

Trabajo Fin de Grado

Ingeniería Aeroespacial

Recalentamiento de material criopreservado mediante Ultrasonidos Focalizados de Alta Intensidad

Autor: José Cava Pérez

Tutor: Ramón de Jesús Risco Delgado

Dpto. Física Aplicada III
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Universidad de Sevilla

Sevilla, 2019



Trabajo Fin de Grado
Ingeniería Aeroespacial

Recalentamiento de material criopreservado mediante Ultrasonidos Focalizados de Alta Intensidad

Autor:
José Cava Pérez

Tutor:
Ramón de Jesús Risco Delgado

Dpto. Física Aplicada III
Escuela Técnica Superior de Ingeniería
Universidad de Sevilla
Sevilla, 2019

Trabajo Fin de Grado: Recalentamiento de material criopreservado mediante Ultrasonidos Focalizados de Alta Intensidad

Autor: José Cava Pérez

Tutor: Ramón de Jesús Risco Delgado

El tribunal nombrado para juzgar el proyecto arriba indicado, compuesto por los siguientes miembros:

Presidente:

Vocales:

Secretario:

Acuerdan otorgarle la calificación de:

Resumen

El objetivo principal de este proyecto es el diseño completo y construcción de un sistema de recalentamiento para material biológico criopreservado. Dicho calentamiento ha de ser rápido y homogéneo para así poder garantizar la integridad de la muestra una vez recalentada desde temperaturas criogénicas. Es por esta razón que se usará la técnica HIFU en el desarrollo del sistema. Los HIFU (Ultrasonidos Focalizados de Alta Intensidad) permiten mediante la focalización de ondas de presión la transmisión de potencia sonora que, al llegar a la muestra se traducirá en calor.

En el proyecto se expondrán cuáles han sido las vías principales para conseguir la creación del sistema. Asimismo, se remarcará cuál de todas esas vías ha sido la óptima y se expondrá su desarrollo.

Posteriormente, tras la realización del sistema HIFU, se realizarán los experimentos correspondientes en el laboratorio para así comprobar el correcto funcionamiento del sistema, así como la premisa fundamental de este proyecto.

Abstract

The main objective of this project is the complete design and construction of a reheating system for cryopreserved biological material. This heating must be fast and homogeneous in order to guarantee the integrity of the sample once reheated from cryogenic temperatures. It is for this reason that the HIFU technique will be used in the development of the system. The HIFU (High Intensity Focused Ultrasound) allows the transmission of sound power through focusing pressure waves which, when arriving at the sample, will translate into heat.

The project will expose which have been the main ways to achieve the creation of the system. Likewise, it will be highlighted which of these routes has been the optimum and its development will be exposed.

Subsequently, after the completion of the HIFU system, the corresponding experiments will be carried out in the laboratory to verify the correct functioning of the system as well as the fundamental premise of this project.

Índice

Resumen	7
Abstract	8
Índice	9
Índice de Tablas	11
Índice de Figuras	12
1 Introducción	14
2 Estado del Arte	16
2.1 <i>Criopreservación</i>	16
2.2 <i>Condiciones de temperatura para la criopreservación</i>	16
2.3 <i>Problemáticas</i>	17
2.4 <i>Técnicas usadas en criopreservación</i>	19
2.4.1 Congelación	19
2.4.2 Recalentamiento	20
2.5 <i>HIFU: Ultrasonidos focalizados de alta intensidad</i>	23
2.5.1 Ultrasonidos	23
2.5.2 Piezoelectricidad	24
2.5.3 Transductores esféricos: Geometría	25
2.5.4 Mecanismo de acción del HIFU	26
2.5.5 Usos del HIFU en la actualidad	27
3 Motivación y objetivos	30
3.1 <i>Motivación</i>	30
3.2 <i>Objetivos</i>	31
4 Elaboración del sistema: Evaluación de alternativas	33
4.1 <i>Introducción</i>	33
4.2 <i>Esquema básico del sistema</i>	33
4.3 <i>Transductores</i>	34
4.3.1 Transductor PZ52	34
4.3.2 Transductor PZT-8	38
4.3.3 Comparación entre ambos transductores	39
4.4 <i>Soportes</i>	40
4.4.1 Soporte cilíndrico con hueco simple	40
4.4.2 Soporte cónico	43
4.4.3 Soporte definitivo	47
4.5 <i>Etapa amplificadora</i>	50
4.5.1 Generador de señales ultrasónico	50
4.5.2 Amplificador lineal	51
4.5.3 Circuito amplificador de Sterling	53
4.5.4 Circuito de Sterling modificado	56
4.5.5 Circuito definitivo	59
4.6 <i>Resultado final del sistema</i>	63

5	Uso experimental del sistema y resultados prácticos	65
5.1	<i>Introducción</i>	65
5.2	<i>Medición de ΔT usando un phantom como muestra</i>	66
5.3	<i>Medición del ΔT usando material biológico a temperatura ambiente</i>	67
5.4	<i>Medición del ΔT usando material biológico a baja temperatura</i>	73
6	Conclusiones y líneas futuras	77
	Referencias	79
	Anexo 1: Manual de uso del sistema de calentamiento HIFU	81

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1 – DATOS TRANSDUCTOR PZ52	36
TABLA 2 – DATOS TRANSDUCTOR PZT-8.....	39
TABLA 3 – VENTAJAS E INCONVENIENTES DEL SOPORTE CILÍNDRICO HUECO.....	43
TABLA 4 – VENTAJAS E INCONVENIENTES DEL SOPORTE CÓNICO.....	46
TABLA 5 – ESPECIFICACIÓN AMPLIFICADOR RM KL 203-P.....	51
TABLA 6 – ELEMENTOS PRINCIPALES EL CIRCUITO DE STERLING	54
TABLA 7 – ELEMENTOS AUXILIARES DEL CIRCUITO	55
TABLA 8 – ELEMENTOS AUXILIARES DEL CIRCUITO	72

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1 – PROBABILIDAD DE FORMACIÓN DE NÚCLEOS Y CRECIMIENTO EN FUNCIÓN DE LA TEMPERATURA Y CONCENTRACIÓN DE CRIOPROTECTOR	18
FIGURA 2 – CLASIFICACIÓN DE LAS ONDAS DE PRESIÓN SEGÚN LA FRECUENCIA	23
FIGURA 3 – EFECTO PIEZOELECTRICO EN EL CUARZO	24
FIGURA 4 – REPRESENTACIÓN GRÁFICA DE UN CASQUETE ESFÉRICO	25
FIGURA 5 – TRANSDUCTORES DE ULTRASONIDOS REALES	25
FIGURA 6 – PRINCIPIO DE ACCIÓN DEL HIFU: LA GENERACIÓN DE ONDAS ULTRASÓNICAS FOCALIZADAS PRODUCE UN INCREMENTO DE DENSIDAD ENERGÉTICA EN EL ÁREA FOCAL SIN MODIFICACIONES EN EL TEJIDO CIRCUNDANTE	26
FIGURA 7 – DIAGRAMA CON DISTINTAS POSIBILIDADES DE COLOCACIÓN DEL FOCO MEDIANTE EL CONTROL DE LA FASE Y AMPLITUD DE LA SEÑAL	27
FIGURA 8 – DIAGRAMA DE USO DE HIFU PARA EL TRATAMIENTO DE UN TUMOR	27
FIGURA 9 – MODELO PRELIMINAR DEL SISTEMA DE ULTRASONIDOS	33
FIGURA 10 – CONFIGURACIÓN DE LOS TRANSDUCTORES	34
FIGURA 11 – MODELO 3D DEL TRANSDUCTOR PZ52. PARTE CÓNCAVA (IZQUIERDA) Y PARTE CONVEXA (DERECHA)	35
FIGURA 12 – PLANO CON ALZADO (ARRIBA, IZQUIERDA), PLANTA (ABAJO) Y PERFIL (ARRIBA, DERECHA) DEL TRANSDUCTOR PZ52	35
FIGURA 13 – PLANO CON ALZADO (ARRIBA, IZQUIERDA), PLANTA (ABAJO) Y PERFIL (ARRIBA, DERECHA) DEL TRANSDUCTOR PZ52	37
FIGURA 14 – FOTO DEL TRANSDUCTOR PZ52. PARTE CÓNCAVA (IZQUIERDA) Y PARTE CONVEXA (DERECHA)	37
FIGURA 15 – MODELO 3D DEL TRANSDUCTOR PZT-8. PARTE CÓNCAVA (IZQUIERDA) Y PARTE CONVEXA (DERECHA)	38
FIGURA 16 – MODELO 3D DEL TRANSDUCTOR PZT-8. PARTE CÓNCAVA (IZQUIERDA) Y PARTE CONVEXA (DERECHA)	38
FIGURA 17 – MODELO 3D DEL SOPORTE PARA EL TRANSDUCTOR PZT-8. VISTA GENERAL 3D (IZQUIERDA). DETALLE DE LA BASE CON EL TRANSDUCTOR PZT-8 APOYADO (DERECHA)	40
FIGURA 18 – VISTAS DEL SOPORTE CILÍNDRICO PARA EL TRANSDUCTOR PZT-8 (IZQUIERDA) Y PARA EL PZ52 (DERECHA)	41
FIGURA 19 – IMPRESORA PRUSA I3 (IZQUIERDA). DETALLE DE LA SIMULACIÓN DE LA CONSTRUCCIÓN DEL TUBO CON EL SOFTWARE CURA (DERECHA)	42
FIGURA 20 – SOPORTE CILÍNDRICO DE PLA PARA TRANSDUCTOR PZT-8 IMPRESO 3D	42
FIGURA 21 – DISEÑO 3D DEL SOPORTE CÓNICO (IZQUIERDA). SOPORTE CÓNICO CON TRANSDUCTOR POSICIONADO (DERECHA)	43
FIGURA 22 – VISTA DE PLANTA Y CORTE LONGITUDINAL DEL SOPORTE CÓNICO CON MEDIDAS SIGNIFICATIVAS PARA EL TRANSDUCTOR PZ52 (IZQUIERDA) Y PARA EL PZT-8 (DERECHA)	44
FIGURA 23 – VISTA DE PLANTA Y CORTE LONGITUDINAL DEL SOPORTE CÓNICO CON MEDIDAS SIGNIFICATIVAS PARA EL TRANSDUCTOR PZ52 (IZQUIERDA) Y PARA EL PZT-8 (DERECHA)	45
FIGURA 24 – RESINA EPOXÍDICA CARGADA DE PLATA (SUPERIOR IZQUIERDA). RESINA EPOXI (INFERIOR IZQUIERDA). SOPORTE CÓNICO CON TRANSDUCTOR PZ52 MONTADO	46
FIGURA 25 – ESQUEMA DEL SOPORTE DEFINITIVO PARA EL TRANSDUCTOR PZT-8	47
FIGURA 26 – PASOS SEGUIDOS PARA LA CONSTRUCCIÓN DEL SOPORTE DEL PZT-8	48
FIGURA 27 – VISTA DEL SOPORTE FINALIZADO MIENTRAS SE REALIZA LA PRUEBA DE ESTANQUEIDAD	49
FIGURA 28 – GENERADOR ULTRASÓNICO	50
FIGURA 29 – AMPLIFICADOR LINEAL RM KL 203-P	51
FIGURA 30 – REPRESENTACIÓN DE LA GANANCIA DEL AMPLIFICADOR RM KL 203-P FRENTE A LA FRECUENCIA	52
FIGURA 31 – PREAMPLIFICADORES	52
FIGURA 32 – DISEÑO ESQUEMÁTICO DEL CIRCUITO AMPLIFICADOR DE STERLING	53
FIGURA 33 – DISIPADOR HIDRÁULICO (IZQUIERDA). DISIPADOR DE ALUMINIO (DERECHA)	56
FIGURA 34 – CIRCUITO MODIFICADO DE STERLING	57
FIGURA 35 – AUTOSCILACIÓN GENERADA EN EL DRIVER	58
FIGURA 36 – COMPARACIÓN DE LA SEÑAL EXCITADORA CON Y SIN FILTRO PASO-BAJO	59
FIGURA 37 – CIRCUITO AMPLIFICADOR DEFINITIVO	60
FIGURA 38 – SALIDA DEL AMPLIFICADOR ALIMENTANDO EL TRANSDUCTOR	61
FIGURA 39 – VALOR DE INTENSIDAD CONSUMIDA POR LA CARGA USANDO UN SENSOR DE CORRIENTE CON RESISTENCIA DE 0.2Ω	61
FIGURA 40 – REPRESENTACIÓN CONJUNTA DE LA INTENSIDAD CONSUMIDA POR EL TRANSDUCTOR Y EL VOLTAJE A LA SALIDA DEL AMPLIFICADOR	62
FIGURA 41 – IMAGEN DEL CONJUNTO FINAL DEL SISTEMA ULTRASÓNICO DE CALENTAMIENTO	63
FIGURA 42 – TERMOPARES CONECTADOS A UNA MUESTRA BIOLÓGICA Y AL PICOLOG	65
FIGURA 43 – PLACA TERMOSENSIBLE	66
FIGURA 44 – PHANTOM USADO EN EL LABORATORIO	66
FIGURA 45 – MUESTRA BIOLÓGICA DE LONGITUD 0.5 CM	67
FIGURA 46 – DISPOSICIÓN DEL EXPERIMENTO CON MUESTRA DE 0.5 CM	67
FIGURA 47 – RESULTADOS DEL EXPERIMENTO DE CALENTAMIENTO DE LA MUESTRA DE 5 MM	68
FIGURA 48 – CONFIGURACIÓN DEL EXPERIMENTO CON RECIPIENTE DE CRISTAL (IZQUIERDA). MUESTRAS BIOLÓGICAS PARA EL EXPERIMENTO A TEMPERATURA AMBIENTE (DERECHA)	69
FIGURA 49 – RESULTADOS DEL EXPERIMENTO DE CALENTAMIENTO DE LA MUESTRA DE 1.5 CM	70
FIGURA 50 – RESULTADOS DEL EXPERIMENTO DE CALENTAMIENTO DE LA MUESTRA DE 3 CM	70
FIGURA 51 – RESULTADOS DEL EXPERIMENTO DE CALENTAMIENTO DE LA MUESTRA DE 5 CM	71
FIGURA 52 – RESULTADOS DEL EXPERIMENTO DE CALENTAMIENTO HOMOGÉNEO	72
FIGURA 53 – CONFIGURACIÓN DEL EXPERIMENTO CON ETILENGLICOL	73
FIGURA 54 – VISUALIZACIÓN DE LA DISTANCIA ENTRE LOS TERMOPARES EN EL EXPERIMENTO BAJO CERO	74
FIGURA 55 – RESULTADOS DEL EXPERIMENTO A BAJA TEMPERATURA	74

1 INTRODUCCIÓN

El proyecto que se desarrolla a continuación: *Uso experimental de la tecnología HIFU para el recalentamiento de material biológico criopreservado*, forma parte de una línea de investigación mucho más amplia, cuyo objetivo consiste, a grandes rasgos, en la preservación de especímenes orgánicos, principalmente órganos, mediante la congelación de los mismos a temperaturas muy bajas (cercas a $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$) con el propósito de, posteriormente, cuando los mismos son requeridos, descongelarlos para su uso.

Debido a la escasez en la disponibilidad de órganos y tejidos para trasplantes, el mantenimiento de sus características vitales durante el transporte al anfitrión se está convirtiendo en un problema clínico de vital importancia. Es por esto por lo que surge la idea de “Organ Banking” o Banco de Órganos. Éstos consisten lugares donde poder tener almacenados distintos órganos y tejidos por un tiempo indefinido para poder usarlos cuando se requiera. Si estos bancos fueran viables, supondría una revolución en el campo del trasplante de órganos mejorando la calidad de vida de millones de personas que necesitan un trasplante de órganos. Por ejemplo, 2/3 de corazones de donantes no son usados para trasplantes debido a restricciones logísticas, debidas en su gran mayoría al corto periodo de usabilidad del órgano de 4 horas desde su extracción. Esta ventana de tiempo puede ser expandida mediante la criopreservación de órganos, lo que reduciría notablemente las largas listas de espera que existen para trasplantes.

En la criopreservación entran en juego dos partes fundamentales, el enfriamiento o “cooling” y el recalentamiento o “rewarming”. De esta manera, el objeto de este proyecto se centra, principalmente, en el recalentamiento de los especímenes para su descongelación y recuperación.

Se han desarrollado distintas técnicas para conseguir este propósito, muchas de ellas sin éxito, ya que finalmente, sea por daños físicos o por daños tóxicos, el espécimen a descongelar queda inviable para su reutilización. Posteriormente se comentará más en profundidad cuáles son estos daños y por qué se producen.

El objetivo de este proyecto es, por tanto, la aplicación práctica de otra técnica, teóricamente viable, para poder traer de vuelta a temperatura ambiente especímenes criopreservados sin que éstos sufran ningún tipo de daño en el proceso. Posteriormente dichos especímenes podrán ser totalmente aptos para trasplantes, investigación, etcétera.

2 ESTADO DEL ARTE

2.1 Criopreservación

La criopreservación de material biológico es una práctica que permite el almacenamiento de dicho material a unas temperaturas muy bajas, generalmente, a -196°C , por un periodo indefinido de tiempo.

La criopreservación surge de la necesidad de mantener la viabilidad y funcionabilidad celular durante largos periodos de tiempo. Para ello, es necesario detener cualquier actividad biológica que tenga lugar en la célula o tejido, por ejemplo, las reacciones bioquímicas que podrían ocasionar la muerte celular.

Los orígenes de la criopreservación se remontan a 1946 cuando Rostand centró sus estudios en la congelación de gametos procedentes de anfibios. Tres años más tarde, Polge centraría dichos estudios en las aves y, posteriormente, en los mamíferos. De hecho, en 1952, Polge y Row criopreservaron por primera vez espermatozoides de toro obteniendo muy buenos resultados.

En los años 60 se produce una gran expansión demográfica en Estados Unidos lo que requiere incrementar la cantidad de carne de vaca, así como la producción de leche. Con objeto de reducir gastos se optó por recurrir a la inseminación artificial lo que propició grandes avances en la metodología empleada en la criopreservación de espermatozoides.

En la década de los 70 se dio un paso más allá y se empezaron a llevar a cabo numerosos estudios de criopreservación de embriones, empleando para ello: ratones, conejos y ovejas. En 1979, Trouson y Mohr criopreservaron un embrión humano, no obstante, a pesar de que tras ser implantado tuvo lugar el embarazo, este cesó a las 24 semanas. Finalmente, en 1986, Testart y Lasalle publicaron los primeros embarazos con éxito a partir de embriones congelados.

Actualmente, la criopreservación de gametos y embriones cuenta con unos protocolos que se encuentran suficientemente estandarizados y el proceso tiene una tasa de éxito elevada.

2.2 Condiciones de temperatura para la criopreservación

Usualmente, se utilizan temperaturas de en torno a -80°C para mantener organismos criopreservados. Sin embargo, esta temperatura no es estable para el almacenamiento a largo plazo de las muestras, siendo las mismas perecederas.

Esto se debe a que a -80°C se produce crecimiento del hielo que con un almacenamiento de larga duración puede dar lugar a un crecimiento excesivo que dañe los organismos, especialmente si son de gran tamaño.

Para llevar a cabo un almacenamiento de larga duración, pudiendo llegar a ser indefinido, la temperatura de almacenamiento debe ser la de transición vítrea, T_g . A esta temperatura el fluido sufre una transición de fase de segundo orden, en el que pasa a ser de un fluido viscoso a un sólido, aumentando su viscosidad en unos 15 órdenes de magnitud.

La temperatura de transición vítrea para el caso de las soluciones típicas empleadas para la criopreservación se encuentra en unos -140°C , por lo que esta temperatura se considera óptima para el almacenamiento de larga duración. El almacenamiento a estas temperaturas se denomina "almacenamiento a temperaturas intermedias", ya que el punto triple del nitrógeno se encuentra a -196°C .

El almacenamiento a temperaturas más bajas de -140°C no es recomendable, ya que se produce estrés mecánico que da lugar al crecimiento de las fracturas, si tener ninguna ventaja a nivel biológico para las muestras criopreservadas. Si se quisiera disminuir la temperatura podría hacerse de forma que la transición sea muy lenta, lo que hace que se libere estrés mecánico y no crezcan las fracturas, sin embargo, este proceso es muy complejo.

Para el almacenamiento de larga duración, las temperaturas inferiores a -140°C producidas por ciclos de temperatura no son deseables, ya que se produce el cambio de fase y las fracturas crecen nuevamente. Por este hecho, se puede establecer que una ventana ideal para el mantenimiento de las muestras sería entre -140°C y -150°C .

La existencia de un ciclo térmico no es excesivamente perjudicial si se trata de muestras pequeñas, ya que la aparición de fracturas no implicaría la rotura de las mismas, aun así, no es deseable tener un número muy grande de ciclos para dañar en la menor medida posible los organismos criopreservados.

La utilización de un sistema dinámico para el control de la temperatura no es muy recomendable para el control de las muestras almacenadas, ya que los sistemas de control de temperatura suelen estar sujetos a muchos fallos. Es recomendable la utilización de un sistema pasivo.

2.3 Problemáticas

La principal problemática que surge a la hora de completar un ciclo completo de criopreservación, es la aparición de cristales de hielo durante el recalentamiento del espécimen. De esta forma, se desarrollarán una serie de conceptos de tal manera que quede explicado el origen de la aparición de dichos cristales.

Dos fenómenos están relacionados con la aparición de cristales de hielo:

1. **Nucleación** – En un medio acuoso, las moléculas de agua están constantemente agrupándose y desagrupándose de una forma aleatoria. Éstas forman núcleos mediante puentes de hidrógeno que son destruidos al instante por la agitación térmica. Sin embargo, si uno de estos núcleos consigue llegar a un determinado tamaño, la agitación térmica no es capaz de deshacerlo. En este caso la adición de una nueva molécula es energéticamente favorable, generando el crecimiento del cristal de hielo. El nacimiento de este embrión (núcleo de mínimas dimensiones) se llama nucleación y es el principio de la congelación. Mientras más frío llegue a ser el sistema, los núcleos que consigan llegar a la nucleación podrán ser más pequeños ya que la agitación térmica, que es el agente que los pretende destruir, es menos intensa.
2. **Crecimiento** – El crecimiento de los núcleos de hielo previamente formados está dominado por la viscosidad de la solución. Si la solución es muy viscosa, el hielo que ha aparecido no es capaz de crecer. En las áreas con baja viscosidad, las dendritas encuentran la vía para avanzar y crecer. A mayor temperatura, menor viscosidad, luego el requisito para el crecimiento del hielo, en este sentido, es justo el contrario que para la nucleación.

En la Figura 1, la temperatura se encuentra en el eje horizontal, mientras que la probabilidad de nucleación (color rojo) y la velocidad de crecimiento del hielo (color azul) para una concentración dada de crioprotector genérico se muestra en el eje vertical. En el caso en el que no haya presente ningún agente crioprotector en la solución, estas dos curvas se encuentran superpuestas. A medida que la concentración del crioprotector aumenta, estas dos curvas comienzan a estrecharse y a estar menos superpuestas. Para una determinada concentración de crioprotector, ya no hay superposición alguna (este es el caso de la figura).

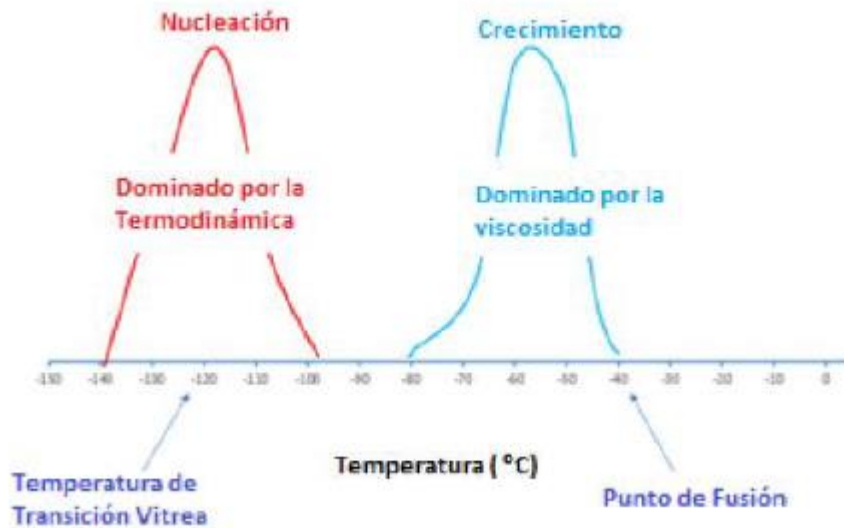


Figura 1 – Probabilidad de formación de núcleos y crecimiento en función de la temperatura y concentración de crioprotector

En este caso, cuando se comienza a enfriar (recorremos el gráfico de derecha a izquierda), primero pasamos por la zona de crecimiento de las dendritas y posteriormente, a una temperatura menor, se cruza la zona de nucleación. De esta manera, durante el enfriamiento, cuando cruzamos por la zona de crecimiento, no hay todavía núcleos presentes que puedan crecer. Posteriormente, en la zona de nucleación, si ésta se da, el hielo no tiene posibilidad de crecer, ya que su formación ocurre en una zona de temperaturas menor que la zona de temperaturas de crecimiento, que ya habíamos excedido al enfriar.

De esta manera, gracias a la adición de agentes crioprotectores se puede llevar una muestra a temperaturas criogénicas sin el inconveniente de la formación de cristales de hielo.

El problema surge en el recalentamiento. Como se ha dicho anteriormente, al enfriar, existe la posibilidad de que se creen unos núcleos de hielo que no tienen posibilidad de crecer ya que se había dejado atrás la zona de crecimiento. Sin embargo, durante el recalentamiento, los núcleos de hielo formados durante el enfriamiento tendrán que cruzar por la zona de temperaturas de crecimiento de dendritas, que se encuentra a mayores temperaturas, cuando la viscosidad es más baja. Por lo tanto, si bien no se induce la formación de grandes cristales durante el enfriamiento, durante el recalentamiento es posible que los núcleos sí crezcan. Este fenómeno es conocido como **recristalización**.

Como la nucleación es un proceso estocástico, en el caso en el que los núcleos no hayan aparecido en el enfriamiento, y por tanto, el proceso de nucleación se da en el recalentamiento con su correspondiente crecimiento de dendritas, se da el fenómeno llamado **desvitrificación**.

La forma de evitar tanto la desvitrificación como la recristalización es pasar la zona de crecimiento muy rápidamente de tal manera que temperaturas suficientemente altas sean alcanzadas antes de que el crecimiento de los cristales de hielo comprometa la viabilidad biológica del sistema.

Por otra parte, este recalentamiento, además de ser rápido debe ser también uniforme, de forma que, durante el recalentamiento, las zonas aún frías no induzcan la formación de cristales de hielo en las zonas ya recalentadas.

2.4 Técnicas usadas en criopreservación

A continuación, tras haber expuesto cuáles son los distintos problemas que surgen en el proceso de la criopreservación, es necesario describir cuáles son las distintas técnicas que hasta ahora se han llevado a cabo para intentar criopreservar con éxito.

2.4.1 Congelación

De entre las técnicas que se han desarrollado para congelación de material biológico, destacan dos de ellas:

- **“Slow freezing” o congelación lenta**
- **Vitrificación**

2.4.1.1 “Slow freezing”

En el enfriamiento lento, la muestra biológica se encuentra en un recipiente bañada con una solución isotónica. Un medio o solución isotónico es aquel en el cual la concentración de soluto es igual fuera y dentro de una célula.

Esta solución generalmente incorpora ~ 10% de un agente crioprotector, cuya función principal es evitar la formación de cristales de hielo dañinos para las muestras biológicas. Este agente crioprotector debe tener una serie de propiedades para que sea adecuado su uso en criopreservación:

- Que las membranas celulares sean permeables a él
- Que permanezca disuelto en agua a lo largo de un rango amplio de temperaturas (bajo cero)
- Que no sea tóxico

El proceso comienza con el enfriamiento gradual del recipiente que contiene la muestra y la solución isotónica, normalmente, a $-1\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Cuando se alcanza el punto de congelación de la solución ($\sim -5\text{ }^{\circ}\text{C}$) se induce la formación de hielo en el medio extracelular.

A medida que se va formando el hielo, como éste es agua pura, reduce el agua líquida (disolvente) de la solución extracelular y como resultado la concentra. Esto causa que el agua contenida dentro de la célula salga hacia fuera por el efecto de la osmosis. Como consecuencia, se concentran los solutos del citoplasma, que es la solución que se encuentra en el interior de la célula, y esto hace que baje el punto de congelación dentro de la célula.

Si el crecimiento del hielo es suficientemente lento, el agua dentro de la célula tiene suficiente tiempo para salir gradualmente, y el crioprotector también lo tiene para entrar. En este caso, para cada temperatura, la concentración intracelular de solutos siempre será suficientemente alta para que el hielo no se forme dentro de la célula. De esta forma, la solución intracelular acabará siendo un sólido amorfo, evitando la formación de cristales de agua congelada, lo que sería letal para la célula.

Los agentes crioprotectores funcionan de tal manera que su punto eutéctico (punto en el que se forman los primeros núcleos de sólido) es mucho más bajo que el del citoplasma y entonces son capaces de llegar a temperaturas tan bajas sin formar núcleos en la que la viscosidad es tan alta que no hay posibilidad de formación de estructuras cristalinas.

Por otra parte, el “slow freezing” es solamente útil si las células en suspensión pueden ser recolocadas entre las dendritas de hielo extracelular, es decir, en áreas con alta concentración de soluto. Esta técnica también puede ser aplicada a ciertos tejidos.

2.4.1.2 Vitrificación

Esta técnica está basada en el hecho de que cualquier líquido, cuando es enfriado a un ritmo suficientemente alto, solidifica sin formar cristales. Particularmente, para las sustancias que se encuentran en estado líquido para un rango grande de temperaturas, este ritmo de enfriamiento no debe ser necesariamente tan alto para que se dé la vitrificación.

Se ha comprobado que, para el agua pura se requiere una velocidad de enfriamiento de aproximadamente 10^7 °C/min para vitrificar.

Dentro de la técnica de vitrificación se distinguen dos ramas:

- **Vitrificación por enfriamiento ultrarrápido** – Consiste en conseguir un enfriamiento del espécimen muy rápido, de tal manera que se alcance la temperatura deseada en un corto periodo de enfriamiento. Es útil en sistemas que pueden ser dañados por el frío, en inglés, “chill injury”. Este es el caso de gametos y embriones, por ejemplo. En la vitrificación ultrarrápida no hay daño por frío porque no hay una exposición prolongada. Esta técnica no es viable para sujetos más grandes que una célula porque con los medios de hoy en día no se puede enfriar tan rápido sistemas voluminosos como órganos, que es la materia que nos interesa.
- **Vitrificación de equilibrio** – En este caso, la operación es viable para muestras grandes. La adición de solutos en altas concentraciones reduce significativamente las velocidades de congelación tan altas que son requeridas para la vitrificación.

2.4.2 Recalentamiento

Como se ha comentado anteriormente, el mayor problema que se nos presenta a la hora de criopreservar órganos es el recalentamiento sin que estos resulten dañados por los potenciales cristales de hielo que se pueden formar durante el proceso. A lo largo de los últimos años se han ido desarrollando distintas técnicas para paliar este problema que se nos presenta, aunque ninguna es lo suficientemente estable, eficiente y eficaz como para poder implementarse hoy en día.

2.4.2.1 Mezclas de crioprotectores con menor toxicidad

Un gran avance en el ámbito de la criopreservación es el uso de los anticongelantes o crioprotectores. De esta forma, a mayor concentración de crioprotector, menor velocidad de enfriamiento necesaria. Para grandes concentraciones (8 molar o mayor), el sistema puede ser congelado y descongelado a cualquier velocidad sin la formación de hielo. La solución obvia es usar una concentración tan alta como sea necesaria.

El problema es que, a estas concentraciones, los crioprotectores actuales son muy tóxicos. Una estrategia ampliamente utilizada es la de reducir su toxicidad formando una mezcla de varios crioprotectores. Para una concentración total dada, la toxicidad de una combinación de distintos crioprotectores en la misma solución es menor que la de la misma solución con la misma concentración, pero con la presencia de sólo un crioprotector. Sin embargo, aunque esta ruta minimiza el problema y hace que sea posible enfriar el sistema sin la formación de hielo, para órganos grandes, mayores velocidades de recalentamiento que aquellas que se consiguen con la tecnología actual son todavía necesarias.

2.4.2.2 “Liquidus Tracking”

Este método intenta sacar partido del hecho de que la toxicidad disminuye a menores temperaturas. De esta forma, ha surgido la idea de aumentar la concentración de crioprotector a medida que la temperatura del sistema va decreciendo y viceversa. En otras palabras: en cualquier momento, la cantidad de crioprotector es la justa y necesaria para evitar la formación de cristales de hielo a la temperatura a la que el sistema se encuentra en ese momento. Ese seguimiento de las curvas de equilibrio sólido-líquido da el nombre a esta técnica: liquidus tracking. Sin embargo, de entre las dificultades que se encuentran a la hora de llevar a la práctica esta técnica está el hecho de que, si disminuye la temperatura, la viscosidad de la solución aumenta y disminuye la permeabilidad de las membranas, haciendo difícil o incluso imposible seguir la curva sólido líquido en muchos casos.

2.4.2.3 Uso de altas presiones

La relación entre la concentración de crioprotector y la velocidad mínima de enfriamiento o calentamiento para evitar la formación de hielo es una función de la presión. Normalmente es asumido que el proceso tiene lugar a presión atmosférica (en la que la mayoría de los experimentos tienen lugar). Sin embargo, es posible proponer escenarios en los que las presiones sean mayores (condiciones hiperbáricas). En estos casos, la relación entre la velocidad de enfriamiento o calentamiento y la mínima concentración de crioprotector es afectado favorablemente: para la misma concentración, menores velocidades de enfriamiento y recalentamiento son requeridas para la formación de cristales de hielo. La mayor limitación de esta estrategia reside en el hecho de que los sistemas biológicos no son generalmente compatibles con las altas presiones requeridas.

2.4.2.4 Conservación isocórica

Esta técnica es similar a la anterior. Sin embargo, en este caso, las altas presiones son conseguidas por medio de rellenar un recipiente de paredes rígidas con la solución hasta el borde, y después sellarlo herméticamente. Por lo tanto, cuando el sistema empieza a enfriarse, y el hielo aparece (fuera del sistema biológico), éste, llena un volumen mayor que el que llenaría la misma cantidad de agua en estado líquido. Esto causa que la presión naturalmente crezca dentro del recipiente, ya que éste se encuentra sellado sin aire en su interior. La preservación isocórica tiene los mismos beneficios y desventajas que el método hiperbárico.

2.4.2.5 Recalentamiento con microondas

Este proceso consigue una alta velocidad de recalentamiento, razón por la cual son un buen candidato para evitar el problema de la recristalización/desvitricación. Sin embargo, existe una principal limitación al uso de esta técnica para el recalentamiento de material biológico: el llamado “thermal runaway”. Este fenómeno provoca la pérdida de uniformidad en el recalentamiento.

Se ha demostrado que la radiación microondas calienta eficientemente moléculas polares como agua, proteínas y grasas. Sin embargo, si las microondas están producidas en un ambiente específico como podría ser dentro de una cavidad: horno microondas, pueden aparecer ondas estacionarias que pueden modificar el campo electromagnético aumentando la intensidad de las ondas microondas o haciéndola despreciable. Esto significa que habrá puntos que se calentarán rápido y otros que no.

Además, la temperatura modifica la constante dieléctrica del material haciendo que la radiación pueda ser absorbida más fácilmente. De esta forma, los puntos calientes se terminarán calentando aún más, distanciándose irreversiblemente en temperatura de las áreas más frías.

Finalmente, el tipo de tejido también influye en el “termal runaway” de forma que la absorción de las microondas en regiones más grasas es mayor que en el resto del tejido, lo que provoca la no uniformidad de calentamiento.

2.4.2.6 Proteínas antihielo y “ice blockers”

Además de los crioprotectores, hay otro tipo de moléculas capaces de reducir la formación de hielo.

En el caso de las proteínas antihielo, se evidencia que su adhesión al hielo juega un papel fundamental en la limitación del crecimiento del cristal.

Por otra parte, en cuanto a los “ice blockers” no hay consenso de su mecanismo de acción todavía.

Como no se conoce todavía muy bien el mecanismo de estas sustancias, se usan en concentraciones muy pequeñas. Además, aunque producen grandes beneficios, no son capaces de eliminar todo el hielo que puede ser generado, ni en condiciones óptimas de funcionamiento.

2.4.2.7 Nanowarming

Con esta técnica se es capaz de calentar un órgano completo rápida y homogéneamente. Está basada en la adición de partículas ferromagnéticas a la solución crioprotectora. Estas partículas en presencia de un campo magnético alternativo generan corrientes inducidas y ciclos de histéresis magnéticos que indican el calentamiento de las partículas. Por lo tanto, cada partícula actúa como una fuente de calor desde dentro del órgano. La toxicidad de estas partículas y la no uniformidad de los campos magnéticos son las principales desventajas de esta técnica.

2.4.2.8 Uso de partículas magnéticas junto a proteínas anticongelantes

Las proteínas anticongelantes basan su acción en la afinidad que tienen por los núcleos de hielo. Aprovechando las propiedades de dichas proteínas, se ha propuesto unirles a partículas magnéticas, de forma que las partículas magnéticas queden situadas junto a los núcleos de hielo para posteriormente fundirlos mediante un pulso de radiofrecuencia, impidiendo así su crecimiento.

2.5 HIFU: Ultrasonidos focalizados de alta intensidad

Como se ha comentado anteriormente, el objetivo principal de este proyecto es la implementación de los ultrasonidos focalizados de alta intensidad con el objetivo de recalentar muestras criopreservadas a muy baja temperatura con una velocidad de calentamiento suficientemente alta como para que no haya daños en dichas muestras biológicas. Dicho daño es principalmente causado por el crecimiento de cristales de hielo que desgarran los tejidos.

De esta forma, la presente tecnología que se va a usar para tal propósito ha sido ya ampliamente utilizada en el ámbito de la medicina, más específicamente en oncología, con el objetivo de remover células malignas mediante la aplicación de altas temperaturas (ablación térmica).

2.5.1 Ultrasonidos

Un ultrasonido es una onda de presión con una frecuencia superior al rango audible por el ser humano (18-20kHz), y es generado por un movimiento mecánico que induce una oscilación a las moléculas de un medio alrededor de su posición de reposo. Las uniones de las moléculas del medio permiten que la onda mecánica se transmita, creando compresiones y rarefacciones en el mismo.



Figura 2 – Clasificación de las ondas de presión según la frecuencia

La imagen anterior muestra la clasificación de las ondas de presión en función de la frecuencia, y vienen separadas según su audibilidad. De esta forma, como se puede observar en la figura, el oído humano sólo puede percibir sonidos de entre 20 Hz y 20 KHz. Los ultrasonidos por tanto son todo aquello que quede por encima de este límite audible de 20KHz.

En cuanto a su descubrimiento, éste viene asociado a la observación de cómo los murciélagos atrapaban sus presas usando estas ondas. El siglo XIX supone el inicio del conocimiento del ultrasonido a partir del silbato de Galton y del diapasón, que eran capaces de producirlo; aunque muy bajas las frecuencias producidas, eran suficientes para comprobar las distintas barreras existentes en el oído entre el hombre y los animales. A finales de siglo, en Francia se detectan este tipo de ondas y se empiezan a hacer numerosas investigaciones sobre sus usos. Como consecuencia a principios del siglo XX el físico francés P. Langevin y el Dr. C. Chilowsky lograron desarrollar el primer generador ultrasónico por medio de un piezoeléctrico.

De entre sus usos, ya se ha mencionado su utilización en medicina, sin embargo, además son ampliamente empleados en la industria para la limpieza de objetos mediante cavitación, así como para la detección de errores de fabricación.

2.5.2 Piezoelectricidad

Una de las formas en las que se producen ultrasonidos es mediante el uso de materiales piezoeléctricos. Este método es el que se usará en el presente Proyecto. Es por esto que la descripción de dicho fenómeno se desarrollará a continuación.

La piezoelectricidad es un fenómeno que ocurre en determinados cristales que, al ser sometidos a tensiones mecánicas, en su masa adquiere una polarización eléctrica y aparece una diferencia de potencial y cargas eléctricas en su superficie. Este fenómeno también ocurre a la inversa: se deforman bajo la acción de fuerzas internas al ser sometidos a un campo eléctrico. El efecto piezoeléctrico es normalmente reversible: al dejar de someter los cristales a un voltaje exterior o campo eléctrico, recuperan su forma.

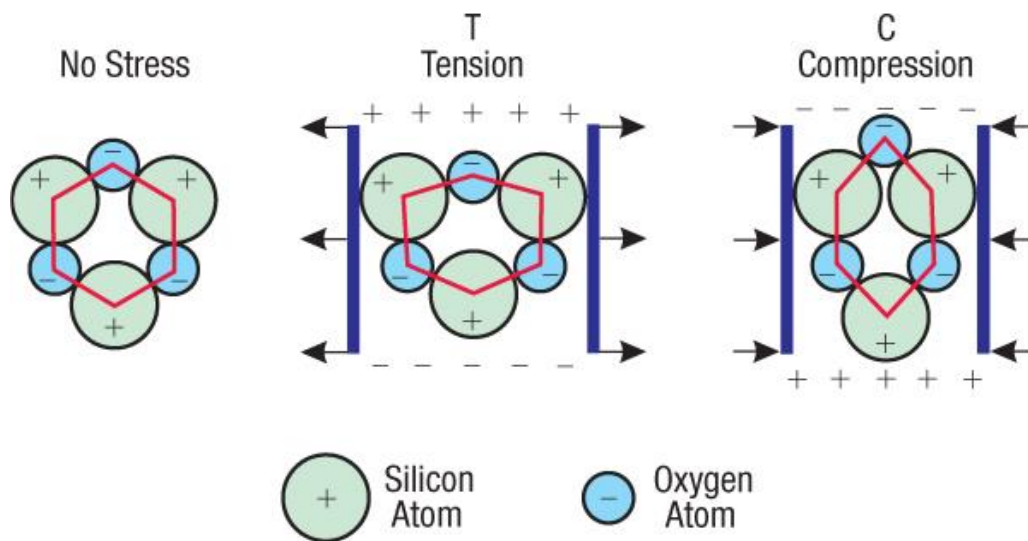


Figura 3 – Efecto piezoeléctrico en el cuarzo

La figura anterior muestra el efecto piezoeléctrico gráficamente, tomando al cuarzo como ejemplo. En este caso vemos como la red cristalina está formada por átomos que presentan polaridad positiva y negativa. De este modo cuando no hay tensión en el cristal, aunque internamente haya polaridad, en escala macroscópica ésta no se aprecia. De otro modo, si provocamos una deformación de tracción o compresión en el cristal, como se puede ver en la figura, esto provoca que la red cristalina se posicione de una determinada forma que hace incrementar la polaridad en los extremos provocando una diferencia de potencial entre ambas caras del piezoeléctrico.

En el ejemplo anterior se ha usado cuarzo para mostrar gráficamente el comportamiento piezoeléctrico, sin embargo, hay más materiales que se comportan de la misma manera. Algunos de ellos son:

- Cuarzo
- Rubidio
- Sal de Seignette
- Cerámicas
- Cerámica piezoeléctrica
- Cerámica técnica

2.5.3 Transductores esféricos: Geometría

En este proyecto, para conseguir el objetivo que se estableció al comienzo, se va a hacer uso de transductores esféricos. Este tipo de transductores poseen una forma de casquete esférico, es decir, el corte de una superficie esférica con un plano. Este tipo de geometrías son usadas para poder aprovechar al máximo la potencia de los ultrasonidos, focalizándolos en el punto que se desea calentar.

Cabe decir que el material usado para la construcción de los transductores es un material piezoeléctrico.

La siguiente figura muestra la geometría normalmente usada para los HIFU:

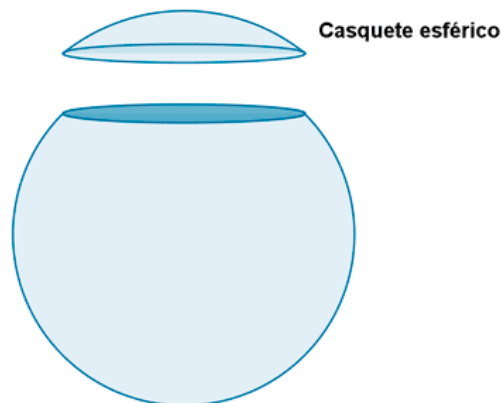


Figura 4 – Representación gráfica de un casquete esférico

Más concretamente, en la siguiente figura se muestran algunos ejemplos de transductores ultrasónicos reales. La geometría depende del uso que se le vaya a dar. Cada tipo de transductor mostrado en la imagen tiene diferente punto focal, potencia, frecuencia de resonancia...



Figura 5 – Transductores de ultrasonidos reales

2.5.4 Mecanismo de acción del HIFU

El haz energético generado por el dispositivo de ultrasonido de alta frecuencia es muy intenso en la denominada zona focal, ya que, es en esta zona donde las ondas de presión se concentran gracias a la geometría esférica del transductor. De esta manera, se produce un rápido incremento de la temperatura de forma focalizada (por encima de valores de 70-100 °C) en pocos segundos, calentando una zona de tejido muy específico, con absoluta conservación de la estructura tisular circundante.

Dicho calentamiento es producido gracias a la agitación microscópica al atravesar diferentes tejidos. Es por esto que para que el sistema funcione es necesario un medio de transmisión.

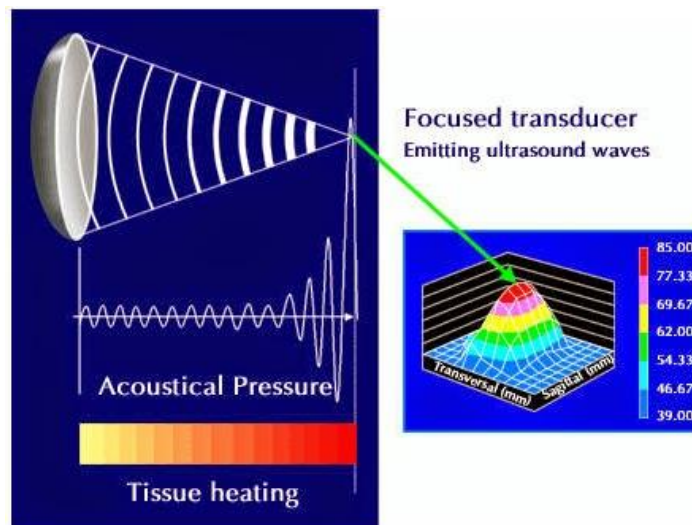


Figura 6 – Principio de acción del HIFU: la generación de ondas ultrasónicas focalizadas produce un incremento de densidad energética en el área focal sin modificaciones en el tejido circundante

Por otra parte, se producen además otros mecanismos de acción secundarios tales como la cavitación, la cual se puede definir como la creación de gas en un campo acústico, como por ejemplo el movimiento oscilatorio de una burbuja de aire dentro de un medio líquido al exponerla a un campo acústico. Con la suficiente compresión y expansión del tejido se obtienen burbujas de aire. Estas burbujas de aire interactúan con el ultrasonido produciendo un flujo líquido que puede dañar superficies sólidas.

El volumen de muestra calentado por un solo disparo energético se produce en una zona muy comedida. Para conseguir el calentamiento de una forma progresiva del órgano es necesario incrementar dicha área. Hay dos métodos principales para conseguir esto:

1. Creando un *array* de transductores con una geometría específica de tal forma que se amolde a la geometría del órgano.
2. Mediante la creación de un *array* de transductores en posición matricial, que con capacidad de controlar la ubicación del foco mediante la fase y la amplitud de las señales de radiofrecuencia que impulsan cada elemento.

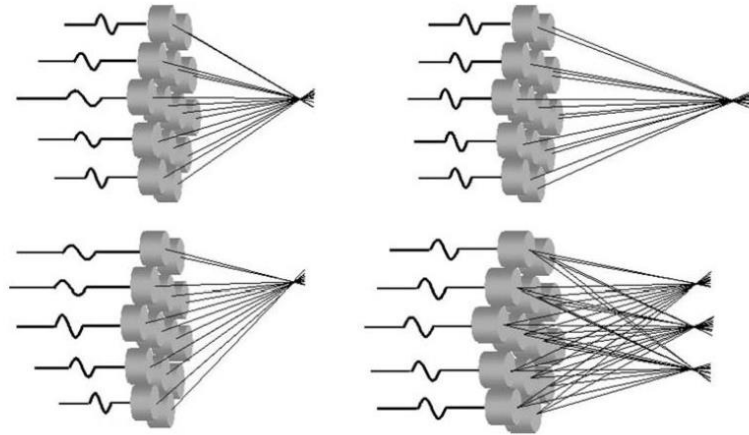


Figura 7 – Diagrama con distintas posibilidades de colocación del foco mediante el control de la fase y amplitud de la señal

2.5.5 Usos del HIFU en la actualidad

En la actualidad el uso de la tecnología HIFU está prácticamente centrado en casos médicos. Las técnicas médicas que lo emplean aprovechan su capacidad de incrementar enormemente la temperatura de una zona acotada sin que esto afecte al exterior de dicha zona.

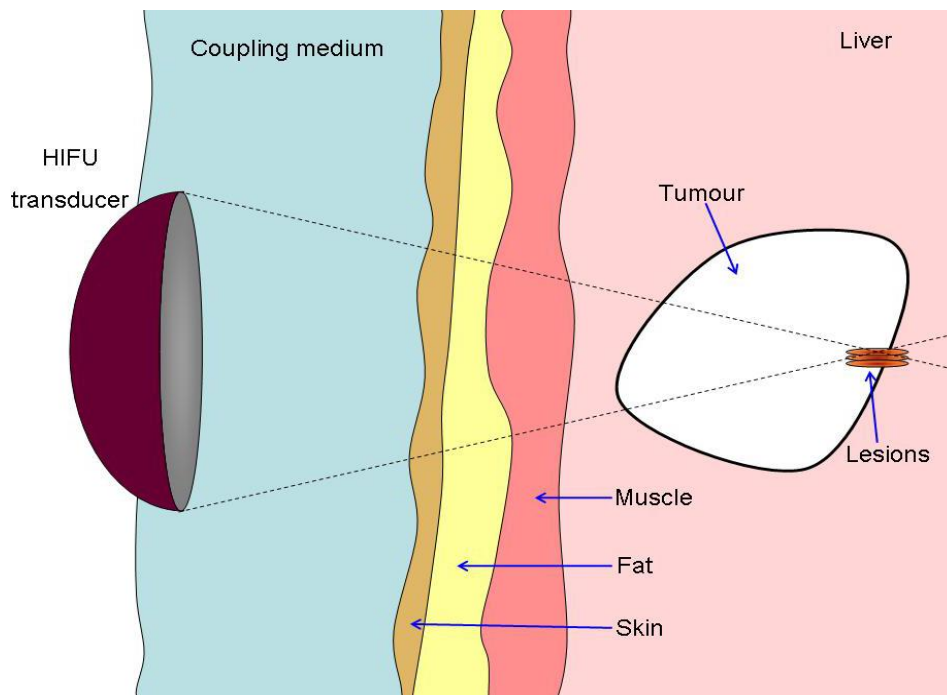


Figura 8 – Diagrama de uso de HIFU para el tratamiento de un tumor

De entre los usos médicos más comunes se encuentran:

- **Enfermedades neurológicas** – permite el tratamiento del cerebro sin incisión o radiación. Usado en el tratamiento contra el Párkinson o el dolor neuropático.
- **Adeniosis y fibromas uterinos** – el uso del HIFU ha significado un gran alivio de los síntomas de estas enfermedades evitando el riesgo que implicaría la cirugía u otros métodos invasivos.
- **Cáncer de próstata** – el tratamiento de esta dolencia está todavía en desarrollo.
- **Otros cánceres** – en cuanto al tratamiento de otros cánceres, la tecnología HIFU ha sido exitosamente aplicada para destruir tumores sólidos de los huesos, cerebro, pecho, hígado, páncreas...
- **Cuidados paliativos** – el HIFU también está siendo usada para la disminución del dolor en casos de cáncer de hueso con metástasis y cáncer de páncreas avanzados.

3 MOTIVACIÓN Y OBJETIVOS

3.1 Motivación

La criopreservación es un campo aún en desarrollo. Por esta razón la motivación del presente proyecto es continuar con el desarrollo de las tecnologías necesarias para hacer que la criopreservación de órganos sea una realidad. Si esto fuese posible, se abriría todo un nuevo campo de investigación que, sin lugar a duda, supondría un gran beneficio y un gran salto en diversas áreas de la ciencia y la tecnología.

En primer lugar, debido a la vital importancia de los órganos y tejidos hoy en día, estos se han convertido en los recursos más valiosos para salvar y mejorar millones de vidas. Sin embargo, la única procedencia de órganos y muchos tejidos es la decisión personal de convertirse en donante, lo que hace que los suministros sean muy limitados. Además, muchos de los órganos que provienen de donantes tienen que ser desechados debido a que la vida de estos órganos fuera de un receptáculo vivo es de pocas horas. Por tanto, la persona que necesita el trasplante debe estar relativamente cerca del anfitrión. Cabe decir que el transporte de los órganos es un proceso extremadamente delicado, debido a la fragilidad de los mismos. Todo esto hace que el proceso de trasplante de órganos sea muy delicado, complejo y costoso.

Si un “banco de órganos”, en el que los órganos permanecieran criopreservados sin temor a la descomposición de los mismos fuera factible, significaría una revolución en el trasplante de órganos, brindando la posibilidad de tener órganos siempre que fuera necesario. Se abaratarían los costes del proceso, y sería posible transportarlos sin grandes complicaciones y con una ventana de tiempo mucho mayor a la actual. Todo esto supondría una gran revolución en el sector pudiéndose salvar miles de vidas.

Además de eso, el almacenamiento a largo plazo de los tejidos y órganos creados en el laboratorio por la nueva impresión biológica en 3D y la ingeniería de células madre requerirá, tarde o temprano, el desarrollo de una potente tecnología de criopreservación.

Por otra parte, también existen proyectos de criopreservación de material genético de especies en peligro de extinción. Estos bancos de almacenamiento contienen información genética de gran valor, que, en el caso de ser perdida, quedaría totalmente irrecuperable. Es por esto que es totalmente imprescindible un sistema de recalentamiento fiable y seguro para cuando estas muestras necesiten ser examinadas o usadas.

Otro de los motivos por lo que es necesario desarrollar este campo de investigación es la necesidad de mantener vivas a personas durante un gran periodo de tiempo. Más a largo plazo, con la tecnología de criopreservación se pretende poder llegar a criopreservar cerebros de tal manera que, por ejemplo, en el sector espacial, se puedan afrontar viajes extremadamente largos, que de otra manera no se podrían realizar con tripulación.

3.2 Objetivos

El objetivo principal que presenta este proyecto es el de diseñar y construir físicamente un artefacto capaz de recalentar una muestra de material biológico criogenizado a una velocidad suficientemente alta como para que no se formen cristales de hielo en dicha muestra. El planteamiento del proyecto es tal que dicho sistema se construye utilizando la tecnología HIFU cuyo modo de funcionamiento y principios físicos han quedado expuestos anteriormente.

Por otra parte, como también se ha mencionado al principio, el presente proyecto forma parte de una línea de investigación mucho más amplia cuyo objetivo final es ser capaz de poder realizar un ciclo de criopreservación completo y exitoso sobre un órgano humano voluminoso. Podría entonces decirse que este proyecto engloba por tanto también estos objetivos, aunque obviamente quedan fuera del alcance de este.

En resumen, los objetivos de este proyecto son:

- Diseño de un sistema de calentamiento tomando la tecnología HIFU como base del mismo.
- Evaluación de alternativas.
- Construcción del sistema.
- Experimentos en laboratorios para verificar la eficacia del sistema.

Hasta aquí los objetivos que engloban el alcance del proyecto. Unos objetivos más generales a la vez que ambiciosos son:

- Implementación del sistema en órganos de animales.
- Automatización del proceso.
- Implementación a casos clínicos reales (órganos humanos).
- Implementación del sistema para construir un banco de órganos.

4 ELABORACIÓN DEL SISTEMA: EVALUACIÓN DE ALTERNATIVAS

4.1 Introducción

En este apartado del proyecto se comentará el proceso seguido para poder realizar el diseño del sistema, las distintas alternativas que se han presentado, así como las dificultades encontradas y los distintos diseños.

Asimismo, se presentará los distintos materiales y medios que se han usado para poder concurrir en el diseño final del sistema.

4.2 Esquema básico del sistema

En primer lugar, es necesario introducir cuál será el diseño básico preliminar del sistema de ultrasonidos. Para ello se ha realizado un croquis que posteriormente se desarrollará hasta dar lugar al sistema real.

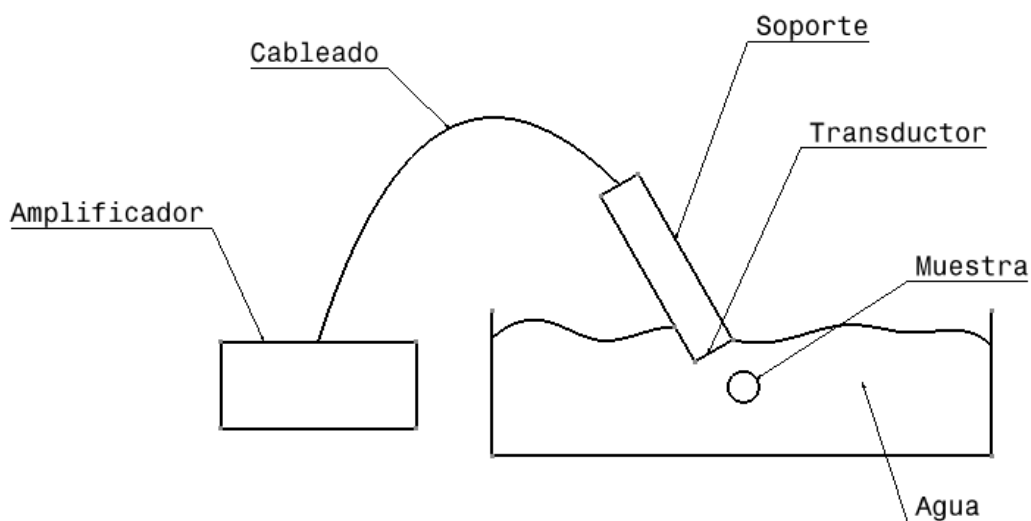


Figura 9 – Modelo preliminar del sistema de ultrasonidos

En este esquema se pueden observar cuáles son las distintas partes por las que está compuesto el sistema de ultrasonidos, las cuales son:

1. **Transductor** – necesario para convertir la potencia eléctrica en mecánica para calentar la muestra.
2. **Muestra** – material biológico que se desea recalentar. Se debe colocar en el foco del transductor.
3. **Agua** – es el medio transmisor de las ondas de presión que transmite el transductor.
4. **Soporte** – necesario para sostener el transductor mientras el sistema está siendo usado.
5. **Amplificador** – dispositivo que amplifica la señal, de tal manera que aumenta la potencia que emite el transductor hasta la necesaria para poder recalentar la muestra con el gradiente deseado.
6. **Cableado** – une el amplificador con el transductor. Transmite la potencia eléctrica al transductor.

4.3 Transductores

Los transductores de ultrasonidos juegan un papel fundamental a la hora del desarrollo de un sistema HIFU ya que serán estos los que proporcionen las ondas de presión necesarias para el calentamiento cuando los mismos se sometan a una diferencia de potencial.

Los transductores que se van a usar en este proyecto presentan la siguiente configuración: están conformados en su totalidad por un material piezoeléctrico, y en sus caras cóncava y convexa presentan sendos baños de plata que funcionan a modo de electrodo. Esto se hace para poder someter el transductor a la diferencia de tensión deseada con el fin de producir los ultrasonidos. El siguiente esquema muestra la configuración de los transductores.

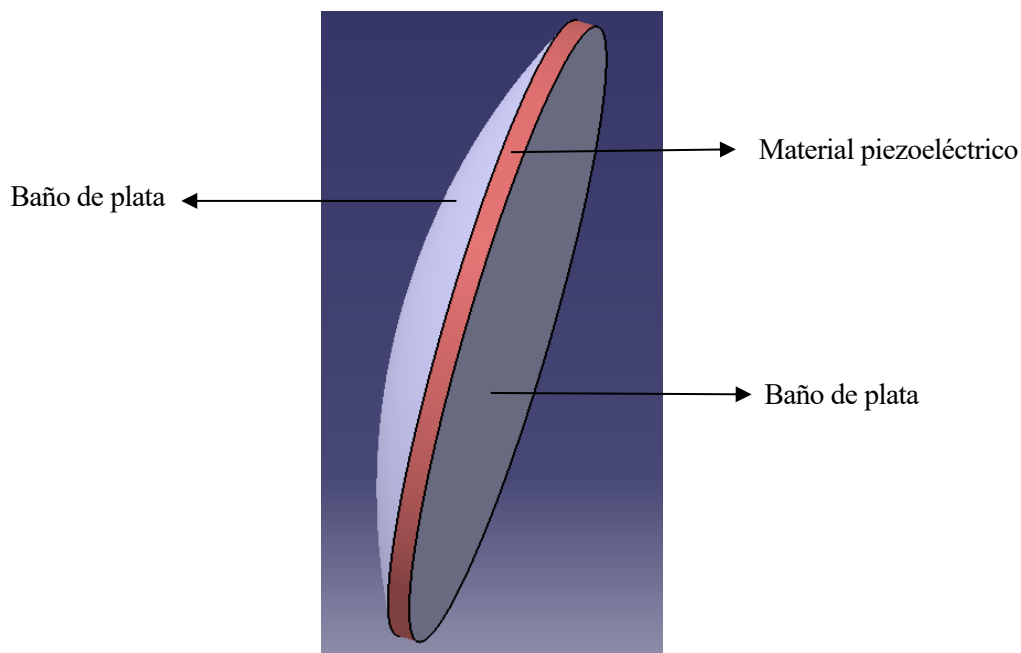


Figura 10 – Configuración de los transductores

A la hora de elegir transductor, se ha optado por dos de ellos, que se comentará a continuación.

4.3.1 Transductor PZ52

Este es el transductor más pequeño de los dos por los que se ha optado. La razón principal por la cual se ha elegido este transductor frente a otros es que ha sido enviado por la empresa MEGGIT sin coste alguno, como transductores de prueba. Además, presenta características favorables a la realización del proyecto, que comentaremos posteriormente.

A continuación, se muestra una imagen de la modelización 3D de este transductor.

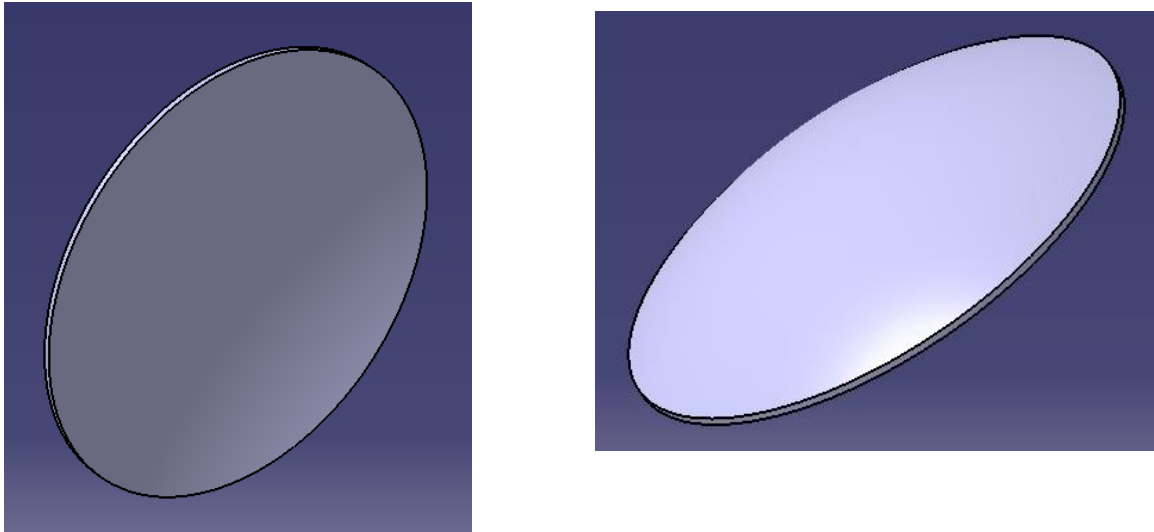


Figura 11 – Modelo 3D del transductor PZ52. Parte cóncava (izquierda) y parte convexa (derecha)

A partir del modelado 3D se ha podido realizar además un plano del transductor (figura 12), que contiene además las medidas más significativas de este tipo de transductor ultrasónico.

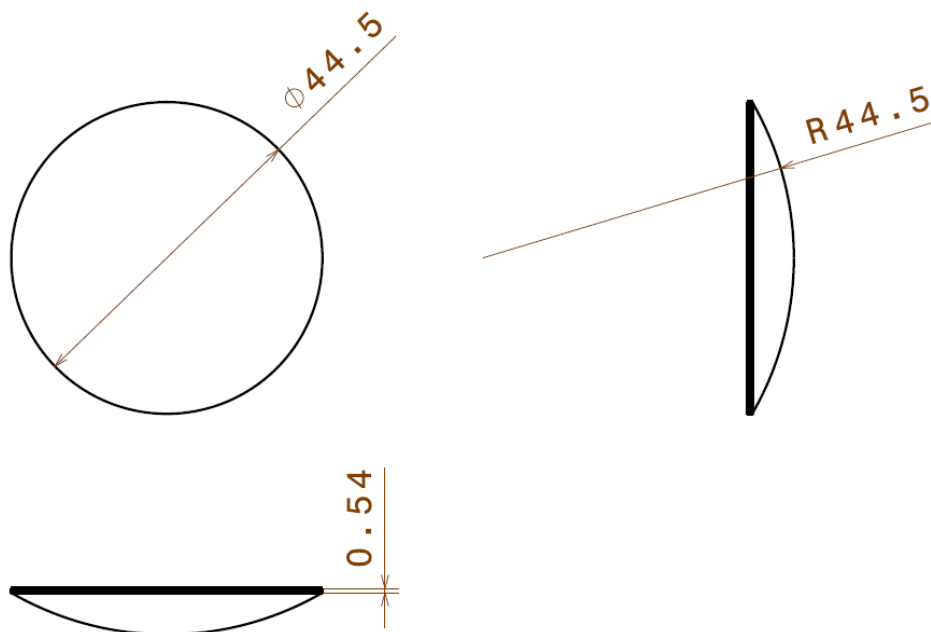


Figura 12 – Plano con alzado (arriba, izquierda), planta (abajo) y perfil (arriba, derecha) del transductor PZ52

En la misma figura se puede apreciar el alzado, la planta y el perfil del transductor PZ52. Se puede observar a partir de las vistas que el transductor es esférico, como se mencionó anteriormente, dado que el perfil y la planta son iguales.

En cuanto a las especificaciones, la recopilación de los datos de este tipo de transductor ha sido especialmente compleja dado que estos transductores PZ52 son transductores de prueba gratuitos. Sin embargo, a continuación, se muestran las principales especificaciones de este transductor a una temperatura de 25 °C y una humedad relativa del 70 %.

Propiedad	Valor	Unidad
Dimensiones	Ø 44.5 × 0.54 R44.5	mm
Material	Cerámica PZ52	
Radio de curvatura	44.5	mm
Capacitancia	53.17	nF
Pérdida dieléctrica	0.35	%
Constante dieléctrica	1800	
κ_p	60.4	%
Frecuencia de resonancia	800	KHz (medido experimentalmente)

Tabla 1 – Datos transductor PZ52

Como se puede ver en la tabla, el dato de la frecuencia de resonancia se ha debido obtener mediante experimentación práctica debido a que dicha especificación no la aportó la empresa fabricante a la hora de adquirir los transductores.

Por otra parte, para poder caracterizar aún más el transductor, sea recurrido a un espectrómetro para poder obtener la curva S21 del transductor en frecuencia. Como se puede observar en la figura 13, la curva realiza lo que cabe esperar, ya que posee la misma forma que la que tendría un condensador, que es la clase de comportamiento que tienen los transductores. Esto es así ya que la morfología de los mismos es igual que la de un condensador: dos placas de material conductor (plata) separadas por un dieléctrico (cerámica).

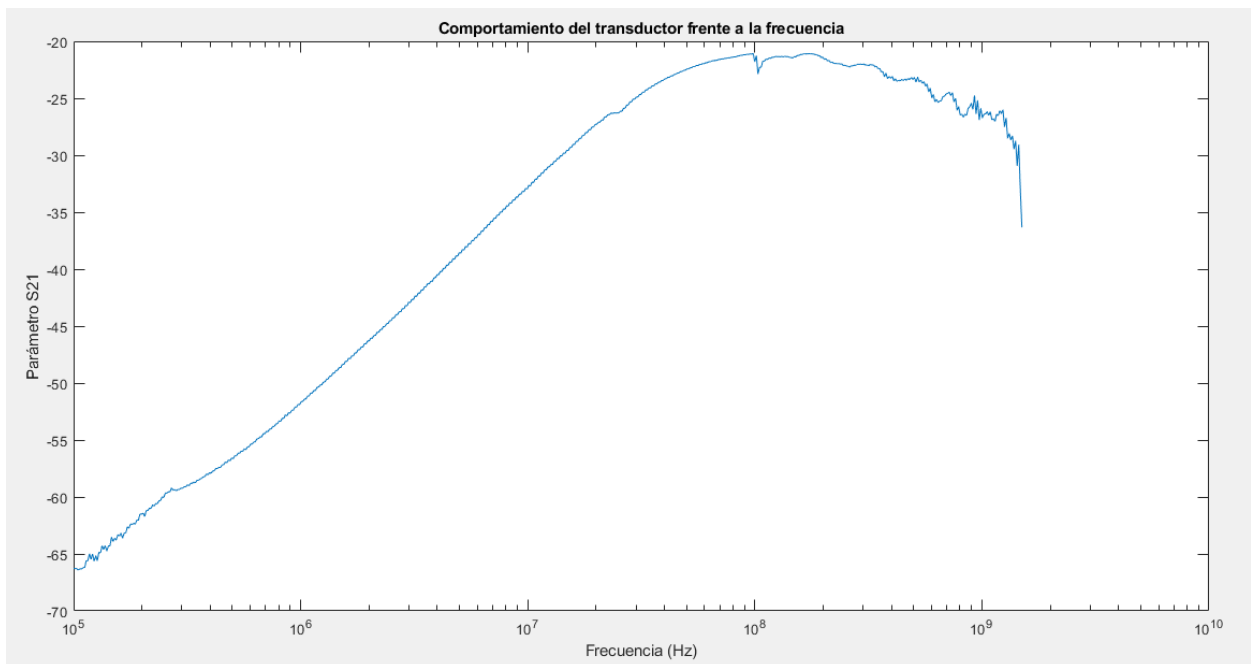


Figura 13 – Plano con alzado (arriba, izquierda), planta (abajo) y perfil (arriba, derecha) del transductor PZ52

La figura anterior ha sido representada con ayuda del software MATLAB, el cual ha tomado los datos de un fichero de Excel donde se encontraban almacenados. Dichos datos han sido obtenidos, como se comentó anteriormente, con un espectrómetro.

Finalmente, se adjunta a continuación algunas imágenes del transductor PZ52 reales. Dichas imágenes han sido tomadas en el laboratorio.

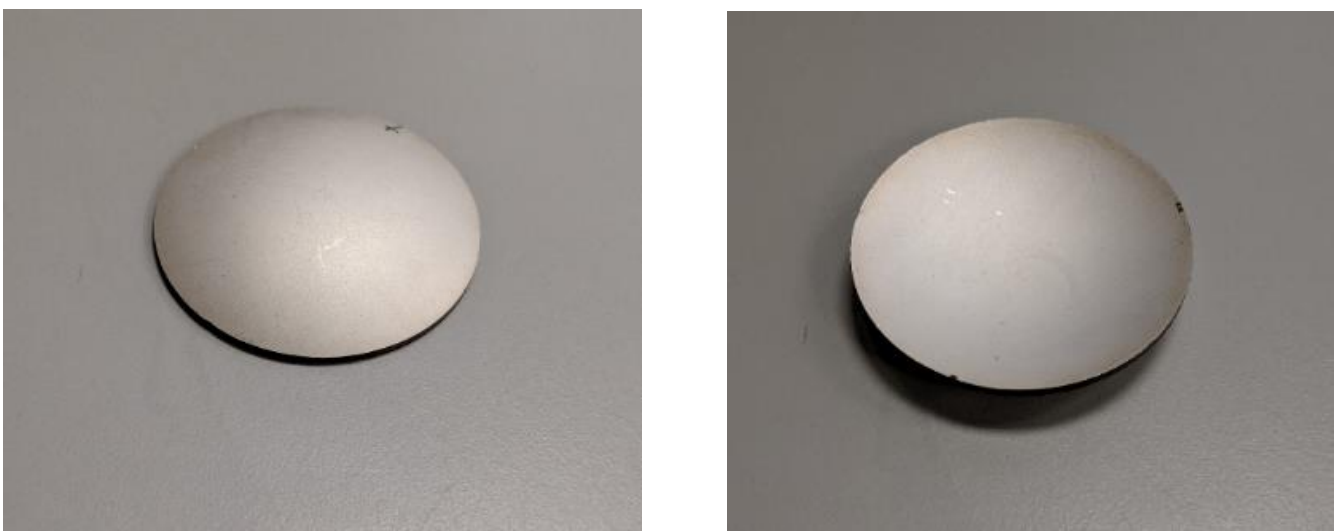


Figura 14 – Foto del transductor PZ52. Parte cóncava (izquierda) y parte convexa (derecha)

4.3.2 Transductor PZT-8

El transductor PZT-8 es el más grueso y grande de los dos que se han tenido en cuenta a la hora de realizar este proyecto. Este es el transductor que originalmente se iba a implementar en el sistema dado que sus características son muy favorables al propósito del sistema que se quiere construir. Posteriormente se comentarán sus características.

Este transductor ha sido proporcionado por la empresa china *SHANDONG WELINK TRADING CO.,LTD.*

A continuación, como con el transductor anterior, se va a presentar el modelo 3D que se ha realizado del mismo para poder tener una mejor visualización del mismo.

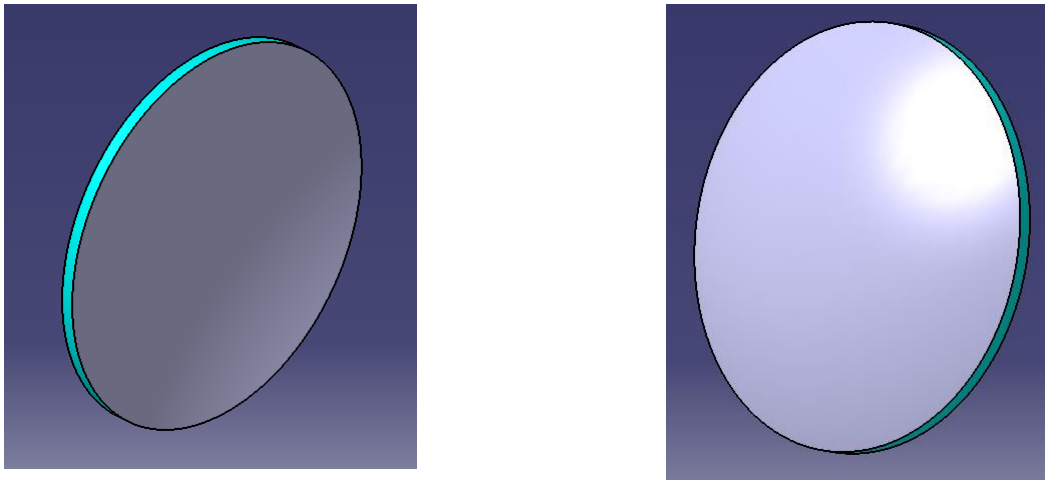


Figura 15 – Modelo 3D del transductor PZT-8. Parte cóncava (izquierda) y parte convexa (derecha)

En la imagen anterior se puede apreciar que este transductor es considerablemente más grueso que el anterior. Esto conlleva cambios en su comportamiento físico cuando se le somete una diferencia de potencial. Esto se comentará más en profundidad posteriormente. Además, también es mayor en cuanto a la dimensión radial.

De igual modo, el modelo 3D del transductor permite poder realizar los planos del mismo con las medidas más representativas para tener una idea general de las dimensiones del PZT-8.

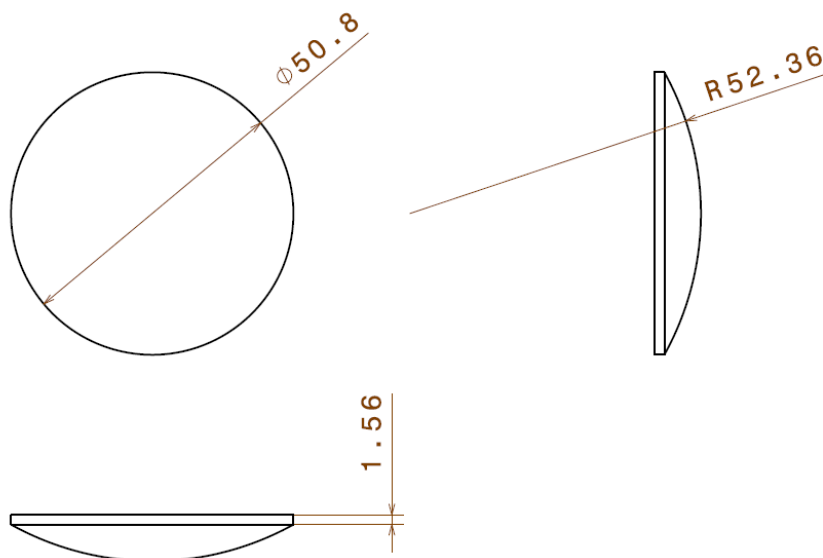


Figura 16 – Modelo 3D del transductor PZT-8. Parte cóncava (izquierda) y parte convexa (derecha)

En cuanto a las especificaciones del transductor PZT-8, al igual que ocurre con el PZ52, ha sido un proceso complejo llegar a obtener sus especificaciones principales. La razón de esto es que, cuando este transductor fue adquirido, no adjuntaba ningún *datasheet* con las especificaciones de este. Sin embargo, recientemente se volvió a contactar con el fabricante para solicitar la información del transductor. Desafortunadamente, el fabricante no nos la pudo proporcionar dado que los transductores son hechos a medida, y para poder expedir un *datasheet*, antes deben hacer pruebas con los mismos. Sin embargo, gracias a los experimentos en el laboratorio y a diversos justificantes de compra, se ha logrado estimar las principales dimensiones y frecuencia de resonancia del transductor, especificadas en la tabla 2.

Propiedad	Valor nominal	Valor medido	Unidad
Diámetro	50.8	50.6	mm
Espesor		1.56	mm
Radio de curvatura	50.8	50.6 (suponiendo esfera)	mm
Frecuencia de resonancia nominal	1.5	1.3	MHz
Impedancia		5 ÷ 15	Ω
Capacitancia parásita en el entorno de la resonancia		14	nF
Material	Cerámica PZT-8		

Tabla 2 – Datos transductor PZT-8

Cabe comentar que este cristal deberá generar ultrasonidos de entre 50 a 100 W de potencia. Entonces, debido a su extremada baja impedancia cabe esperar la aparición de picos de corriente de hasta 10 A.

4.3.3 Comparación entre ambos transductores

Una vez analizadas las características de ambos piezoeléctricos, es necesario compararlos para determinar cuál de ellos es más afín a los propósitos para los que se va a utilizar.

Para ello es necesario recordar cuál es el propósito de los transductores: poder provocar un gradiente alto de temperaturas sobre una muestra criopreservada. De esta forma, la capacidad de aumentar la temperatura va ligada a la potencia que es capaz de transmitir el transductor. Asimismo, a mayor grosor del transductor (o dimensiones en general) mayor potencia es capaz de transmitir. Consecuentemente, se deduce que el transductor que más conviene para este proyecto es el transductor de mayores dimensiones, es decir, el PZT-8.

4.4 Soportes

El soporte del transductor es un dispositivo necesario en la elaboración del sistema de calentamiento ya que será la pieza donde irá colocado el transductor durante el funcionamiento del sistema.

En cuanto a las características principales de este se encuentran:

1. Debe ser estanco ya que el entorno de trabajo será baños de agua.
2. Debido al elevado precio del cristal, el diseño debe permitir la fácil y segura recuperación del mismo en el caso de que el montaje no cumpla con los requisitos funcionales esperados.

A la hora de diseñar dicho soporte, por tanto, se han propuesto varias alternativas de tal manera que cada cual es una versión mejorada de la anterior.

4.4.1 Soporte cilíndrico con hueco simple

4.4.1.1 Diseño

La primera opción que se ha tenido en cuenta a la hora de realizar el diseño del soporte del sistema consiste en una pieza con forma de cilindro hueco de tal forma que el transductor fuese apoyado en alguna de las bases del cilindro. El diámetro del cilindro debe de ser ligeramente menor que el radio del transductor de forma que el transductor se mantenga sin que caiga por el hueco interior.

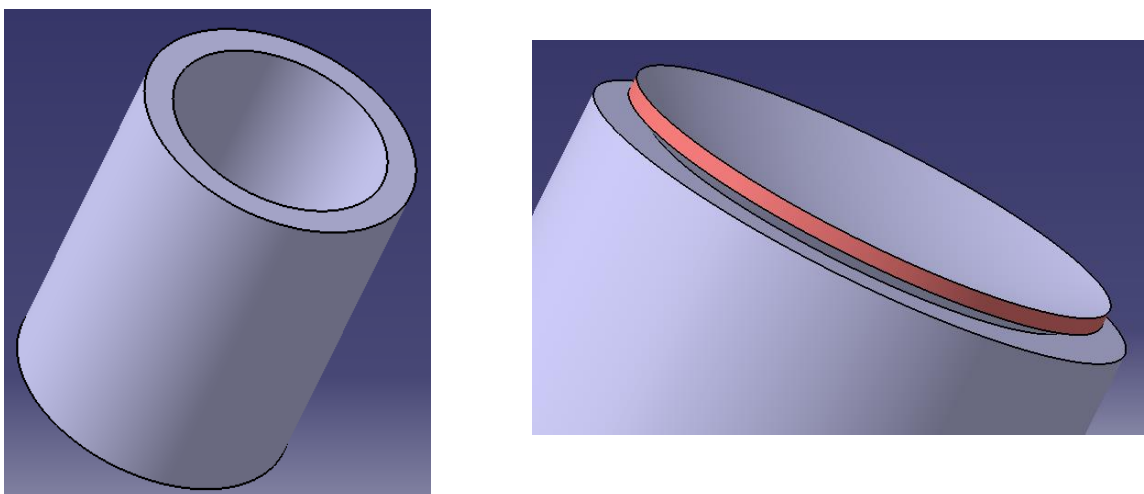


Figura 17 – Modelo 3D del soporte para el transductor PZT-8. Vista general 3D (izquierda). Detalle de la base con el transductor PZT-8 apoyado (derecha)

La figura anterior muestra el diseño del soporte cilíndrico para el caso del transductor PZT-8 (transductor grueso), sin embargo, un proceso de diseño completamente análogo se hace para el caso del transductor PZ52 (transductor fino) sin más que reducir el diámetro de tal forma que el transductor no caiga al apoyarse sobre la base del tubo.

A continuación, se muestran las vistas isométricas de este tipo de soporte tanto para el modelo PZT-8 como para el PZ52.

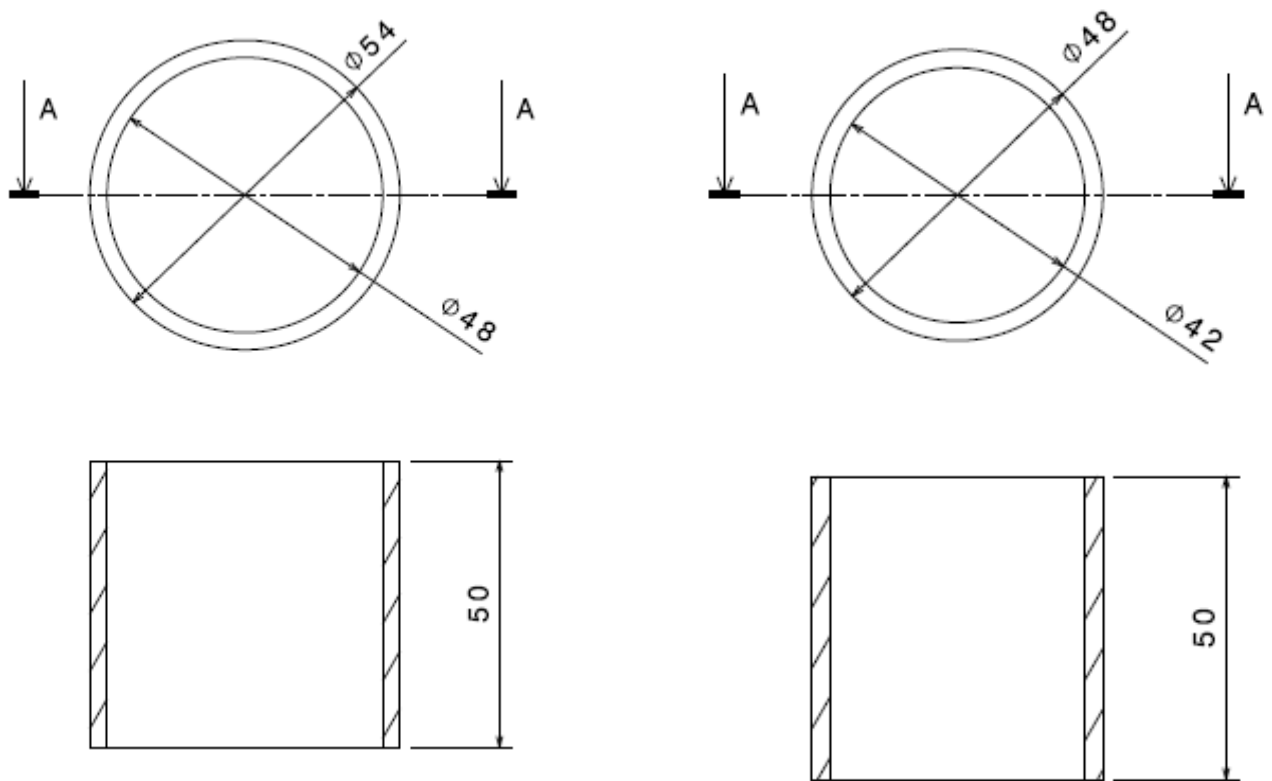


Figura 18 – Vistas del soporte cilíndrico para el transductor PZT-8 (izquierda) y para el PZ52 (derecha)

4.4.1.2 Construcción

Una vez hecho el diseño CAD del soporte, para construirlo se ha hecho uso de la impresión 3D.

Previamente también se han explorado otras alternativas como tubos ya fabricados de PVC comercial. Sin embargo, esta posibilidad ha sido descartada debido a que los diámetros de dichos tubos comerciales no se ajustaban al rango de diámetros compatibles con los transductores que se manejan en el laboratorio.

De este modo, para poder materializar el tubo se ha usado la impresora 3D *Prusa i3*, que se encuentra en el laboratorio. Así como el software de diseño ha sido *CATIA*, el programa utilizado para convertir el modelo 3D en una serie de códigos entendibles por la impresora ha sido el software *CURA*. Este programa se dedica a laminar el modelo 3D de forma que se pueda realizar capa a capa. En la siguiente figura, a la derecha, se puede apreciar una de las capas que el software ha generado. El mismo movimiento que se ve en la simulación ha sido reproducido por la impresora 3D para poder obtener el soporte.

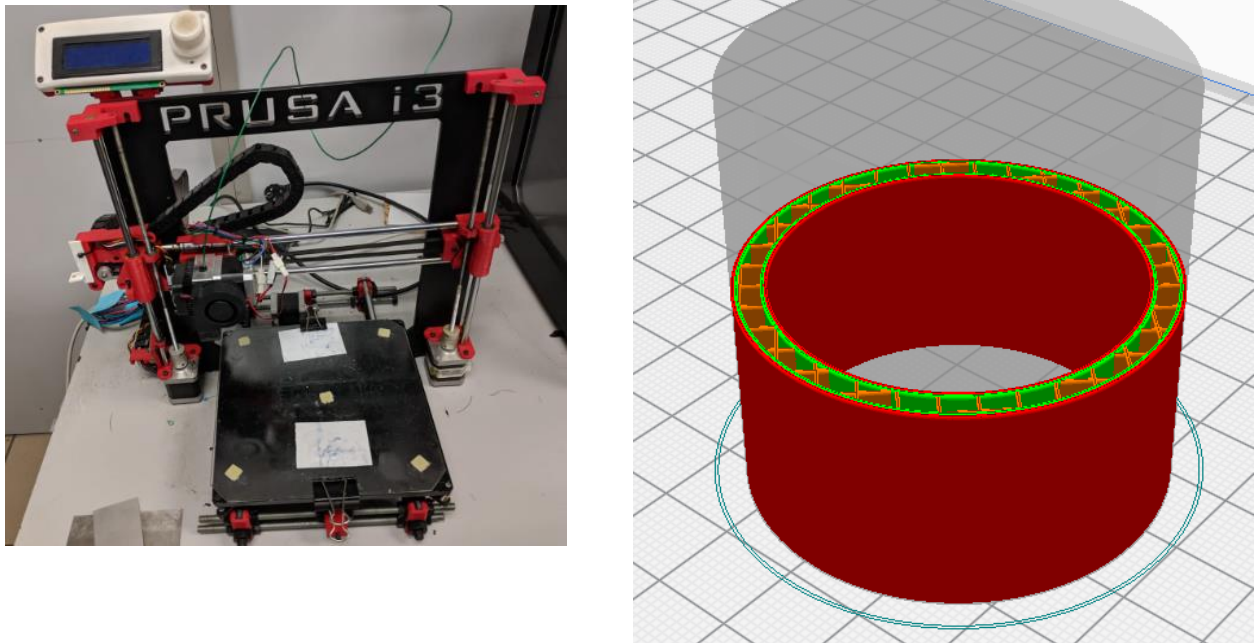


Figura 19 – Impresora *Prusa i3* (izquierda). Detalle de la simulación de la construcción del tubo con el software *CURA* (derecha)

Por otra parte, el material que se ha usado para fabricar el tubo ha sido PLA, un material muy usado en impresión 3D debido a su rápida solidificación y maleabilidad, así como su bajo coste. Su punto de fusión se encuentra entorno a los 100 °C. Sin embargo, la impresora trabaja a una temperatura de 200 °C para asegurar la completa fusión homogénea del material. Una vez el material se ha fundido, este solidifica inmediatamente después, quedando sólidamente depositado donde el extrusor haya estado posicionado.

De este modo, el resultado final de la impresión es el que se muestra en la siguiente imagen.

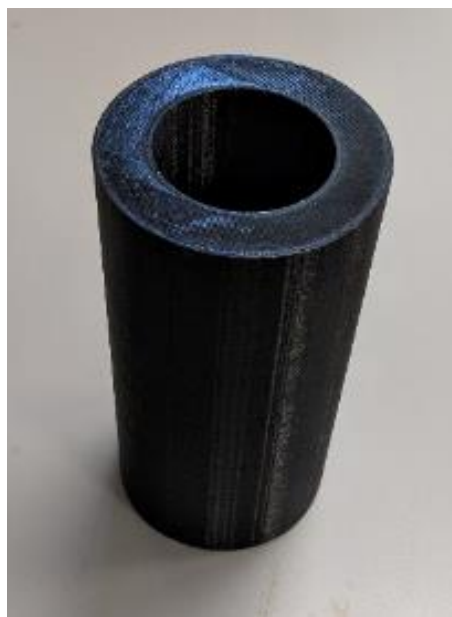


Figura 20 – Soporte cilíndrico de PLA para transductor PZT-8 impreso 3D

4.4.1.3 Ventajas e inconvenientes

A continuación, se presentan las ventajas e inconvenientes de este tipo de soporte.

Ventajas	Inconvenientes
Diseño simple y fácil de proyectar	Es difícil asegurar la estanqueidad debido a que el contacto del cilindro con el transductor es a través de una línea curva
Fabricación simple ya que la forma cilíndrica se encuentra comercialmente	La fijación del transductor en el soporte es inestable debido a que el contacto, como se ha dicho anteriormente, se produce a través de una línea curva
Impresión 3D sencilla sin necesidad de soportes para estructuras en voladizo	
Fabricación rápida	

Tabla 3 – Ventajas e inconvenientes del soporte cilíndrico hueco

Los inconvenientes de este tipo de diseño son de suma importancia. Es por ello por lo que se ha decidido el diseño de un nuevo soporte antes de proceder con el montaje.

4.4.2 Soporte cónico

4.4.2.1 Diseño

Una vez descartado el diseño anterior debido al peso de sus inconvenientes, se ha optado por realizar un diseño más sofisticado. Este consiste en un soporte cilíndrico cuya base superior cuenta con un rebaje cónico en el cual el transductor se queda encajado de tal manera que su cara cóncava queda completamente a ras de la base del soporte. La siguiente imagen muestra el diseño 3D del soporte.

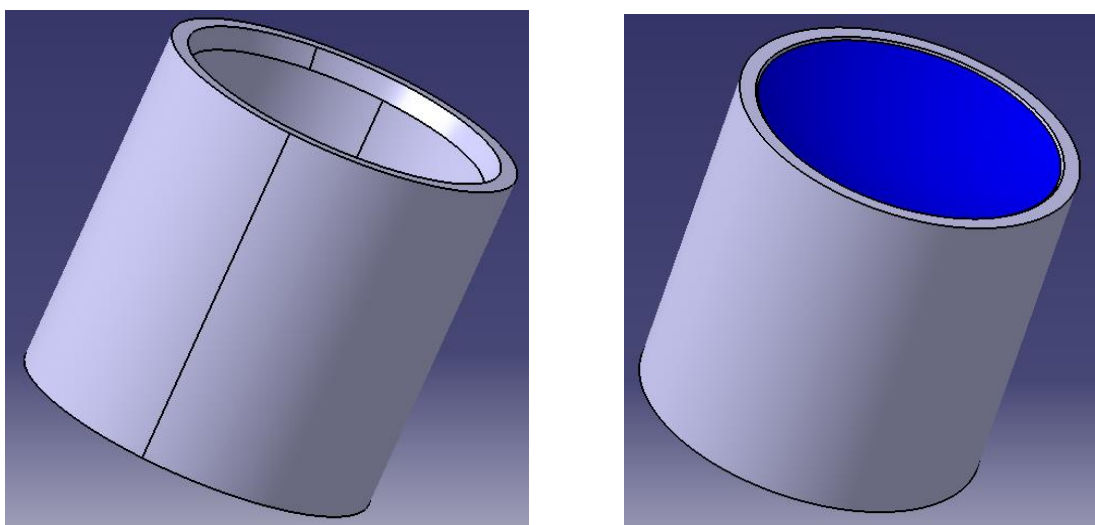


Figura 21 – Diseño 3D del soporte cónico (izquierda). Soporte cónico con transductor posicionado (derecha)

La imagen anterior muestra el diseño 3D del soporte para el transductor PZ52 (transductor pequeño). Como en el caso anterior, el mismo diseño se realiza para el caso del PZT-8 sin más que cambiar los diámetros del modelo para que encaje con las medidas del transductor.

A continuación, se muestran las vistas CAD de este tipo de soporte, tanto para el PZT-8, como para el PZ52, con las medidas más significativas. En la imagen se puede observar el rebaje cónico que presenta el soporte. El diámetro superior del cono es mayor que el diámetro nominal del transductor. Por otra parte, el diámetro inferior del cono es menor que el diámetro nominal del transductor. Consecuentemente se asegura que en un punto intermedio de la altura del cono el transductor se quedará encajado.

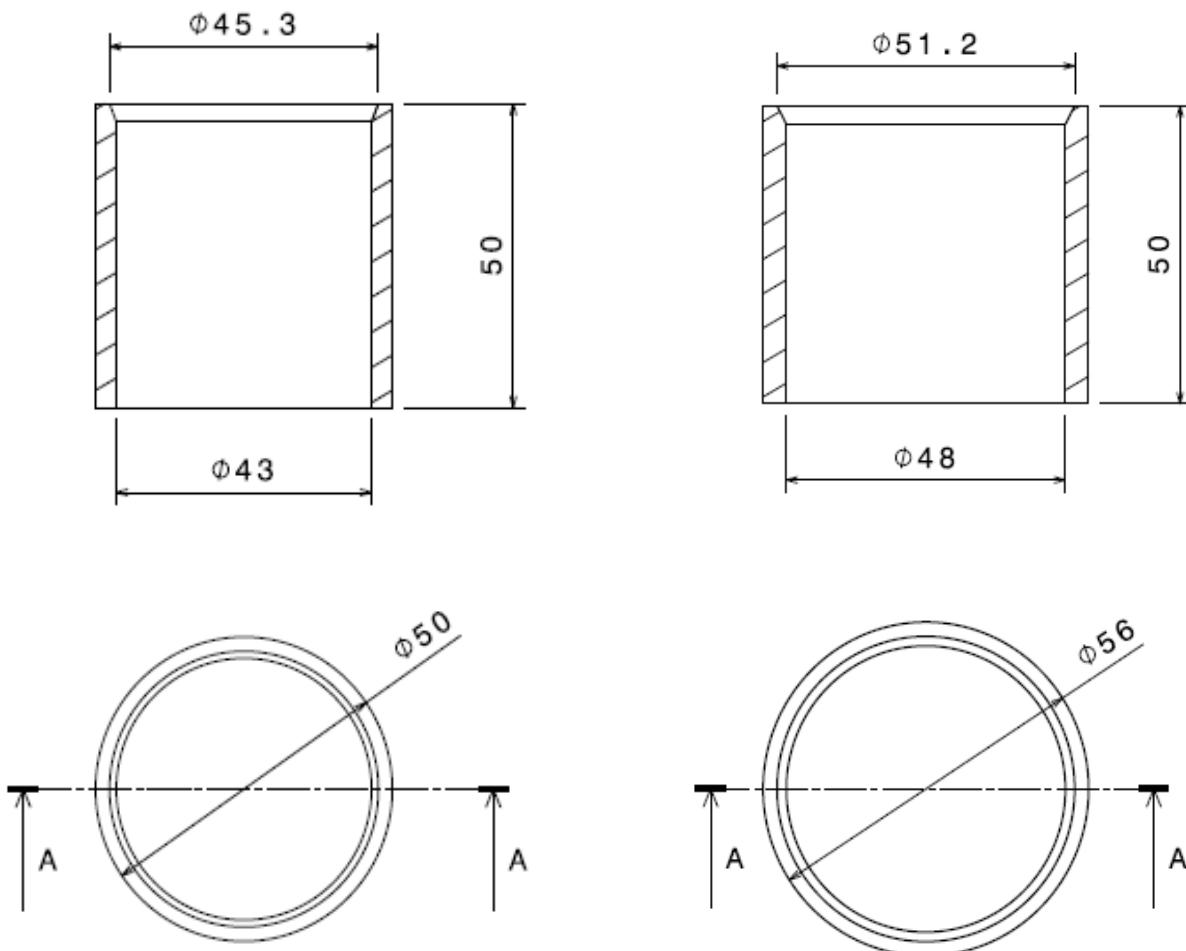


Figura 22 – Vista de planta y corte longitudinal del soporte cónico con medidas significativas para el transductor PZ52 (izquierda) y para el PZT-8 (derecha)

4.4.2.2 Construcción

En cuanto a la construcción de este soporte, se ha realizado de la misma manera que el soporte anterior cilíndrico: se ha procedido a la impresión 3D. De esta forma han sido usados el mismo software y las mismas técnicas e impresora. Una vez realizado el diseño 3D del soporte cónico mediante el software *CATIA*, al igual que en el modelo anterior, se ha sometido al software *CURA* para su correspondiente laminación: el modelo se ha transformado en coordenadas de tal forma que la impresora 3D lo pueda leer e imprimir.

Seguidamente, se muestra una imagen con los soportes de ambos transductores ya impresos. En la parte superior, aunque muy sutilmente, se puede observar el rebaje cónico de los soportes.



Figura 23 – Vista de planta y corte longitudinal del soporte cónico con medidas significativas para el transductor PZ52 (izquierda) y para el PZT-8 (derecha)

4.4.2.3 Montaje

Debido a que este diseño parecía más prometedor, se procedió al montaje del transductor PZ52 sobre este soporte. Se escogió el PZ52 en vez del PZT-8 porque se disponía de más unidades del PZ52 y, por ende, si hubiese cualquier imprevisto, este se podría sustituir.

En primer lugar, se ha conectado los electrodos al transductor, y posteriormente, este ha sido unido al soporte cónico. Para aumentar el área de contacto entre el transductor y el electrodo, se ha elegido papel de cobre en vez de cable como elemento de unión al piezoeléctrico. Posteriormente, para sellar y unir el transductor al soporte se ha usado resina epoxi para asegurar la estanqueidad. Igualmente, para unir el transductor con el papel de cobre, se ha hecho uso de una resina epoxídica cargada de plata, la cual garantiza el contacto eléctrico.

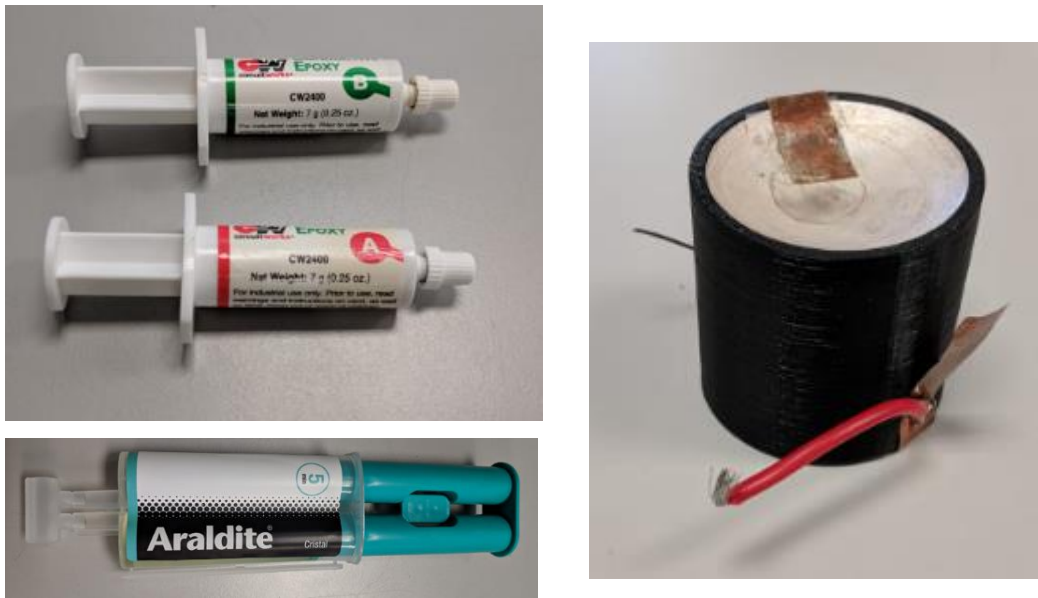


Figura 24 – Resina epoxídica cargada de plata (superior izquierda). Resina epoxi (inferior izquierda). Soporte cónico con transductor PZ52 montado

4.4.2.4 Ventajas e inconvenientes

A continuación, se presenta una tabla con las ventajas e inconvenientes de este tipo de soporte.

Ventajas	Inconvenientes
Diseño simple y fácil de proyectar	No se dispone de un medio seguro más que el sellador para garantizar la estanqueidad
Fabricación simple y a medida mediante impresión 3D	El contacto que se produce con el transductor es casi puntual, no siendo seguro debido a los grandes picos de intensidad que se producen
Impresión 3D sencilla sin necesidad de soportes para estructuras en voladizo	
Fabricación rápida	
Se refuerza la estanqueidad del sistema gracias al rebaje cónico	

Tabla 4 – Ventajas e inconvenientes del soporte cónico

4.4.3 Soporte definitivo

4.4.3.1 Diseño

Dado que sólo se disponía de un transductor tipo PZT-8, se ha decidido no montar este sobre el diseño cónico debido que, aun siendo el diseño mejorado del cilíndrico, todavía presentaba algunos inconvenientes que debían ser mejorados. Por esta razón, se ha decidido diseñar un tercer y último soporte que corrigiera todos los errores de los anteriores.

Dicho soporte ha sido diseñado y construido en colaboración con la empresa *MicroAphotec SL* y el cual está compuesto por una concatenación de cilindros de distintos radios. El primero de ellos (A), cuyo interior está metalizado, va en contacto con el cristal. Un segundo cilindro metalizado parcialmente (A') sustenta el cristal, el cual se asegura mediante resina epoxi (G). Por otra parte, un tercer cilindro (C) aumenta la cámara interior hasta un volumen adecuado para minimizar la generación de calor perdido. A continuación, un cuarto cilindro (B) asegura la estanqueidad de la cámara de aire (J), sellando la unión entre (A) y (C). El cable (H) queda inmobilizado por otro tubo (D), el cual se encuentra totalmente lleno de resina epoxi, y termina conectando con los electrodos interiores. Finalmente, un tapón estanco y removible (L) permite el drenado del líquido que pudiera pasar al interior de la cámara.

La adición de dicho tapón tiene un carácter meramente redundante ya que la estanqueidad ha quedado demostrada al someterse el soporte a una presión positiva de hasta 3 bares para comprobar la ausencia de fugas.

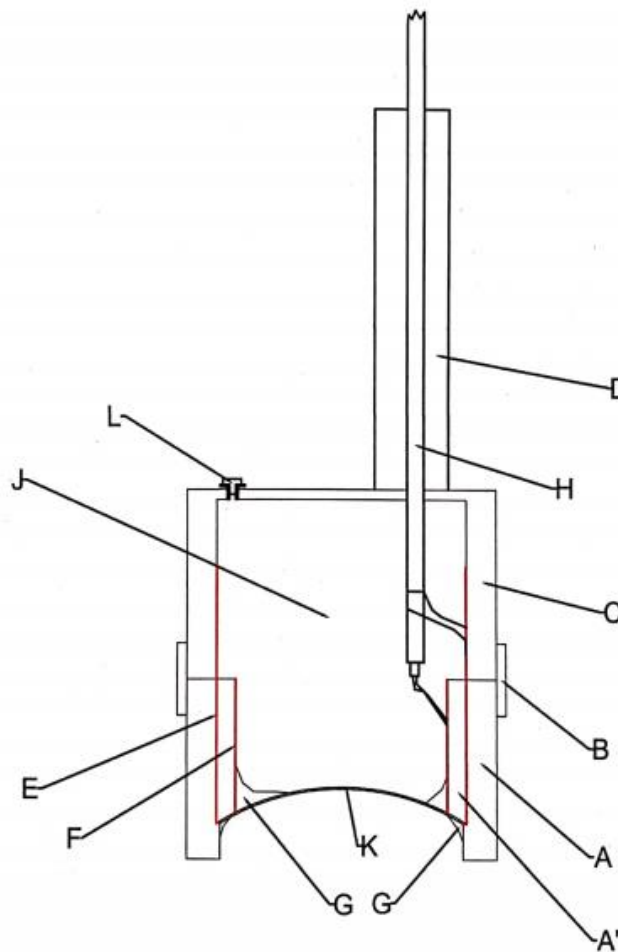


Figura 25 – Esquema del soporte definitivo para el transductor PZT-8

4.4.3.2 Construcción

En cuanto a la construcción del soporte, este se ha realizado con un método distinto a la impresión 3D ya que los materiales empleados ofrecen más resistencia que la que posee el plástico PLC con el que se han fabricado los otros soportes. De esta forma, este soporte definitivo se ha llevado a cabo mediante el mecanizado de piezas y tubos de PVC para ajustarlos a las medidas requeridas por el sistema. Por otra parte, el metalizado de la parte interior de los cilindros se ha realizado siguiendo la técnica del coloide de paladio. En esta técnica se realiza una solución coloidal de paladio con cloruro de estaño II. Posteriormente se baña la parte a metalizar y el metal queda adherido a las paredes. Para facilitar la adhesión es frecuente un ataque ácido.

Los pasos seguidos para el mecanizado de la pieza son los siguientes:

1. Torneado del cilindro principal. Se realiza un canal para la posterior absorción del rebose de la resina epoxídica de plata.
2. Se metaliza el interior del cilindro. El metalizado tiene una profundidad de 30 micras. El metalizado se engruesa mediante cobre galvánico. Se ha decidido hacer así de grueso para soportar los altos picos de corriente que circularán por la capa de metal.
3. Se procede al pegado del transductor PZT-8 en una de las bases del cilindro con la resina de plata. Previamente se aplica una máscara vinílica para evitar el cortocircuito si la resina contacta los dos electrodos del transductor.
4. Se aplica la primera capa de resina epoxi de plata que contacta el electrodo interno.
5. A continuación, se aplican 5 capas de resina epoxi que aísla el electrodo interno.
6. Posteriormente se procede a la mecanización de la cubierta superior y metalizado de la misma.

Las siguientes imágenes muestran el proceso anteriormente descrito gráficamente. El número que se encuentra en la parte superior izquierda de la imagen coincide con el número del paso del proceso de construcción del soporte.

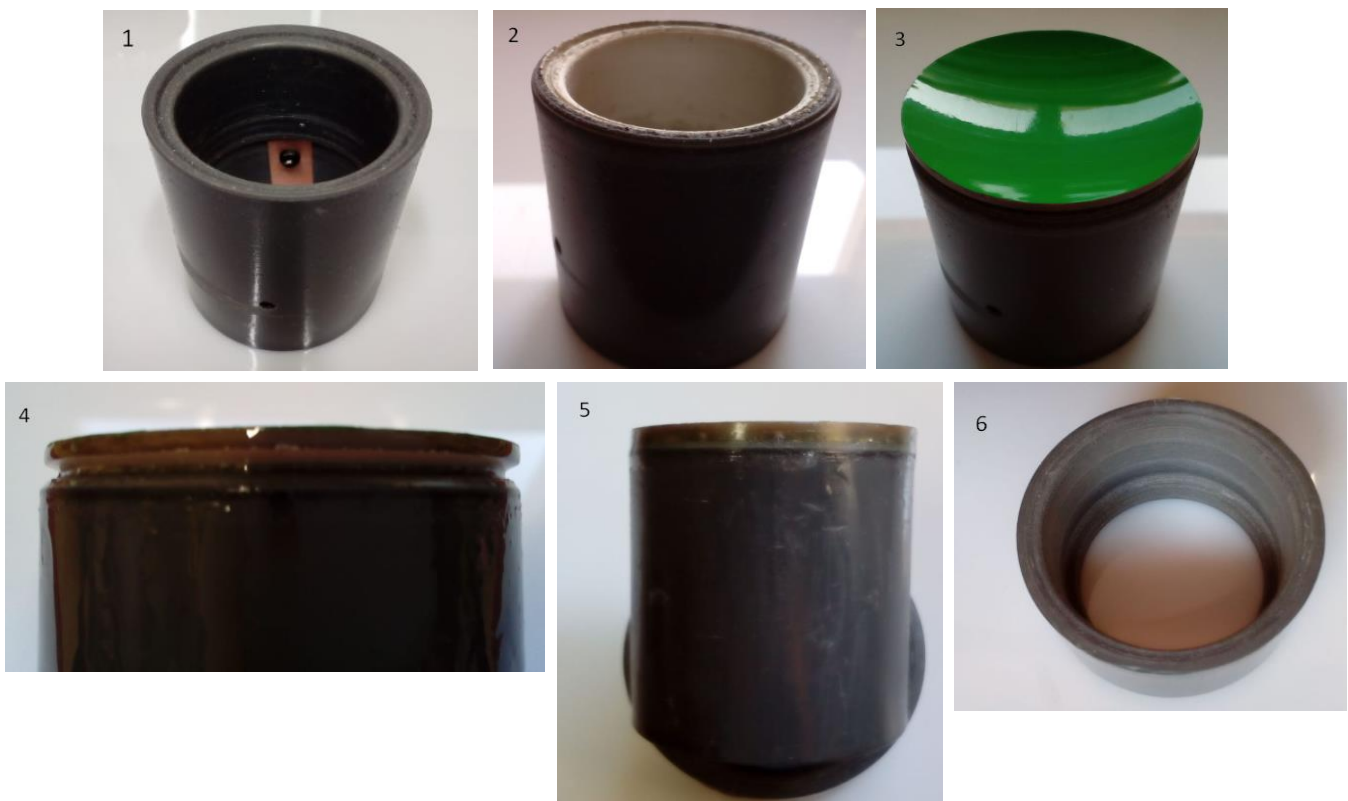


Figura 26 – Pasos seguidos para la construcción del soporte del PZT-8

Finalmente, una vez realizado el montaje completo del soporte definitivo, se ha procedido a realizar la prueba de estanqueidad que, como se comentó anteriormente, el soporte ha sido sometido a una presión interna positiva de hasta 3 bar para comprobar que efectivamente no hay fugas.



Figura 27 – Vista del soporte finalizado mientras se realiza la prueba de estanqueidad

En la imagen anterior se puede apreciar el dispositivo finalizado. En el lugar que ocupa el tapón de silicona original se ha colocado un tubo que suministra aire a presión en el interior.

4.5 Etapa amplificadora

Esta, sin lugar a duda, es la etapa más compleja del diseño del sistema de calentamiento con ultrasonidos. Por ello, han sido propuestas múltiples opciones a la hora de amplificar el sistema, muchas de ellas sin éxito. Principalmente, esto se ha debido a que la carga del amplificador, el transductor, es muy compleja de caracterizar, además de la dificultad implícita que tiene realizar un amplificador.

4.5.1 Generador de señales ultrasónico

En el laboratorio se cuenta con un generador de señales ultrasónico, el cual es un generador de señal senoidal a una frecuencia ultrasónica, con la particularidad de que a la salida transmite una potencia considerable. Es por esto por lo que se ha incluido dentro de las alternativas amplificadoras para el sistema de calentamiento ultrasónico.

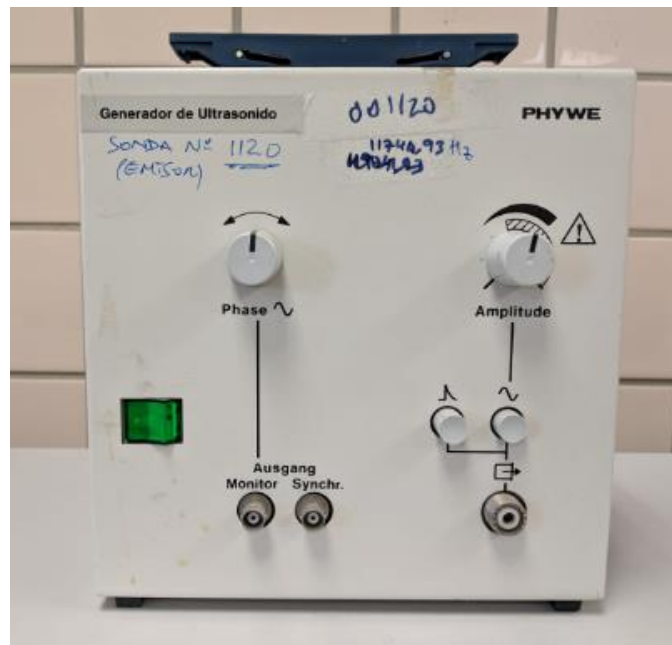


Figura 28 – Generador ultrasónico

En la imagen anterior se puede observar el generador de señales ultrasónico. Este posee en su lado izquierdo el botón de encendido y apagado. Posteriormente, más a la derecha posee un regulador de fase, que como se comentó anteriormente, sirve para modificar el foco de los ultrasonidos en el caso de contar un array. Abajo se encuentra una salida mediante un cable BNC a un osciloscopio para poder monitorizar la señal. Por último, en el lado derecho se encuentra un selector de amplitud con el que se puede graduar la intensidad de la señal de salida, así como un selector de señal: para el propósito del trabajo interesa la señal seno. Abajo está la salida, que mediante un cable UHF (Ultra High Frequency) se conecta al transductor ultrasónico.

La desventaja en este tipo de sistema se encuentra en que no posee un selector de frecuencias ya que esto complicaría en gran medida el diseño del generador. Con la inconveniencia de que la frecuencia de trabajo de los transductores no coincide con la frecuencia proporcionada por el generador de ultrasonidos. Este hecho provoca que este método no sea válido para el sistema de calentamiento propuesto.

4.5.2 Amplificador lineal

Otras de las alternativas que se ha investigado a la hora de amplificar el sistema de calentamiento es el uso de un amplificador ya fabricado. De este modo se ha recurrido a un amplificador lineal de radio.



Figura 29 – Amplificador lineal RM KL 203-P

En la imagen superior se puede observar el amplificador que se ha usado: el RM KL 203-P, el cual se trata de un amplificador de radioaficionado.

En cuanto a sus especificaciones, son las que se observan en la siguiente tabla.

Especificación	Valor	Unidad
Frecuencia de trabajo	20 ÷ 30	MHz
Tensión de suministro	12 ÷ 14	Vcc
Energía de entrada	0.5 ÷ 10	W
Potencia de salida máxima	100	W
Tamaño	109 × 125 × 35	mm
Peso	325	g

Tabla 5 – Especificación amplificador RM KL 203-P

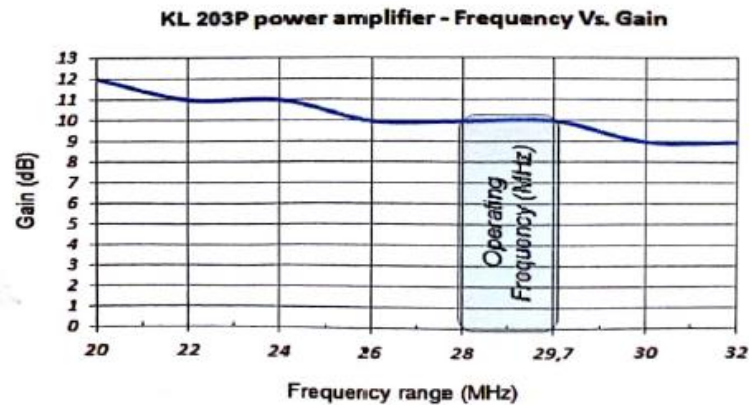


Figura 30 – Representación de la ganancia del amplificador RM KL 203-P frente a la frecuencia

Como se puede ver en la tabla, la potencia de salida es idónea para el propósito de recalentamiento ya que la potencia buscada es de 50 – 100 W. Sin embargo, se puede también observar dos problemas: la energía de entrada puede no ser suficiente y la frecuencia de trabajo no coincide con la especificación de los transductores.

Para intentar solventar el primero de los problemas, se adquirieron distintos preamplificadores, los cuales permitirían amplificar la señal hasta tal punto que fuese factible su entrada en el amplificador lineal. La siguiente imagen muestra los preamplificadores.

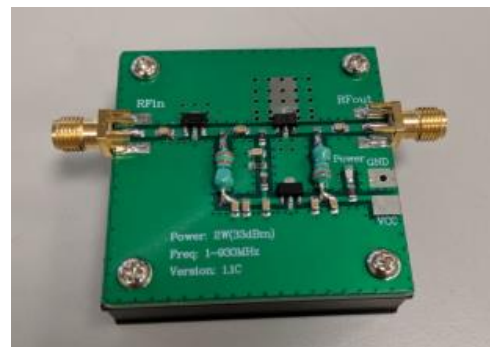
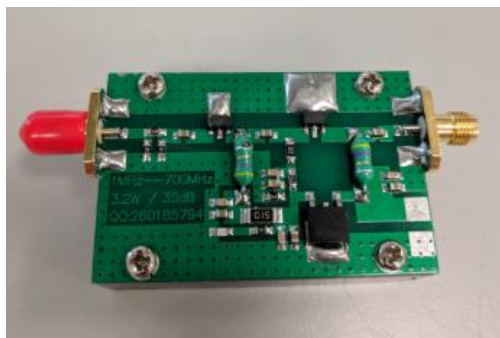


Figura 31 – Preamplificadores

El segundo de los problemas se intentó salvar argumentando que, a pesar de que la frecuencia de trabajo del amplificador estaba restringida de 28 a 29.7 MHz, el diagrama de ganancia mostraba que la misma aumentaba cuando la frecuencia disminuía. Por lo tanto, era factible que, a la frecuencia de 1 MHz, el amplificador todavía pudiera seguir amplificando.

Sin embargo, tras varias pruebas realizadas en el laboratorio, se pudo observar que efectivamente, este amplificador se comportaba como un filtro paso-alto de tal forma que a la frecuencia de 1 MHz la ganancia se volvía nula.

Por esta razón, este método de amplificación tuvo que ser igualmente rechazado: no se cumplía el criterio del acoplamiento de frecuencias.

4.5.3 Circuito amplificador de Sterling

Paralelamente a los métodos anteriores, se intentó la fabricación del sistema de calentamiento según las pautas de un ingeniero electrónico estadounidense: Sterling Nesbitt. De esta manera, el transductor PZT-8 fue recomendado por él para su uso en calentamiento mediante ultrasonidos.

Por otra parte, junto a este transductor, también ha sido recomendado un circuito amplificador aparentemente simple para hacer funcionar el transductor y hacer que este emita ondas de presión con la suficiente intensidad como para calentar agua a 100 °C en pocos segundos. El diseño esquemático del circuito es el que se presenta en la siguiente figura.

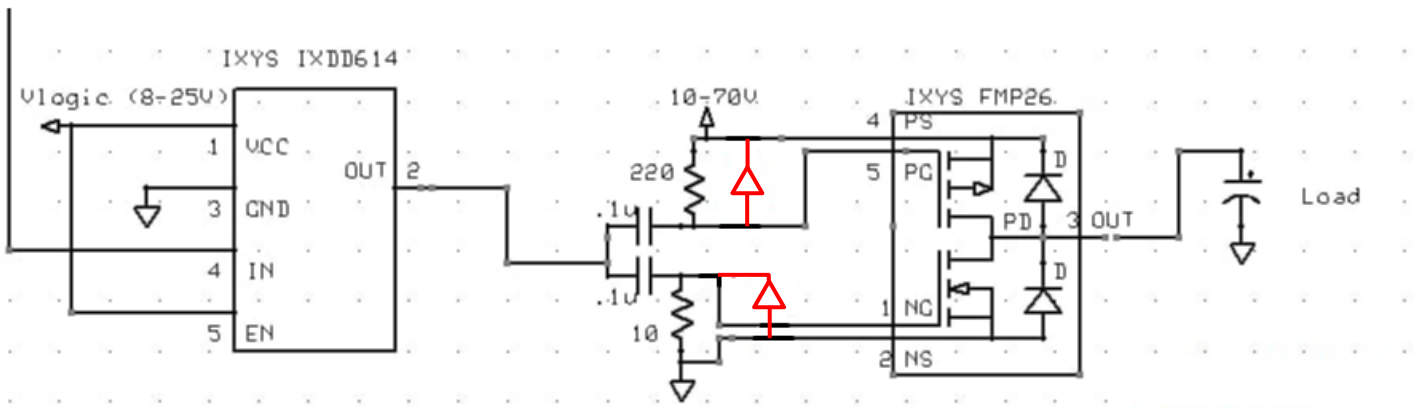



Figura 32 – Diseño esquemático del circuito amplificador de Sterling


Para realizar el circuito se han adquirido los distintos componentes que se requieren para su montaje. En la siguiente tabla se muestran los componentes principales.

Componente	Descripción	Imagen
IXYS IXDD614	<p>Se trata de un circuito controlador de alta velocidad especializado en controlar los MOSFET IXYS. Son especialmente recomendables para aplicaciones de alta frecuencia y potencia, como es el caso.</p> <p>Es necesario ya que, en los dispositivos de alta potencia, los <i>gates</i> (puertas) son grandes por lo que tienen una capacitancia muy alta. Por lo tanto, el generador de onda necesita generar más amperaje para poder hacer frente a esas capacitancias.</p>	

<p>IXYS FMP26</p>	<p>Este circuito se trata de un MOSFET de potencia adecuado para ir en tándem con el IXYS IXDD614 para amplificación de señales.</p>	
<p>Resistencias</p>	<p>Las resistencias son parte del circuito amplificador. Se han tomado resistencias de valores 220 Ω y 10 Ω de potencia ya que por el circuito circularán corrientes muy altas.</p>	
<p>Condensadores</p>	<p>Al igual que las resistencias, sirven para completar el circuito amplificador. En este caso los valores que se han tomado son de 1 μF.</p>	

Tabla 6 – Elementos principales el circuito de Sterling

Por otra parte, también se han usado otros componentes secundarios a la hora de montar el circuito. Dichos componentes vienen especificados en la tabla siguiente.

Componente	Descripción	Imagen
<p>Fuente de alimentación</p>	<p>Se trata del elemento que proporciona potencia eléctrica de continua a todo el sistema para que funcione.</p>	



<p>Generador de señales</p>	<p>Genera la señal a la frecuencia necesaria. Dicha señal será amplificada posteriormente para alimentar al transductor.</p>	
<p>Osciloscopio</p>	<p>Es el elemento que sirve para visualizar a tiempo real lo que está sucediendo en el circuito. Principalmente es usado para medir la intensidad del voltaje de la señal.</p>	

Tabla 7 – Elementos auxiliares del circuito

Tras haberse reunido todo lo necesario para poder realizar el circuito anteriormente descrito, se ha procedido al montaje de este. De esta forma, el circuito se montó sobre una placa *protoboard*, la cual tiene una matriz de pines interconectados entre sí, de forma que no hace falta soldar para construir el circuito. Sin embargo, tras el montaje y puesta en marcha, los resultados no han sido satisfactorios, ya que la amplificación era más baja que la que se esperaba para la frecuencia de trabajo del PZT-8. Además, debido a las grandes interferencias de onda que usualmente provocan las *protoboards*, la señal a la salida se encontraba muy distorsionada.

Por otra parte, también se ha probado este mismo amplificador a otras frecuencias. A frecuencias más bajas que la de trabajo del PZT-8, se había conseguido una amplificación considerable, aunque igualmente no llegaba al umbral esperado. Sin embargo, esta amplificación ya era considerable para realizar las primeras pruebas. Con una entrada de 20 Vpp (voltios pico a pico), a la salida se consiguió amplificar hasta 40 Vpp.

Sin embargo, este sistema ha planteado un problema. Debido a la alta frecuencia a la que los MOSFET del IXYS IXDD614 debían conmutar, se producía un *crossover* durante un corto periodo de tiempo, es decir, un instante en el que los dos MOSFET conducen al mismo tiempo. Este fenómeno produce la elevación pronunciada de la temperatura en el circuito integrado, haciendo su uso incompatible durante más de unos segundos de funcionamiento.

Es por este motivo que durante el desarrollo de este tipo de amplificador se recurriera a diversos métodos de disipación de calor. Se han probado dos métodos:

1. **Disipadores comunes** – Son los disipadores que se encuentran actualmente en la mayoría de los circuitos que tienden a calentarse. Debido a su gran ratio entre el área en contacto con aire y el volumen, consiguen una disipación elevada. A pesar de su gran poder disipativo, no era suficiente para el calentamiento del circuito integrado. Por eso se procedió a otro método.

2. **Disipador hidráulico** – Consiste en un bloque metálico hueco con un orificio de entrada y otro de salida. La disipación se produce por convección forzada. El calor que genera la corriente eléctrica en el circuito integrado es transmitido mediante conducción al disipador hidráulico. Posteriormente, el agua fría que entra por el orificio de entrada toma este calor de forma que el agua sale por el orificio de salida con una temperatura más elevada. La siguiente imagen muestra el disipador hidráulico junto con los tubos instalados, listo para funcionar.

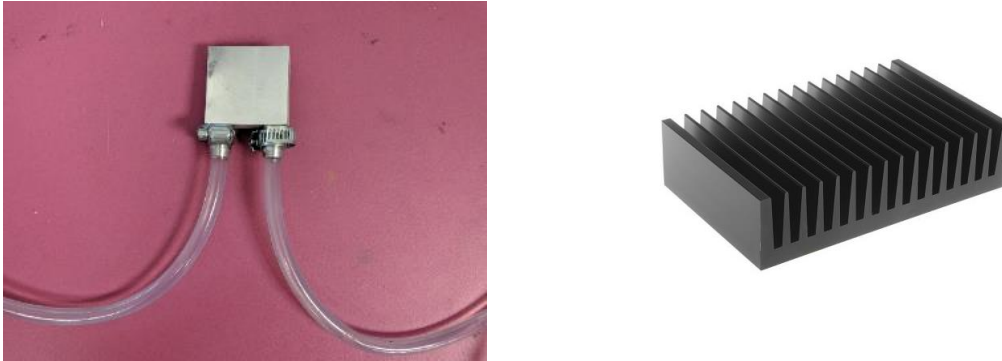


Figura 33 – Disipador hidráulico (izquierda). Disipador de aluminio (derecha)

Finalmente, a pesar del gran poder disipativo de este disipador, la potencia generada a la salida no era suficientemente alta como para satisfacer las necesidades del sistema de calentamiento. Por ello, este circuito ha sido desechado.

4.5.4 Circuito de Sterling modificado

Debido a que ninguna de las opciones anteriores había funcionado, se contactó con la empresa *Microaphotec SL*, tal y como se comentó anteriormente, la cual es especialista en electrónica, en busca de asesoramiento para la construcción del circuito. De esta manera, en colaboración con esta empresa se emprendió la construcción del circuito de Sterling pero en una placa impresa además de con algunos añadidos.

4.5.4.1 Diseño

Tal y como aparece en la figura 34, el circuito es un amplificador de clase D, es decir, que usa el modo conmutado de los transistores (corte y saturación) para regular la entrega de potencia. Su principal componente es un encapsulado fabricado por IXYS, el FMP24 (cuya descripción e imagen se encuentra en el apartado 4.5.3), el cual incluye dos CMOS de potencia, supuestamente pareados y de polaridad contraria. Estos transistores están dispuestos para trabajar en modo fuente (source) común.

Aunque estos CMOS son de una impedancia muy elevada, la excesiva carga requerida para excitar sus puertas (gates) requiere de un excitador (driver) de potencia también elevada. El excitador es recomendado por el fabricante IXYS, el IXDD614. Al igual que el FMP24, este dispositivo se encuentra caracterizado en el apartado 4.5.3.

Para la generación de la onda cuadrada, a diferencia del circuito anterior, se ha implementado un circuito de generación de OC (Onda Cuadrada) basado en el LTC1779, capaz de generar hasta 30 MHz y con gran estabilidad. Igualmente se incorpora un microcontrolador Attiny85 que tendrá funciones de puesta en marcha, supervisión de la botonera de control, control de indicación mediante leds, así como control de los relés que cambian de alta a baja tensión y viceversa.

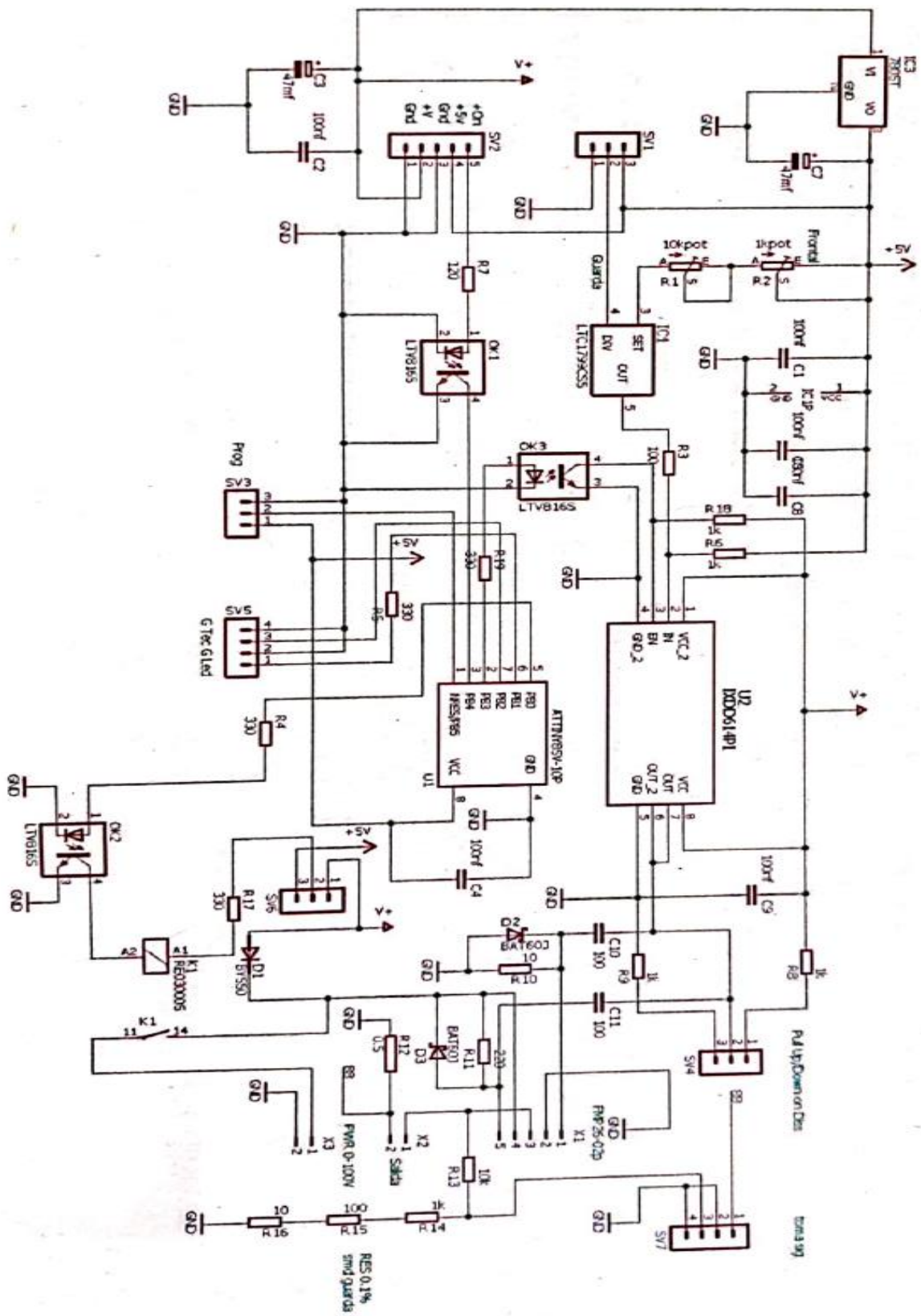


Figura 34 – Circuito modificado de Sterling

Centrándose en la parte amplificadora, se puede observar la peculiaridad de la configuración de diodos y resistencias. En primer lugar, en cuanto a los diodos (D2 y D3), éstos no se suelen emplear en este tipo de topologías (amplificadores de clase D), sí en cambio en amplificadores de audio de clase A o AB. Por otro lado, con relación a las resistencias de polarización R10 y R11, no se comprenden si, tal y como asegura el fabricante del FMP24, ambos CMOS se encuentran pareados.

Finalmente, el circuito también incorpora otras funcionalidades tal como un acoplador en el caso en el que se requiera introducir una señal externa al circuito (por ejemplo, generada por un ordenador o un generador de ondas).

4.5.4.2 Resultado práctico

Una vez montado el circuito, este se ha probado con una carga resistiva pura de 50Ω . Tal y como ocurría en el caso anterior, las excelencias del circuito no eran las esperadas.

En primer lugar, destaca un calentamiento excesivo de la pieza FMP24 (como en el caso anterior), la cual fue refrigerada mediante un sistema de 60 W de refrigeración. Además, los valores de consumo y la forma de onda a la salida, incluso con la carga ficticia resistivamente pura, hacían prever que la vida de los CMOS podría ser limitada.

En esta configuración, los problemas encontrados han sido los siguientes:

1. El driver IXDD614 genera una señal cuadrada de potencia, pero con una autoscilación, no solo preocupante por su figura parásita, sino porque sus picos sobrepasan un 50 % el valor de H y L en las puertas, con el consiguiente riesgo de sobrepasar el valor límite de V_{gs} (normalmente marcado a 20 V) que causarían la destrucción de los CMOS.
2. Para evitar la destrucción de los transistores, ha sido necesario limitar el valor de H del driver, excitando entonces los CMOS con una V_g demasiado baja, incapaz de provocar la saturación necesaria. Esto implica que los CMOS se “abren” con una resistencia interna muy superior a la requerida, lo cual implica disipación de calor. Esta disipación hace decrecer la V_{gs} máxima de los transistores, conllevando nuevamente su destrucción.
3. Otro de los defectos de este circuito es que ambos transistores son alimentados por una única línea de corriente. Esto conlleva el solapamiento de conducción (*crossover*) entre ambos CMOS, es decir, se crean momentos en los que ambos transistores se encuentran totalmente abiertos. Esto genera transitorios de corrientes suficientemente altos como para superar los valores de I_{ds} máximo y, por tanto, destruyendo los CMOS. Este fenómeno igualmente contribuye a la disipación de calor.



Figura 35 – Autoscilación generada en el driver

4.5.5 Circuito definitivo

4.5.5.1 Diseño

Tal y como se vio en el apartado anterior, aunque el circuito de Sterling se construyera sobre una placa de circuitería impresa (que elimina las interferencias al incluir un plano de masa), los resultados no fueron satisfactorios aún. Es por esto que, de nuevo con la colaboración de la empresa *Microaphotec SL*, se emprendió el diseño de un nuevo amplificador de potencia, aunque intentando no desechar demasiado del que se había hecho previamente.

El primer problema que se necesitó corregir es la sobreoscilación que el driver genera. De esta forma, se llevó a cabo un análisis espectral de la señal y se pudo observar que la frecuencia de esta sobreoscilación se marcaba sobre los 20 MHz, un valor suficientemente alejado de 1.5 MHz, que es la frecuencia de trabajo del sistema. De esta manera se ha eliminado los diodos D2 y D3 (no necesarios en amplificadores de clase D), así como la resistencia R10. Sin embargo, se ha mantenido la resistencia R11 con la idea de que, junto a la capacitancia de las puertas de los CMOS (~ 2 nF) y la adición de otra resistencia en serie, se formase un circuito RC cuya constante de tiempo formara un filtro paso-bajo que eliminara la sobreoscilación.

Por otra parte, estas resistencias debían ser muy ligeramente distintas de tal modo que los tiempos de subida y bajada de la onda cuadrada de excitación no coincidieran entre sí. Esto forma un *dead time* entre las aperturas y cierre de ambos CMOS, y por tanto elimina gran parte del *crossover*.

A continuación, se propuso el cambio del FMP24 por dos parejas de transistores CMOS, lo que facilitaría encontrar los valores de las resistencias antes mencionadas.

Finalmente, tras todos estos cambios, se permitió elevar el nivel H de la onda cuadrada de excitación hasta los 20 V: un valor adecuado para lograr la saturación de los CMOS y hacerlos trabajar correctamente en clase D.

4.5.5.2 Resultados obtenidos

Los resultados que se presentan a continuación son los obtenidos cuando se le suministra al amplificador una carga real, el cristal PZT-8.

En primer lugar, en cuanto al funcionamiento de la red RC, es decir, el filtro paso-bajo, se ha podido observar la eliminación de la autososcilación dañina gracias a dicho filtro. La siguiente imagen se corresponde con la pantalla de un osciloscopio la cual muestra en amarillo (señal superior) la salida tal y como la genera el driver y en verde (señal inferior) cómo llega la señal a las puertas tras el paso por la red RC.

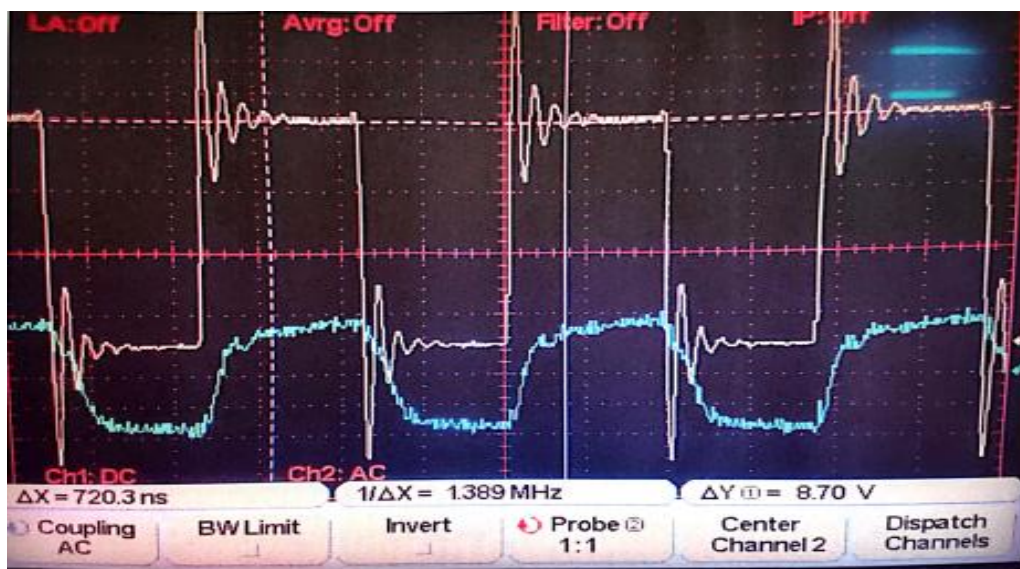


Figura 36 – Comparación de la señal excitadora con y sin filtro paso-bajo

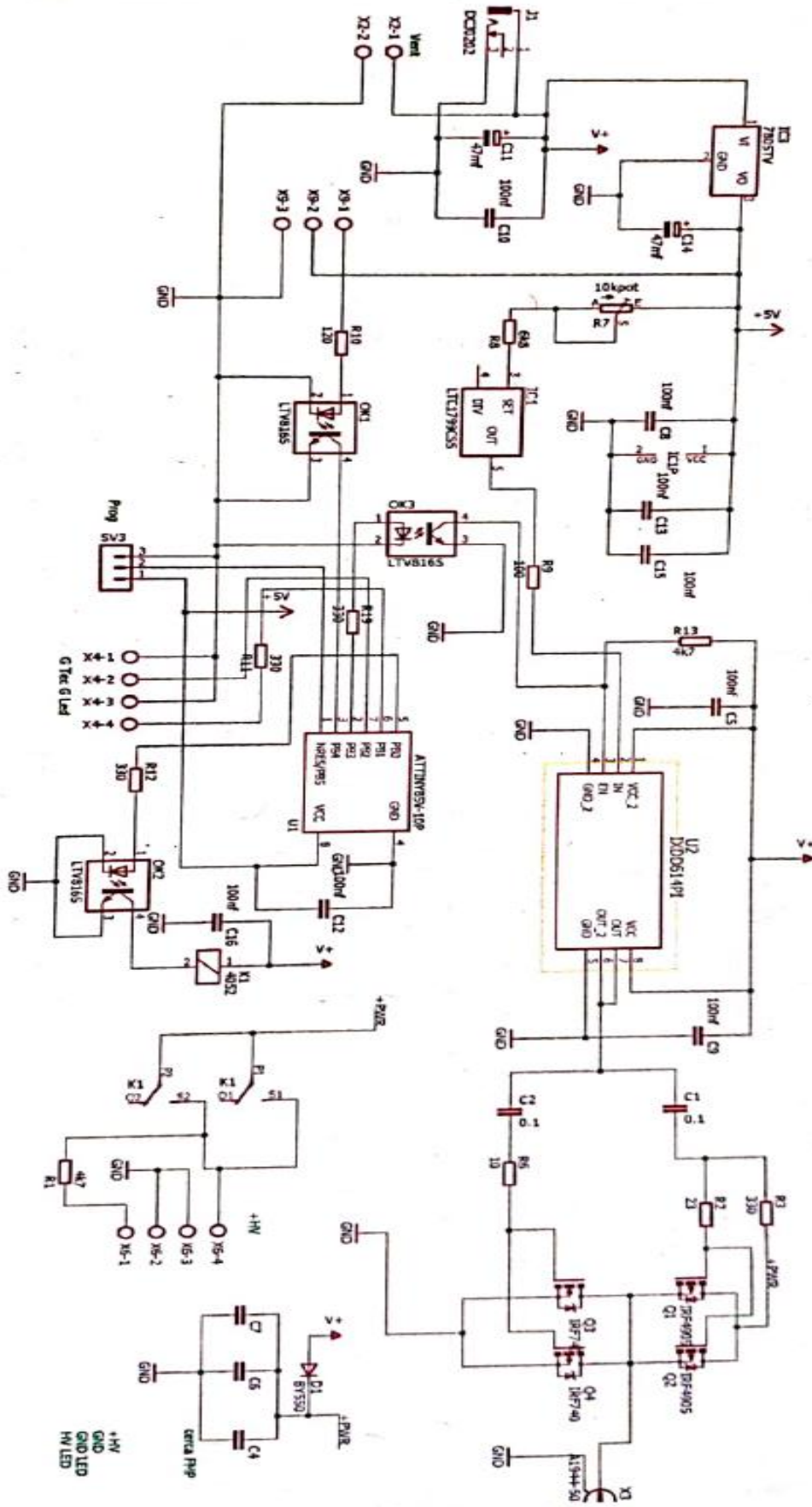


Figura 37 – Circuito amplificador definitivo

Tras pasar por el amplificador (4 transistores CMOS) y con una carga que, como se comentó anteriormente, se corresponde con el transductor PZT-8, la forma de onda de la señal es la de la siguiente imagen.

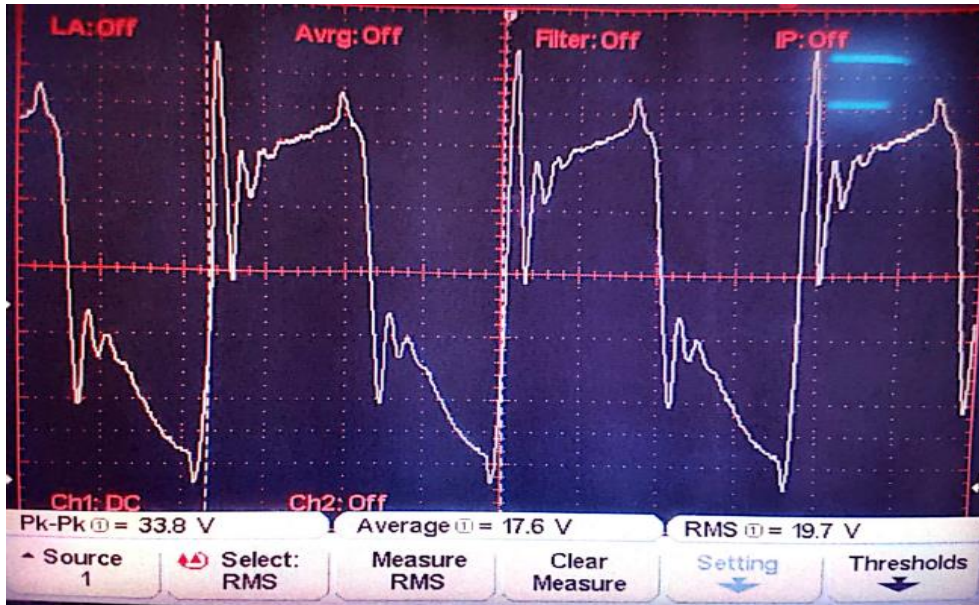


Figura 38 – Salida del amplificador alimentando el transductor

Por otra parte, se ha usado un sensor de corriente, el cual cuenta con una resistencia de 0.2Ω , para medir la intensidad consumida por la carga. En la siguiente imagen se puede observar que el valor de pico-pico es de 2.48 V. Aplicando la ley de Ohm se obtiene la intensidad pico.

$$I_p = \frac{V_{pp}}{R} = \frac{2.48}{0.2} = 12.4 A$$

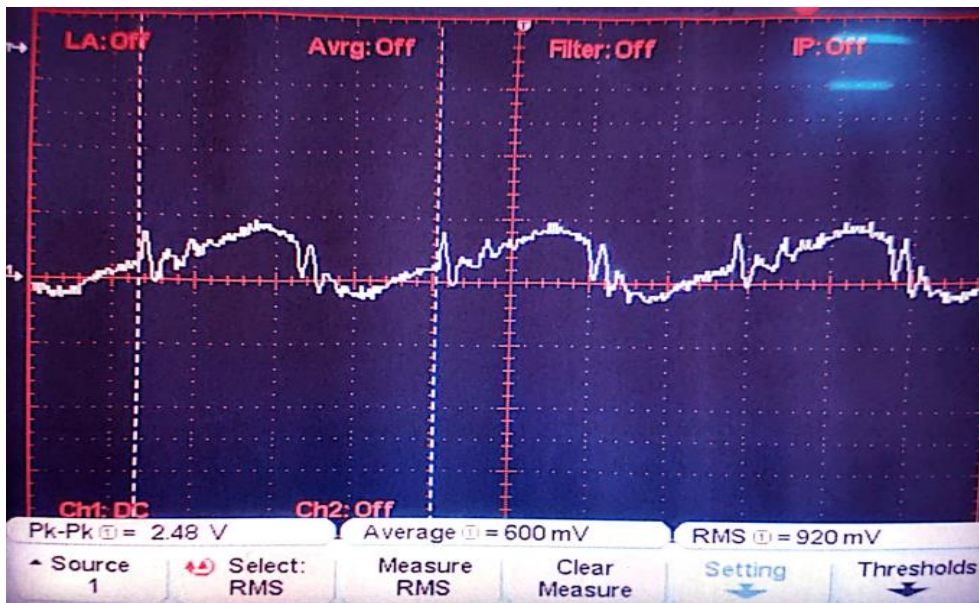


Figura 39 – Valor de intensidad consumida por la carga usando un sensor de corriente con resistencia de 0.2Ω

Igualmente se puede obtener el valor RMS de la intensidad sin más que dividir el voltaje RMS entre los 0.2Ω de la resistencia del sensor obteniendo el siguiente resultado.

$$I_{RMS} = \frac{V_{RMS}}{R} = 4.6 A$$

En la siguiente imagen se puede observar el voltaje a la salida del amplificador (señal superior) en comparación con la intensidad que consume el PZT-8 (señal inferior). A partir de esta información se puede obtener directamente la potencia RMS del sistema.

$$W_{RMS} = V_{RMS} \cdot I_{RMS} = 89.7 W$$

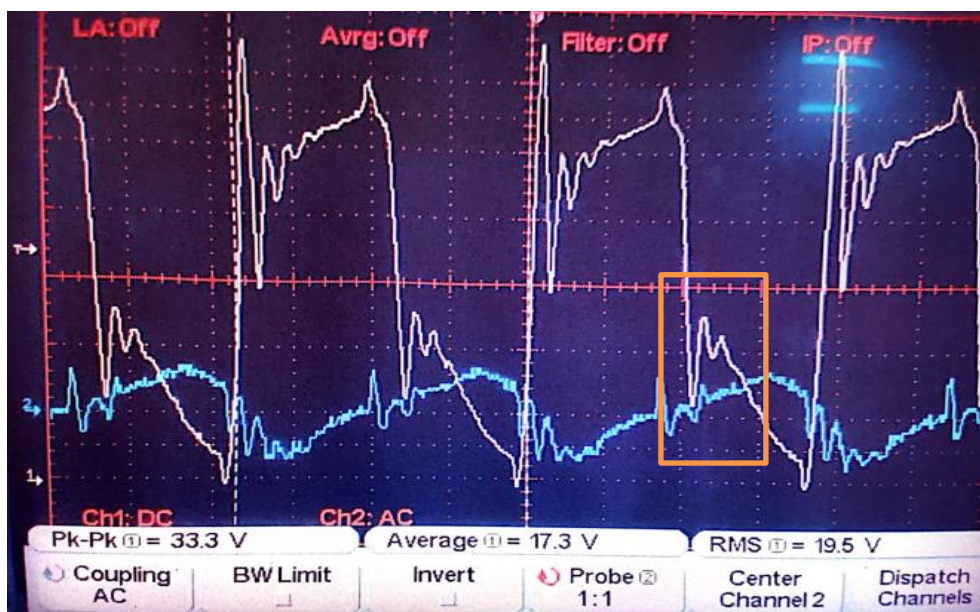


Figura 40 – Representación conjunta de la intensidad consumida por el transductor y el voltaje a la salida del amplificador

Por último, cabe añadir que como se ve en la figura, el *crossover* no ha desaparecido totalmente (efecto señalado con un cuadro naranja). Por esta razón los CMOS aún disipan alguna cantidad de energía. Este valor puede acentuarse si no se mantiene el funcionamiento del amplificador dentro de unos regímenes específicos de potencia que aseguren la integridad y seguridad del sistema.

Se ha encontrado mediante un análisis empírico que manteniendo un valor de alimentación de 30 V hace funcionar el amplificador entregando 55 W RMS sobre el PZT-8. Evidentemente, valores mayores de tensión aumentan la eficacia, pero hacen peligrar la operatividad del sistema.

4.6 Resultado final del sistema

Una vez han sido desarrolladas y construidas todas las partes esenciales que se esquematizaba al principio de este capítulo, se ha podido concluir en el diseño y montaje final del sistema de calentamiento.

A continuación, se presentan imágenes en las que se puede observar el resultado final del sistema. Asimismo, en el anexo 1 de este documento se encuentra una guía de uso.

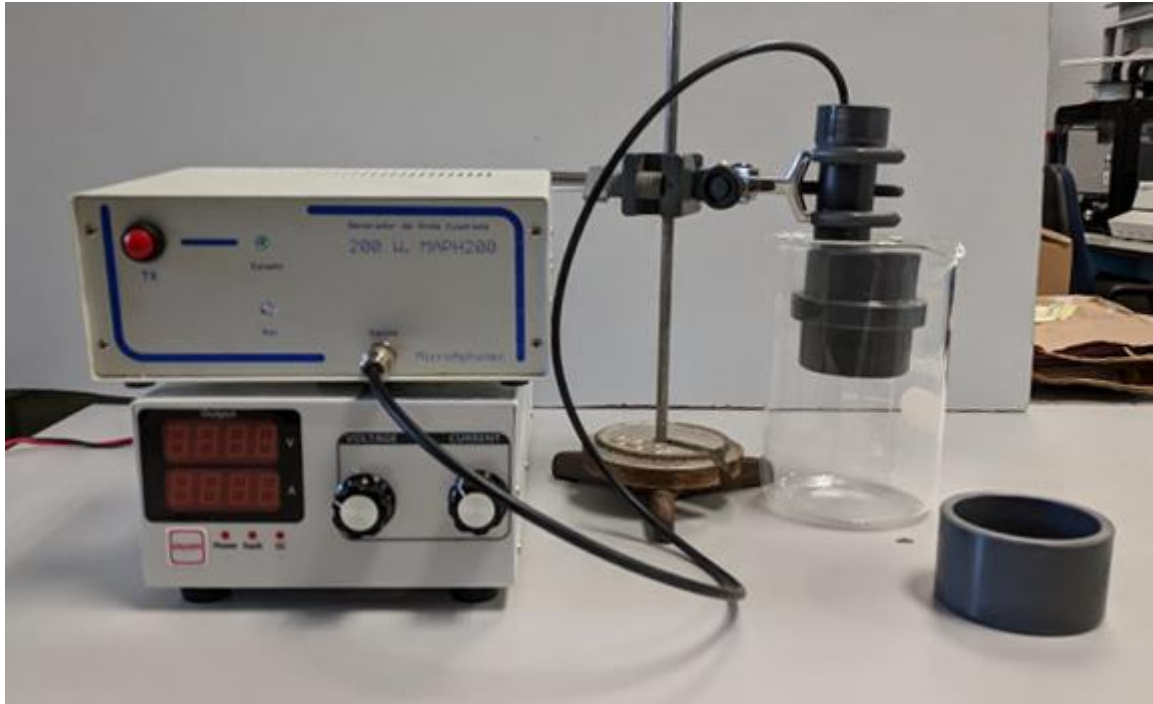


Figura 41 – Imagen del conjunto final del sistema ultrasónico de calentamiento

Como se puede observar, el amplificador ha sido introducido en una caja metálica para impedir la entrada de polvo y facilitar su uso y comprensión a los operarios. Asimismo, se incluye una fuente de alimentación, que suministrará alta tensión al sistema (más allá que el adaptador AC/DC que incorpora el amplificador para alimentación de circuitería).

5 USO EXPERIMENTAL DEL SISTEMA Y RESULTADOS PRÁCTICOS

5.1 Introducción

Tras haber podido concluir el diseño y montaje del sistema de calentamiento ultrasónico, éste ha sido probado en el laboratorio para comprobar su efectividad y eficiencia experimentalmente. Es por esto que, en este apartado, se comentará cuáles han sido los resultados prácticos a la hora de poner en marcha el sistema, así como cuál ha sido el procedimiento para poder llevarlo a cabo.

El análisis principal que se llevará a cabo en este apartado será la medición de las curvas de temperatura al calentar con el sistema ultrasónico, así como el cálculo de la velocidad de calentamiento. Este análisis se realiza mediante el uso de termopares (transductores formados por la unión de dos metales distintos que produce una diferencia de potencial muy pequeña que es función de la diferencia de temperatura entre uno de los extremos denominado punto caliente y el otro llamado punto frío o de referencia), que conectados al módulo de recogida de datos *PicoLog*, recoge la historia térmica del objeto en estudio.

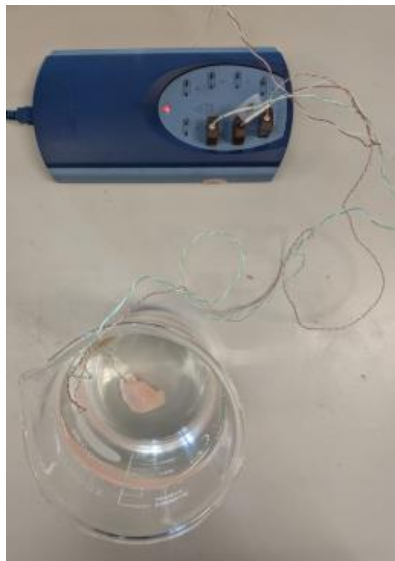


Figura 42 – Termopares conectados a una muestra biológica y al PicoLog

El recipiente usado para albergar desionizada en un principio era de material plástico, sin embargo, durante los experimentos, este recipiente se hacía insostenible ya que fundía la base del mismo y dejaba así escapar el agua que contenía. Por esta razón fue necesario cambiar a un recipiente de cristal, como se ve en la figura superior.

Por último, a la hora de realizar los experimentos ha sido de vital importancia obtener un método para encontrar el foco de los ultrasonidos, ya que es ahí donde toda la energía se encuentra concentrada. De este modo se ha adquirido una placa termosensible que varía su color en función de la temperatura a la que es sometida. La propiedad peculiar que posee esta placa se la da un determinado tipo de colesterol con el que la placa está hecha. A continuación, se muestra una imagen de esta.

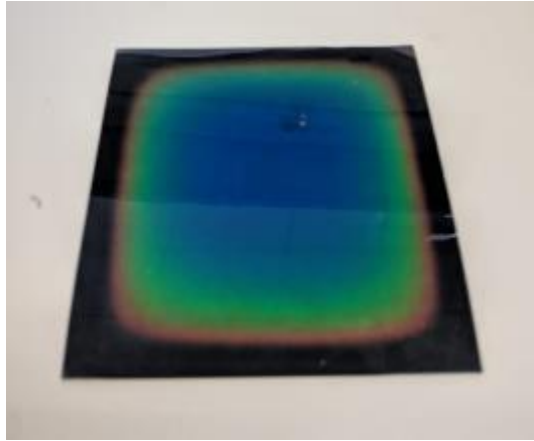


Figura 43 – Placa termosensible

5.2 Medición de ΔT usando un *phantom* como muestra

En primera instancia, se ha intentado recopilar la historia térmica de un *phantom*. Este elemento se trata de un volumen gelatinoso que simula tejidos u órganos, sin serlo realmente. En el laboratorio se ha usado uno fabricado con principalmente gelatina y glucosa (azúcar).



Figura 44 – *Phantom* usado en el laboratorio

En el experimento que se ha llevado a cabo, el *phantom* se encontraba a temperatura ambiente y se le ha sometido al campo de ultrasonidos focalizados de alta intensidad.

Los resultados que se han obtenido no han sido satisfactorios ya que debido a las ondas de presión y a la alta temperatura, así como a la composición del *phantom*, este acababa por destruirse cuando la temperatura alcanzaba alrededor de los 60 °C. Por esta razón se decidió desecharlo y cambiar la muestra a analizar.

5.3 Medición del ΔT usando material biológico a temperatura ambiente

Tras haber fracasado el experimento con la muestra de gelatina y glucosa, se decidió realizar las mediciones sobre muestras biológicas verdaderas. De esta forma se tomó tejido muscular avícola para la realización del experimento.

Este tejido se ha clasificado según su tamaño, con el objetivo de demostrar que la velocidad de calentamiento no depende del tamaño de la muestra.

En primer lugar, se ha tomado una muestra de tejido de longitud aproximadamente igual a 5 mm. La figura siguiente muestra el tejido, su dimensión, así como el termopar que incorpora aproximadamente en el centro de esta.

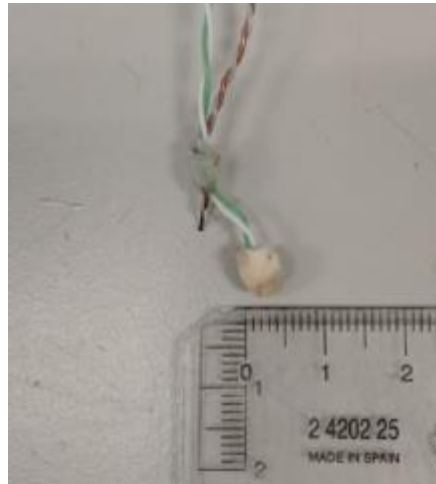


Figura 45 – Muestra biológica de longitud 0.5 cm

A continuación, se ha preparado el experimento de tal forma que se detalla en la siguiente imagen. Se tiene un recipiente plástico lleno de agua desionizada. En su interior se encuentra la muestra con el termopar insertado y una pesa que hace la función de fijador del cable para restringir su movimiento y que no se mueva mientras dure el experimento.



Figura 46 – Disposición del experimento con muestra de 0.5 cm

Posteriormente, tras haber encontrado el foco se pone en marcha el sistema (para más información ver anexo 1). Es importante remarcar que el foco que se encuentra es aproximado debido a que para encontrar el foco verdadero se requieren técnicas que van más allá del alcance de este proyecto.

El programa que se encarga de la recopilación de datos es el propio de *PicoLog*. El programa trae varias funciones incorporadas como el ajuste del número de muestras tomadas por segundo, así como la adquisición de datos por gráficas o tablas de datos. De esta manera se ha ajustado el sistema para que recoja 1000 muestras de temperatura por segundo (el máximo posible) siendo la evolución de la temperatura para la muestra de 5 mm la siguiente.

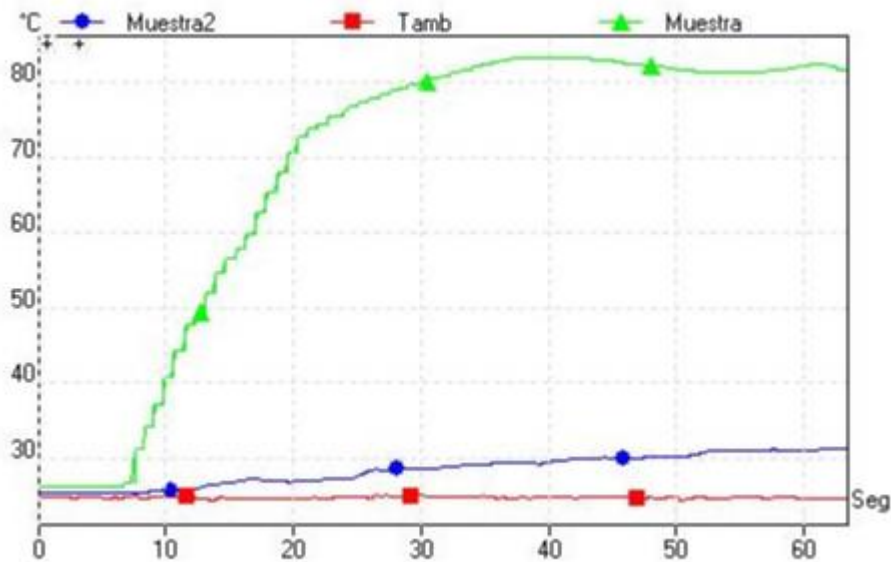


Figura 47 – Resultados del experimento de calentamiento de la muestra de 5 mm

Como se puede observar en la imagen, hay 3 canales de medición. El canal verde (“Muestra”) es el que va insertado en el tejido de pollo. El canal azul (“Muestra2”) es un canal que normalmente también iría insertado en la muestra, sin embargo, debido al reducido tamaño de esta, el termopar va simplemente al lado de la muestra, pero sin entrar en contacto con la misma (en el agua). Por último, el canal rojo (“Tamb”) muestra la temperatura de referencia (temperatura ambiente).

En cuanto a los resultados, se puede observar que el canal insertado en la muestra sufre un incremento muy acentuado de la temperatura debido al efecto de las ondas de presión del ultrasonido. La temperatura aumenta aproximadamente lineal hasta una temperatura de unos 75 °C a partir de la cual la temperatura sigue aumentando de una forma menos pronunciada hasta los 83 °C. Asimismo, el canal azul (que se encuentra en contacto con el agua) no incrementa apenas su temperatura. Esto es debido a que, al estar cerca del foco, este se calienta, sin embargo, al estar en contacto con el agua, esta, ejerce sobre el termopar el fenómeno de conducción de calor forzada, lo que impide que la temperatura del termopar aumente drásticamente.

Por otra parte, también es importante medir la velocidad de calentamiento, que es lo que al fin y al cabo se busca: una velocidad de calentamiento alta. De esta forma, se ha medido dicha velocidad en el tramo lineal de la gráfica. Gracias al archivo de datos generado por el programa *PicoLog* se ha obtenido de forma exacta la velocidad de calentamiento lineal media en ese tramo en este experimento. El tejido ha pasado de 40 °C a 80 °C en 9.6 s. Se ha escogido este rango de temperaturas para calcular la velocidad de calentamiento porque es un rango suficientemente amplio como para dar un buen resultado y además todas las curvas de las muestras de otros tamaños pasan también por ese rango, por lo tanto, la comparación se simplifica.

$$V_{heat}^{5mm} = 4.22 \frac{^{\circ}C}{s} = 253 \frac{^{\circ}C}{min}$$

Como se ha comentado anteriormente, también se han realizado estos experimentos para otros tamaños de tejido: 1.5, 3 y 5 cm. Sin embargo, para estos, la configuración del experimento ha sido cambiada ligeramente, aunque el principio físico se mantiene intacto. En este caso, el material plástico de la cubeta presentaba un defecto: las ondas ultrasónicas lo atacaban fuertemente y este alcanzaba la temperatura de fusión, derritiéndose y dejando pasar el agua. Es por esta razón por la que se decidió cambiar el material del recipiente, por lo que se escogió un recipiente de vidrio para realizar los experimentos restantes. Otras de las bondades de este recipiente es que encontrar el foco era ligeramente más sencillo. Al ser un recipiente más comedido, no daba mucho lugar a holguras. El principal defecto es por tanto el espacio. En este recipiente ya no se puede introducir la pesa para sujetar los cables y la muestra, por lo que se ha debido ingeniar un nuevo método. De entre las posibilidades que se presentaban, la más factible era usar cinta adhesiva para mantener el cable del termopar unido a una de las paredes del recipiente. Esta solución no es ideal, debido a que el agua reduce la adhesividad de la cinta, y con el tiempo se acaba desprendiendo. Sin embargo, para el propósito y duración del experimento es suficiente. A continuación, se muestra una imagen de la nueva configuración usada para los experimentos de tejidos de tamaño 1.5, 3 y 5 cm.

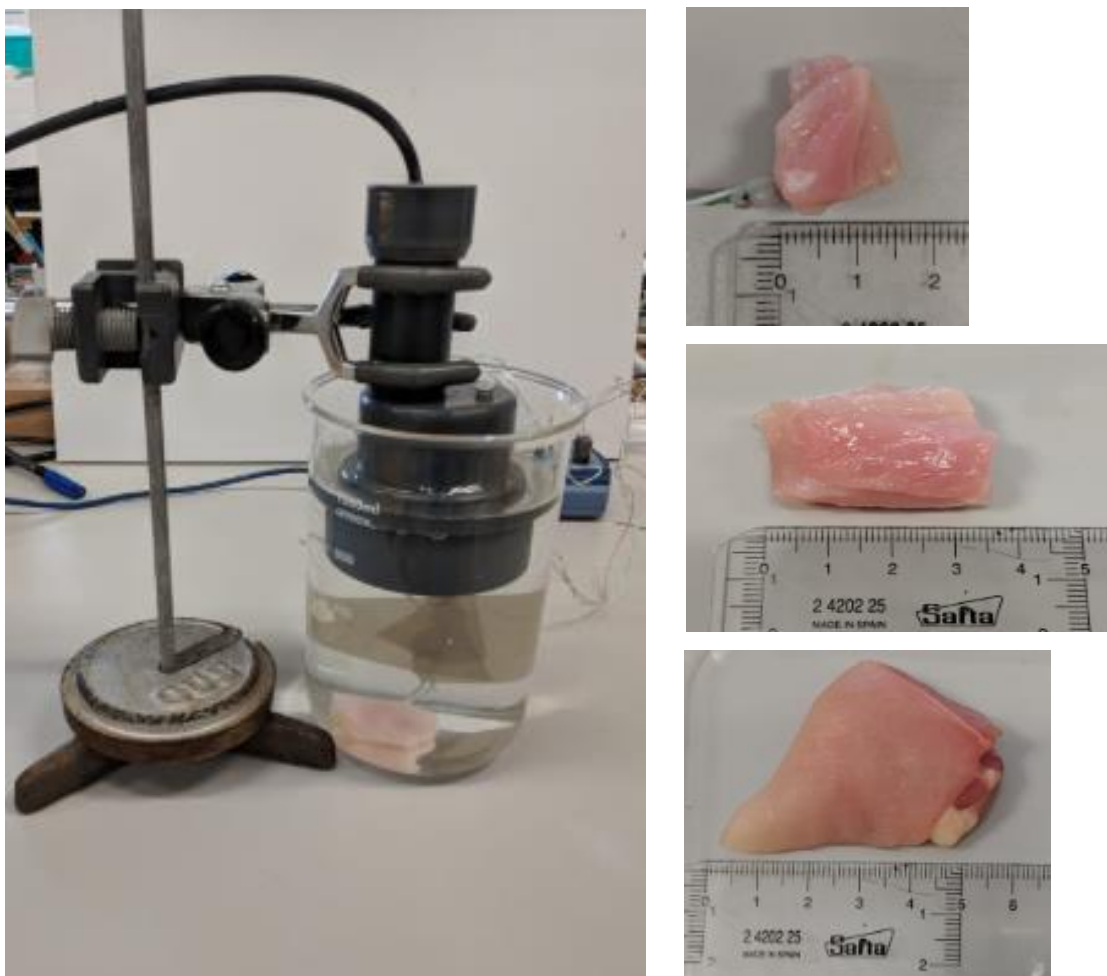


Figura 48 – Configuración del experimento con recipiente de cristal (izquierda). Muestras biológicas para el experimento a temperatura ambiente (derecha)

Se observa en la imagen (derecha superior) que ahora los dos termopares están en el interior de las muestras. Los termopares se encuentran a una distancia de 5-6 mm el uno del otro en cada una de las muestras.

A continuación, se procede a meter la muestra a analizar en el recipiente, se fija para que su posición no cambie en la duración del experimento, y se introduce el agua. Posteriormente se introduce el transductor y se le proporciona potencia. Los resultados obtenidos para cada una de las muestras son los que se muestran en las siguientes imágenes.

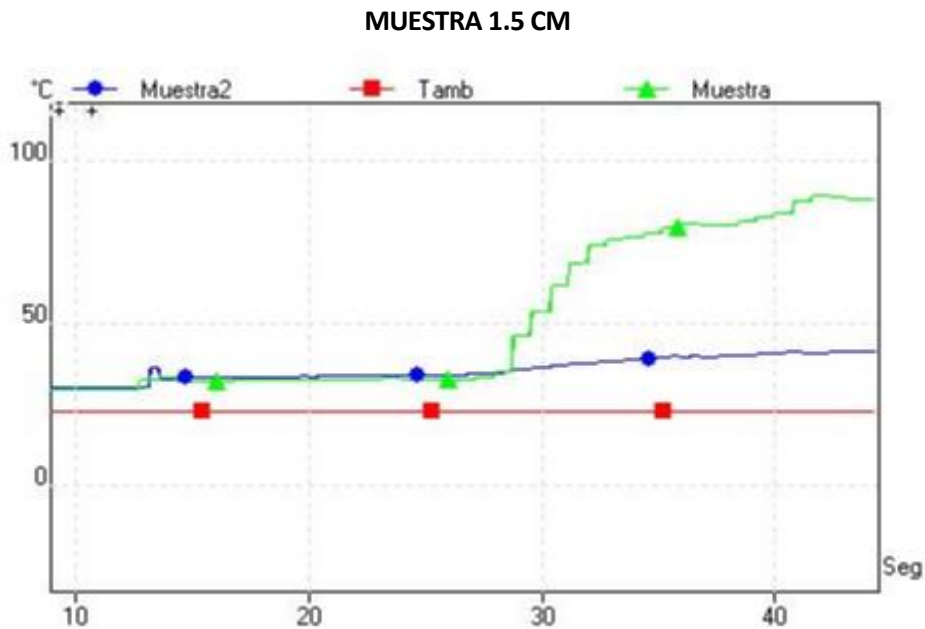


Figura 49 – Resultados del experimento de calentamiento de la muestra de 1.5 cm

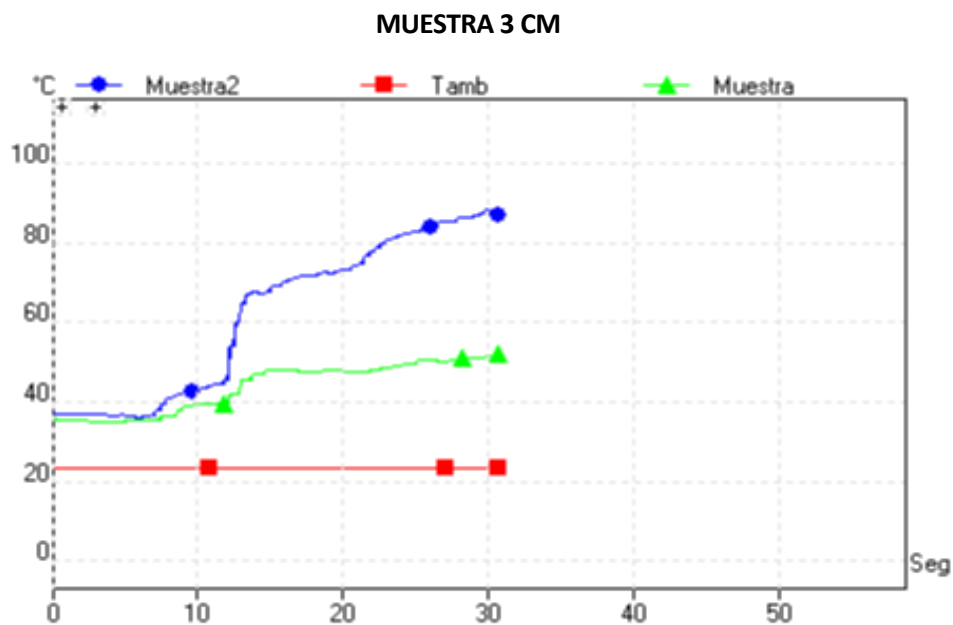


Figura 50 – Resultados del experimento de calentamiento de la muestra de 3 cm

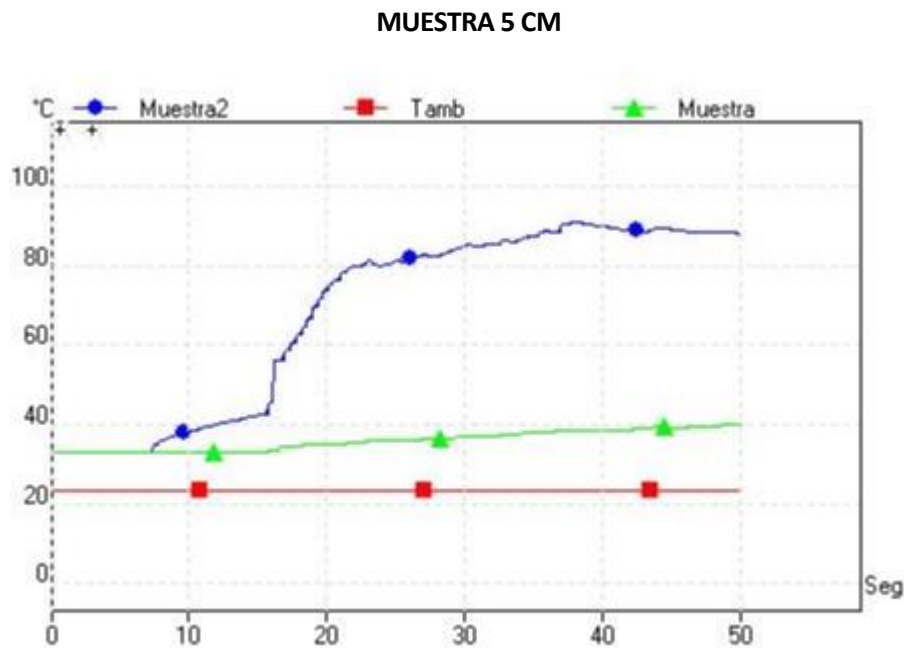


Figura 51 – Resultados del experimento de calentamiento de la muestra de 5 cm

Como se puede observar en las imágenes anteriores, todas tienen un comportamiento similar: una vez se acciona el transductor con alta potencia, la temperatura sube drásticamente en todos los casos con independencia del tamaño de la muestra.

Es importante señalar el fenómeno que ocurre en las muestras de 3 y 5 cm, en las cuales se puede observar un aumento sutil de la temperatura antes de experimentar la gran subida hasta entorno los 80 °C. Esto es debido a que, en estos experimentos, antes de conectar la fuente de alta tensión, se mantuvo durante un corto periodo de tiempo el amplificador con alimentación de línea (baja tensión). Como la potencia que entrega en ese estado es mucho menor que cuando se le suministra alta tensión, el aumento de temperatura también es menor. Este fenómeno queda claramente reflejado en las imágenes.

Por otra parte, como se puede observar también en las imágenes, el crecimiento de la temperatura no siempre se da en el mismo sensor. Esto es porque al cambiar la muestra, el sensor en el que se focaliza la energía depende de la posición del mismo. Asimismo, por la misma razón, en algunas muestras, la velocidad de calentamiento de ambos sensores es mayor o menor. Cuanto más plana esté la curva del sensor que no está focalizado, mayor será la focalización del otro y por tanto mayor será la velocidad de calentamiento en este, y viceversa.

A continuación, se procederá a calcular la velocidad de calentamiento para estas 3 muestras, teniendo en cuenta que la focalización no siempre es la misma, sin embargo, servirá para obtener una primera aproximación a la velocidad de calentamiento real. La siguiente tabla muestra el incremento de temperatura, el incremento de tiempo, así como la velocidad de calentamiento para estas tres muestras.

Muestra	ΔT (°C)	Δt (s)	V_{heat} (°C/s)	V_{heat} (°C/min)
1.5 cm	46.6 → 80.19	29.2 → 36.7	4.47	268.72
3 cm	43.5 → 80.2	13.1 → 22.8	3.78	227
5 cm	42.2 → 80.1	16.1 → 24.6	4.46	267.5

Tabla 8 – Elementos auxiliares del circuito

Como se puede observar, los datos no son muy dispares entre sí, lo que conlleva a deducir que el tamaño de la muestra no es importante en cuanto al calentamiento del foco, como cabía esperar. Igualmente se han calculado datos estadísticos tales como la media y la desviación típica.

$$V_{\text{heat}}^{\text{mean}} = 254.05 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{min}} \quad \sigma = 19.4$$

Se ha visto hasta ahora que en el punto focal de las ondas ultrasónicas se produce un gran calentamiento, mientras que en un punto alejado 5 mm, el calentamiento es muy leve. Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, el objetivo principal de este proyecto era conseguir un calentamiento homogéneo. Por lo tanto, el objetivo a conseguir ahora es intentar colocar el foco en un punto intermedio entre los dos sensores de temperatura y observar cómo es el calentamiento que se produce. Este calentamiento debe ser homogéneo, es decir, en toda la historia térmica de los dos termopares no debe haber una diferencia de temperatura considerable.

El experimento a continuación se realiza con la siguiente configuración: un tamaño de la muestra de 3 cm de longitud y una separación de los termopares de 5 mm entre ellos. Los resultados son los que siguen.

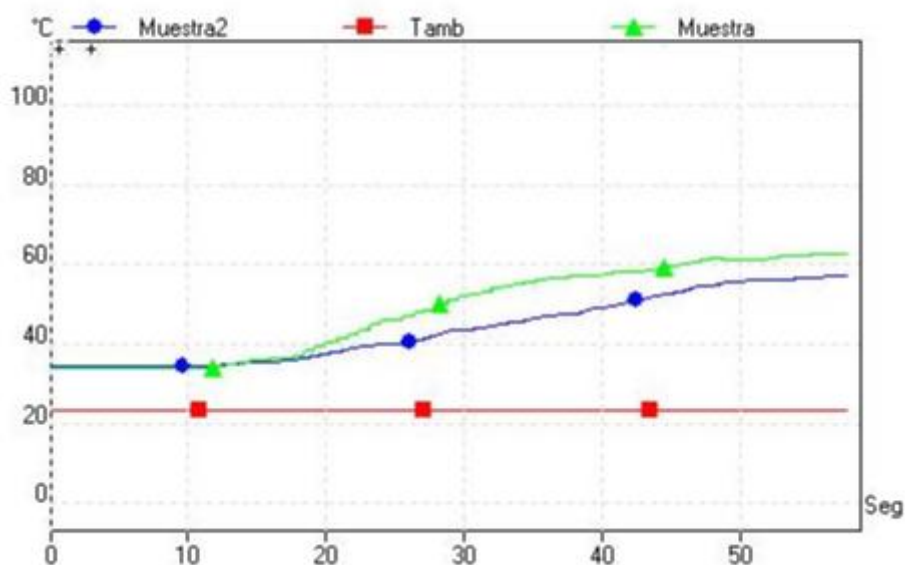


Figura 52 – Resultados del experimento de calentamiento homogéneo

Como cabía esperar la eficacia del calentamiento se ha visto considerablemente reducida a costa de conseguir un calentamiento homogéneo (no hay más de 10 °C de diferencia en toda la historia térmica). Se calcula a continuación la velocidad de calentamiento obtenida.

$$V_{heat}^{hom} = 0.8 \frac{^{\circ}C}{s} = 48.375 \frac{^{\circ}C}{min}$$

Obviamente, este resultado puede ser mejorado si la posición del foco es obtenida con una mayor precisión, consiguiendo velocidades mayores con mayor homogeneidad.

5.4 Medición del ΔT usando material biológico a baja temperatura

Hasta ahora, todos los experimentos se han realizado a temperatura ambiente debido principalmente a la mayor simplicidad de operación. Sin embargo, es necesario recordar que el propósito del proyecto es recalentar muestras biológicas criopreservadas. Es por esta razón que es necesario realizar experimentos a temperaturas menores. Debido a las limitaciones del laboratorio, las muestras no han podido ser criopreservadas previamente, pero sí congeladas, por lo que se ha podido simular la criopreservación.

En este caso, el formato del experimento se ha visto alterado. Al estar manejando temperaturas por debajo de 0 °C, el agua no puede ser usada como medio transmisor de las ondas ya que, si el agua se baja de 0 °C, esta se congela, y si se mantiene a temperatura ambiente, la muestra se descongela heterogéneamente por el calentamiento que el agua induce en ella. Por esta razón, los principales candidatos a sustituir el agua han sido el etanol y el etilenglicol, ambos compuestos con temperaturas de fusión por debajo de 0 °C. Como etanol es inflamable, se ha decidido optar por el etilenglicol.



Figura 53 – Configuración del experimento con etilenglicol

En la imagen anterior se puede observar el vaso de precipitados con la muestra en el interior y los termopares insertados en esta. El vaso está relleno de etilenglicol a una temperatura de -14 °C. En cuanto a la muestra, esta ha sido previamente congelada y los termopares han sido insertados a una distancia de 6 mm entre ellos.



Figura 54 – Visualización de la distancia entre los termopares en el experimento bajo cero

A continuación, tras haber insertado la muestra con los termopares y el etilenglicol, se introduce el transductor ultrasónico y se pone en marcha. Debido a que el etilenglicol es opaco, ha sido más dificultoso en este caso encontrar el foco de los ultrasonidos al no poder verse la muestra. Los resultados del experimento son los que siguen.

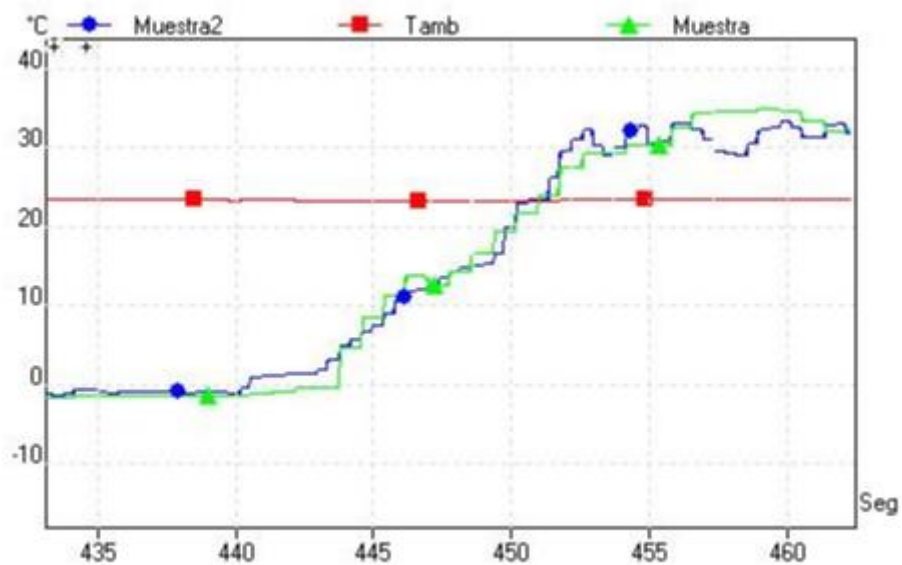


Figura 55 – Resultados del experimento a baja temperatura

Como se puede observar en la imagen anterior, la muestra parte de una temperatura de $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ y alcanza una temperatura de $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ con una velocidad igual a

$$V_{heat}^{tbaja} = 2.69 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{s}} = 161.5 \frac{^{\circ}\text{C}}{\text{min}}$$

Igualmente, se puede ver que el criterio de homogeneidad se cumple en mayor medida que en el experimento a temperatura ambiente. Se puede ver que en toda la historia térmica de los termopares no hay una diferencia de temperatura mayor que $5\text{ }^{\circ}\text{C}$. En cuanto a la velocidad, también es importante remarcar que en este caso es mayor que en el experimento a temperatura ambiente. Se puede concluir por tanto que el descenso en la temperatura ha favorecido en gran medida los resultados del experimento.

6 CONCLUSIONES Y LÍNEAS FUTURAS

Tras el desarrollo del proyecto es posible concluir que es viable la premisa principal de este proyecto, es decir, el recalentamiento de material biológico criopreservado satisfactoriamente. Como se ha podido ver, los resultados de los experimentos son muy prometedores, al haberse alcanzado velocidades de calentamiento considerables además de cumplirse el criterio de homogeneidad. Además, también se ha podido observar que cuanto menor es la temperatura del sistema, mejores son las condiciones del experimento.

Sin embargo, a pesar de los resultados tan prometedores que se han obtenido, esto no deja de ser un primer desarrollo de un sistema que debe someterse a un diseño mucho más exhaustivo. A continuación, se van a plantear algunos de los desarrollos que no entran dentro del alcance de este proyecto pero que sería necesario tener en cuenta en desarrollos futuros:

- Sistema de posicionamiento focal – Para el uso práctico del sistema de ultrasonidos, sería totalmente conveniente contar con un sistema que posicionara de forma exacta el foco de las ondas ultrasónicas. Durante el desarrollo de los experimentos se ha empleado una importante cantidad de tiempo en la búsqueda de dicho foco para la realización del experimento.
- Rediseño del amplificador – Como también se ha comentado anteriormente, el diseño del amplificador no es óptimo. A pesar del rediseño que este ya ha experimentado, sería necesario eliminar por completo el *crossover* que ocurre en los transistores de manera que se pueda alimentar al sistema con más potencia sin riesgo de la destrucción de los transistores.
- Aumento del volumen focal – Gracias a los experimentos en el laboratorio se ha observado que el volumen focal de este transductor es bastante reducido. Como lo que se busca es el recalentamiento de órganos de tamaño considerable, sería conveniente aumentar este volumen focal. Es por esto que como línea futura se proponen 2 vías:
 - La construcción de un array de transductores con posicionamiento de foco mediante la fase de la onda.
 - La adquisición de un transductor más grande.
- Amplificador con frecuencia variable – El amplificador con el que se cuenta en el laboratorio está diseñado sola y exclusivamente para trabajar a una frecuencia específica (la del transductor PZT-8), es por esto que si se quisiera cambiar el transductor habría que rediseñar todo un nuevo sistema de amplificación específico para ese nuevo transductor. Es por esto que sería conveniente la obtención de un sistema de amplificación global, apto para cualquier transductor sin más que variar la frecuencia de trabajo.

REFERENCIAS

- [1] LUZ MÁBEL ÁVILA PORTILLO, BACTER ET AL. (2006). Fundamentos de criopreservación. Revista Colombiana de Obstetricia y Ginecología Vol.57 No.4, 291 300.
- [2] RISCO, R. Rewarming of vitrified heart through the use of HIFU and thermography by MRI, and validation of Radiofrequency technology for its use in cryopreservation (Ultrawarming).
- [3] RISCO, R. EID “Ultraorgan”
- [4] MAZUR, P. Freezing of living cells: mechanisms and implications.
- [5] RISCO, R. The Summit on Organ Banking through converging technologies. 2017, Boston (USA).
- [6] NESBITT, STERLING. Diseño de circuito amplificador para PZT-8 (USA).
- [7] BREWSTER, DAVID. Observations of the pyro-electricity of minerals.
- [8] FARRANT, J. Mechanism of Cell Damage During Freezing and Thawing and its Prevention.
- [9] MICROAPHOTEC. Diseño de circuito amplificador de alta potencia y soporte para transductor
- [10] RISCO, R, BARROSO, P, OLMO, A. Use of high intensity focused ultrasound for the rewarming of cryopreserved biological material.
- [11] http://calculo.cc/temas/temas_geometria/cuerpos_geometricos/teoria/esfera.html
- [12] http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0210-48062007000600010
- [13] <http://criopreservacion.blogspot.com/2007/05/historia-de-la-criopreservacion.html>

ANEXO 1: MANUAL DE USO DEL SISTEMA DE CALENTAMIENTO HIFU

Este manual tiene como objetivo facilitar el aprendizaje de uso del sistema HIFU para futuros operarios del sistema.

COMPONENTES DEL SISTEMA

1. Amplificador de potencia
2. Fuente de alimentación y cable de 8 pines
3. Transductor ultrasónico con soporte, cable BNC y protector
4. Cable de alimentación del amplificador
5. Cable de alimentación de la fuente de alimentación

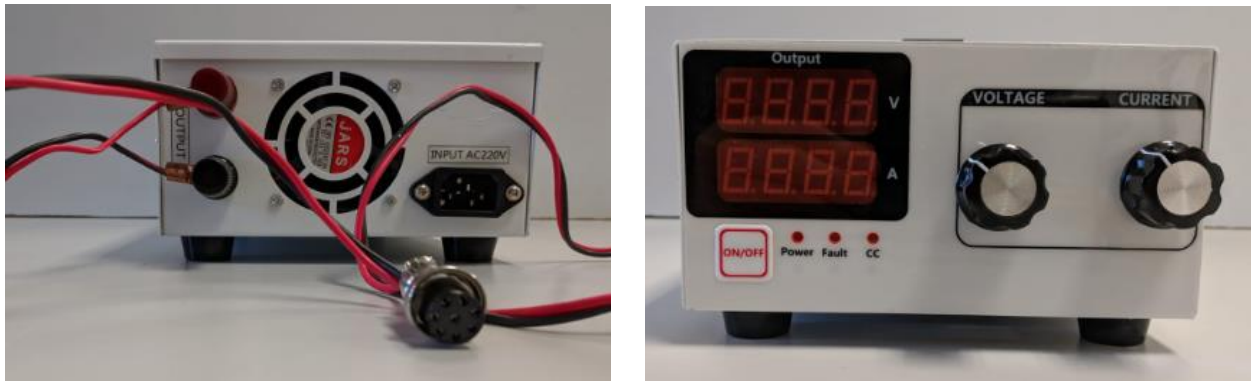


Figura 1 – Fuente de alimentación. Parte trasera (izquierda). Parte delantera (derecha)

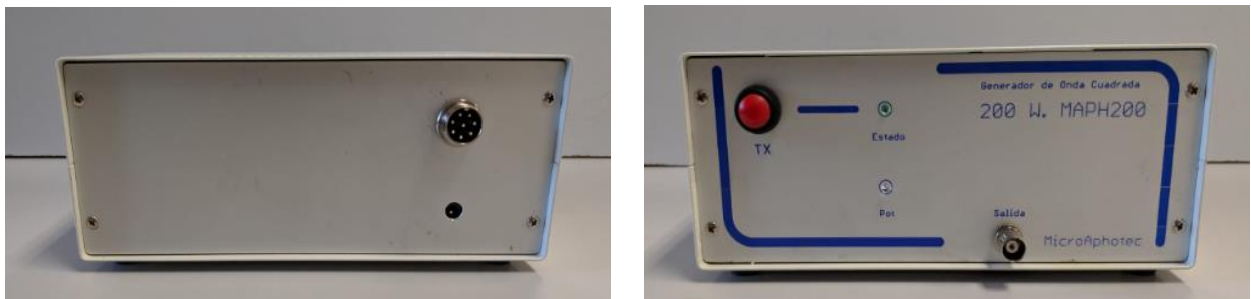


Figura 2 – Amplificador. Parte trasera (izquierda). Parte delantera (derecha)

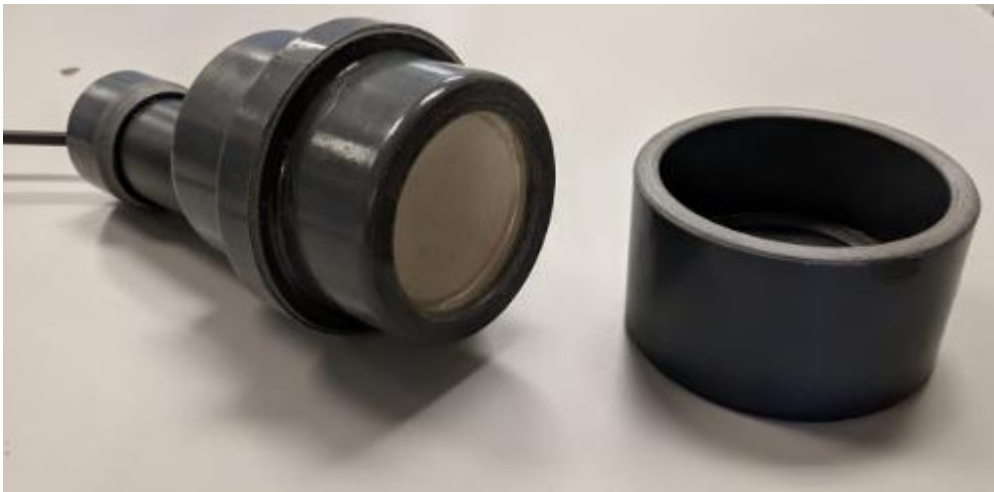


Figura 3 – Transductor y protector

MONTAJE Y FUNCIONAMIENTO DEL SISTEMA

1. Se conecta el cable BNC del transductor al amplificador. Es importante que la carga siempre esté puesta para reducir el riesgo de rotura de los transistores.
2. Se conecta el cable de 8 pines procedente de la fuente de alimentación en el conector correspondiente del amplificador.
3. Se conecta el amplificador y la fuente de alimentación a la corriente a través de sus respectivos cables. La fuente de alimentación desprenderá un sonido (aunque se mantendrá apagada) y el ventilador del amplificador empezará a funcionar. Asimismo, el LED de “estado” del amplificador deberá parpadear cada segundo aproximadamente indicando que está funcionando, pero no transmitiendo. El LED que se encuentra más abajo “Pot.”, es el LED de potencia. Se encenderá en dos casos: 1) La alta tensión (fuente de alimentación) está conectada al amplificador. 2) Se está transmitiendo. En este caso deberá estar encendido ya que la fuente se encuentra conectada al amplificador.
4. Se prepara el transductor para meterlo en el medio que se vaya a usar. Se debe introducir el transductor completamente en el líquido. Tener especial cuidado en quitar la posible burbuja de aire que se deposita en la parte cóncava del transductor al meterlo en el medio.
5. Se pulsa el botón rojo del amplificador. Tras hacer esto, el LED de “estado” empezará a parpadear rápido durante unos segundos. Durante este parpadeo el transductor no emitirá ultrasonidos. Esto es un mecanismo de seguridad en el caso en el que se haya pulsado el botón rojo sin querer. De esta forma se tienen unos segundos para volverlo a pulsar y parar la transmisión.
6. Tras haber pulsado el botón rojo y haber esperado los segundos de seguridad, el transductor empezará a emitir ultrasonidos, pero de baja potencia (8 – 10 W). Esto ocurre porque hasta el momento la única energía que tiene es la que le llega a través del transformador de corriente del cable de alimentación del amplificador. Es conveniente usar este modo para probar que el transductor funciona.
7. A continuación, si se enciende la fuente de alimentación, el transductor empezará a emitir ultrasonidos de alta potencia (50 – 100 W). Se debe ajustar la tensión de la fuente de alimentación para que se emita la potencia deseada.

CONSIDERACIONES A TENER EN CUENTA

- Cuando el transductor transmite a alta potencia (con la fuente de alimentación activada), el parámetro limitador es el amperaje. De esta forma el amperaje máximo recomendable al que se debe someter el sistema son 2.5 A. Sin embargo, para pruebas de corta duración (unos segundos) se podrían aplicar hasta 3.5 A.
- Es importante tener especial cuidado al encender la fuente de alimentación, ya que al encenderla no aplica la mínima tensión posible, sino que recuerda la última tensión marcada y la aplica directamente sin previo aviso. Por esto es recomendable antes del primer uso comprobar a qué nivel de tensión se encuentra la fuente y ajustarla a la deseada antes de conectar los cables.
- Es normal que tanto la carcasa del amplificador como el cable BNC del transductor se calienten moderadamente al usarse el sistema, ya que se han tomado estos componentes como la masa del sistema.
- El soporte del transductor cuenta con un tapón de silicona. Dicho tapón sirve para, en el caso en el que haya podido entrar una mínima cantidad de líquido dentro del soporte, extraerla introduciendo un papel absorbente en el orificio.
- Normalmente, los sistemas *PicoLog* para adquisición de temperatura se encuentran en una configuración tal que la toma de temperatura es de 1 muestra por segundo o incluso menor. Debido a las altas velocidades de calentamiento que se manejan en este ámbito, es importante cambiar esta configuración. Se realiza así: Abrir *PicoLog* > Configuración > Muestras > Intervalo de muestreo. La configuración predeterminada es de 1 muestra por segundo. En este proyecto se ha configurado 1 muestra cada milisegundo para la realización de los experimentos.