



Universitatea
Transilvania
din Braşov

ŞCOALA DOCTORALĂ INTERDISCIPLINARĂ

Facultatea de Construcţii

Secţia: Instalaţii

Ing. George-Andrei BEŞCHEA

**Studiul profilelor termodinamice în sistem izocoric pentru cele
mai importante substanţe crioprezervante**

**Study of thermodynamic profiles in isochoric conditions for the
most important cryoprotective substances**

REZUMAT / ABSTRACT

Conducător ştiinţific

Prof.dr.ing. Gabriel NĂSTASE

BRAŞOV, 2023

CUPRINS (lb. română)

	Pg. teza	Pg. rezumat
1. CUPRINS	3	2
2. MULȚUMIRI	6	-
3. LISTA FIGURILOR	7	5
4. LISTA TABELELOR	11	5
5. LISTA NOTAȚII	12	6
6. DICȚIONAR	13	7
7. SISTEMELE IZOCORICE	15	9
7.1 Introducere	15	9
7.2 Bază teoretică	15	9
7.3 Etimologia cuvântului "izocor"	16	10
7.4 Istoria conservării în izocor	16	10
7.5 Concluzii intermediare	20	10
7.6 Mecanismele de distrugere a țesuturilor	21	11
7.7 Studii aplicate pentru conservare în izocor – bază practică comună	21	-
8. CRIOCONSERVANȚII	32	12
8.1 Introducere	32	12
8.2 Definiția	32	12
8.3 Modul de funcționare	32	12
8.4 Istoric	32	12
8.5 Prezentarea celor mai utilizate soluții crioprezervante	38	15
8.5.1 Dimetil sulfoxid (DMSO)	38	15
8.5.1.1 Comportamentul amestecurilor de soluții apoase și DMSO la răcirea în izobar	39	15
8.5.2 Glicerol	40	16
8.5.2.1 Cristalizarea amestecurilor de glicerină-soluții apoase în izobar	41	16
8.5.3 Etilen glicol	41	16
	2	

8.5.3.1 Comportamentul amestecurilor de etilen glicol și apă la răcirea în izobar.....	41	16
8.5.4 Glucoza.....	42	16
8.5.4.1 Comportamentul amestecurilor de apă-glucoză în izobar.....	42	16
8.5.5 Dietilen glicol.....	43	17
8.5.5.1 Comportamentul amestecurilor de dietilen glicol și apă la răcirea în izobar.....	43	17
8.5.6 Trehaloză.....	44	17
8.5.6.1 Comportamentul amestecurilor de trehaloză și apă la răcirea în izobar.....	44	17
8.6 Clasificarea crioprotectanților.....	45	17
9. MODELAREA FIZICO-MATEMATICĂ A CONSERVĂRII ÎN IZOCOR	46	18
9.1 Clasificarea crioprotectanților.....	46	18
9.2 Cazul soluțiilor apoase amestecate.....	50	22
9.2.1 Presiunea.....	50	22
9.2.2 Concentrația.....	50	22
10. MODELAREA ASISTATĂ PE CALCULATOR AL RĂCIRII APEI ÎN IZOCOR. (TESTAREA REACTORULUI CU PRIVIRE LA REZISTENȚA ACESTUIA LA PRESIUNILE MAXIMALE DIN LITERATURĂ)	52	24
10.1 Setări generale în programul de simulare.....	52	24
10.1.1 Setarea modelului în programul de simulare.....	52	24
10.1.2 Setarea geometriei.....	54	24
10.2 Adăugarea mărimilor fizice.....	55	24
10.2.1 Discretizarea modelului.....	56	25
10.3 Rezultate.....	57	25
10.3.1.1 Tensiunea Von Misses în 2D.....	57	25
10.3.1.2 Presiunea.....	59	26
10.3.1.3 Temperatură.....	60	27
10.4 Simularea comportamentului apei în timpul răcirii izocor prin calculul presiunii.....	61	28
10.4.1 Setări generale.....	61	28

10.4.2 Discretizarea modelului.....	63	29
10.5 Rezultatele.....	64	29
10.5.1 Temperatura °C.....	64	29
10.5.2 Schimbarea de fază.....	65	30
11. MATERIALE ȘI METODE	69	33
11.1 Componentele sistemului.....	69	33
11.1.1 Programul de analiză și stocare date.....	72	34
11.1.2 Laptopul.....	73	34
11.1.3 Baia de răcire.....	74	34
11.2 Materiale utilizate.....	75	34
11.3 Protocolul experimental.....	79	35
12. REZULTATELE EXPERIMENTELOR	82	35
12.1 Comportamentul amestecurilor de glicerină-ser fiziologic 0.9% în izocor.....	82	35
12.2 Comportamentul amestecurilor de soluție salină 0.9% cu glucoză în izocor.....	87	36
12.3 Comportamentul amestecurilor de DMSO și soluție salină 0.9 % în izocor.....	92	37
12.4 Comportamentul amestecurilor de etilen glicol și soluție salină 0.9 % în izocor.....	97	38
12.5 Comportamentul amestecurilor de dietilenglicol și soluție salină 0.9 % în izocor.....	102	39
12.6 Comportamentul amestecurilor de trehaloză și soluție salină 0.9 % în izocor.....	107	40
12.7 Comportamentul amestecurilor de trehaloză și apă distilată % în izocor.....	113	41
13. CONCLUZII GENERALE	119	42
14. CONTRIBUȚII PERSONALE	123	45
15. REFERINȚE	126	47
16. Scurt rezumat (romană /engleză)	-	51

3. LISTA FIGURILOR

Figura 1. Diagrama presiune volum în regim izocor,.....	9
Figura 2– Teoria modelelor de schimbare de fază a apei.....	10
Figura 3- Diagrama de fază, în izobar pentru mixturile de DMSO și apă, realizat pe baza procentului molar.....	15
Figura 4-Figura generală, presiune-temperatură, a celor 3 etape prin care trece amestecul[54].	23
Figura 5– A) model reactor MS-1. B) secțiune reactor MS-1 C) varianta simplificata reactor MS 1 D) model introdus în programul de simulare.....	25
Figura 6– Adăugarea marimilor fizice.....	25
Figura 7– Rezultate grafice – în secțiune – tensiunea Von Mises.....	26
Figura 8– Deformarea cauzată de presiune în reactor	27
Figura 9– Izotermele din interiorul reactorului.....	28
Figura 10– Modelul setat în programul de simulare	28
Figura 11– Setări program simulare, în regim tranzitoriu.....	29
Figura 12– Rezultatele obținute cu ajutorul programului de simulare în minutele [A=0,B=5,C=10,D=15,E=20,F=25,G=30] – temperatură °C.	30
Figura 13 - Rezultatele obținute cu ajutorul programului de simulare în minutele [A=0,B=5] –schimbarea de fază.....	31
Figura 14 - Rezultatele obținute cu ajutorul programului de simulare în minutul [C=10] –schimbarea de fază – captura ', reprezintă captură mărită.....	31
Figura 15 - Rezultatele obținute cu ajutorul programului de simulare în minutul [D=15] –schimbarea de fază – captura ', reprezintă captură mărită.....	32
Figura 16 - Rezultatele obținute cu ajutorul programului de simulare în minutul [E=20] –schimbarea de fază – captura ', reprezintă captură mărită.....	32
Figura 17 - Rezultatele obținute cu ajutorul programului de simulare în minutul [F=25] –schimbarea de fază – captura ', reprezintă captură mărită.....	33
Figura 18 - Rezultatele obținute cu ajutorul programului de simulare în minutul [G=30] –schimbarea de fază – captura ', reprezintă captură mărită.....	33
Figura 19- Echipamentele utilizate pentru realizarea experimentelor	35
Figura 20-Diagrama de stare a apei in izocor[59]	43

4. LISTA TABELELOR

Tabel 1- Soluții crioprezervante 1996 – acvacultură și alte domenii [19].....	13
Tabel 2- Crioconservanții studiați și considerați viabili în anul 2017[20]	14
Tabel 3- Corelări temperatură-presiune la echilibru, în izocor pentru diferite concentrații de soluție salină și glicerină .[59].....	36

Tabel 4- Corelări temperatură-presiune la echilibru în izocor pentru diferite concentrații de soluție salină și glucoză .[59]	37
Tabel 5- Corelări temperatură-presiune la echilibru în izocor pentru diferite concentrații de DMSO și soluție salină 0.9%	38
Tabel 6- Corelări temperatură-presiune la echilibru în izocor pentru diferite amestecuri de etilen glicol și soluție salină 0.9%.....	39
Tabel 7- Corelări temperatură-presiune la echilibru în izocor pentru diferite amestecuri de dietilen glicol și soluție salină 0.9% [60]	40
Tabel 8- Corelări temperatură-presiune la echilibru în izocor pentru diferite mixturi de trehaloză și soluție salină 0.9% [60]	41
Tabel 9- Corelări temperatură-presiune la echilibru în izocor pentru diferite mixturi de trehaloză și apă distilată [60].....	42
Tabel 10- Centralizatorul amestecurilor studiate și temperaturile minime viabile (presiune maxim 40 MPa).....	43

5. LISTĂ NOTAȚII

Q	Căldura schimbată de un sistem termodinamic cu mediul exterior	[J]
W	Lucrul mecanic	[W]
ΔU	Variația energiei interne	[-]
P	Presiunea	[Pa]
V	Volumul	[m ³]
P _i	Presiunea inițială	[Pa]
P _f	Presiunea finală	[Pa]
T	Temperatura	[K] [°C]
m ₀	Masa în condițiile inițiale	[kg]
m ₁	Masa gheții	[kg]
m ₂	Masa apei	[kg]
V ₀	Volumul în condițiile inițiale	[m ³]
V ₁	Volumul gheții	[m ³]
V ₂	Volumul apei	[m ³]
Z	Calitatea	[-]
v ₀	Volumul apei	[m ³ /kg]
v ₁	Volumul specific al gheții	[m ³ /kg]
v ₂	Volumul specific al apei	[m ³ /kg]
β	Coeficientul de compresibilitate	[-]
α	Coeficientul de dilatare termică	[-]
T _{ph}	Temperatura de schimbare de fază, în regim izocor, pentru amestec	[K] [°C]

T^0	Temperatura de îngheț al apei la presiunea de 1 atm	[K] [°C]
$\Delta T(P)$	Scăderea de temperatură cauzată de creșterea presiunii P	[Pa]
$\Delta T(c)$	Scăderea de temperatură în funcție de concentrația amestecului c	[K] [°C]
c	Concentrația	[mol/m ³]
MW	Masa moleculară	[g]
M	Molaritatea	[mol/l]
C_{solvent}	Concentrația solventului	[mol/m ³]
C_{solvat}	Concentrația solvatului	[mol/m ³]

6. DICȚIONAR

materii biologice în sensul prezentei lucrări	<p>Celule: Celulele sunt una dintre cele mai comune materii biologice studiate în crioconservare izocoră. Acestea pot fi recoltate din diferite țesuturi, cum ar fi sângele, țesuturile conjunctive sau organele și pot fi conservate pentru a fi utilizate în cercetarea medicală sau în scopuri terapeutice.</p> <p>Țesuturi: Țesuturile biologice, cum ar fi țesutul muscular, țesutul osos sau țesutul nervos, pot fi studiate în crioconservare izocoră. Aceste mostre pot fi utilizate pentru a cerceta dezvoltarea bolilor sau pentru a găsi noi tratamente.</p> <p>Microorganisme: Microorganismele, cum ar fi bacteriile, fungi sau virusurile, pot fi studiate în crioconservare izocoră. Această tehnică poate fi utilizată pentru a conserva culturi pure de microorganisme pentru cercetarea biologică sau pentru producerea de medicamente.</p> <p>Plante: Plantele, cum ar fi semințele sau mugurii, pot fi conservate în crioconservare izocoră. Această tehnică poate fi utilizată pentru a păstra biodiversitatea plantelor și pentru a conserva soiuri rare sau importante</p>
---	---

Crioconservare izocoră	Crioprezervare izocoră, Criostocare izocoră Crioconservarea izocoră este o tehnică de conservare a materiilor biologice la temperaturi extrem de scăzute, fără deformarea volumetrică a mediului de stocare
Soluție crioprotectantă	Soluție crioprezervanta, agent crioprotector Un agent crioprotector este o substanță adăugată la mostrele biologice înainte de procesul de crioprezervare, cu scopul de a proteja celulele și țesuturile împotriva deteriorării cauzate de îngheț. Aceste substanțe ajută la reducerea formării cristalelor de gheață în celule și la protejarea membranelor celulare și a structurilor interne ale acestora, permițând astfel celulelor să supraviețuiască înghețului și să fie păstrate pentru utilizare ulterioară.
DMSO	Dimetilsulfoxid
Ser fiziologic	Soluție salină 0.9%
Mixturi	Amestecuri
Crioconservare	Crioprezervare, răcire în regim izocor
Reactor izocoric	Recipient metalic închis ermetic, recipient metalic închis ermetic
Crioconservanți	Crioprotectanți, crioprezervanți
Prag de temperatură	Nivel de temperatură

7. SISTEMELE IZOCORICE

7.1. Introducere

Dorința umanității de a conserva diferite materii biologice există încă din antichitate. Răcirea artificială face parte din preocupările speciei noastre pentru a crea condiții de viață mai bune.[1] Conservarea diferitelor materii biologice, datează din timpuri străvechi, având în vedere că au fost găsite corpuri de animale (în special de mamuți) perfect păstrate, în zonele arctice.[2]

Dincolo de aceste descoperiri timpurii și rudimentare de utilizare a frigului artificial în scopul folosirii lui în diferite ramuri ale confortului, prin diferite procedee foarte simple, este oportun de menționat că adevăratul avânt al răcirii artificiale a fost înfăptuit odată cu descoperirea amestecurilor frigorifice în secolele XVI – XVII [1] și a principiilor termodinamicii în secolul al XIX-lea.

7.2. Bază teoretică

$$W = P\Delta V, \text{ unde}$$

W – lucrul mecanic

P – presiunea

V – Volumul

După cum se poate observa din relația de mai sus, în cazul unui proces izocoric, lucrul mecanic al sistemului este 0, singura diferență în cazul transferului de căldură poate fi dată doar de variația de presiune din interior. Dacă trasăm procesul într-o diagramă presiune – volum, acesta ar arăta în felul următor (Figura 1)[3]:

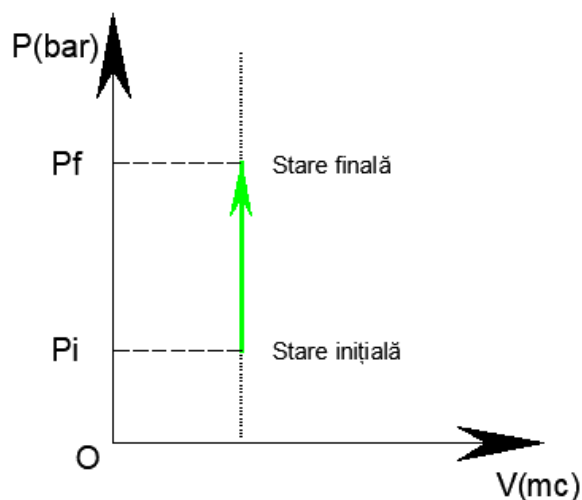


Figura 1. Diagrama presiune volum în regim izocor, unde V – volumul; P – presiunea; $V = \text{constant}$, $P_i > P_f$;

7.3. Etimologia cuvântului "izocor"

Din punct de vedere al definiției cuvântului "izocor" sau în engleză "isochor" acesta înseamnă " o linie care reprezintă variația de presiune în funcție de temperatură când volumul substanței studiate este constant"[4].

7.4. Istoria conservării în izocor

Studiul comportamentului lichidelor la presiuni mari și în regim izocor a luat amploare în anul 1998 când a fost publicată o sinteză a cercetărilor făcute în acest domeniu de către Knorr D., Schluetler O. și Heinz V.[5]. Aceștia au definit pentru prima oară tipurile de conservare:

- Pressure – assisted freezing : schimbarea de fază are loc la volum constant
- Pressure – shift freezing : schimbarea de fază are loc din cauza unei schimbări de presiune
- Pressure - induced freezing : schimbarea de fază este inițiată prin modificare de presiune și este continuată la volum constant.

În (Figura 2) de se poate observa transpunerea teoriei lor pe diagrama de fază a apei.

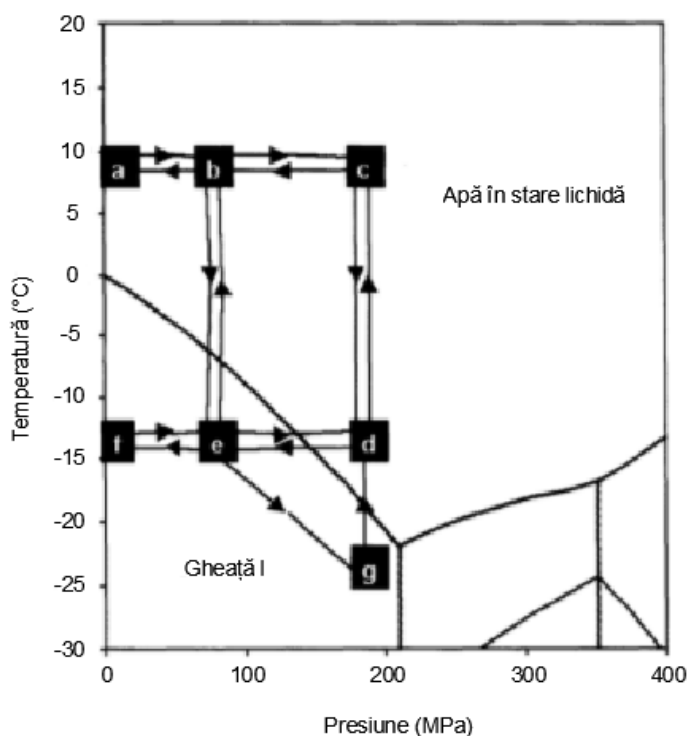


Figura 2– Teoria modelelor de schimbare de fază a apei

(acdf) schimbarea de fază are loc din cauza unei modificări de presiune; (abef) – schimbarea de fază are loc la volum constant; (fdca) – schimbarea de fază (topire) demarează prin modificare de presiune și continuă la volum constant. [5]

7.5. Concluzii intermediare

Toate aceste studii, au culminat cu lucrarea "The termodinamic principles of isochoric preservation", publicat în anul 2005. [6] Această lucrare a propus în literatura de specialitate principiile termodinamice ale crioconservării în regim izocor. Prin modelul matematic prezentat în aceasta, putem calcula cantitatea de gheață care se formează într-un sistem cu volum constant,

și pentru apă și pentru diferite amestecuri de apă cu alte soluții. Datele teoretice sunt susținute de o serie de determinări practice pentru demonstrarea veridicității metodelor prezentate.

În această lucrare sunt definite și o serie de principii fundamentale ale procesului de crioconservare:

- Se desfășoară într-un sistem termodinamic în două faze, în care apa și gheața coexistă și sunt în echilibru termodinamic
- Într-un sistem termodinamic în două faze, aflat în echilibru, temperatura și presiunea sunt interdependente
- Într-un sistem izocor volumul este constant
- Într-un sistem izocor în două faze, aflat la o anumită presiune și temperatură, singura variabilă care se poate ajusta, pentru a fi sistemul în echilibru, este "calitatea" sistemului, procentul relativ de gheață și apă din sistem
- Temperatura sau presiunea și calitatea la fiecare temperatură sau presiune specifică complet procesul de crioconservare izocoră.

Pe lângă acestea, mai putem adăuga unele concluzii recente:

- Putem avea o cantitate predictibilă de lichid și gheață în sistemul izocoric, în funcție de lichidul (crioconservantul) pe care îl folosim. Cu cât scădem temperatura, teoretic, cantitatea de cristale va crește și este important de studiat la fiecare tip de crioconservant, care este temperatura optimă la care va trebui să o răcim astfel încât să avem presiune cât mai mică și cristale de gheață cât mai puține. [7]
- Putem ajunge în situația de a avea lichid suprarăcit, fără a avea cristale de gheață în compoziție. Unele soluții sunt foarte stabile din punct de vedere al perturbărilor microscopice și nucleația efectiv nu are loc în timpul răcirii, în acest caz se pot dezvolta protocoale de transport, fără a apărea cristalizarea, foarte stabile și sigure.[8]
- În cazul unor amestecuri de lichide (apă + crioconservați), putem ajunge la vitrificare, fără a se forma cristale de gheață în timpul transformării. Putem, totodată să scădem foarte mult presiunea la care are loc această transformare, prin amestecarea optimă a soluțiilor componente.[9]

7.6. Mecanisme de distrugere a țesuturilor

Vom menționa mecanismele de distrugere a țesuturilor la conservare în condiții izobare. Gheața nu poate conține substanțe conservante dizolvate și pe măsură ce țesutul îngheață, substanțele dizolvate sunt respinse și concentrate în jurul celulelor. Acest lucru are ca rezultat ceea ce este cunoscut sub numele de deteriorare în timpul înghețului, și se compune din:

Deshidratarea celulelor [10]

Precipitarea soluției [10]

Schimbări ale PH-ului [10]

Distrugerii chimice[10]

Limitările date de utilizarea crioconservanților în condiții izobare sunt și ele de natură negativă, făcând din conservarea izocoră o metodă viabilă:

Organele de dimensiuni mari, sunt dificil de conservat în izobar, deoarece transferul de căldură de la lichid la organ durează foarte mult timp

Crioconservanții pot fi, în sine, periculoși pentru organele ce se dorește a fi conservate.

Aceste aspecte pot fi evitate în cazul în care se utilizează conservarea în regim izocoric. [10]

8. CRIOCONSERVANȚII

8.1. Introducere

Crioconservanții au revoluționat modul în care privim conservarea. Faptul că putem conserva o multitudine de organisme procariotice și eucariotice și le putem utiliza ulterior, după ce le-am răcit la o temperatură de $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ a fost un pas uriaș pentru multe ramuri ale științei. Putem enumera aici: biologia, chimia sau medicina. Acest lucru nu ar fi însă posibil, fără prezența unor crioconservanți/crioprotectanți. Acestea sunt soluții apoase sau solubile în apă, care în amestec cu apa sau alt solvent, pot influența temperatura la care amestecul cristalizează.

8.2. Definiția

Cea mai bună definiție a crioprotectanților a fost publicată în anul 1974, de către Armand Karow : „Orice aditiv ce poate fi adăugat celulelor înainte de a fi conservate prin înghețare, în acest fel mărindu-se rata de supraviețuire a acestora după dezghețare față de situația în care nu am adăuga nimic”[11][12], poate fi numit crioprotectant.”

Crioprotectanții sunt folosiți pentru a proteja integritatea membranelor celulelor și interiorul acestora. Totodată aceștia reduc riscul de distrugere ale lipidelor din membrane, proteinelor și acidului nucleic.[13]

8.3. Modul de funcționare

Modul cum funcționează crioconservanții este foarte variat, acestea putând funcționa ca soluții intracelulare sau extracelulare. Toate au însă proprietatea de a fi foarte hidrofilice și pot forma legături foarte strânse cu hidrogenul din apă. Aceasta le permite să întârzie foarte mult formarea gheții, chiar dacă sunt îndeplinite condițiile de temperatură și presiunile necesare (pentru solvenții studiați (care pot fi simpli sau compuși)) în condiții atmosferice normale.

Amestecurile sunt formate din două sau mai multe substanțe de bază și acestea se obțin în urma unor fenomene fizice. Fazele se dispersează între ele însă legăturile chimice nu se rup. Proprietățile chimice ale componentelor rămân neschimbate, însă proprietățile fizice ale amestecului, diferă, în general față de proprietățile fizice ale componentelor individuale.[14]

8.4. Istoric

Primele concepte de crioconservare au apărut la sfârșitul secolului al XIX-lea când Hans Molisch a studiat înghețarea plantelor cu un criomicroscop utilizând o tehnologie incipientă. Acesta a ajuns la concluzia că compoziția și concentrația de substanțe din citoplasma plantelor au un rol definitor în rata de supraviețuire a acestora după înghețare. [15]

În discuțiile avute de H. Molisch cu contemporanul său, Hermann Muller-Thurgau, au concluzionat că expunerea plantelor la temperaturi negative, duce la o acumulare de zaharuri în acestea, dar nu au făcut o legătură între acest aspect și faptul că zahărul ar putea funcționa ca un inhibitor al cristalizării.[16]

Folosirea cu succes a crioprotectanților a început din anul 1949 când a fost arătat pentru prima oară beneficiul folosirii glicerolului ca și crioprotectant. În studiul realizat de G. Polge, A.U. Smith și A.S. Parkes pe materie biologică vie (celule roșii) a fost constatate proprietățile benefice ale acestuia folosită la conservare în izobar. Munca acestora a fost continuată și din cercetările lui J.E. Lovelock, în 1954 au fost publicate și rezultate pentru DMSO, alături de alte soluții apoase cu masă moleculară mică cum ar fi metanolul sau acetamida.[17]

Un aspect interesant îl reprezintă faptul că din cele 127 de studii raportate cu cele 56 de soluții cu potențial crioconservant s-au evidențiat încă din faze incipiente ale studiilor : Glicerolul (15 studii); Dimetilsulfoxidul – DMSO- (9 studii); Glucoza (7 studii); Zaharoza (8 studii); Metanolul (5 studii);

În anul 1986 a fost publicată lucrarea "Mechanism of cryoprotectant action" de către Ashwood-Smith MJ. În aceasta lucrare, pe baza studiilor dintre anii 1969 și 1986, au rămas puțin peste 20 de soluții crioconservante eficiente. [18]

"Lista celor 56" al lui Karow a rămas, însă, încă viabilă în alte ramuri ale științei, cum ar fi acvacultura. În lucrarea publicată în anul 1996 "Cryopreservation of finfish and shellfish sperms" de către Nai Hsien-Chao, se regăsesc 52 de soluții crioprezervante, încă studiate în acvacultură.[19] Din soluțiile crioconservante prezentate în anul 1969, multe se regăsesc încă în studiu. (Tabelul 3)

Tabel 1- Soluții crioprezervante 1996 – acvacultură și alte domenii [19]

Acetamidă	Etilen glicol	Mannose	Serină
L. Alanină	Formamidă	Metanol	Bromură de sodiu
Albumină	Glucoză	Metil acetamidă	Clorură de sodiu
Acetat de amoniu	Glicerol	Metil formamidă	Iodură de sodiu
Cloroform	Glicerol monoacetat	Metil uree	Nitrat de sodiu
Colină	Glicină	Fenol	Sulfat de sodiu
Dextrans	Amidon hidroxietilic	Polioli pluronici	Sorbitol
Dietilen glicol	Inositol	Polietilen glicol	Zaharoză
Dimetil acetamidă	Lactoză	Polivinil pirolidonă	Trietilen glicol
Dimetil formamidă	Clorura de magneziu	Pralină	Acetat de trimetilamină
Dimetil sulfoxid (DMSO)	Sulfat de magneziu	Propilen glicol	Uree
Eritritol	Maltoză	Piridină-N-oxid	Valine
Etanol	Manitol	Ribose	Xiloză

Dintre soluțiile prezentate, au dovedit eficacitate mare (raportat la soluțiile din tabel): Dextransul, Etilen glicolul (raportat la spermatozoizi de pește), amidonul de hidroxietil, metanolul, polietilen glicolul, polivinil pirrolidona și sucroza. [19]

Din această listă putem să extragem 8 soluții viabile.

În lucrarea "Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures" de Gloria D., Shangping Wang, Barry J. Fuller din anul 2017 au fost sintetizate studii din domeniu. Au fost raportate următoarele ca fiind viabile[20]. (Tabelul 4)

Tabel 2- Crioconservanții studiați și considerați viabili în anul 2017[20]

Alcooluri și derivate	Zaharuri și Zaharuri alcoolizate	Polimeri	Sulfoxide și amide	Amine
Metanol - 2	Glucoză - 2	Polietilen glicol (PEG) - 3	Dimetil sulfoxid - 5	Proline - 3
Etanol - 1	Galactoză - 2	Polivinil pirolidonă (PVP) - 2	Acetamidă- 2	Glutamine - 2
Glicerol - 4	Lactoză - 1	Dextrans - 3	Formamidă - 2	Betaine - 2
Propilen glicol - 3	Sucroză - 1,3	Ficoll - 3	Dimetil Acetamidă - 1	
Etilen glicol - 3	Trehaloză - 3	Amidon hidroexitilic - 3		
	Rafinoză- 3	Proteine serice (amestec complex) - 3		
	Manitol - 1,2	Proteine lactice (amestec complex) - 1,2		
	Sorbitol - 1	Peptonă - 1		
1 - Eficient pe celule procariotice 2 - Eficient pe scară redusă la celule eucariotice 3 - Puțin eficient pe celule eucariotice. De multe ori amestecat. 4 - Foarte eficient pe un număr clar definit de celule 5 - Foarte eficient pe toate tipurile de celule				

Autorii au stabilit că DMSO este cel mai eficient crioprotectant disponibil în acel moment.

În anul 2021, în lucrarea "The need for novel cryoprotectants and cryopreservation protocols: Insights into the importance of biophysical investigation and cell permeability" de către Rekha Rajua, Saffron J. Bryanta, Brendan L. Wilkinsonb, Gary Bryanta au concluzionat că cel mai des utilizate/eficiente soluții crioprezervante în acest moment, multidisciplinar, sunt DMSO și glicerolul. [21]

Totodată mai putem adăuga dextransul, etilen glicolul (raportat la spermatozizi de pește), amidonul de hidroxietil, metanolul, polietilen glicolul, polivinil pirrolidona și sucroză. [19]

8.5. Prezentarea celor mai utilizate soluții crioprezervante

8.5.1. Dimetil sulfoxid (DMSO)

Sintetizat în anul 1866[22]. Este un sulf organic, având formula chimică $(\text{CH}_3)_2\text{SO}$. Este un solvent polar aprotic, care poate dizolva compoziții polare și non-polare. Este miscibil cu apa și o gamă largă de solvenți organici. [23] DMSO este utilizat în diverse aplicații, cum ar fi în medicină veterinară și umană, în industria electronică și în sinteza organică, este considerat unul dintre cele mai des utilizate soluții crioprezervante în zilele noastre.[21] DMSO are o proprietate foarte interesantă, aceasta îngheață la 18.5 °C, această proprietate făcându-l extrem de facil de utilizat.[23]

8.5.1.1. Comportamentul amestecurilor de soluții apoase și DMSO la răcirea în izobar.

În anul 1966[24], a fost publicată prima diagramă pentru comportamentul amestecului în izobar. Totodată, pe baza detelilor, autorii au realizat și un tabel cu temperaturile de îngheț, în funcție de concentrația molară. (Tabelul 5)

În anul 1968, a fost publicată prima diagramă de fază pentru acest amestec, în izobar.

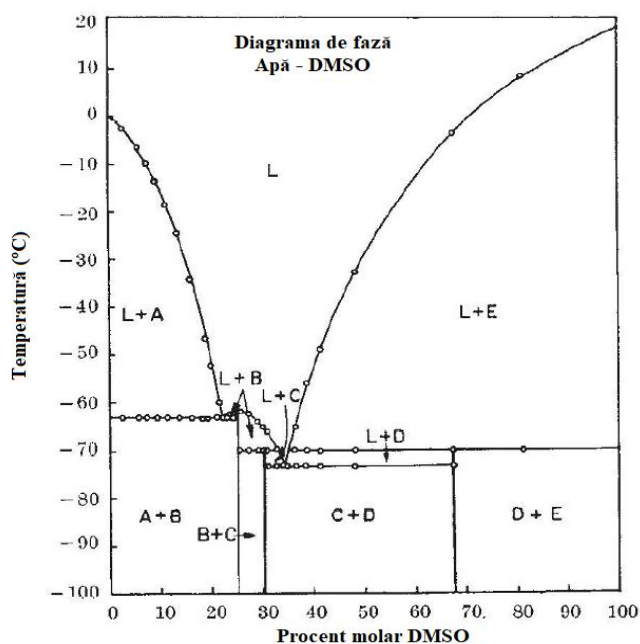


Figura 3- Diagrama de fază, în izobar pentru mixturile de DMSO și apă, realizat pe baza procentului molar.

L -Fază lichidă, A – Apă, B – DMSO 3Apă, C- DMSO 2.5Apă, D – DMSO ½ Apă, E- DMSO [25]

După cum observăm, acest amestec are un comportament anomaliu chiar și în izobar. Cercetarea acestui fenomen continuă și în zilele noastre. [26][27]

8.5.2. Glicerol

Denumit și glicerină($C_3H_8O_3$), aceasta formează legături cu hidrogenul din apă. Acest aspect face dificilă formarea de cristale de gheață în mixtura cu apa la concentrații de 70% glicerol și 30%, până la temperaturi de $-37.8\text{ }^{\circ}\text{C}$. [23] Are rol de osmolit, solvent, detergent, metabolit uman și conservant.

8.5.2.1. Cristalizarea amestecurilor de glicerină-soluții apoase în izobar

Glicerina este lichidă în concentrații mari și la temperaturile întâlnite în general în depozitare. Cristalizarea nedorită, care afectează negativ aspectul unui produs nu are loc cu glicerina la temperatura camerei. Dacă, de exemplu, glicerina este expusă într-o atmosferă uscată, nu va deveni „pietroasă” precum zahărul, de exemplu. [28]

Datorită acestor proprietăți, glicerina a fost primul tip de antigel pentru sistemele de răcire a radiatoarelor de autovehicule. Deși ulterior înlocuit cu etilen glicolul pentru această aplicație, combinații de alcool sau glicol și glicerina sunt încă folosite în acest scop.

8.5.3. Etilen glicol

A fost preparat prima oară în anul 1856 de către Charles Adolphe Wurtz. Acesta slăbește legăturile de hidrogen din apă atunci când se amestecă cu aceasta. Soluția pură are o temperatură de îngheț de $-12\text{ }^{\circ}\text{C}$, dar atunci când o amestecăm cu apa (40% etilen glicol, 60% apă), temperatura de îngheț coboară la $-45\text{ }^{\circ}\text{C}$. Această proprietate îl face foarte potrivit pentru crioconservare, însă este considerat destul de toxic. [23]

8.5.3.1. Comportamentul amestecurilor de etilen glicol și apă la răcirea în izobar

Comportamentul acestora a fost studiat începând cu anii 1950 [29], odată cu introducerea pe scară largă a folosirii acestui crioconservant.

8.5.4. Glucoza

Glucoza este un agent protector pe bază de zahăr, natural. În natură găsim exemple de protecție a plantelor în timpul iernii prin producerea de glucoză. [30][31] A fost observat faptul că mixtura glucozei cu metanolul, duce la o creștere a ratei de supraviețuire a celulelor, după conservare. [30] Glucoza este folosită în criomicrobiologie în concentrații de 1-18% (media 4%). [32] O rată de supraviețuire mai mare a unor culturi microbiale prin utilizare de mixturi apoase cu glucoză la temperaturi de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a fost observată de foarte mult timp. [33] . De-a lungul timpului glucoza și-a dovedit eficacitatea într-o serie de cercetări, cum ar fi virusul bacteric T4 [34], E-aerogene [35], drojdie [36] sau P.Berghei în sânge .

8.5.4.1. Comportamentul amestecurilor de apă-glucoză în izobar.

Cu cât avem o concentrație mai mare de glucoză în mixtura studiată cu atât va scădea temperatura la care amestecul nostru va îngheța.

8.5.5. Dietilen glicol

Produs din hidroliza parțială a a oxidului de etilen, dietilen glicolul este o compoziție organică având formula chimică $(\text{HOCH}_2\text{CH}_2)_2\text{O}$. Soluția diluată a acestuia, cu apă, poate fi utilizată ca și crioprotectant [23]. Dietilen glicolul este considerat periculos pentru consumul uman, și din acest punct de vedere utilizarea lui este limitată.[37]

8.5.5.1. Comportamentul amestecurilor de dietilen glicol și apă la răcirea în izobar

În literatura de specialitate, informațiile referitoare la comportamentul mixturilor sunt limitate. Din informațiile găsite, dietilen glicolul este în umbra etilen glicolului, cu mențiunea că "se comportă similar". [38][39][40]

Aspectele interesante care reies din literatură sunt, că într-adevăr dietilen-glicolul și etilen glicolul au un comportament asemănător atunci când sunt folosite ca și crioprotectant în amestec cu apa. Atunci când amestecăm etilen glicol sau dietilen-glicol cu apă într-o concentrație de 60%-80% cu apă, și îl răcim la o temperatură mai mică de $-50\text{ }^\circ\text{C}$, atunci ele îngheață.

8.5.6. Trehaloză

Până în anii 2000 a fost un crioprotectant extrem de scump și greu de produs. Este un zahăr care se compune din două molecule de glucoză având formula chimică $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$. În mod natural se acumulează în unele ciuperci, bacterii, animale nevertebrate sau plante care o utilizează ca și o sursă de energie. [41] Poate fi folosit ca și crioprotectant pentru o gama largă de aplicații cum ar fi bănci genetice [42], morcovi sau celule de tutun[43] sau spermă umană [44].

8.5.6.1. Comportamentul amestecurilor de trehaloză și apă la răcirea în izobar

Studii recente arată că odată cu răcirea mixturilor de apă și trehaloză, acestea nu cristalizează, ci formează o sticlă amorfă, care este responsabilă pentru proprietățile de conservare a acestora. [45]

Diagrama de fază a mixturilor de apă și trehaloză, în funcție de concentrația molară o regăsim în figura 23. Aceasta a fost publicată în anul 2000 prin contopirea rezultatelor publicate în 30 de lucrări publicate anterior.

8.6. Clasificarea crioprotectanților

După permeabilitate, crioprotectanții pot fi împărțiți în 2 grupe :

Nonpermeabile – protectanți cu molecule mari [46]-(nu pătrund în interiorul celulelor, sunt extracelulare): zaharurile (trehaloză și sucroză); amidonul (hidroxietil); PVP -ul sau polietilen oxidul.

Acestea sunt folosite, în principal, în cazul în care procesul de crioprezervare se desfășoară foarte rapid. Aceste soluții transformă lichidul în sticlă pe parcursul răcirii. Fluxul de apă dintre interiorul și exterior celulelor va fi întrerupt din această cauză.[13]

Permeabile – protectanți cu molecule mici, în general polimeri [46]- (pătrund în interiorul celulelor, sunt intracelulare): DMSO (Dimethylsulfoxid), glicerol, etilen glicol, sau propilen glicol.

Acestea sunt folosite, în principal, în cazul în care procesul de crioconservare se desfășoară lent. Datorită acestui aspect este suficient timp ca apa din celule să se evacueze datorită presiunii osmotice care conduce la o scădere în volum a celulelor.[13]

Deși au fost realizate numeroase studii asupra crioprotectanților, baza cercetărilor actuale nu a suferit modificări semnificative din 1969 și până în prezent. În unele cazuri, amestecarea unor crioprotectanți a dus la îmbunătățirea eficienței acestora față de utilizarea lor separată [21] însă nu s-a produs o descoperire majoră în ultimii 60 de ani. Studiile efectuate au furnizat o mulțime de rezultate în diferite domenii și pe diverse tipuri de celule, dar niciunul dintre acestea nu a dus la dezvoltarea unei soluții de crioprotecție universal acceptate și utilizată multidisciplinar. În consecință, necesitatea dezvoltării de noi metode și soluții crioprotectante rămâne crucială pentru cercetarea multidisciplinară și progresul în acest domeniu.

9. MODELAREA FIZICO-MATEMATICĂ A CONSERVĂRII ÎN IZOCOR

Modelul termodinamic, cu ajutorul căruia se poate exprima fenomenul de răcire în izocor pentru amestecuri în stare lichidă, este încă în fază incipientă. Dacă reducem discuția la explicitarea bazelor fenomenului pentru apă, putem deduce o serie de concluzii din aceasta.

Au fost dezvoltate câteva teorii, care susțin, fiecare în parte rezultatele obținute prin experimente. Prima lucrare notabilă în domeniu a fost publicată în anul 2005 de către Boris Rubinsky et. al "The thermodynamic principles of isochoric cryopreservation" [6].

9.1. Cazul soluțiilor apoase pure

Temperatura de schimbare de fază în izocor a unui sistem simplu format dintr-o substanță pură într-un câmp gravitațional este o funcție unică de presiune. Pentru orice presiune, există o temperatură corespondentă, la care schimbarea de fază are loc.

A fost definită, o curbă de regresie pentru a facilita relația dintre presiune și temperatură în timpul schimbării de fază din lichid în intersecția cu Gheață I și III. Această curbă a fost validată, de altfel și pe cale experimentală și este extrasă din diagrama de fază a apei în izocor[47]

$$P = -0.1461T^2 - 12.58T + 0.1013 \quad (1)$$

T - exprimat în °C

P – exprimat în MPa

Prin urmare, procentul de gheață sau apă într-un sistem izocor, poate fi calculat într-un sistem pentru fiecare temperatură și sistemul poate fi complet specificat.

Trebuie să introducem, însă "Calitatea Z" – Aceasta reprezintă procentul masic al apei relatat la greutatea totală a amestecului de apă și gheață la o anumită presiune și temperatură.

"Calitatea Z" se obține din ecuația conservării masei și a volumului în izocor.

$$m_0 = m_1 + m_2 \quad \#(2)$$

m_0 – masa în condițiile inițiale [kg]

m_1 – masa gheții[kg]

m_2 – masa apei[kg]

$$V_0 = V_1 + V_2 \quad \#(3)$$

V_0 – volumul în condițiile inițiale [m^3]

V_1 – volumul gheții[m^3]

V_2 – volumul apei[m^3]

Din acestea, "calitatea Z" se exprimă ca,

$$Z = \frac{m_2}{m_0} = \frac{m_2}{m_1 + m_2} \quad \#(4)$$

Ulterior, din teoria conservării masei în volum constant și din definiția volumului specific, vom avea

$$v_0 = \frac{V_0}{m_0} = \frac{V_1 + V_2}{m_0} = \frac{m_1 * V_1}{m_0 * m_1} + \frac{m_2 * V_2}{m_0 * m_2} = \frac{(m_0 - m_2)}{m_0} * v_1 + Z * v_2 = (1 - Z) * v_1 + Z * v_2 \quad \#(5)$$

v_0 – volumul specific în condițiile inițiale [m^3/kg]

v_1 – volumul specific al gheții[m^3/kg]

v_2 – volumul specific al apei[m^3/kg]

Dacă, reorganizăm termenii din ecuație, va rezulta o expresie generală a calității, în timpul răcirii în izocor prin volume specifice ale gheții și apei neînghețate:

$$Z = \frac{v_0 - v_1}{v_2 - v_1} \quad \#(6)$$

În termeni generali, volumul specific al apei sau gheții, poate fi determinată rezolvând polinomul Taylor de prim rang, introducând valorile pentru presiune și temperatură echivalente.[48]

$$dv = \frac{\delta_v}{\delta_P} dP = \frac{\delta_v}{\delta_T} \# (7)$$

din acesta, conform principiului echilibrului chimic[49]

$$\beta = \frac{1}{v} \frac{\delta_v}{\delta_P} \# (8)$$

$$\alpha = \frac{1}{v} \frac{\delta_v}{\delta_T} \# (9)$$

Volumul specific pentru gheață în funcție de temperatură și presiune calculează prin următoarele ecuații:

$$v_1 = v_{10} \exp \left[- \int_{P_0}^P \beta_{T_1}(P', T) dP' + \int_{T_0}^T \alpha_{T_1}(P_0, T') dT' \right] \# (10)$$

β – coeficientul de compresibilitate

α – coeficientul de dilatare termică

indicele 0 reprezintă proprietățile apei la punctul de îngheț la o presiune de 1 [atm]

Acestea se regăsesc în lucrarea "Freezing processes in high-pressure domains" publicată de P.D. Sanz et. al. [50]

$$\alpha_{T_1}(P_0, T) = A_1 + A_2 T + A_3 T^2 + A_4 T^3 \# (11)$$

$$A_1 = 1.5756 * 10^{-4}$$

$$A_2 = 5.556 * 10^{-7}$$

$$A_3 = 2.655 * 10^{-8}$$

$$A_4 = 7.11 * 10^{-10}$$

Unitatea de măsură pentru temperatură este [°C]

Valorile sunt preluate din lucrarea "Thermodynamic Properties of Ice, Water and Their Mixture Under High Pressure,

Glaciers– Ocean– Atmosphere Interactions" de către V. E. Chizhov et. al. [51]

$$\beta_{T_1}(P, T) = \frac{\beta_{T_1}^0}{1 + m_1 \beta_{T_1}^0 P} \# (12)$$

$$\beta_{T_1}^0 = \frac{\beta_1}{1 - \beta_2 T}$$

$$\beta_1 = 1.827 * 10^{-5}$$

$$\beta_2 = 1.418 * 10^{-3}$$

$$m_1 = 5$$

Unitatea de măsură pentru presiune este [bar]
 Valorile sunt preluate din lucrarea "Thermodynamic Properties
 of Ice, Water and Their Mixture Under High Pressure,
 Glaciers– Ocean– Atmosphere Interactions" de către V. E. Chizhov et. al. [51]

Volumul specific pentru apă în funcție de temperatură și presiune calculează prin următoarele ecuații:

$$v_2 = v_{10} \exp \left[- \int_{P_0}^P \beta_{T_2}(P', T) dP' + \int_{T_{k0}}^{T_k} \alpha_{T_2}(P_0, T') dT' \right] \# (13)$$

Coeficienții de compresibilitate și dilatare termică sunt :

$$\beta_{T_2}(P, T) = \left(\sum_{i=0}^4 b_i P^i \right) * 10^{-4} \# (14)$$

$$\alpha_{T_2} = \left(A + \frac{B}{C + \Gamma} \right) * 10^{-4} \# (15)$$

Funcțiile de temperatură A, B, C și Γ sunt exprimate prin:

$$A = a_1 + a_2 T_K + a_3 T_K^2 \# (16)$$

$$B = a_4 + a_5 T_K + a_6 T_K^2 + a_7 T_K \Gamma + a_8 \Gamma \# (17)$$

$$C = a_8 + a_9 T_K + a_{10} T_K^2 + a_{11} T_K^3 \# (18)$$

$$\Gamma = P + a_{13} P^2 + a_{14} P^3 \# (19)$$

unde,

$$\begin{aligned} a_1 &= 4.7856 * 10^1 \\ a_2 &= -8.12847 * 10^{-2} \\ a_3 &= 8.49849 * 10^{-5} \\ a_4 &= 5.56047 * 10^5 \\ a_5 &= -3.76355 * 10^3 \\ a_6 &= 5.56395 \\ a_7 &= 5.59682 * 10^{-3} \\ a_8 &= -2.76522 * 10^1 \\ a_9 &= -4.28067 * 10^3 \\ a_{10} &= -3.39150 * 10^1 \\ a_{11} &= 3.65873 * 10^{-1} \\ a_{12} &= -5.89617 * 10^{-4} \\ a_{13} &= 3.28892 * 10^{-4} \end{aligned}$$

$$a_{14} = 2.65933 * 10^{-8}$$

Aceste constante se regăesc în lucrarea "Thermodynamic properties of water under pressure up to 5 kb(kilobar), and between 28 and 120 °C. Estimations in the supercooled region down to - 40 °C" publicată de către L. T. Minnasian et. al. [52]

Cunoscând volumul specific inițial al apei și volumele specifice de apă și de gheață la noile condiții de echilibru termodinamic, putem obține din Ec. (20) greutatea procentuală a apei raportată la greutatea procentuală a amestecului în un sistem izocor, la fiecare temperatură și presiune. Procentul de gheață din amestecul de apă și gheață este dat de ecuația:

$$\%Gheață = (1 - Z) * 100 \# (20)$$

9.2. Cazul soluțiilor apoase amestecate

Din conceptele fundamentale ale termodinamicii, putem afirma că temperatura de schimbare de fază a unui amestec este o funcție de presiune și compoziție a amestecului studiat. [6]

$$T_{ph}(P, c) = T^0 + \Delta T(P) + \Delta T(C) \# (21)$$

T_{ph} – temperatura de schimbare de fază, în izocoric, pentru amestec

T^0 – temperatura de îngheț al apei la presiunea de 1 atm

$\Delta T(P)$ – scăderea de temperatură cauzată de creșterea presiunii P

$\Delta T(c)$ – scăderea de temperatură în funcție de concentrația amestecului c

9.2.1. Presiunea

$$\Delta T(P) = -4E - 10P^3 - 3E - 7P^2 - 0.00809P + 0.00819547826 \# (22)$$

9.2.2. Concentrația

$$\Delta T(c) = \Delta T_{solvent}(c_{solvent}) + \Delta T_{solvat}(c_{solvat}) \# (23)$$

$$c = MW * M * v \# (24)$$

Unde,

c – concentrația [mol/m³]

MW - masa moleculară [g]

M – molaritatea [mol/l]

v – volumul specific al soluției [m^3/kg]

Putem spune că $\Delta T(c)$ poate fi o combinație liniară care încorporează punctele de îngheț a mai multor solvați, sub forma :

$$\Delta T(c) = \Delta T(c_1) + \Delta T(c_2) + \dots + \Delta T(c_n) \quad \# (25)$$

Datele pentru diferite tipuri de amestecuri, se găsesc în lucrarea „CRC Handbook of Tables for Applied Engineering Science” publicată de R.E. Bolz et.al. [53]

În acest caz trebuie să avem în vedere că avem cel puțin două soluții apoase amestecate, fiecare cu compoziție și osmolalitate diferită. Plecând de la ecuațiile (21-25) amestecurile sunt separate de o limită teoretică Γ , care este impermeabilă la materie dar complet maleabilă și poate transmite căldura și presiunea. Iar amestecul are aceeași presiune P și temperatură T . [54] , o prezentare grafică se regăsește în Figura 24.

- a) Figura generală, presiune-temperatură, a celor 3 etape prin care trece amestecul
- b) În prima etapă a răcirii, considerăm că solvatul are o temperatură de îngheț mai mare ca solventul, și de aceea începe să cristalizeze. Limita Γ este una imaginară (b)
- c) În a doua etapă a răcirii, solvatul îngheață complet (c)
- d) În a treia etapă a răcirii, începe să înghețe și solventul (d)

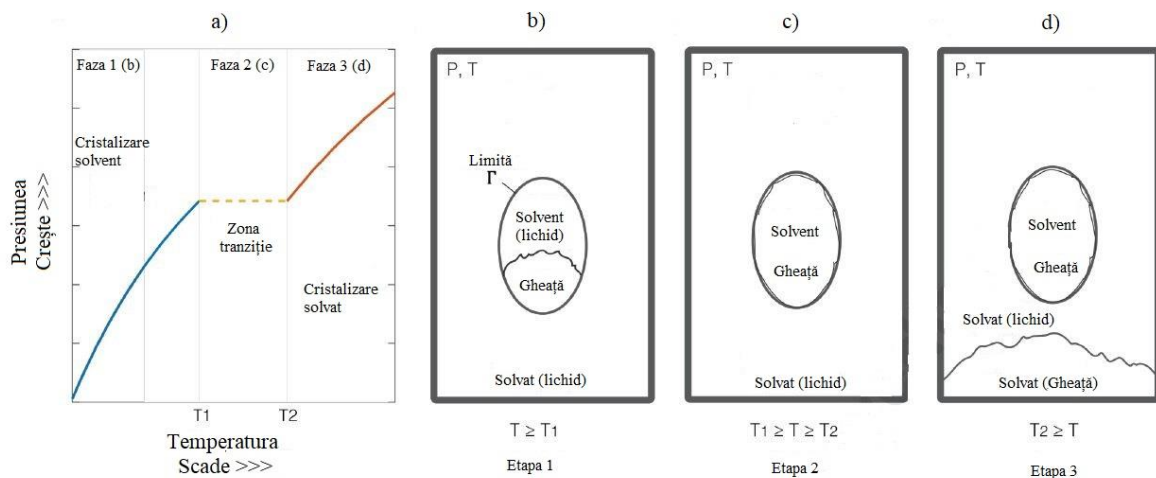


Figura 4-Figura generală, presiune-temperatură, a celor 3 etape prin care trece amestecul[54].

Pentru simplitate am introdus termenii de $c_{solvent}$ și c_{solvat}

Dacă ne asumăm că c_{solvat} are o temperatură de înghețare mai mare ca $c_{solvent}$ atunci schimbarea de fază în c_{solvat} va urma diagrama de fază pentru soluția în sine. (exceptând unele condiții încă nespecificate în literatură)

Totodată, dacă ne asumăm că ca $c_{solvent}$ are o temperatură de înghețare mai mare ca c_{solvat} atunci schimbarea de fază în $c_{solvent}$ va urma diagrama de fază pentru soluția în sine. (exceptând unele condiții încă nespecificate în literatură)

Principiul este un tratament, teoretic, separat al celor două componente ale amestecului.

$$c_{solvent} = \frac{c_0}{Z} \# (26)$$

Dacă, înlocuim ecuația (26) în ecuația (23), și recalculăm iterativ valorile pentru T, P și Z vom ajunge la convergență [54], și ne vom putea explica procesul de înghețare al amestecului în izocor.

10. MODELAREA ASISTATĂ PE CALCULATOR AL RĂCIRII APEI ÎN IZOCOR. (TESTAREA REACTORULUI CU PRIVIRE LA REZISTENȚA ACESTUIA LA PRESIUNILE MAXIMALE DIN LITERATURĂ)

Prin modelele de calcul prezente în literatură până în acest moment, putem obține rezultate cvasistatice. Lipsa continuității în modelele termotehnice fragmentează realizarea unor modele asistate complete a procesului de înghețare în izocor.

10.1. Setări generale în programul de simulare.

În prima etapă vom simula comportamentul reactorului izocoric, în timpul presiunii maxime înregistrate în timpul experimentelor, respectiv pentru amestecul glucoză 1M și soluție salină 0.9% - unde presiunea maximă înregistrată a fost de 212.8 MPa la o temperatură exterioară de -22°C. Având în vedere că temperatura exterioară și presiunea rămân constante și faptul că sistemul ajunge în echilibru termodinamic, se consideră, că și temperatura din interiorul reactorului este de -22°C.

Simularea a fost realizată în regim staționar, folosind un model 2D Axisymmetric.

Pentru aceasta a fost folosit modulul de Thermal Stress.

10.1.1. Setarea modelului în programul de simulare

După deschiderea programului vom selecta 2D Axisymmetric.

10.1.2. Setarea geometriei

A fost definit un model simplificat al reactorului, pentru a scurta timpul de convergență al rezultatelor obținute.

După cum se poate vedea în Figura 29, acesta respectă dimensiunile reactoarelor originale MS-02.

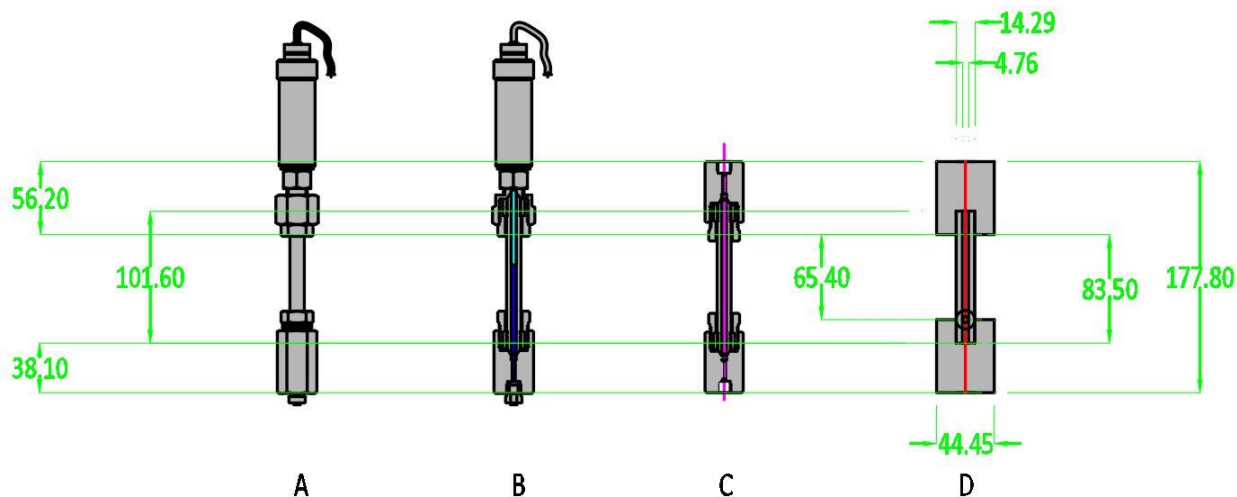


Figura 5– A) model reactor MS-1. B) sectiune reactor MS-1 C) varianta simplificata reactor MS 1 D) model introdus în programul de simulare

10.2. Adăugarea mărimilor fizice.

Vom adăuga mărimile fizice definite la parametrii.

Se va adăuga: Presiune interioară (P_i), Un punct fix[-], Temperatura interioară[°C] și Temperatura exterioară[°C] conform Figurii 32.

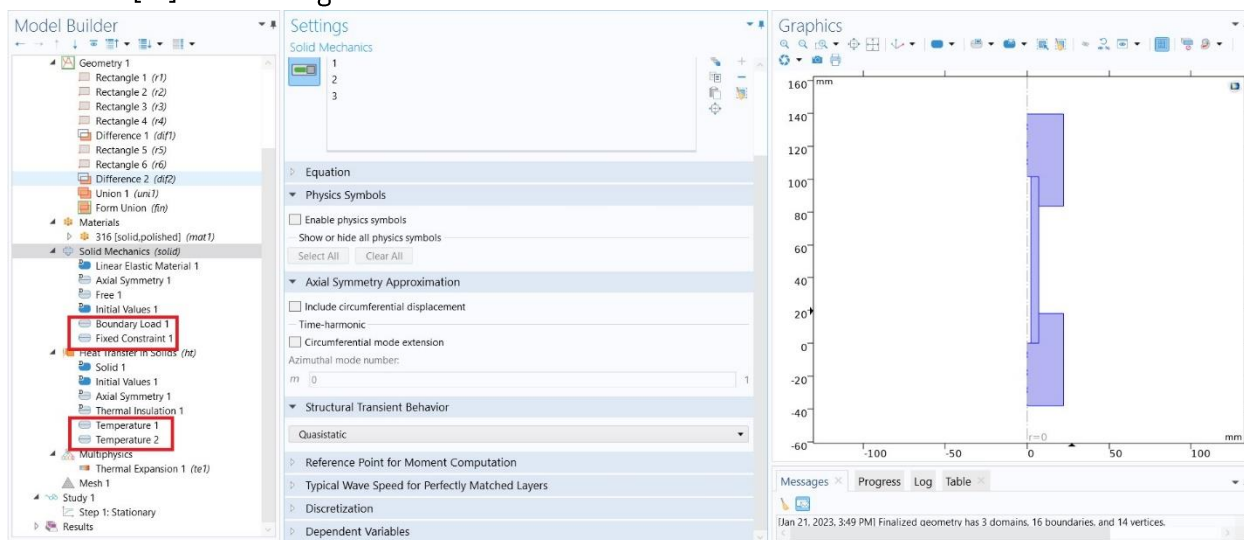


Figura 6– Adăugarea marimilor fizice

10.2.1. Discretizarea modelului

Discretizarea sau meșarea este necesară pentru a înlocui continuumul cu un set finit de puncte. Pentru suprafețe se folosește metoda elementelor finite, iar pentru volume, metoda volumelor finite.

10.3. Rezultate.

10.3.1.1. Tensiunea Von Mises în 2D.

Această tensiune este o tensiune teoretică cu ajutorul căruia putem afla punctul de rupere al materialului. Criteriul de verificare a acestei tensiuni presupune că dacă tensiunea Von Mises a unui material sub sarcină, este mai mare sau egală cu a materialului respectiv la limita de curgere a tensiunii uniaxiale, acesta va ceda.

$$\sigma_{VM} = \sqrt{\frac{\sigma_1 + \sigma_2^2 + \sigma_2 - \sigma_3^2 + \sigma_3 - \sigma_1^2}{2}}$$

Unde

σ_1 -este componenta normală a tensiunii x

σ_2 -este componenta normală a tensiunii y

σ_3 -este efortul de forfecare

Din literatura de specialitate, limita de rezistență pentru aliaj de oțel este de 690 MPa. [55]

Din rezultatele obținute de noi, valoarea maximă este de 487 MPa, ceea ce indică o utilizare sigură a reactorului în timpul experimentelor. În figura 34 și figura 35 avem o captură din programul de simulare în 2D respectiv 3D cu rezultatele:

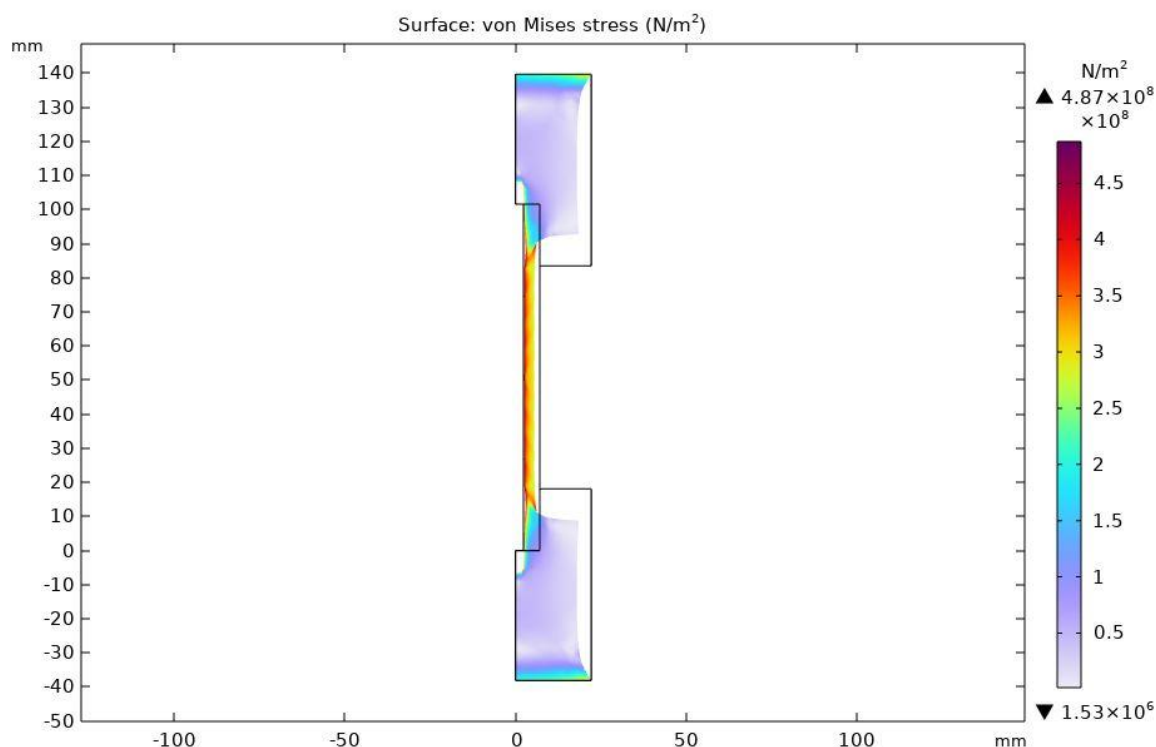


Figura 7– Rezultate grafice – în secțiune – tensiunea Von Mises

În urma simulărilor, s-a înregistrat o tensiune von Mises maximă de 487 MPa în timpul procesului de racire a reactorului. Această valoare reprezintă cea mai mare tensiune echivalentă în materialul reactorului în timpul experimentelor.

10.3.1.2. Presiunea

Din presiunile adăugate în program, nu a apărut nici o deformare, așa cum era de așteptat, și așa cum se poate vedea în Figura extrasă din program.

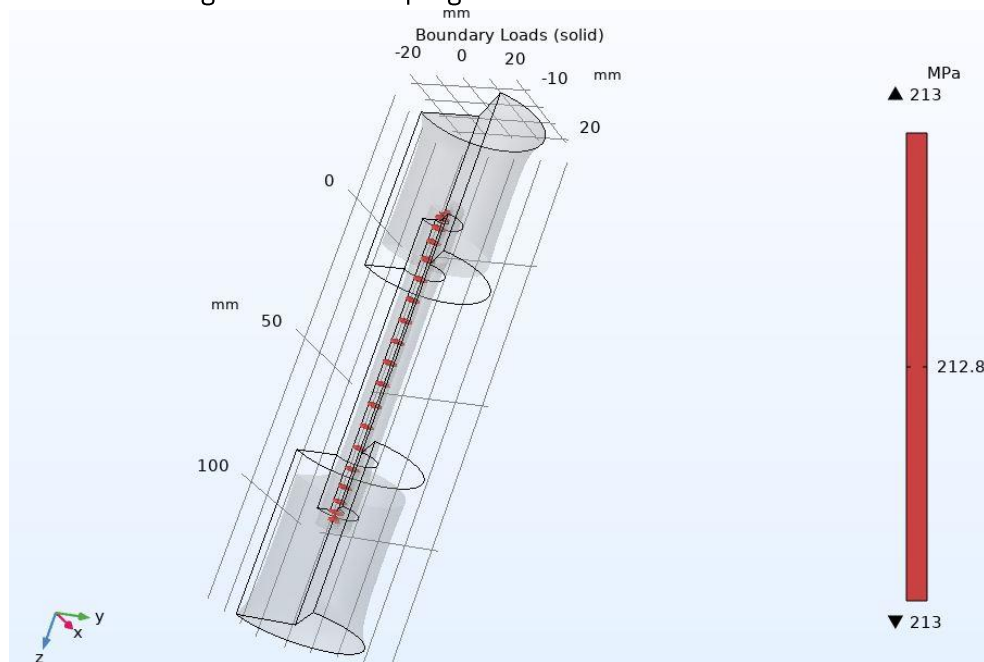


Figura 8– Deformarea cauzată de presiune în reactor

10.3.1.3. Temperatură

Simularea a fost realizată la temperatura de echilibru, respectiv -25°C . Putem extrage din program izotermele din interiorul reactorului conform Figurii.

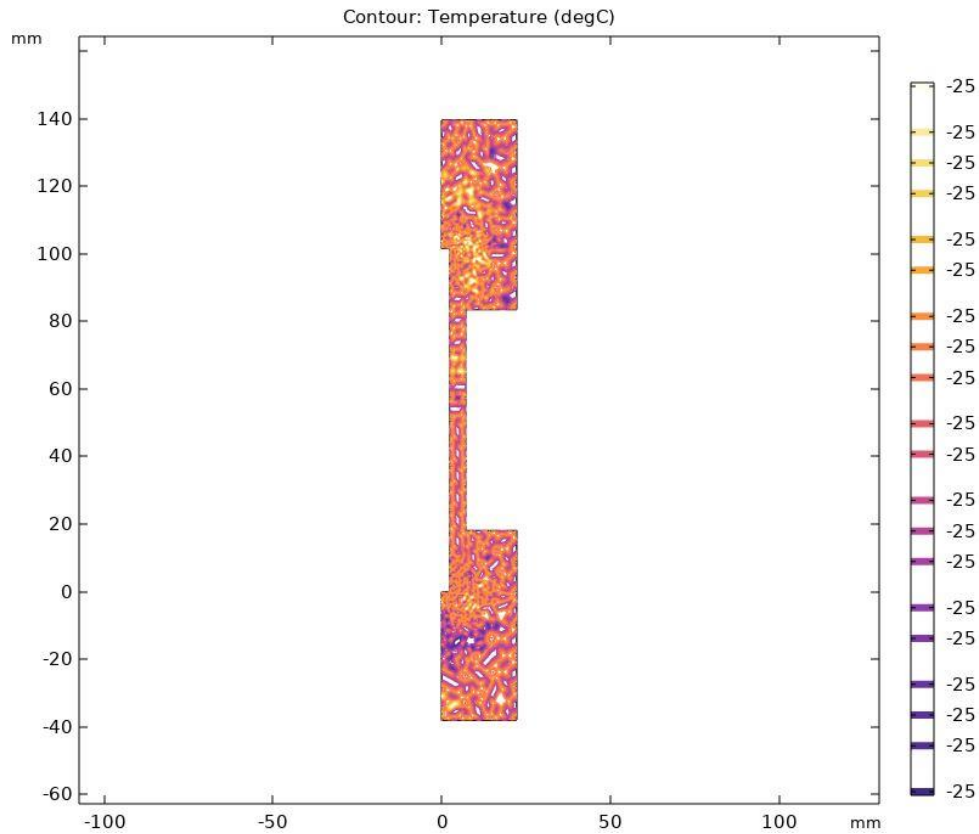


Figura 9– Izotermele din interiorul reactorului

10.4. Simularea comportamentului apei în timpul răcirii izocor prin calculul presiunii

Pentru a reduce timpii de convergență, am setat un model 2D, conform figurii de mai jos

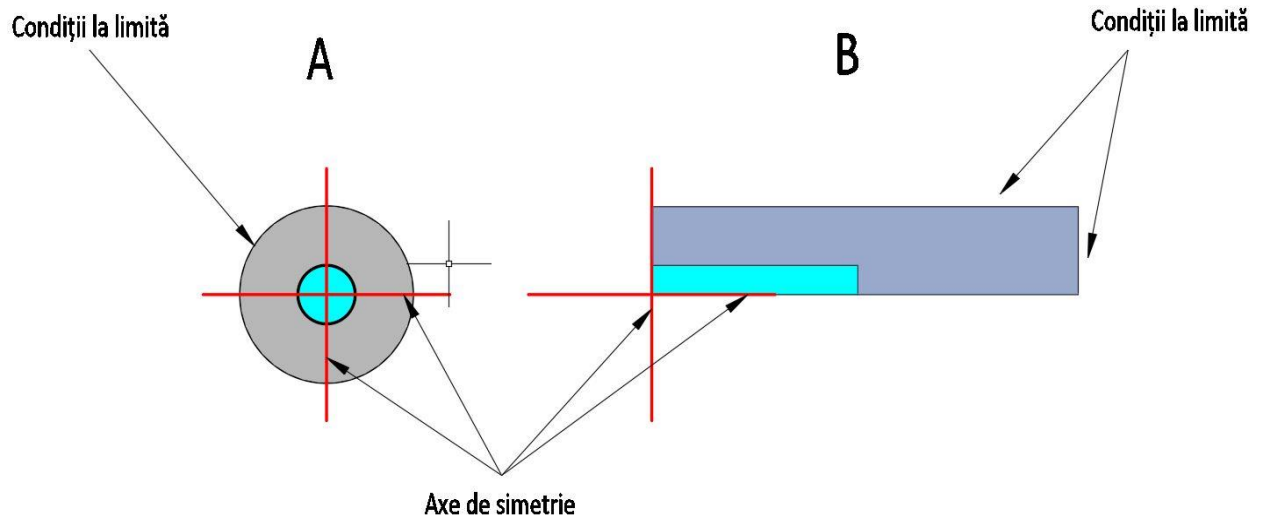


Figura 10– Modelul setat în programul de simulare

Presiunea în volum constant, poate fi calculată folosind mecanica mediilor continue sau corelațiile schimbării de fază. Literatura a arătat că utilizând ambele metode, putem obține rezultate corecte.[56]

10.4.1. Setări generale.

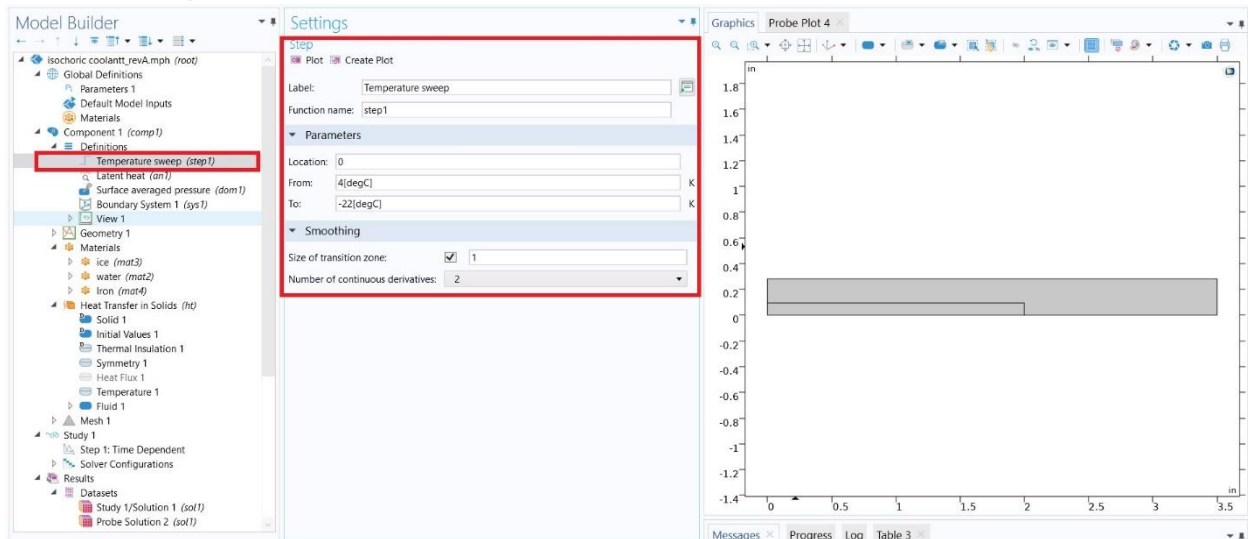


Figura 11– Setări program simulare, în regim tranzitoriu

Vom adăuga și căldura latentă, sub forma unei funcții analitice:

$$L(T_m) = 1.617 * 10^{-4} * T_m^4 - 1.711 * 10^{-1} * T_m^3 + 67.94 * T_m^2 - 1.198 * 10^4 * T_m + 7.926 * 10^5 \text{ [kJ/kg]}$$

Unde T_m reprezintă temperatura de schimbare de fază pentru apă [K] [57] [51]

Vom adăuga o probă de domeniu.

$$P = 8.78 * 10^2 * IPm^4 + 2.75 * 10^2 * IPm^3 + 3.24 * 10^2 * IPm^2 + 1.97 * 10^2 * IPm + 0.31 \text{ [Pa]}$$

unde, IPm este indicatorul de schimbare de fază de la 1 (apă) la 0 (gheață)

10.4.2. Discretizarea modelului.

În acest caz vom discretiza modelul nostru cu 2 tipuri de mărimi.

1. În zona în care avem reactorul (Otel inox 316) vom utiliza discretizare liberă
2. În zona în care avem apa și unde schimbarea de fază va avea loc, pentru rezultatele necesare vom utiliza discretizare cu mărimea elementului de maxim 0.6 [mm]

10.5. Rezultatele

10.5.1. Temperatura °C

Capturile din program din figurile de mai jos (ABCDEFGG) reprezintă valorile temperaturilor rezultate din simulare la min (0,5,10,15,20,25,30)

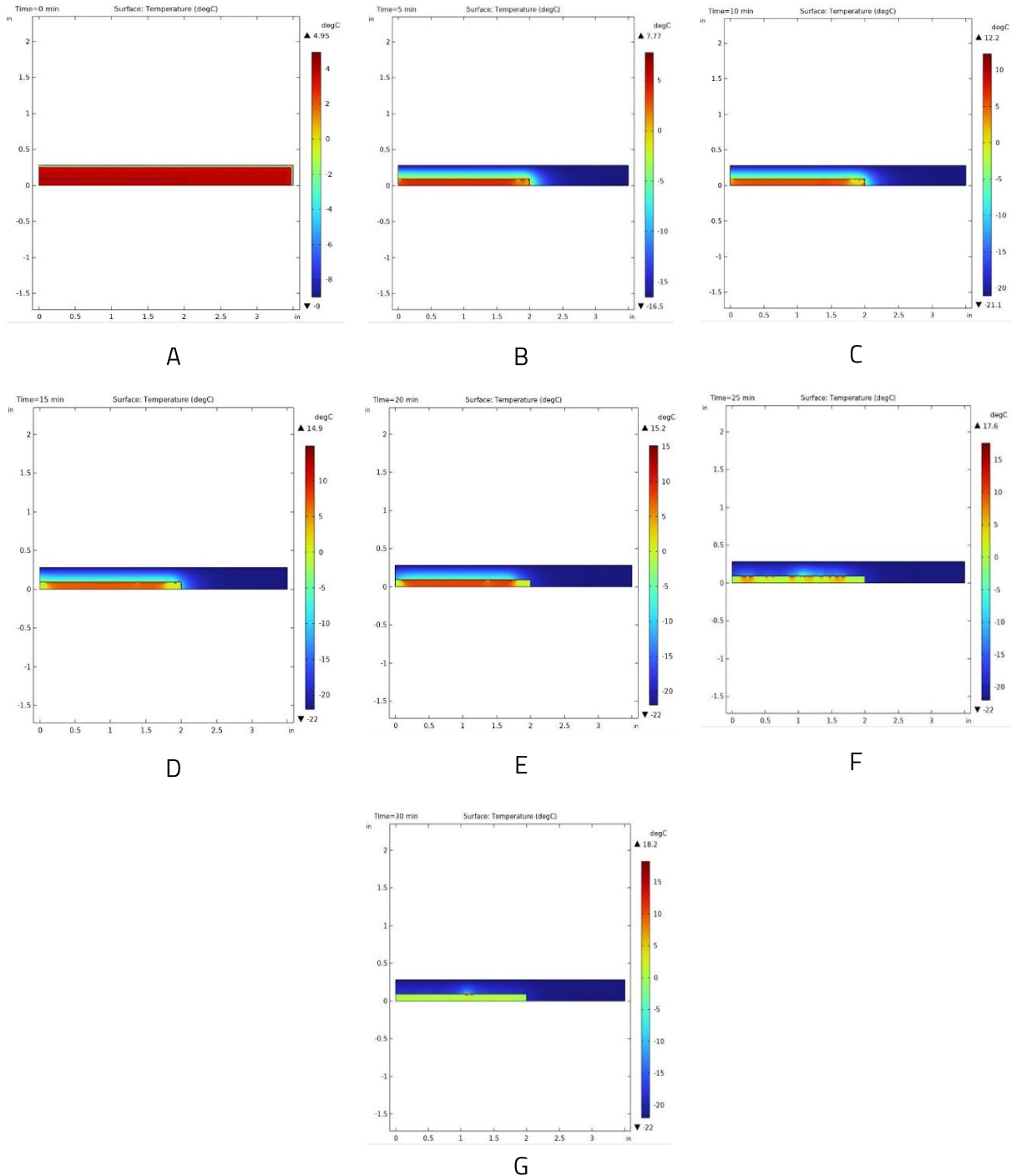


Figura 12– Rezultatele obținute cu ajutorul programului de simulare în minutele [A=0,B=5,C=10,D=15,E=20,F=25,G=30] – temperatură °C.

10.5.2. Schimbarea de fază.

Capturile din program, (ABCDEFGG) reprezintă modelul schimbării de fază rezultat în urma rulării programului de simulare la min (A=0,B=5,C=10,D=15,E=20,F=25,G=30)

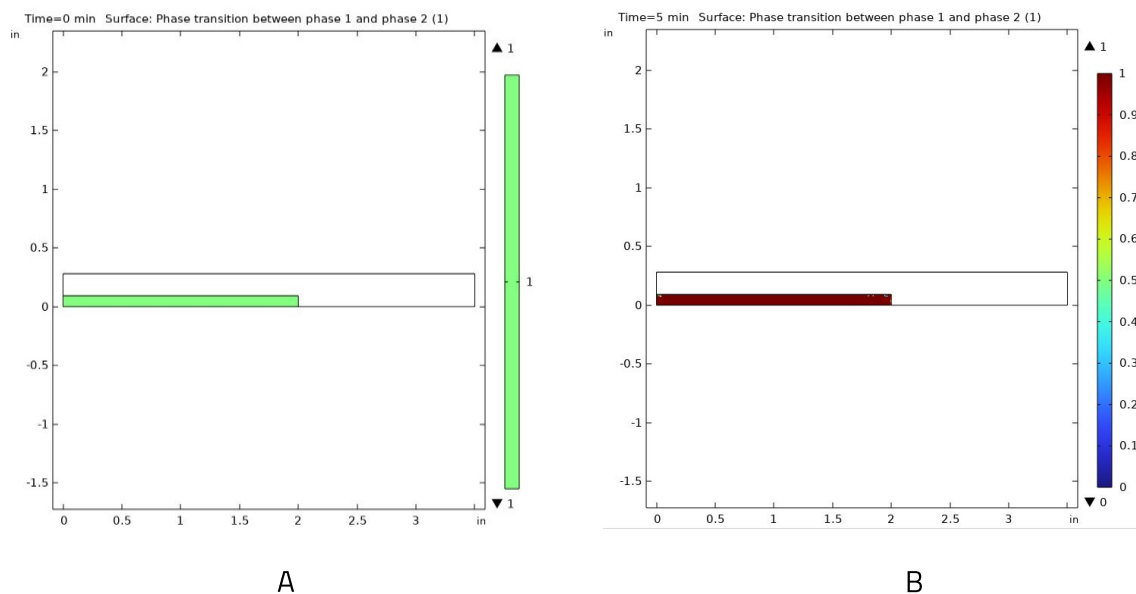


Figura 13 - Rezultatele obținute cu ajutorul programului de simulare în minutele [A=0,B=5] –schimbarea de fază

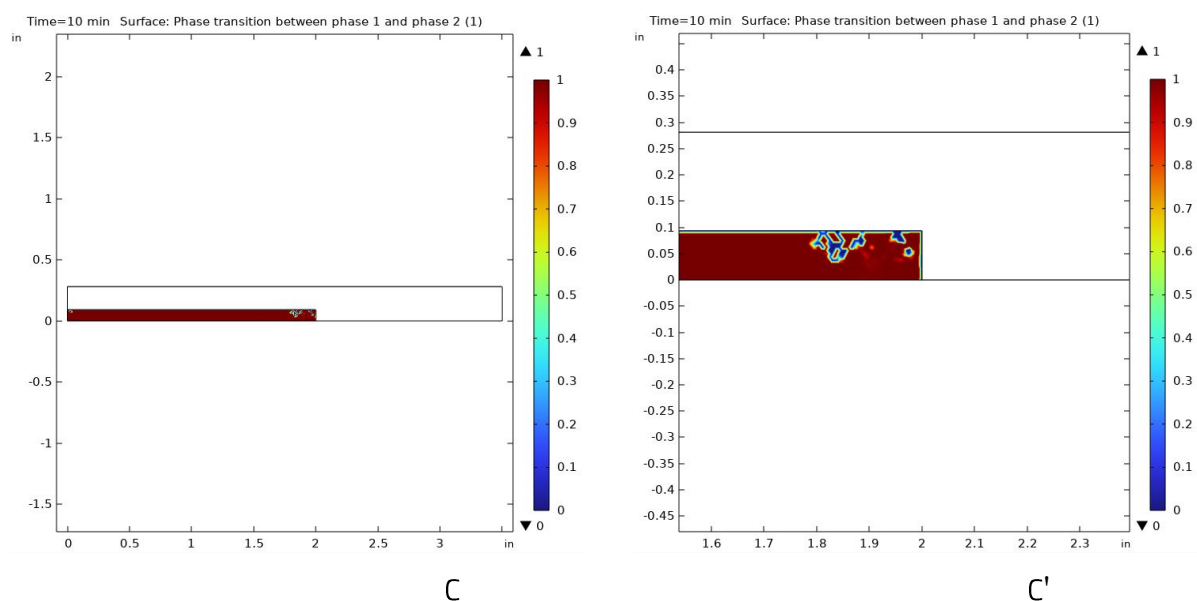


Figura 14 - Rezultatele obținute cu ajutorul programului de simulare în minutul [C=10] –schimbarea de fază – captura ', reprezintă captură mărită

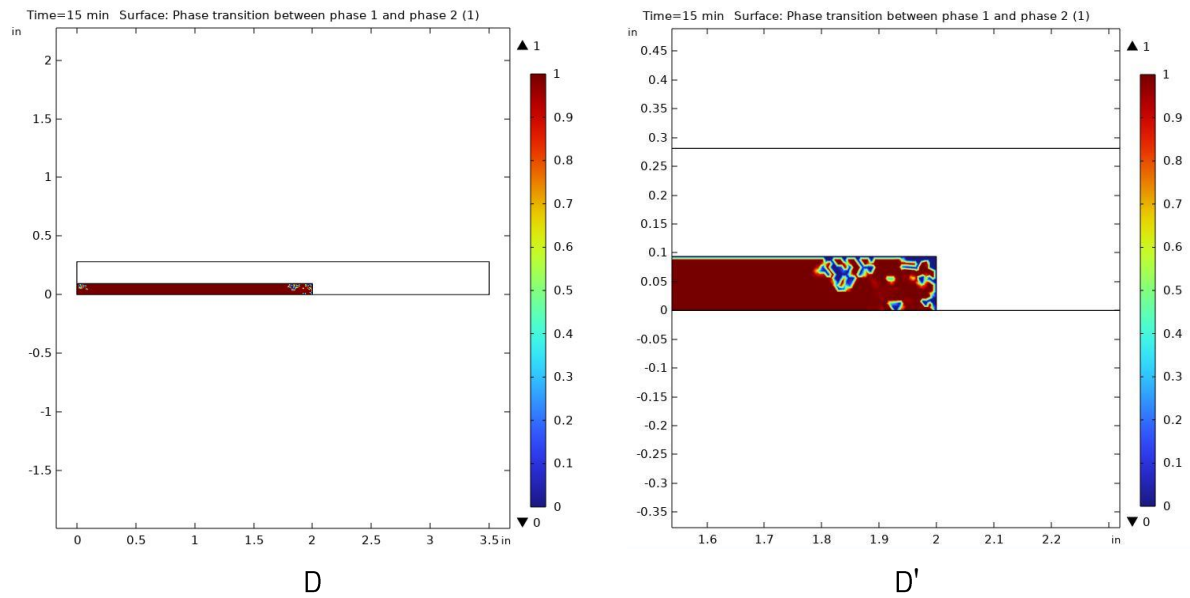


Figura 15 - Rezultatele obținute cu ajutorul programului de simulare în minutul [D=15]
 –schimbarea de fază – captura ' , reprezintă captură mărită

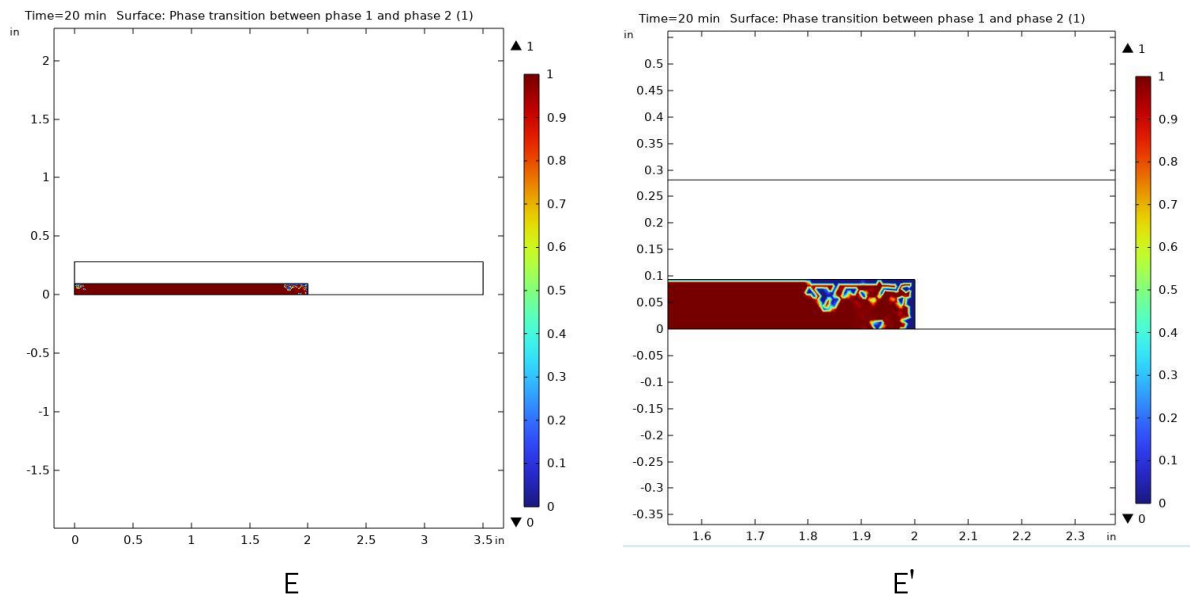


Figura 16 - Rezultatele obținute cu ajutorul programului de simulare în minutul [E=20]
 –schimbarea de fază – captura ' , reprezintă captură mărită

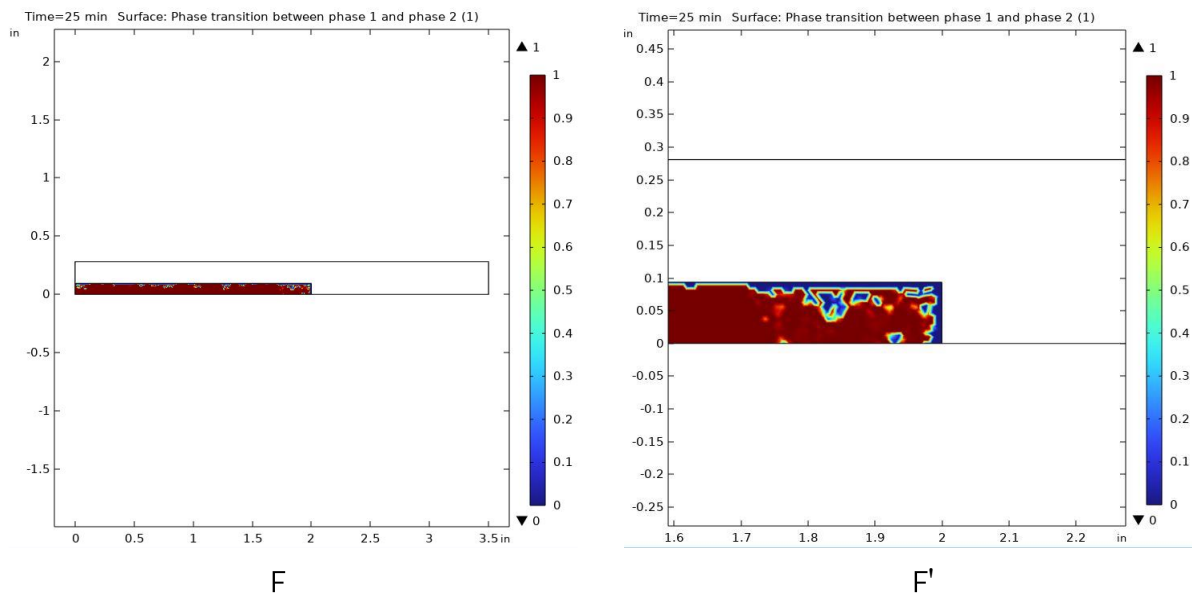


Figura 17 - Rezultatele obținute cu ajutorul programului de simulare în minutul [F=25]
 –schimbarea de fază – captura', reprezintă captură mărită

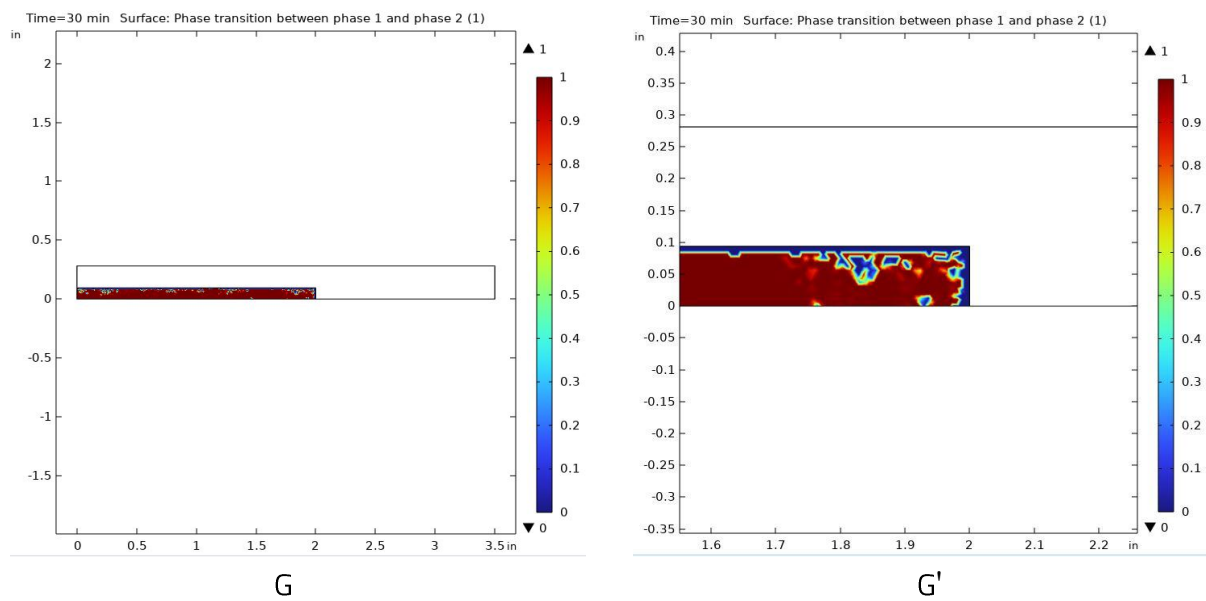


Figura 18 - Rezultatele obținute cu ajutorul programului de simulare în minutul [G=30]
 –schimbarea de fază – captura', reprezintă captură mărită

11. MATERIALE ȘI METODE

Pentru a obține rezultatele din această lucrare, a fost utilizat un model experimental unitar pentru fiecare determinare.

11.1. Componentele sistemului

Microreactorul utilizat este unul de tipul MS-1 produs de către compania High-Pressure Equipment Company (Erie, PA, SUA). Acesta este fabricat din oțel inoxidabil 316 și este proiectat în așa fel încât poate rezista la presiunea generată de către amestecurile studiate în timpul experimentelor fără a avea dilatări. [58]

Traductorul de presiune este conectat la reactorul izocoric cu ajutorul unui cablu USB. Acesta este fabricat de compania ESI Technology Ltd și este modelul GD4200- USB, 0-5000 bar (0-72,519 psi).

Cablul USB – USB CAB 2 -este fabricat de către ESI Technology Ltd, are o lungime de 2 m și este utilizat pentru conectarea senzorului de presiune la laptop.

11.1.1. Programul de analiză și stocare date

Pentru analiză în timp real, stocare și vizionare a rezultatelor a fost utilizat softul "ESI – USB Dynamic Interface"

11.1.2. Laptopul

Laptopul utilizat pentru rularea programului de achiziție al datelor este unul HP ProBook 6570b. Acesta este dotat cu procesoare Intel I5 cu viteză de procesare de până la 3.2 GHz, memorie internă RAM DDR3 8 Gb și are un spațiu de stocare de 250 GB.

Performanțele laptopului permit rularea programului de achiziție al datelor, fără a influența acuratețea datelor culese.

11.1.3. Baia de răcire

Baia de răcire utilizată pentru realizarea experimentelor este Lauda RE 1225 S produsă de LAUDA DR. R. WOBSEER GMBH and CO. KG, Lauda-Königshofen,

O poză cu sistemul complet asamblat, utilizat la realizarea experimentelor.

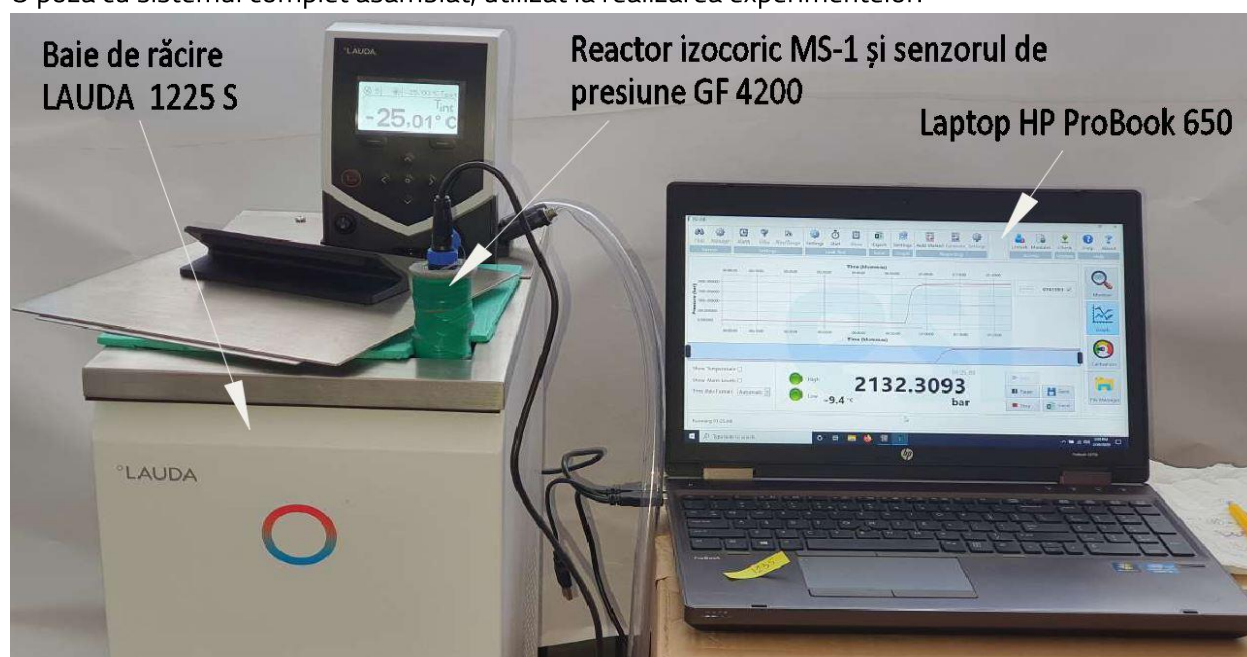


Figura 19- Echipamentele utilizate pentru realizarea experimentelor

11.2. Materiale utilizate

Soluție salină cu 9 grame clorură de sodiu ($3.54\text{g Na}^+ = 154.0\text{ mmol/l}$ și $5.46\text{ g Ca}^{2+} = 154.0\text{ mmol/l}$) soluție perfuzabilă ambalată în pungi de 1000 ml, având o osmolalitate de 308 mOsm/l, produsă de STADA HEMOFARM SRL, Timisoara, Romania

Apă distilată la abur fabricat de către European Drinks (Strada Libertății 14-16, Oradea, Bihor)

Glicerol pentru biologie moleculară ($\geq 99\%$ - G5516-100 ml fabricat de SIGMA-ALDRICH Co.3050 Spruce Street, St. Louis, MO, SUA)

Glucoză D-(+)-Soluție Glucoză 100 g/L în H₂O, filtrată steril, BioXtra, pretabil pentru culturi celulare (G8644-100 mL – SIGMAALDRICH Co.).

Etilen – glicol anhidru, 99.8%, fabricat de SIGMA-ALDRICH Co., SUA.

Dietilen – glicol BioUltra, $\geq 99.0\%$, fabricat de SIGMA-ALDRICH Co., SUA

Dimetil – sulfoxid (DMSO) fabricat de EMPLURA® - EMD Millipore Co., SUA

Trehaloză – în formă de pulbere fabricat de (SOSA Ingredients S.L., Spania.).

11.3. Protocolul experimental

Pentru definirea profilelor termodinamice au fost alese amestecuri de soluție salină ca și solvent și soluțiile crioconservante ca și solvați. Concentrația soluțiilor, în toate cazurile, pentru a se obține rezultate comparabile a fost de 1M, 2M, 3M, 4M și 5M. [59][60].

În timpul experimentelor a fost măsurată în paralel, presiunea în fiecare reactor și temperatura de pe pereții exteriori ai reactorului, aceste valori fiind înregistrate. Temperatura antigelului din interiorul băii de răcire a fost măsurată cu ajutorul senzorilor încorporați din utilaj, și aceasta a fost de asemenea înregistrată.

Fiecare măsurătoare a fost repetată între 3 și 5 ori.

12. Rezultatele experimentelor.

12.1. Comportamentul amestecurilor de glicerină-ser fiziologic 0.9% în izocor

Următoarele soluții au fost utilizate în acest studiu: soluție salină fiziologică 0.9% și glicerol

1 M, 2 M, 3 M, 4 M, 5 M. Fiecare protocol experimental a fost repetat între trei și cinci ori.[59]

S-a măsurat presiunea din sistemul izocoric de-a lungul tuturor experimentelor și înregistrată simultan cu temperatura măsurată pe pereții reactoarelor.

În tabelul de mai jos regăsim, toate presiunile măsurate la temperaturile de echilibru pentru fiecare concentrație de soluție salină și glicerol studiată în parte.

Totodată, în tabel, hașurat cu culoare verde, găsim intervalul recomandabil, în care utilizând acest amestec pentru conservarea diferitelor materii biologice, putem obține rezultate viabile, având în vedere experimentele validate până la momentul redactării prezentei lucrări.

În chenarul marcat cu verde din partea dreaptă a tabelului, sunt prezentate temperaturile, până la care, a fost observat fenomenul de suprarăcire, pentru fiecare concentrație în parte.

Presiunea maximă până la care au fost obținute rezultate promițătoare până în acest moment este cea de [40] MPa. [7]

Tabel 3- Corelări temperatură-presiune la echilibru, în izocor pentru diferite concentrații de soluție salină și glicerină .[59]

Soluție	Presiune la 5 °C [MPa]	Presiune la 10 °C [MPa]	Presiune la -15 °C [MPa]	Presiune la -20 °C [MPa]	Presiune la -25 °C [MPa]	Suprarăcire (°C)
Soluție salină 0.9%, 0.308M						
răcire	48.8±0.05	98.1±0.09	141.3±0.07	179.7±0.09	214.4±0.14	n.a.
încălzire	49.1±0.06	98.3±0.06	141.4±0.09	179.9±0.12	214.1±0.22	
Glicerol						
1M răcire	-	59.2±0.00	97.9±2.35	132.0±2.86	161.9±3.37	-11.44±1.41
1M încălzire	14.4±1.70	59.3±2.00	98.0±2.35	132.1±2.76	161.9±3.37	
2M răcire	-	33.7±0.00	70.1±3.72	101.5±4.31	129.0±4.81	-12.55±2.28
2M încălzire	-	34.2±3.01	70.3±3.67	101.7±4.31	129.0±4.81	
3M răcire	-	-	33.4±4.51	61.2±4.25	85.8±4.81	-14.65±0.97
3M încălzire	-	2.2±2.49	33.3±3.61	61.7±4.64	85.8±4.81	
4M răcire	-	-	-	21.5±0.66	43.1±0.61	-18.63±0.72
4M încălzire	-	-	-	21.8±0.75	43.1±0.61	
5M răcire	-	-	-	-	2.7±0.06	-24.74±0.46
5 M încălzire	-	-	-	-	2.7±0.06	

12.2. Comportamentul amestecurilor de soluție salină 0.9% cu glucoză în izocor.

Următoarele soluții au fost utilizate în acest studiu: soluție salină 0.9% și glucoză 1 M, 2 M, 3 M, 4 M, 5 M. Fiecare protocol experimental a fost repetat între trei și cinci ori.[59]

În tabelul de mai jos regăsim, toate presiunile măsurate la temperaturile de echilibru pentru fiecare concentrație de soluție salină și glucoză studiate în parte.

Totodată, în tabel, marcat cu culoare verde, găsim intervalul recomandabil, în care utilizând acest amestec pentru conservarea diferitelor materii biologice, putem obține rezultate viabile, având în vedere experimentele validate până la momentul redactării prezentei lucrări.

Presiunea maximă până la care au fost obținute rezultate promițătoare până în acest moment este cea de [40] MPa. [7]

Tabel 4- Corelări temperatură-presiune la echilibru în izocor pentru diferite concentrații de soluție salină și glucoză .[59]

Soluție	Presiune la -5°C [MPa]	Presiune la -10°C [MPa]	Presiune la -15°C [MPa]	Presiune la - 20°C[MPa]	Presiune la -25°C [MPa]	Suprarăcire (°C)
Soluție salină 0.9% 0.308M						
răcire	48.8±0.05	98.1±0.09	141.3±0.07	179.7±0.09	214.4±0.14	n.a.
încălzire	49.1±0.06	98.3±0.06	141.4±0.09	179.9±0.12	214.1±0.22	
Glucoză						
1M răcire	46.9±0.00	96.1±0.15	138.7±0.10	176.7±0.00	210.9±0.15	-7.26±2.46
1M încălzire	47.5±0.10	96.5±0.10	139.3±0.15	177.2±0.10	210.9±0.15	
2M răcire	45.3±0.00	93.9±0.44	136.3±0.63	173.5±1.16	205.3±3.05	-7.96±2.81
2M încălzire	45.0±1.05	93.5±1.50	135.8±1.93	173.5±2.32	205.3±3.05	
3M răcire	-	91.4±1.13	133.4±1.37	170.7±1.69	202.9±2.44	-9.48±0.85
3M încălzire	43.6±0.64	91.7±0.96	133.8±1.25	171.1±1.63	202.9±2.44	
4M răcire	-	90.0±0.40	131.3±1.11	168.4±1.36	201.5±1.49	-9.58±0.34
4M încălzire	41.6±0.61	89.8±0.75	131.8±1.01	168.8±1.16	201.5±1.49	
5M răcire	-	86.9±0.75	128.3±1.12	164.8±1.55	196.9±2.97	-9.73±0.71
5 M încălzire	40.0±0.34	87.4±0.70	128.9±0.97	165.6±1.28	196.9±2.97	

12.3. Comportamentul amestecurilor de DMSO și soluție salină 0.9 % în izocor

Pentru acest studiu au fost utilizate următoarele amestecuri: soluție salină 0.9% și DMSO 1 M, 2 M, 3 M, 4 M. Fiecare protocol experimental a fost repetat între trei și cinci ori. La o concentrație de 5M DMSO în ser fiziologic, amestecul nu a mai nucleat.

În tabelul de mai jos regăsim toate presiunile măsurate la temperaturile de echilibru pentru fiecare concentrație de soluție salină și DMSO studiate în parte.

Totodată, în tabel, marcat cu culoare verde, găsim intervalul recomandabil, în care utilizând acest amestec pentru conservarea diferitelor materii biologice, putem obține rezultate viabile, având în vedere experimentele validate până la momentul redactării prezentei lucrări.

Presiunea maximă până la care au fost obținute rezultate promițătoare până în acest moment este cea de [40] MPa. [7]

Tabel 5- Corelări temperatură-presiune la echilibru în izocor pentru diferite concentrații de DMSO și soluție salină 0.9%

Soluție	Presiune la -5°C [MPa]	Presiune la -10°C [MPa]	Presiune la -15°C [MPa]	Presiune la -20°C [MPa]	Presiune la -25°C [MPa]	Suprarăcire (°C)
Soluție salină 0.9% 0.308M						
răcire	48.8±0.05	98.1±0.09	141.3±0.07	179.7±0.09	214.4±0.14	n.a.
încălzire	49.1±0.06	98.3±0.06	141.4±0.09	179.9±0.12	214.1±0.22	-
DMSO						
1M răcire	-	-	104.2±1.69	139.3±1.88	169.2±3.22	-12.82±1.73
1M încălzire	19.2±0.96	64.9±1.34	104.5±1.62	139.7±1.85	169.2±3.22	-
2M răcire	-	-	63.0±2.35	93.9±2.59	120.5±3.02	-13.59±2.70
2M încălzire	-	28.9±1.75	63.9±2.22	94.3±2.59	120.5±3.02	-
3M răcire	-	-	22.6±3.68	68.5±3.72	68.5±3.72	-16.53±2.85
3M încălzire	-	-	23.1±2.54	68.5±3.13	68.5±3.72	-
4M răcire	-	-	-	-	13.9±0.38	-23.85±1.18
4M încălzire	-	-	-	-	13.9±0.38	-

12.4. Comportamentul amestecurilor de etilen glicol și soluție salină 0.9 % în izocor

În timpul acestui studiu au fost utilizate următoarele amestecuri: soluție salină fiziologică 0.9% și etilen glicol 1 M, 2 M, 3 M, 4 M, 5 M. Fiecare protocol experimental a fost repetat între trei și cinci ori. Amestecul a nucleat la toate concentrațiile studiate.[60]

Pentru a vizualiza datele ușor și complet, au fost introduse în tabelul de mai jos.

În tabel regăsim, toate presiunile măsurate la temperaturile de echilibru pentru fiecare concentrație de soluție salină și EG studiate în parte.

Totodată, în tabel, marcat cu culoare verde, găsim intervalul recomandabil, în care utilizând acest amestec pentru conservarea diferitelor materii biologice, putem obține rezultate viabile, având în vedere experimentele validate până la momentul redactării prezentei lucrări.

Presiunea maximă până la care au fost obținute rezultate promițătoare până în acest moment este cea de [40] MPa. [7]

Tabel 6- Corelări temperatură-presiune la echilibru în izocor pentru diferite amestecuri de etilen glicol și soluție salină 0.9%

Soluție	Presiune la -5°C [MPa]	Presiune la -10°C [MPa]	Presiune la -15°C [MPa]	Presiune la -20°C [MPa]	Presiune la -25°C [MPa]	Suprarăcire (°C)
Soluție salină 0.9% 0.308M						
răcire	48.8±0.05	98.1±0.09	141.3±0.07	179.7±0.09	214.4±0.14	n.a.
încălzire	49.1±0.06	98.3±0.06	141.4±0.09	179.9±0.12	214.1±0.22	
ETILEN-GLICOL						
1M răcire			104.5±0.89	139.6±1.23	168.7±2.55	-10.36±3.06
1M încălzire	19.2±0.28	65.0±0.53	104.8±0.79	139.7±1.30	168.7±2.55	
2M răcire	-	-	75.1±1.60	107.7±2.15	136.0±2.92	-13.05±2.21
2M încălzire	-	38.6±1.33	75.5±1.79	107.8±2.40	136.0±2.92	
3M răcire	-	-	-	72.6±1.13	97.8±1.62	-18.00±0.34
3M încălzire	-	9.6±0.64	43.2±0.90	73.1±1.07	97.8±1.62	
4M răcire	-	-	-	37.2±0.00	59.1±0.18	-21.65±3.03
4M încălzire	-	-	11.6±0.22	37.2±0.24	59.1±0.18	
5M răcire	-	-	-	-	14.2±0.08	-22.14±1.59
5M încălzire	-	-	-	-	14.2±0.08	

12.5. Comportamentul amestecurilor de dietilenglicol și soluție salină 0.9 % în izocor

În această etapă a studiului, au fost utilizate următoarele amestecuri: soluție salină 0.9% și dietilenglicol 1 M, 2 M, 3 M, 4 M. Fiecare protocol experimental a fost repetat între trei și cinci ori. La o concentrație de 5M dietilenglicol în ser fiziologic, amestecul nu a mai nucleat.

În tabel regăsim, toate presiunile măsurate la temperaturile de echilibru pentru fiecare concentrație de soluție salină și DEG studiată în parte.

Totodată, în tabel, marcat cu culoare verde, găsim intervalul recomandabil, în care utilizând acest amestec pentru conservarea diferitelor materii biologice, putem obține rezultate viabile, având în vedere experimentele validate până la momentul redactării prezentei lucrări.

Presiunea maximă până la care au fost obținute rezultate promițătoare până în acest moment este cea de [40] MPa. [7]

Tabel 7- Corelări temperatură-presiune la echilibru în izocor pentru diferite amestecuri de dietilen glicol și soluție salină 0.9% [60]

Soluție	Presiune la -5 °C [MPa]	Presiune la -10 °C [MPa]	Presiune la -15 °C [MPa]	Presiune la -20 °C [MPa]	Presiune la -25 °C [MPa]	Suprarăcire (°C)
Soluție salină 0.9% 0.308M						
răcire	48.8±0.05	98.1±0.09	141.3±0.07	179.7±0.09	214.4±0.14	n.a.
încălzire	49.1±0.06	98.3±0.06	141.4±0.09	179.9±0.12	214.1±0.22	
DIETILEN-GLICOL						
1M răcire	-	-	102.7±1.30	137.2±1.65	167.6±2.00	-13.36±0.47
1M încălzire	18.4±0.70	63.6±0.90	102.9±1.20	137.4±1.55	167.6±2.00	
2M răcire	-	-	53.7±2.62	82.7±1.60	107.7±1.84	-16.10±1.28
2M încălzire	-	21.2±1.11	54.4±1.37	83.2±1.60	107.7±1.84	
3M răcire	-	-	-	28.2±0.00	47.9±0.21	-19.29±2.93
3M încălzire	-	-	5.9±0.25	28.6±0.26	47.9±0.21	
4M răcire	-	-	-	-	3.4±0.22	-23.45±0.21
4M încălzire	-	-	-	-	3.4±0.22	

12.6. Comportamentul amestecurilor de trehaloză și soluție salină 0.9 % în izocor

Amestecurile folosite pentru realizarea acestor experimente au fost: soluție salină 0.9% și trehaloză 10%, 20%, 30%, 40% și 50%. Față de experimentele anterioare (unde solvații au fost sub formă lichidă), trehaloza utilizată a fost sub formă de pulbere, și utilizarea acestuia sub formă de procent masic, a fost mult mai ușor interpretabilă.[60].

Pentru a vizualiza datele ușor și complet, au fost introduse în Tabelul de mai jos.

În tabel regăsim, toate presiunile măsurate la temperaturile de echilibru pentru fiecare concentrație de soluție salină 0.9% și trehaloză studiată în parte.

Totodată, în tabel, marcat cu culoare verde, găsim intervalul recomandabil, în care utilizând acest amestec pentru conservarea diferitelor materii biologice, putem obține rezultate viabile, având în vedere experimentele validate până la momentul redactării prezentei lucrări.

Presiunea maximă până la care au fost obținute rezultate promițătoare până în acest moment este cea de [40] MPa. [7]

Tabel 8- Corelări temperatură-presiune la echilibru în izocor pentru diferite mixturi de trehaloză și soluție salină 0.9% [60]

Soluție	Presiune la -5°C [MPa]	Presiune la -10°C [MPa]	Presiune la -15°C [MPa]	Presiune la -20°C [MPa]	Presiune la -25°C [MPa]	Suprarăcire (°C)
Soluție salină 0.9% 0.308M						
răcire	48.8±0.05	98.1±0.09	141.3±0.07	179.7±0.09	214.4±0.14	n.a.
încălzire	49.1±0.06	98.3±0.06	141.4±0.09	179.9±0.12	214.1±0.22	
Trehaloză + soluție salină 0.9%						
10% răcire		85.4±0.00	127.2±1.41	164.0±1.74	196.4±2.54	-10.72±0.85
10% încălzire	38.6±0.57	86.2±0.91	127.9±1.27	164.4±1.65	196.4±2.54	
20% răcire		72.8±0.00	113.1±0.64	147.8±0.81	178.5±0.78	-11.24±1.76
20% încălzire	27.9±0.17	73.5±0.38	113.6±0.44	148.2±0.67	178.5±0.78	
30% răcire			96.3±0.00	128.4±1.51	156.9±1.25	-15.60±0.56
30% încălzire	14.4±0.84	58.4±1.01	95.9±1.27	128.6±1.40	156.9±1.25	
40% răcire		40.2±0.00	74.3±0.38	103.1±1.33	129.4±1.49	-14.20±1.76
40% încălzire	0.5±0.14	39.4±1.38	73.8±1.32	103.6±1.33	129.4±1.49	
50% răcire					165.8±0.71	-11.36±1.12
50% încălzire	15.9±0.76	65.3±0.84	105.8±0.65	138.5±0.58	165.8±0.71	

12.7. Comportamentul amestecurilor de trehaloză și apă distilată % în izocor

Amestecurile utilizate pentru acest experiment au fost: apă distilată și trehaloză 10%, 20%, 30%, 40% și 50%. Față de experimentele anterioare (unde solvații au fost sub formă lichidă), trehaloza utilizată a fost sub formă de pulbere, și utilizarea acestuia sub formă de procent masic, a fost mult mai ușor

Pentru a vizualiza datele ușor și complet, au fost introduse în Tabelul de mai jos.

În tabel regăsim, toate presiunile măsurate la temperaturile de echilibru pentru fiecare concentrație de apă distilată și trehaloză studiată în parte.

Totodată, în tabel, marcat cu culoare verde, găsim intervalul recomandabil, în care utilizând acest amestec pentru conservarea diferitelor materii biologice, putem obține rezultate viabile, având în vedere experimentele validate până la momentul redactării prezentei lucrări.

Presiunea maximă până la care au fost obținute rezultate promițătoare până în acest moment este cea de [40] MPa. [7]

Tabel 9- Corelări temperatură-presiune la echilibru în izocor pentru diferite mixturi de trehaloză și apă distilată [60]

Soluție	Presiune la -5°C [MPa]	Presiune la -10°C [MPa]	Presiune la -15°C [MPa]	Presiune la -20°C [MPa]	Presiune la -25°C [MPa]	Suprarăcire (°C)
Soluție salină 0.9% 0.308M						
răcire	48.8±0.05	98.1±0.09	141.3±0.07	179.7±0.09	214.4±0.14	n.a.
încălzire	49.1±0.06	98.3±0.06	141.4±0.09	179.9±0.12	214.1±0.22	
Trehaloză + apă distilată						
10% răcire		96.3±0.42	138.0±0.72	174.8±0.84	206.6±1.75	-10.20±1.23
10% încălzire	47.9±0.15	96.2±0.29	138.3±0.43	175.3±0.69	206.6±1.75	
20% răcire		81.9±0.57	122.8±1.27	157.9±1.70	187.6±3.34	-10.71±1.52
20% încălzire	36.5±0.53	83.0±0.90	123.5±1.00	158.6±1.39	187.6±3.34	
30% răcire		66.4±0.44	104.2±0.62	136.8±0.60	163.2±0.84	-9.96±0.10
30% încălzire	22.8±0.29	66.8±0.43	104.5±0.42	137.1±0.44	163.2±0.84	
40% răcire			90.9±0.48	121.9±0.55	147.1±1.34	-11.63±0.21
40% încălzire	13.0±0.22	55.1±0.29	91.3±0.35	122.2±0.49	147.1±1.34	
50% răcire					173.0±2.72	-13.48±1.00
50% încălzire	25.2±0.16	76.0±0.21	115.9±2.92	147.1±3.26	173.0±2.72	

13. Concluzii generale

Cercetările anterioare, găsite în literatură, au arătat că materia biologică a supraviețuit conservării până la temperaturi de aproximativ -4 °C și presiuni de 40 MPa [61][62][63][64][65][66][7][67], după care efectul dăunător al presiunii crescute, depășește efecte benefice ale stocării la temperaturi scăzute în absența gheții (Figura 110).[7]

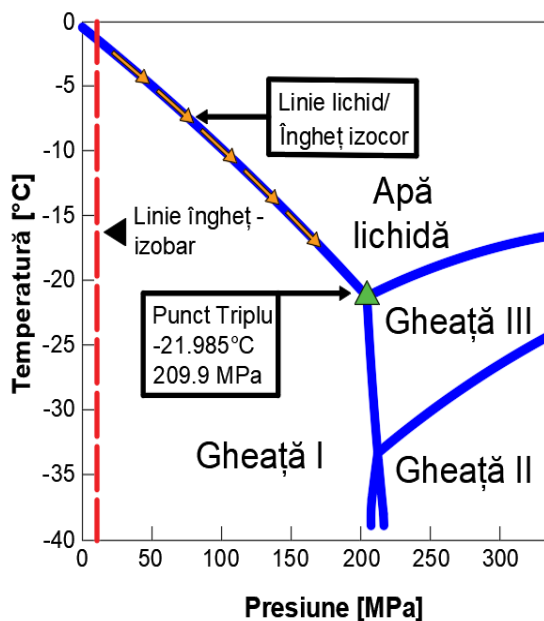


Figura 20-Diagrama de stare a apei in izocor[59]

Rezultatele prezentate în lucrare, au arătat că crioprotectanți uzuali, folosiți pentru conservare în izobar, ar putea fi utilizați sub punctul de îngheț al acestora (în izobar), pentru conservarea materiilor biologice. În timpul studiului, prin răcirea amestecurilor de crioprotectanți în diferite concentrații și soluție salină 0.9%, în majoritatea cazurilor au fost găsite intervale viabile, în domeniul de temperatură negativ < 0 [°C], în care presiunea nu ajunge la 40 MPa, evitându-se formarea gheții și efectul dăunător al presiunii crescute, în acest fel mărindu-se intervalul de temperatură viabil în supraviețuirea materiei biologice, chiar și vii.

Din câte știm, datele obținute sunt noi în literatura de specialitate, profilele termodinamice pentru amestecurile de glucoză și soluție salină 0.9%, glicerol și soluție salină 0.9%, dimetilsulfoxid și soluție salină 0.9%, etilenglicol și soluție salină 0.9%, dietilenglicol și soluție salină 0.9%, trehaloză și soluție salină 0.9%, trehaloză și apă distilată pot fi, așadar utilizate în realizarea de noi protocoale de crioconservare.

Având în vedere că toate studiile au fost realizate cu soluție salină 0.9% (exceptând amestecul de trehaloză și apă distilată), putem totodată afirma, că studiul prezintă și comportamentul acesteia din urmă, în timpul răcirii în izocor, amestecat cu diferiți agenți chimici.

În tabelul de mai jos au fost centralizate datele obținute pentru toate amestecurile cercetate în prezenta lucrare.

Tabel 10– Centralizatorul amestecurilor studiate și temperaturile minime viabile (presiune maxim 40 MPa)

Amestec	Temperatură la 40 MPa [°C]
Soluție salină 0.9% + 1M Glucoză	n.a
Soluție salină 0.9% + 2M Glucoză	n.a
Soluție salină 0.9% + 3M Glucoză	n.a
Soluție salină 0.9% + 4M Glucoză	n.a

Soluție salină 0.9% + 5M Glucoză	-5
Soluție salină 0.9% + 1M Glicerol	-8
Soluție salină 0.9% + 2M Glicerol	-11
Soluție salină 0.9% + 3M Glicerol	-16.5
Soluție salină 0.9% + 4M Glicerol	-24
Soluție salină 0.9% + 5M Glicerol	<-25
Soluție salină 0.9% + 1M DMSO	-7
Soluție salină 0.9% + 2M DMSO	-13
Soluție salină 0.9% + 3M DMSO	-20.5
Soluție salină 0.9% + 4M DMSO	<-25
Soluție salină 0.9% + 5M DMSO	<<-25
Soluție salină 0.9% + 1M Etilenglicol	-7.2
Soluție salină 0.9% + 2M Etilenglicol	-10
Soluție salină 0.9% + 3M Etilenglicol	-14.5
Soluție salină 0.9% + 4M Etilenglicol	-20.5
Soluție salină 0.9% + 5M Etilenglicol	<-25
Soluție salină 0.9% + 1M Dietilenglicol	-7.2
Soluție salină 0.9% + 2M Dietilenglicol	-12.9
Soluție salină 0.9% + 3M Dietilenglicol	-22.8
Soluție salină 0.9% + 4M Dietilenglicol	<-25
Soluție salină 0.9% + 5M Dietilenglicol	<<-25
Soluție salină 0.9% + 10% Trehaloză	-5.1
Soluție salină 0.9% + 20% Trehaloză	-6.2
Soluție salină 0.9% + 30% Trehaloză	-7.9
Soluție salină 0.9% + 40% Trehaloză	-10.1
Soluție salină 0.9% + 50% Trehaloză	-7.7
Apă distilată + 10% Trehaloză	n.a
Apă distilată + 20% Trehaloză	-5.2
Apă distilată + 30% Trehaloză	-6.9
Apă distilată + 40% Trehaloză	-8.1
Apă distilată + 50% Trehaloză	-6.5

La toate amestecurile studiate, exceptând amestecurile de trehaloză, a fost observat un comportament asemănător. Odată cu creșterea concentrației de soluție crioprotectantă studiată în componența amestecului, s-a ajuns la o creștere a osmolarității și implicit la o scădere a punctului de îngheț.

Acest comportament poate fi explicat prin faptul că soluțiile crioprotectante împiedică cristalizarea apei prin formarea unui microambalaj molecular în jurul moleculelor de apă, ceea ce reduce tendința apei de a forma cristale la temperaturi scăzute. Cu toate acestea, cu cât crește

concentrația soluției crioprotectante, cu atât crește și numărul de molecule crioprotectante din soluție, iar aceasta duce la o creștere a osmolarității și implicit la o scădere a punctului de îngheț. Rezultatele obținute în acest studiu deschid noi perspective în ceea ce privește conservarea materiilor biologice la temperaturi scăzute sub punctul de îngheț, în volum constant, introducând pentru prima oară, corelat cu literatura de specialitate intervale viabile de studiu. Chiar dacă continuarea acestora trebuie tratată din multe alte perspective, cum ar fi cea toxicologică sau componența chimică a acestora.

Profilele termodinamice obținute în acest studiu pot fi utilizate pentru optimizarea condițiilor de conservare și îmbunătățirea eficienței metodelor de crioconservare. Totodată aceste rezultate pot contribui la dezvoltarea de noi protocoale de conservare pentru o varietate de materii biologice, cu implicații semnificative pentru domeniul ingineriei și biotehnologiei.

Am putea adăuga punctual câteva arii în care pot fi folosite rezultatele:

- Dezvoltarea de produse alimentare mai sigure - Studiul acestor amestecuri poate ajuta la dezvoltarea de produse alimentare și medicamente care să fie mai sigure pentru consumatori, prin utilizarea unor combinații eficiente de conservanți.
- Reducerea pierderilor din industria alimentară și farmaceutică - Datorită studiului amestecurilor de conservanți și soluție salină 0.9% în sisteme izocore, industria alimentară și farmaceutică poate reduce pierderile de produse care se degradează din cauza contaminării, ceea ce poate duce la economii semnificative
- Contribuția la dezvoltarea de politici și standarde - Studiul amestecurilor de conservanți și soluție salină 0.9% în sisteme izocore poate contribui la dezvoltarea de politici și standarde privind siguranța alimentară și farmaceutică, asigurând astfel o protecție mai bună pentru consumatori
- Dezvoltarea de produse mai naturale și mai sănătoase - Studiul amestecurilor de conservanți și soluție salină 0.9% în sisteme izocore poate ajuta la identificarea de combinații eficiente de conservanți naturali și soluție salină, care să permită dezvoltarea de produse mai naturale și mai sănătoase

Studiul amestecurilor de soluții crioconservante și soluție salină 0.9% în sisteme izocore este un domeniu de cercetare cu o importanță crucială pentru diferite aplicații, de la conservarea alimentelor și a medicamentelor până la depozitarea celulelor și țesuturilor în medicina regenerativă. Cercetările din acest domeniu au dus la dezvoltarea de soluții crioconservante eficiente și mai sigure, care protejează mostrele biologice împotriva degradării și pierderii funcționalității în timp. În plus, aceste cercetări au arătat că soluțiile crioconservante pot fi utilizate cu succes în diferite aplicații, cum ar fi depozitarea celulelor și țesuturilor pentru utilizare ulterioară în medicina regenerativă sau conservarea vaccinurilor și medicamentelor pentru a le face mai accesibile în zonele în care resursele sunt limitate. Studiile în izocor contribuie la identificarea compoziției și efectelor amestecurilor agenților crioconservanți și la dezvoltarea de amestecuri optimizate pentru diferite aplicații. Mai mult, studiile din acest domeniu pot ajuta la dezvoltarea de tehnologii mai avansate pentru depozitarea și conservarea mostrelor biologice și a altor produse sensibile la temperatură, cu efecte semnificative asupra medicinei și industriei alimentare. În plus, aceste cercetări pot aduce noi perspective asupra dezvoltării de soluții

sustenabile și ecologice pentru depozitarea produselor și conservarea resurselor naturale. Cercetarea în domeniul amestecurilor de soluții crioconservante în sisteme izocore este esențială pentru dezvoltarea de soluții inovative și eficiente pentru conservarea și protejarea produselor sensibile la temperatură, cu beneficii semnificative pentru medicină, industria alimentară și mediul înconjurător. Aceste cercetări pot aduce noi perspective și contribuie la dezvoltarea de soluții mai sustenabile și mai eficiente pentru depozitarea și conservarea produselor, cu efecte semnificative asupra societății și mediului înconjurător. Studiile au arătat că, în funcție de concentrația și combinația utilizată, aceste amestecuri pot avea efecte diferite asupra supraviețuirii și funcționalității celulelor și țesuturilor crioconservate. De exemplu, s-a constatat că DMSO și glicerolul sunt eficiente în protecția celulelor și țesuturilor împotriva înghețului, în timp ce glucoza și trehaloza pot îmbunătăți viabilitatea celulară prin reducerea stresului osmotic. Totodată, cercetările recente au arătat că adăugarea unor antioxidanți și agenți de protecție celulară, cum ar fi vitamina C sau N-acetilcisteina, la amestecurile de soluție salină și crioconservante poate îmbunătăți în continuare viabilitatea celulară și țesutul crioconservat.

În concluzie, studiul amestecurilor de soluție salină 0.9% cu crioconservante reprezintă o arie importantă de cercetare pentru știința medicală și farmaceutică, cu potențiale implicații semnificative în dezvoltarea de soluții de crioconservare mai bune și mai eficiente pentru utilizare clinică și terapeutică.

14. Contribuții personale

În timpul cercetărilor și experimentelor ce stau la baza redactării acestei lucrări, consider că am avut următoarele contribuții personale:

- Cercetarea bibliografică detaliată atât din perspectiva numărului mare de publicații evaluate cât și din punct de vedere calitativ. Acest lucru a condus la realizarea unui stadiu actual al cunoașterii foarte bine elaborat și care totodată a fost și publicat într-un jurnal de profil: *Cryoletters*, ISSN - 0143-2044.
- Modelarea matematică elaborată în cadrul lucrării pornește de la o serie de principii fundamentale care stau la baza fenomenelor de crioconservare în sistemele izocore și pentru ca mai apoi acestea să fie observate și în cadrul determinărilor practice.
- Modelarea unor fenomene care au loc în interiorul unui reactor izocoric, cu ajutorul unui pachet software de analiză, rezolvare și simulare cu elemente finite pentru diverse aplicații de fizică și inginerie, în special fenomene cuplate și multifizică. Lucrare inițială publicată în *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, ISSN - 1757-899X
- Participarea ca membru și implicarea în mod activ într-un proiect național câștigat în competiție, cod proiect PN-III-P4-ID-PCE-2020-1706 Contract nr. PCE2302021, intitulat după titlul prezentei teze: "Studiul profilelor termodinamice în regim izocoric pentru cele mai importante substanțe crioprotectante", în cadrul tipului de proiect: Proiecte de cercetare exploratorie.
- Dezvoltarea și extinderea unui domeniu nou de cercetare în cadrul Departamentului de Instalații pentru Construcții prin realizarea unui stand experimental, în laboratorul de

Instalații frigorifice și criogenice. Cu ajutorul acestui stand se pot realiza și extinde în continuare cercetări și de asemenea standul poate fi utilizat în scop didactic pentru studenți iar cu echipamentele și instrumentele de măsură portabile pot fi realizate măsurători în afara laboratorului.

- Pe baza rezultatelor experimentale au fost propuse ecuații polinomiale de gradul 2 pentru fiecare substanță și pentru fiecare concentrație analizată. Cu ajutorul acestor ecuații noi introduse se pot face ușor interpolări pentru a se afla valori intermediare ale presiunii sau chiar se pot propune și apoi confirma experimental valori din afara intervalului.
- Participarea și implicarea în mod activ în redactarea și recenzarea articolelor trimise spre publicare la jurnale științifice.
- Contribuții la extinderea cunoașterii experimentale pe baza măsurătorilor de temperatură-presiune pentru unele din cele mai utilizate substanțe crioconservante. Publicarea a două lucrări în domeniu, în jurnalele *Biochemical and biophysical research communications*, ISSN 0006-291X și *Cryobiology*, ISSN - 0011-2240.
- Propunerea unor ecuații polinomiale pe baza liniilor de trend, pentru fiecare substanță analizată și pentru fiecare concentrație analizată.
- Participarea activă la studiul fenomenului de nucleare aleatorie în izocor. Publicare articol (co-autor) în jurnalul *AIP Advances*, ISSN 2158-3226.
- Participarea activă la studiul conservării fructelor în izocor. Publicare articol (co-autor) în jurnalul *Heliyon*, ISSN 2405-8440.
- Propun în continuare următoarele direcții de studiu, având în vedere experiența relizării prezentei lucrări :
 - o Analiza comportamentului substanțelor studiate la temperaturi criogenice
 - o Analiza comportamentului acestor substanțe și pentru alte concentrații
 - o Utilizarea unor rezultate din cadrul prezentei teze, în experimente cu material biologic, pentru investigarea comparativă material biologic proaspăt-material biologic conservat

Concluzionând succint, prin experimentele realizate și cuprinse în prezenta lucrare, am reușit să măsurăm și ulterior să prezentăm grafic profilele termodinamice pentru 5 amestecuri de crioconservanți și soluție salină 0.9% alături de un amestec de crioconservant și apă distilată. Metoda, și mai ales intervalul de temperatură studiat pentru realizarea profilelor termodinamice, cuprinde intervale din studii realizate până în acest moment în domeniu [68], [69], [64], [7], [66], [62], [63], [61].

Metoda utilizată, pentru determinarea profilelor, este acceptată și utilizată în practica comună din acest domeniu [8], [70], [71], [65].

Unicitatea acestei lucrări constă în uniformizarea profilelor atât din punct de vedere grafic cât și din punct de vedere al temperaturilor studiate, și prezentarea acestora într-un mod simplu și concis, pentru ca în practica experimentală, viitorii cercetători ce vor dori să conducă experimente în domeniu, să găsească informațiile ușor, rapid și grupate într-o singură lucrare.

15. Referințe

- [1] F. Chiriac, *Instalații frigorifice*, Plan editu. Bucuresti: Editura didactică și pedagogică, 1981.
- [2] R. H. D. Zemansky, Mark W., *Heat and Thermodynamics An intermediate textbook*, 7th ed. NY: McGraw Hill.
- [3] G. Beșchea, Ștefan-ioan Câmpean, M. Tăbăcaru, B. Vuțoiu, A. Șerban, and G. Năstase, "A STATE OF THE ART REVIEW OF ISOCHORIC CRYOPRESERVATION AND CRYOPROTECTANTS," *CryoLetters*, vol. 3, no. 4, pp. 189–199, 2022.
- [4] M.-W. Merriam-Webster.com Dictionary, "Isochor." <https://www.merriam-webster.com/dictionary/isochor> (accessed Oct. 25, 2020).
- [5] D. Knorr, O. Schlueter, and V. Heinz, "Impact of high hydrostatic pressure on phase transitions of foods," *Food Technol.*, vol. 52, no. 9, pp. 42–45, 1998.
- [6] B. Rubinsky, P. A. P. A. Perez, and M. E. M. E. Carlson, "The thermodynamic principles of isochoric cryopreservation," *Cryobiology*, vol. 50, no. 2, pp. 121–138, 2005, doi: 10.1016/j.cryobiol.2004.12.002.
- [7] L. Wan *et al.*, "Preservation of rat hearts in subfreezing temperature isochoric conditions to – 8 °C and 78 MPa," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 496, no. 3, pp. 852–857, 2018, doi: 10.1016/j.bbrc.2018.01.140.
- [8] M. J. Powell-Palm, A. Koh-Bell, and B. Rubinsky, "Isochoric conditions enhance stability of metastable supercooled water," *Appl. Phys. Lett.*, vol. 116, no. 12, p. <https://doi.org/10.1063/1.5145334>, 2020, doi: 10.1063/1.5145334.
- [9] Y. Zhang *et al.*, "Isochoric vitrification: An experimental study to establish proof of concept," *Cryobiology*, vol. 83, no. May, pp. 48–55, 2018, doi: 10.1016/j.cryobiol.2018.06.005.
- [10] B. R. Gabriel Năstase, Alexandru Șerban, "Isochoric Cryopreservation for Tissue Engineering," 2016.
- [11] H. A. (eds) Karow AM, Abouna GJ, *Organ Preservation for Transplantation*. Boston: Little Brown, 1974.
- [12] B. Fuller and S. Paynter, "Fundamentals of cryobiology in reproductive medicine," *Reprod. Biomed. Online*, vol. 9, no. 6, pp. 680–691, 2004, doi: 10.1016/S1472-6483(10)61780-4.
- [13] S. Chen, J. Ren, and R. Chen, "5.11 - Cryopreservation and Desiccation Preservation of Cells," in *Comprehensive Biotechnology (Third Edition)*, Third Edit., M. Moo-Young, Ed. Oxford: Pergamon, 2019, pp. 157–166.
- [14] J. K. Peter Atkins, Julio De Paula, *Atkins' physical chemistry*, 11th ed. Oxford University Press, 2017.
- [15] F. Franks, "Investigations into the freezing of plants (translated abstracts from a book by Hans Molisch, 1897)," *Cryo-letters*, vol. v. 2. 1981.
- [16] U. S. W. Bureau, *Bulletin*, no. nr. 11. U.S. Government Printing Office, 1894.
- [17] E. Woods, "8. Cryobiology: Past, present and future," *Cryobiology*, vol. 71, no. 1, pp. 166–167, 2015, doi: <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2015.05.014>.
- [18] M. J. Ashwood-Smith, "Mechanisms of cryoprotectant action.," *Symp. Soc. Exp. Biol.*, vol. 41, pp. 395–406, 1987.
- [19] R. Nai-hsien and P. Chao, "Cryopreservation of Finfish and Shellfish Sperms," *J. Taiwan Fish. Res.*, vol. 4, no. 2, pp. 157–170, 1996.
- [20] G. D. Elliott, S. Wang, and B. J. Fuller, "Cryoprotectants: A review of the actions and applications of cryoprotective solutes that modulate cell recovery from ultra-low temperatures," *Cryobiology*, vol. 76, pp. 74–91, 2017, doi: 10.1016/j.cryobiol.2017.04.004.
- [21] R. Raju, S. J. Bryant, B. L. Wilkinson, and G. Bryant, "The need for novel cryoprotectants and cryopreservation protocols: Insights into the importance of biophysical investigation and cell permeability," *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.*, vol. 1865, no. 1, p. 129749, 2021, doi:

- 10.1016/j.bbagen.2020.129749.
- [22] G. and C. N. S. Achari, "Action of Dimethyl Sulfoxide on finkleman preparation," *Jap J. Pharma.* 18, 86-88, pp. 2-4, 1967.
- [23] S. Bhattacharya, "Cryoprotectants and Their Usage in Cryopreservation Process," *Cryopreserv. Biotechnol. Biomed. Biol. Sci.*, 2018, doi: 10.5772/intechopen.80477.
- [24] R. N. Havemeyer, "Freezing Point Curve of Dimethyl Sulfoxide—Water Solutions," *J. Pharm. Sci.*, vol. 55, no. 8, pp. 851-853, 1966, doi: <https://doi.org/10.1002/jps.2600550822>.
- [25] D. H. Rasmussen and A. P. MacKenzie, "Phase diagram for the system water-dimethylsulphoxide [6]," *Nature*, vol. 220, no. 5174, pp. 1315-1317, 1968, doi: 10.1038/2201315a0.
- [26] B. Kirchner and M. Reiher, "The secret of dimethyl sulfoxide-water mixtures. A quantum chemical study of 1DMSO-nwater clusters," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 124, no. 21, pp. 6206-6215, 2002, doi: 10.1021/ja017703g.
- [27] K. Newell and Z. Ltd, "The Effects of Water on DMSO and Effective Hydration Measurement," *Ziath Stud.*, no. 05598930, pp. 1-5, 2006, [Online]. Available: http://www.ziath.com/images/pdf/DMSO_The_effects_of_water_and_hydration_measurement.pdf.
- [28] C. Miner and Dalton NN, "Glycerine: An Overview," *Chem Soc Monogr.* 1953, vol. 117, no. 212, pp. 1-27, 1953, [Online]. Available: <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Glycerine+:+an+overview#0>.
- [29] S. Fukusako and M. Yamada, "Freezing characteristics of ethylene glycol solution," *Wärme-und Stoffübertragung*, vol. 24, no. 5, pp. 303-309, 1989, doi: 10.1007/BF01597235.
- [30] S. Tsai, G. Chong, P.-J. Meng, and C. Lin, "Sugars as supplemental cryoprotectants for marine organisms," *Rev. Aquac.*, vol. 10, no. 3, pp. 703-715, Aug. 2018, doi: <https://doi.org/10.1111/raq.12195>.
- [31] J. P. Costanzo, R. E. Lee, and P. H. Lortz, "Glucose concentration regulates freeze tolerance in the wood frog *Rana sylvatica*," *J. Exp. Biol.*, vol. 181, pp. 245-255, 1993.
- [32] Z. Hubálek, "Protectants used in the cryopreservation of microorganisms," *Cryobiology*, vol. 46, no. 3, pp. 205-229, 2003, doi: [https://doi.org/10.1016/S0011-2240\(03\)00046-4](https://doi.org/10.1016/S0011-2240(03)00046-4).
- [33] S. C. Keith, "FACTORS INFLUENCING THE SURVIVAL OF BACTERIA AT TEMPERATURES IN THE VICINITY OF THE FREEZING POINT OF WATER," *Science (80-)*, vol. 37, no. 962, pp. 877 LP - 879, Jun. 1913, doi: 10.1126/science.37.962.877.
- [34] P. R. M. Steele, "Prevention of low temperature denaturation injury in T4Bo phage by low concentrations of traditional cryoprotective additives," *J. Hyg. (Lond)*, vol. 76, no. 3, pp. 453-458, 1976, doi: 10.1017/S0022172400055388.
- [35] J. R. POSTGATE and J. R. HUNTER, "On the survival of frozen bacteria," *J. Gen. Microbiol.*, vol. 26, pp. 367-378, Nov. 1961, doi: 10.1099/00221287-26-3-367.
- [36] E. D. Meyer, N. A. Sinclair, and B. Nagy, "Comparison of the survival and metabolic activity of psychrophilic and mesophilic yeasts subjected to freeze-thaw stress," *Appl. Microbiol.*, vol. 29, no. 6, pp. 739-744, 1975, [Online]. Available: <http://europepmc.org/abstract/MED/1171652>.
- [37] L. J. Schep, R. J. Slaughter, W. A. Temple, and D. M. G. Beasley, "Diethylene glycol poisoning," *Clin. Toxicol.*, vol. 47, no. 6, pp. 525-535, 2009, doi: 10.1080/15563650903086444.
- [38] B. Tohidi, A. Chapoy, and J. Yang, "Developing a hydrate-monitoring system," *SPE Proj. Facil. Constr.*, vol. 4, no. 1, 2009, doi: 10.2118/125130-pa.
- [39] R. K. Ibrahim, M. Hayyan, M. A. Alsaadi, S. Ibrahim, A. Hayyan, and M. A. Hashim, "Diethylene glycol based deep eutectic solvents and their physical properties," *Stud. Univ. Babeş-Bolyai Chem.*, vol. 62, no. 4, pp. 433-450, 2017, doi: 10.24193/subbchem.2017.4.37.
- [40] S. S. Chadwick, "Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry," *Ref. Serv. Rev.*, vol. 16, no. 4, pp. 31-34, Jan. 1988, doi: 10.1108/eb049034.

- [41] R. Sharma, R. Bhardwaj, A. K. Thukral, N. Handa, R. Kaur, and V. Kumar, "Chapter 17 - Osmolyte Dynamics: New Strategies for Crop Tolerance to Abiotic Stress Signals," P. Ahmad and S. B. T.-E. T. and M. of C. S. T. Rasool, Eds. San Diego: Academic Press, 2014, pp. 405–430.
- [42] C. Coutinho, E. Bernardes, D. Félix, and A. D. Panek, "Trehalose as cryoprotectant for preservation of yeast strains," *J. Biotechnol.*, vol. 7, no. 1, pp. 23–32, 1988, doi: [https://doi.org/10.1016/0168-1656\(88\)90032-6](https://doi.org/10.1016/0168-1656(88)90032-6).
- [43] I. S. Bhandal, R. M. Hauptmann, and J. M. Widholm, "Trehalose as Cryoprotectant for the Freeze Preservation of Carrot and Tobacco Cells," *Plant Physiol.*, vol. 78, no. 2, pp. 430–432, Nov. 1985, [Online]. Available: <http://www.jstor.org/stable/4269356>.
- [44] M. Suksai and K. Dhanaworavibul, "Effects of trehalose and sucrose on human sperm motility, vitality and morphology after cryopreservation," *J. Heal. Sci. Med. Res.*, vol. 37, no. 2, pp. 101–107, 2019, doi: 10.31584/jhsmr.201945.
- [45] T. Chen, A. Fowler, and M. Toner, "Literature review: supplemented phase diagram of the trehalose-water binary mixture.," *Cryobiology*, vol. 40, no. 3, pp. 277–282, May 2000, doi: 10.1006/cryo.2000.2244.
- [46] B. Wowk, "How cryoprotectants work," *Cryonics*, vol. 3, p. 28, 2007.
- [47] P. W. Bridgman, "Water, in the Liquid and Five Solid Forms, under Pressure," *Proc. Am. Acad. Arts Sci.*, vol. 47, no. 13, pp. 441–558, Nov. 1912, doi: 10.2307/20022754.
- [48] J. A. Preciado and B. Rubinsky, "The Fundamentals of Isochoric Freezing and its Role in the Cryopreservation of Biological Materials.," UNIVERSITY OF CALIFORNIA, BERKELEY, 2007.
- [49] K. G. Denbigh and K. G. Denbigh, *The Principles of Chemical Equilibrium: With Applications in Chemistry and Chemical Engineering*. Cambridge University Press, 1981.
- [50] P. D. Sanz, L. Otero, C. de Elvira, and J. A. Carrasco, "Freezing processes in high-pressure domains," *Int. J. Refrig.*, vol. 20, no. 5, pp. 301–307, 1997, doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-7007\(97\)00027-3](https://doi.org/10.1016/S0140-7007(97)00027-3).
- [51] V. E. Chizhov and O. V Nagornov, "Thermodynamic properties of ice, water and their mixture under high pressure," *Glaciers-ocean-atmosph. Interact.*, vol. 463, no. 208, pp. 463–470, 1991.
- [52] L. Ter Minassian, P. Pruzan, and A. Soulard, "Thermodynamic properties of water under pressure up to 5 kbar and between 28 and 120 °C. Estimations in the supercooled region down to –40 °C," *J. Chem. Phys.*, vol. 75, pp. 3064–3072, 1981.
- [53] Bolz, R.E. (1970). *CRC Handbook of Tables for Applied Engineering Science (2nd ed.)*. CRC Press. <https://doi.org/10.1201/9781315214092>. .
- [54] M. J. Powell-Palm, J. Aruda, and B. Rubinsky, "Thermodynamic Theory and Experimental Validation of a Multiphase Isochoric Freezing Process," *J. Biomech. Eng.*, vol. 141, no. 8, pp. 1–8, 2019, doi: 10.1115/1.4043521.
- [55] Z. Li *et al.*, "Tensile properties of 316L stainless steels made by laser powder-bed-fusion additive manufacturing," 2016.
- [56] Y. Zhao, M. J. Powell-Palm, J. Wang, C. Bilbao-Sainz, T. McHugh, and B. Rubinsky, "Analysis of global energy savings in the frozen food industry made possible by transitioning from conventional isobaric freezing to isochoric freezing," *Renew. Sustain. Energy Rev.*, vol. 151, 2021, doi: 10.1016/j.rser.2021.111621.
- [57] P. K. Solanki and Y. Rabin, "Thermo-mechanics aspects of isochoric cryopreservation: A new modeling approach and comparison with experimental data," *PLoS One*, vol. 17, no. 4 April, pp. 1–25, 2022, doi: 10.1371/journal.pone.0267852.
- [58] High Pressure Equipment Company, "High Pressure Equipment," no. p 2. 2955 W. 17th Street • Erie, PA 16505 U.S.A, pp. 1–12, [Online]. Available: <https://www.highpressure.com/>.
- [59] G.-A. Beșchea, Ștefan-I. Câmpean, M.-B. Tăbăcaru, A. Șerban, B. Rubinsky, and G. Năstase, "Glucose and glycerol temperature-pressure correlations for the design of cryopreservation protocols in an isochoric system at subfreezing temperature," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 559, pp. 42–47, 2021, doi: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2021.04.084>.

- [60] G. A. Beșchea *et al.*, “Temperature-pressure correlations of cryoprotective additives for the design of constant volume cryopreservation protocols,” *Cryobiology*, vol. 108, no. July, pp. 42–50, 2022, doi: 10.1016/j.cryobiol.2022.08.001.
- [61] H. Mikus, A. Miller, G. Nastase, A. Serban, M. Shapira, and B. Rubinsky, “The nematode *Caenorhabditis elegans* survives subfreezing temperatures in an isochoric system,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 477, no. 3, pp. 401–405, 2016, doi: 10.1016/j.bbrc.2016.06.089.
- [62] C. Bilbao-Sainz *et al.*, “Preservation of Tilapia (*Oreochromis aureus*) Fillet by Isochoric (Constant Volume) Freezing,” *J. Aquat. Food Prod. Technol.*, vol. 29, no. 7, pp. 1–12, 2020, doi: 10.1080/10498850.2020.1785602.
- [63] G. Năstase, C. Lyu, G. Ukpai, A. Șerban, and B. Rubinsky, “Isochoric and isobaric freezing of fish muscle,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 485, no. 2, pp. 279–283, 2017, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.02.091.
- [64] M. J. Powell-Palm, J. Preciado, C. Lyu, and B. Rubinsky, “*Escherichia coli* viability in an isochoric system at subfreezing temperatures,” *Cryobiology*, vol. 85, no. August, pp. 17–24, 2018, doi: 10.1016/j.cryobiol.2018.10.262.
- [65] M. J. Powell-Palm, Y. Zhang, J. Aruda, and B. Rubinsky, “Isochoric conditions enable high subfreezing temperature pancreatic islet preservation without osmotic cryoprotective agents,” *Cryobiology*, vol. 86, no. December 2018, pp. 130–133, Feb. 2019, doi: 10.1016/j.cryobiol.2019.01.003.
- [66] J. Preciado and B. Rubinsky, “The effect of isochoric freezing on mammalian cells in an extracellular phosphate buffered solution,” *Cryobiology*, vol. 82, no. October 2017, pp. 155–158, 2018, doi: 10.1016/j.cryobiol.2018.04.004.
- [67] D. G. Whittingham, S. P. Leibo, and P. Mazur, “Survival of mouse embryos frozen to -196° and -269°C ,” *Science (80-.)*, vol. 178, no. 4059, pp. 411–414, 1972, doi: 10.1126/science.178.4059.411.
- [68] M. J. Powell-Palm and B. Rubinsky, “A shift from the isobaric to the isochoric thermodynamic state can reduce energy consumption and augment temperature stability in frozen food storage,” *J. Food Eng.*, vol. 251, no. January, pp. 1–10, 2019, doi: 10.1016/j.jfoodeng.2019.02.001.
- [69] C. Bilbao-Sainz *et al.*, “Preservation of sweet cherry by isochoric (constant volume) freezing,” *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, vol. 52, no. November 2018, pp. 108–115, 2019, doi: 10.1016/j.ifset.2018.10.016.
- [70] C. Bilbao-sainz *et al.*, “Original article Preservation of spinach by isochoric (constant volume) freezing,” pp. 2141–2151, 2020, doi: 10.1111/ijfs.14463.
- [71] C. Bilbao-sainz *et al.*, “Preservation of grape tomato by isochoric freezing,” *Food Res. Int.*, vol. 143, no. March, p. 110228, 2021, doi: 10.1016/j.foodres.2021.110228.

"