador A e o PDMS através da imersão em nitrogênio líquido | 60 |
| Figura 4.11 – Comparativo entre métodos para a cápsula de PDMS | 61 |
| Figura 4.12 – Comparativo entre métodos para evaporador A (imersão) e evaporador A (jato de nitrogênio) | 62 |
| Figura 4.13 – Comportamento da temperatura durante o congelamento da amostra no evaporador A | 63 |
| Figura 4.14 – Variação da temperatura da amostra no congelamento para diferentes títulos de vapor de nitrogênio..... | 64 |
| Figura 4.15 – Variação da temperatura da amostra no congelamento para diferentes títulos de vapor de nitrogênio para cada ponto do experimento com erros médios relativos | 65 |
| Figura 4.16 - Variação da temperatura da amostra no congelamento para diferentes velocidades de entrada de nitrogênio | 65 |

| | |
|--|----|
| Figura 4.17 - Variação da temperatura da amostra no congelamento para diferentes velocidades de entrada de nitrogênio para cada ponto do experimento com erros médios relativos..... | 66 |
| Figura 4.18 – Perfil de temperatura da simulação no instante 0,01 s..... | 68 |
| Figura 4.19 – Perfil de temperatura da simulação no instante 0,5 s..... | 69 |
| Figura 4.20 – Perfil de solidificação da amostra ao longo do tempo | 69 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 2.1 – Vantagens e desvantagens dos métodos de criopreservação | 20 |
| Tabela 2.2 – Tipos e exemplos de ACPs | 21 |
| Tabela 3.1 – Evaporadores utilizados nos testes de congelamento por evaporação de filme fino de nitrogênio | 43 |
| Tabela 3.2 – Propriedades físicas da espuma porosa de níquel..... | 44 |
| Tabela 4.1 – Comparativo do resfriamento por evaporação de filme fino | 55 |
| Tabela 4.2 – Comparativo do resfriamento por imersão | 59 |
| Tabela 4.3 – Erro médio relativo para as simulações com variação de vapor de nitrogênio ... | 67 |
| Tabela 4.4 – Erro médio relativo para as simulações com variação de velocidade de entrada de nitrogênio..... | 67 |

LISTA DE SÍMBOLOS

| | | |
|-----------------------------|---|-----------------------------------|
| \vec{v}_p | Velocidade do sólido devido as forças de tração | [m/s] |
| $\frac{\Delta T}{\Delta t}$ | Taxa de resfriamento | [°C/min] |
| Γ_k | Difusividade efetiva de k | [m ² /s] |
| Γ_ω | Difusividade efetiva de ω | [m ² /s] |
| A_{mush} | Constante de zona mole definida pelo usuário | [kg/m ³ s] |
| \vec{F} | Força de campo | [N] |
| G_b | Termo de flutuabilidade de k | [W/m ³] |
| G_k | Geração de turbulência de energia cinética | [W/m ³] |
| G_ω | Geração de turbulência da taxa de dissipação específica | [W/m ³] |
| $G_{\omega b}$ | Termo de flutuabilidade de ω | [W/m ³] |
| S_k | Termo fonte de k | [kg/m ³ s] |
| S_m | Termo fonte de massa adicionada a fase contínua | [kg/m ³ s] |
| S_ω | Termo fonte de ω | [kg/m ³ s] |
| T_{final} | Temperatura do evaporador no instante final do resfriamento | [°C] |
| $T_{inicial}$ | Temperatura do evaporador no instante inicial do resfriamento | [°C] |
| Y_k | Dissipação de k em função da turbulência | [m ² /s ²] |
| Y_ω | Dissipação de ω em função da turbulência | [m ² /s ³] |
| \vec{g} | Gravidade | [m/s ²] |
| t_{final} | Tempo no instante final do resfriamento | [min] |
| $t_{inicial}$ | Tempo no instante inicial do resfriamento | [min] |
| \vec{v} | Velocidade do fluido | [m/s] |
| v_r | Velocidade radial | [m/s] |
| v_x | Velocidade axial | [m/s] |
| $\bar{\tau}$ | Tensor de estresse | [N/m ²] |
| ΔT | Variação de temperatura durante o resfriamento | [°C] |
| Δt | Variação de tempo durante o resfriamento | [min] |
| H | Entalpia do material | [kJ/kg] |
| k | Energia cinética turbulenta | [m ² /s ²] |
| β | Fração de volume líquido | [-] |
| ε | Constante | [-] |
| ρ | Massa específica do material solidificado | [kg/m ³] |
| ω | Taxa de dissipação específica | [m ² /s ³] |

SUMÁRIO

| | | |
|------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 | Objetivos | 15 |
| 1.1.1 | Objetivo Geral..... | 15 |
| 1.1.2 | Objetivos Específicos | 15 |
| 1.2 | Justificativa | 15 |
| 2 | FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 16 |
| 2.1 | Criopreservação celular | 16 |
| 2.1.1 | Tipos de Criopreservação | 18 |
| 2.1.2 | Agentes crioprotetores (ACPs)..... | 20 |
| 2.1.3 | Congelamento lento | 22 |
| 2.1.4 | Vitrificação | 24 |
| 2.2 | Métodos de vitrificação | 26 |
| 2.2.1 | Método de <i>Cryoloop</i> | 26 |
| 2.2.2 | Método de <i>Open Pulled Straw</i> (OPS)..... | 27 |
| 2.2.3 | Método de <i>Droplet Vitrification</i> (Vitrificação por Gota) | 28 |
| 2.2.4 | Método de <i>Electron Microscope Grids</i> (Grades de microscópio eletrônico)..... | 29 |
| 2.2.5 | Método de Evaporação de filme fino..... | 30 |
| 2.2.6 | Transferência de calor utilizando espumas metálicas..... | 35 |
| 3 | METODOLOGIA | 37 |
| 3.1 | Análise Experimental | 37 |
| 3.1.1 | Bancada experimental de evaporação de filme fino | 37 |
| 3.1.2 | Seções de testes e amostras da evaporação de filme fino | 40 |
| 3.1.3 | Bancada experimental do método de imersão | 45 |
| 3.2 | Análise Numérica | 47 |
| 3.2.1 | Geometria da simulação..... | 47 |
| 3.2.2 | Geração da malha..... | 48 |
| 3.2.3 | Equações e Configurações dos processos | 49 |
| 4 | RESULTADOS | 52 |
| 4.1 | Resultados experimentais | 52 |
| 4.1.1 | Método da evaporação de filme fino | 52 |
| 4.1.2 | Método por imersão em nitrogênio líquido | 57 |
| 4.1.3 | Comparação de Métodos | 60 |

| | |
|---|-----------|
| | 12 |
| 4.2 Resultados do estudo em simulação numérica | 62 |
| 4.2.1 Experimento utilizado para comparação..... | 62 |
| 4.2.2 Condições para a simulação numérica..... | 63 |
| 4.2.3 Comparações simulações e experimento | 64 |
| 4.2.4 Contornos gerados ao longo das simulações | 68 |
| 5 CONCLUSÃO | 70 |
| REFERÊNCIAS | 71 |

1 INTRODUÇÃO

A viabilidade de sistemas vivos depende principalmente da presença de água. A remoção de água de tecidos, células ou biomoléculas através da secagem ou congelamento normalmente ocasionam danos celulares. Essa remoção pode causar um estresse osmótico ou mudanças conformais que afetam a estrutura e função das células e biomoléculas. Além disso, no caso de congelamentos, a formação de gelo pode causar estresses mecânicos nos materiais biológicos. Uma maneira de preservar a vida dessas células durante processos de congelamento ou secagem é o desenvolvimento de formulações e estratégias focadas na proteção desses materiais (WOLKERS *et al.*, 2021).

A criopreservação é utilizada em diversas áreas como, por exemplo, para auxiliar em técnicas de reprodução assistida, além da preservação de células para uso futuro como as células de fertilidade masculina e feminina. Existem basicamente dois métodos de congelamento, sendo eles o de congelamento lento e a vitrificação. Basicamente a sua diferença ocorre em relação à velocidade de resfriamento e à concentração de agentes crioprotetores utilizados. Tanto a velocidade, como os crioprotetores influenciam diretamente na eficiência de um processo de criopreservação, garantindo ou não a sobrevivência do material biológico utilizado (LI *et al.*, 2019).

Para preservar células durante o seu congelamento, a criobiologia estuda os efeitos de temperaturas extremamente baixas em materiais biológicos, como células e organismos. Dentro dessa área de pesquisa existe a criopreservação, que consiste em conjunto de protocolos que permite a manutenção de diversos materiais biológicos em baixas temperaturas. O principal objetivo da criopreservação é minimizar o dano nos materiais biológicos, como tecidos, células mamárias, bactérias, fungos, células de plantas e vírus durante o congelamento ou preservação em baixas temperaturas (BROCKBANK *et al.*, 2007).

Atualmente, existe cada vez mais a busca por alternativas de como efetuar a criopreservação de células. Segundo Timóteo *et al.* (2014), a criopreservação consiste em um processo em que as células e tecidos são conservados em temperaturas negativas, com uso de crioprotetores, que garantem a integridade para utilização futura dos materiais congelados.

Novas biotecnologias na reprodução animal tem o intuito de aumentar a propagação de material genético de alto valor em menor espaço de tempo. Entretanto, a manipulação desses materiais para preservá-los e utilizá-los durante muito tempo, ocasiona danos em suas estruturas, que podem comprometer as suas funções. Por esse motivo é importante entender e

estudar o processo de criopreservação de materiais biológicos, a fim de reduzir as lesões e mortes celulares (Silva, 2011).

Isso ocorre porque esse processo de resfriamento celular interfere nas diversas vias metabólicas, na diminuição da atividade da bomba de sódio e potássio e na mudança de fase dos lipídios da membrana plasmática, interferindo na função das enzimas e na precipitação de substâncias. Além disso, a criopreservação pode causar danos de desidratação ou geração de cristais de gelo na parte interna das células, conhecidas como crioinjúrias (Silva, 2017).

Tendo em vista os problemas apresentados, que podem prejudicar a vida útil das células, e considerando os avanços das tecnologias médicas, que visam utilizar a terapia celular, aumenta a necessidade da preservação de células. Todavia, a preservação celular ainda carece de uma garantia de resistência de todas as células tratadas. Portanto, é importante encontrar a melhor metodologia para realizar estes protocolos, de maneira que todas as células possam ser reutilizadas após o processo de criopreservação.

Com isso, o esse trabalho apresenta um estudo de um novo método de criopreservação utilizando a evaporação de filme fino, tendo um enfoque principal no estudo do fenômeno térmico que ocorre no processo. Esse estudo consiste em analisar experimentalmente e numericamente as possibilidades e dificuldades que o método pode proporcionar.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é estudar e caracterizar o método de evaporação de filme fino de nitrogênio líquido para criopreservação de material biológico.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer as condições operacionais para realizar a evaporação de filme fino;
- Desenvolver e avaliar microdispositivos para deposição da amostra no evaporador para o congelamento e o efeito na taxa de congelamento;
- Avaliar as taxas de congelamento e transferência de calor comparando a evaporação de filme fino com o método de imersão da amostra;
- Analisar numericamente o processo de congelamento por evaporação de filme fino de nitrogênio líquido.

1.2 Justificativa

Os objetivos específicos foram determinados visando buscar a melhor metodologia de criopreservação através da evaporação de filme fino. O trabalho comparou o método de evaporação de filme fino com o método de imersão da amostra, para avaliar a influência de diferentes condições nos processos.

Ademais, foi desenvolvido um estudo numérico a fim de que o fenômeno estudado possa ser previsto antes de ser colocado em prática, reduzindo consideravelmente custos operacionais.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Neste capítulo serão apresentados conceitos e parâmetros importantes relacionados à criopreservação e o estado atual da pesquisa no tema.

2.1 Criopreservação celular

Um ramo expoente da biologia, que estuda o efeito de baixas temperaturas em células, tecidos e organismos vivos é a criobiologia. Através desta ciência, foi possível desenvolver a criopreservação, que consiste na preservação de células e tecidos em temperaturas abaixo do ponto de congelamento da água, visando preservar a composição das células e manter suas funcionalidades por tempo indeterminado (SILVA *et al.*, 2011).

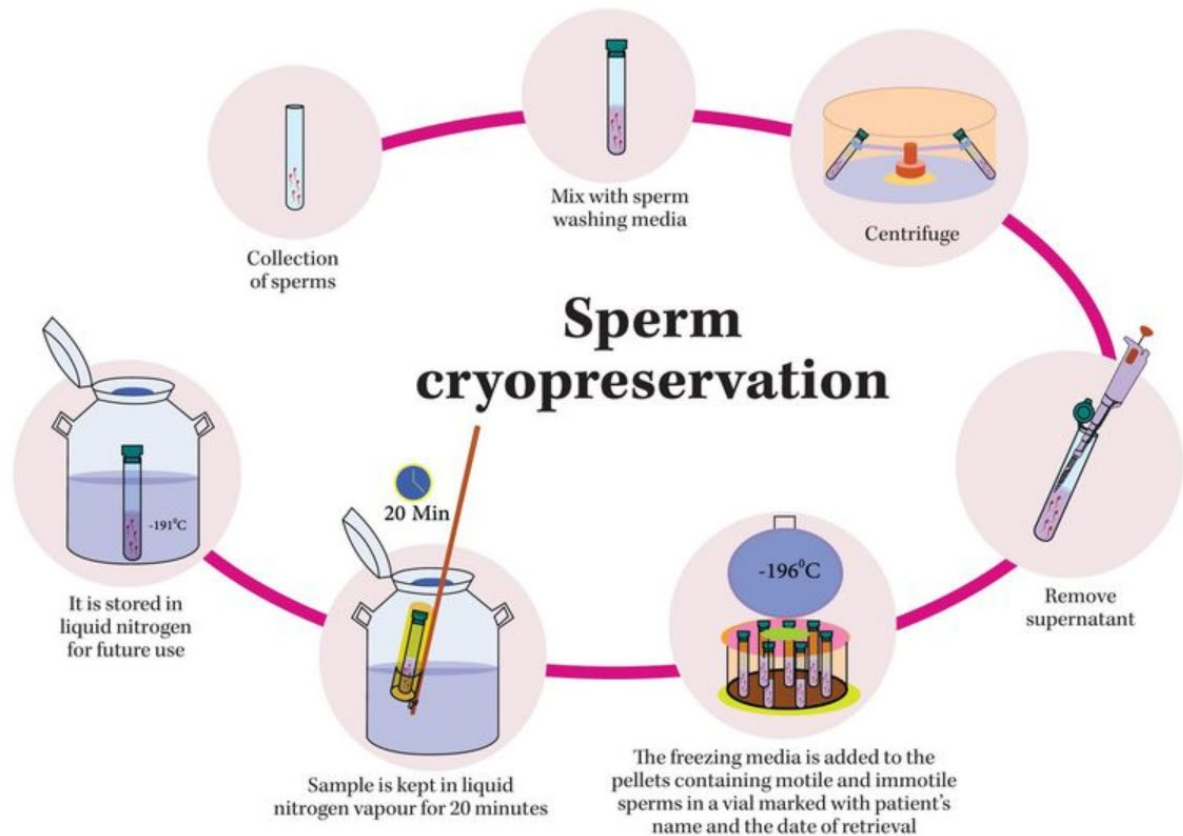
A biopreservação, como também é conhecida a área de criopreservação, consiste em um conjunto de processos que suprimem o envelhecimento celulares através de processos de preservação e processos de restauração celular após a preservação. Esses processos ocorrem em temperaturas negativas consideradas criogênicas, o que gera o nome de “criopreservação” (BAUST, 2009).

Segundo Santos (2000) a criopreservação consiste na conservação de material biológico em temperaturas na faixa de -190 a -196 °C, através da utilização de nitrogênio líquido. Esta é uma técnica que permite a preservação de material genético de plantas a longo prazo, tendo como principal exemplo o germoplasma.

Na baixa temperatura em que o material é conservado, todas as reações químicas, processos biológicos e atividades intra e extracelulares estão suspensas, o que torna possível que as células ou materiais biológicos sejam conservados por tempo indeterminado. Entretanto, para que isso ocorra, é necessário utilizar um agente crioprotetor, também conhecido como ACP (SHEIKHI *et al.*, 2011).

Dentre as várias células que podem ser criopreservadas, as mais comuns são os espermatozoides e os ovócitos, respectivos gametas masculinos e femininos responsáveis pela reprodução. Na Figura 2.1 é possível visualizar um exemplo de como funciona o processo de criopreservação de espermas, desde a etapa de coleta até a etapa de armazenamento do material genético.

Figura 2.1 – Esquema do processo de criopreservação de espermatozoides



Fonte: Daniell (2019).

O processo de criopreservação gera alguns efeitos temporários sobre as células e tecidos utilizados. Alguns exemplos são a interferência nas diversas vias metabólicas, a diminuição da atividade da bomba de sódio e potássio e a mudança de fase dos lipídios da membrana plasmática. Isso também leva a uma mudança nas funções das enzimas e à precipitação de algumas substâncias. Vale ressaltar, que na maioria dos casos esses efeitos permanecem apenas enquanto as células estão congeladas, retornando ao seu metabolismo natural após o reaquecimento celular (SILVA *et al.*, 2017).

Apesar da utilização de crioprotetores, ainda existem outros fatores que podem influenciar na preservação das células, sendo eles o método de criopreservação, os materiais utilizados e os métodos de descongelamento das células. Algumas dessas variáveis serão apresentadas nos posteriores subcapítulos.

2.1.1 Tipos de Criopreservação

Os métodos de criopreservação podem ser diferenciados de acordo com a taxa de resfriamento, a composição do crioprotetor, a taxa de diluição, as ferramentas e a taxa de aquecimento. Apesar desses fatores, na maioria dos casos os principais métodos de criopreservação são o congelamento lento e a vitrificação (LI *et al.*, 2019).

Apesar de serem métodos diferentes, a criopreservação é caracterizada pelas seguintes etapas fundamentais.

1. **Exposição ao ACP:** Momento em que os crioprotetores são inseridos nas células através da difusão mássica.
2. **Resfriamento com redução de temperatura de forma gradual (congelamento lento) ou súbita (vitrificação):** Etapa na qual a amostra passa da temperatura ambiente para a criogênica, além de ser a etapa que diferencia os métodos de criopreservação.
3. **Armazenamento dos materiais congelados:** Nesta etapa os materiais celulares são preservados por tempo indeterminado até que seja necessário a sua utilização.
4. **Descongelamento ou aquecimento:** Nesta etapa o material criopreservado é descongelado, de maneira a recuperar o seu metabolismo celular.
5. **Diluição ou remoção do ACP:** Antes de utilizar as células preservadas, é necessário retirar os ACPs ainda presentes, de maneira a evitar a produção de metabólitos secundários que podem ser tóxicos as células.

Dentre as cinco etapas apresentadas anteriormente, o presente trabalho focou na segunda etapa do processo de criopreservação, de maneira a comparar os métodos possíveis, bem como a influência de diferentes variáveis nesse processo.

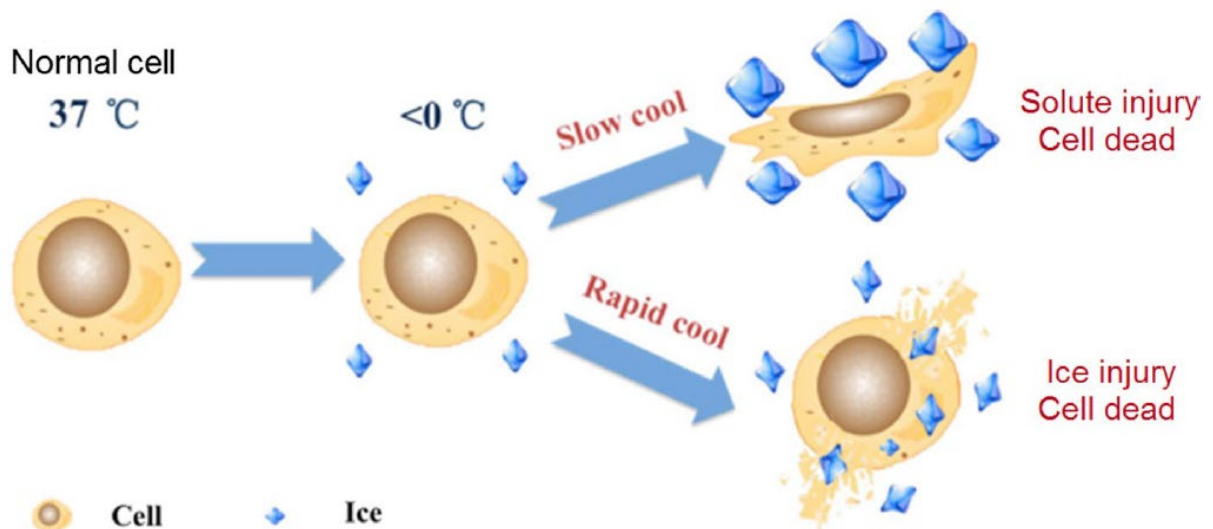
O método de congelamento lento é caracterizado por uma redução gradual de temperatura que permite reduzir o estresse térmico presente nas mudanças de fase do estado líquido para o estado sólido. Esse método também garante uma desidratação celular gradual que ajuda a reduzir a formação de cristais de gelo, além de reduzir a necessidade de altas concentrações de ACP (SANCHES, 2009; SHAW *et al.*, 2000).

Esse congelamento controlado é realizado por meio de um freezer com controle de temperatura, que garante uma desidratação celular adequada na faixa de -30 a -80 °C. Após essa desidratação o material é estocado em nitrogênio líquido na temperatura de -196 °C (CASTRO *et al.*, 2011).

Em contrapartida, a criopreservação por vitrificação é realizada com uma redução brusca de temperatura. O congelamento é realizado dessa maneira com o intuito de obter um sólido amorfo ou em estado vítreo, que difere do sólido cristalino por não haver formação de cristais de gelo no interior das células. A taxa de resfriamento de uma vitrificação é alta e necessita de altas concentrações de crioprotetores e suas taxas variam entre 10.000 e 25.000 °C/min. Apesar das altas concentrações de ACP, estudos mostram que com taxas maiores de 100.000 °C/min, a necessidade da utilização de crioprotetores começa a diminuir (CRUZAN *et al.*, 2004; YAMAKI *et al.*, 2002; YEOMAN *et al.*, 2005).

Para ambos os métodos existe a possibilidade de crioinjúrias ao longo do processo de criopreservação. Existe a lesão que pode ocorrer devido à desidratação em excesso, que ocorre em processos lentos. Outra lesão que ocorre é a mecânica, que provém da formação de pedaços de gelo que danificam as estruturas celulares (YANG *et al.*, 2020). Exemplos de crioinjúrias estão representados na Figura 2.2.

Figura 2.2 – Tipos de crioinjúrias



Fonte: Yang *et al.* (2020).

Ao comparar os métodos de criopreservação, Gurruchaga *et al.* (2018) apresentaram as vantagens e desvantagens da vitrificação e do congelamento lento, conforme apresentado na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Vantagens e desvantagens dos métodos de criopreservação

| Método | Vantagens | Desvantagens |
|--------------------|--|--|
| Congelamento Lento | <ul style="list-style-type: none"> - Baixa concentração de ACPs - Simples manipulação e equipamentos - Possibilidade de armazenar grandes volumes | <ul style="list-style-type: none"> - Formação de gelo na amostra - Possibilidade de danos na estrutura ou tecido |
| Vitrificação | <ul style="list-style-type: none"> - Previne a criação de gelo - Preserva a estrutura dos tecidos | <ul style="list-style-type: none"> - Alta concentração de ACPs - ACPs apresentam toxicidade - Complexidade na adição e remoção dos ACPs |

Fonte: Gurruchaga *et al.* (2018).

Conforme a Tabela 2.1, o congelamento lento apresenta uma maior simplicidade e facilidade de aplicação, apesar do método causar maiores danos celulares. Em relação à vitrificação, se obtém maior proteção celular durante a criopreservação, mas necessita alta concentração de ACPs para prevenir a criação de cristais de gelo, mas que podem causar problemas futuros para as células devido à toxicidade dos mesmos.

Por fim, Castro *et al.* (2011) avaliam que independentemente do método aplicado, o uso de ACP é imprescindível para o sucesso da criopreservação, pois aumenta a resistência das células a possíveis injúrias provenientes do processo de congelamento. Entretanto, a degradação desses ACPs pode gerar metabólitos tóxicos às células, fazendo necessário o uso controlado desses agentes.

2.1.2 Agentes crioprotetores (ACPs)

Ao longo dos anos foram aprimorados e testados diversos crioprotetores para aumentar a preservação celular em temperaturas ultrabaixas. Alguns dos ACPs identificados em diferentes bibliografias foram os compostos sulfóxidos, álcoois hidratados, dióis, trióis, poliálcoois, monossacarídeos, dissacarídeos, polissacarídeos, heterocíclicos e proteínas (SANTIS *et al.*, 2009).

Ao se realizar o processo de congelamento, inicialmente as células são tratadas com agentes crioprotetores, com o intuito de protegê-las das lesões ocasionadas pela desidratação ou geração de cristais de gelo que são formados durante o resfriamento. Essas duas lesões estão

relacionadas às taxas de congelamento, onde a desidratação ocorre em baixas velocidades e a formação de cristais de gelo em altas velocidades de congelamento (SILVA *et al.*, 2017).

Segundo Brockbank *et al.* (2007), os crioprotetores são utilizados para suprimir altas concentrações de sais, reduzir o encolhimento celular, reduzir o congelamento parcial da solução e reduzir a formação de gelo intracelular. Além disso, os ACPs são comumente divididos em intracelular, que é permeável às células e apresenta um baixo peso molecular, e o extracelular, que por sua vez é impermeável e apresenta um alto peso molecular.

Os ACPs intracelulares, são substâncias que apresentam uma baixa densidade relativa e uma alta solubilidade em meio aquoso, garantindo a penetração celular. Eles garantem a redução dos danos do congelamento, pois apresentam características químicas que reduzem a formação de cristais de gelo, permitindo assim a estabilização da forma das biomembranas. Como principais exemplos dessa classe de ACPs são o dimetilsulfóxido (DMSO), o glicerol e o etilenoglicol (EG) (SILVA *et al.*, 2017).

O outro grupo de ACPs é o extracelular, que são substâncias naturais com alta densidade relativa. Eles atuam aumentando a osmolaridade do meio extracelular, retirando a água do interior das células, garantindo assim a redução da formação de cristais de gelo. Alguns exemplos desses ACPs são os açúcares trealose e sacarose, que têm como vantagem uma baixa toxicidade ao compararmos com alguns ACPs intracelulares (SILVA *et al.*, 2017).

Uma lista de crioprotetores comuns podem ser visualizados na Tabela 2.2, onde são basicamente separados entre permeáveis e não permeáveis.

Tabela 2.2 – Tipos e exemplos de ACPs

| ACPs permeáveis | ACPs não permeáveis | |
|-------------------------|---------------------|------------------------------|
| | Açúcares | Polímeros |
| Dimetilsulfóxido (DMSO) | Sacarose | Polietileno glicol (PEG) |
| Etilenoglicol (EG) | Trealose | Polivinilpirrolidona (PVP) |
| Propileno glicol | Rafinose | Hidroxietilamido (HEA) |
| Glicerol | Manitol | Ficoll |
| Metanol | Glicose | Proteínas séricas (mistura) |
| Etanol | Galactose | Proteínas de leite (mistura) |

Fonte: Fuller *et al.* (2017).

Para cada célula deve existir um ACP ótimo, que interaja da melhor forma com o material biológico. No estudo de Santis *et al.* (2009) foi determinado que o DMSO, com fórmula molecular Me_2SO , é o mais indicado para a criopreservação de células-progenitoras

hematopoéticas (CPHs). Este protetor tem a função de capturar as moléculas de água livre, reduzindo a quantidade de gelo formado, diminuindo assim a temperatura do ponto de congelamento e aumentando o ponto de vitrificação.

Ainda no trabalho de Santis *et al.* (2009), o glicerol também se mostrou muito útil na preservação de espermatozoides de aves, hemácias, plaquetas e vários tipos de células nucleadas. O glicerol diminuiu a desnaturação das proteínas expostas a baixas temperaturas, além de ser um composto atóxico para as células, independente da concentração utilizada.

Estes crioprotetores exemplificados, apresentam uma influência intracelular nas células, entretanto existem alternativas menos evasivas. Um exemplo de um ACP extracelular é o hidroxietilamido (HEA), que é utilizado como expansor da volemia, sedimentador de eritrócitos e separador de leucócitos. O HEA é uma molécula que tem seu efeito osmótico reduzido, devido ao seu alto peso molecular, fazendo com que o crioprotetor não penetre no interior das células, tornando-o um crioprotetor não-penetrante (SANTIS *et al.*, 2009).

Segundo Silva *et al.* (2020) apesar das diferentes alternativas de ACPs, o mais utilizado é o DMSO, porém o uso é restrito para uma concentração máxima de 10%. Isso porque vários estudos apontaram que o DMSO apresenta uma elevada toxicidade, que pode ocasionar náusea, vômito, diarreia, hipertensão, edema pulmonar, dentre outros problemas.

Tendo em vista estes efeitos colaterais que podem ocorrer com a utilização de crioprotetores, alguns estudos demonstraram que com taxas de resfriamento maiores que 100.000 °C/min é possível reduzir consideravelmente a sua utilização. Com isto, métodos que alcançam estas taxas são os mais utilizados e estudados atualmente, visando evitar o uso de ACPs.

2.1.3 Congelamento lento

O processo de congelamento lento ocorre usualmente dentro de freezers de alta performance, com controle de temperatura. O material biológico é armazenado em um recipiente que suporta temperaturas criogênicas. O recipiente é adicionado ao sistema de refrigeração com a temperatura desejada previamente programada, ocorrendo então o resfriamento da célula até a desidratação celular, que ocorre em duas temperaturas distintas, por volta de -30 e -80°C. Depois disso, o material congelado é conservado em nitrogênio líquido até sua reutilização e reativação celular (CASTRO *et al.*, 2011).

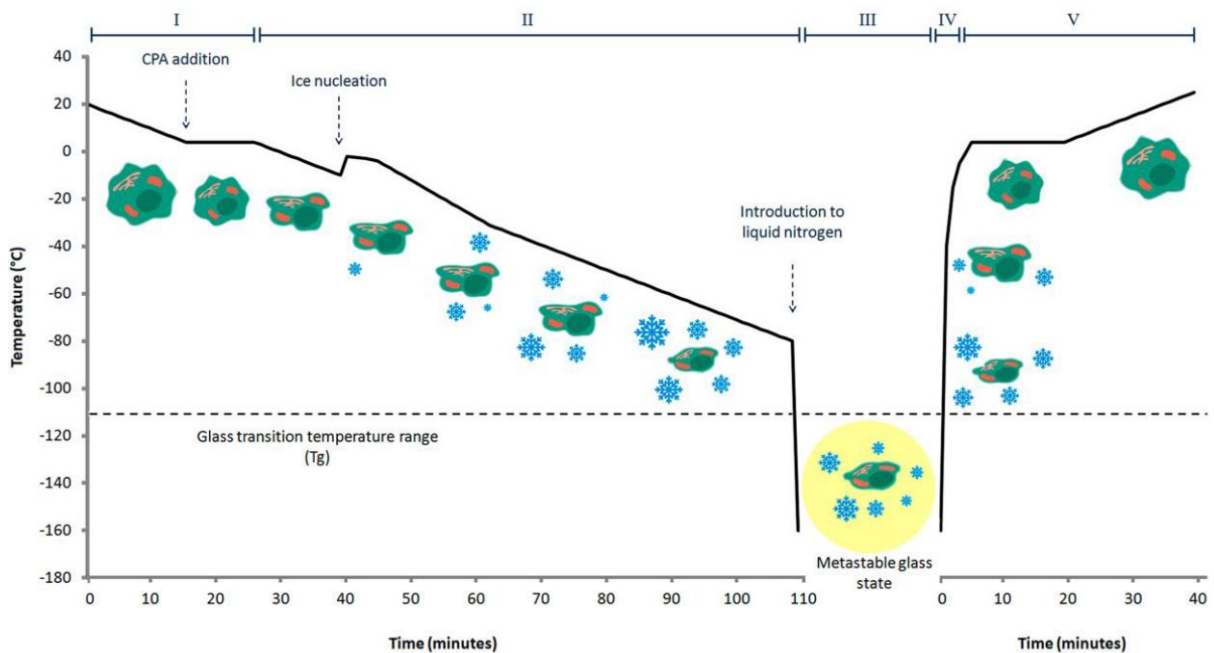
De acordo com Shaw *et al.* (2003), o processo de congelamento lento pode ser realizado utilizando uma taxa de congelamento constante ou variável. Independente da taxa selecionada,

usualmente seus valores variam entre 1 e 1.000 °C/min, dependendo da célula e do volume da amostra. Além disso, este processo utiliza baixa concentração de agentes crioprotetores (ACPs).

Um exemplo é o congelamento de espermatozoides, que utiliza diferentes taxas de congelamento. Inicialmente é resfriado de 20 a 5°C com uma taxa de 0,5 a 1°C/min. Depois desse passo, a temperatura é reduzida de 5 a -80°C, usando uma taxa de 1 a 10 °C/min. Finalmente, a amostra de espermatozoides congelada é conservada em um tanque com nitrogênio líquido (LI *et al.*, 2019). Para outros materiais biológicos como embriões e ovários, são utilizadas taxas de resfriamento entre 0,3 e 1°C/min, dependendo do tamanho da amostra, permeabilidade e características difusivas das células (SHAW *et al.*, 2003).

De acordo com o material utilizado, existem diferentes maneiras de realizar qualquer processo de criopreservação. Na Figura 2.3 é possível ver as etapas do congelamento lento que ocorrem usualmente, variando para cada célula as taxas de congelamento e os ACPs utilizados.

Figura 2.3 – Esquema do processo de criopreservação por congelamento lento



Fonte: Gurruchaga *et al.* (2018).

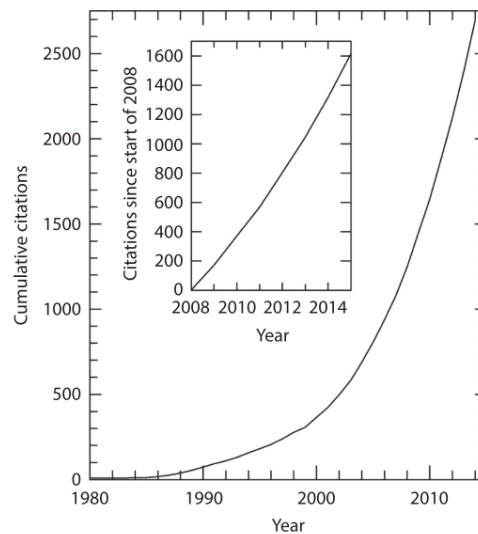
O processo inicialmente ocorre com uma redução de temperatura, e somente por volta de 4 °C a solução de ACP é adicionada, evitando assim os efeitos citotóxicos da solução. Então a amostra é resfriada lentamente até que a nucleação do gelo ocorre, por volta de -7 °C. Depois a amostra continua seu resfriamento até -80 °C, quando então as amostras são submersas em nitrogênio líquido, ultrapassando assim a temperatura vítrea de transição e atingindo o estado criogênico. As amostras criopreservadas formam uma matriz solidificada composta por gelo,

ACPs, soluto e uma biomassa composta por células extremamente desidratadas sem a presença de gelo. Para reutilização das células preservadas, ocorre um descongelamento rápido, onde por volta de 4 °C ocorre a remoção dos ACPs e então a amostra estará pronta para ser utilizada novamente (GURRUCHAGA *et al.*, 2018).

2.1.4 Vitriificação

Desde 1984, a vitriificação apresenta uma rápida expansão da sua utilização para alcançar a criopreservação de uma maneira que não era possível antes. Isso é possível perceber ao analisar a Figura 2.4, que mostra o número de citações acumuladas sobre “vitriificação” entre o período de 1980 e 2014 analisados pela PubMed. Em especial, no período entre 2008 e 2014 o número de citações em trabalhos aumenta cerca de 1600 nesse período analisado (TUCKER *et al.*, 2016).

Figura 2.4 – Número de citações de vitriificação acumuladas entre 1980 e 2014.



Fonte: Tucker *et al.* (2016).

A vitriificação é um processo de solidificação onde o líquido é transformado em um material amorfo ou em estado vítreo. Esse método de criopreservação consiste na redução repentina da temperatura para obter o estado vítreo, visando evitar a formação de cristais de gelos dentro das células. Entretanto, para garantir esse estado, é necessário aumentar a taxa de resfriamento (por exemplo 2.500 °C/min) e utilizar uma alta concentração de ACPs (Castro *et al.*, 2011). Atualmente esse método é o mais comum utilizado na preservação de ovócitos e embriões (LI *et al.*, 2019).

De fato, a vitrificação é uma maneira ideal de preservar células, visto que pode reduzir as lesões ocasionadas por cristais de gelo durante o processo. Todavia, para garantir essa redução é necessário utilizar ACPs, que podem causar problemas futuros nas células em função de sua toxicidade. Outro fator importante nesse método é o processo de descongelamento das células, o qual precisa ocorrer com uma taxa uniforme para evitar estresses térmicos e danos celulares (BAUST *et al.*, 2009).

À medida que o resfriamento ocorre, os movimentos moleculares no líquido que permeiam o tecido diminuem. Eventualmente, a amostra alcança um estado vítreo onde o líquido fica “preso” e atinge uma temperatura muito baixa para fluir. Esse líquido vitrificado é essencialmente um líquido em estase molecular, no qual ocorre o aumento da viscosidade e não a cristalização (BROCKBANK *et al.*, 2007).

Tipicamente o material é considerado sólido quando a viscosidade atinge cerca de 10^{14} kg/ms. A temperatura em que o material pode ser considerado vítreo é a temperatura de transição vítrea. Essa transição é usualmente associada à mudança repentina de densidade, que pode causar estresses mecânicos e fraturas nos materiais. Isso pode ser evitado se o material biológico estiver vitrificado e conservado abaixo da temperatura de transição vítrea. Com isso, teoricamente a vitrificação garante não apresentar nenhum efeito danoso biológico associado ao congelamento (BROCKBANK *et al.*, 2007).

Esse processo de criopreservação ocorre basicamente através da utilização de substâncias criogênicas, tendo como principal exemplo o nitrogênio líquido. O contato direto com o nitrogênio líquido garante uma alta taxa de resfriamento, fazendo com que a vitrificação seja atingida.

De maneira geral, podemos definir então a vitrificação como um método de criopreservação ultrarrápido onde as células variam da temperatura ambiente até -196 °C em menos de 1 s. É considerado um método de não equilíbrio, representando uma abordagem radical que garante a total eliminação da formação de cristais de gelo. Mas para atingir essa eficiência é necessária uma taxa de resfriamento extremamente alta, alinhada com uma alta concentração de ACPs (TAYUKCUOGLU *et al.*, 2012).

Para realizar esse processo, existem vários métodos diferentes que utilizam o nitrogênio líquido de diferentes maneiras, com diferentes materiais, como apresentado a seguir.

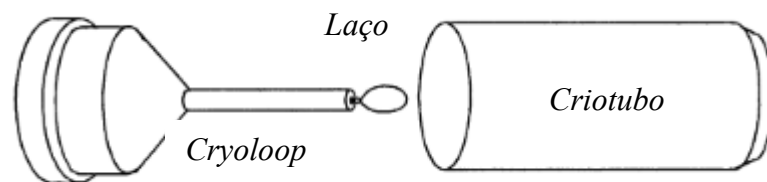
2.2 Métodos de vitrificação

O aumento da taxa de congelamento ou a redução do volume da amostra, podem auxiliar na redução das concentrações de ACPs necessários para o processo. Alguns desses estudos, mostraram diferentes métodos de se realizar a vitrificação onde podem ser atingidas taxas de congelamento em patamares acima de 10.000 °C/min.

2.2.1 Método de *Cryoloop*

Os autores Lane *et al.* (1999) apresentaram a vitrificação através do método de *Cryoloop* (“Laço” criogênico). O dispositivo utilizado consiste basicamente em uma alça de náilon montada em um tubo de aço inoxidável e acoplada a uma tampa de um criotubo. A inserção de metal na tampa permite o uso de uma haste inoxidável de manuseio com um pequeno imã para manipulação do loop em baixa temperatura. O esquema do dispositivo desenvolvido pode ser visualizado nas Figura 2.5 – Dispositivo do método *Cryoloop* para a vitrificação de blastócitos

Figura 2.5 – Dispositivo do método *Cryoloop* para a vitrificação de blastócitos



Fonte: Lane *et al.* (1999).

Figura 2.6 – Imagens do dispositivo para o método *Cryoloop*



Fonte: Saki *et al.* (2005).

Para realizar a vitrificação via *Cryoloop*, são utilizados blastócitos carregados em duas etapas com crioprotetores. Inicialmente os blastócitos são colocados em uma solução crioprotetora A que contém 10% de DMSO e 10% de etilenoglicol durante 2 min. Após esse intervalo, as células são transferidas para a solução B, que apresenta 20% de DMSO, 20% de etilenoglicol, 10 mg/mL de Ficoll e 0,65M de sacarose, por aproximadamente 20 s.

Enquanto os blastócitos estão na solução A, o *Cryoloop* é mergulhado na solução B para criar uma fina película na alça. Os blastócitos então são transferidos da solução B para o *Cryoloop*. O *Cryoloop* contendo o blastócito foi então mergulhado no criotubo que está preenchido com nitrogênio líquido. Usando a haste de aço inoxidável, a alça contendo os blastócitos é selada. Por fim, a amostra é fixada em suportes e então armazenadas em nitrogênio líquido.

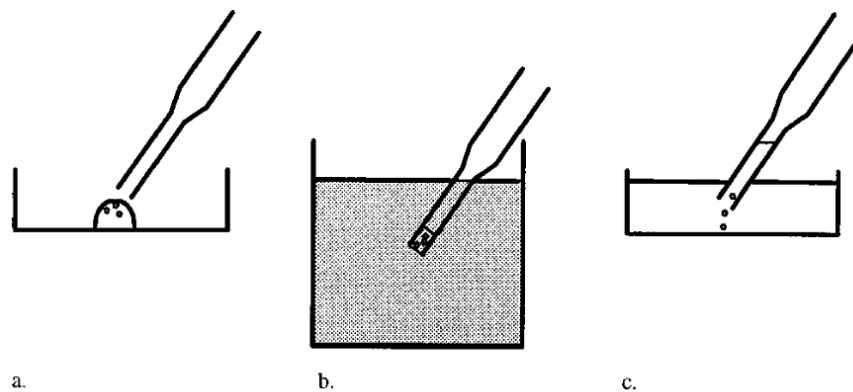
Todo esse processo acontece em cerca de 5 minutos, sendo que o congelamento ocorre com uma taxa ultrarrápida. O estudo de Lane *et al.* (1999) avaliou blastócitos de ratos e de humanos e, em ambas as espécies estudadas, foi possível a reutilização de suas células após o processo de criopreservação via-*Cryoloop*.

2.2.2 Método de *Open Pulled Straw* (OPS)

Outro método reconhecido para a vitrificação é o *Open Pulled Straw* (OPS), que na tradução literal seria “palheta aberta esticada”. No trabalho Vajta *et al.* (1998) foram utilizadas palhetas de 250 μ L, que foram esticadas e cortadas ao meio, produzindo duas OPS. Estas foram amolecidas termicamente sobre uma placa quente e tracionadas até que o diâmetro interno e a espessura da parede na parte central fossem de 0,8 e 0,07 mm, respectivamente. As palhetas foram então resfriadas no ambiente e depois cortadas na ponta mais estreita com uma lâmina.

Para realizar o carregamento das células na palheta, é utilizado o efeito da capilaridade, tocando a palheta em uma gota de 1 a 2 μ L contendo as células com a extremidade aberta, como podemos ver na Figura 2.7(a). Essa extremidade é então submergida em nitrogênio líquido, que apesar das turbulências, a coluna de líquido na palheta solidifica instantaneamente sem ocorrer perdas de células (Figura 2.7 (b)). Após a vitrificação, as células são aquecidas diretamente no meio de retenção em que serão armazenadas. O meio vitrificado torna-se líquido em cerca de 2 segundos após o contato da palheta com o meio de retenção. Em seguida, por meio da sedimentação, as células flutuam para o meio de retenção (Figura 2.7 (c)) e então são preservadas para futuro reutilização (VAJTA *et al.*, 1998).

Figura 2.7 – Método do *Open Pulled Straw* (OPS)



Fonte: Vajta *et al.* (1998).

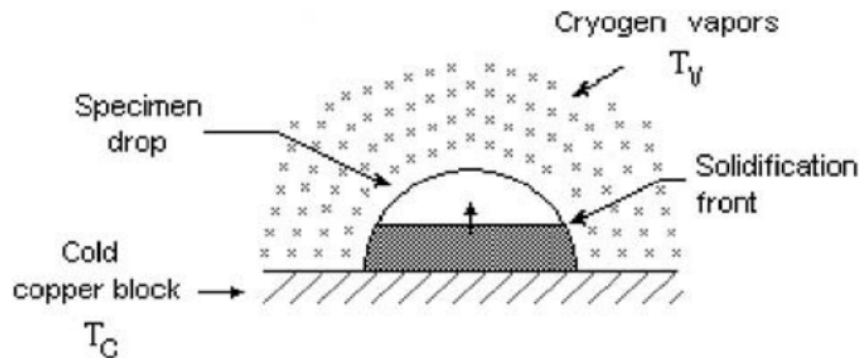
Segundo os autores, esse método de criopreservação conseguiu alcançar taxas de resfriamento médias de 22.500 °C/min, para temperaturas entre -25 e -175 °C e taxas de 16.700 °C/min para temperaturas entre 0 e -195 °C. As variações para as taxas obtidas nos 5 experimentos realizados pelos autores foi de $\pm 5\%$.

2.2.3 Método de *Droplet Vitrification* (Vitrificação por Gota)

Um método reconhecido para a criopreservação de células é a vitrificação por gota. Esse método consiste basicamente na vitrificação de uma amostra que é gotejada em uma superfície criogênica. A superfície é um material com alta condutividade térmica, que consiga manter a temperatura homogênea durante todo o processo, tendo como principal exemplo o cobre.

Marchesi *et al.* (2005) estudaram este método de vitrificação (sem uso de ACPs) por análise CFD. A simulação, representada na Figura 2.7, consiste basicamente em uma gota de água sendo adicionada a uma placa de cobre que está em temperatura de equilíbrio com um nitrogênio líquido. A solidificação ocorre no sentido vertical, partindo da interface entre a gota e a placa de cobre. Na simulação, as propriedades da amostra são consideradas como água e gelo, tendo em vista que os materiais biológicos apresentam altas concentrações de água. A mudança de fase de líquido para sólido é considerada na temperatura de 273 K (0 °C) com um calor latente de solidificação de 336 kJ/kg.

Figura 2.7 – Esquema das condições das simulações do método de vitrificação por gota



Fonte: Marchesi *et al.* (2005).

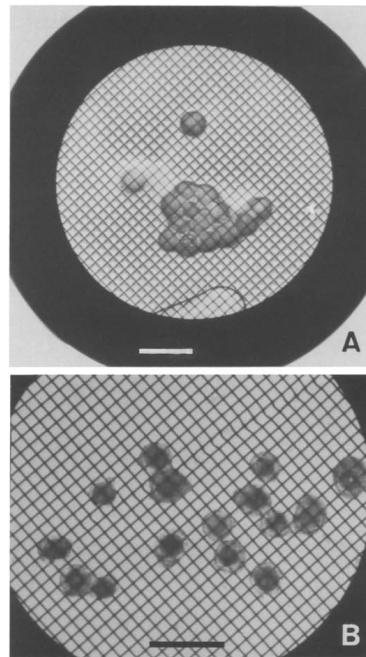
Nas simulações foram avaliadas diferentes posições dentro da gota, para conseguir identificar o perfil de solidificação das amostras. Além disso, também foi possível determinar as taxas de congelamento para cada ponto da gota e perceber a influência do gelo na redução da transferência de calor ao longo do tempo. No trabalho foi possível identificar taxas de congelamento maiores que 150.000 °C/s.

2.2.4 Método de *Electron Microscope Grids* (Grades de microscópio eletrônico)

Uma alternativa de método para realizar a vitrificação é através da utilização de grades microscópicas, que foi desenvolvido por Martino *et al.* (1996) aplicado a ovócitos bovinos.

A vitrificação foi realizada com grades de cobre de microscopia eletrônica, com o intuito de obter altas taxas de congelamento. Grupos de 10 a 15 ovócitos são expostos em uma solução crioprotetora de etilenoglicol de 3 mL durante 20 s. Com a ajuda de uma pequena pipeta, os ovócitos foram transferidos para uma grade de cobre de volume de aproximadamente 1 µL. Para reduzir ainda mais o volume, a parte inferior da grade é preparada com uma membrana milicelada, expondo os ovócitos como vemos na Figura 2.8.

Figura 2.8 – Fotos dos ovócitos nas grades de cobre microscópicas antes do resfriamento em LN₂ (a) e depois do aquecimento após preservação (b)



Fonte: Martino *et al.* (1996).

As grades contendo os ovócitos foram inseridas diretamente no nitrogênio líquido (LN₂) ou até mesmo no nitrogênio *slush* (SN₂). No caso do N₂ *slush*, este é preparado através da conexão de uma bomba de vácuo em um dessecador de vidro contendo um copo de poliestireno com 250 ml de nitrogênio líquido, reduzindo a pressão do meio, formando uma espécie de floculação. As grades congeladas no SN₂ são então transferidas para o LN₂, onde as células serão preservadas. Esse processo todo tem uma duração de cerca de 30 s, desde a exposição ao ACP até o mergulho da grade no LN₂ ou SN₂.

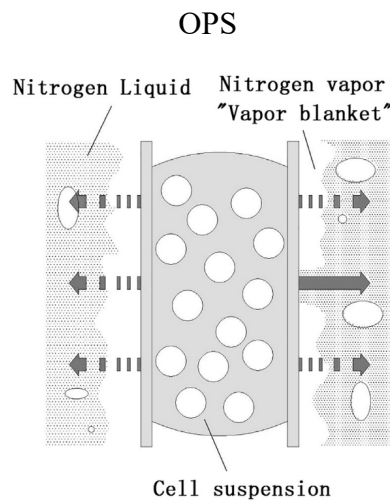
Nesse trabalho utilizando as grades microscópicas de cobre, foram obtidas diferentes taxas de congelamento que variaram desde 3.000 até 24.000 °C/min. Os autores ainda salientaram que os melhores resultados foram obtidos utilizando o nitrogênio super-resfriado SN₂, atingindo as maiores taxas de congelamento nos testes realizados.

2.2.5 Método de Evaporação de filme fino

Os métodos citados anteriormente podem alcançar a vitrificação completa ou parcial das amostras, mas é necessário usar alta concentração de crioprotetores. Uma forma de diminuir a concentração dos ACPs, e assim melhorar a sobrevivência celular, é aumentar a taxa de congelamento. No entanto, quando o sistema portador da amostra é submerso diretamente no

nitrogênio, ocorre a vaporização do LN2 próxima à superfície do mesmo devido à grande diferença de temperatura entre eles. Ao aumentar a taxa de resfriamento forma-se uma manta de vapor, como vemos na Figura 2.9, que atua como uma camada de isolamento térmico dificultando a transferência de calor, pois limita o coeficiente de transferência de calor.

Figura 2.9 – Esquema da formação da manta de vapor durante o resfriamento pelo método

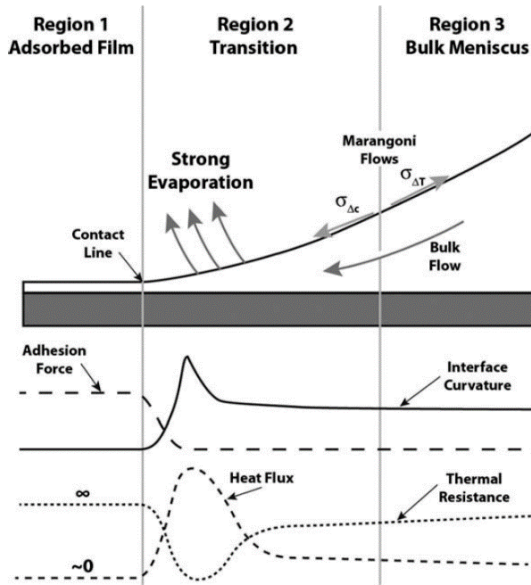


Uma forma alternativa de vitrificação que pode ser utilizada é a evaporação de filme fino de nitrogênio líquido, que será o método utilizado nesse presente trabalho. Neste caso, não há submersão da amostra e sim esta fica dentro de um evaporador com uma superfície externa microporosa, ou micro aletada, e o nitrogênio líquido é jateado sobre ela, ficando disperso na camada microestruturada por força capilar e preenchendo os espaços vazios entre as micropartículas.

A diferença entre os processos de transferência de calor é que o processo de evaporação ocorre na interface entre o líquido e o vapor, quando a pressão é menor que a pressão de saturação do líquido em uma determinada temperatura. Enquanto a ebulição ocorre na interface entre o sólido e o líquido, quando o líquido é colocado em contato com uma superfície com maior temperatura que sua temperatura de saturação em uma determinada pressão.

Plawsky *et al.* (2014) realizaram um trabalho com o intuito de entender e explicar o processo de evaporação de filme fino utilizando nano e microestruturas. Segundo os autores, a evaporação de filme fino quase sempre ocorre no contexto de um “menisco” de evaporação. A Figura 2.10 apresenta o detalhamento do processo.

Figura 2.10 - Esquema de transições de uma região de filme fino



Fonte: Plawsky *et al.* (2014).

Considerando um fluido completamente molhante sobre uma superfície a evaporação é dividida nas seguintes regiões.

Região 1 – Considerada a *região do filme fino adsorvido* ou *não evaporante*. Nesta região o filme apresenta uma espessura fixa e não ocorre o processo de evaporação, devido aos efeitos das forças atrativas entre sólido e líquido, da pressão de vapor e da temperatura de substrato (sólido) não atingirem os valores necessários.

Região 2 – Conhecida como *região de transição*, nesta etapa ocorre um enfraquecimento das forças atrativas e a espessura do filme fino apresenta uma variação ao longo do substrato. É nesta região que ocorre o início da evaporação e onde ocorre a maior transferência de calor e a força de adesão do líquido no sólido reduz, como é possível identificar na Figura 2.10.

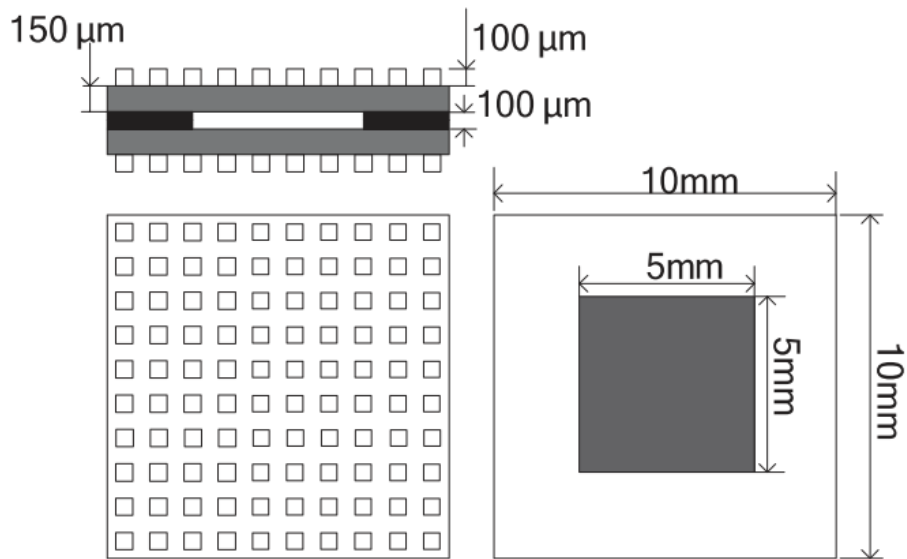
Região 3 – Também chamada de *região de menisco*, onde a inclinação da interface líquido e vapor se torna quase constante. Ela atua como um reservatório que fornece líquido para a região de transição. A inclinação da interface entre o líquido e o vapor desta fase é o que determina o ângulo de contato entre o fluido e o substrato.

Na Figura 2.10 também é possível avaliar as variações das forças de adesão, fluxo de calor, resistência térmica e ângulo de contato ao longo das três regiões. Todas essas variáveis estão interligadas, de modo que se pode perceber as influências entre elas. Como exemplo, pode-se notar que inicialmente na região 1 a resistência de transferência de calor tende ao infinito, o que acarreta um fluxo de calor nulo. Na região 2 quando a resistência térmica atinge

seu valor mínimo, ocorre o ponto de maior fluxo de calor, que é o principal ponto no processo de evaporação de filme fino.

Esse processo foi utilizado por Su *et al.* (2017), onde os autores realizaram testes de vitrificação de uma solução aquosa de DMSO utilizando a evaporação de filme fino de nitrogênio líquido. Os autores inseriram a amostra dentro de um evaporador formado por dois chips de silício com microaletas no seu exterior, representado na Figura 2.11.

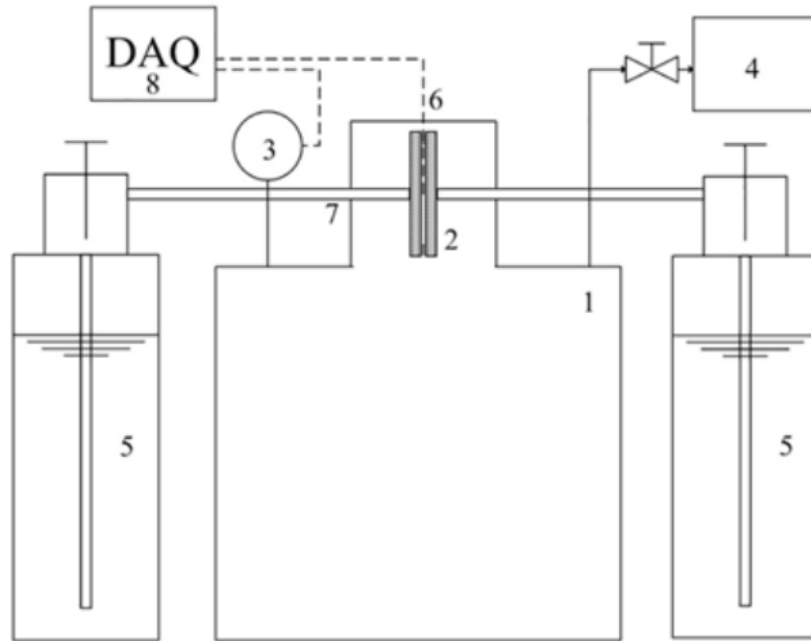
Figura 2.11 – Esquema do evaporador constituído de duas placas aletadas de silício



Fonte: Su *et al.* (2017).

Esse evaporador era inserido dentro de uma câmara em que é gerado vácuo, fazendo com que o nitrogênio líquido escoe para os dois lados do evaporador. Quando o nitrogênio líquido entra em contato com a superfície microaletada, ocorre a evaporação de filme fino e o congelamento ultrarrápido da amostra. O sistema construído pelos autores está representado na Figura 2.12, que podemos ver a seguir.

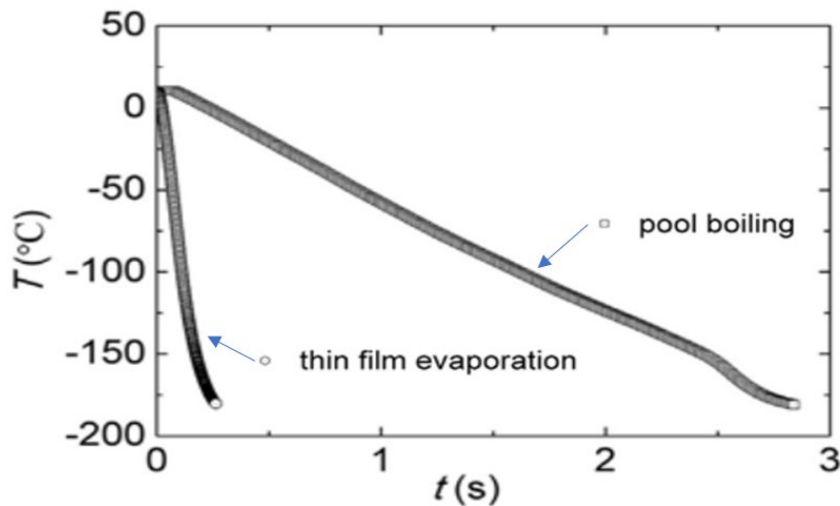
Figura 2.12 – Esquema da bancada de testes para evaporação de filme fino de LN₂



Fonte: Su *et al.* (2017).

Com os resultados obtidos nos experimentos, foi possível determinar que o processo de evaporação de filme fino apresenta taxas de resfriamento maiores ao compararmos com o método de ebulição em vaso (*pool boiling*) onde o sistema é imerso no LN₂, como apresenta a Figura 2.13. Na evaporação de filme fino o processo dura cerca de 0,3 s e no caso do *Pool Boiling* durou cerca de 2,8 s.

Figura 2.13 – Variação de temperatura ao longo do tempo para diferentes métodos de vitrificação.



Fonte: Su *et al.* (2017).

Diferentes conjuntos de evaporadores foram testados, variando a quantidade de microaletas e a área da seção delas. Com isso, identificou-se que quanto maior é o número de aletas maior é a taxa de congelamento obtida, encontrando valores de aproximadamente 50.000 °C/min. Como principal resultado desse trabalho, foi identificado que a estrutura das superfícies do evaporador apresenta um papel fundamental na transferência de calor entre o evaporador e o nitrogênio líquido. Sendo assim, é interessante avaliar outras maneiras de aumentar a área de superfície do evaporador, para buscar melhores taxas de congelamento, que garantam a redução da utilização de ACPs.

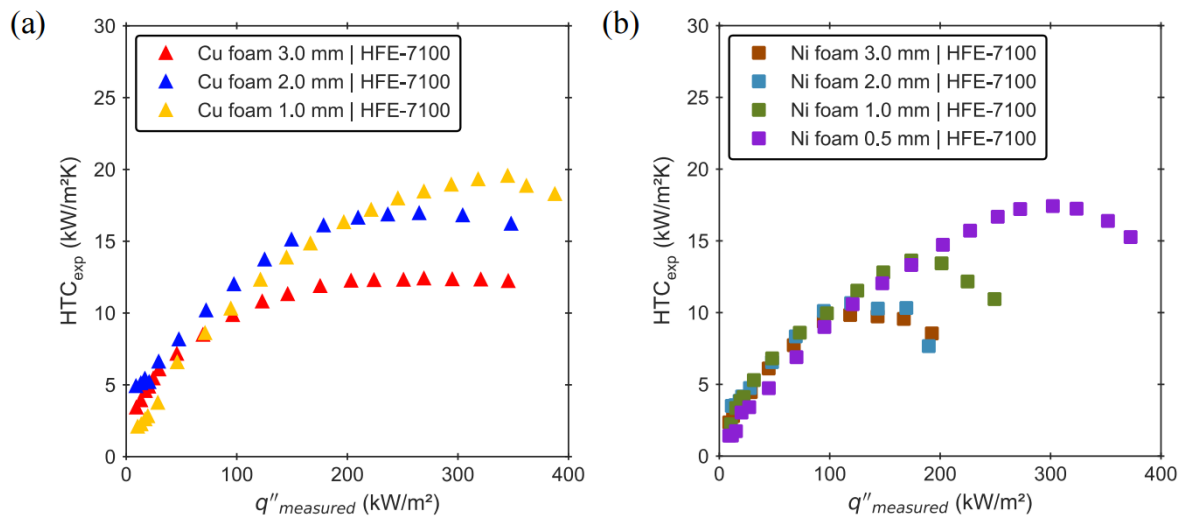
2.2.6 Transferência de calor utilizando espumas metálicas

Ao trabalhar com processos de transferência de calor, um conceito básico é que o aumento da área superficial de troca térmica favorece o aumento da troca térmica. Tendo isso em vista, Manetti *et al.* (2021) desenvolveram uma pesquisa para avaliar a utilização de espumas metálicas para o processo de *pool boiling* e verificar o incremento da transferência de calor.

Os autores propuseram uma correlação para *pool boiling* com diferentes fluidos e diferentes superfícies porosas, considerando espessura, porosidade e diâmetro do poro das espumas a partir de resultados experimentais.

Os experimentos consistiram em inserir duas estruturas porosas, de níquel e cobre, de diferentes espessuras, em dois fluidos dielétricos. Os fluidos utilizados foram o etanol e o HFE-7100. A espuma de cobre tinha espessuras de 1, 2 e 3 mm, enquanto a espuma de níquel foi utilizada com espessuras de 0,5, 1, 2 e 3 mm. Os fluidos eram condicionados em câmaras apropriadas com um sistema de medição de pressão e temperatura, além de uma resistência para variar os valores de temperatura. Dentro da câmara o fluido em contato com as estruturas metálicas aquecidas sofria uma mudança de fase. As medições consistiram em inserir diferentes fluxos de calor e calcular o coeficiente de transferência de calor para cada caso, como vemos na Figura 2.9 (MANETTI *et al.*, 2021).

Figura 2.9 – Variação do coeficiente de transferência de calor com o fluxo de calor para diferentes espessuras das espumas de cobre (a) e de níquel (b)



Fonte: Manetti *et al.* (2021)

Nos testes realizados, observou-se que quanto menor a espessura das espumas, maior a tendência de aumentar o coeficiente de transferência de calor em ambos os casos. Com os testes, foi possível desenvolver um modelo para prever o coeficiente de transferência de calor para estruturas microporosas em estudos com *pool boiling*. Além disso identificou-se a importância da variação da espessura nas espumas e uma oportunidade de utilização dessas estruturas em outros processos, como a evaporação de filme fino, uma vez que elas tendem a aumentar a área superficial de troca térmica e promovem a evaporação por efeito capilar (MANETTI *et al.*, 2021). O trabalho trouxe também uma caracterização das espumas metálicas em termos de porosidade e diâmetro do poro. Foram comparadas porosidades entre 0,8 e 0,98, onde quanto menor o valor da porosidade, maior o coeficiente de transferência de calor com o aumento da taxa de calor trocada. Em relação ao diâmetro do poro, comparou-se valores de 0,1 até 1, onde os resultados demonstraram que os menores diâmetros apresentam um limite de calor que suportam, fazendo com que para os maiores diâmetros e maiores taxas de calor são obtidas os maiores coeficientes de transferência de calor.

3 METODOLOGIA

Este trabalho apresenta um estudo experimental e numérico do processo de resfriamento/congelamento utilizando o método de evaporação de filme fino.

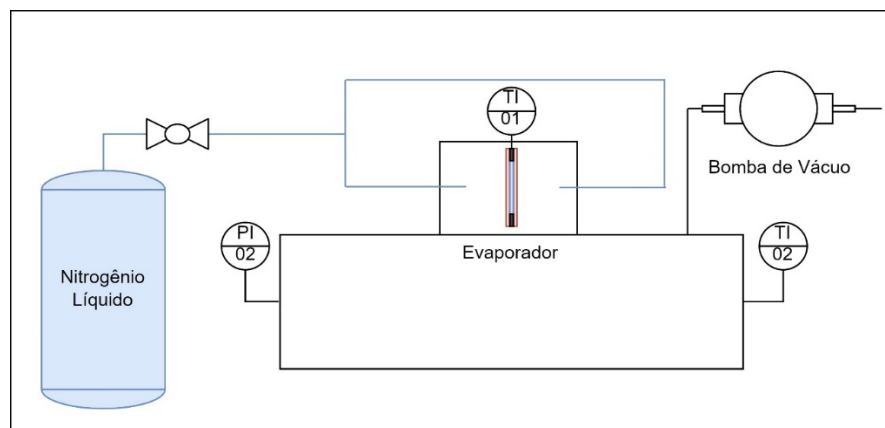
Inicialmente foi realizado um estudo experimental, testando duas composições do sistema de evaporação de filme fino. Logo foi feita uma comparação com o método de congelamento por imersão em nitrogênio líquido. Por fim, foi realizado um estudo numérico do processo de evaporação de filme fino.

3.1 Análise Experimental

3.1.1 Bancada experimental de evaporação de filme fino

Para a realização dos experimentos foi desenvolvida uma bancada experimental como representada na Figura 3.1.

Figura 3.1 – Diagrama da bancada experimental de congelamento por evaporação de filme de nitrogênio

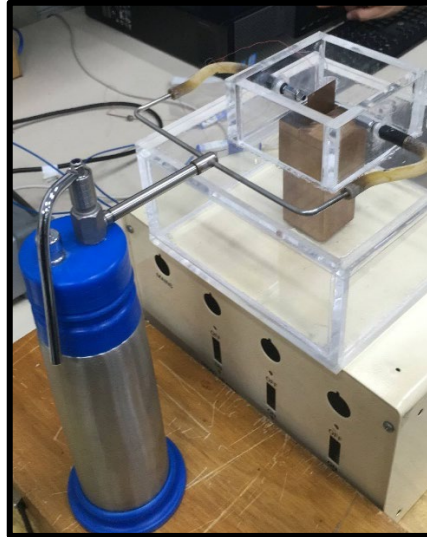


Fonte: Elaborado pelo autor.

A bancada experimental consiste basicamente em uma câmara de testes em acrílico onde será inserido o evaporador com a amostra e conectado a um criocautério de nitrogênio líquido com um volume de 0,5 L, como mostra a Figura 3.2. A pressão no interior do criocautério tende a aumentar com a vaporização do nitrogênio líquido, tendo como limite uma válvula de alívio com aproximadamente 2 bar de condição de abertura para o ambiente externo. O LN₂ foi succionado para a câmara de testes através de uma diferença de pressão, onde o líquido, em

forma de jato entra em contato com a superfície do evaporador, onde ocorre a evaporação de filme fino de nitrogênio, e a amostra no seu interior é congelada.

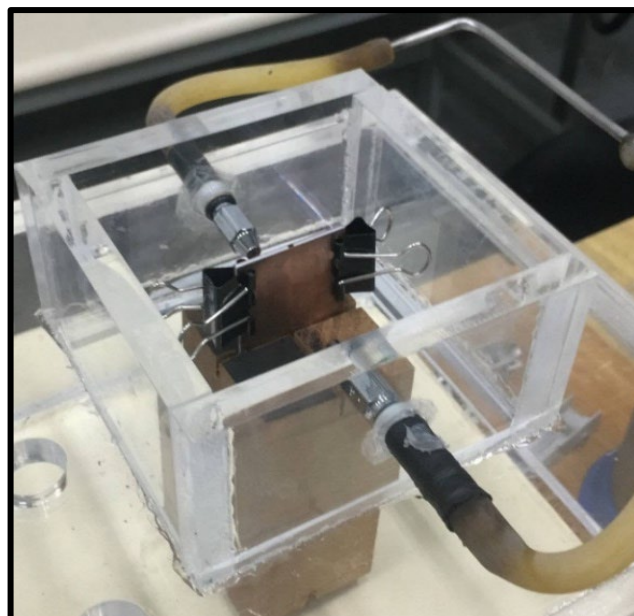
Figura 3.2 – Aparato experimental (sem os instrumentos de medição).



Fonte: Elaborado pelo autor.

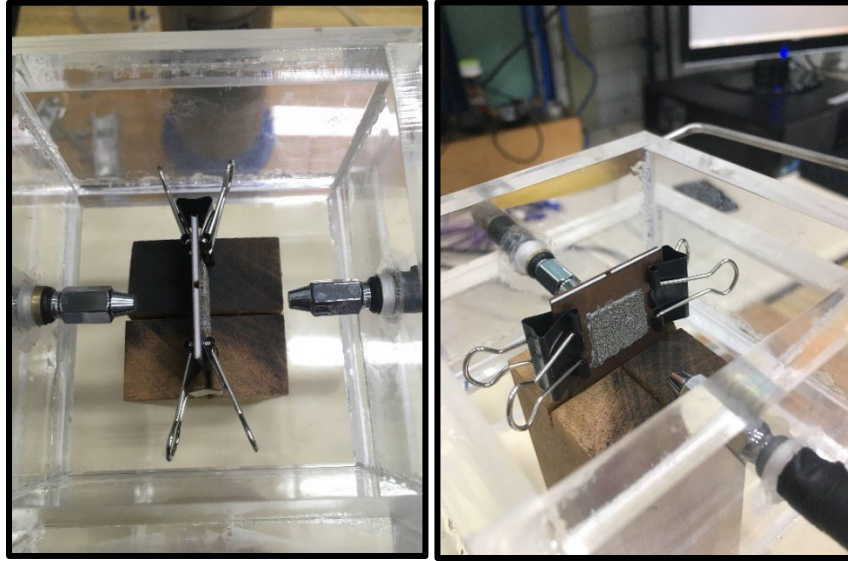
A seção de testes ou evaporador foi confeccionada de duas maneiras descritas a seguir. Uma delas consistia em duas placas lisas de cobre com a amostra no seu interior (Figura 3.3). Já a outra seção foi formada por duas placas de cobre com uma superfície externa microporosa de níquel com a amostra no seu interior (Figura 3.4).

Figura 3.3 – Evaporador com placas lisas de cobre



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3.4 – Evaporador com placa de cobre e superfície porosa de níquel

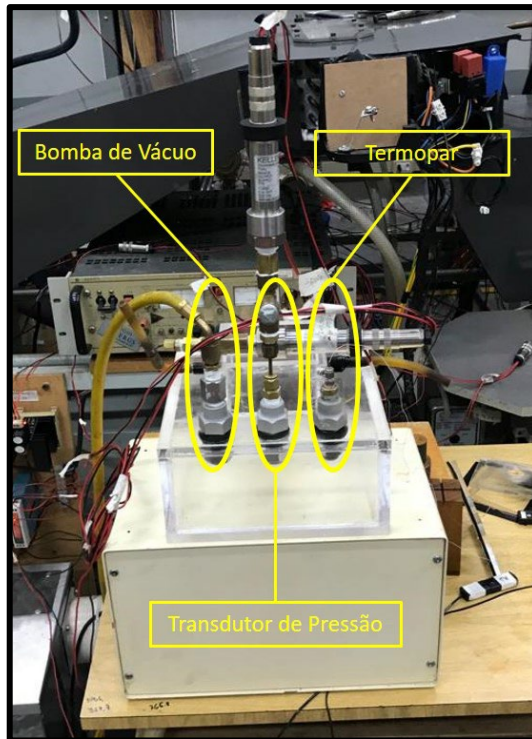


Fonte: Elaborado pelo autor.

Para realizar o processo, a câmara foi conectada a uma bomba de vácuo (Modelo VE 260D 3/4HP da marca EOS) com o intuito de garantir a diferença de pressão constante entre a câmara e o criocautério de nitrogênio líquido com ponteira de 1mm de saída. Quando a pressão na câmara se estabilizou no valor desejado, a válvula do criocautério (de 500mL da marca NitroSpray) foi aberta para permitir o escoamento do nitrogênio e resfriar todo o sistema. Após o evaporador com a amostra foi inserido na câmara e então a bomba de vácuo é acionada novamente. Por fim, o nitrogênio líquido foi novamente injetado diretamente na superfície do evaporador, realizando o processo de evaporação de filme fino.

Além da bomba de vácuo, têm-se instalados dois termopares (tipo T da marca Ômega) e um transdutor de pressão (Modelo PA33X/80794 da marca Keller), conforme indicado na Figura 3.1, para acompanhar a variação de temperatura da amostra e da câmara durante todo o processo. O sistema completo pode ser visualizado na Figura 3.5.

Figura 3.5 – Aparato experimental com os instrumentos de medição acoplados



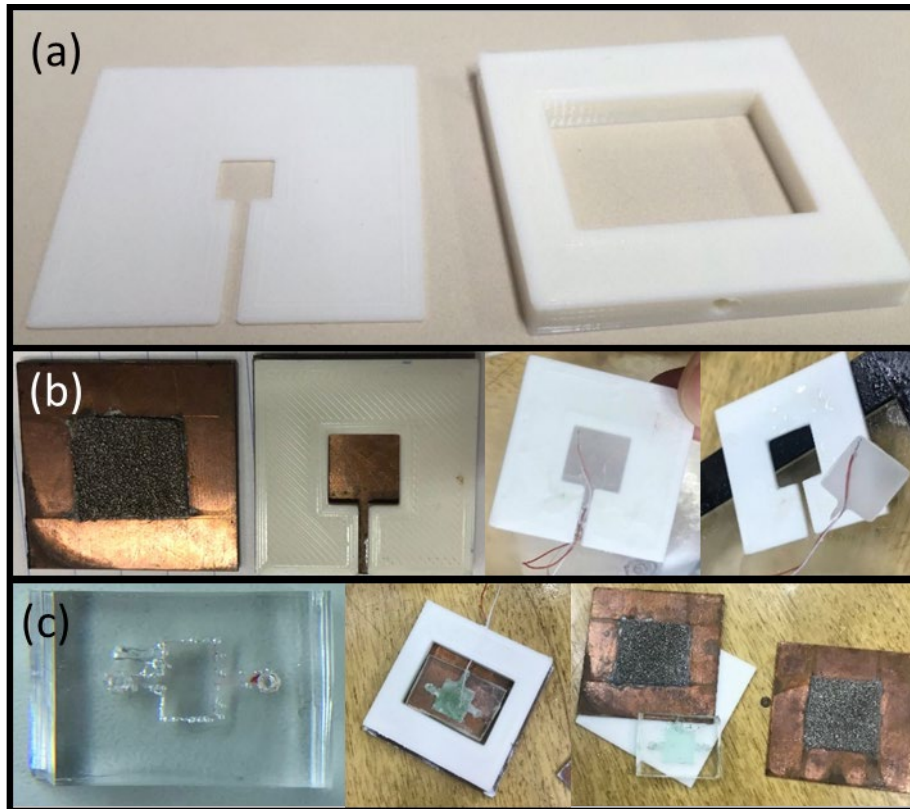
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os dados de pressão e temperatura foram registrados utilizando um sistema de aquisição de dados Agilent, utilizando o software BenchLink Data Logger Pro e o tempo de aquisição variou entre 0,1 e 1 s.

3.1.2 Seções de testes e amostras da evaporação de filme fino

As amostras foram colocadas no evaporador utilizando moldes de impressão 3D em PLA de diferentes volumes com e sem um dispositivo em PDMS, conforme Figura 3.6 . Na figura, estão representadas diferentes molduras de PLA utilizadas, bem como os sistemas dos evaporadores montados para os testes.

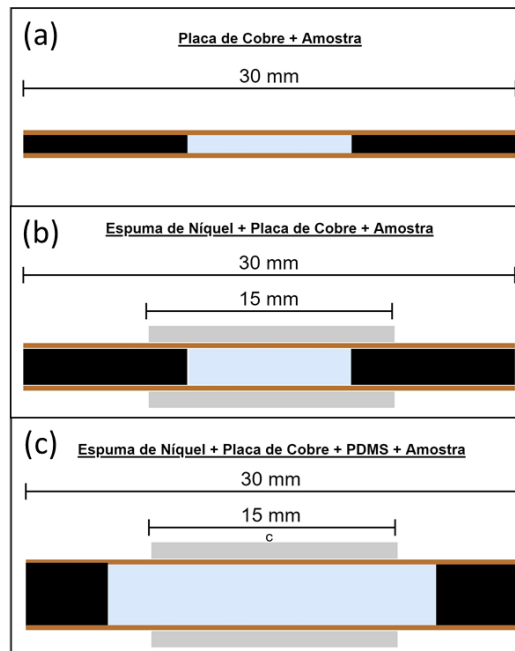
Figura 3.6 – Molduras em PLA para a amostra (a); Peças de superfície de cobre e espuma metálica do evaporador B, antes e pós congelamento (b); Peças do evaporador C, antes e pós congelamento (c).



Fonte: Elaborado pelo autor.

A amostra consistiu de água e foram testados volumes de 25, 30 e 50 μL . Além disso, os testes foram realizados em três conjuntos de evaporadores diferentes, indicados na Figura 3.7.

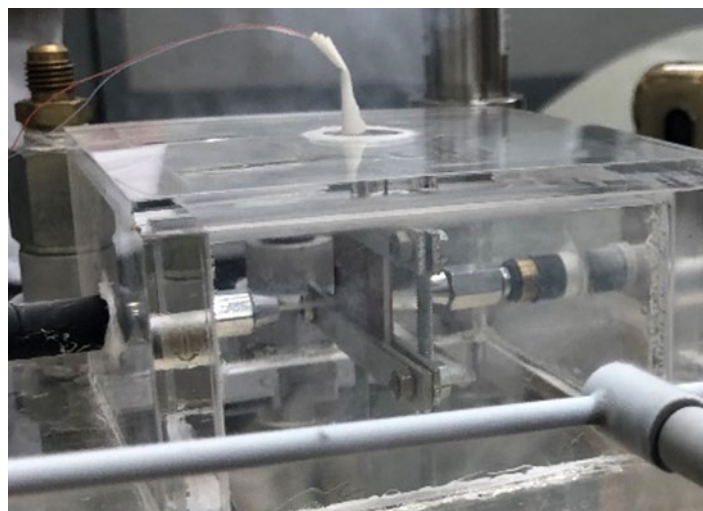
Figura 3.7 – Evaporador A: Placa de cobre e amostra (a), Evaporador B: Placa de cobre revestida com espuma de níquel e amostra (b) e Evaporador C: Placa de cobre revestida com espuma de níquel e amostra no PDMS (c)



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 3.8 é possível observar o jato de nitrogênio sobre a superfície da espuma do evaporador. Nota-se que em alguns casos, como na foto, o nitrogênio evapora antes mesmo de atingir a seção de testes.

Figura 3.8 – Imagem do vapor de nitrogênio entrando em contato com o evaporador



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os detalhes dimensionais dos evaporadores utilizados nos testes, são apresentados na Tabela 3.1. Além disso, a área total da superfície dos evaporadores é de 900 mm² em todos os casos estudados.

Tabela 3.1 – Evaporadores utilizados nos testes de congelamento por evaporação de filme fino de nitrogênio

| Evaporador A | Evaporador B | Evaporador C |
|---------------------------|--|--|
| Placa de cobre – 0,3 mm | Espuma de níquel – 0,5 mm Placa de cobre – 0,3 mm | Espuma de níquel – 0,5 mm Placa de cobre – 0,3 mm |
| Amostra – 1,15 m | Amostra – 1,50 mm | PMDS + Amostra – 3,90 mm |
| Volume da Amostra – 25 µL | Volume da Amostra - 50 µL | Volume da Amostra – 30 µL |

Fonte: Elaborado pelo autor.

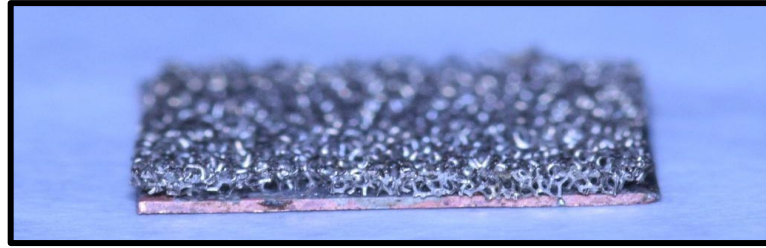
Os evaporadores B e C são formados basicamente por duas placas de cobre com uma espuma porosa de níquel soldada nas superfícies externas das placas, divergindo apenas no condicionamento e espessura da amostra. No evaporador B a amostra está em contato direto com a placa de cobre dentro da moldura, enquanto no evaporador C ela está condicionada dentro de uma cápsula de PDMS, a qual foi utilizada nos testes visando uma viabilidade técnica para posterior utilização na indústria, onde as células podem permanecer preservadas.

O PDMS citado e utilizado no trabalho se trata do dimetilpolissiloxano, também conhecido como dimeticona. Ele é um polímero orgânico a base de silício utilizado para várias aplicações, graças as suas diferentes propriedades. O composto é transparente, inerte, não tóxico e não inflamável, fazendo com que ele seja uma alternativa muito viável para a conservação de células.

O composto tem aplicações em lentes de contato, dispositivos médicos, elastômeros, xampus, alimentos, calafetantes, lubrificantes e outros materiais. Em relação as suas propriedades mecânicas ele apresenta viscoelasticidade, se caracterizando como um óleo em altas temperaturas e como uma borracha em temperatura ambiente ou negativas. Apresenta também uma característica hidrofóbica, facilitando assim o manuseio de amostras no seu interior.

A espuma de níquel foi soldada sobre a placa de cobre conforme mostrado na Figura 3.9. Esta confecção foi realizada em apoio do Laboratório de Engenharia Mecânica da Universidade Estadual Paulista (UNESP) de São Paulo.

Figura 3.9 – Placa de cobre com espuma metálica porosa de níquel



Fonte: Elaborado pelo autor.

A estrutura porosa de níquel utilizada foi caracterizada por Manetti *et al.* (2021), e as principais propriedades são descritas a seguir na Tabela 3.2.

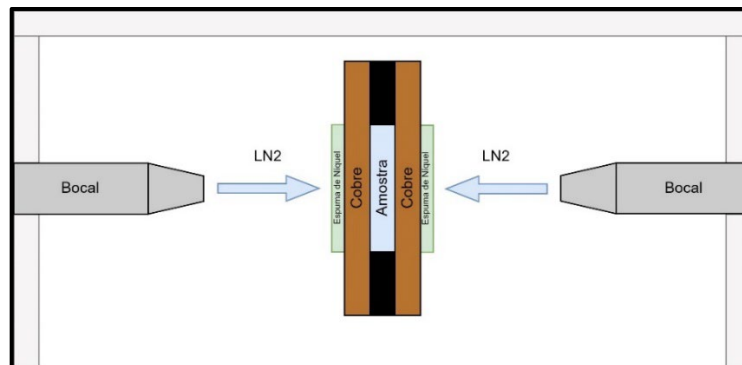
Tabela 3.2 – Propriedades físicas da espuma porosa de níquel

| Propriedade | Valor |
|--|-------------------|
| Massa (kg) | $0,106 \pm 0,010$ |
| Massa específica da espuma (kg/m^3) | $138,0 \pm 14,12$ |
| Massa específica relativa (-) | $1,6 \pm 0,15$ |
| Porosidade (%) | $98,4 \pm 0,15$ |
| Diâmetro da célula (mm) | $0,46 \pm 0,10$ |
| Diâmetro do poro (mm) | $0,25 \pm 0,09$ |
| Diâmetro da fibra (mm) | $0,07 \pm 0,02$ |

Fonte: Manetti *et al.* (2021).

A maneira como os evaporadores são condicionados dentro da câmara de acrílico está representada na Figura 3.10. A distância entre as saídas dos bocais e o centro das amostras é igual em todos os casos, para garantir uma comparação posterior mais real possível.

Figura 3.10 – Condicionamento do evaporador na câmara de testes



Fonte: Elaborado pelo autor.

A medição de temperatura do processo ocorre através de um termopar tipo T inserido no interior da amostra. Com essa medição ao longo do tempo, é possível calcular a taxa de resfriamento, sendo ela a relação da variação de temperatura ao longo de um determinado tempo, como podemos ver na Eq. (1).

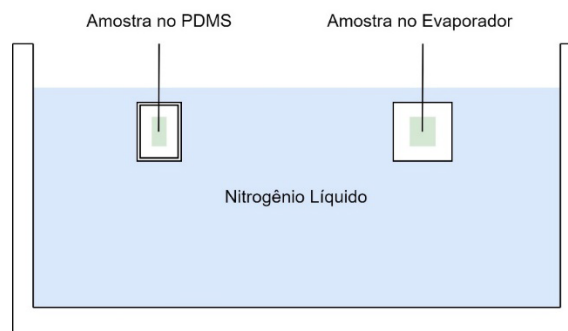
$$\frac{\Delta T}{\Delta t} = \frac{T_{Final} - T_{Inicial}}{t_{Final} - t_{inicial}} \quad (1)$$

Os experimentos consistiram em analisar a evaporação de filme fino no processo de resfriamento/congelamento de uma amostra de água através das medidas de temperatura da amostra ao longo do tempo e medição de pressão da câmara para garantir estabilidade do processo. Para o cálculo da taxa de resfriamento representada na Eq. (1) foram utilizados o início e o fim da curva de resfriamento como parâmetros. Estes tempos são determinados avaliando a curva de coleta de dados, e identificando onde as temperaturas estão estáveis. Quando a temperatura começa a variar considera-se o ponto inicial, ao passo que, quando não ocorre variação na temperatura considera-se como o ponto final.

3.1.3 Bancada experimental do método de imersão

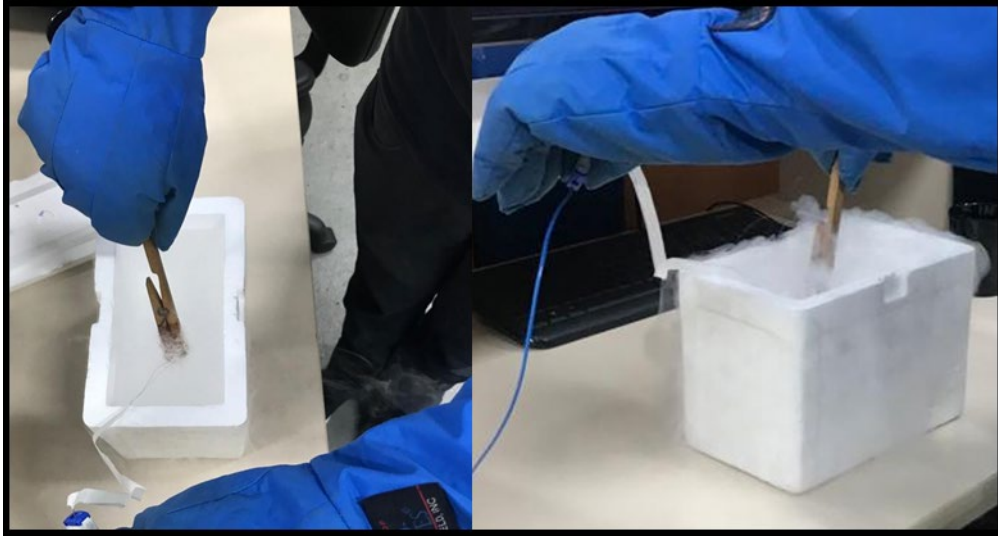
O método consiste na imersão da amostra em nitrogênio líquido. Para realizar este experimento, foi utilizada uma caixa de poliestireno com nitrogênio líquido e após a amostra foi inserida com um termopar do tipo T em seu interior, fazendo a medição do processo de resfriamento/congelamento. Na Figura 3.11 tem-se o sistema por imersão com a amostra de água em PDMS e a amostra no evaporador, além dos pontos onde foram inseridos os termopares.

Figura 3.11 – Diagrama do experimento do método por imersão em LN2



Fonte: Elaborado pelo autor.

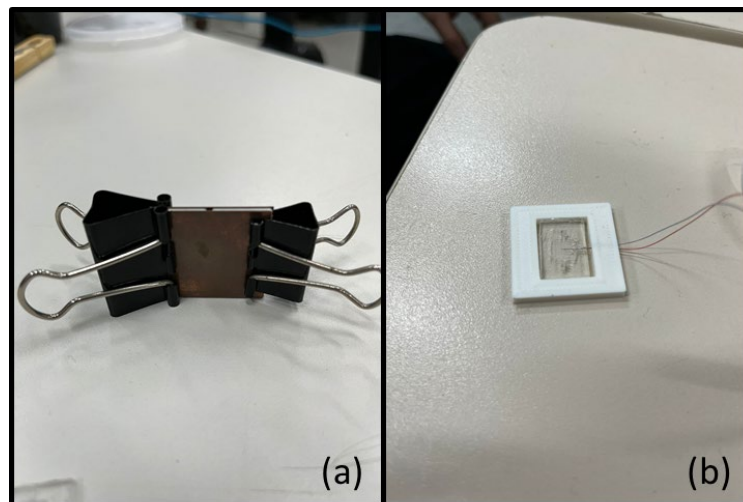
Figura 3.12 – Bancada de testes do congelamento por imersão



Fonte: Elaborado pelo autor.

Foram feitos testes em triplicata com os dois sistemas, sendo um deles exatamente idêntico ao evaporador A e outro uma cápsula de PDMS, utilizada no evaporador C, como vemos na Figura 3.13. Em ambos os sistemas foi utilizado novamente água como amostra, para poder comparar os resultados obtidos na evaporação de filme fino com este método convencional. Os testes foram realizados utilizando 50 μL de água no evaporador e cerca de 30 μL de água na cápsula de PDMS. Estes volumes foram os mesmos utilizados nos testes de evaporação de filme fino, com o intuito de permitir a comparação entre os métodos na discussão dos resultados.

Figura 3.13 – Seções de teste utilizadas no método de imersão: Evaporador A (a) e Cápsula de PDMS (b)



Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2 Análise Numérica

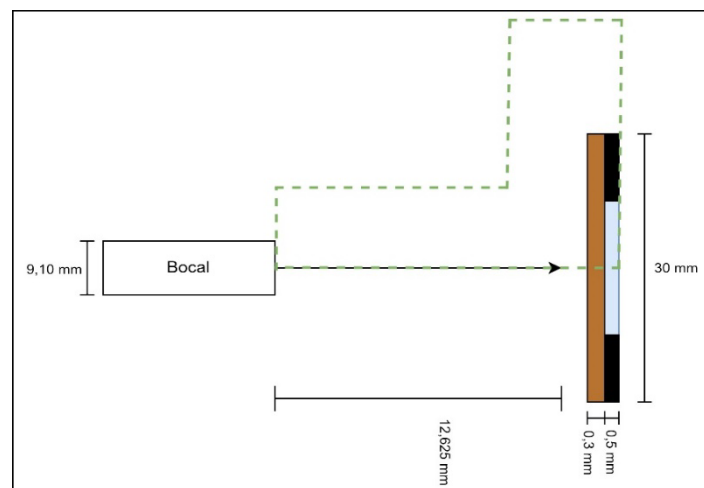
Paralelamente ao estudo experimental, foi realizada uma simulação numérica da evaporação por filme fino. O *software* ANSYS ® foi utilizado pois permite trabalhar com os fenômenos de escoamento de fluidos, bem como transferência de calor e mudança de fase. Nas simulações, foram utilizadas as condições para o caso do Evaporador A, ou seja, duas placas de cobre com a amostra no interior.

3.2.1 Geometria da simulação

Como o processo consiste em condições de entrada idênticas dos dois lados do evaporador, na simulação numérica é possível reduzir o domínio que será simulado considerando simetria dos eixos X e Y. Essas simplificações de simetrias tem o intuito de reduzir o tempo computacional, tendo em vista que o comportamento é de fato simétrico, ao desprezarmos a gravidade.

Na Figura 3.14 é possível visualizar o lado esquerdo do evaporador, considerando que ele foi dividido exatamente pela metade ao compararmos com a Figura 3.10, que foi apresentada anteriormente.

Figura 3.14 – Domínio do sistema evaporador e bocal do jato de nitrogênio para simulação computacional

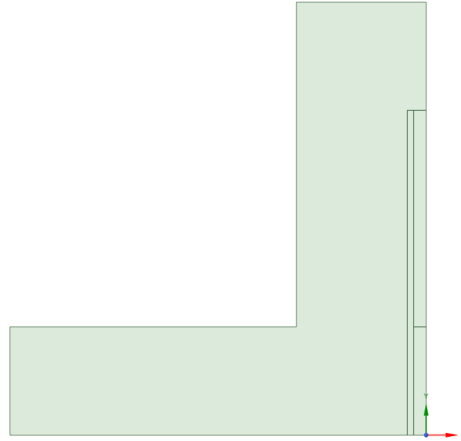


Fonte: Elaborado pelo autor.

Com metade do sistema de evaporação no sentido horizontal, ainda é possível separar o sistema em duas partes verticalmente. Com isso, a parte que foi considerada como domínio das

simulações é a parte tracejada em verde na Figura 3.14. Esse domínio foi desenhado no *software SpaceClaim* e pode ser visualizado na Figura 3.15.

Figura 3.15 – Geometria 2D desenvolvida para a simulação

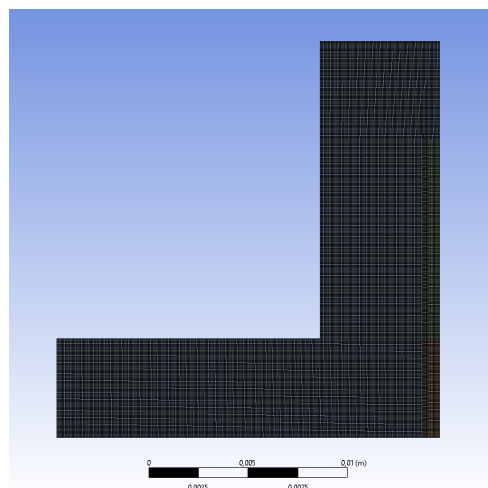


Fonte: Elaborado pelo autor.

3.2.2 Geração da malha

A malha foi desenvolvida no *software ANSYS MESHING*®, utilizando os modelos pertinentes para o trabalho. A malha foi construída de maneira uniforme em todas as superfícies, se dividindo em câmara, amostra, placa de cobre e isolamento (molde em 3D). Como foi realizada uma simulação em 2D, o método *MultiZone Quad*, juntamente com um *Face Meshing*, foi utilizado para garantir que todos os elementos tenham formato quadrilátero idênticos, conforme mostrado na Figura 3.16.

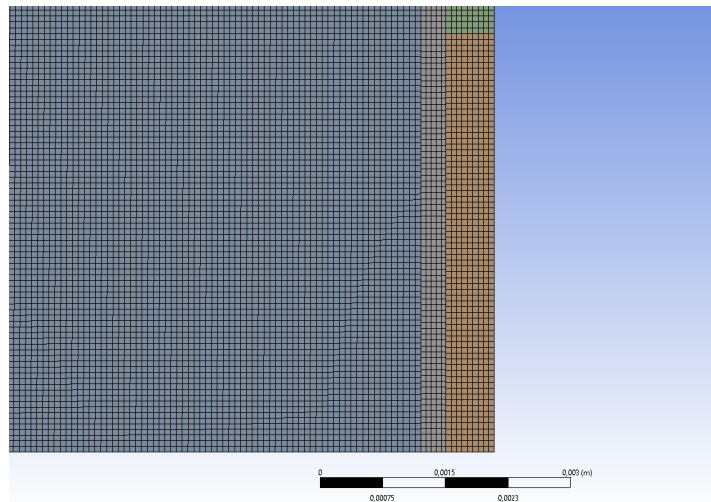
Figura 3.16 – Malha gerada para a simulação



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os tamanhos dos elementos ficaram na faixa de 7×10^{-5} mm, garantindo um total de cerca de 40.000 elementos quadriláteros. Os detalhes na região entre a câmara, placa e amostra podem ser visualizados na Figura 3.17.

Figura 3.17 – Malha aproximada da região de transição



Fonte: Elaborado pelo autor.

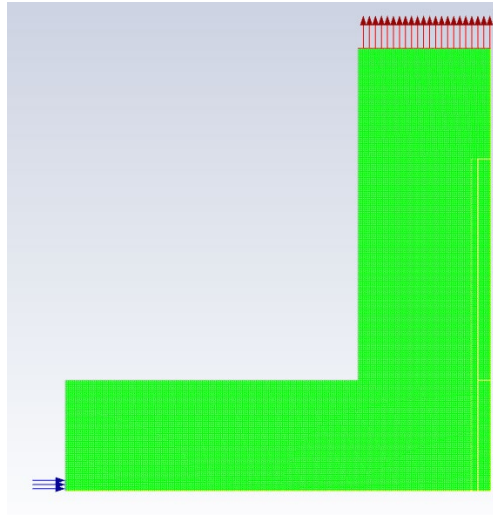
3.2.3 Equações e Configurações dos processos

O *setup* que foi utilizado nas simulações numéricas para a evaporação de filme fino apresentou os modelos de turbulência, solidificação e de energia presentes no ANSYS *Fluent*®. O processo foi simulado considerando uma formulação transiente durante um período de 0,5 s, com um passo de tempo de tamanho 10^{-5} s e com um modelo de viscosidade turbulento do tipo $k-\omega$.

O modelo de turbulência foi escolhido a partir de uma análise comparativa com outros modelos, que apresentam também um escoamento turbulento. O escoamento foi determinado como turbulento através do cálculo de Reynolds que apresentou valor acima de 50.000.

No *Fluent*, é possível visualizar a geometria que será simulada, bem como as condições de contorno consideradas na simulação que são apresentadas na Figura 3.18.

Figura 3.18 – Malha da simulação no software *Ansys Fluent*



Fonte: Elaborado pelo autor.

Para simular o escoamento o *software* ANSYS Fluent® necessita da equação de conservação da quantidade representada na Eq. (2).

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho \vec{v}) + \nabla \cdot (\rho \vec{v} \vec{v}) = -\nabla p + \nabla \cdot (\bar{\tau}) + \rho \vec{g} + \vec{F} \quad (2)$$

Onde p é a pressão estática, $\bar{\tau}$ tensor de estresse, $\rho \vec{g}$ é a força gravitacional do corpo e \vec{F} é a força de campo externas ao corpo.

O *software* utiliza as equações de transporte para o modelo de turbulência k - ω , representadas pelas equações de energia cinética turbulenta e de taxa de dissipação específica, Eq. (4) e Eq. (5), respectivamente,

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho k) + \frac{\partial}{\partial x_i}(\rho k u_i) = \frac{\partial}{\partial x_j} \left(\Gamma_k \frac{\partial k}{\partial x_j} \right) + G_k - Y_k + S_k + G_b \quad (4)$$

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho \omega) + \frac{\partial}{\partial x_i}(\rho \omega u_i) = \frac{\partial}{\partial x_j} \left(\Gamma_\omega \frac{\partial \omega}{\partial x_j} \right) + G_\omega - Y_\omega + S_\omega + G_{\omega b} \quad (5)$$

onde k é a energia cinética turbulenta e ω é a taxa de dissipação específica, que são obtidas nas Eqs. (4) e (5).

As variáveis G_k e G_ω representam a geração de turbulência de energia cinética e geração de turbulência do ω , respectivamente. Γ_k e Γ_ω representam a difusividade efetiva de k e ω . S_k e S_ω são os termos fonte definidos pelo usuário. Y_k e Y_ω representam a dissipação de k e ω em função da turbulência. Por fim, as variáveis G_b e $G_{\omega b}$ são os termos de empuxo.

Para a equação da continuidade, utiliza-se a equação de conservação de massa considerando geometrias 2D, representada na Eq. (6),

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \frac{\partial}{\partial x}(\rho v_x) + \frac{\partial}{\partial r}(\rho v_r) + \frac{\rho v_r}{r} = S_m \quad (6)$$

onde x é a coordenada axial, r é a coordenada radial, v_x é a velocidade axial, v_r é a velocidade radial e S_m é a fonte de massa adicionada a fase contínua.

Como existe o processo de solidificação da água, então a equação de energia que controla o processo é a apresentada na Eq. (7),

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho H) + \nabla \cdot (\rho \vec{v} H) = \nabla \cdot (k \nabla T) + S \quad (7)$$

onde H é a entalpia do material, ρ é a massa específica, \vec{v} é a velocidade do fluido e S o termo de fonte, calculado pela Eq. (8).

Por fim, como existe a solidificação do líquido no interior do evaporador, o software ainda utiliza a equação de solidificação que é representada pelas Eq. (8) e Eq. (9),

$$S = \frac{(1 - \beta)^2}{(\beta^3 + \varepsilon)} A_{mush} (\vec{v} - \vec{v}_p) \quad (8)$$

$$\beta = 0 \quad \text{se } T < T_{solido} \quad \beta = 1 \quad \text{se } T > T_{liquido} \quad (9)$$

$$\beta = \frac{T - T_{solido}}{T_{liquido} - T_{solido}} \quad \text{se } T_{solido} < T < T_{liquido}$$

onde β é a fração de volume de líquido, ε é uma constante para prevenir a divisão por zero, A_{mush} é uma constante de zona mole definida pelo usuário. Além disso, temos a velocidade \vec{v}_p , que representa a velocidade do sólido para fora do domínio devido às forças de tração.

As condições utilizadas para iniciar a simulação foram considerando a entrada do jato com velocidade de 7 m/s e apenas nitrogênio vapor entrando na câmara, considerando um título de nitrogênio líquido para simular a evaporação. Além disso, considerou-se uma temperatura inicial do meio de 287 K e uma saída de pressão de 101,325 kPa (atmosférica). Todas essas condições foram consideradas a partir das mesmas condições dos experimentos que foram realizados, permitindo a comparação posterior.

4 RESULTADOS

Os resultados do trabalho foram divididos de acordo com a metodologia descrita no capítulo anterior, sendo eles o experimental e o numérico.

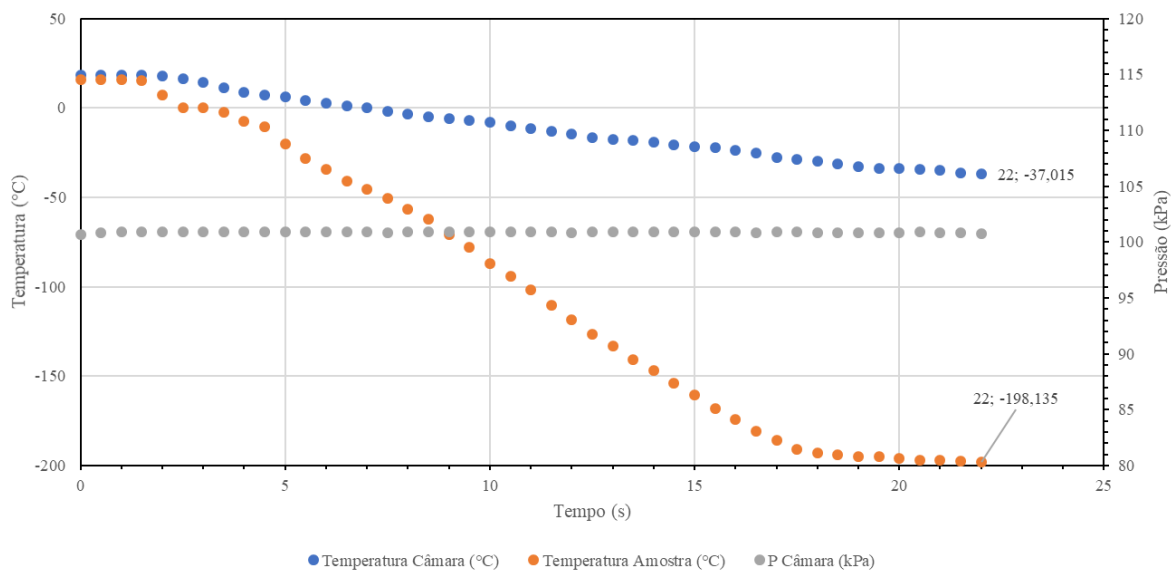
4.1 Resultados experimentais

4.1.1 Método da evaporação de filme fino

Os testes com os evaporadores B e C, com amostra em contato direto com a placa de cobre e a amostra dentro do PDMS, respectivamente, foram realizados em triplicata. Já os experimentos realizados com o evaporador A, foram utilizados somente para comparar posteriormente com os resultados do modelo numérico.

Na Figura 4.1 é mostrado o comportamento do congelamento do evaporador B num período de aproximadamente 25 s. Em todos os casos a pressão no interior da câmara ficou aproximadamente 100 kPa, representando uma pressão atmosférica, mesmo com a utilização da bomba de vácuo durante todo o processo.

Figura 4.1 – Comportamento da temperatura e pressão durante o congelamento com o evaporador B



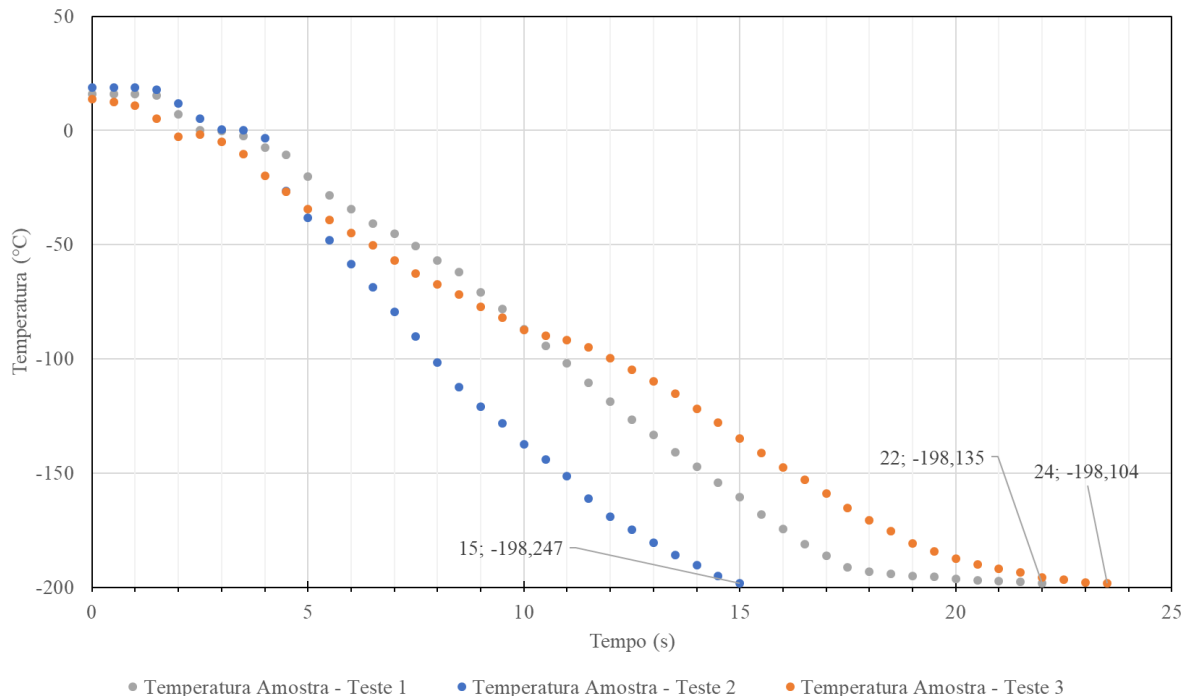
Fonte: Elaborado pelo autor.

Um ponto importante de salientar é que mesmo sem a geração de vácuo na câmara, a bomba auxiliou a redução de umidade do sistema, fazendo com que não ocorresse o congelamento na superfície externa do evaporador. Este congelamento externo, poderia causar dificuldades na transferência de calor, visto que a camada de gelo aumenta ao longo do processo e funciona como uma resistência térmica.

Além disso, podemos ver que os testes apresentam uma redução na taxa de resfriamento das amostras no instante em que a água começa a congelar, quando a temperatura fica próxima de 0°C. De maneira geral, todas as curvas de congelamento apresentarão o mesmo comportamento, onde a mudança de fase apresenta uma temperatura constante e depois retorna a variar quando a amostra está solidificada.

Na Figura 4.2 é possível ver os comportamentos de resfriamento para os 3 testes com o evaporador B. Nota-se que o comportamento não se repete em todos os testes. Isso pode ser considerado devido a variações de condicionamento do evaporador e do sistema. Uma possível causa que pode recorrer em diferenças é a posição do termopar no interior da amostra.

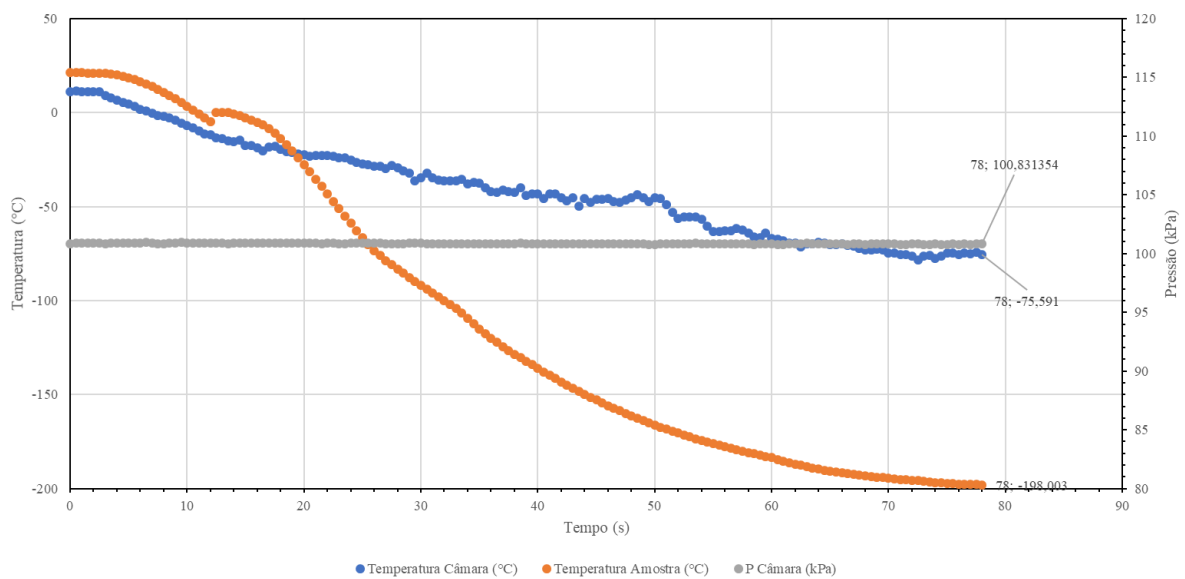
Figura 4.2 – Comportamento da temperatura para os 3 testes durante o congelamento da amostra no evaporador B



Fonte: Elaborado pelo autor.

Da mesma forma que o evaporador B, se obteve os resultados apresentados nas Figura 4.3, representando o resfriamento da amostra dentro do PDMS do evaporador C em um dos testes. O tempo para a amostra chegar até a temperatura do nitrogênio é aproximadamente 5 vezes maior no evaporador C ao compararmos com os resultados obtidos no evaporador B. Os tempos respectivos são de 20 e 95 segundos em média, para o evaporador B e C respectivamente, como vemos na Figura 4.5.

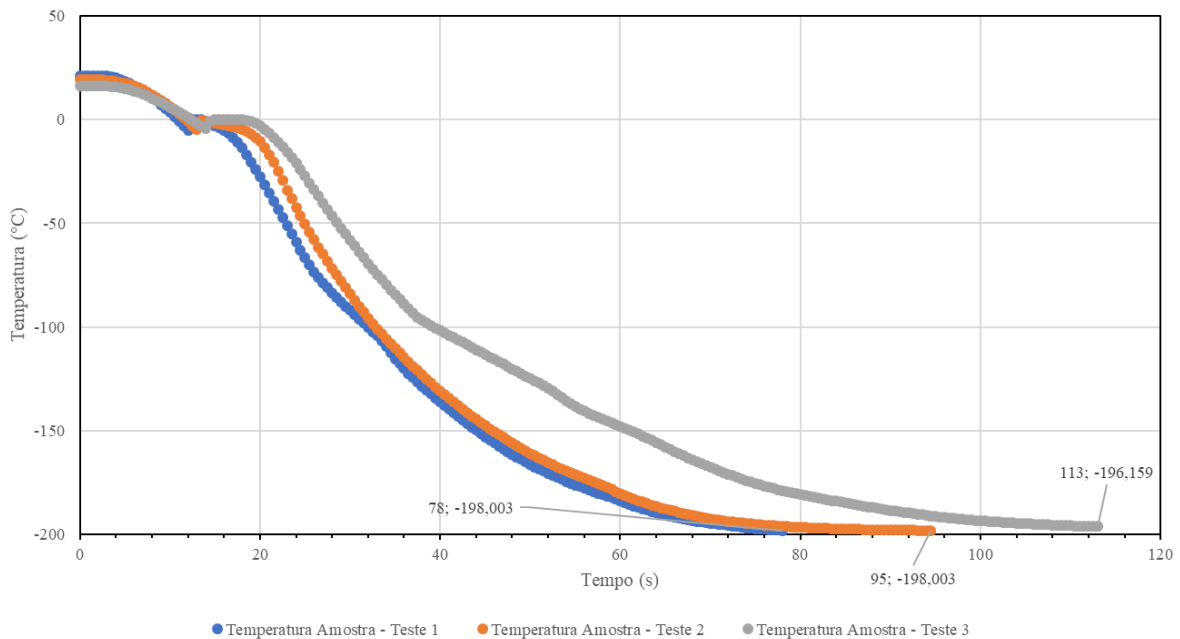
Figura 4.3 – Comportamento da temperatura e pressão durante o congelamento com evaporador C



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na Figura 4.4 podemos ver a curva para os testes realizados com o evaporador C. Nota-se que o terceiro teste apresenta um resfriamento mais demorado ao comparar com os demais. Isso pode ocorrer devido à redução de velocidade do nitrogênio na saída do criocautério ou até mesmo algum erro de medição proveniente de posição do termopar. Outra incerteza de medição que pode estar associada nesse caso também é que a quantidade de nitrogênio no criocautério pode ter variado, uma vez que é possível realizar até 5 testes com um criocautério no volume máximo de 500 mL.

Figura 4.4 – Comportamento da temperatura para os 3 testes durante o congelamento da amostra no evaporador C



Fonte: Elaborado pelo autor.

Percebe-se ao compararmos as Figuras 4.2 e 4.4 que o comportamento do congelamento é semelhante, com pequenas variações nas taxas de resfriamento. O comportamento em ambos os testes demonstra uma redução de velocidade de resfriamento na mudança de fase da água e um comportamento de uma curva exponencial com expoente x negativo.

Tendo isso em vista, pode-se calcular a taxa de resfriamento dos experimentos, como mostra na Tabela 4.1. Nela, é possível perceber que em todos os testes o evaporador B apresentou uma maior taxa de resfriamento.

Tabela 4.1 – Comparativo do resfriamento por evaporação de filme fino

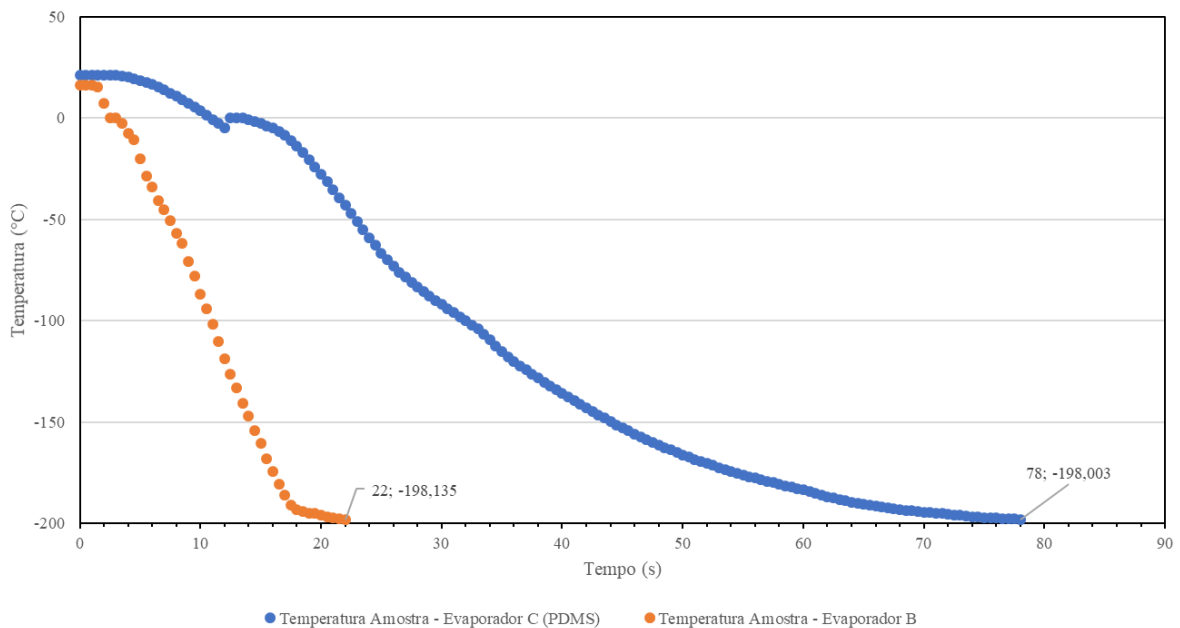
| Testes | Evaporador B | | | |
|--------|--------------|--------|-------|--------------------------------------|
| | Ti(°C) | Tf(°C) | s (s) | $\frac{\Delta T}{\Delta t}$ (°C/min) |
| 1 | 16,0 | -198,1 | 22,0 | -584,0 |
| 2 | 18,9 | -198,2 | 15,0 | -868,7 |
| 3 | 13,7 | -198,1 | 23,5 | -540,7 |
| Testes | Evaporador C | | | |
| | Ti(°C) | Tf(°C) | s (s) | $\frac{\Delta T}{\Delta t}$ (°C/min) |
| 1 | 21,2 | -198,0 | 78,0 | -168,6 |
| 2 | 19,5 | -198,0 | 94,5 | -138,1 |
| 3 | 16,4 | -196,2 | 113,0 | -112,9 |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Nota-se que as maiores taxas de resfriamento encontradas foram no evaporador B, que não utilizava o PDMS para condicionar a amostra. Essa diferença pode ser explicada por dois fatores importantes que seriam a resistência de transferência de calor do PDMS e a instabilidade dos jatos de nitrogênio. Em relação ao PDMS, o material apresenta uma condutividade térmica de aproximadamente 0,18 W/mK, que é um valor muito baixo ao compararmos com a condutividade do cobre de 400 W/mK.

Um ponto importante é que o evaporador B utiliza um volume de 50 μL , enquanto o evaporador C utiliza um volume de 30 μL . Apesar do volume maior, ainda assim o evaporador B encontra a melhor taxa de resfriamento, mostrando o tamanho da influência da condutividade do PDMS. Essa diferença fica visível ao compararmos as curvas de resfriamento dos evaporadores, como vemos na Figura 4.5.

Figura 4.5 – Variação da temperatura no resfriamento de amostras no evaporador B e o evaporador C através da evaporação de filme fino



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em muitos momentos do experimento o jato aparentava apresentar apenas vapor de nitrogênio, que possui um coeficiente de transferência de calor quase 10 vezes menor que o nitrogênio líquido. Ou seja, a variação do jato e sua composição acabava por afetar em alguns momentos no processo estudado. Mesmo modificando o bocal utilizado para diferentes diâmetros as variações seguiram ocorrendo, o que pode causar essa diferença de comportamentos.

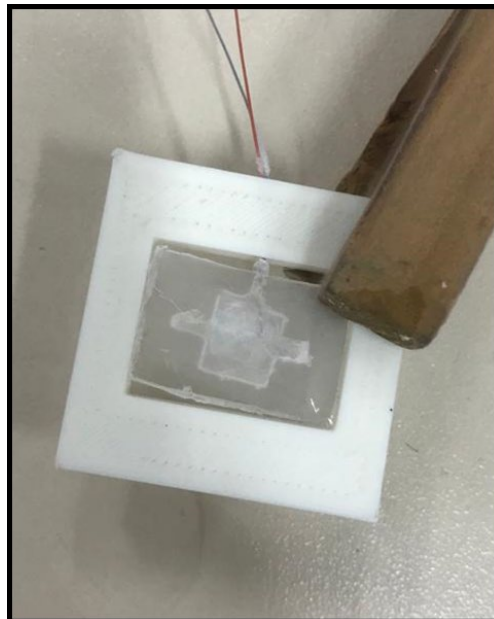
Um ponto importante de salientar, apresentado na Tabela 4.1, onde o evaporador B apresentou uma maior taxa no teste 2. Isso pode ter ocorrido pelos fatores citados ou ainda a posição do termopar na amostra. Caso o termopar não estiver centralizado na amostra, a medição pode ser da superfície interna da placa de cobre, fazendo com que ocorra um erro de medição.

4.1.2 Método por imersão em nitrogênio líquido

Com o intuito de comparar os métodos, foram realizados testes de congelamento por imersão em nitrogênio líquido. Foram consideradas duas condições: amostra em PDMS e amostra entre duas placas de cobre lisas (Evaporador A).

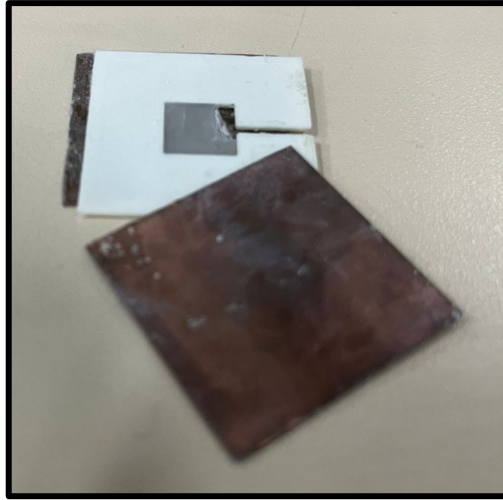
As Figuras 4.6 e 4.7 apresentam as amostras após o congelamento. É possível perceber que não houve vazamento ou perda de amostra ao longo dos processos realizados.

Figura 4.6 – Cápsula de PDMS após o congelamento por imersão



Fonte: Elaborado pelo autor.

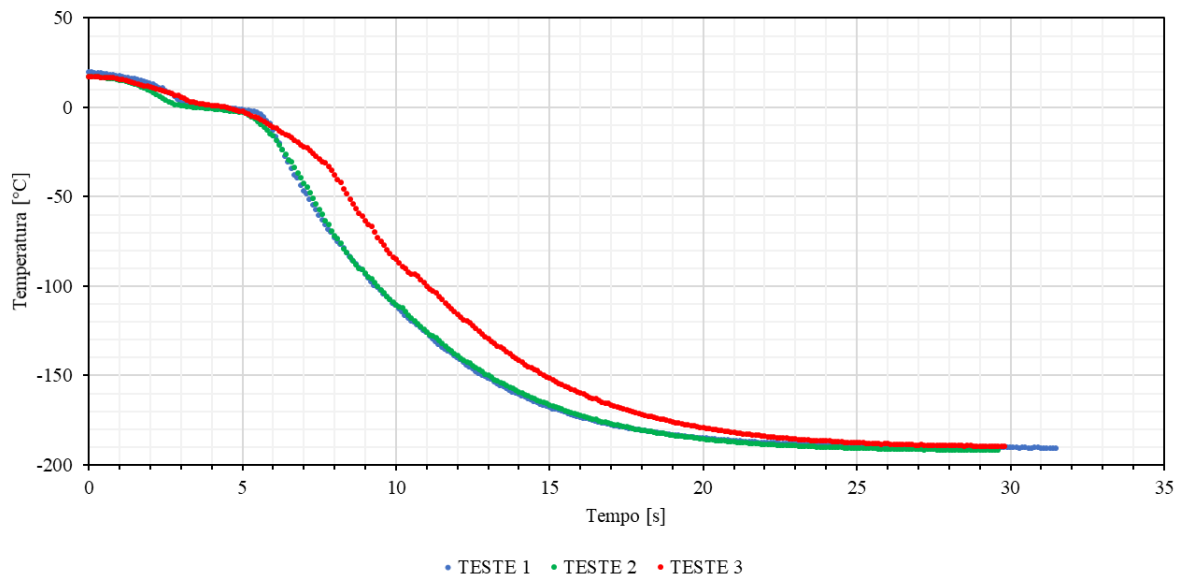
Figura 4.7 – Evaporador A após o congelamento por imersão



Fonte: Elaborado pelo autor.

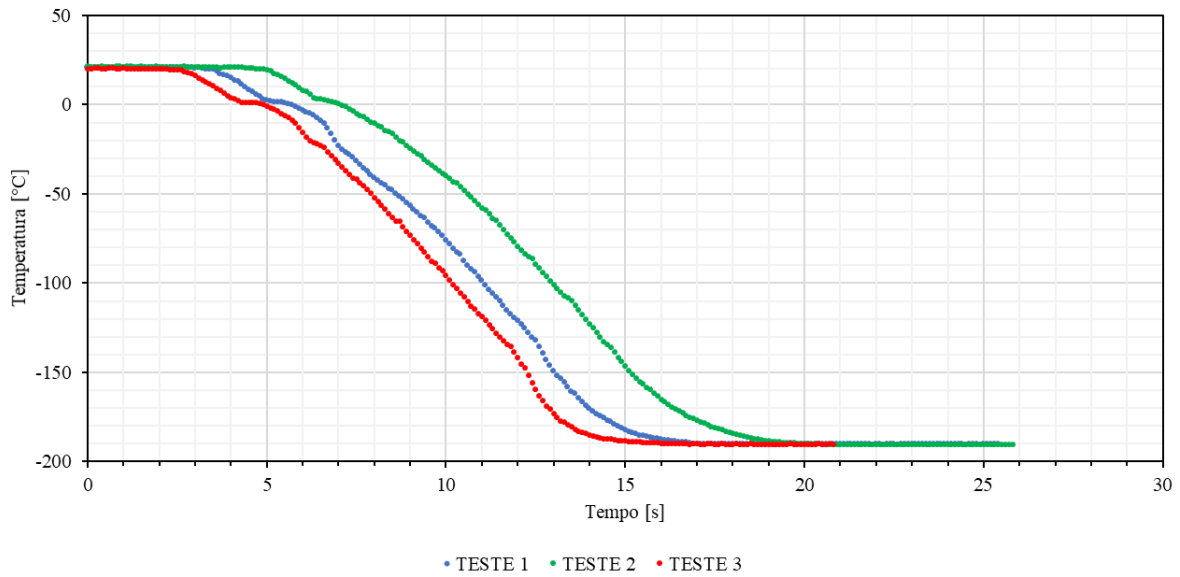
Assim como na evaporação de filme fino, foram realizados testes em triplicata para verificar o comportamento do método de resfriamento e posterior comparação. Nas Figura 4.8 e Figura 4.9 são apresentadas as curvas de resfriamento.

Figura 4.8 – Comportamento da temperatura no congelamento por imersão com amostra em cápsula de PDMS



Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 4.9 – Comportamento da temperatura no congelamento por imersão do evaporador A



Fonte: Elaborado pelo autor.

Avaliando as curvas apresentadas é possível verificar novamente que durante a mudança de fase da água de líquido para sólido, ocorre o ponto de maior resistência de transferência de calor em todos os casos. As diferenças observadas nas curvas dos diferentes testes podem ser provenientes de alguma movimentação do termopar durante os experimentos, como já foi citado anteriormente.

Além disso, percebe-se que as maiores diferenças ocorrem para o caso do teste com a placa de cobre. Também o fato de as temperaturas iniciais não serem exatamente as mesmas, isso pode afetar também nessa diferença das taxas encontradas.

Tabela 4.2 – Comparativo do resfriamento por imersão

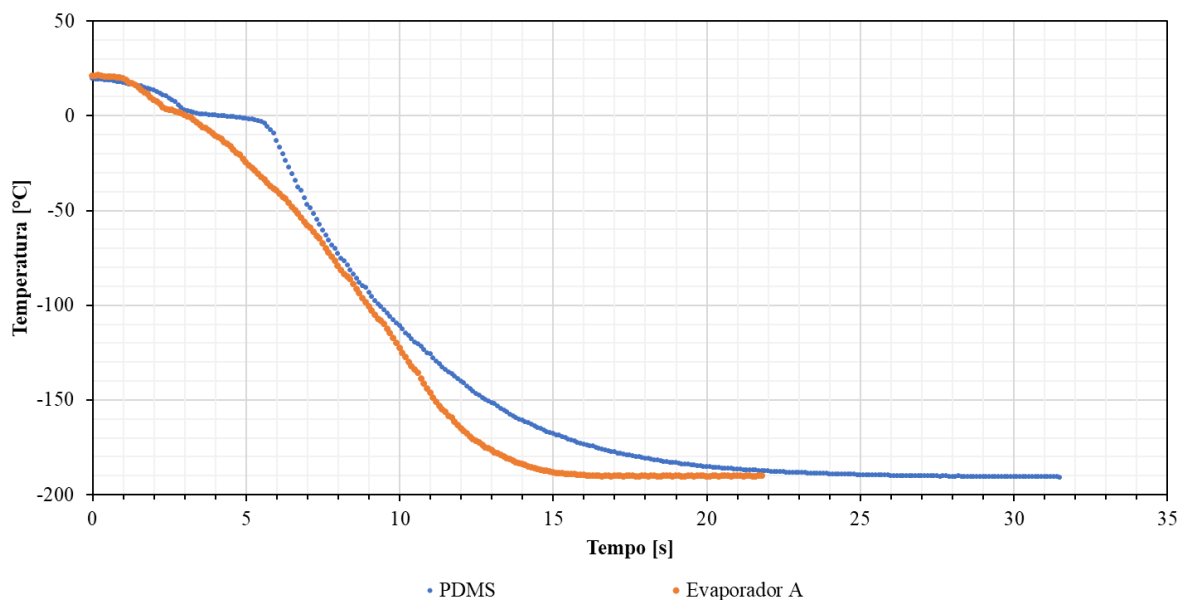
| Testes | Evaporador A + Amostra | | | |
|--------|------------------------|--------|-------|--------------------------------------|
| | Ti(°C) | Tf(°C) | s (s) | $\frac{\Delta T}{\Delta t}$ (°C/min) |
| 1 | 20,0 | -189,9 | 13,6 | -926,3 |
| 2 | 20,3 | -190,1 | 15,4 | -819,7 |
| 3 | 20,0 | -190,0 | 14,2 | -887,4 |
| Testes | PDMS + Amostra | | | |
| | Ti(°C) | Tf(°C) | s (s) | $\frac{\Delta T}{\Delta t}$ (°C/min) |
| 1 | 19,5 | -190,1 | 26,4 | -476,2 |
| 2 | 17,4 | -191,2 | 26,5 | -472,4 |
| 3 | 17,4 | -188,6 | 26,6 | -464,8 |

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação as taxas de resfriamento, identifica-se que o evaporador A apresentou os maiores valores em comparação a cápsula de PDMS, como vemos na Tabela 4.2. Diferente dos testes de evaporação de filme fino, nesse caso não ocorreu variação significativa entre os testes com o mesmo caso.

Na Figura 4.10 é possível visualizar a diferença entre dois testes utilizando o Evaporador A e o PDMS. Nota-se que o PDMS apresenta uma maior resistência, devido a sua baixa condutividade térmica como já citado anteriormente.

Figura 4.10 – Comparativo de resfriamento entre o evaporador A e o PDMS através da imersão em nitrogênio líquido



Fonte: Elaborado pelo autor.

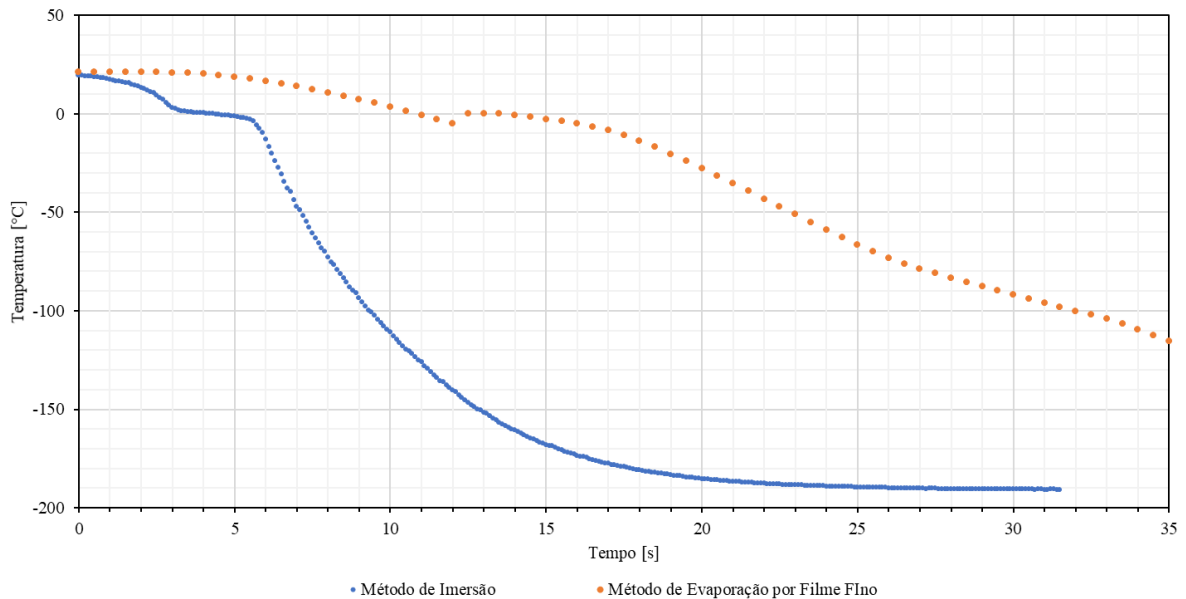
Independentemente do método, podemos dizer que o PDMS apresenta um ponto positivo e um negativo em relação a sua utilização. Tendo em vista sua natureza inerte, ele é um ótimo recipiente para armazenar células, todavia, ele apresenta como ponto negativo uma baixa condutividade térmica, reduzindo assim a velocidade de resfriamento.

4.1.3 Comparação de Métodos

Na Figura 4.11 é possível verificar uma comparação entre o congelamento do evaporador C, amostra em PDMS, através da evaporação de filme fino, e o congelamento por imersão da cápsula de PDMS. Percebe-se que o método por imersão foi mais rápido comparado ao filme fino, apresentando taxas médias de $-471,1$ e $-139,9$ °C/min respectivamente. Essa

divergência provavelmente está associada ao fato de o nitrogênio chegar na superfície porosa quase totalmente vaporizado. Isso faz com que a estrutura perca a sua capacidade do efeito de capilaridade, que ocorreria com o nitrogênio líquido, reduzindo assim a velocidade do resfriamento.

Figura 4.11 – Comparativo entre métodos para a cápsula de PDMS



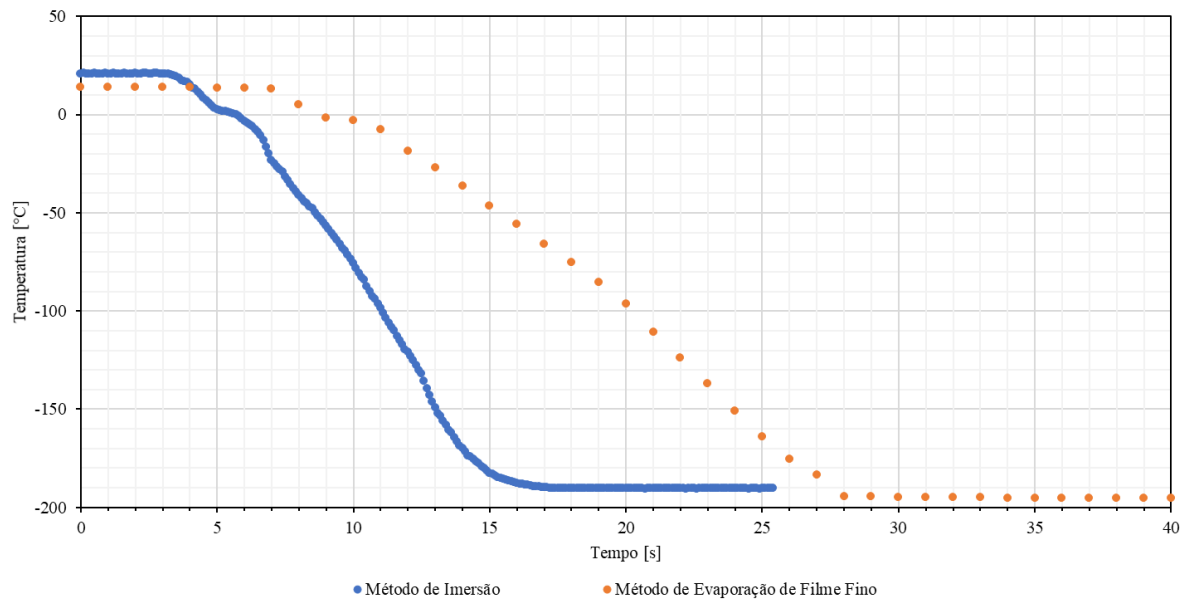
Fonte: Elaborado pelo autor.

Os testes realizados de evaporação de filme fino neste trabalho apresentaram taxas relativamente baixas, ao compararmos por exemplo com o trabalho de Su *et al.* (2017), que obtiveram taxas no patamar de 50.000 °C/min. Isso nos leva a entender que os testes realizados não podem ser considerados como uma vitrificação ultrarrápida, como as taxas máximas nesse método foram de aproximadamente 500°C/min.

Vale ressaltar, que essas diferenças com na o trabalho de Su *et al.* (2017) se dão pelo fato de o volume de amostra utilizado neste experimento ser consideravelmente maior, além de algumas diferenças do sistema utilizado. Das diferenças que podemos citar, temos a quantidade de criocautério utilizados e os evaporadores com diferentes formações. Além disso, o trabalho comparado utilizou uma redução de pressão na câmara, gerando um vácuo no sistema.

Já na Figura 4.12 podemos comparar as diferenças entre o método de evaporação de filme fino e de imersão para o evaporador A. Neste caso, o método com jato de nitrogênio apresenta uma velocidade de resfriamento menor ao compararmos com o método de imersão. Essa diferença pode estar associada com a oscilação do jato entre nitrogênio vapor e líquido, enquanto na imersão o nitrogênio em contato está em fase líquida.

Figura 4.12 – Comparativo entre métodos para evaporador A (imersão) e evaporador A (jato de nitrogênio)



Fonte: Elaborado pelo autor.

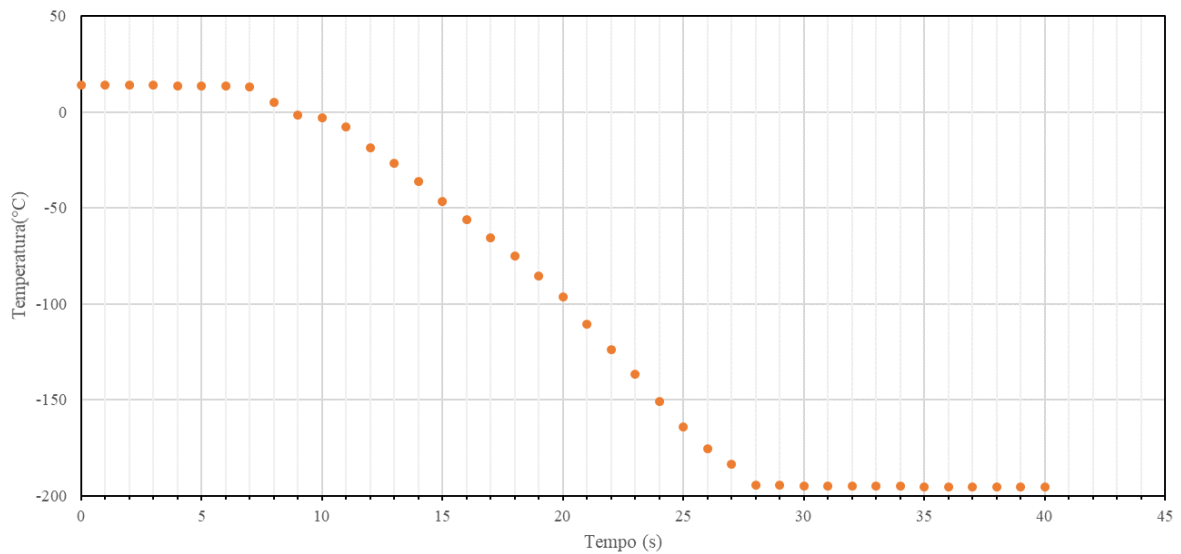
4.2 Resultados do estudo em simulação numérica

O estudo numérico desse trabalho foi desenvolvido para um caso de resfriamento/congelamento de uma amostra de água em um evaporador de cobre de superfície lisa e jato de nitrogênio. Os resultados serão comparados com um experimento realizado nas mesmas condições e serão apresentados os perfis de temperatura, pressão e outras variáveis no domínio simulado.

4.2.1 Experimento utilizado para comparação

Para comparar os resultados simulados, foram utilizados os dados de um experimento de evaporação de filme fino com o evaporador A (Figura 3.3) formado com duas placas de cobre lisas e a moldura 3D com a amostra dentro. O resultado do experimento realizado é apresentado na Figura 4.13.

Figura 4.13 – Comportamento da temperatura durante o congelamento da amostra no evaporador A



Fonte: Elaborado pelo autor.

O teste realizado com o evaporador A apresentou uma taxa de resfriamento de aproximadamente $-370^{\circ}\text{C}/\text{min}$, valores menores do que os apresentados pelo evaporador B, representado na Tabela 4.1. Isso demonstra, que de fato a espuma de níquel facilita o aumento da transferência de calor e aumenta a taxa de resfriamento do método.

4.2.2 Condições para a simulação numérica

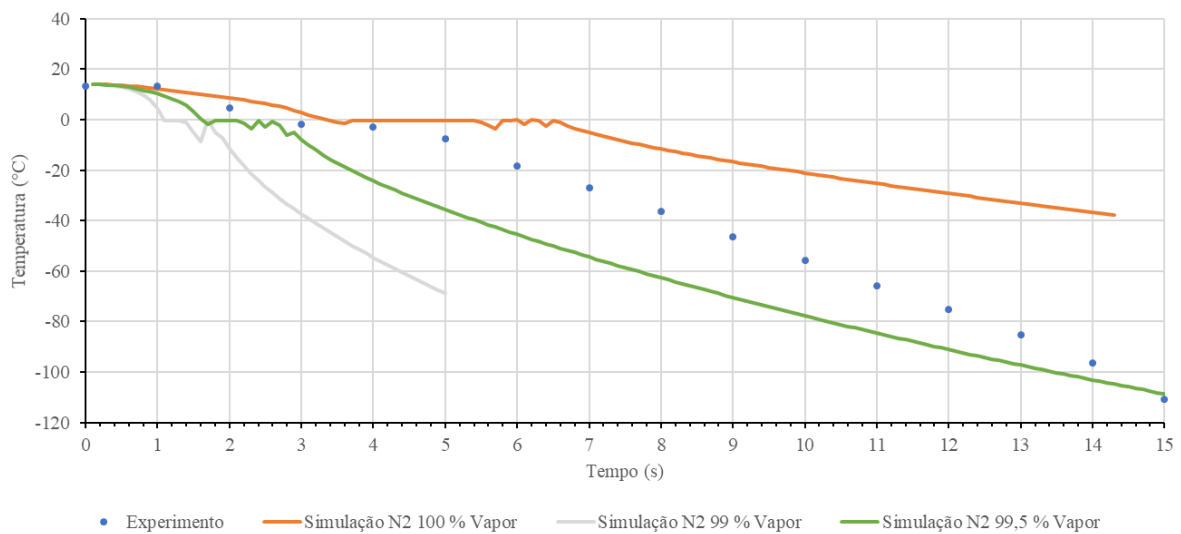
Para a simulação numérica foram consideradas as mesmas condições iniciais do teste realizado representado na Figura 4.13. Desta forma, a temperatura inicial do meio foi de 14°C e a velocidade de entrada do nitrogênio vapor considerada de 7 m/s . Tendo em vista que não foi utilizado um modelo de mudança de fase, além da solidificação, considerou-se que a câmara já possuía nitrogênio vapor no seu interior no instante inicial.

Além disso, foram efetuadas algumas variações nas condições de entrada do nitrogênio, variando a velocidade e o título de vapor. Essas variações foram realizadas, pois a velocidade do jato oscilava ao longo dos experimentos e, além disso, a fração de vapor presente no jato também oscilava.

4.2.3 Comparações simulações e experimento

Inicialmente a simulação foi realizada com apenas nitrogênio vapor, porém foram testados alguns títulos, tendo em vista a dificuldade que o método experimental apresenta de identificar com precisão o estado físico do jato. Com isso, os resultados encontrados são apresentados na Figura 4.14, para títulos de vapor próximos ao vapor saturado.

Figura 4.14 – Variação da temperatura da amostra no congelamento para diferentes títulos de vapor de nitrogênio

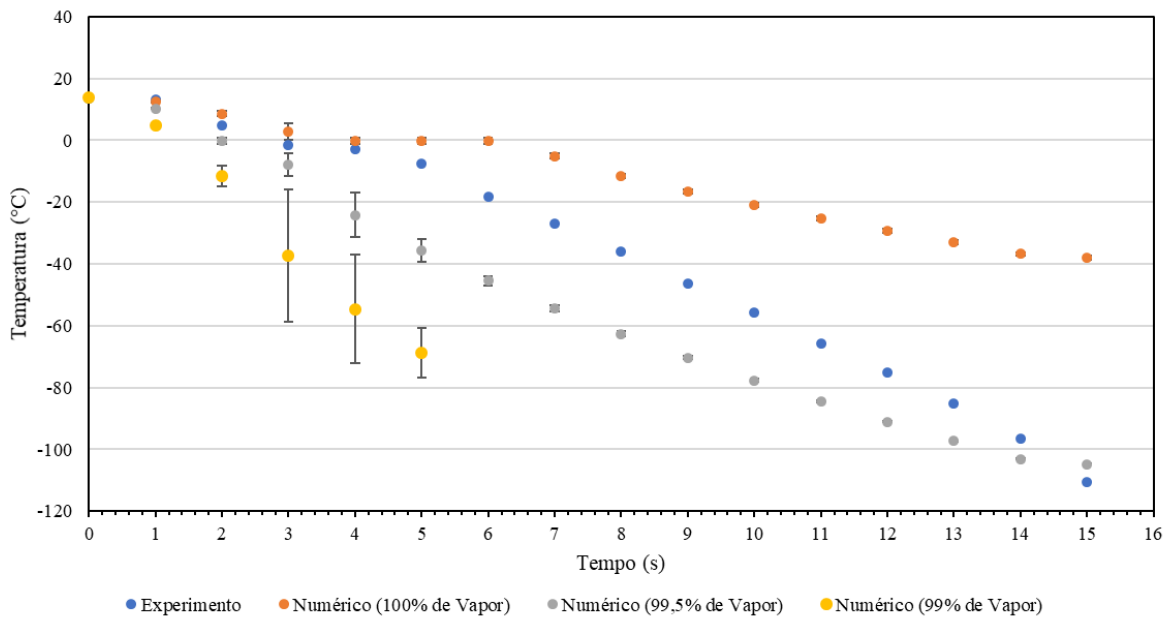


Fonte: Elaborado pelo autor.

Percebe-se que o resultado que mais aproximou-se dos valores experimentais foi a simulação com um título de 100% de nitrogênio na fase vapor. Isso foi determinado através do cálculo do erro médio relativo, que está representado na Figura 4.15, onde a simulação com título de 100% apresentou o menor erro médio relativo, representado pela Eq. (10).

$$erro_{relativo} = \frac{Valor\ Experimental - Valor\ Numérico}{Valor\ Experimental} \cdot 100\% \quad (10)$$

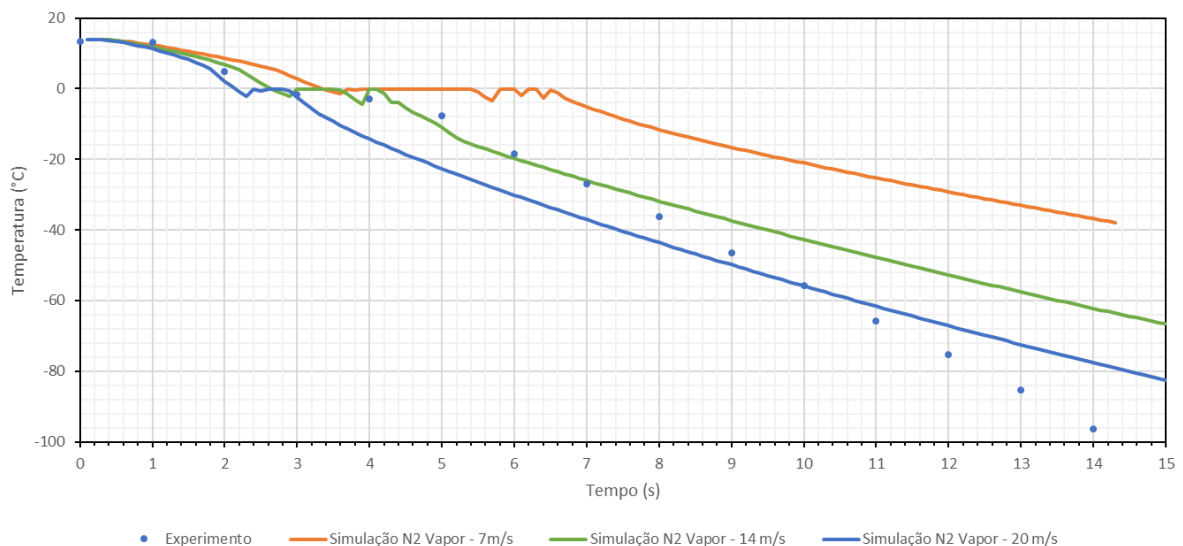
Figura 4.15 – Variação da temperatura da amostra no congelamento para diferentes títulos de vapor de nitrogênio para cada ponto do experimento com erros médios relativos



Fonte: Elaborado pelo autor.

O efeito da velocidade do jato foi avaliado para título de vapor de 100%, e variou-se as velocidades de entrada, como vemos na Figura 4.16.

Figura 4.16 - Variação da temperatura da amostra no congelamento para diferentes velocidades de entrada de nitrogênio



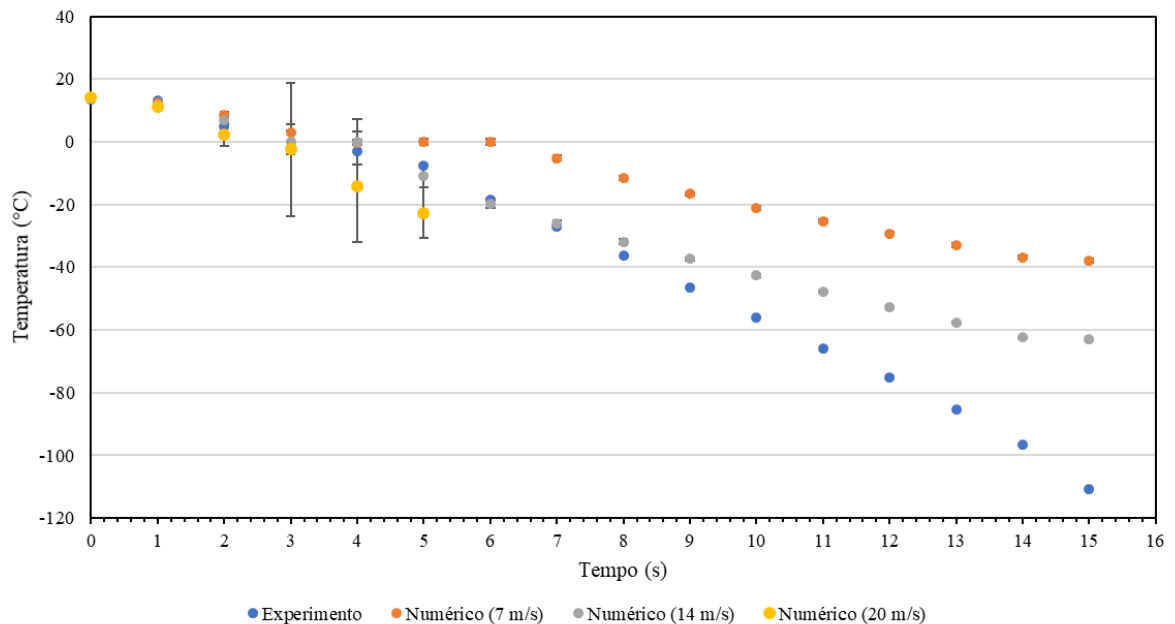
Fonte: Elaborado pelo autor.

No gráfico apresentado, é possível perceber que nos primeiros 7 segundos a simulação chega próximo aos valores obtidos experimentalmente, quando utilizamos uma velocidade de

entrada de 14 m/s. Além disso, percebe-se que com o aumento da velocidade, a taxa de resfriamento tende a ser cada vez maior.

Apesar disso, os resultados numéricos não se ajustam satisfatoriamente aos dados experimentais. Isso fica claro na comparação das curvas das Figura 4.14 e Figura 4.16.

Figura 4.17 - Variação da temperatura da amostra no congelamento para diferentes velocidades de entrada de nitrogênio para cada ponto do experimento com erros médios relativos



Fonte: Elaborado pelo autor.

Nas Tabela 4.3 e Tabela 4.4 é possível identificar os erros relativos médios para cada um dos pontos, calculados a partir da Eq.08, que também foram apresentados nas Figura 4.15 e Figura 4.17. Percebe-se que existem diferenças entre os valores experimentais e numéricos, entretanto os resultados encontrados com o título de vapor em 100% e a velocidade de 14m/s encontraram a menor média de erro relativos.

Tabela 4.3 – Erro médio relativo para as simulações com variação de vapor de nitrogênio

| Tempo (s) | Erro médio relativo | | |
|-----------|---------------------|--------------|-----------|
| | 100 % Vapor | 99,5 % Vapor | 99% Vapor |
| 0 | -4% | -4% | -4% |
| 1 | 7% | 22% | 63% |
| 2 | -77% | 103% | 339% |
| 3 | 267% | -367% | -2127% |
| 4 | 93% | -727% | -1767% |
| 5 | 98% | -366% | -800% |
| 6 | 99% | -146% | |
| 7 | 81% | -102% | |
| 8 | 68% | -73% | |
| 9 | 64% | -51% | |
| 10 | 62% | -39% | |
| 11 | 62% | -29% | |
| 12 | 61% | -21% | |
| 13 | 61% | -14% | |
| 14 | 62% | -7% | |
| 15 | 66% | 5% | |

Fonte: Elaborado pelo autor

Tabela 4.4 – Erro médio relativo para as simulações com variação de velocidade de entrada de nitrogênio

| Tempo (s) | Erro médio relativo | | |
|-----------|---------------------|-------------------|-------------------|
| | Velocidade 7 m/s | Velocidade 14 m/s | Velocidade 20 m/s |
| 0 | -4% | -4% | -4% |
| 1 | 7% | 11% | 15% |
| 2 | -77% | -40% | 55% |
| 3 | 267% | 89% | -41% |
| 4 | 93% | 95% | -387% |
| 5 | 98% | -44% | -196% |
| 6 | 99% | -7% | |
| 7 | 81% | 4% | |
| 8 | 68% | 12% | |
| 9 | 64% | 20% | |
| 10 | 62% | 24% | |
| 11 | 62% | 27% | |
| 12 | 61% | 30% | |
| 13 | 61% | 32% | |
| 14 | 62% | 36% | |
| 15 | 66% | 43% | |

Fonte: Elaborado pelo autor

Essas diferenças entre o numérico e experimental podem ser provenientes de alguns erros experimentais, que podem ocorrer, como posição do termopar, erro de medição e outros. Além disso, a velocidade do escoamento do jato variável e a fração de líquido influencia nessa diferença numérica e experimental.

A diferença pode ocorrer também em relação a alguns ajustes ainda necessários no modelo numérico. Devido a imprecisão do estado físico, como o título de vapor do nitrogênio líquido que entra de fato no experimento, acaba gerando um erro associado ao modelo. A determinação do título é quase impossível devido a velocidade de escoamento do jato, que ainda assim é variável por vezes. Essa velocidade variável é outro fator que pode reduzir a confiabilidade do modelo numérico.

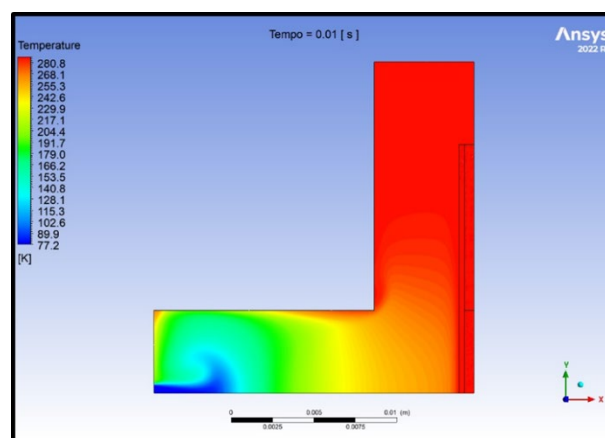
Por esses motivos que o modelo numérico avaliou e testou diferentes títulos e velocidades de nitrogênio, tentando verificar a influência nessas variáveis no comportamento numérico das taxas de resfriamento.

4.2.4 Contornos gerados ao longo das simulações

O comportamento do processo no domínio simulado será analisado através da variação de temperatura e na solidificação da amostra.

Primeiramente, as Figura 4.18 e Figura 4.19 apresentam a evolução do perfil de temperatura. Inicialmente a temperatura do meio é de 287 K, logo inicia o escoamento do nitrogênio e após 0,5 s a temperatura de toda a câmara já está em equilíbrio com o nitrogênio.

Figura 4.18 – Perfil de temperatura da simulação no instante 0,01 s

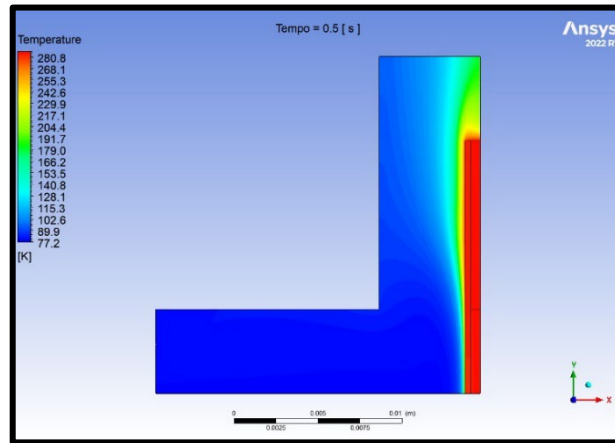


Fonte: Elaborado pelo autor.

Depois dos instantes iniciais, o perfil de temperatura segue idêntico no meio em que se encontra o nitrogênio, variando apenas no interior do evaporador. Como já foi citado

anteriormente, a temperatura reduz de acordo com o experimento apresentado nos primeiros 7 s e após isso, o processo é mais lento.

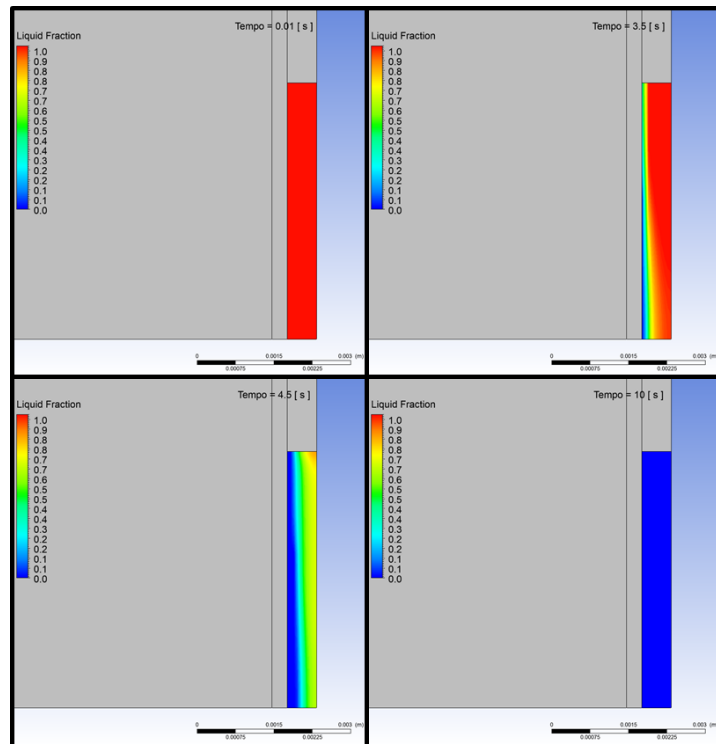
Figura 4.19 – Perfil de temperatura da simulação no instante 0,5 s



Fonte: Elaborado pelo autor.

Por fim, podemos avaliar o processo de solidificação da amostra, que ocorre entre o instante inicial e termina em aproximadamente 5,45 s. A Figura 4.20 apresenta os contornos da fração de líquido, representando o processo de solidificação que ocorre no problema estudado.

Figura 4.20 – Perfil de solidificação da amostra ao longo do tempo



Fonte: Elaborado pelo autor.

5 CONCLUSÃO

Com os resultados obtidos neste trabalho foi possível estudar e caracterizar o método de evaporação de filme fino, determinando algumas condições de operação que necessitam evoluir. Percebeu-se que a taxa de resfriamento pode ser melhorada com alguns aspectos, como reduzir o volume da amostra, utilizar materiais do evaporador que apresentem maior condutividade e incluir um segundo criocautério para produção dos jatos nas faces do evaporador.

Ao comparar os métodos experimentais, identificou-se que o método de imersão apresentou uma maior taxa de resfriamento com o Evaporador A (placas de cobre com amostra no interior). No caso da evaporação de filme fino de nitrogênio o melhor resultado foi alcançado no teste utilizando o Evaporador B (placa de cobre com espuma metálica e amostra no interior), que resultou em uma taxa de $868^{\circ}\text{C}/\text{min}$, valor próximo ao obtido no método de imersão e Evaporador A ($900^{\circ}\text{C}/\text{min}$ em média).

O método numérico apresentou bons resultados, simulando o contexto estudado na evaporação de filme fino. Dentro do modelo estudado, foi possível identificar que a solidificação proposta ocorre em aproximadamente 5 segundos da amostra no interior da seção de testes simulada. Com algumas variações nas condições iniciais do modelo, foi possível perceber a influência da velocidade de entrada e do título de nitrogênio no processo físico. Ainda existem algumas evoluções do modelo, que podem fazer com que os erros relativos encontrados nos testes reduzam cada vez mais.

Para trabalhos futuros, se sugere as seguintes pesquisas.

- Avaliar utilizar dois criocautérios no método de evaporação de filme fino, além de reduzir a pressão da câmara durante os testes e reduzir o tamanho das amostras. Todas essas condições permitem aumentar as taxas de resfriamento do método;
- Avaliar outras alternativas de layouts e materiais para os evaporadores, que aumentem a taxa de resfriamento;
- Avaliar a utilização de modelos de mudança de fase nas simulações numéricas com o intuito de aprimorar os modelos estudados.

REFERÊNCIAS

- BAUST, J.G.; GAO, D.; BAUST, J.M. **Cryopreservation: An emerging paradigm change.** Organogenesis Volume 5, Issue 3, p. 90-96. 2009.
- BROCKBANK, K.G.M.; COVAULT, J.C.; TAYLOR, M.J. **Cryopreservation Guide.** Thermo Fisher Scientific. 2007.
- CASTELO, T.S.; FROTA, T.R.; SILVA, A.R. **Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos.** Acta Veterinaria Brasilica, v.2, n.3, p. 67-75. 2008.
- CASTRO, S.V.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.G; FAUSTINO, L.R.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. **Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos.** Acta Scientiae Veterinariae 39, Publicação 957. 2011.
- CELIK, I.B.; GHIA, U.; ROACHE, P.J.; FREITAS, C.J.; COLEMAN, H.; RAAD, P.E. **Procedure for Estimation and Reporting of Uncertainty Due to Discretization in CFD Applications.** ASME. J. Fluids Eng. 130(7): 078001. 2008.
- CRUZAN G.; CORLEY R.A.; HARD G.C.; MERTENS H.J.W.M.; MCMARTIN K.E.; SNELLINGS W.M.; GINGELL R.; DEYO J.A. **Subchronic toxicity of ethylene glycol in Wistar and F-344 rats related to metabolism and clearance of metabolites.** Toxicological Science. Vol 81 p. 02-511. 2004.
- DANIELL, O.G. **Freezing for the future.** The Week. 2019. Disponível em: <<https://www.theweek.in/news/health/2019/09/07/freezing-for-the-future.html>>. Acesso em: 20 de dezembro de 2020.
- F-CHART SOFTWARE. **Engineering Equation Solver (EES): Commercial and Professional Versions.** Madison, EUA, 2005. 297p.
- FULLER, B.; GONZALEZ-MOLINA, J.; ERRO, E.; MENDONCA, J.; CHALMERS, S.; AWAN, M.; POIRIER, A.; SELDEN, C. **Applications and optimization of cryopreservation technologies to cellular therapeutics.** Cell and Gene Therapy Insights. BioInsights. 2017.
- GURRUCHAGA, H.; BURGO, S.D; HERNANDEZ, R.M.; ORIVE, G.; SELDEN, C.; FULLER, B.; CIRIZA, J.; PEDRAZ, J.L. **Advances in the slow freezing cryopreservation of microencapsulated cells.** Journal of Controlled Release. Corel. 2017.
- LANE, M.; SCHOOLCRAFT, W.B.; GARDNER, D.K. **Vitrification of mouse and huma blastocysts using a novel cryoloop container-less technique.** Fertility and Sterility Vol. 72. 1999.
- LI, Y.; ZHOU, L.; LV, M.; GE, P.; LIU, Y.; ZHOU, D.; **Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation: A systematic review and meta-analysis.** European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology 233, p. 98-92. 2019.

- MA, H.B.; CHENG, P.; BORGMEYER, B.; WANG, Y.X. **Fluid flow and heat transfer in the evaporation thin film region.** *Microfluid Nanofluid.* Vol. 4 p. 237-243. 2008.
- MANETTI, L.L.; CARDOSO, E.M.; MOITA, A.S.O.H. **A new pool boiling heat transfer correlation for wetting dielectric fluids on metal foams.** Elsevier, 2021.
- MARCHESI, R.; MAFFÈ, M.; MORASCHI, M. **Computational fluid dynamics analysis of cell cooling process.** *Cell preservation technology.* Volume 3. Number 4. 2005.
- MARTINO A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S.P. **Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling.** *Biology of Reproduction* 54 p. 1059-1069. 1996.
- PLAWSKY, J.L.; FEDOROV, A.G.; GARIMELLA, S.V.; MA, H.B.; MAROO, S.C.; CHEN, L.; NAM, Y. **Nano and microstructures for thin-film evaporation – A review.** *Nanoscale and Microscale Thermophysical Engineering*, 18 - p. 251-269. 2014.
- SAKI, G.; DEZFULY, F.G. **Vitrification of human oocyte using Cryoloop.** *Iranian Journal of Reproductive Medicine* Vol.3. No.1 pp: 19-24, 2005.
- SANCHES, B.V. **Evaluation of different cryoprotectant and Forskolin in the culture medium for improving the efficacy of vitrification of Bos indicus in vitro derived embryos.** 49 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Agrárias - Veterinária) - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.
- SANTIS, G.C.; PRATA, K.L. **Criopreservação de células-progenitoras hematopoéticas.** *Medicina (Ribeirão Preto).* Vol. 42 p. 36-47. 2009.
- SANTOS, I.R.I. **Criopreservação: Potencial e perspectiva para a conservação de germoplasma vegetal.** *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12 p. 70-84. 2000.
- SHAW J.M., COX S.L.; TROUNSON A.O.; JENKIN G. **Evaluation of the long-term function of cryopreserved ovarian grafts in the mouse, implications for human applications.** *Molecular and Cellular Endocrinology* 161 p. 103-110. 2000.
- SHAW, J.M.; JONES, G.M. **Terminology associated with vitrification and other cryopreservation procedures for oocytes and embryos.** *Human Reproduction Update.* Vol. 9 p. 584-605. 2003.
- SHEIKHI M.; HULTENBY K.; NIKLASSON B.; LUNDQVIST M.; HOVATTA O. **Clinical grade vitrification of human ovarian tissue: an ultrastructural analysis of follicles and stroma in vitrified tissue.** *Oxford Journals - Human Reproduction.* Volume 26. Pages 594-603. 2011.
- SILVA, S.V.; GUERRA, M.M.P. **Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias.** *Revista Brasileira de Reprodução Animal.* Volume 35. Pág. 370-384. Belo Horizonte. Dezembro de 2011.

- SILVA, A.A.R.; RODRIGUES, C.G.; SILVA, M.B. **Avanços tecnológicos na criopreservação de células-tronco e tecidos, aplicados à terapia celular.** Revista de Biologia 17 p. 13-18. 2017.
- SILVA, A.R.S.; MACAGNAN, M.H.; COPETTI, J.B.; OGLIARI, K.S. **Numerical analysis of biological materials vitrification processes.** 12° MERCOFRIO. 2020.
- SU, F.; XU, H.; ZHAO, N.; DENG, Y.; MA, H. **Evaporation heat transfer of liquid nitrogen on microstructured surface at high superheat level.** International Communications in Heat and Mass Transfer. Vol. 87, pp. 192-197. 2017.
- TAVUKCUOGLU, S.; AL-AZAWI, T.; KHAKI, A.A.; AL-HASANI, S. **Is vitrification standard method of cryopreservation.** Middle East Fertility Society Journal 17 p. 152-156. 2012.
- TIMÓTEO, M.A.; SOUSA, W.B.; LOPES, I.C.R.; SILVA, V.J.D. **Criopreservação de células tronco e suas aplicações.** Revista Brasileira de Ciência Tecnologia e Inovação. 2014.
- TUCKER, M.J.; LIEBERMANN, J. **Vitrification in Assisted Reproduction.** Second Edition. Taylor & Francis Group. CRC Press. 2016.
- VAJTA, G.; HOLM, P.; KUWAYAMA, M.; BOOTH, P.J.; JACOBSEN, H.; GREVE, T.; CALLESEN, H. **Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos.** Molecular reproduction and development 51 p.53-58. 1998.
- WOLKERS F.W.; OLDENHOF, H. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols.** Springer Protocols. Fourth Edition. 2021.
- YAMAKI S.B.; PEDROSO A.G.; ATVARS T.D.Z. **O estado vítreo dentro da perspectiva do curso de graduação em química.** Química Nova. Vol. 25(2) p. 330-334. 2002.
- YANG, J.; GAO, L.; LIU, M. SUI, X.; ZHU, Y; WEN, C.; ZHANG, L. **Advanced biotechnology for cell cryopreservation.** Transactions of Tianjin Univesity 26 p. 409-423. 2020.
- YEOMAN R.R.; WOLF D.P.; LEE D.M. **Coculture of monkey ovarian tissue increases survival after vitrification and slow-rate freezing.** Fertility and Sterility. Vol. 83 p.1248-1254. 2005.