

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

ÁLISSON RENAN STOCHERO DA SILVA

**ANÁLISE TEÓRICO-EXPERIMENTAL DE MÉTODOS DE VITRIFICAÇÃO PARA
APLICAÇÕES DE CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN**

SÃO LEOPOLDO

2024

Álison Renan Stochero da Silva

ANÁLISE TEÓRICO-EXPERIMENTAL DE MÉTODOS DE VITRIFICAÇÃO PARA
APLICAÇÕES DE CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN

Defesa de Tese apresentada como requisito para
a obtenção do título de Doutor em Engenharia
Mecânica, pelo Programa de Pós-Graduação
em Engenharia Mecânica da UNISINOS

Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline Biancon Copetti

Coorientador: Prof. Dr. Mário Henrique Macagnan

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Paulo Roberto Wander – Universidade do Vale do Rio dos Sinos - Unisinos

Profa. Dra. Elaine Maria Cardoso – Universidade Estadual de SP - UNESP

Prof. Dr. Jeferson Diehl de Oliveira – Universidade do São Paulo – USP - SISEA

Dra. Karolyn Ogliari – Hemocord

SÃO LEOPOLDO

2024

S586a Silva, Álisson Renan Stochero da.
Análise teórico-experimental de métodos de vitrificação
para aplicações de criopreservação de sêmen / Álisson Renan
Stochero da Silva. – 2024.
125 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Universidade do Vale do Rio dos
Sinos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica,
2024.

“Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline Biancon Copetti
Coorientador: Prof. Dr. Mário Henrique Macagnan”

1. Criopreservação. 2. Sêmen. 3. Taxa de resfriamento. 4.
Vitrificação. I. Título.

CDU 621

Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz Renê Dias da Silva e Cláudia de Fátima Stochero da Silva, pelo apoio incondicional e por sempre acreditarem que este dia chegaria.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à minha orientadora, Profa. Jaqueline Biancon Copetti, pela excelente orientação, confiança, paciência e empenho durante a realização deste trabalho.

À UNISINOS pela infraestrutura fornecida.

À Hemocord Biotecnologia e seus colaboradores, pela parceria e apoio na realização dos testes com materiais biológicos.

Ao ITT CHIP e seus colaboradores, pelo constante suporte na realização dos dispositivos de PDMS.

Aos colegas do PPGEM e aos bolsistas de Iniciação Científica pela amizade, momentos de descontração e pela assistência na elaboração de artigos e deste trabalho.

Aos funcionários e laboratoristas da UNISINOS pelo apoio durante os testes experimentais.

Por fim, gostaria de agradecer ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de doutorado DAI, que possibilitou a dedicação integral ao PPGEM.

RESUMO

O sucesso de um procedimento de criopreservação de células está diretamente relacionado com o procedimento de preparação do material biológico, o método de congelamento empregado, o volume da amostra e a relação entre a taxa de resfriamento e a concentração/tipo de agentes crioprotetores. De modo a evitar a formação de cristais de gelo, a velocidade de resfriamento da amostra deve ser maior que a velocidade de formação dos cristais. Através do método de vitrificação, é possível conseguir elevadas taxas de resfriamento, fazendo com que a amostra faça uma transição direta do estado líquido para o estado vitrificado e amorfo, sem a formação de cristais de gelo. Quanto maior a taxa de resfriamento, maior a viscosidade e menor o volume da amostra, maior será a chance de vitrificar uma solução. A vitrificação é bastante utilizada quando se trabalha com materiais biológicos de pequeno volume e baixa concentração de água intracelular, tal como aplicações de criopreservação de sêmen. Neste trabalho foram desenvolvidos dois métodos de criopreservação de sêmen, sendo o método de vitrificação por imersão direta e o método de vitrificação de gotículas por contato. Foi conduzida uma investigação experimental e numérica, através do projeto e construção de bancadas e equipamentos, simulações computacionais, avaliação e proposição de metodologias. Para o método de vitrificação de gotas por contato, investigou-se o comportamento do avanço da solidificação, taxas de resfriamento, ângulo de contato, geometria e material da superfície de resfriamento. Para o método de vitrificação por imersão direta, foi investigada a influência do meio de resfriamento, comparando a imersão em nitrogênio líquido (LN₂) com slush de nitrogênio (SN₂). Também foi avaliado o efeito do tipo de recipiente para alocação das amostras, comparando criotubos com chips de PDMS, comparando diferentes concentrações de CPA e o impacto do volume no processo de criopreservação. Os testes biológicos com sêmen investigaram a influência do método de processamento (lavagem simples e *swim-up*), e protocolo de congelamento, quanto à taxa de resfriamento, viabilidade e motilidade. Os resultados neste trabalho corroboram para o aprimoramento e desenvolvimento de novos métodos e protocolos para criopreservação de materiais biológicos, especialmente para aplicações de vitrificação de sêmen.

Palavras-chave: Criopreservação, Vitrificação, Taxa de resfriamento, Sêmen.

ABSTRACT

The success of a cell cryopreservation procedure is directly related to the method of preparing the biological material, the freezing protocol, the sample volume and the relationship between the cooling rate and the concentration/type of cryoprotective agents (CPA). In order to avoid the formation of ice crystals, the sample cooling rate must be greater than the crystal formation rate. Through the vitrification method, it is possible to achieve high cooling rates, making the direct transition from the liquid state to the vitrified and amorphous state, without the formation of ice crystals. The probability of vitrification increases with higher cooling rates, higher viscosity and smaller sample volume. Vitrification is most used when working with biological materials with a small volume and low concentration of intracellular water, such as semen cryopreservation applications. In this work, two semen cryopreservation methods were developed, the direct immersion vitrification method and the contact droplet vitrification method. An experimental and numerical investigation was conducted, through the design and construction of benches and equipment, computer simulations, evaluation and proposal of methodologies. For the contact droplet vitrification method, solidification advancement behavior, cooling rates, contact angle, geometry and material of the cooling surface were investigated. For the direct immersion vitrification method, the influence of the cooling medium was investigated, comparing immersion in liquid nitrogen (LN₂) with nitrogen slush (SN₂). The effect of the type of container for sample allocation was also evaluated, comparing cryotubes with PDMS chips, comparing different concentrations of CPA and the impact of volume on the cryopreservation process. Biological tests with semen investigated the influence of the processing method (simple washing and swim-up), and freezing protocol, on the cooling rate, viability and motility. The results in this work support the improvement and development of new methods and protocols for cryopreservation of biological materials, especially for semen vitrification applications.

Key-words: Cryopreservation, Vitrification, Cooling rate, Semen.

INSTITUIÇÕES E FONTES FINANCIADORAS

Este trabalho foi realizado na Unisinos, campus de São Leopoldo, através de uma bolsa CNPq/DAI de Doutorado em parceria com a empresa de biotecnologia Hemocord, localizada em São Leopoldo – RS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Exemplos de criorefrigeradores programáveis.	24
Figura 2.2 – Diferentes fases da água de acordo com a temperatura e concentração de CPA.	25
Figura 2.3 - Possíveis problemas durante o processo de vitrificação.	266
Figura 2.4 - Relação entre a constante k_4 de Bourton para valores de vcr entre 0,1 e 1%... ..	288
Figura 2.5 - Comparação entre a taxa de resfriamento e aquecimento para diferentes tipos de solução crioprotetora.	299
Figura 2.6 – Relação entre as taxas de resfriamento e aquecimento para diferentes soluções e parâmetros da Equação 2.5, para diferentes crioprotetores.	30
Figura 2.7 - Mecanismos de ação entre CPAs intracelulares e extracelulares.	32
Figura 2.8 – Exemplos de crioprotetores e suas aplicações.	33
Figura 2.9 – Método de vitrificação OPS: (a) Palheta, (b) Coleta, (c) Resfriamento em nitrogênio líquido e (d) Aquecimento.	34
Figura 2.10 - Domínio numérico da simulação computacional de uma gotícula depositada e resfriada em um substrato de cobre.	35
Figura 2.11- Método de vitrificação por gotejamento proposto por Vries et al. (2019).	346
Figura 2.12 - Congelamento por gotículas Super Flash - SFF.	37
Figura 2.13 - Impressão 3D do protótipo para vitrificação em película.	378
Figura 2.14 – Método experimental para impressão de gotículas.	359
Figura 2.15 – Dispositivo para produção de <i>slush</i> empregado em estudos de ebulição.	41
Figura 2.16 – Dispositivo para vitrificação via evaporação de um filme fino de LN2.	41
Figura 2.17 – Morfologia do espermatozoide humano.	48
Figura 2.18 - Morfologia padrão da cabeça de um espermatozoide.	48
Figura 2.19 - Anomalias morfológicas típicas do esperma.	50
Figura 2.20 - Protocolo de congelamento de sêmen utilizado por Shin et al. (2016).	53
Figura 2.21– Aparato experimental de vitrificação utilizado por Huang et al. (2020).	54
Figura 2.22 - Dispositivo de vitrificação desenvolvido por O’Neill <i>et al.</i> (2019).	55
Figura 2.23 - Vitrificação por gotejamento direto no nitrogênio líquido.	56
Figura 3.1 – Fluxograma de apresentação da metodologia deste trabalho.	587
Figura 3.2 - Esquematização da bancada experimental de vitrificação pelo método de microgotas utilizada neste trabalho.	588
Figura 3.3 - Medição do ângulo de contato entre a gota e a superfície de congelamento.	60

Figura 3.4 - Domínio numérico e condições de contorno do dispositivo proposto para vitrificação de microgotas.	61
Figura 3.5 - Malhas numéricas utilizadas no cálculo do GCI.	63
Figura 3.6 - Bancada Experimental utilizada para produção do SN2.	64
Figura 3.7 – Comparação do efeito do agitador na formação do SN2.	65
Figura 3.8 – Criotubos e dispositivos de PDMS utilizados no processo de vitrificação por imersão direta.	66
Figura 3.9 - (a) Criotubo, (b) Representação gráfica do problema, (c) Condições de contorno e (d) Malha para solução numérica.	67
Figura 3.10 - Etapas do processo de projeto, corte e limpeza dos moldes.	69
Figura 3.11 - Colagem dos moldes nas superfícies de placas de silício e Petri.	70
Figura 3.12 - (a) Mistura do PDMS e agente de cura, (b) Remoção das bolhas, (c) Cura do PDMS e (d) Recorte dos dispositivos.	71
Figura 3.13 - (a) Equipamento de plasma utilizado, (b) Configuração do plasma e (c) Plasma de Oxigênio.	72
Figura 3.14 - (a) Processo de preparação da amostra seminal pelos métodos de lavagem simples e (b) Swim-up.	74
Figura 3.15 - Suporte para as amostras em criotubo e dispositivo de PDMS para testes de imersão.	74
Figura 3.16 - Imersão das amostras em LN2 e SN2.	75
Figura 3.17 - (a) Bancadas experimentais para produção de <i>slush</i> e (b) Testes de imersão.	76
Figura 4.1 - Avanço do processo de solidificação da gota.	77
Figura 4.2 - (a) Campos de fração mássica de líquido obtidos via análise CFD e (b) Comparação numérico-experimental da taxa de solidificação.	78
Figura 4.3 - Imagens da solidificação e campos de velocidade na interface líquido-cristal com evolução temporal.	79
Figura 4.4 - Comparação experimental e numérica para diferentes pontos de medição de temperatura na gota	80
Figura 4.5 - Resfriamento por gotículas sobre substrato plano de cobre com regiões semi vitrificadas.	81
Figura 4.6 - Comportamento da temperatura das gotas na superfície plana e na cavidade do substrato de cobre.	82
Figura 4.7 – (a) Comparação numérico-experimental das curvas de temperatura e da fração de líquido (b) durante o processo de solidificação das gotas.	83

Figura 4.8 - Comparação dos resultados numéricos e experimentais da variação da temperatura durante o congelamento por imersão direta de criotubos.	84
Figura 4.9 - (a) Fração de líquido ou Campos de solidificação e (b) Campos de temperatura para a imersão em LN2 de amostra em criotubo.	85
Figura 4.10 - (a) Efeito da concentração e do tipo de CPA para amostras com volume de 1 ml, na variação da temperatura e nas imagens dos criotubos pós-congelamento para 10% de CPA, (b) 30% de CPA e (c) 50% de CPA.	86
Figura 4.11 - Efeito do meio criogênico no resfriamento de amostras de CPAs a 30% e volume de 1 ml, DMSO (a) e Glicerol (b); e volume de 0,5 ml, DMSO (c) e Glicerol (d).	87
Figura 4.12 - Efeito do volume das amostras de CPAs a 30%: DMSO em LN2 (a) e SN2 (b) e Glicerol em LN2 (c) e SN2 (d).	88
Figura 4.13 - Curvas de temperatura dos dispositivos de PDMS quando imersos em LN2, SR- LN2 e SN2.	89
Figura 4.14 - Curvas de resfriamento dos testes de imersão em LN2 e SN2, com alocação da amostra em chip de PDMS e criotubo.	91
Figura 4.15 - Criopreservação das mostras de sêmen alocadas em criotubos e chips de PDMS, com imersão em LN2 e SN2.	92
Figura 4.16 - Análise de viabilidade e motilidade após 1 semana de armazenamento.	93
Figura 4.17 - Visualização da ocorrência da cristalização para as concentrações de 1 – 5 M de sacarose.	94
Figura 4.18 - Curvas de resfriamento para concentração de 4 M de sacarose, alocadas em criotubo e chip de PDMS, com imersão em LN2.	96
Figura 4.19 - Efeito da espessura do chip de PDMS na taxa de resfriamento, com imersão em LN2.	97
Figura 4.20 - Efeito do recipiente e do meio de imersão nas curvas de resfriamento utilizando sêmen como amostra, com concentração de 4 M de sacarose e volume de 150 µL.	98
Figura 4.21 - Processo de criopreservação das amostras de sêmen quando imersas em LN2 e SN2, alocadas em criotubo e chip de PDMS, com concentração de 4 M de sacarose.	98
Figura 4.22 - Concentração de espermatozoides processados via <i>swim-up</i> com 4 M de sacarose.....	98

Figura 4.23 - Viabilidade dos espermatozoides processados via <i>swim-up</i> com 4 M de sacarose.....	99
Figura 4.24 - Motilidade dos espermatozoides processados via <i>swim-up</i> com 4 M de sacarose.	100
Figura A1.1 - Domínio numérico e condições de contorno para simulação da avaliação do ângulo de contato.	112
Figura A1.2 - Aparência das malhas empregadas no GCI.	113
Figura A1.3 - (a) Curva de solidificação e (b) Curva de temperatura durante a etapa de congelamento.	113
Figura A1.4 - (a) Campos de temperatura e de solidificação para $\theta = 135^\circ$, (b) $\theta = 90^\circ$ e (c) $\theta=135^\circ$ em diferentes tempos.	114
Figura A2.1 - Molde em serpentina para dispositivo em PDMS.	116
Figura A2.2 - Molde circular para dispositivo em PDMS.	117
Figura A3.1 - Esquema do protótipo de um equipamento gerador de plasma para ionização de superfícies: a) Sistema completo e b) Câmara de vácuo.	118
Figura A3.2 - Imagens do teste de funcionamento do protótipo da câmara de plasma.	119
Figura A4.1 - Dispositivo para fixação dos chips de PDMS e criotubos.	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Datas históricas da criopreservação de sêmen.....	443
Tabela 2.2 - Parâmetros de referência do sêmen.....	51
Tabela 4.1 - Taxas de resfriamento para diferentes faixas de temperatura em 3 diferentes fluidos criogênicos e amostra de glicerol em chip de PDMS.....	90
Tabela 4.2 - Taxas de resfriamento obtidas para amostras de sêmen imersas em LN2 e SN2, alocadas em chips de PDMS e criotubos.	98

LISTA DE SIGLAS

CFD	Dinâmica de Fluidos Computacional (<i>Computacional Fluid Dynamics</i>)
CPA	Agentes crioprotetores (<i>Crioprotective Agents</i>)
DMSO	Dimetil Sulfoxido
FPS	<i>Frames per second</i>
GCI	<i>Grid Convergence Index</i>
GEYC	CPA glicerol-ovo-gema-citrato
LN2	Nitrogênio Líquido
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPS	<i>Open Pulled Straw</i>
PDMS	Polydimethylsiloxane
RSL	Revisão Sistemática da Literatura
SBRA	Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida
SFF	<i>Super Flash Freezing</i>
SisEmbrio	Sistema Nacional de Produção de Embriões
SN2	Nitrogênio <i>Slush</i>
TFE	<i>Thin Film Evaporation</i>
TRA	Técnicas de Reprodução Assistida

LISTA DE SIMBOLOS

T_G	Temperatura de transição vítrea	[°C]
T_H	Temperatura de transição homogênea	[°C]
dT/dt	Taxa de resfriamento	[°C/min]
V	Volume da solução	[m ³]
Pv	Probabilidade de vitrificação	[-]
k_4	Constante de cristalização	[°C/min]
x	Fração total de gelo formado na vitrificação	[%]
dT/dt_{cr}	Taxa de resfriamento crítica	[°C/min]
g_{max}	Percentual máximo de massa que pode ser congelado	[-]
g	Quantidade de gelo observada no processo de congelamento	[%]
T_M	Temperatura de fusão (derretimento/solidificação)	[-]
dT/dt_{cw}	Taxa de aquecimento crítica	[°C/min]
y_0, a, b	Constantes empíricas de acordo com CPA utilizado	[-]
H	Entalpia da fase	[J/kg]
k	Condutividade térmica	[W/mK]
ρ	Massa específica	[kg/m ³]
\vec{V}	Velocidade do fluido	[m/s]
S	Termo fonte	[-]
β	Fração mássica de líquido	[-]
p	Pressão da fase fluida	[Pa]
A_{mush}	Constante da interface sólido-líquido	[-]
e_a	Erro calculado entre malhas numéricas	[-]
r	Razão de refino entre malhas numéricas	[-]
ϕ	Parâmetro de referência para cálculo do GCI	[-]
T	Temperatura	[°C]
θ	Ângulo de contato da gota com o substrato	[°]
T_i	Temperatura inicial	[°C]
T_b	Temperatura do substrato	[°C]

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1.1 Objetivo Geral	20
1.1.2 Objetivos Específicos	20
1.2 JUSTIFICATIVA.....	21
1.3 ESTRUTURA DA PESQUISA.....	22
2 CRIOPRESERVAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO	23
2.1 MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO	23
2.1.1 Congelamento Lento	23
2.1.2 Vitrificação.....	24
2.1.2.1 Modelagem Matemática da Cristalização.....	26
2.1.2.2 Relação da taxa de resfriamento com a taxa de aquecimento	28
2.2 AGENTES CRIOPROTETORES – CPA	31
2.2.1 Crioprotetores Intracelulares.....	31
2.2.2 Crioprotetores Extracelulares.....	32
2.3 MÉTODOS PARA VITRIFICAÇÃO DE MATERIAIS BIOLÓGICOS.....	33
2.3.1 Vitrificação por Palhetas (<i>Open Pulled Straw</i> - OPS)	33
2.3.2 Vitrificação de Microgotas	34
2.3.3 Vitrificação em Película	37
2.3.4 Vitrificação via Impressão de Gotículas por Adesão	38
2.3.5 Vitrificação em Nitrogênio <i>Slush</i> – SN2.....	40
2.3.6 Evaporação de Filme Fino de Nitrogênio (TFE)	41
2.4 CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN.....	42
2.4.1 Preparação da amostra seminal.....	43
2.4.1.1 Lavagem simples	44
2.4.1.2 <i>Swim-up</i> direto	45
2.4.1.3 Gradiente de densidade descontínua.....	46
2.4.2 Congelamento da amostra e Armazenamento.....	46
2.4.3 Descongelamento e Tratamento da amostra.....	47
2.4.4 Morfologia do sêmen.....	47
2.4.4.1 Anomalias Morfológicas	49
2.4.4.2 Parâmetros Seminais de Referência.....	51
2.5 VITRIFICAÇÃO DE SÊMEN	51

3 MATERIAIS E MÉTODOS	57
3.1 MÉTODO DE VITRIFICAÇÃO DE GOTAS POR CONTATO	58
3.1.1 Metodologia Experimental	58
3.1.2 Modelagem Computacional do congelamento de gotículas.....	60
3.2 MÉTODO DE VITRIFICAÇÃO POR IMERSÃO.....	64
3.2.1 Metodologia Experimental	64
3.2.2 Amostras e Testes de Imersão	66
3.2.3 Modelagem Computacional do Processo de Imersão de Criotubo	67
3.3 DESENVOLVIMENTO DOS DISPOSITIVOS DE PDMS	69
3.3.1 Preparação dos Moldes de Poliestireno.....	69
3.3.2 Fixação dos Moldes	70
3.3.3 Preparação do PDMS	70
3.3.4 Tratamento Superficial por Plasma	71
3.4 TESTES BIOLÓGICOS.....	73
3.4.1 Preparação das amostras.....	73
3.4.2 Procedimento Experimental.....	74
4 RESULTADOS	77
4.1 MÉTODO DE VITRIFICAÇÃO DE GOTAS POR CONTATO	77
4.1.1 Comportamento do Avanço da Solidificação.....	77
4.1.2 Análise das Curvas de Temperatura e Taxa de Solidificação.....	80
4.1.3 Influência da Geometria da Superfície de Resfriamento	81
4.1.4 Influência do Material da Superfície de Resfriamento.....	82
4.2 MÉTODO DE VITRIFICAÇÃO POR IMERSÃO DIRETA	84
4.2.1 Validação Numérico-Experimental	84
4.2.2 Estudo Experimental das Condições de Vitricificação	86
4.2.2.1 Efeito da concentração de CPA – Criotubo	86
4.2.2.2 Efeito do Fluido Criogênico e do Volume da amostra – Criotubo	87
4.2.2.3 Influência do Fluido Criogênico – Chip de PDMS	89
4.3 TESTES COM MATERIAL BIOLÓGICO – SÊMEN.....	90
4.3.1 Bateria de testes I – Sêmen	90
4.3.1.1 Avaliação Térmica.....	91
4.3.1.2 Avaliação Biológica.....	92
4.3.2 Bateria de Testes II	94
4.3.2.1 Concentração mínima de CPA para Vitricificação.....	94

4.3.2.2 Influência da Espessura do PDMS na Taxa de Resfriamento	96
4.3.2.3 Avaliação Térmica.....	97
4.3.2.4 Avaliação Biológica.....	99
5 CONCLUSÃO.....	104
REFERÊNCIAS	107
APÊNDICE 1 - CALIBRAÇÃO DO MODELO: AVALIAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO.....	116
APÊNDICE 2 – FOLHAS 2D DOS MOLDES PARA FABRICAÇÃO DE PDMS	120
APÊNDICE 3 - PROJETO DE UM PROTÓTIPO DE UM EQUIPAMENTO PARA TRATAMENTO DE SUPERFÍCIES COM PLASMA	122
APÊNDICE 4 – FOLHA 2D DO DISPOSITIVO PARA IMERSÃO DAS AMOSTRAS.....	124

1 INTRODUÇÃO

A infertilidade é considerada um problema global de saúde pública, definida como a incapacidade de conceber após doze meses de atividade sexual regular desprotegida, afetando aproximadamente 15% dos casais em idade reprodutiva, representando aproximadamente 48 milhões de casais e 186 milhões de pessoas no mundo todo segundo a Organização Mundial de Saúde (WHO, 2021). Segundo a Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida (SBRA, 2019), aproximadamente 8 milhões de pessoas sofrem com problemas de fertilidade no Brasil, destes 35% dos casos são referentes ao homem, 35% à mulher, 20% a ambos e 10% de causas desconhecidas.

De acordo com o Sistema Nacional de Produção de Embriões (SisEmbrio, 2024), foram congelados no Brasil 115.318 embriões no ano de 2023, um aumento de 10,4% em relação a 2022. Com o avanço da ciência e da medicina, surgem opções para auxiliar nos problemas de infertilidade, como por exemplo, as técnicas de reprodução assistida (TRA), que são recursos eficazes para alcançar a gravidez de modo artificial ou parcialmente artificial.

As técnicas de reprodução assistida vão desde inseminação artificial, fertilização *in vitro* até criopreservação de sêmen, óvulos e embriões. São utilizadas em pacientes que apresentam problemas relacionados à função sexual e reprodutiva, tais como disfunção ovulatória, patologias nas tubas uterinas, endometriose, endométrio fino, fatores cervicais, infertilidade masculina (problemas relacionados ao sêmen), problemas na genética familiar ou quando já houve falha em outros tratamentos para infertilidade (BANERJEE e SIGLA, 2020).

O sucesso de um procedimento de criopreservação está diretamente relacionado ao protocolo de congelamento/aquecimento empregado, tendo como fator primordial a relação entre a taxa de resfriamento, o tipo e a concentração de agentes crioprotetores (CPA). Velocidades de resfriamento mais elevadas tendem a causar o rompimento das células, devido à geração de cristais de gelo intracelular, e seu oposto, à desidratação da célula. Para tanto, as soluções crioprotetoras exercem um papel importante para diminuir os danos causados durante o processo de criopreservação (SILVA et al., 2017).

No entanto, alguns crioprotetores não são totalmente inertes, como é o caso do Dimetilsulfóxido ou Sulfóxido de Dimetilo (DMSO ou Me₂SO), amplamente utilizado em atividades de criopreservação. Segundo estudos, o DMSO possui alta toxicidade, não podendo ser aplicado em pacientes em alta dosagem, tendo alto potencial de ocasionar alguns efeitos colaterais previamente relatados na literatura, tais como náusea, vômito, diarreia, insuficiência renal, bradicardia, hipertensão, edema pulmonar, entre outros problemas. De modo a atenuar

estes efeitos, medidas como a lavagem de células para remoção do DMSO, infusão fracionada, diminuição do percentual do crioprotetor para menos de 10% e substituição do mesmo por açúcares, álcoois de açúcares, polímeros especializados e pequenas moléculas vêm sendo estudadas (JONG *et al.*, 2020; WENG e BEAUCHESNE, 2020).

Os protocolos de criopreservação se dividem em: congelamento lento (convencional) e congelamento rápido (vitrificação). O congelamento lento é geralmente realizado através de criorefrigeradores programáveis, indicado para células grandes e ricas em água, utilizando CPA para atenuar a desidratação celular oriunda da formação de cristais de gelo extracelular. Já a vitrificação, é caracterizada por alcançar elevadas taxas de resfriamento sem cristalização da amostra, com rapidez e praticidade de execução, diminuição da quantidade de CPA e aumento da viabilidade do material biológico, ideal para células pequenas, com menos água intracelular (MEHTA, 2020).

Alguns pesquisadores têm proposto a vitrificação ultrarrápida, na qual é possível alcançar taxas de resfriamento extremamente altas, superiores a 10.000 °C/min, dependendo do volume da amostra de material biológico, diminuindo a quantidade de CPAs ou até mesmo sem a necessidade de utilização de crioprotetores (SU *et al.*, 2020; AKIYAMA *et al.*, 2019).

Dentre os métodos de vitrificação destacam-se a vitrificação por imersão direta e a vitrificação de gotículas, aplicadas tanto à medicina humana, como veterinária e biologia. O processo de vitrificação por imersão direta é um dos processos mais simples e um dos mais utilizados em aplicações gerais de criopreservação. O processo consiste basicamente em realizar a imersão das amostras em criotubos (0,5 a 2 ml) ou em palhetas abertas ou fechadas (0,25 a 0,5 ml) em um fluido criogênico, geralmente nitrogênio líquido (KUWAYAMA *et al.*, 2005; KOZINK *et al.*, 2006; ZHU *et al.*, 2014; Maria *et al.*, 2015; Júnior *et al.*, 2018; HUANG *et al.*, 2020).

A vitrificação de gotículas pode ser realizada por imersão ou por contato. A vitrificação de gotículas por imersão é caracterizada pelo contato direto da amostra com o fluido refrigerante, com altas taxas de resfriamento, boa viabilidade e simplicidade. Já na vitrificação de gotículas por contato, as amostras são depositadas e congeladas sobre uma superfície resfriada, sem o contato direto com o meio refrigerante, reduzindo assim o risco de contaminação cruzada (LE *et al.*, 2019; O'NEILL *et al.*, 2019; NAKAYAMA *et al.* 2020; PRUß *et al.*, 2021, REN *et al.*, 2024).

Um dos grandes desafios quando se fala em métodos de vitrificação de pequenos volumes de materiais biológicos, é mensurar a taxa de solidificação, que pode ser feita por calorimetria, análise de imagens ou de forma analítica. Bourton (1986), foi o pioneiro em

conseguir quantificar analiticamente a relação entre a taxa de resfriamento e de cristalização, para taxas de resfriamento na ordem de 80-160 °C/min. Atualmente, alguns autores vêm utilizando modelos matemáticos aplicados em simulações computacionais (CFD), possibilitando uma ampla gama de análises a serem feitas numericamente, ajudando no aprimoramento e desenvolvimento de novos protocolos de vitrificação (AKIYAMA *et al.*, 2019; SHI *et al.*, 2018; SANSINENA *et al.*, 2011; ZHOU *et al.*, 2013; MOMOZAWA, K. *et al.*, 2019).

Percebe-se então, que, muito do desenvolvimento científico de novos métodos de vitrificação, tanto experimentais como numéricos, são destinados a aplicações para amostras com volumes pequenos, de modo a aumentar as taxas de resfriamento, atenuando os efeitos da cristalização, manipulação mecânica e uso de CPA (HUANG *et al.*, 2020; ISACHENKO *et al.*, 2012). No entanto, volumes pequenos ($\leq 10 \mu\text{L}$), apesar de apresentarem bons resultados quanto à vitrificação, restringem a gama de aplicação comercial destes métodos, devido à dificuldade de processamento e manuseio de alíquotas tão pequenas. Logo, é necessário buscar desenvolver métodos com volumes otimizados, atendendo os requisitos de eficiência térmica e biológica, facilitando a aplicação em escala comercial.

Neste contexto, este trabalho atua no desenvolvimento numérico-experimental de dois métodos de vitrificação, por imersão direta, e de gotículas por contato, para aplicação comercial de criopreservação de sêmen, em parceria com a empresa de biotecnologia HEMOCORD, com sede em São Leopoldo, RS, desenvolvendo protocolos e aprimorando metodologias, buscando garantir a eficiência térmica dos processos de vitrificação, bem como a viabilidade das amostras.

1.1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral desta pesquisa é desenvolver e avaliar métodos de vitrificação aplicados a criopreservação de sêmen humano.

1.1.2 Objetivos Específicos

Os objetivos específicos são:

- a) Desenvolver experimentalmente o método de vitrificação por imersão em nitrogênio líquido (LN2) e nitrogênio *slush* (SN2), analisando a influência do fluido criogênico;

- b) Desenvolver experimentalmente o método de vitrificação de gotículas sobre superfícies planas e com cavidades;
- c) Analisar numericamente por CFD o desempenho térmico dos métodos experimentais de vitrificação;
- d) Projetar e desenvolver dispositivos em PDMS para acondicionamento da amostra para a vitrificação por imersão, comparando o processo com amostras em criotubos;
- e) Avaliar a influência do tipo de CPA e concentração, além do volume da solução, na taxa de resfriamento e vitrificação;
- f) Analisar a influência da geometria e do ângulo de contato das gotas com a superfície de resfriamento;
- g) Estudar numérico-experimentalmente o processo de cristalização durante a vitrificação;
- h) Testar a eficiência biológica da amostra seminal, quanto à motilidade e viabilidade.

1.2 JUSTIFICATIVA

A qualidade e a eficiência de um protocolo de criopreservação estão relacionadas com o procedimento de preparação do material biológico, o método de congelamento empregado, o volume da amostra e a relação entre a taxa de resfriamento e a concentração/tipo de agentes crioprotetores. Em se tratando da criopreservação de espermatozoides, o procedimento de congelamento das amostras espermáticas é aplicado nos casos em que se tem bancos de sêmen, pacientes com dificuldade na produção de sêmen (oligospermia) ou com azoospermia, antes de radioterapias e quimioterapias, antes de vasectomias ou cirurgias para tratamento de infertilidade (BANERJEE e SIGLA, 2020).

Tanto a viabilidade como a motilidade do sêmen tendem a ser superiores para o processo de vitrificação em relação ao congelamento lento, devido a menor concentração e tempo de contato dos espermatozoides com os crioprotetores. Para garantir que a vitrificação ocorra, pode-se trabalhar com algumas variáveis de processo, tais como, incremento da taxa de resfriamento, aumento da viscosidade da solução e diminuição do volume da amostra (YAVIN e ARAV, 2007). A viscosidade da solução pode ser incrementada aumentando a concentração de CPA, já a taxa de resfriamento, pode ser aumentada reduzindo o volume da amostra, alterando o recipiente da amostra e/ou modificando o meio de resfriamento.

Para o método de vitrificação de gotas por contato, pode-se aumentar a velocidade de resfriamento mudando as condições do substrato de resfriamento, tal como geometria da

superfície de contato e tipo de material. Já para o método de imersão direta, a taxa de resfriamento pode ser incrementada modificando as propriedades do meio de imersão, tal como a técnica de slush de nitrogênio (SN2), onde a pressão e temperatura do meio são reduzidas, formando uma mistura bifásica sólido-líquido, diminuindo a intensidade do Efeito Leidenfrost que ocorre durante o estágio inicial de imersão da amostra (OSMAN *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2020). Além disso, outra forma de aumentar a taxa de resfriamento é modificando o tipo e espessura do recipiente para alocação da amostra, variando entre criotubos, palhetas e dispositivos microfluidicos, alterando o tipo de material e capacidade de armazenamento.

Assim, este trabalho irá desenvolver numérico-experimentalmente dois métodos de vitrificação comumente utilizados para criopreservação de sêmen, sendo a vitrificação por imersão em LN2 e SN2 (amostras em criotubos e dispositivos de PDMS) e vitrificação de gotas (por contato), propondo metodologias e elucidando sobre as peculiaridades de cada método.

1.3 ESTRUTURA DA PESQUISA

O trabalho está disposto da seguinte forma: Introdução, abordando os objetivos e justificativa, seguida pela revisão da literatura, detalhando o processo de criopreservação de materiais biológicos, tais como métodos e aplicações, agentes crioprotetores, vitrificação de sêmen, morfologia e características do sêmen.

Na sequência é apresentada a metodologia numérica e experimental do trabalho, elucidando os procedimentos, equações e materiais empregados para realização do estudo. Por fim, são apresentados os resultados da pesquisa.

2 CRIOPRESERVAÇÃO DE MATERIAL BIOLÓGICO

O processo de criopreservação de células consiste em congelar e armazenar materiais biológicos por longos períodos, geralmente em nitrogênio líquido à $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, sem que ocorra a perda da viabilidade deles. Em faixas de temperaturas extremamente baixas, não existe atividade bioquímica considerável, devido à falta de energia térmica para que ocorra reações químicas e a baixa quantidade de água líquida para manter os processos metabólicos (MENON E D'SOUZA, 2018).

O principal risco durante o processo de criopreservação é o dano celular devido à formação de cristais de gelo intracelular, ocorrendo quando a amostra fica muito tempo abaixo da temperatura de transição vítrea, $-130\text{ }^{\circ}\text{C}$. Isto pode ser resolvido utilizando agentes crioprotetores (CPAs) e/ou aplicando elevadas taxas de resfriamento e aquecimento que minimizem a quantidade de água intracelular sujeita à cristalização. (WHO manual, 2021). Assim, a etapa mais sensível da criopreservação de uma amostra celular é o processo de congelamento, pois é nela que poderão ocorrer as crioinjúrias, afetando a viabilidade da amostra. O processo de congelamento pode ser categorizado em 3 tipos: congelamento lento (convencional), congelamento rápido (vitricificação) e liofilização.

2.1 MÉTODOS DE CRIOPRESERVAÇÃO

2.1.1 Congelamento Lento

O método convencional de criopreservação de materiais biológicos, também conhecido como congelamento lento, é uma técnica baseada na desidratação celular e vastamente empregada no congelamento de embriões, óvulos, espermatozoides, células tronco e tecidos. Neste método, as amostras são congeladas em um criorefrigerador programável, Figura 2.1, abaixo do ponto de congelamento, controlando a taxa de resfriamento em um processo lento e em etapas, utilizando baixas velocidades de resfriamento juntamente com soluções crioprotetoras. O tempo total de preparação e congelamento das amostras pode variar entre 3 e 6 horas, com taxas de resfriamento na ordem de $1 - 25\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$, dependendo do material biológico e do protocolo empregado. (BEHR E SHU, 2010; SHEHATA E CHIAN, 2010; MENON E D'SOUZA et al., 2018).



Figura 2.1 - Exemplos de criorefrigeradores programáveis.

Fonte: <https://www.thermofisher.com>, <https://planer.com>, <https://www.cryosolutions.ch>.

O sucesso do procedimento de criopreservação convencional está diretamente ligado à taxa de resfriamento e à concentração de CPAs. Taxas de resfriamento muito elevadas não permitem a completa remoção da água intracelular, favorecendo a cristalização e rompimento da célula. Já taxas de resfriamento muito baixas danificam as células devido ao contato excessivo da solução com baixas temperaturas (*Chilling injury*). Além disso, baixas taxas de congelamento aumentam o tempo de contato da célula com o crioprotetor, que em caso de alta toxicidade, é prejudicial (MENON E D'SOUZA et al., 2018).

2.1.2 Vitrificação

Vitrificação é um processo físico em que a amostra sofre uma transição direta do estado líquido para o estado vitrificado e amorfo, sem a formação de cristais de gelo, quando exposta a temperaturas extremamente baixas e altas taxas de resfriamento. Isto ocorre quando uma solução atinge sua temperatura de transição vítrea, conforme ilustrado na Figura 2.2.

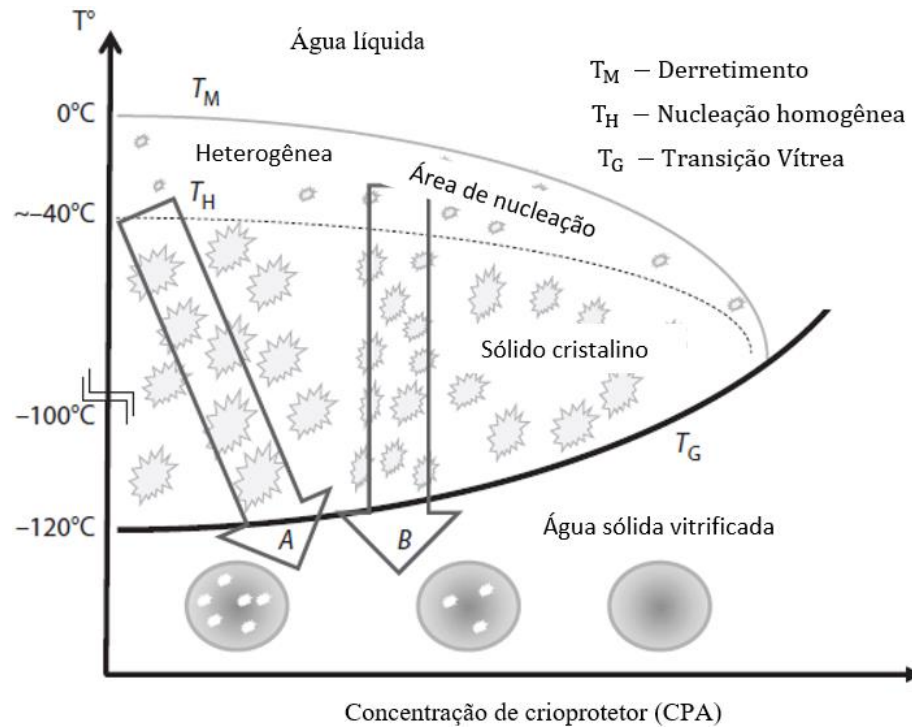


Figura 2.2 – Diferentes fases da água de acordo com a temperatura e concentração de CPA.
Fonte: Adaptado de Vanderzwalmen et al. (2016).

De modo a evitar a formação de cristais de gelo, a passagem da amostra pela região de instabilidade termodinâmica, ou seja, da nucleação homogênea ($T_h = -38\text{ °C}$) até a temperatura de transição vítrea ($T_g = -137\text{ °C}$), deve ser mais rápida que a taxa de resfriamento crítica da solução, ou seja, a velocidade de formação dos cristais (AKIYAMA et al., 2019). A probabilidade de uma substância alcançar esta condição pode ser determinada através da relação de suas propriedades, que relaciona a taxa de resfriamento ou aquecimento (dT/dt), a viscosidade de acordo com concentração de CPA (μ) e o volume da solução (V), vide Equação 2.1, proposta por Yavin e Arav, 2007.

$$Pv = \frac{\left(\frac{dT}{dt}\right)\mu}{V} \quad (2.1)$$

Quanto maior a taxa de resfriamento/aquecimento, maior a viscosidade e menor o volume da amostra, maior será a chance de vitrificar uma solução. Para uma solução de água pura, estima-se um valor para taxa de resfriamento na ordem de 10^5 a 10^6 °C/s para que não ocorra a formação de cristais de gelo (BRUGGELLER e MAYER, 1980).

Yavin e Arav (2007) documentaram alguns problemas usuais durante o processo de vitrificação, conforme Figura 2.3, como sendo a cristalização, a fratura e a devitrificação da

amostra. Para tanto, os autores utilizam o método de vitrificação em palhetas, variando a concentração de CPA (50, 87 e 100%) e volume da solução (0,5 - 2 μ L).

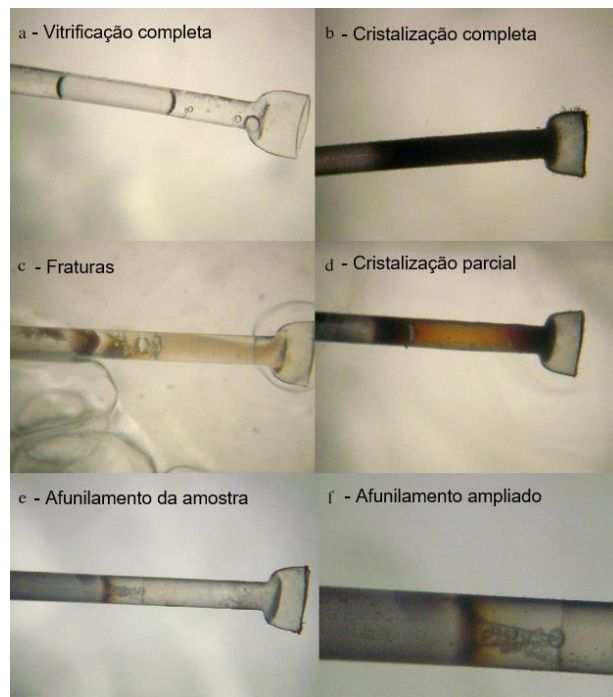


Figura 2.3 - Possíveis problemas durante o processo de vitrificação.

Fonte: Adaptado de Yavin e Arav, 2007.

De modo a evitar os problemas mostrados pela Figura 2.3, os autores elencam algumas medidas que podem ser tomadas, em ordem de importância. Para evitar o fenômeno da cristalização, a primeira medida seria a redução de volume, seguida pelo aumento da taxa de resfriamento, e por último, aumento da concentração de agente crioprotetor. Para evitar fraturas da amostra, pode-se reduzir a concentração de CPA, reduzir o volume da amostra ou a taxa de resfriamento. Já para evitar o afunilamento, oriundo da devitrificação/recristalização da amostra, pode-se incrementar a taxa de resfriamento/aquecimento, reduzir o volume da amostra ou aumentar a concentração de CPA.

2.1.2.1 Modelagem Matemática da Cristalização

Bourton (1986), conseguiu caracterizar quantitativamente a relação entre a taxa de resfriamento e grau de formação de gelo, para diferentes tipos e concentrações de soluções compostas por água e CPAs. A Equação 2.2 apresenta a relação de Bourton para taxa de resfriamento versus cristalização, predizendo com alto grau de acurácia a quantidade de cristais de gelo formados durante o processo de congelamento de uma solução.

$$-\ln\left(1 - x^{\frac{1}{3}}\right) + \frac{1}{2}\ln\left(1 + x^{\frac{1}{3}} + x^{\frac{2}{3}}\right) + \sqrt{3}\operatorname{arctg}\left(\frac{\sqrt{3}x^{\frac{1}{3}}}{2 + x^{\frac{1}{3}}}\right) = \frac{k_4}{\left|dT/dt\right|} \quad (2.2)$$

onde k_4 [°C/min] é uma constante de cristalização dependente da solução utilizada, referente à velocidade de avanço da porção de gelo formada, x [-] é a fração total de gelo formado na condição de máxima cristalização ($0 \leq x \leq 1$), e dT/dt [°C/min] é a taxa de resfriamento.

Quando a fração de gelo formado é muito pequena, por exemplo, $x = 10^{-6}$, a Equação 2.2 pode ser simplificada por:

$$dT/dt_{cr} = 100 \frac{k_4}{3} \quad (2.3)$$

A Equação 2.3 representa a taxa de resfriamento crítica dT/dt_{cr} , ou seja, é a taxa de resfriamento acima da qual não é observada formação apreciável de gelo ou quando a fração de gelo cristalizado pode ser considerada desprezível. No entanto, não é possível observar experimentalmente frações tão pequenas, então Bourton (1993) propôs um valor mais apropriado para dT/dt_{cr} sendo de aproximadamente 0,2% (limite para análise por calorimetria da época). Então, a nova equação para a taxa de resfriamento crítica é definida por:

$$dT/dt_{cr} = \frac{k_4}{3 \left(\frac{0,2}{g_{max}}\right)^{\frac{1}{3}}} \quad (2.4)$$

em que g_{max} é o máximo percentual de massa da solução que pode ser congelado quando observado experimentalmente por calorimetria, para taxas de resfriamento extremamente baixas. A Figura 2.4 mostra o efeito da constante de avanço da cristalização k_4 , para diferentes valores de dT/dt_{cr} . A variável g representa a quantidade de gelo observada durante o processo de congelamento.

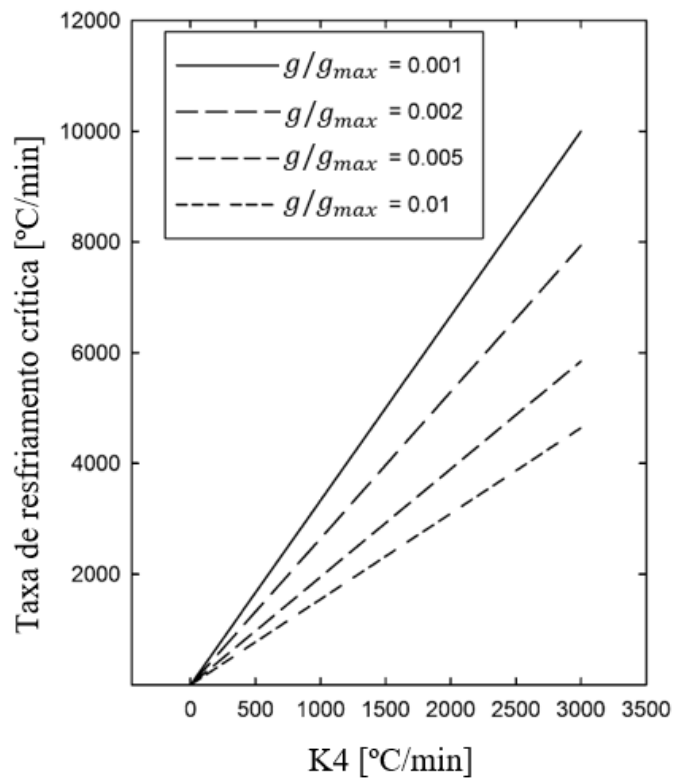


Figura 2.4 - Relação entre a constante k_4 de Bourton para valores de fração de gelo, x , entre 0,1 e 1%.

Fonte: Adaptado de Fahy e Wowk, 2015.

2.1.2.2 Relação da taxa de resfriamento com a taxa de aquecimento

A eficácia de um processo de vitrificação vai depender tanto da taxa de resfriamento quanto da taxa de aquecimento, visto que em ambas as etapas podem ocorrer a formação de cristais de gelo. Durante o processo de nucleação, a formação dos cristais de gelo depende apenas das movimentações e orientações locais das moléculas. Já o crescimento e avanço da parcela de água congelada, depende fortemente de uma certa difusão, inversamente proporcional à viscosidade da solução (FAHY e WOWK, 2015).

O crescimento da frente de gelo ocorre mais rapidamente próximo da temperatura de derretimento/solidificação (T_M), enquanto a nucleação tem seu ápice próximo à temperatura de vitrificação (T_G), logo, o processo de aquecimento tende a formar mais cristais de gelo do que o processo de resfriamento. De acordo com Fahy e Rall (2007), a taxa crítica de aquecimento é em torno de 10^3 a 10^8 vezes maior que a taxa de resfriamento necessária para evitar a formação de cristais de gelo, conforme ilustrado na Figura 2.5. No entanto, a depender do tipo de material biológico a ser vitrificado, a taxa de aquecimento pode variar entre $10 - 10^3$ vezes a taxa de resfriamento.

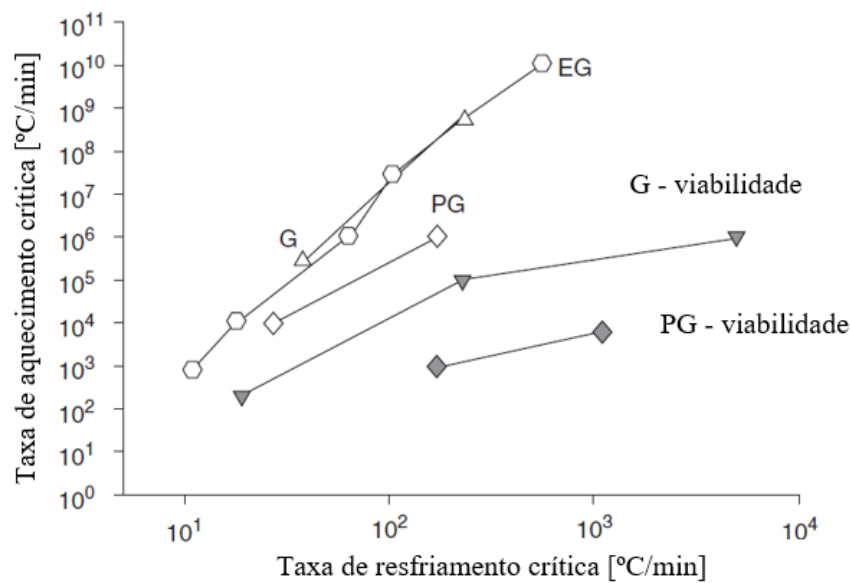


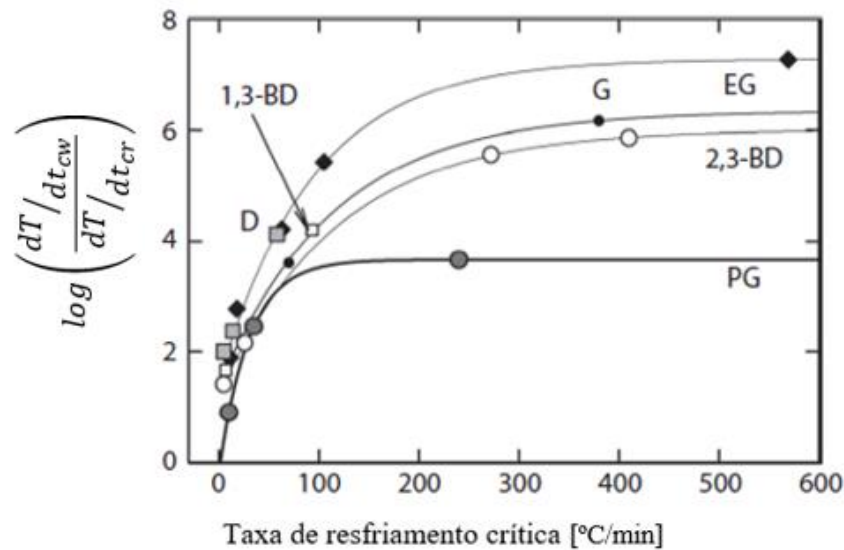
Figura 2.5 - Comparação entre a taxa de resfriamento e aquecimento para diferentes tipos de solução crioprotetora.

Fonte: Adaptado de Fahy e Rall, 2007.

De acordo com a Figura 2.5, a viabilidade da amostra possui maior dependência da taxa de aquecimento, de modo a evitar os efeitos da desvitrificação, por exemplo, a taxa crítica de resfriamento para o glicerol é em torno de 10² °C/min, enquanto para o aquecimento, esta taxa é na ordem de 10⁴ °C/min. Isto significa que a velocidade de cristalização é maior no processo de aquecimento do que no resfriamento da amostra. A Figura 2.6 mostra algumas curvas empíricas da relação entre a taxa de aquecimento crítica, $\frac{dT}{dt_{cw}}$ e, a taxa de resfriamento crítica, $\frac{dT}{dt_{cr}}$ para 6 tipos de soluções (água + crioprotetor): etileno glicol (EG), glicerol (G), 1,3 butanodiol, 2,3 butanodiol (BD), propileno glicol (PG) e dimetilsulfóxido (D). Para determinação da taxa de resfriamento, pode-se aplicar uma relação matemática de ajuste da curva entre a taxa de resfriamento crítica e a taxa de aquecimento crítica, conforme mostrado pela Equação 2.5.

$$\log \left(\frac{v_{cw}}{v_{cr}} \right) = y_0 + a(1 - e^{-b \cdot v_{cr}}) \quad (2.5)$$

onde y_0 , a , b são constantes empíricas, que variam conforme a solução crioprotetora utilizada.



Crioprotetores	y_0	a	b
EG and D	1.4659	5.8246	0.0107
G and 1,3-BD	1.3668	4.9799	0.0088189
2,3-BD	1.2023	4.8140	0.0085981
PG	-0.1792	3.8417	0.0331

EG: Etileno glicol; D: DMSO; G: Glicerol; BD: Butanodiol.

Figura 2.6 - Relação entre as taxas de resfriamento e aquecimento para diferentes soluções e parâmetros da Equação 2.5, para diferentes crioprotetores.

Fonte: Adaptado de Fahy, 2016.

É importante ressaltar que não existem valores fixos para taxas de resfriamento e aquecimento, visto que o sucesso de um protocolo de vitrificação depende de vários fatores, como tipo de material biológico, volume da solução, tipo e concentração de agentes crioprotetores, aparato de congelamento empregado, entre outros.

Seki (2016) avaliou a influência das taxas de resfriamento e aquecimento na viabilidade de oócitos e embriões de camundongos, utilizando dois métodos de vitrificação: método por palhetas (sistema fechado) e o método *Cryotop* (sistema aberto). Em ambos os casos, a amostra biológica foi suspensa em uma solução com 10% de etileno glicol, 10% de acetamida, 24% de ficoll e 0,4 M de sacarose. O autor empregou diferentes taxas de resfriamento e aquecimento, variando de 37 °C/min a 69.000 °C/min e 137 °C/min a 117.500 °C/min, respectivamente. Foi observado que a taxa de aquecimento é predominante sobre a taxa de resfriamento, onde quanto

maior a taxa de aquecimento, maior será a viabilidade da amostra, superando 80% para o valor máximo estabelecido em seu estudo.

No entanto, Ali e Shelton (2007) relatam que, quando aplicado à criopreservação de embriões, taxas de resfriamento na ordem de 4460 °C/min, aquecidas de -196 °C para 37 °C, apresentam boa viabilidade pós vitrificação, não sendo obrigatória a utilização de taxas de aquecimento extremamente altas.

2.2 AGENTES CRIOPROTETORES – CPA

Os crioprotetores são componentes químicos de baixo peso molecular e alta permeabilidade química, que atuam na proteção das células contra os danos oriundos do processo de congelamento, como a formação de cristais de gelo (cristalização). Isto ocorre através da diminuição do ponto de congelamento da substância, reduzindo a quantidade de sais e solutos presentes na fase líquida da amostra, enfraquecendo os efeitos de cristalização (CHIMOTE et al., 2015). Os agentes crioprotetores, ou CPAs, podem ser classificados de acordo com seu modo de ação, divididos em dois grupos: Penetrantes (intracelulares) e Não-penetrantes (extracelulares).

2.2.1 Crioprotetores Intracelulares

Esta categoria de CPA é caracterizada por ser completamente miscível com água e por penetrar através da membrana plasmática da célula, evitando a formação de cristais de gelo intracelular, devido às ligações do hidrogênio com a água. Este tipo de CPA atua na estabilização das proteínas da membrana da célula e na redução da quantidade de eletrólitos, protegendo assim o citoesqueleto das células (GUTGUTIA et al., 2018; MENON e D’SOUZA, 2018).

Alguns exemplos desta categoria de CPA são o dimetil sulfoxido, propileno glicol, etileno glicol, metanol e glicerol, este último sendo amplamente utilizado para congelamento de sêmen. No entanto, quando utilizados em grandes concentrações, normalmente os crioprotetores penetrantes são tóxicos, como é o caso do dimetil sulfoxido (DMSO).

2.2.2 Crioprotetores Extracelulares

Os agentes crioprotetores extracelulares ou não-penetrantes são caracterizados por grandes moléculas de alto peso molecular, que agem apenas na região ao redor da célula, fomentando um gradiente de osmolaridade, que acarreta a extração da água intracelular, aumentando a viscosidade da amostra e desidratando o meio interno. Altas temperaturas e uma exposição prolongada de células à estas moléculas é altamente tóxico, por isto, geralmente se utiliza uma combinação com CPAs penetrantes. Alguns exemplos de crioprotetores não-penetrantes são a sacarose, rafinose, glicina, albuminas, dextransos, citrato de gema do ovo, entre outros (MENON e D'SOUZA, 2018). A Figura 2.7 mostra a comparação do mecanismo de ação para cada tipo de crioprotetor.

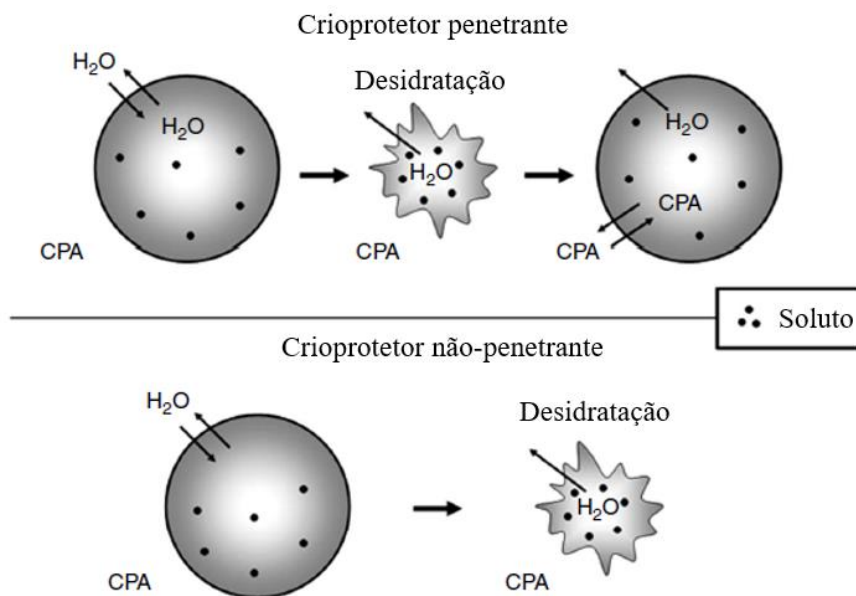


Figura 2.7 - Mecanismos de ação entre CPAs intracelulares e extracelulares.

Fonte: Adaptado de Swain e Smith, 2010.

Como pode ser visto pela Figura 2.7, os crioprotetores intracelulares agem penetrando na célula e se equilibrando com o citoplasma, assim, evitando a sua desidratação. Por terem uma temperatura de solidificação baixa, conseguem reduzir a formação de cristais de gelo durante o processo de congelamento. Além disso, esta categoria de CPA fornece uma proteção adicional para a célula contra danos oriundos de sais, agindo como um solvente, reduzindo a fração destes na água intracelular remanescente. Já o mecanismo de ação dos crioprotetores extracelulares é diferente, promovendo a desidratação celular, assim, com o mesmo intuito de evitar a formação de cristais de gelo durante o congelamento. Esta categoria de CPA tem por característica evitar o choque osmótico

durante o reaquecimento do material biológico, que ocorre quando a pressão dentro da célula é maior que a pressão externa, acarretando a sua desidratação (SWAIN e SMITH, 2010).

A Figura 2.8 traz uma comparação entre os tipos de crioprotetores intracelulares e extracelulares, bem como suas aplicações a humanos e outras espécies.

Crioprotetor	Tipo de célula	Espécie destinada	Crioprotetor	Tipo de célula	Espécie destinada
Agentes penetrantes			Agentes não-penetrantes		
Dimetil sulfoxido	Óvulos Embriões Sêmen	Ratos Humanos Vacas	Sacarose	Óvulos Embriões Sêmen	Ratos Humanos Vacas
Propileno Glicol	Óvulos Embriões Sêmen	Ratos Humanos Vacas	Trealose	Óvulos Embriões Sêmen	Ratos Humanos Vacas Cavalos
Etileno Glicol	Óvulos Embriões Sêmen	Ratos Humanos Vacas	Ficoll	Óvulos Embriões	Ratos Humanos Vacas
Glicerol	Óvulos Embriões Sêmen	Ratos Humanos Vacas	Polietileno Glicol	Óvulos Embriões	Ratos Humanos Vacas
Adonitol	Embriões Sêmen	Ratos Humanos Vacas Ovelhas			

Figura 2.8 – Exemplos de crioprotetores e suas aplicações.

Fonte: Adaptado de Swain e Smith, 2010.

Assim, a correta escolha da categoria e tipo do CPA a ser empregado vai evitar a formação de cristais de gelo e o choque osmótico, a depender de alguns fatores, tais como tamanho da célula, permeabilidade de sua membrana, temperatura durante o processo de vitrificação e reaquecimento, concentração e tempo de exposição da solução aos agentes crioprotetores.

2.3 MÉTODOS PARA VITRIFICAÇÃO DE MATERIAIS BIOLÓGICOS

2.3.1 Vitrificação por Palhetas (*Open Pulled Straw - OPS*)

Vajta *et al.* (1998), desenvolveram o protocolo OPS de vitrificação (*Open Pulled Straw*) para trabalhar inicialmente com o desenvolvimento de embriões bovinos, vide Figura 2.11. Este método consiste em coletar os embriões através de um canudo (0,25 ml ou 0,5 ml), denominado palheta (Figuras 2.9 a, b), pelo efeito de capilaridade e em seguida submergi-los em um recipiente contendo nitrogênio líquido (Figura 2.9 c), até que as células em suspensão no

interior do tubo sejam completamente vitrificadas na temperatura do nitrogênio, para então serem armazenadas em um tanque de preservação/armazenagem utilizando nitrogênio líquido.

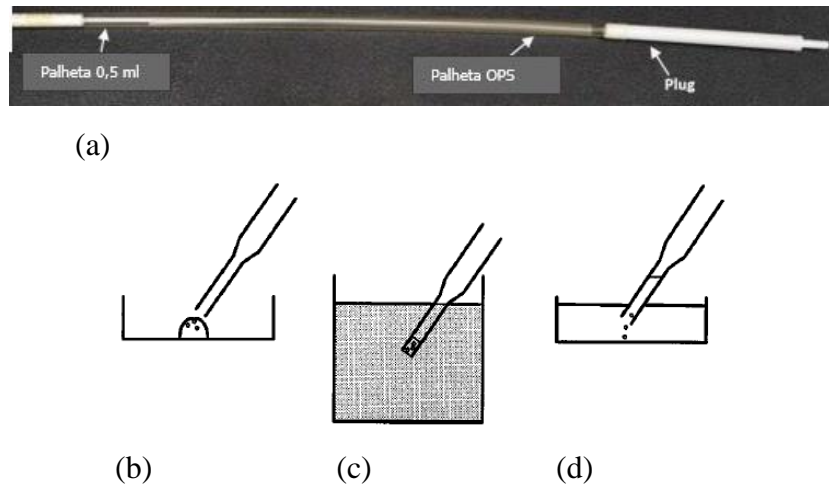


Figura 2.9 - Método de vitrificação OPS: (a) Palheta, (b) Coleta, (c) Resfriamento em nitrogênio líquido e (d) Aquecimento.

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

Através do método OPS pode-se alcançar taxas de resfriamento superiores a 20.000 °C/min com um curto contato com os agentes crioprotetores, menos de 30 s até uma temperatura de -180°C, minimizando os efeitos tóxicos e osmóticos das substâncias crioprotetoras.

2.3.2 Vitrificação de Microgotas

A vitrificação de gotas pode acontecer de duas formas: por imersão direta em LN2, ou sobre superfícies sólidas, por contato direto. Na vitrificação de gotas por imersão, as gotículas são depositadas dentro de um recipiente contendo nitrogênio líquido, geralmente criotubos, e logo após, são enviadas para os tanques de armazenamento. Apesar de ser um método simples e eficaz, devido ao contato direto com o meio de resfriamento, pode acarretar contaminação cruzada da amostra.

Já a vitrificação por contato, ou superfície sólida (SSV), proposta inicialmente por Bagis *et al.* (2002), as amostras são depositadas e congeladas em uma superfície resfriada sem contato direto com o meio de resfriamento, reduzindo assim o risco de contaminação cruzada e mitigando o efeito dificultador do filme de vapor na transferência de calor durante o resfriamento (ZHANG *et al.*, 2012). Neste caso, a viabilidade celular varia de 76% a 95%, com

volumes de gotículas entre 20 μL e 380 μL . Quanto menor o volume da gota associado à baixa concentração de CPA, maior será a viabilidade celular. Um aspecto importante do processo é o sistema de formação e injeção de gotas, que atinge pequenos volumes e uniformidade. Gotículas contendo células ou tecidos são depositadas, por exemplo, em uma superfície plana ou em cavidades previamente resfriadas (em torno de $-190\text{ }^\circ\text{C}$), feitas de materiais como vidro ou metais.

Marchesi et al. (2005) realizaram um estudo CFD via Ansys Fluent[®] de um processo de vitrificação por gotejamento (sem crioprotetores), através de um modelo considerando a transferência de calor condutiva combinada com a mudança de fase de solidificação. O objetivo foi avaliar a viabilidade térmica do método e a influência dos parâmetros termo físicos envolvidos.

A Figura 2.10 mostra as condições de simulação do processo de vitrificação por gotejamento aplicado.

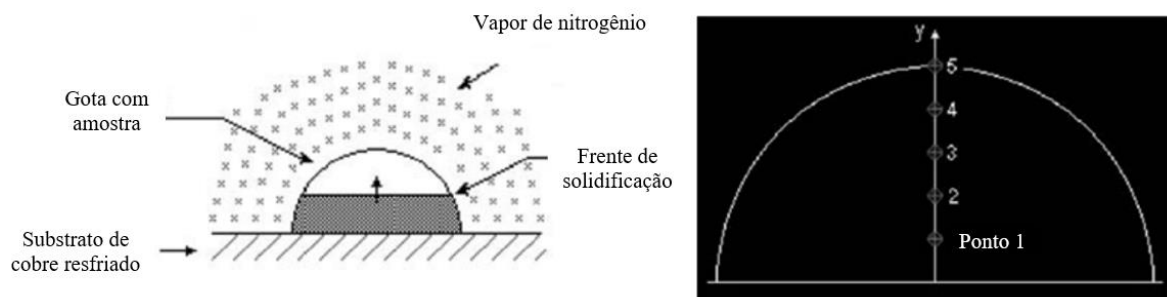


Figura 2.10 – Domínio numérico da simulação computacional de uma gotícula depositada e resfriada em um substrato de cobre.

Fonte: Adaptado de Marchesi et al. (2005).

Os autores avaliaram a variação do diâmetro da amostra (gotícula), através da coleta de temperatura em 5 pontos radiais, utilizando dois tipos de fluido refrigerante (nitrogênio líquido e hélio líquido). Também foi estudada a influência da temperatura de vapor em relação à temperatura do substrato. Foi verificado então que a taxa de resfriamento dentro da amostra possui dependência espacial e temporal, variando conforme a posição dentro da amostra, onde foi possível encontrar taxas de resfriamento $>150.000\text{ }^\circ\text{C/s}$.

Vries et al. (2019) desenvolveram um sistema de vitrificação de células por gotejamento juntamente com um método de desidratação osmótica, utilizando grandes montantes de células, onde as gotículas entram em contato direto com o nitrogênio líquido. A Figura 2.11 mostra o aparato experimental projetado pelos autores, onde utilizaram gotículas de grandes volumes,

com diâmetros de 3 e 5 mm, com baixas porcentagens de agente crioprotetor (15% em volume), de modo a minimizar a toxicidade e a perda de viabilidade da amostra. Foram alcançadas taxas de resfriamento de 1320 °C/min para gotículas com 3 mm de diâmetro e 960 °C/min para gotículas com 5 mm de diâmetro, com boa viabilidade de função metabólica após descongelamento.



Figura 2.11 – Método de vitrificação por gotejamento proposto por Vries et al. (2019).

Fonte: Vries et al. (2019).

Akiyama et al. (2019) idealizaram um sistema de criopreservação de células de mamíferos por congelamento ultrarrápido, denominado de Congelamento *Superflash* (*Super Flash Freezing* – SFF) sem a utilização de agentes crioprotetores. Os autores utilizaram simulações numéricas para estimar previamente as taxas de resfriamento, via software comercial COMSOL®, com validação experimental. Para tanto, foi empregada uma técnica de impressão de gotas, em que microgotículas são depositadas sobre uma superfície em temperatura extremamente baixa, imersa em uma fase gasosa proveniente da evaporação do nitrogênio líquido, obtendo assim velocidades de resfriamento extremamente baixas, atingindo um estado próximo à vitrificação, conforme ilustrado pela Figura 2.12.

Através deste sistema, os autores conseguiram taxas de resfriamento na ordem de $3,7 \times 10^4$ °C/s, variando apenas a espessura do substrato (150 µm e 5 µm) e o diâmetro do bocal gotejador (60 µm e 40 µm), resultando em gotículas com volume de aproximadamente 200 pL e 40pL. Também foi realizada a comparação do protocolo de congelamento *Super Flash* (SFF)

com um protocolo convencional, utilizando baixas taxas de congelamento e 10% de DMSO em volume. Os autores verificaram que o método de congelamento SFF, livre de soluções crioprotetoras, apresentou alta viabilidade celular quando comparado com o método tradicional, especialmente para células pequenas, como por exemplo, espermatozoides e trombócitos, com futuras aplicações em células tronco pluripotentes e hemócitos para transfusão de sangue.

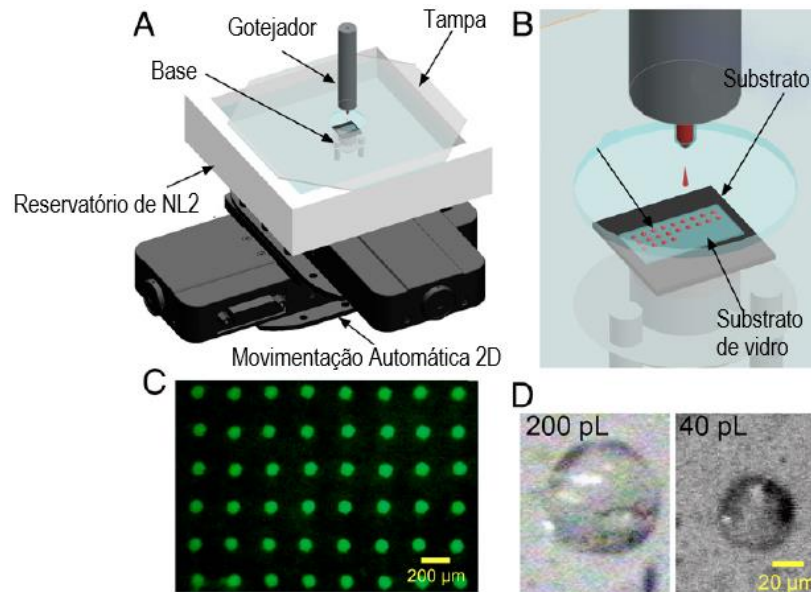


Figura 2.12 - Congelamento por gotículas Super Flash - SFF.

Fonte: Adaptado de Akiyama et al. (2019).

2.3.3 Vitriificação em Película

Tiersch et al. (2020) desenvolveram um método de vitriificação utilizando impressão 3D, aplicado na criopreservação de material genético oriundo de espécies aquáticas. O método consiste em suspender por adesão uma película fina de sêmen em um orifício circular, facilitando o processamento, congelamento e armazenamento. A Figura 2.13 mostra o protótipo criado pelos autores, onde uma película fina de material genético fica alojada na extremidade do dispositivo de vitriificação.

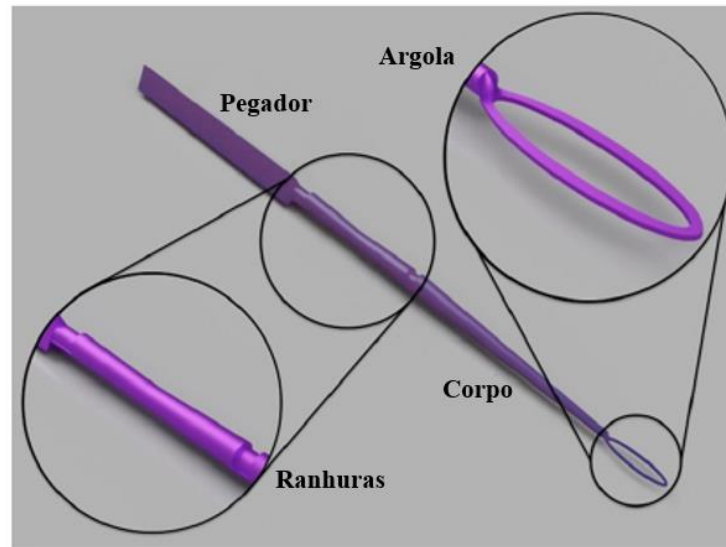


Figura 2.13 – Impressão 3D do protótipo para vitrificação em película.

Fonte: Tiersch et al. (2020).

Os autores testaram diversas configurações da região anelar de congelamento, utilizando 3 variações de altura (10 mm, 15 mm e 20 mm) e 13 variações de comprimento, com volumes entre 1 μL a 47 μL , utilizando PLA e ABS como materiais base para impressão do protótipo. Foi possível vitrificar as amostras de sêmen com um custo baixíssimo (< \$0,10 de dólar) para alturas de 10 mm e 15 mm. Já para as configurações com 20 mm de altura não foi possível vitrificar, devido ao grande volume de material genético, que implica diretamente na velocidade de resfriamento, dificultando a vitrificação.

2.3.4 Vitrificação via Impressão de Gotículas por Adesão

Este método é similar ao processo de vitrificação por gotejamento SFF, com a diferença que neste sistema as gotículas ficam suspensas para baixo do dispositivo, através da adesão oriunda da tensão superficial. Shi et al. (2015) realizaram um estudo numérico e experimental deste sistema, vide Figura 2.14, no qual as gotículas não entram em contato com o nitrogênio líquido, sem risco de contaminação e com altas velocidades de resfriamento.

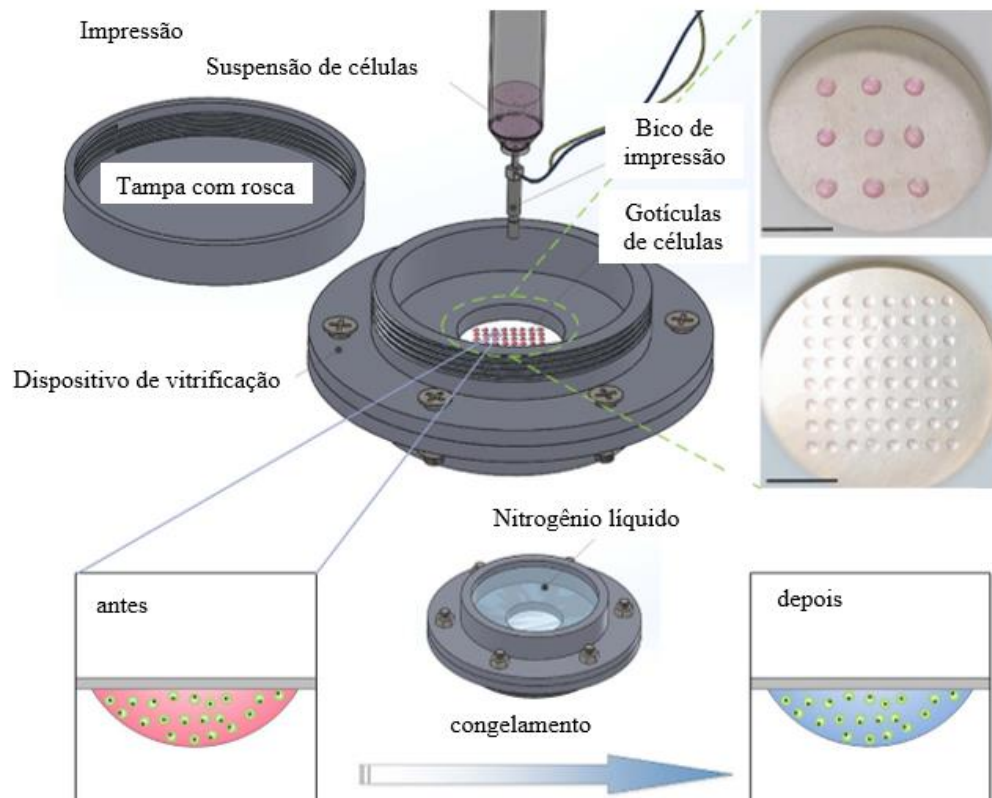


Figura 2.14 – Método experimental para impressão de gotículas.

Fonte: Adaptado de Shi et al. (2015).

Nesse sistema, gotículas ficam alojadas sobre um substrato de prata, com 150 μm de espessura, por meio do efeito da tensão superficial. Esta placa fina de prata está em contato direto com um reservatório preenchido com nitrogênio líquido, o qual a mantém constantemente resfriada em temperaturas extremamente baixas. O ângulo de contato entre as gotículas e a superfície condutora foi de 52° , e os diâmetros das gotículas considerados foram 0,2 μL , 1 μL e 5 μL . As simulações numéricas foram realizadas utilizando o software COMSOL®, de forma a determinar a curva de variação da temperatura durante o processo.

Os autores conseguiram altas taxas de resfriamento, aproximadamente $1146^\circ\text{C}/\text{min}$, alcançando uma temperatura de 120 K (-153°C) em torno de 10s após o início do processo de vitrificação. Foi verificada uma cristalização não homogênea comparando a base da gota com sua superfície, o que é esperado, devido à diferença de transferência de calor entre a base da gota e o substrato de prata, que é muito superior à superfície da gota com o ambiente ao seu entorno. Também foi possível obter uma boa taxa de viabilidade do material genético, com viabilidade de 76% para o caso com gotículas de 5 μL e 62% para gotículas com volume de 0,2 μL .

2.3.5 Vitriificação em Nitrogênio *Slush* – SN2

Nos métodos de congelamento que envolvem a imersão da amostra diretamente em nitrogênio líquido, devido à grande diferença de temperatura entre a amostra e o meio de congelamento, ocorre a vaporização do LN2 sobre a superfície da amostra, formando uma “manta de vapor” ao seu redor (Efeito Leindenfrost), que atua como isolante térmico, dificultando a transferência de calor. Uma das formas de evitar a formação dessa manta de vapor é através do nitrogênio parcialmente solidificado, denominado *slush* ou SN2, ou seja, uma solução bifásica sólido-líquido. O SN2 é formado reduzindo a pressão do LN2 abaixo do ponto triplo, aproximadamente 12,5 kPa, atingindo uma temperatura de -210 °C, resultando em uma mistura (LEE et al., 2007).

Talevi et al. (2016) estudaram a viabilidade de vitriificação de tecidos ovarianos humanos usando a imersão em SN2 e LN2. Como resultado, após análise de crio danos e viabilidade sob microscopia óptica, confocal e eletrônica de transmissão, a vitriificação demonstrou que o aumento da taxa de resfriamento através do uso de SN2 melhora a recuperação de oócitos saudáveis.

Lee et al. (2007) avaliaram o efeito da vitriificação utilizando SN2 na criopreservação de embriões em camundongos utilizando criotubos e palhetas (OPS). O uso de SN2 para vitriificação resultou em melhores resultados de desenvolvimento embrionário em comparação com o observado quando se utilizou LN2. Yoon et al (2007) também avaliaram a vitriificação de embriões em SN2 e obtiveram altas taxas de resfriamento bem como a possibilidade de redução de CPA.

Osman et al. (2020) investigaram se a vitriificação do embrião em SN2 (-210 °C) é uma alternativa menos prejudicial ao LN2 (-196 °C), conforme determinado pela sobrevivência pós-aquecimento. Os embriões passaram por repetidos ciclos de aquecimento e vitriificação em ambos os fluidos criogênicos até serem considerados mortos e foi verificado que após cada ciclo os embriões vitriificados em SN2 apresentaram maior probabilidade de sobreviver do que aqueles em LN2.

De modo geral, os dispositivos para formação de *slush* consistem basicamente em uma câmara com nitrogênio líquido, que será submetida ao vácuo, uma bomba de vácuo, um agitador, e sensores de pressão e temperatura. A Figura 2.15 mostra a bancada para fabricação do SN2, utilizado no trabalho de Wu et al., 2020. Os autores estudaram o processo de ebulição em vaso (*pool boiling*) utilizando SN2 como meio de troca térmica. Foi verificado que o processo de transferência de calor apresentado pelo *slush* é típico de um processo de ebulição

nucleada, onde aumentando a fração de sólidos na mistura, se tem um incremento do coeficiente de transferência de calor para ebulição.

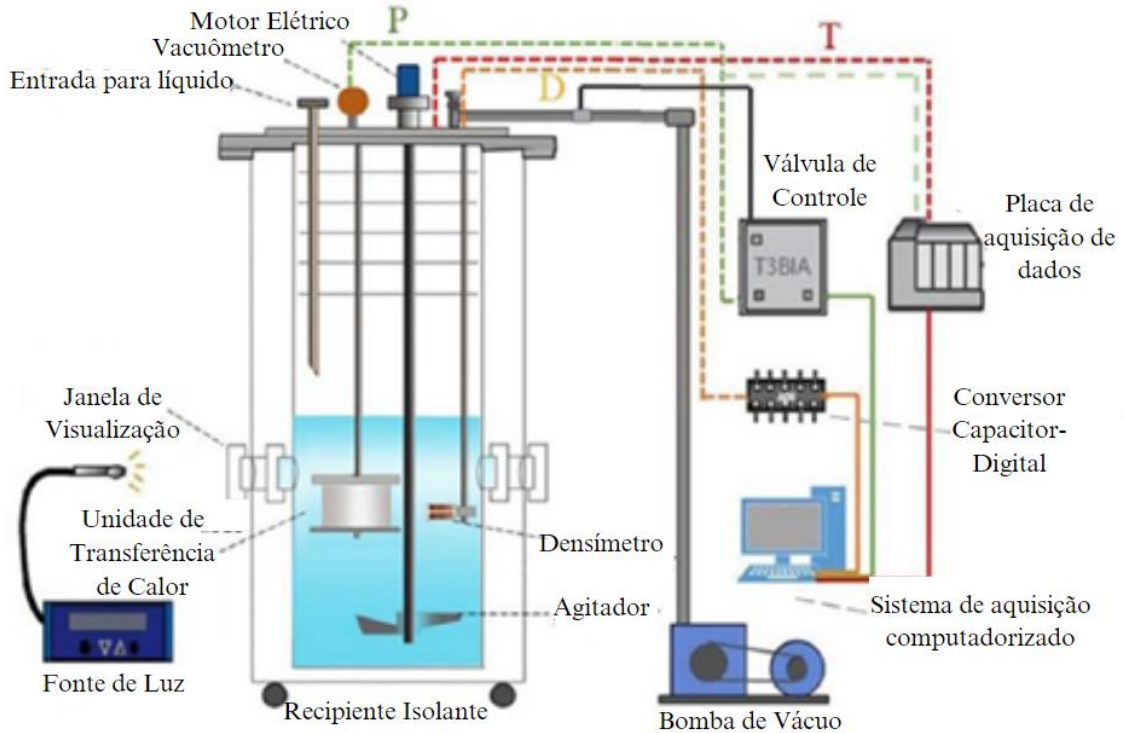


Figura 2.15 - Dispositivo para produção de *slush* empregado em estudos de ebulição.

Fonte: Adaptado de Wu et al., 2020.

2.3.6 Evaporação de Filme Fino de Nitrogênio (TFE)

Su *et al.* (2019, 2020), desenvolveram um método de vitrificação para criopreservação de células utilizando a evaporação de um filme fino de nitrogênio líquido sobre uma superfície porosa. Este método evita o problema da formação da manta de vapor dos métodos por imersão em LN₂. O método propõe a inserção da amostra entre duas placas metálicas com superfície externa microporosa, conforme dispositivo ilustrado na Figura 2.16.

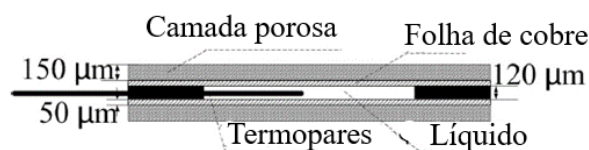


Figura 2.16 - Dispositivo para vitrificação via evaporação de um filme fino de LN₂.

Fonte: Adaptado de Su et al. (2018).

O dispositivo é suspenso em uma câmara sob vácuo e o nitrogênio líquido é dispersado sobre a superfície metálica micro estruturada ou porosa. Por efeito de capilaridade e de pressão de descolamento preenche os espaços vazios presentes entre as micropartículas e forma um filme fino de líquido na superfície microestruturada, que evapora rapidamente devido à rápida absorção de calor da amostra. Os autores conseguiram alcançar elevadas taxas de resfriamento, na ordem de 150.000°C/min (reduzindo a temperatura de 10°C a -180°C em aproximadamente 0,074 s) associadas a volumes de 3 µL ou menores. Também foi possível obter um coeficiente de transferência de calor na ordem de 10⁶ W/m²K, juntamente com uma redução considerável da quantidade de agentes crioprotetores.

Os pesquisadores também compararam o método evaporação de filme fino (TFE) com o método OPS, no congelamento de células de ovário de hamster. Os autores verificaram que através do TFE foi possível alcançar maiores taxas de resfriamento devido ao elevado fluxo de calor na região (50.059 °C/min - TFE e 25.200 °C/min - OPS). Também observaram maiores taxas de sobrevivência celular, 82,9% e 71,7%, respectivamente.

2.4 CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN

A criopreservação de sêmen tem por objetivo preservar a fertilidade masculina, através do congelamento e armazenamento de espermatozoides, mantendo a integridade do material biológico para utilização futura em uma técnica de reprodução assistida (TRA). A TRA é aplicada nos casos em que se tem pacientes com disfunções ejaculatórias e problemas testiculares, doenças não malignas e autoimunes, bancos de sêmen, antes de radioterapias e quimioterapias, antes de vasectomias ou cirurgias para tratamento de infertilidade. (BANERJEE e SIGLA, 2020; MENON e D'SOUZA et al., 2018; PAUL et al., 2018).

Devido às suas características morfológicas, como tamanho pequeno, baixa concentração de água intracelular (cerca de 50%) e resistência à choques térmicos, os espermatozoides humanos toleram altas taxas de resfriamento e aquecimento (WHO manual, 2019). O primeiro nascimento de uma criança através de inseminação artificial utilizando sêmen criopreservado é datado na década de 1950, por Bunge et al. (1954). A Tabela 2.1 traz uma breve descrição da história da criopreservação de sêmen.

Tabela 2.1 - Datas históricas da criopreservação de sêmen.

Ano	Evento
1776	Primeira observação de sêmen humano congelado com neve
1866	Primeira proposta de bancos de sêmen
1938	Congelamento de sêmen a -269 °C e armazenado a -79 °C, mantendo viabilidade
1949	Descoberta do glicerol como CPA
1951	Primeira criopreservação de sêmen bem-sucedida com touros
1953	Primeira gravidez utilizando sêmen criopreservado
1962/1963	Congelamento e armazenamento de sêmen utilizando LN2
1970s	Fundação dos primeiros bancos de sêmen comerciais

Fonte: Adaptado de Shin et al., 2016.

De acordo com o manual de exame e processamento de sêmen da OMS (WHO manual, 2021), o processo de criopreservação de sêmen pode ser descrito em 3 etapas essenciais:

- Preparação da amostra (coleta, análise, diluição, lavagem).
- Congelamento (preparação do CPA e do protocolo de congelamento programável) e armazenamento (nitrogênio líquido a -196 °C).
- Descongelamento (banho térmico ou temperatura ambiente) e tratamento pós-aquecimento (separação, centrifugação, lavagem, análise de laboratório).

2.4.1 Preparação da amostra seminal

A escolha da técnica de preparação da amostra depende da natureza do sêmen e seu propósito de utilização. Uma das etapas de preparação da amostra é a remoção do plasma seminal, de modo a facilitar a penetração dos espermatozoides no muco cervical, produzindo uma amostra final com alta concentração de células morfológicamente normais e móveis. Além disso, a remoção do plasma seminal é utilizada para realização de testes e diagnósticos de função, recuperação terapêutica para inseminação e tecnologias de reprodução assistida (ART). (WHO manual, 2021).

A preparação do sêmen para criopreservação pode ser agrupada em três métodos básicos: lavagem simples, *swim-up* direto (capacitação espermática) e técnica de gradiente de densidade. Para amostras normozoospermicas, ou seja, dentro dos padrões de referência, a diluição do sêmen com meio de cultura seguida pela centrifugação da amostra é uma técnica amplamente utilizada, por exemplo, em inseminação intrauterina (IUI). O meio de cultura a ser

utilizado deve ser composto por uma solução salina, balanceada e suplementada com proteína, contendo um tampão apropriado para as condições ambientais em que os espermatozoides serão processados. Já para amostras com uma ou mais anormalidades nos parâmetros do sêmen, as técnicas de gradiente de densidade e *swim-up* são as preferidas (WHO manual, 2021).

2.4.1.1 Lavagem simples

O método de lavagem simples é realizado por meio de centrifugação. De acordo com o manual de exame e processamento de sêmen da OMS (WHO manual, 2021), o procedimento padrão para lavagem do sêmen para amostras de boa qualidade e com alto rendimento é descrito em 9 etapas:

1. Mistura da amostra de sêmen: a mistura deve ser realizada com pipetas estéreis, com diâmetro de aproximadamente 1,5 mm, aspirando a amostra aproximadamente 10 vezes, dosando a intensidade de sucção e descarga a fim de evitar a formação de bolhas de ar. Não devem ser empregados misturadores de vórtice com altas velocidades, pois podem danificar os espermatozoides.
2. Diluir a amostra de sêmen na proporção 1:2 com o meio suplementado, para promover a remoção do plasma seminal.
3. Transferir a amostra diluída para tubos com não mais que 3 ml.
4. Realizar a centrifugação da mistura em 300 – 500g por 5 a 10 minutos.
5. Aspirar cuidadosamente o sedimento de espermatozoides, descartando os que ficam sobre a superfície.
6. Combinar, via micropipetas, o sedimento de espermatozoides com 1 ml do meio suplementado.
7. Centrifugar novamente a solução entre 300 - 500g por 3 a 5 minutos.
8. Aspirar novamente, com cuidado, os espermatozoides sedimentados.
9. Misturar o sedimento final com o meio suplementado para testes de laboratório, tais como avaliação da concentração espermática e motilidade.

O número de lavagens pode ser reduzido incrementando o volume da amostra em cada tubo, conseqüentemente, aumentando a força e o tempo de centrifugação, por exemplo, entre 500 e 600g por 8 a 10 minutos. É importante destacar que, cada laboratório de criopreservação deve analisar e aplicar os parâmetros que mais se adequem ao seu processo.

2.4.1.2 *Swim-up* direto

Este método consiste em selecionar os espermatozoides pela sua capacidade de nadar para fora do plasma seminal e entrar no meio de cultura. Nesta técnica não se utiliza unicamente a centrifugação como ferramenta para seleção de espermatozoides móveis, pois pode causar danos peroxidativos às membranas espermáticas. Para tanto, é realizado um banho por meio de camadas de meio de cultura sobre o sêmen liquefeito ou por sêmen liquefeito em camadas sob o meio de cultura. Este procedimento é classificado em 7 etapas, de acordo com o manual de exame e processamento de sêmen da OMS (WHO manual, 2021).

1. Misturar o sêmen através de pipetas estéreis, com diâmetro de aproximadamente 1,5 mm, aspirando a amostra aproximadamente 10 vezes, dosando a intensidade de sucção e descarga a fim de evitar a formação de bolhas de ar e não prejudicar os espermatozoides.
2. Colocar 1 ml de espermatozoides em um tubo cônico de 15 ml e sobrepor com 1,2 ml do meio suplementado. Alternativamente, realizar a pipetagem do sêmen sobre o meio de cultura.
3. Incubar o tubo durante 1 hora, a uma temperatura de 37 °C. Manter o tudo inclinado em 45°, com o intuito de aumentar a área de contato entre o meio de cultura e o sêmen.
4. Retornar o tubo para a posição vertical e remover 1 ml da parte superior contendo o meio de cultura. Este volume será composto por espermatozoides com alta motilidade.
5. Diluir a fração removida com em 1,5 a 2 ml de meio suplementado
6. Centrifugar a mistura entre 300 e 500 g por 5 minutos, coletando o sedimento espermático e descartando o restante.
7. Misturar o sedimento final de esperma em 0,5 ml de meio suplementado para realização dos testes de concentração, motilidade total e progressiva.

O método *swim-up* possui menor rendimento quando relacionado à lavagem simples, porém é extremamente útil quando a percentagem de espermatozoides no sêmen é baixa, para aplicações em fertilização in vitro (IFV) ou em injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

2.4.1.3 Gradiente de densidade descontínua

Este método é de simples padronização, selecionando espermatozoides de boa qualidade e com resultados consistentes para aplicações em fertilizações *in vitro* (IVF) e injeção intracitoplasmática ICSI. Utiliza de centrifugação do plasma seminal sobre gradientes de densidade de sílica coloidal revestida com silano, que realiza a separação das células de acordo com sua densidade. Os espermatozoides nadam através do material de gradiente e sedimentam ao fundo do tubo. Este método é descrito em 7 etapas de acordo com o manual de exame e processamento de sêmen da OMS (WHO manual, 2021).

1. Preparar o meio de gradiente de densidade em um tubo de ensaio, com 1 ml do gradiente de densidade de 40% em volume sobre o meio de 80% (v/v).
2. Misturar o sêmen através de pipetas estéreis, com diâmetro de aproximadamente 1,5 mm, aspirando a amostra aproximadamente 10 vezes, dosando a intensidade de sucção e descarga a fim de evitar a formação de bolhas de ar e não prejudicar os espermatozoides.
3. Aplicar 1 ml de sêmen sobre o meio de gradiente de densidade e centrifugar entre 300 e 400 g por 15-30 minutos.
4. Selecionar o sedimento espermático após a centrifugação e suspender em 5ml de meio suplementado via micropipeta.
5. Centrifugar a nova mistura a 200 g por 4-10 minutos.
6. Repetir o procedimento de lavagem (passos 4 e 5).
7. Misturar o sedimento espermático final em meio suplementado para avaliação da concentração e motilidade.

A preparação de esperma usando centrifugação de gradiente de densidade geralmente resulta em uma fração de espermatozoides altamente móveis, livres de detritos, leucócitos contaminantes, células não germinativas e células germinativas degeneradas (WHO manual, 2019).

2.4.2 Congelamento da amostra e Armazenamento

O procedimento de congelamento do sêmen irá variar de acordo com o método de congelamento aplicado, volume da amostra e tipo de crioprotetor. O manual de exame e processamento de sêmen da OMS (WHO manual, 2021), detalha o protocolo padrão de

criopreservação através de freezers programáveis, utilizando como agente crioprotetor o GEYC, ou glicerol-ovo-gema-citrato.

Primeiramente é realizada a preparação do crioprotetor, avaliando o pH da solução (deve estar entre 6,8 e 7,2) e os parâmetros de toxicidade. Caso aprovado, o CPA é congelado para futuras aplicações, podendo ficar armazenado por até 3 meses. Após descongelado em banho térmico à uma temperatura de 37 °C, a solução GEYC pode ser adicionada ao sêmen, com leve agitação para completa mistura, pois o glicerol em altas concentrações é prejudicial aos espermatozoides. Depois de misturada, a solução deve ser incubada entre 30 e 35 °C, durante 5 minutos.

Após incubação, a solução é disposta e selada em palhetas de 0,5 ml ou em criotubos, para realização da etapa de congelamento. O congelamento é realizado através da injeção de vapor de nitrogênio líquido via crio-refrigeradores programáveis. Um programa comumente realizado consiste em resfriar as palhetas de 20 °C até 6 °C, com uma taxa de resfriamento de 1,5 °C/min, e depois até -100 °C com uma taxa de 6 °C/min. A amostra é mantida nesta temperatura durante 30 minutos, e então, é levada para armazenamento em nitrogênio líquido, a uma temperatura de -196 °C.

Para amostras oligozoospermáticas ou espermatozoides recuperados cirurgicamente, o método de congelamento empregado deve utilizar o menor volume possível, tal como os métodos de vitrificação. Caso não for possível, uma estratégia é a centrifugação da solução espermática em 1500 g durante 10 min, condensando os espermatozoides em um volume máximo de 0,4 ml (WHO manual, 2021).

2.4.3 Descongelamento e Tratamento da amostra

Após remoção do tanque de nitrogênio líquido, os recipientes contendo sêmen congelado devem ser imediatamente colocados em um banho térmico a uma temperatura constante de 37 °C. Após o completo descongelamento, o recipiente é aberto em um ambiente estéril, realizando a coleta do sêmen para análise de laboratório. A remoção do CPA é realizada via centrifugação a 500 g durante 10 min. Para tanto, é necessário adicionar um meio de cultura e coletar o sedimento espermático restante para utilização (WHO manual, 2021).

2.4.4 Morfologia do sêmen

O espermatozoide é uma célula reprodutiva masculina, sendo a menor célula do corpo humano em termos de volume. Possui características únicas, como morfologia definida (cabeça

e cauda nas extremidades), não cresce ou se divide (espermatozoides adultos), exerce uma função fora do corpo (fecundação), possuem maiores núcleos e menos citoplasma (65% da cabeça corresponde ao núcleo) e são as células que apresentam maior índice de anormalidades morfológicas dentre os mamíferos (CHAKRAVARTY et al., 2018).

Os espermatozoides se dividem em três partes principais: cabeça, pescoço e cauda, com um comprimento aproximado de 60 a 65 μm , conforme ilustrado na Figura 2.17.

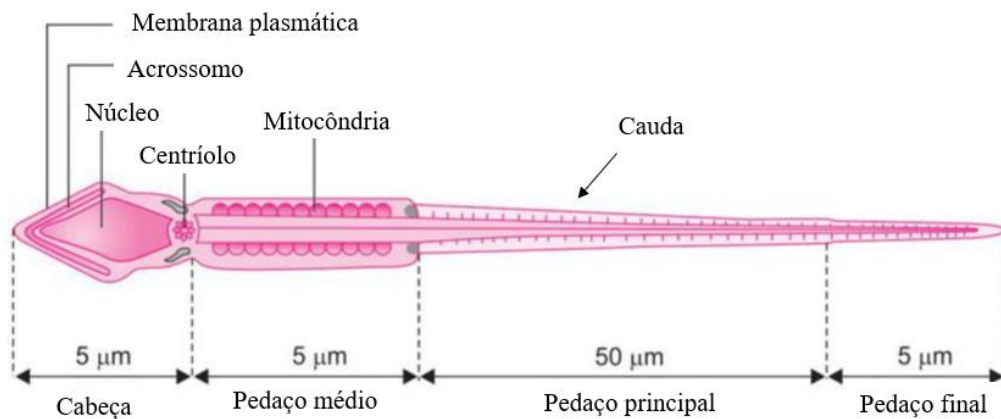


Figura 2.17 - Morfologia do espermatozoide humano.

Fonte: Adaptado de Chakravarty et al. (2018).

A cabeça do espermatozoide possui uma estrutura plana, com formato de oval/pontiagudo, com comprimento na faixa de 3-5 μm e largura de 2-3 μm , cuja razão aspecto (comprimento/largura) é de aproximadamente 1,5 - 1,75 (SHAH e SHAH, 2019). Ela é dividida em cinco regiões: núcleo, membrana nuclear, acrossomo, membrana interna do acrossomo, membrana externa do acrossomo e membrana plasmática. O núcleo representa a maior parte da cabeça do espermatozoide, e é onde estão contidas as informações genéticas e metade do número de cromossomos. Já o acrossomo tem a função de liberar enzimas hidrolíticas, como fosfatase e hialuronidase, que destroem o ácido hialurônico da membrana que reveste o óvulo, facilitando a entrada do espermatozoide no mesmo

O pescoço do espermatozoide, como o próprio nome sugere, é a parte de ligação entre a cabeça e a cauda. Possui dois centríolos, proximal e distal. O centríolo proximal dá origem ao filamento axial do espermatozoide, que vai até o final de sua cauda. Já o centríolo distal, é responsável pela formação dos microtúbulos da cauda do esperma. (CHAKRAVARTY et al., 2018).

A cauda do espermatozoide é a parte responsável pela sua motilidade, sendo dividida em três regiões: região principal, região intermediária (ligação) e região final. A região principal é

responsável pela movimentação do espermatozoide através do deslizamento de suas fibras. A região intermediária tem a função de fornecer energia para o espermatozoide atravessar a membrana do óvulo. A produção da energia é realizada pela mitocôndria, através da hidrólise do ATP (trifosfato de adenosina), presente entre os filamentos que compõem a cauda. A terceira e última parte da cauda é o pedaço menor espermatozoide. (CHAKRAVARTY et al., 2018; SHAH e SHAH, 2019).

2.4.4.1 Anomalias Morfológicas

Os espermatozoides são as células mamíferas que mais apresentam variações em sua morfologia. A OMS define o que seria um espermatozoide padrão de acordo com as especificidades da cabeça, pescoço, cauda e resíduo citoplasmático, de acordo com o Manual de Exame e Processamento de Sêmen Humano (WHO manual, 2021).

Uma cabeça típica de um espermatozoide deve ser suave, com contornos regulares e formato oval. A região do acrossomo deve estar bem definida, envolvendo uma área entre 40% e 70% da cabeça. Os vacúolos presentes no acrossomo não devem ser muito grandes e nem mais que duas unidades, ocupando um espaçamento inferior a 1/5 da cabeça do espermatozoide. Já a região após o acrossomo não deve contar vacúolo algum (WHO manual, 2021). A Figura 2.18 mostra uma cabeça típica de um espermatozoide padrão.

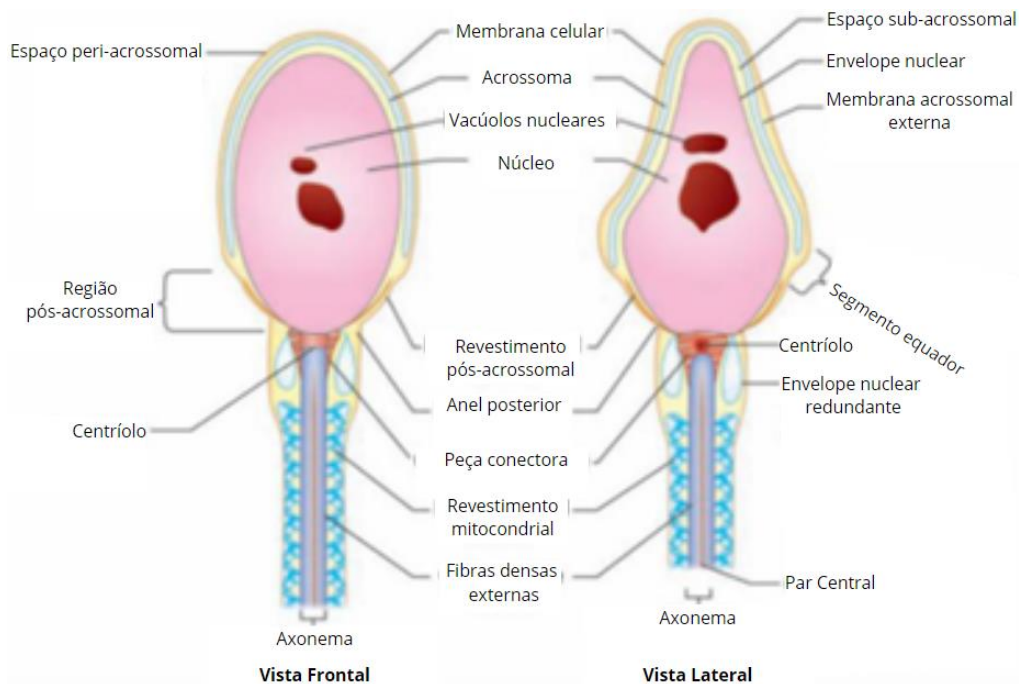


Figura 2.18 - Morfologia padrão da cabeça de um espermatozoide.

Fonte: Adaptado de Shah e Shah (2019).

Alguns problemas comumente encontrados na região da cabeça dos espermatozoides são: acrossomo com tamanho pequeno, baixa razão de aspecto, formato não oval (piriforme, amorfo, assimetria), vacúolos muito grandes e localizados ou localizados na região pós-acrossomo, e duas cabeças.

Em relação ao pescoço e região de ligação, esta deve ser delgada, com formato regular, mesmo comprimento e espessura proporcionais à cabeça do espermatozoide. Alguns problemas encontrados são: espessura irregular, pescoço dobrado, assimetria na região de inserção com a cabeça. O pedaço principal da cauda deve ter um comprimento uniforme, cerca de 10x o comprimento da cabeça, deve ser mais fino que a região de ligação e não deve estar rompido. Seus defeitos mais comuns são cauda curta, rompida ou enrolada, múltiplas caudas, curvas muito acentuadas e espessura irregular. Já o resíduo citoplasmático ideal deve possuir gotículas menores que $1/3$ que a cabeça do espermatozoide, onde tamanhos maiores são considerados irregulares (WHO manual, 2021).

A Figura 2.19 mostra a sumarização dos problemas morfológicos encontrados nos espermatozoides.



Figura 2.19 - Anomalias morfológicas típicas do esperma.

Fonte: Adaptado de WHO manual (2021).

2.4.4.2 Parâmetros Seminais de Referência

Para fins de análise ou pesquisa, as amostras de sêmen devem ser coletadas em um recipiente limpo, com ampla abertura, de material polimérico ou vidro, mantido a uma temperatura entre 20 e 37 °C. O material coletado deve ser mantido a uma temperatura de 37°C, de modo a liquefazer totalmente a solução. Após isto, as análises espermáticas devem ser realizadas em um intervalo de 30 a 60 min, para evitar que mudanças de temperatura ou a desidratação da amostra prejudique a qualidade do sêmen (WHO manual, 2021).

Os parâmetros seminais de referência relacionam o volume da amostra, pH, cor, liquefação, viscosidade, concentração espermática, número total de espermatozoides, motilidade, morfologia e vitalidade. A Tabela 2.2 mostra os parâmetros de referência para uma amostra seminal e se o sêmen analisado possuir as características elencadas nesta tabela, a amostra pode ser considerada apta para prosseguimento com o processo de criopreservação.

Tabela 2.2 - Parâmetros de referência do sêmen.

Parâmetro Espermático	Valor de Referência
Volume	≥ 1,5 ml
pH	≥ 7,2
Cor	Branco opalescente
Liquefação	≤ 30 min, completa
Viscosidade	Normal
Concentração Espermática	≥ 15x10 ⁶ espermatozoides por ml de sêmen
Quantidade de Espermatozoides	≥ 39x10 ⁶ espermatozoides por ejaculado
Motilidade Total	≥ 40%
Morfologia	≥ 4% de formas normais
Vitalidade	≥ 58% espermatozoides vivos

Fonte: Adaptado Pasqualotto et al. (2011).

2.5 VITRIFICAÇÃO DE SÊMEN

Existem diversos protocolos empregados na criopreservação de sêmen, onde os procedimentos variam de acordo com as características seminais, preparação e volume da amostra, método de congelamento e crioprotetores empregados. O manual de exame e

processamento da OMS classifica os protocolos de vitrificação de sêmen em sistemas abertos e sistemas fechados. Dispositivos utilizados na vitrificação aberta possuem contato direto da amostra com o LN2, logo é necessário que o nitrogênio líquido seja sempre esterilizado, de modo a evitar a contaminação do sêmen. Um exemplo de sistema aberto é o método de vitrificação de gotículas por imersão, em que gotículas compostas de sêmen e meio suplementado são depositadas dentro de um criotubo, contendo nitrogênio líquido esterilizado. Após o congelamento, o recipiente é fechado e enviado para armazenamento em um tanque de LN2.

Já os dispositivos fechados, são mais seguros, pois a amostra é selada dentro de um recipiente criogênico, geralmente palhetas com 0,25 - 0,5 ml, ou criotubos com 2 ml de volume. O procedimento padrão para vitrificação em palhetas orientado pela OMS (WHO manual, 2021) é descrito a seguir:

1. Primeiramente é realizada a preparação do meio para vitrificação, com volume de 1 ml. É realizada a mistura de 0,495 ml do meio de cultura utilizado para lavagem do sêmen, juntamente com 0,495 ml de sacarose dissolvida em água (CPA) e 0,010 ml de meio suplementado com soro de dextrano (CPA).
2. Após isto, o sêmen é preparado para remoção do plasma seminal através dos métodos de *swim-up* ou gradiente de pressão. Após este procedimento, é indicado realizar a contagem de espermatozoides.
3. É realizada a centrifugação do sêmen com o meio suplementado a 300 g, durante 8-10 minutos, selecionando apenas o sedimento espermático, rico em espermatozoides.
4. Por fim, é feita a mistura do sêmen processado com o meio de vitrificação. Palhetas com volume de 0,25 ml são preenchidas com 100 µL da mistura realizada.
5. O congelamento é realizado inserindo a palheta menor dentro de uma palheta maior (0,5 ml), selando suas pontas. Então é realizada a imersão do conjunto em nitrogênio líquido na posição vertical, por aproximadamente 5 segundos.
6. O armazenamento é realizado em um tanque de LN2. O aquecimento é efetuado inserindo o conjunto de palhetas em um meio com temperatura constante entre 42-43 °C.

A OMS orienta em relação aos parâmetros mínimos que devem ser levados em consideração na criopreservação de sêmen, onde cada laboratório é instigado a aperfeiçoar seus procedimentos e protocolos.

Shin et al. (2016) utilizaram uma metodologia própria, utilizando criotubos para congelamento de sêmen humano em seu laboratório. A preparação das amostras foi feita através do método do gradiente de pressão, com protocolo de criopreservação disposto em 6 etapas:

1. Liquefação total do sêmen congelado, a temperatura ambiente durante 30 minutos.
2. Mistura do sêmen liquefeito com o meio suplementado utilizado no processo de gradiente de pressão.
3. Centrifugação da mistura a 400 g durante 20-30 minutos para remoção do plasma seminal.
4. A precipitação espermática depositada no fundo do recipiente de centrifugação é selecionada e novamente suspensa em uma solução suplementada para nova centrifugação.
5. Centrifugação a 400 g durante 5-10 minutos para selecionar os espermatozoides com melhores características de mobilidade.
6. O sedimento restante da última centrifugação é selecionado e misturado com o meio de vitrificação, com incubação de 5 minutos. O criotubo é imerso no LN2 para vitrificação, e então é levado ao tanque de armazenamento.

A Figura 2.20 mostra o esquema utilizado para criopreservação de sêmen por Shin *et al.* (2016).

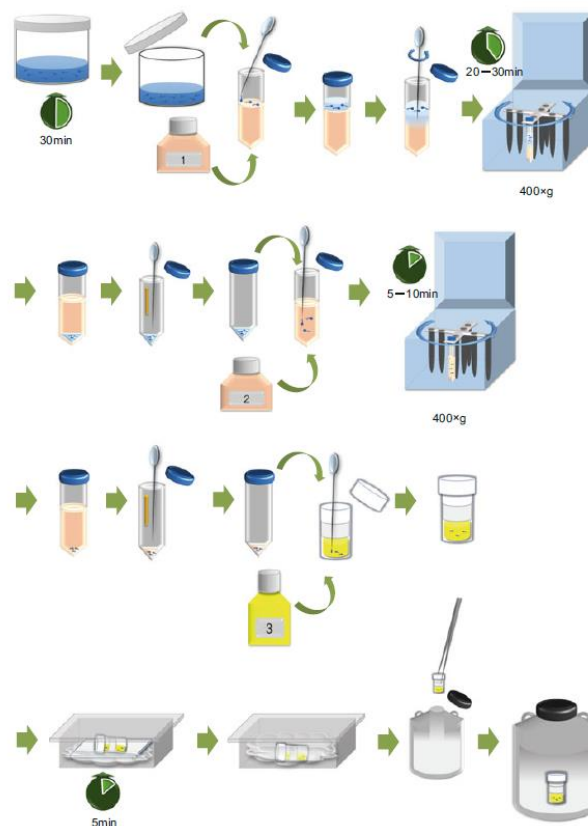


Figura 2.20 – Protocolo de congelamento de sêmen utilizado por Shin et al. (2016).

Fonte: Shin et al. (2016).

Huang et al. (2020) realizaram a vitrificação de sêmen de pacientes com grau severo de oligospermia, variando a concentração de espermatozoides entre $10^3/\text{ml}$ e $10^5/\text{ml}$. Foram depositadas de 10-15 gotículas com volume de $2 \mu\text{L}$, equidistantes em 2 mm dentro de palhetas de 0,25 ml, as quais são seladas e inseridas dentro de outra palheta de 0,5 ml. Os autores testaram diferentes condições de congelamento, variando a posição das palhetas em relação ao meio de resfriamento (LN_2), desde a imersão completa das palhetas, até uma altura de 10 cm sobre a superfície do nitrogênio líquido. Também foi realizada a comparação do método de vitrificação utilizado no trabalho dos autores com um método de congelamento lento (tradicional). A Figura 2.21 exibe o setup experimental utilizado no trabalho dos autores.

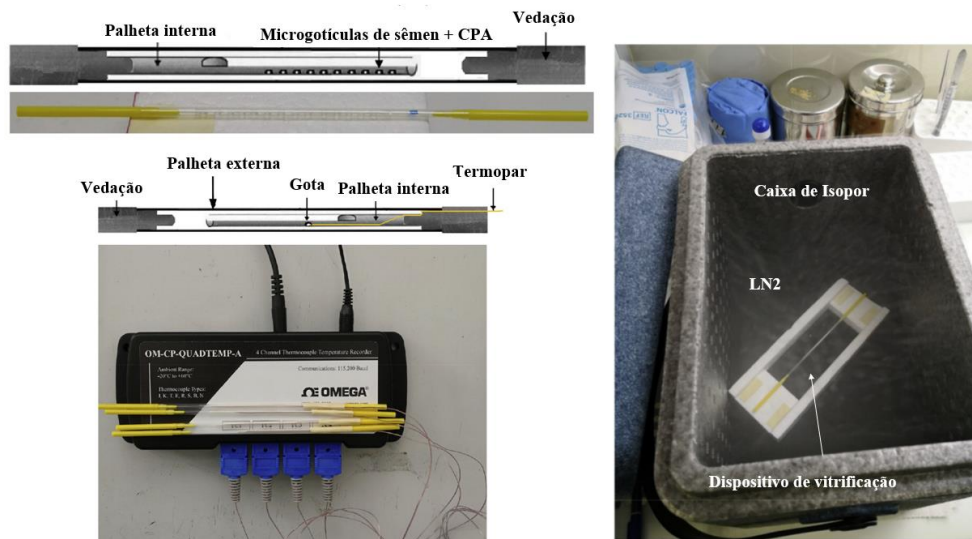


Figura 2.21 - Aparato experimental de vitrificação utilizado por Huang et al. (2020).

Fonte: Adaptado de Huang et al. (2020).

A preparação do sêmen para as amostras normoespermáticas foi realizada através do método de gradiente de pressão, com centrifugação a 300 g durante 20 minutos, com suspensão em 0,3 ml de meio suplementado. Já para as amostras com oligospermia, o tempo de centrifugação foi de apenas 5 minutos, com suspensão em 0,6 ml de meio suplementado. Ao final do procedimento, foi obtido um volume total de $80 \mu\text{L}$ de espermatozoides. O meio de vitrificação utilizado foi uma solução comercial, composta por 10 mg/ml de soro de albumina humana, com glicerol e sacarose como CPA's e gentamicina como antibiótico. A taxa máxima de resfriamento obtida foi de $6384 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, quando imergida apenas a palheta interna em LN_2 , e uma taxa mínima de $12 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$, na condição de dupla palheta posicionada a 10 cm da superfície de resfriamento. A motilidade máxima obtida foi para a condição de dupla palheta congelada a 2 cm sobre a superfície do LN_2 , com um valor 72,4%, e com viabilidade em torno

de 77,6%. Quando comparado com o método de congelamento lento, o processo de vitrificação utilizado pelos autores se mostrou muito superior, com 38,17% de diferença relativa para a motilidade total e 37,63% para a viabilidade total.

O'Neill et al. (2019) projetaram e construíram um dispositivo para vitrificação de sêmen pelo método de gotejamento via imersão, conforme Figura 2.22. O sistema proposto pelos autores consiste basicamente em submergir um aparato metálico em LN₂, e então, depositar gotas com volume de 20 µL nos orifícios do dispositivo imerso, as quais vitrificam instantaneamente. Devido à diferença de densidade, as esferas recém vitrificadas sedimentam em um criotubo fixado na parte inferior do dispositivo.

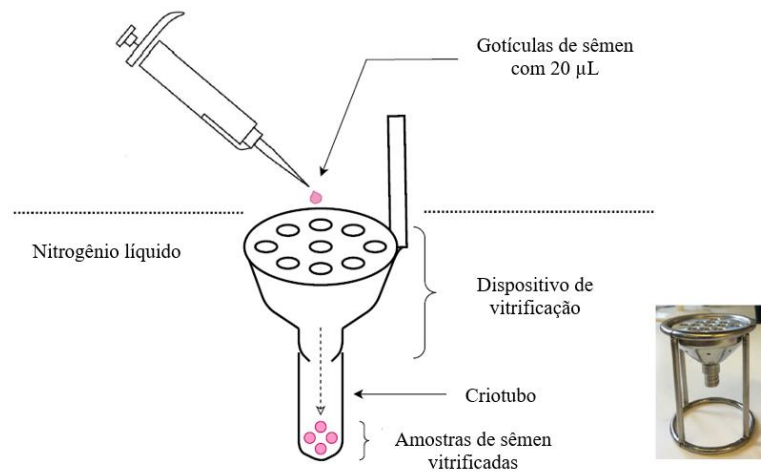


Figura 2.22 – Dispositivo de vitrificação desenvolvido por O'Neill *et al.* (2019).

Fonte: Adaptado de O'Neill et al. (2019).

Cada criotubo comporta 10 gotículas, e é preenchido com 2 ml de um meio para lavagem de esperma, composto por gentamicina e soro de albumina humana (HSA), nas proporções de 5 mg/ml HSA. Os autores avaliaram diferentes tipos de crioprotetores, onde o que obteve melhores taxas de viabilidade após o descongelamento foi a mistura de 0,3 M de sacarose com 20% em volume de suplemento de dextrano.

A preparação das amostras seminais foi realizada nos padrões da OMS (WHO manual, 2021), utilizando o método de gradiente de densidade para seleção dos espermatozoides. Foram testadas amostras seminais de 3 pacientes, avaliando a concentração, motilidade e viabilidade, comparando o novo método de vitrificação com o método convencional. A motilidade alcançada via vitrificação foi aproximadamente 42% maior em relação ao congelamento tradicional, com valores de 30,1% e 21,2%, respectivamente. A viabilidade também foi maior

para as amostras vitrificadas, aproximadamente 1,4 vezes, bem como a concentração de espermatozoides após o aquecimento.

Shah et al. (2019) também desenvolveram um sistema simples e prático para vitrificação de sêmen humano, utilizando o método de gotejamento, conforme ilustrado pela Figura 2.23.

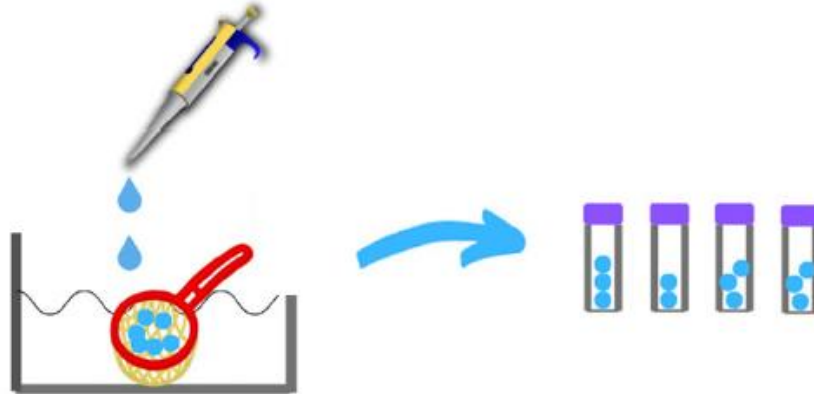


Figura 2.93 - Vitrificação por gotejamento direto no nitrogênio líquido.

Fonte: Adaptado de Shah et al. (2019).

O sistema proposto consiste em mergulhar no nitrogênio pequenas gotículas de sêmen misturada com uma solução crioprotetora composta por 0,5 M de sacarose, com volume de 30 μ L cada. Os autores conseguiram boas taxas de motilidade, acima de 70% após o aquecimento, utilizando seu sistema proposto e sem o uso de substâncias crioprotetoras de alta toxicidade.

Percebe-se então que os trabalhos vinculados à criopreservação de sêmen utilizam basicamente os protocolos de vitrificação por palhetas, criotubos e microgotas, em boa parte pelo método de imersão. Nota-se também uma certa lacuna quanto ao desenvolvimento de métodos inovadores para alocação das amostras, bem como para os meios de imersão. Assim, este trabalho está bem situado quanto aos métodos escolhidos, buscando o aprimoramento e a inovação das técnicas de vitrificação de sêmen, através do desenvolvimento do processo de imersão de slush de nitrogênio (SN2), e dos dispositivos de PDMS para acondicionamento das amostras.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Esta seção fornece a descrição dos procedimentos, materiais e equipamentos utilizados, bem como, das metodologias, experimental e numérica, empregadas para desenvolvimento deste trabalho. Este estudo apresenta métodos para vitrificação de materiais biológicos, mais especificamente, para aplicações com sêmen, por imersão e por gotículas. Para o método de imersão, dois fluidos refrigerantes foram testados, nitrogênio líquido e *slush*. Além disso, um novo dispositivo acondicionador da amostra é proposto, tendo os resultados são comparados com a vitrificação em criotubos. Já para o método de gotículas por contato indireto, foi testada uma nova superfície com cavidades.

Além da análise experimental, se utiliza da ferramenta de fluidodinâmica computacional (CFD) para modelar numericamente os processos de gotículas e de imersão, considerando as geometrias, amostras e condições de contorno referente aos métodos de vitrificação. O software empregado é o código comercial ANSYS *Fluent*, calculando numericamente as equações governantes do processo de vitrificação, tais como conservação de massa, quantidade de movimento e conservação de energia. Além disso, o software possui um módulo específico para solidificação/fusão de materiais, que é utilizado neste estudo para avaliação do processo de congelamento, através da obtenção de curvas de temperatura, taxas de resfriamento e solidificação e fração de cristalização. Abaixo na Figura 3.1, se apresenta um esquema do estudo teórico-experimental realizado e que será detalhado a seguir.



Figura 3.1. Fluxograma de apresentação da metodologia deste trabalho.

3.1 MÉTODO DE VITRIFICAÇÃO DE GOTAS POR CONTATO

3.1.1 Metodologia Experimental

3.1.1.1 Bancada Experimental

O estudo do processo de vitrificação pelo método de microgotas por contato é realizado através de uma bancada experimental especificamente desenvolvida. A Figura 3.2 apresenta o esquema da bancada que consiste no aparato de vitrificação, sistema de medição e sistema de aquisição de dados. O aparato de vitrificação é constituído por um reservatório de isopor para nitrogênio líquido com volume de 1 L, uma micropipeta da marca KASVI de 12 canais, com volume de 5-50 μL , e um bloco metálico para deposição das amostras que serão congeladas. O processo foi avaliado considerando um bloco com superfície plana, de cobre e latão, e outro bloco de cobre com 3 cavidades na superfície, de modo a analisar a influência da geometria da superfície de contato no processo de vitrificação, além da influência do material.

O sistema de medição é composto por 4 termopares tipo T, da marca Ômega, para a faixa de temperaturas de $-200\text{ }^{\circ}\text{C}$ a $350\text{ }^{\circ}\text{C}$, e 1 câmera de alta velocidade da marca IDT, modelo Motion Pro Y4. O sistema de aquisição é composto por um módulo da marca NOVUS, modelo Fieldlogger com 8 canais, que possibilitam a leitura e registro dos dados de temperatura a cada 0,05 segundos.

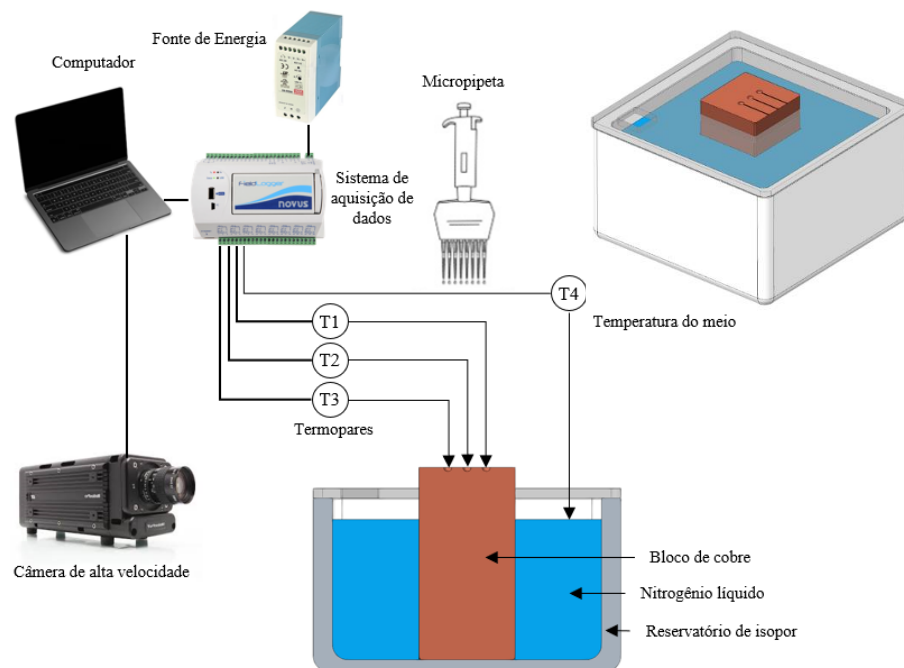


Figura 2.2 - Esquematização da bancada experimental de vitrificação pelo método de microgotas.

3.1.1.2 Setup Experimental

Para ajustar o experimento e as condições da bancada foram realizados testes utilizando água pura como amostra. Os resultados destes testes servem como parâmetros de entrada para validação do estudo numérico via CFD, que será apresentado na continuação. A realização do experimento é feita do seguinte modo: primeiramente, água pura é coletada com a micropipeta, na temperatura ambiente e com um volume fixo de 25 μ L. Após isto, a pipeta é posicionada sobre a superfície de vitrificação, até que a temperatura superficial estabilize com a temperatura do meio de resfriamento, LN2 (aproximadamente -196 °C).

Então, 3 gotículas são depositadas sobre o substrato de vitrificação, nas condições de superfície plana e cavidade, uma de cada vez, onde estão alocados os termopares para obtenção da temperatura, distanciados entre si em 12 mm. O ponto de coleta de temperatura é aproximadamente na metade da microgota. Com os dados de temperatura, é possível obter a taxa de resfriamento do processo, bem como a curva de solidificação/congelamento.

Através da utilização da câmera de alta velocidade, é possível observar o processo de congelamento das amostras, com uma taxa de 5.000 FPS. Durante a realização dos testes, é feita a limpeza constante da superfície de congelamento, de modo a evitar a cristalização da umidade sobre a mesma, evitando a diminuição da taxa de resfriamento devido à resistência térmica do gelo.

3.1.1.3 Medição do Ângulo de Contato

O ângulo de contato entre as gotas e a superfície de vitrificação é um parâmetro extremamente importante, pois além de regular a taxa de resfriamento/solidificação, ele atua como dado de entrada para as simulações numéricas. Alguns fatores influenciam fortemente o valor deste parâmetro, tais como rugosidade superficial altura de deposição, química da superfície e natureza do fluido depositado.

O processo de medição do ângulo de contato experimental foi feito através de uma análise de imagens, após a estabilização da gota com o bloco de cobre, de modo a evitar erros de medição. As imagens foram coletadas com a câmera de alta velocidade, e analisadas no software Image-J®. A Figura 3.3 ilustra o procedimento de determinação dos ângulos de contato.

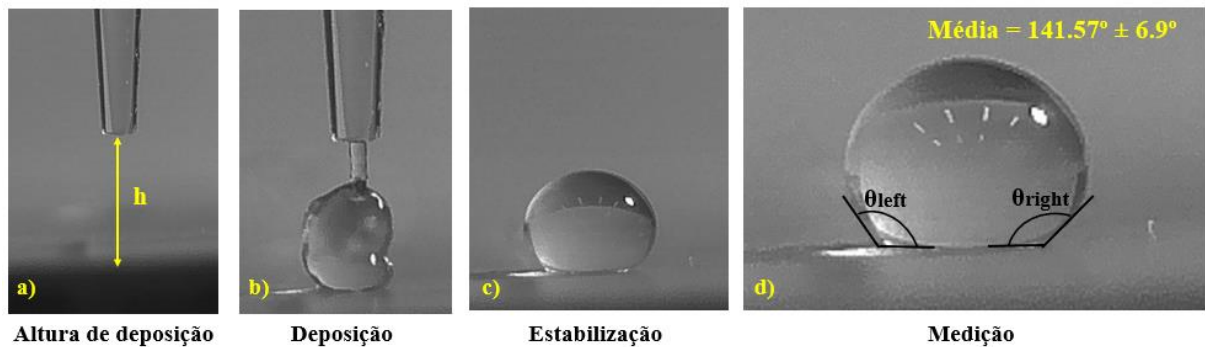


Figura 3.3 - Medição do ângulo de contato entre a gota e a superfície de congelamento.

As gotas foram depositadas manualmente com uma micropipeta, no volume previamente descrito de 25 μL . A altura de deposição (h) foi de aproximadamente 1,5x o diâmetro da gota, e a rugosidade da superfície de cobre é de $1,386 \pm 0,405 \mu\text{m}$. Foi obtido um ângulo de contato médio de $141,57 \pm 6,9^\circ$. Como esperado, ao tocar a superfície resfriada, a gota assume uma geometria semiesférica, com um alto ângulo de contato (superfície hidrofóbica).

3.1.2 Modelagem Computacional do congelamento de gotículas

A modelagem computacional do processo de congelamento de gotículas é realizada através de uma análise bidimensional, utilizando o software ANSYS Fluent®, de modo a registrar o comportamento da temperatura e da solidificação durante o processo de vitrificação. As simulações primárias, para calibração do modelo, estudando a influência do ângulo de contato estão disponíveis no ANEXO I.

3.1.2.1 Modelo Físico - Domínio Numérico

A Figura 3.4 mostra o domínio numérico e as condições de contorno do problema simulado. O domínio numérico é dividido em 3 regiões: gotícula (água), ambiente (ar) e superfície de vitrificação (cobre). A temperatura inicial da gota é a mesma do ambiente, 20 $^\circ\text{C}$, enquanto a temperatura do substrato de congelamento é de -190 $^\circ\text{C}$. A superfície inferior do bloco de cobre é considerada como temperatura constante, e as paredes laterais do substrato são consideradas termicamente isoladas.

O tamanho do ambiente entorno da gota possui um tamanho de 3x o diâmetro da gota, e a espessura do bloco de cobre 1x o diâmetro da gota. É considerada apenas 1 gotícula nas simulações computacionais, utilizando a condição de simetria, de modo a reduzir o tempo de cálculo das simulações.

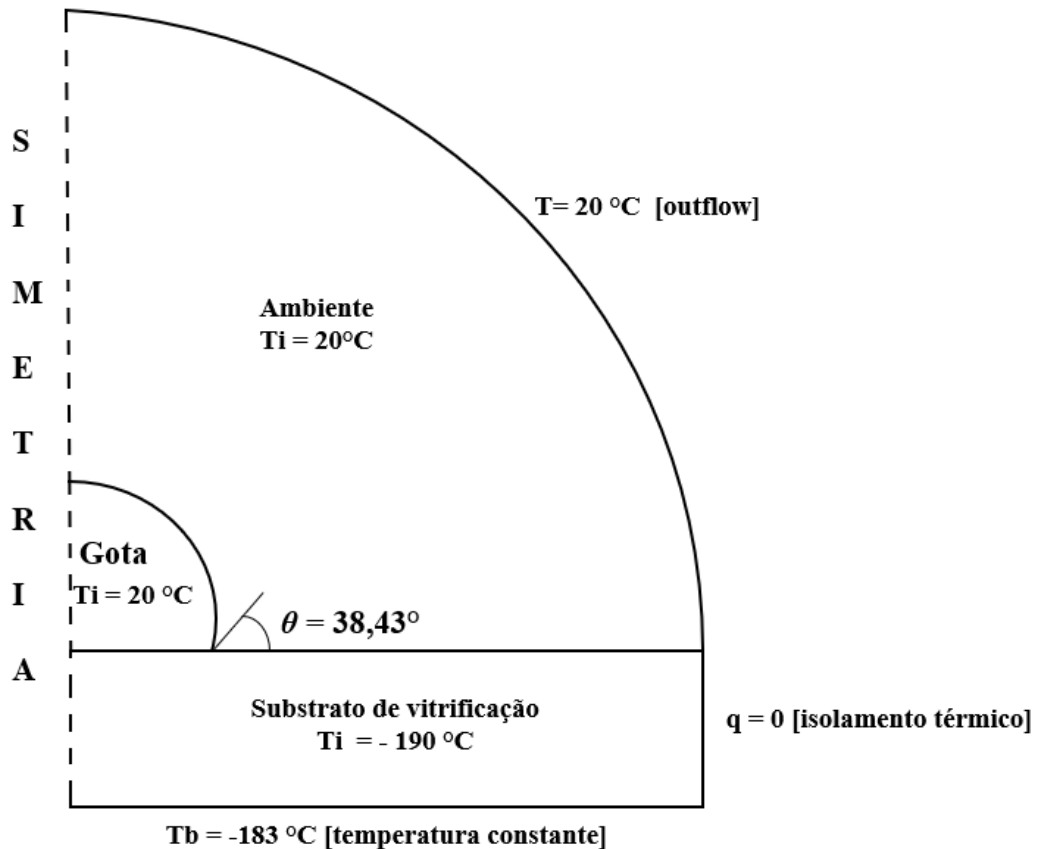


Figura 2.4 - Domínio numérico e condições de contorno do dispositivo proposto para vitrificação de microgotas.

3.1.2.2 Modelo Matemático

As propriedades térmicas utilizadas nas simulações são consideradas dependentes da temperatura, variando em uma faixa entre 30 e -210°C . É empregado o modelo de solidificação presente no software, na qual a equação da energia é escrita em termos de entalpia, conforme Equação 3.1.

$$\frac{\partial}{\partial t}(\rho H) + \nabla \cdot (\rho \vec{V} H) = \nabla \cdot (k \nabla T) + S \quad (3.1)$$

onde k é a condutividade térmica, ρ é a massa específica, \vec{V} é a velocidade do fluido, H é a entalpia da fase. O parâmetro S é o termo fonte, calculado por:

$$S = \frac{(1 - \beta)^2}{(\beta^3 + \varepsilon)} A_{mush} \cdot \vec{V} \quad (3.2)$$

onde β é fração mássica de líquido, ou solidificação. A conservação de massa e quantidade de movimento são descritas pelas Equações 3.3 e 3.4.

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \vec{V}) = 0 \quad (3.3)$$

$$\frac{\partial \rho \vec{V}}{\partial t} + \nabla \cdot (\rho \vec{V} \vec{V}) = -\nabla p + \nabla \cdot (\mu \nabla \vec{V}) + \rho \vec{f} \quad (3.4)$$

em que ε é um valor muito pequeno para evitar divisão por zero e A_{mush} é uma constante da interface líquido-sólido.

O tempo total de simulação é de 20 segundos, com um passo de tempo numérico (*time step size*) de 0,001 segundos. É empregado um modelo de viscosidade laminar, o método de discretização COUPLED para solução do acoplamento pressão-velocidade e algoritmos de segunda ordem para resolução da pressão, energia, momentum e formulação transiente. Como critério de convergência, é definido um resíduo de 1×10^{-6} para energia e 1×10^{-4} para as outras variáveis, com um número máximo de 1000 interações por *time step*.

3.1.2.3 Análise da Malha Numérica

Para validação das simulações, é empregado o método GCI – *Grid Convergence Index* (Celik et al., 2008), a fim de verificar a independência dos resultados em relação às malhas numéricas criadas, como também através da comparação numérico-experimental com os testes realizados. O método consiste em selecionar 3 malhas diferentes, com razão de refino progressiva, e avaliar o índice de convergência através dos erros relativos entre cada malha. Para tanto é necessário utilizar alguma variável como referência para cálculo, por exemplo, pressão, temperatura, fração mássica, entre outros. A Equação 3.5 descreve o procedimento para cálculo do GCI desenvolvido pelos autores.

$$GCI^{21} = \frac{1,25 \cdot e_a^{21}}{(r_{21})^p - 1} \quad e \quad GCI^{32} = \frac{1,25 \cdot e_a^{32}}{(r_{32})^p - 1}, \quad (3.5)$$

em que r_{21} , r_{32} são as razões de refino, e_a^{21} , e_a^{32} são os erros calculados entre as malhas 2-1 e 3-2, vide equação 3.6, e p é um parâmetro definido pela equação 3.7.

$$e_a^{21} = \left| \frac{\varphi_1 - \varphi_2}{\varphi_1} \right|, \quad e_a^{32} = \left| \frac{\varphi_2 - \varphi_3}{\varphi_2} \right|, \quad (3.6)$$

em que φ representa o parâmetro escolhido como referência.

$$p = \frac{1}{\ln(r_{21})} \cdot \left| \frac{\epsilon_{32}}{\epsilon_{21}} + q(p) \right| \rightarrow q = (p) \ln \left(\frac{(r_{21})^p + 1}{(r_{32})^p + 1} \right) \quad (3.7)$$

onde $\epsilon_{21} = \varphi_2 - \varphi_1$ e $\epsilon_{32} = \varphi_3 - \varphi_2$. Se o valor encontrado para o GCI for inferior a 5%, significa que os resultados estão independentes do refino da malha numérica.

Então, foram consideradas 3 malhas com diferentes razões de refino, sendo $r_{1-2} = 1.5$ e $r_{2-3} = 1.3$, com 408.459, 174.143 e 101.105 elementos, respectivamente. O parâmetro de referência para refino de malha foi a fração mássica de líquido (solidificação) da gota. A Figura 3.5 mostra os tamanhos de malha empregados para cálculo do GCI.

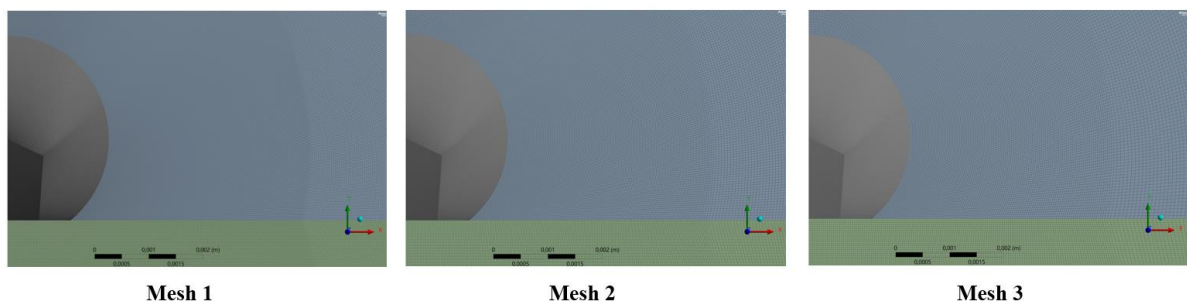


Figura 3.5 - Malhas numéricas utilizadas no cálculo do GCI.

Os valores de GCI encontrados para as malhas 1 e 2 foram $GCI_{2-1} = 0,734\%$ e $GCI_{3-2} = 2,656\%$ para as malhas 2 e 3. Logo, a malha 2 foi utilizada para comparar os resultados numérico-experimentais, reproduzindo com precisão os fenômenos físicos.

3.2 MÉTODO DE VITRIFICAÇÃO POR IMERSÃO

3.2.1 Metodologia Experimental

O estudo do método de imersão foi realizado utilizando 3 meios de resfriamento, sendo o nitrogênio líquido (LN₂), o *slush* de nitrogênio (SN₂) e o nitrogênio sub-resfriado (SR – LN₂). Um reservatório de isopor com volume de 1 L de nitrogênio a -196 °C foi utilizado para testes com LN₂. Para os testes SN₂ e SC-LN₂, um reservatório de isopor com 600 ml de nitrogênio líquido é inserido em uma câmara de vácuo selada para produção do *slush* (líquido com partículas sólidas) com conexões para sucção da bomba de vácuo e medições de pressão (transdutor Keller PA33X) e temperaturas, no centro da amostra e do fluido criogênico.

Para imersão em LN₂, foram utilizados termopares do tipo T (Ômega), e para testes com SN₂ e SR-LN₂, o tipo J, devido à maior faixa de medição para baixas temperaturas. O registro dos dados é realizado a cada 0,1 segundo através de um módulo de aquisição de dados (modelo NOVUS-Fieldlogger) com 8 canais. O esquema da bancada experimental para produção de *slush* (SN₂) é mostrado na Figura 3.6.

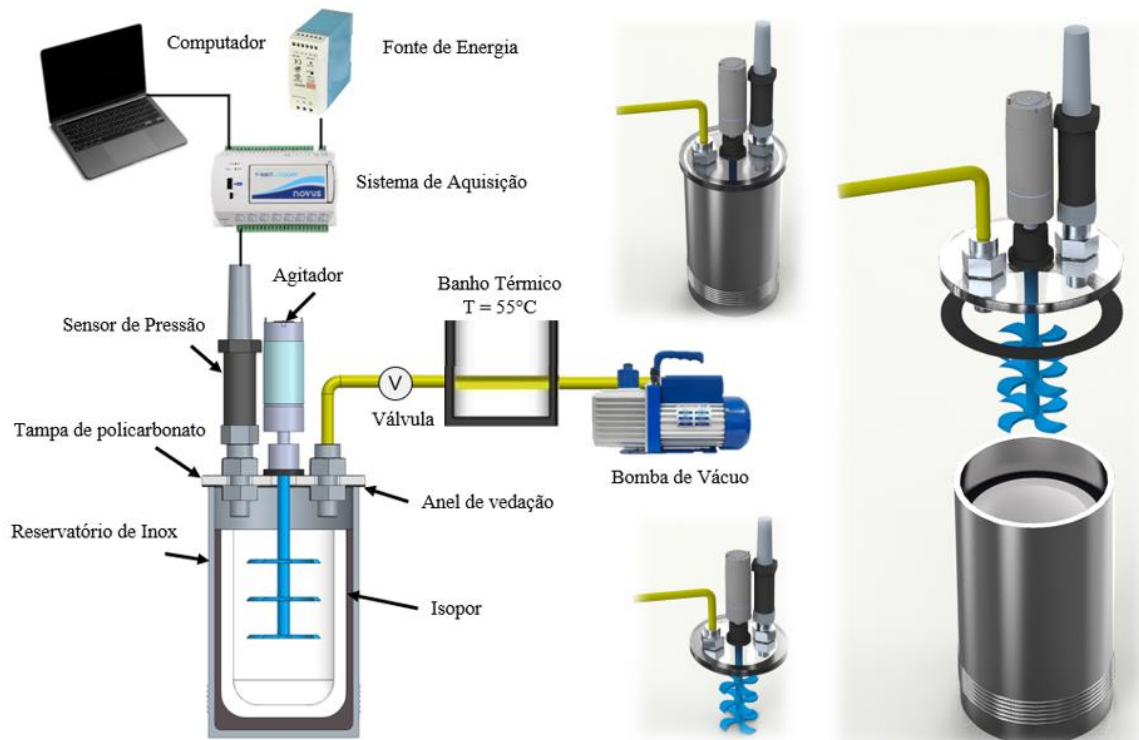


Figura 3.6 - Bancada Experimental utilizada para produção do SN₂.

Para formação do *slush*, a pressão do sistema é reduzida gradativamente até 8 kPa em aproximadamente 20 min e depois mantida nesta pressão por mais 10 min, a fim de homogeneizar toda a fase sólida formada a uma temperatura de 61 K. Durante o processo é utilizado um agitador para quebrar a massa sólida de nitrogênio que é formada, processo essencial para produzir uma mistura heterogênea sólido-líquido. Em caso de não se utilizar de um agitador, é formado um bloco sólido de nitrogênio, conforme ilustrado pela Figura 3.7. Após a formação do SN2, a temperatura do meio permanece estável em $-210\text{ }^{\circ}\text{C}$ até que toda a massa de nitrogênio sólido derreta, processo que leva cerca de 5 minutos. Nesta etapa é obtido nitrogênio líquido sub-resfriado (SR-LN2).

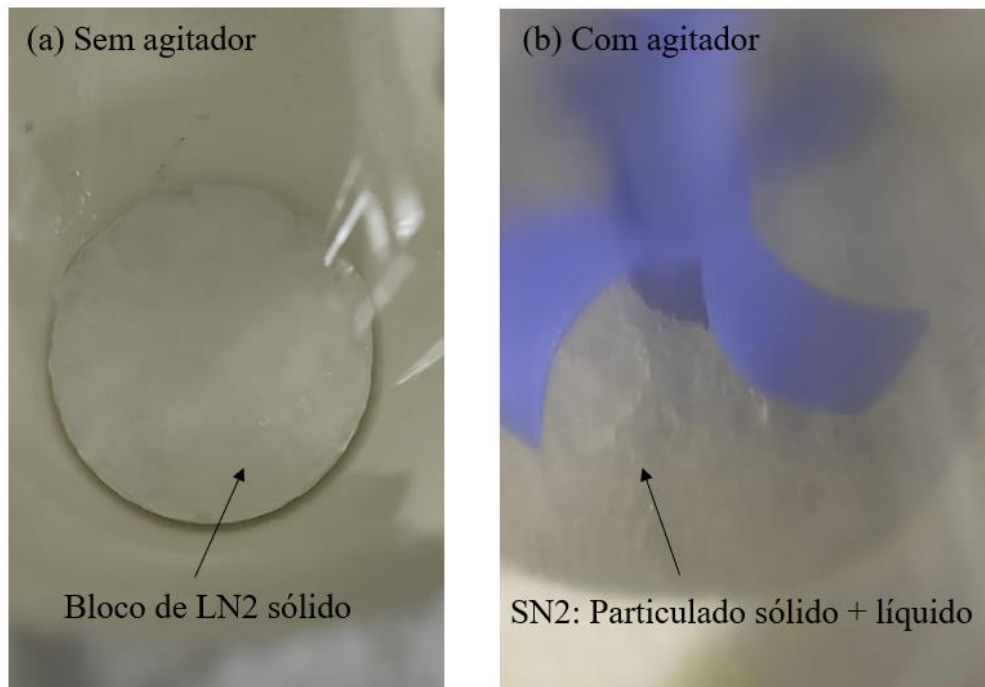


Figura 3.7 - Comparação do efeito do agitador na formação do SN2.

Um dos problemas relatados na formação do SN2, de acordo com Baker et al. (2013), é a presença excessiva de oxigênio no nitrogênio líquido, dificultando a formação, estabilidade e manutenção do *slush*. Isso ocorre, pois, a temperatura de fusão do oxigênio é de $-183\text{ }^{\circ}\text{C}$, ou seja, uma diferença de 27°C com o nitrogênio. Logo, a cada rodada de produção de *slush*, o nitrogênio residual é descartado, evitando assim a presença excessiva de particulados sólidos de oxigênio no LN2.

3.2.2 Amostras e Testes de Imersão

Nos testes de imersão em LN2 e SN2 foram avaliadas a influência do volume e da concentração e tipo de CPA nas soluções, através da taxa de resfriamento e o grau de cristalização das amostras.

Inicialmente, foram realizados testes com criotubos como recipientes para as amostras e testados dois volumes diferentes, 0,5 ml e 1 ml. A preparação das amostras foi feita utilizando a solução tampão salina com fosfato, ou PBS, como solução base, e três tipos de agentes crioprotetores, glicerol e DMSO (intracelular) e sacarose (extracelular). Foram testadas as concentrações de 10%, 30% e 50% de CPA, de modo a verificar qual a condição mínima para vitrificação. Além disso, foi testado um meio comercial para criopreservação de materiais biológicos (TYB - FUJIFILM Irvine Scientific), composto por 20% de gema de ovo, 12% v/v de glicerol, e 10 µg/ml de sulfato de gentamicina (antibiótico).

Paralelamente, foi estudada a utilização de dispositivos desenvolvidos em PDMS (Polydimethylsiloxane) como recipientes para as amostras. Os dispositivos têm a vantagem de serem fechados, com a possibilidade de variação de suas características, tais como espessura, geometria e volume. Foram fabricados dispositivos com 150 µL de volume, com espessuras de 2, 3 e 4 mm. A Figura 3.8 mostra os recipientes utilizados para os testes de imersão.



Figura 3.8 - Criotubos e dispositivos de PDMS utilizados no processo de vitrificação por imersão direta.

3.2.3 Modelagem Computacional do Processo de Imersão de Criotubo

3.2.3.1 Modelo Físico - Domínio Numérico

Foram realizadas simulações computacionais para fins de calibração e validação do modelo numérico com os dados experimentais, tanto para imersão em LN2 como para SN2 em criotubo. As simulações foram feitas no software Fluent®. O material do criotubo é o polipropileno, com paredes de 1 mm de espessura, preenchido com 1 ml de água pura e o restante com ar. A utilização de água na validação é devido à facilidade de obtenção das propriedades do fluido de acordo com a variação de temperatura. A Figura 3.9 mostra o tipo de criotubo utilizado nas simulações (a), sua representação gráfica (b), as condições de contorno (c) e a malha empregada para análise numérica (d).

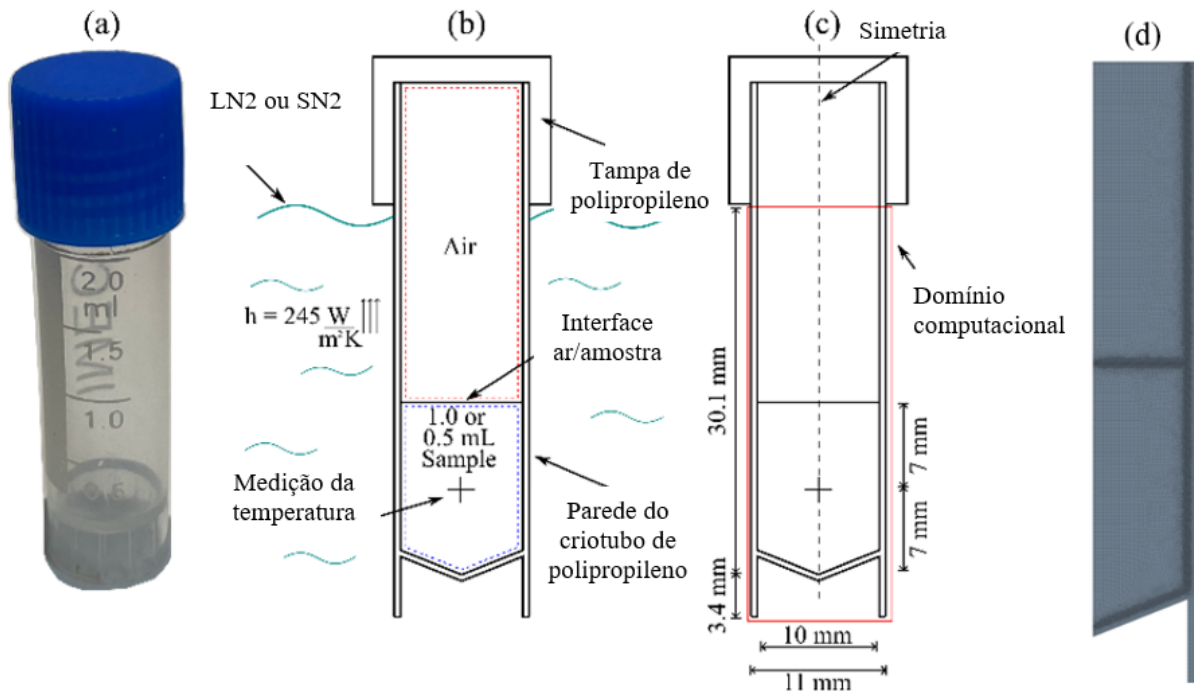


Figura 3.9 - (a) Criotubo, (b) Condições de contorno, (c) Representação gráfica do problema e (d) Malha para solução numérica.

O procedimento de simulação é idêntico ao experimento, onde inicialmente, todo o sistema está a 294,7 K (21,7 °C) e o criotubo é submerso em nitrogênio líquido (LN2) a 77 K (-196°C). O ponto de monitoramento da temperatura foi posicionado no centro da amostra de água. A região da tampa do criotubo foi desconsiderada nas simulações, pois está fora do nitrogênio líquido.

Nas paredes do sistema foi utilizada a condição de contorno de convecção, tendo LN2 ou SN2 como fluido de troca de calor. O coeficiente de transferência por convecção que apresentou os melhores resultados foi de 245 W/m²K (Wang et al., 2015). A independência da malha foi verificada através do método GCI, exposto na seção 3.1.2.3 deste trabalho, com malhas de 24.000, 42.000 e 72.000 elementos. Após análise, optou-se pela malha intermediária, com erro médio inferior a 3,85%.

3.2.3.2 Modelo Matemático

O processo de solidificação é transiente e predominantemente condutivo, onde os efeitos naturais de convecção e flutuabilidade podem ser negligenciados (Alizadeh et al., 2022; Rothan, 2022). Assim, o problema é modelado segundo a equação de conservação de energia, conforme Equação 3.8.

$$(\rho C_p) \frac{dT}{dt} = \nabla(k \nabla T) - L \frac{d\beta}{dt} \quad (3.8)$$

A fração líquida (β) é obtida a partir da Equação 3.9, onde T_s é a temperatura do sólido e T_l é a temperatura do líquido.

$$\beta = \begin{cases} 0 & \text{se } T < T_s \\ 1 & \text{se } T > T_l \\ \frac{(T - T_s)}{(T_l - T_s)} & \text{se } T_l > T > T_s \end{cases} \quad (3.9)$$

O modelo utilizado para a mudança de fase foi proposto por Voller & Prakash (1987). O sistema é bidimensional, contendo um eixo de simetria. A solução do modelo multifásico é feita pelo método VOF (*Volume of Fluid*), considerando duas fases fluidas, sendo ar e água. Como critério de convergência para a equação de energia foi utilizado o resíduo de 1×10^{-8} , e para a análise da independência temporal, foi considerado 0,01 s, com erro inferior a 0,7%. As propriedades termofísicas da água em função da temperatura (T) são calculadas a partir das equações apresentadas por Fukusako (1990).

3.3 DESENVOLVIMENTO DOS DISPOSITIVOS DE PDMS

Os dispositivos foram feitos com o PDMS SYLGARD® 184, com todas as etapas de fabricação feitas em sala limpa, com o PDMS dentro da data de validade, tendo sido aberto pela primeira vez em ambiente controlado para evitar possíveis contaminações externas. O processo de fabricação dos dispositivos de PDMS segue a seguinte metodologia:

- Fabricação dos moldes em poliestireno;
- Fixação dos moldes em placas de silício ou placas Petri;
- Preparação do PDMS;
- Remoção das bolhas;
- Cura do PDMS;
- Ativação da superfície por Plasma de oxigênio e colagem.

3.3.1 Preparação dos Moldes de Poliestireno

Primeiramente foi realizada a modelagem em CAD dos moldes, utilizando o software *SolidWorks®*. Foram projetadas duas geometrias, com formato circular e em serpentina, com volume de 150 μ L. A produção dos moldes foi feita a partir de chapas de poliestireno, com 0,9 mm de espessura e proteção superficial vinílica. As chapas foram cortadas a laser, através de uma máquina de corte a laser, de modo a obter um bom acabamento. Após o corte, os moldes são limpos por imersão em álcool isopropílico, durante 5 minutos, e então, reservados para colagem nas placas de silício ou Petri. A Figura 3.10 mostra as etapas do procedimento de moldagem, corte e limpeza dos moldes. Demais informações sobre as dimensões dos moldes estão descritas no Anexo 2.

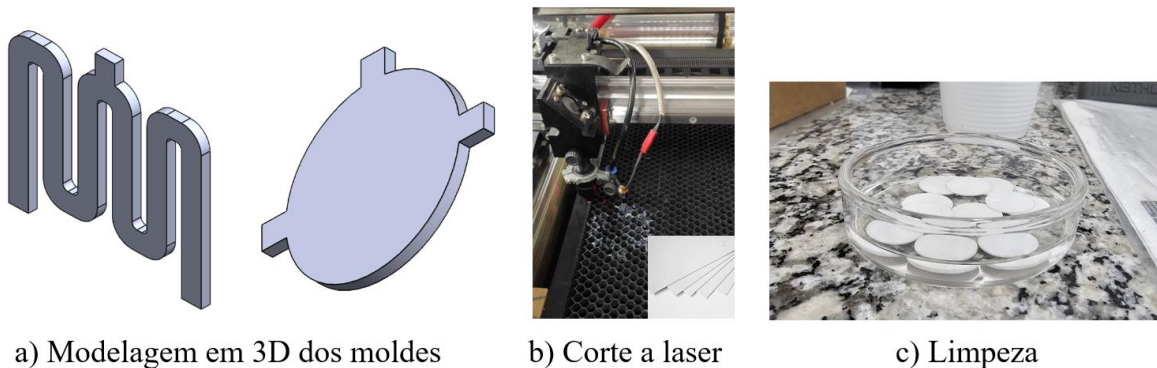


Figura 3.10 - Etapas do processo de projeto, corte e limpeza dos moldes.

3.3.2 Fixação dos Moldes

Primeiramente é necessário efetuar a limpeza das superfícies nas quais os moldes serão colados. Para as placas de Petri, utilizou-se álcool isopropílico e água deionizada utilizando uma pisseta, com secagem na estufa a uma temperatura de 80 °C. Já para a limpeza dos discos de silício, utilizou-se álcool isopropílico e acetona, em que os discos ficaram imersos em álcool isopropílico por 10 minutos, seguido por mais 10 minutos em acetona. Por fim, levou-se os discos ao forno à 80°C até que toda a acetona evaporasse.

Após a limpeza das superfícies, os moldes foram colados com uso de fita dupla-face, em duas superfícies distintas: em disco de silício e diretamente em placa de Petri, conforme mostrado na Figura 3.11.

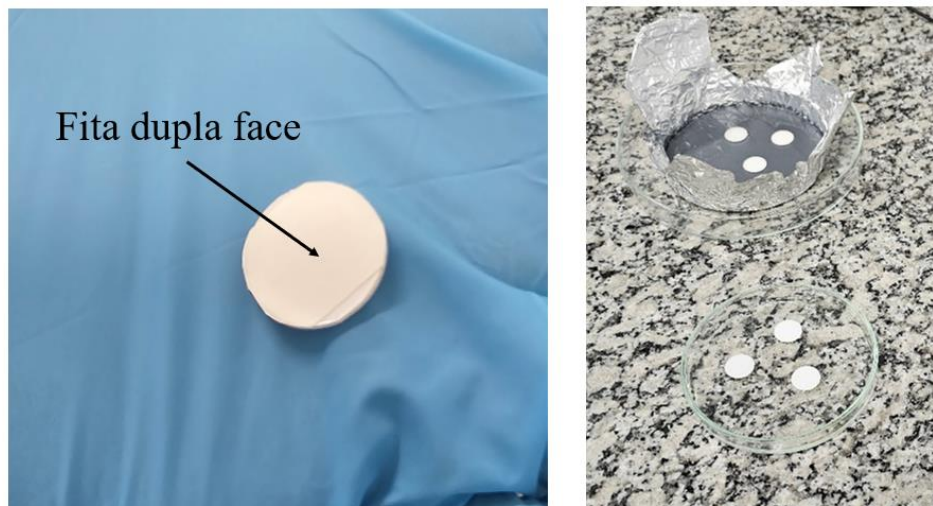


Figura 3.11 - Colagem dos moldes nas superfícies de placas de silício e Petri.

3.3.3 Preparação do PDMS

O dispositivo final consiste em uma mistura de PDMS com agente de cura, na proporção de 10 para 1, respectivamente. Após deposição das misturas em suas respectivas superfícies, elas foram colocadas em uma câmara de vácuo para remoção total das bolhas, durante 30 minutos. Para remoção das bolhas, as placas foram colocadas em uma estufa pré-aquecida a uma temperatura de 80°C por 40 minutos. Por fim, após saída da estufa, as placas com PDMS ficaram descansando por 15 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, com auxílio de um estilete e uma pinça, removeu-se delicadamente a bolacha de PDMS das placas, efetuando os

recortes de cada dispositivo em seus devidos formatos. A Figura 3.12 mostra as etapas da preparação dos dispositivos de PDMS.

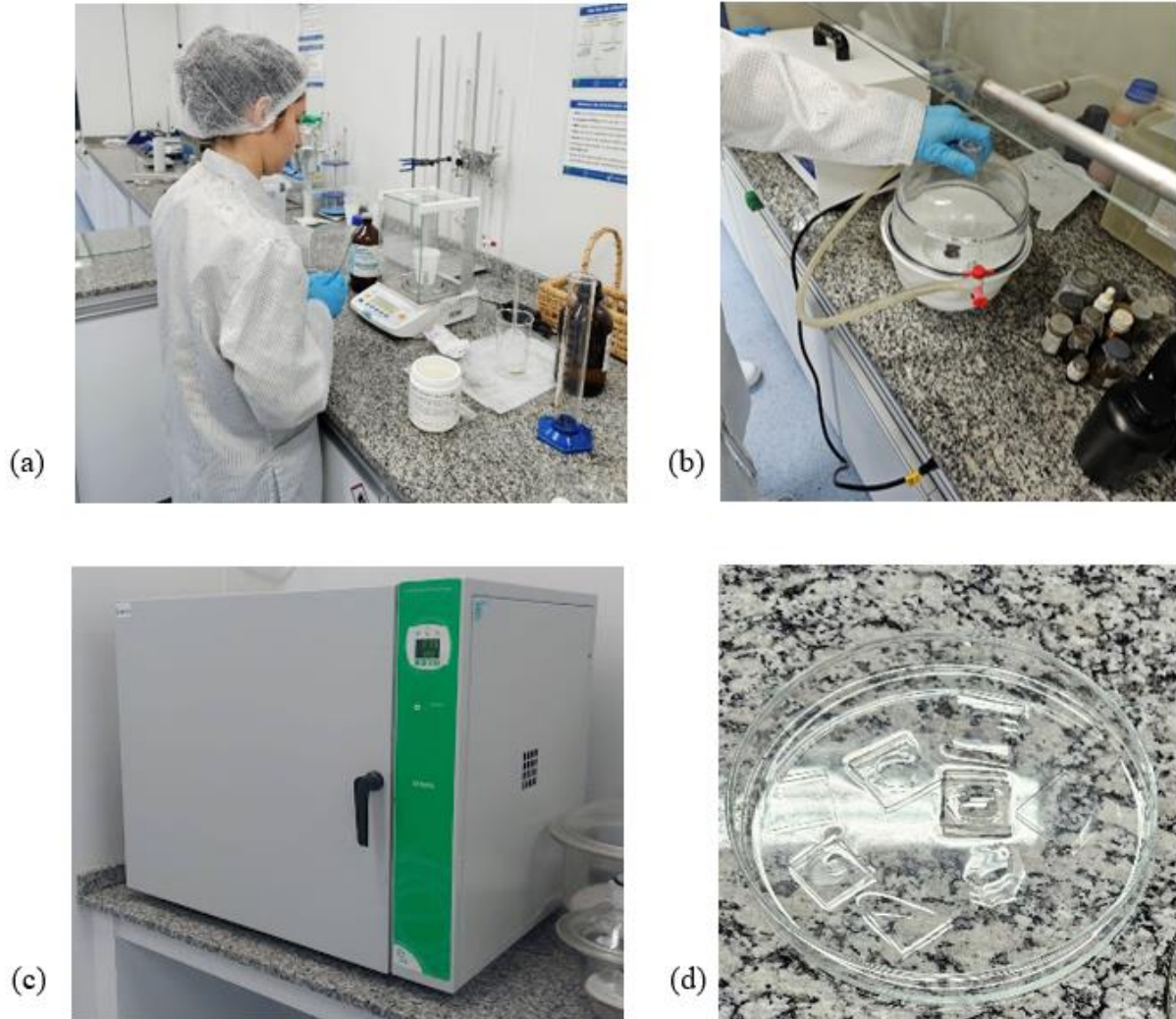


Figura 3.12 - (a) Mistura do PDMS e agente de cura, (b) Remoção das bolhas, (c) Cura do PDMS e (d) Recorte dos dispositivos.

3.3.4 Tratamento Superficial por Plasma

O processo de tratamento superficial do PDMS inicia com a limpeza dos dispositivos recém processados. Para tanto, os dispositivos foram imergidos primeiro em acetona pura e logo em álcool isopropílico, e retornaram à estufa (80 °C) para remoção de potenciais resíduos da acetona ou do álcool.

Em seguida, é realizado o processo de ativação da superfície do PDMS com uso de plasma, utilizando oxigênio como gás ionizante, devido às suas propriedades de ionização. Os dispositivos foram colocados diretamente em placas de Petri e levados à câmara de plasma, marca Plasma Etch®, com potência de 100 W, por um tempo de 5 minutos. A Figura 3.13 mostra detalhes do equipamento utilizado para ativação da superfície.



Figura 3.13 - (a) Equipamento de plasma utilizado, (b) Configuração do plasma e (c) Plasma de Oxigênio.

Durante o processo de plasma, a coloração observada no interior da máquina foi predominantemente roxo-azulado, indicando que o plasma é de oxigênio. Após o processo de ativação, os dispositivos foram removidos da máquina e testados quanto à eficácia do tratamento superficial realizado. O teste consiste em depositar uma pequena gota de água em uma das superfícies, de modo a verificar se a superfície se encontra hidrofílica. Estando hidrofílica, o plasma ativou a superfície adequadamente.

Então, com o plasma validado, basta apenas unir as duas partes dos dispositivos. Essa união se deu com o uso de pinça para garantir apenas o contato superfície-superfície, com aplicação de pressão moderada, durante 3 minutos. Para que a colagem por plasma seja viabilizada, é necessário realizar duas furações nos dispositivos, de modo com que o ar seja expulso do interior dos canais quando unida as duas partes. Por fim, os dispositivos são levados para a estufa novamente, de modo a finalizar o processo de união dos dispositivos, à uma temperatura de 80 °C, por no mínimo 3 horas.

O processo de geração de plasma é relativamente simples, consistindo basicamente em gerar uma diferença de potencial sobre um gás disposto a baixas pressões (em torno de 200 – 700 *mTorr*), de modo a ionizá-lo. No entanto, os equipamentos encontrados comercialmente são de fabricação estrangeira e de alto custo, dificultando o acesso à grupos de pesquisa e empresas com pouco financiamento. Deste modo, este trabalho também se propôs a desenvolver

um protótipo de um equipamento para tratamento superficial por plasma, com materiais de fácil acesso e com baixo custo, auxiliando na promoção de pesquisas que necessitam deste tipo de equipamento. No Anexo 3 é detalhado o desenvolvimento deste protótipo.

3.4 TESTES BIOLÓGICOS

3.4.1 Preparação das amostras

Os testes com sêmen foram realizados no laboratório da Hemocord, em São Leopoldo. O processamento do sêmen foi realizado de acordo com a atualização do manual de exame e processamento de sêmen humano para aplicações de vitrificação da OMS (WHO manual, 2021). A coleta foi realizada seguindo as instruções de boas práticas para processamento de sêmen, com dois voluntários saudáveis, mínimo 3 dias de abstinência sexual, e utilizando um recipiente estéril. O intervalo de tempo da coleta até o congelamento foi menor que duas horas, de modo a evitar a perda de motilidade dos espermatozoides.

Após recebimento das coletas, as amostras foram analisadas quando à motilidade, viabilidade, e concentração espermática. Enquanto o meio de vitrificação é produzido, os espermatozoides ficam armazenados em um agitador com aquecimento, evitando a redução da motilidade e viabilidade. A remoção do plasma seminal e seleção dos espermatozoides se deu através de dois métodos, sendo a lavagem simples e o método *swim-up*. com metodologias descritas na seção 2.4.1 deste trabalho. A Figura 3.14 mostra os dois métodos de preparação da amostra seminal para criopreservação.

A preparação da solução para vitrificação foi realizada utilizando 5 ml do meio HTF (*Human Tubal Fluid*) modificado (FUJIFILM Irvine Scientific®), testando duas concentrações de sacarose, 0,25 M e 4 M, respectivamente. juntamente com 0,1 ml de albumina humana. Após a separação do plasma e seleção dos espermatozoides, novamente é realizada a análise da amostra, verificando a motilidade e concentração espermática, de modo a garantir que os parâmetros estejam dentro do recomendado pela OMS.

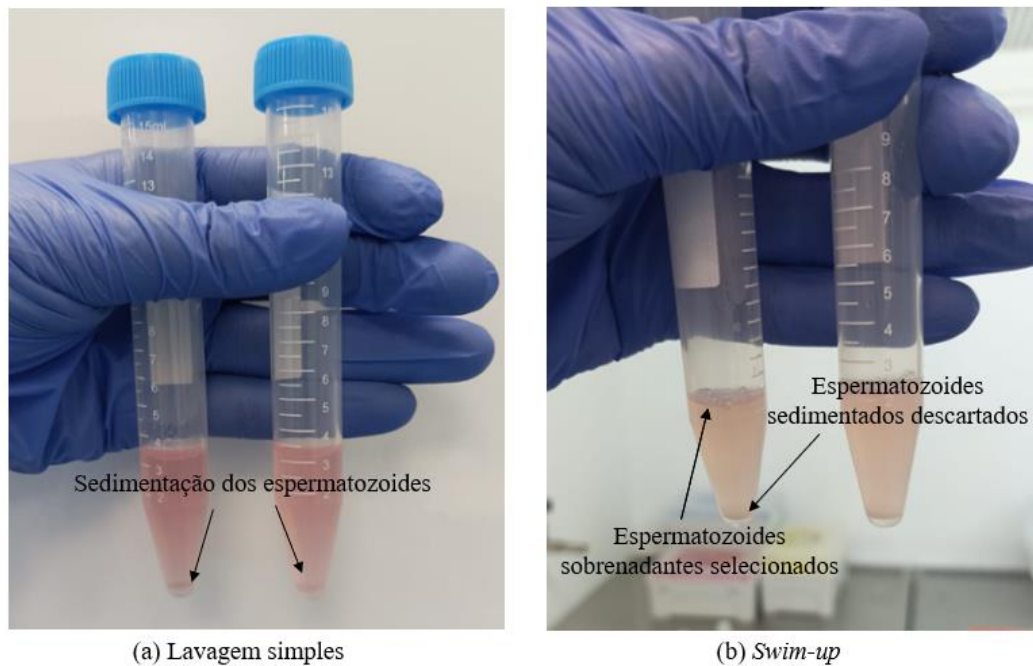


Figura 3.14 - (a) Processo de preparação da amostra seminal pelos métodos de lavagem simples e (b) *Swim-up*.

3.4.2 Procedimento Experimental

Os testes de imersão direta em LN2 e SN2 foram realizados em criotubos e com os dispositivos de PDMS, e o volume utilizado em ambos foi de 150 μ L. Para fixação das amostras, foi desenvolvido um dispositivo, de modo a facilitar a imersão e a padronização do procedimento operacional, conforme Figura 3.15. A esquematização 3D, as vistas ortogonais e as medidas do dispositivo estão disponíveis no Anexo 4.

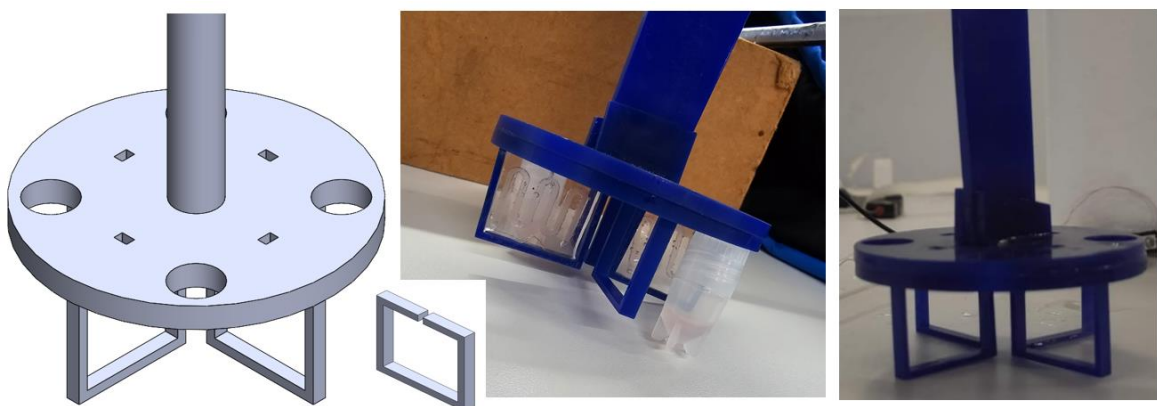


Figura 3.15 - Suporte para as amostras em criotubo e dispositivo de PDMS para testes de imersão.

O dispositivo tem capacidade de fixação de 4 criotubos e 4 dispositivos de PDMS. Na parte superior, foram colocados orifícios de modo a posicionar os termopares para aquisição das temperaturas, que permitem verificar a curva de resfriamento de cada amostra. As amostras que foram instrumentadas para medição de temperatura, não foram consideradas para avaliação biológica pós-aquecimento. Foram congeladas quatro amostras por vez, sendo dois criotubos e dois dispositivos de PDMS. A Figura 3.16 mostra o procedimento de congelamento adotado para imersão em LN2 e SN2.

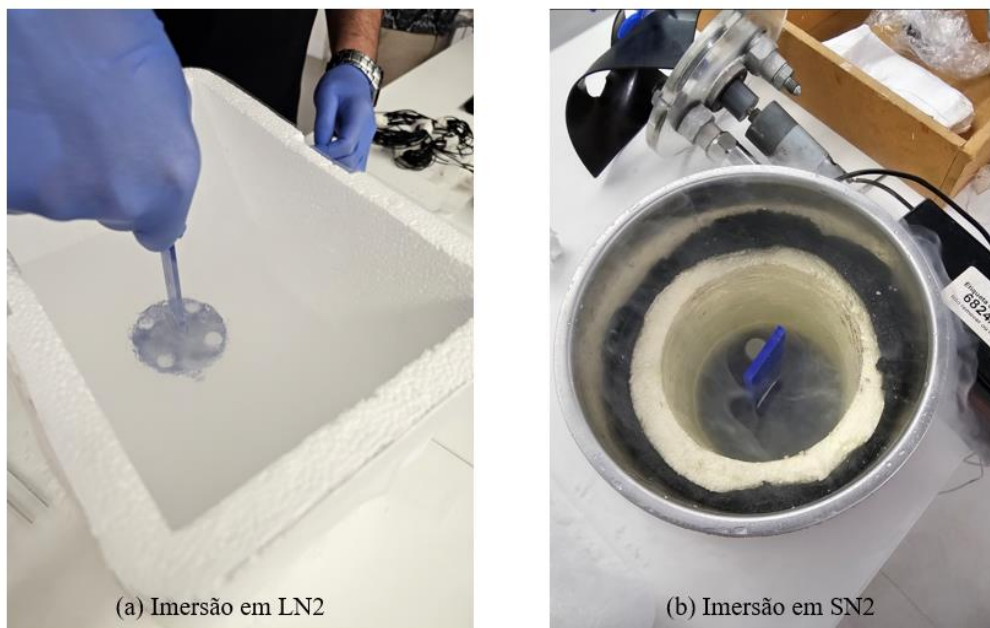


Figura 3.16 - Imersão das amostras em LN2 e SN2.

Foram utilizadas duas bancadas experimentais, uma para a produção do SN2 e outra para o teste de imersão com aquisição dos dados de temperatura durante os testes, vide Figura 3.17. Ambas as bancadas contam com um sistema de aquisição Fieldlogger da marca NOVUS.

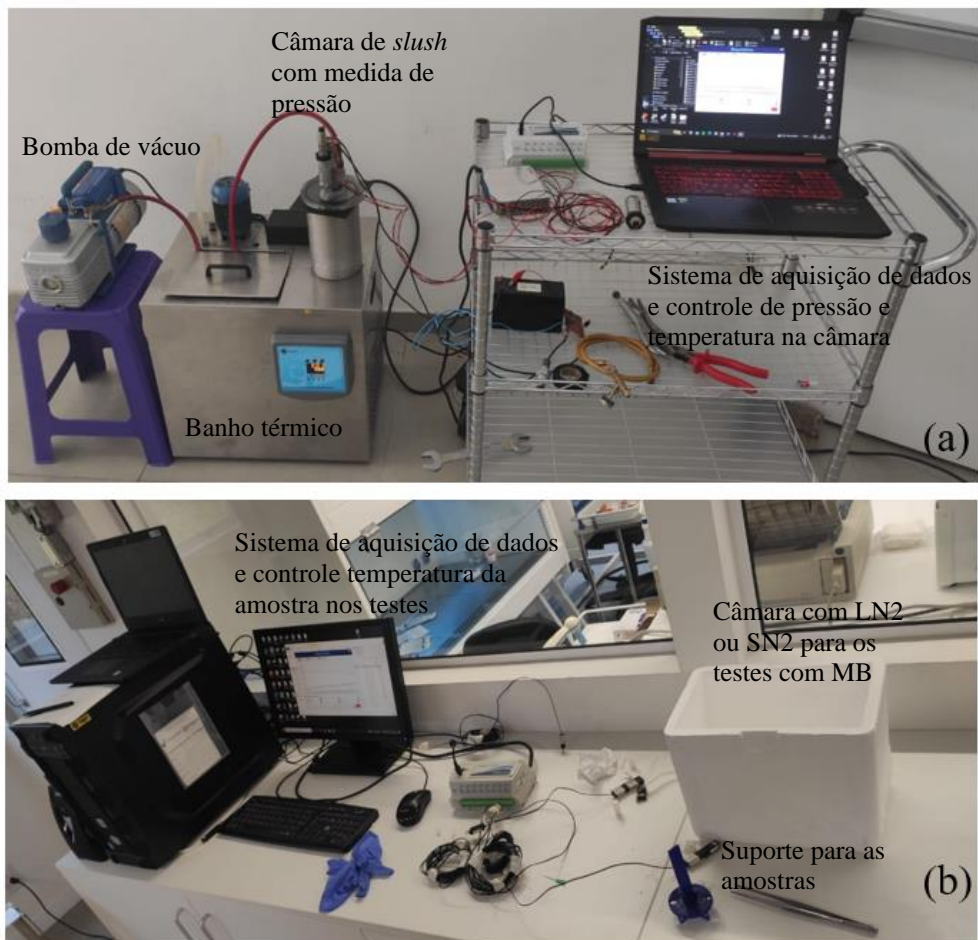


Figura 3.17 - (a) Bancadas experimentais para produção de *slush* e (b) Testes de imersão.

Após o congelamento, as amostras foram levadas para o tanque de armazenamento, onde ficam imersas em vapor de LN₂, a uma temperatura em torno de -195 °C. Depois de um período de 1 semana de armazenamento, as amostras foram aquecidas, em banho maria com temperatura de 43 °C, realizando a análise de motilidade e viabilidade para verificar o sucesso dos procedimentos de criopreservação.

4 RESULTADOS

4.1 MÉTODO DE VITRIFICAÇÃO DE GOTAS POR CONTATO

4.1.1 Comportamento do Avanço da Solidificação

Um importante parâmetro para estudo do protocolo de criopreservação é a taxa de solidificação. Com a câmera de alta velocidade, foi possível capturar as imagens do avanço do processo de mudança de fase, com uma taxa de 5000 FPS. O processamento das imagens foi realizado através do software Image-J®, onde a Figura 4.1 mostra os contornos da evolução da solidificação da gota sobre a superfície plana do substrato de cobre.

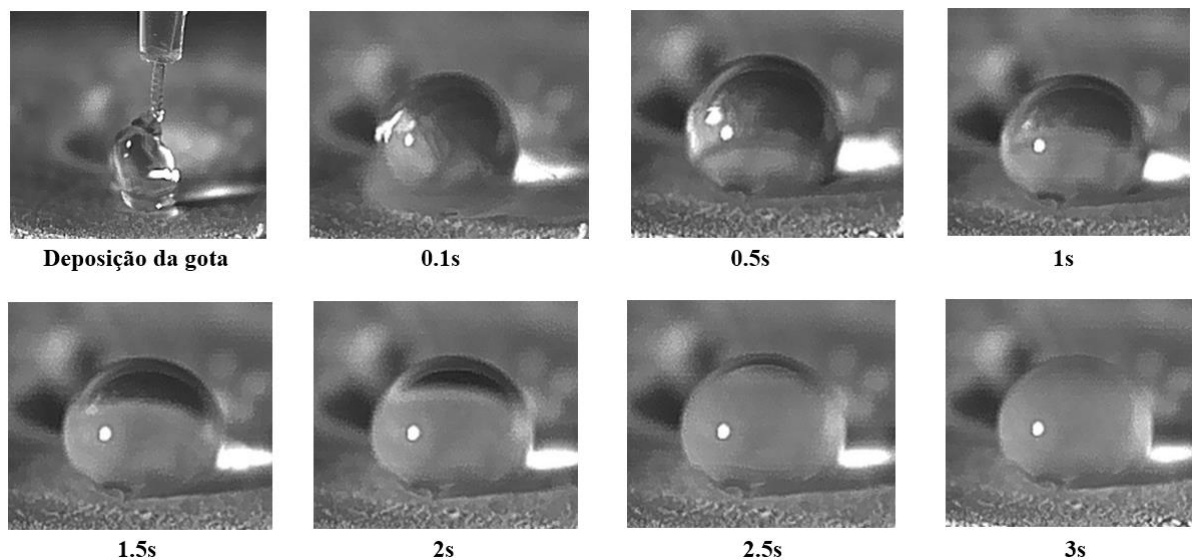


Figura 4.1 - Avanço do processo de solidificação da gota.

Através da coleta de imagens ultrarrápida, foi possível acompanhar todo o processo e solidificação da gota, que ocorreu em 2,87 s. É possível observar flutuações hidrodinâmicas no início da deposição da gota, fenômeno explicado pelo Efeito Leidenfrost que atua na interface gota-substrato, devido à grande diferença de temperatura entre os dois meios (+20°C e -190 °C). Assim que estas flutuações perdem a intensidade, começa o processo de nucleação dos cristais de gelo, pela base da gota, evoluindo para um processo de nucleação multidirecional, em acordo com o estudo realizado por Bourton (1986).

Já na simulação computacional CFD, o processo de solidificação ocorreu em 2,8 s, indicando que o modelo numérico está calibrado corretamente, respondendo com fidelidade aos fenômenos físicos envolvidos. A Figura 4.2 mostra os campos de solidificação, ou da fração de

líquido, obtidos através das simulações, bem como a comparação numérico-experimental da curva de solidificação.

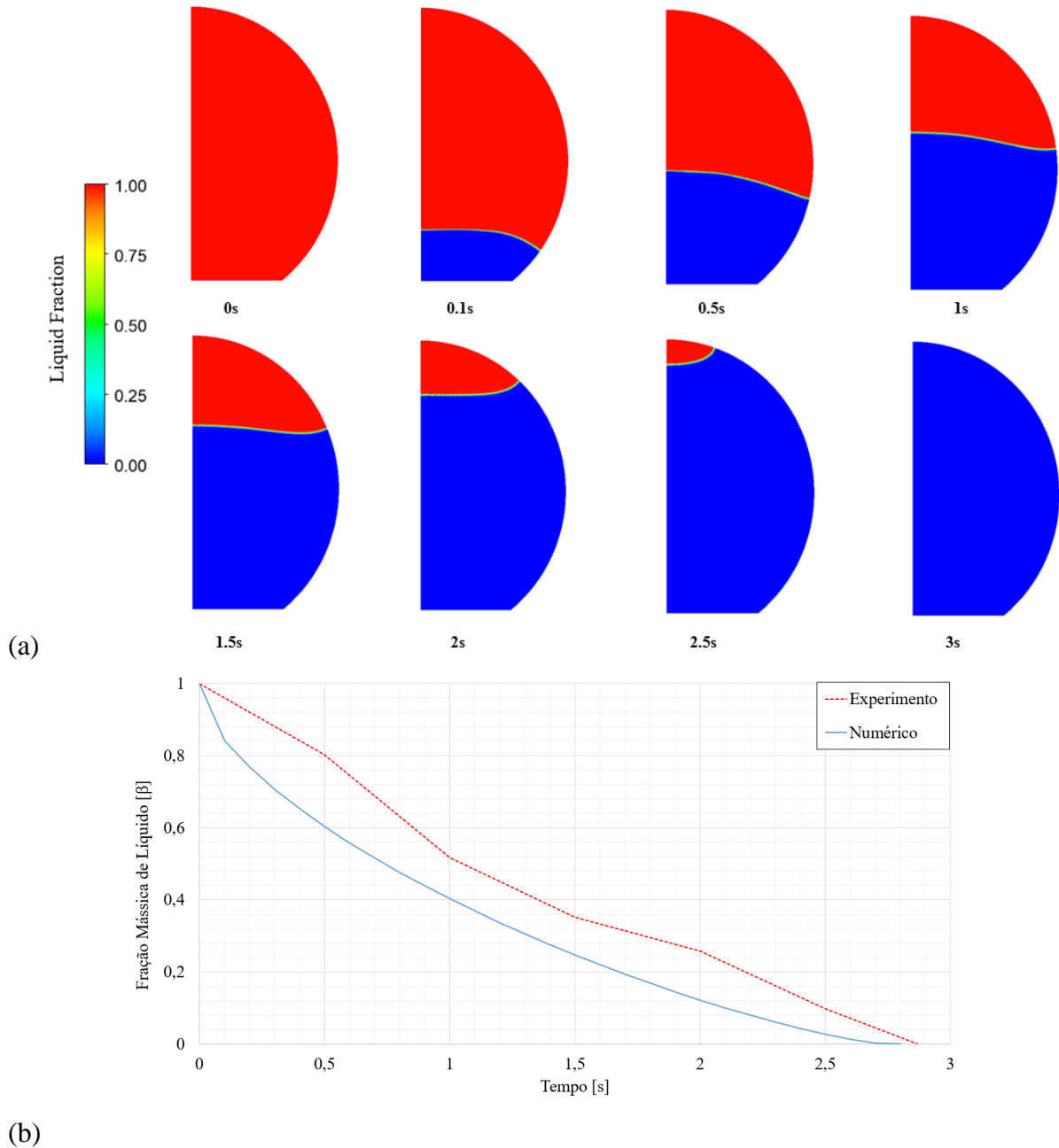


Figura 4.2 - (a) Campos de fração mássica de líquido obtidos via análise CFD e (b) Comparação numérico-experimental da taxa de solidificação.

A diferença relativa na fração mássica de líquido, β , (início e fim) entre as simulações e o experimento foi de apenas 2,5%. A discrepância na taxa de solidificação, observada nas curvas da Figura 4.2.(b), no período de 0,5 s até 2,5 s, é explicada pelo erro de paralaxe durante a captura das imagens, cuja lente da câmara não estava totalmente colinear com o substrato de

cobre ($\theta=180^\circ$). Também foi analisado o processo de mudança de fase através de uma análise pelo Método de Fluxo Óptico, verificando a dinâmica da interface líquido-cristal durante o tempo. A Figura 4.3 mostra o desenvolvimento da cristalização da gota para intervalos de tempo de $\Delta t = 0,2$ s, comparando as imagens com os campos de velocidade dados pelo método do fluxo óptico.

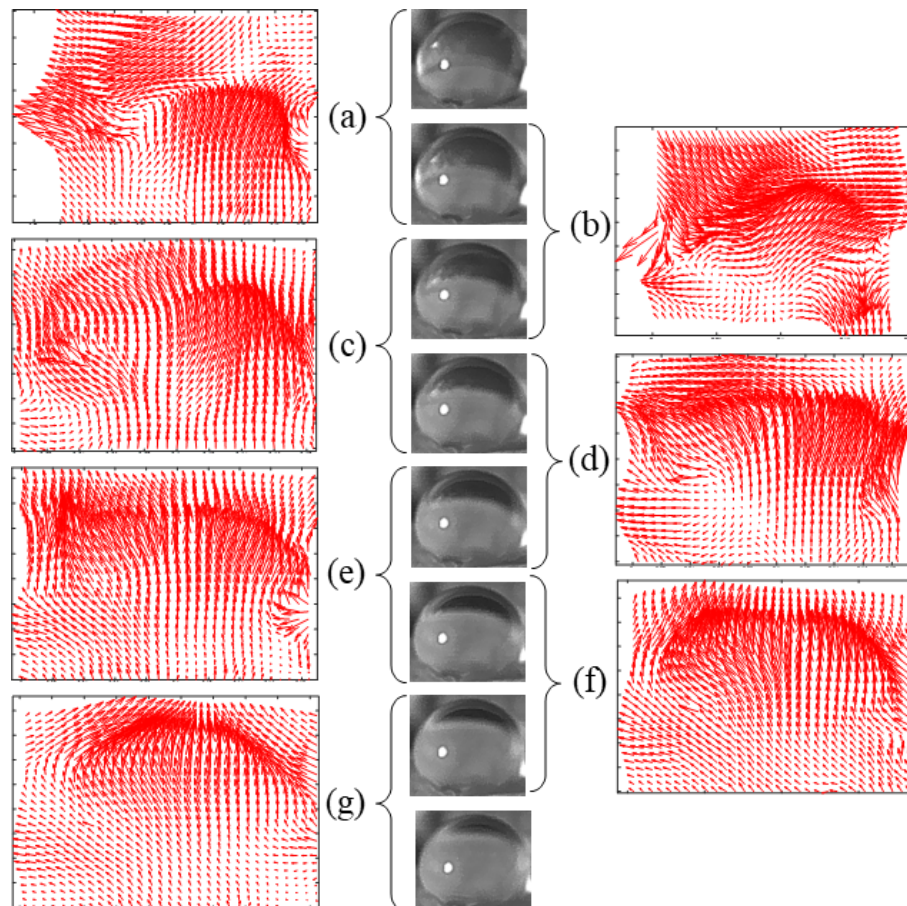


Figura 4.3 - Imagens da solidificação e campos de velocidade na interface líquido-cristal com evolução temporal.

Conforme observado, a cristalização cresce verticalmente, com flutuações na fase líquida ao longo do tempo. Tais flutuações podem ser vistas nos campos de velocidade mostrados na Figuras 4.3(a-e), evidenciados pela componente horizontal da velocidade. Em contraste, para baixas frações β , tais oscilações cessam, e o perfil de velocidade da interface de cristal-líquido exibe uma predominância vertical Figura 4.3(f-g). Isto ocorre devido à mudança da área da frente de cristalização, que atinge seu valor máximo na região central da gota, e seu valor mínimo no topo da gota.

4.1.2 Análise das Curvas de Temperatura e Taxa de Solidificação

A Figura 4.4 mostra as curvas numéricas e experimentais de temperatura medidas no interior da gota ao longo do processo. As taxas de resfriamento foram verificadas utilizando duas faixas de temperatura: a região de instabilidade termodinâmica (água pura), desde o início da nucleação homogênea até a temperatura de transição vítrea, de -37 °C a -138 °C (dT/dt), e de $+20\text{ °C}$ a -175 °C (correspondente à Taxa Global – T.G).

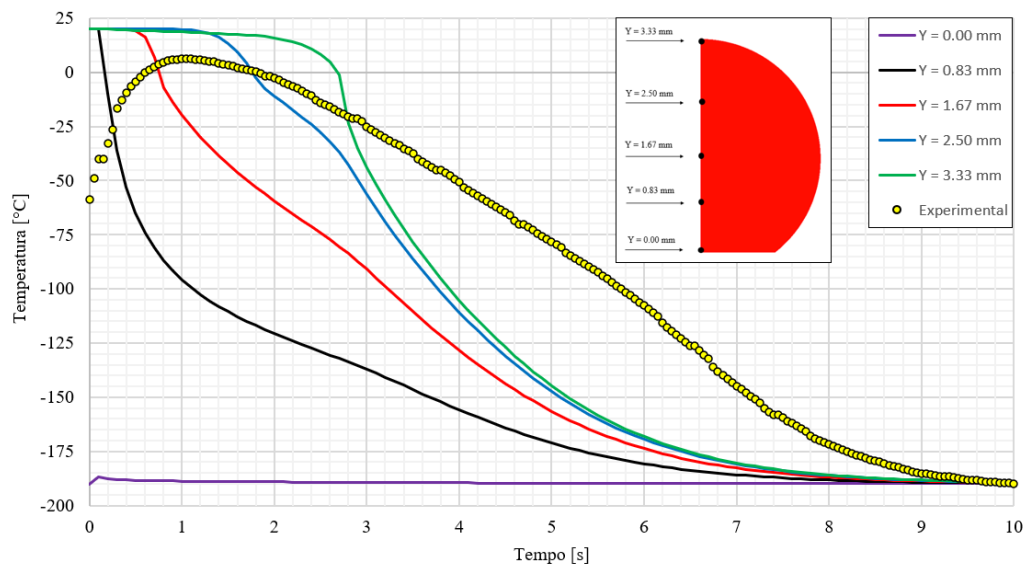


Figura 4.4 - Comparação experimental e numérica para diferentes pontos de medição de temperatura na gota.

A curva experimental atingiu a temperatura de estabilização em aproximadamente 10 s, enquanto as curvas numéricas estabilizaram em aproximadamente 8 s, ou seja, uma diferença de 20%. A solidificação localizada aconteceu em torno de 1,8 s, tanto para a curva experimental como para a numérica na posição $Y = 2,5\text{ mm}$, indicando que a posição do termopar (ajustada manualmente) está a uma altura de 2,5 mm da superfície de vitrificação, sendo a curva ideal para comparação com o experimento.

Para a região de instabilidade termodinâmica, foi encontrada uma taxa de resfriamento experimental de $1836,36\text{ °C/min}$, e de $3030,3\text{ °C/min}$ para o caso numérico, uma diferença relativa de 65%. Avaliando a taxa de resfriamento global, a diferença diminuiu para 18,7%,

com taxas de resfriamento de 1.625 °C/min e 1.928,93 °C/min para as curvas experimental e numérica, respectivamente.

Esta diferença está relacionada ao modelo matemático utilizado pelo Fluent®, que não considera as porções vitrificadas durante o processo de mudança de fase, conforme ilustrado pela Figura 4.5.

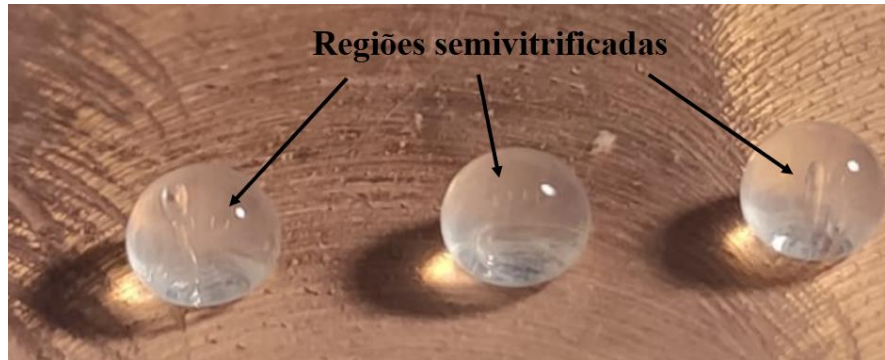


Figura 4.5. Resfriamento por gotículas sobre substrato plano de cobre com regiões semi vitrificadas.

Logo, foi possível simular o processo de congelamento até o ponto de solidificação, que envolve apenas transferência de calor sensível. Após isto, o modelo matemático atual de solidificação considera que 100% da fase sólida é cristal de gelo, sem levar em consideração porções vitrificadas, não representando adequadamente os parâmetros físicos do processo. Isto pode ser ajustado aplicando a equação de Bourton (Equação 2.2) para resolver as parcelas vitrificadas, conforme feito no trabalho de Shi et al., 2018.

4.1.3 Influência da Geometria da Superfície de Resfriamento

A influência da geometria de contato entre a gota e o substrato também foi investigada. Conforme mencionado anteriormente, uma cavidade semiesférica de 25 μL foi usinada na superfície do cobre. A Figura 4.6 compara as curvas de taxa de resfriamento para a gota sobre a superfície plana e na cavidade da superfície de cobre.

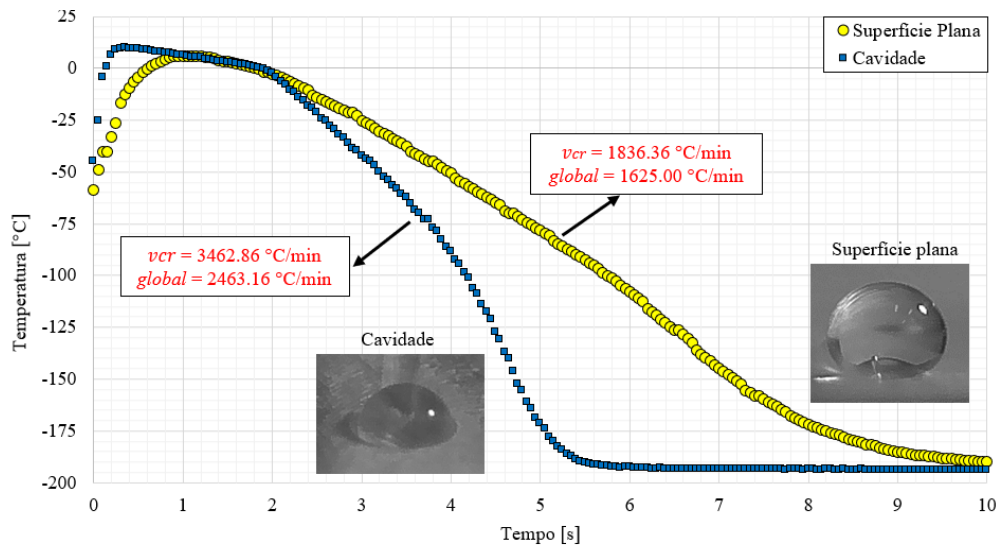


Figura 4.6 - Comportamento da temperatura das gotas na superfície plana e na cavidade do substrato de cobre.

Quando a gota é depositada na cavidade, a área de contato com a superfície de congelamento/vitrificação aumenta, consequentemente aumentando a velocidade de resfriamento e reduzindo em 81,8% o tempo necessário para estabilizar a temperatura da gota com o meio de congelamento (10 s a 5,5 s). Analisando a taxa de resfriamento através da região de instabilidade termodinâmica, foi possível obter um aumento de 88,6% (1836,36 °C/min para 3462,86 °C/min), e de 51,6% para a taxa de resfriamento global (1625 °C/min para 2463,16 °C/min). Este aumento na taxa de resfriamento da gota na cavidade se deve à maior área de transferência de calor entre o bloco de cobre e a gota.

4.1.4 Influência do Material da Superfície de Resfriamento

A influência do material da superfície de resfriamento foi avaliada experimentalmente e numericamente. Dois materiais com propriedades térmicas distintas, cobre e latão, foram comparados. Na superfície de latão, o ângulo de contato da gota foi de $105,5 \pm 11,4^\circ$, uma variação de 10,8% em relação a gota na superfície de cobre ($141,57 \pm 6,9^\circ$), devido às variações na condição de teste, como altura e inclinação de deposição da gota e rugosidade superficial. A Figura 4.7 mostra a comparação numérico-experimental para as superfícies de cobre e de latão, com coleta dos dados de temperatura na posição aproximada de $\frac{3}{4}$ da altura da gota.

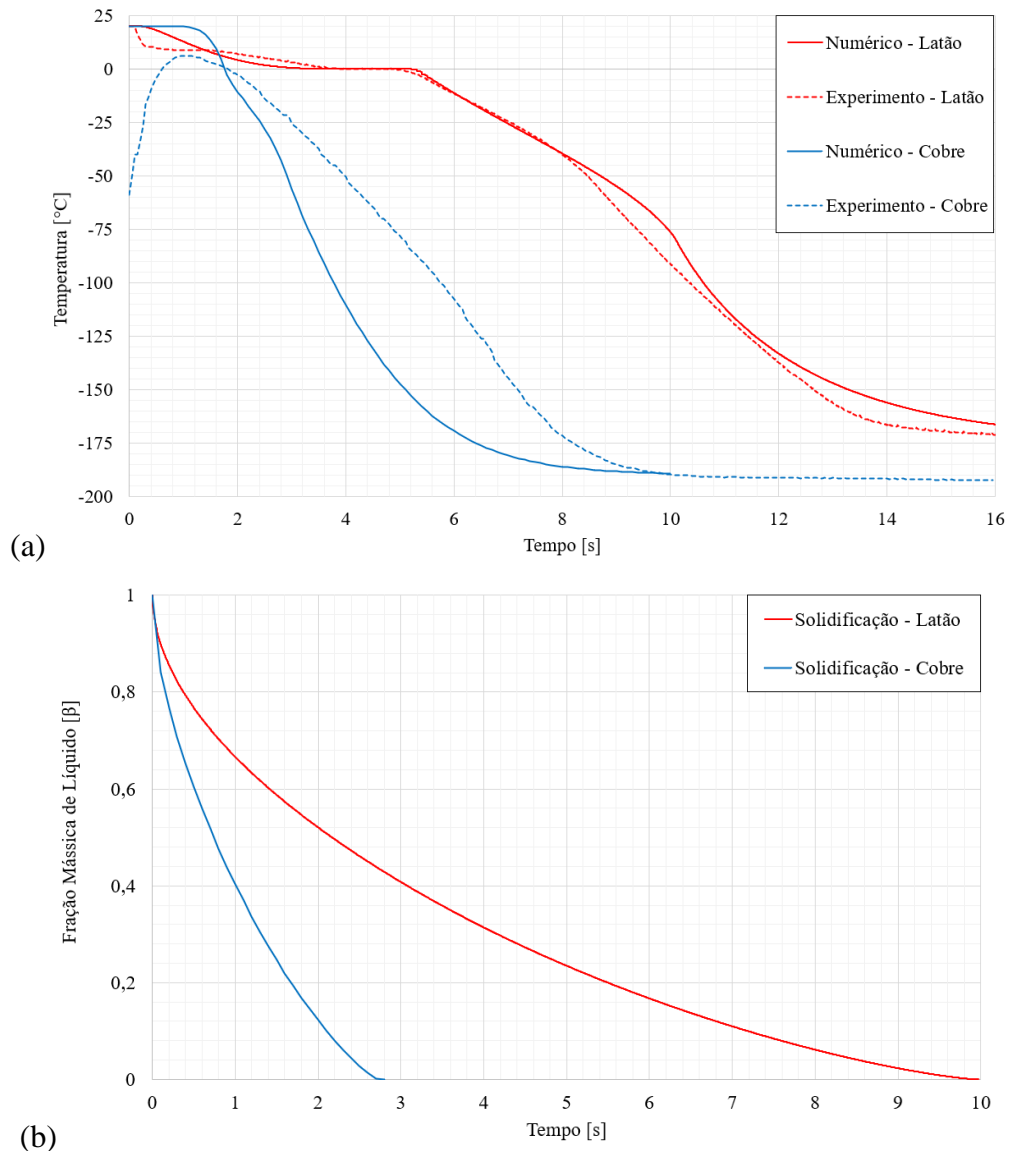


Figura 4.7 - (a) Comparação numérico-experimental das curvas de temperatura e da fração de líquido (b) durante o processo de solidificação das gotas.

Analisando a Figura 4.7.(a), a partir do ponto de início da solidificação ($0\text{ }^{\circ}\text{C}$) é possível confirmar a abrangência do modelo matemático empregado pelo *Fluent*, para solução da mudança de fase, não considerando porções vitrificadas na amostra, apenas uma cristalização homogênea. Isto ocorre apenas para o caso da superfície de cobre, onde foram obtidas as maiores taxas de resfriamento, e conseqüentemente, uma vitrificação parcial da amostra.

A Figura 4.7.(b) apresenta a variação na fração de líquido e o tempo de congelamento total da amostra para a superfície de latão foi de 9,96 s, enquanto 2,8 s para o cobre, uma diferença relativa de 255,7%, resultado esperado devido à grande diferença nas propriedades térmicas entre os materiais. Em relação à taxa de resfriamento, a superfície de latão alcançou

1446,09 °C/min para a região de instabilidade termodinâmica e 593,147 °C/min para a taxa global, com diferenças de 27% e 174% quando comparado com o cobre, nas respectivas regiões.

4.2 MÉTODO DE VITRIFICAÇÃO POR IMERSÃO DIRETA

O estudo da vitrificação por imersão foi realizado em várias etapas, descritas a seguir:

- Validação numérico-experimental do processo de congelamento para uma solução de água disposta em um criotubo.
- Análise do meio criogênico no processo de imersão, comparando nitrogênio líquido, LN2, com nitrogênio *slush*, SN2;
- Estudo da influência do tipo de recipiente para alocação das amostras, comparando criotubos com chips de PDMS;
- Testes de ajuste com diferentes tipos de CPAs para analisar efeito de concentração e volume na vitrificação;
- Testes com material biológico, para avaliar a vitrificação e a viabilidade.

4.2.1 Validação Numérico-Experimental

A Figura 4.8 mostra a validação da modelagem numérica do método de imersão direta com criotubo, com volume de 1 ml, utilizando como parâmetro de comparação com o experimento o perfil da temperatura no centro da amostra. O fluido utilizado neste estudo numérico-experimental foi água.

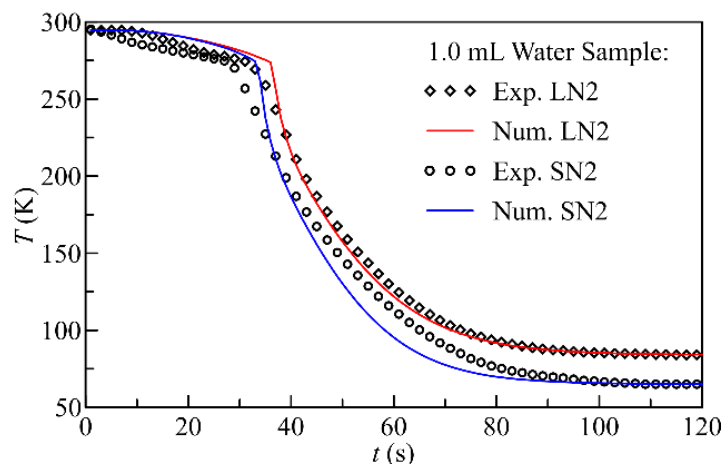


Figura 4.8 - Comparação dos resultados numéricos e experimentais da variação da temperatura durante o congelamento por imersão direta de criotubos.

O resultado numérico mostra conformidade com o resultado experimental, apresentando um fator de precisão médio de 98,2% e 94%, para LN2 e SN2, respectivamente, e erro médio de 1,8% (LN2) e 5,9% (SN2). O comportamento das curvas de temperatura após o ponto inicial de congelamento (0°C), evidencia que o modelo matemático utilizado pelo 85ossíve® consegue representar com acurácia os mecanismos que ocorrem durante o processo de mudança de fase.

Para ambos os fluidos criogênicos, o processo de congelamento ocorreu antes dos 40s, iniciando pelas paredes do criotubo e terminando na região central de contato com o ar dentro do recipiente, como mostra a Figura 4.9, através dos campos de fração mássica de líquido (Figura 4.9.(a)) e de temperatura (Figura 4.9.(b)), evidenciando o comportamento do processo de solidificação da amostra quando imersa em LN2.

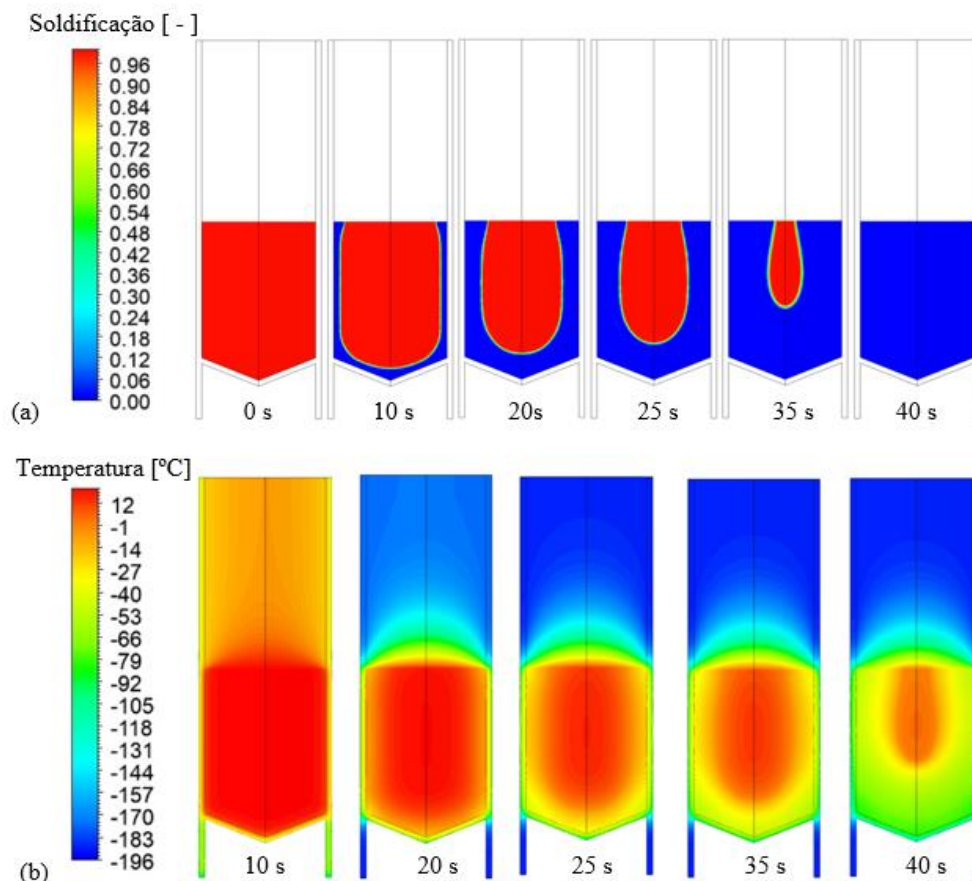


Figura 4.9 - (a) Fração de líquido ou Campos de solidificação e (b) Campos de temperatura para a imersão em LN2 de amostra em criotubo.

4.2.2 Estudo Experimental das Condições de Vitrificação

4.2.2.1 Efeito da concentração de CPA – Criotubo

A Figura 4.10 apresenta os perfis de resfriamento de diferentes amostras imersas em LN2. Pode-se observar pelo formato da curva que em baixas concentrações de CPA (10% - 30%), não foi possível obter a vitrificação das amostras, devido ao alto grau de cristalização. Para que ocorra a vitrificação da solução é fundamental que a taxa de resfriamento do experimento seja maior que a taxa de formação e avanço dos cristais de gelo. O comportamento da curva de resfriamento não varia dependendo do tipo de CPA, congelando completamente a amostra em torno de 40 s e estabilizando a temperatura com o meio em torno de 100-120 s, com taxas de resfriamento na ordem de 338 °C/min.

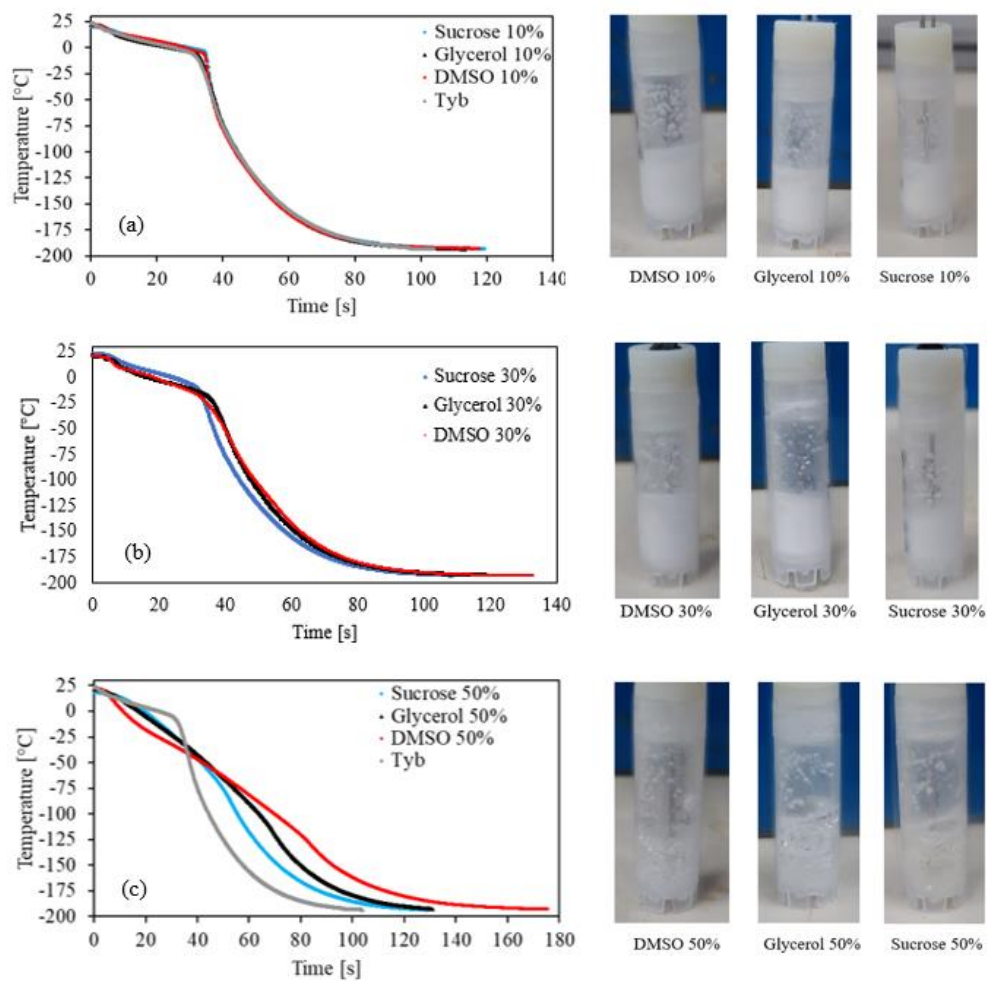


Figura 4.10 - (a) Efeito da concentração e do tipo de CPA para amostras com volume de 1 ml, na variação da temperatura e nas imagens dos criotubos pós-congelamento para 10% de CPA, (b) 30% de CPA e (c) 50% de CPA.

Para concentrações mais elevadas de CPAs (50%), foi possível vitrificar todas as amostras, com efeito significativo do tipo de CPA na taxa de resfriamento. As taxas encontradas para o volume de 1 ml foram 113,16 °C/min para DMSO, 160,52 °C/min para Glicerol e 201,79 °C/min para sacarose. As taxas de resfriamento são calculadas na região de instabilidade termodinâmica, ou seja, desde a temperatura de nucleação homogênea, $T_h = -38$ °C até a temperatura de transição vítrea, $T_g = -137$ °C.

Os resultados encontrados vão em acordo com o estudo de Yavin e Arav (2007), em que quanto maior a taxa de resfriamento (dT/dt), maior a viscosidade (μ) e menor o volume da amostra (V), maior será a chance de vitrificar uma solução (Equação 2.1). Assim, mesmo com taxas de resfriamento mais baixas, se a viscosidade for aumentada (% CPA), a vitrificação pode ser garantida.

4.2.2.2 Efeito do Fluido Criogênico e do Volume da amostra – Criotubo

O efeito do meio de resfriamento foi avaliado com imersão dos criotubos com amostras de CPAs em diferentes concentrações no SN2, e comparado com a imersão direta em LN2, para volumes de 1 ml e 0,5 ml e são apresentadas na Figura 4.11.

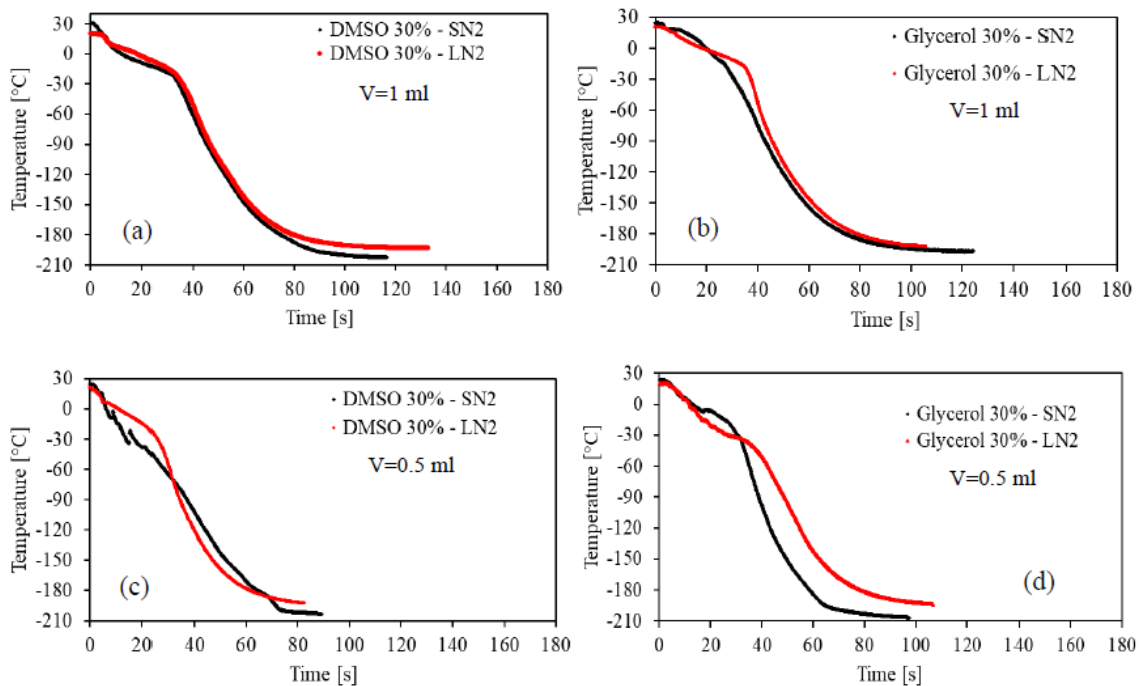


Figura 4.11 - Efeito do meio criogênico no resfriamento de amostras de CPAs a 30% e volume de 1 ml, DMSO (a) e Glicerol (b); e volume de 0,5 ml, DMSO (c) e Glicerol (d).

Para um volume de 1ml e 30% de DMSO e Glicerol (Figuras 4.11.a-b), o SN2 não apresentou vantagem significativa em termos de taxa de resfriamento em comparação ao LN2. Já em relação ao tempo de congelamento, para DMSO (Figura 4.11.(a) houve uma redução de 33,33% utilizando SN2, reduzindo o tempo de congelamento de 18,6 s para 12,4 s. O Glicerol (Figura 4.11b) não mostrou uma vantagem significativa do SN2 sobre o LN2.

Ao reduzir o volume de amostra para 0,5 ml, o efeito do nitrogênio *slush*, SN2, torna-se mais significativo, como é possível observar nas Figuras 4.11.(c-d). Por exemplo, concentrações de 30% reduziram o tempo de congelamento da solução de DMSO (Figura 4.11c) de 11 s para 6,2 s, uma redução de 43%. Entretanto, não houve ganho em relação à taxa de resfriamento dentro da faixa de temperatura considerada de -38°C a -137°C . Já para o Glicerol, (Fig. 4.11d), houve um ganho de 66,5% na taxa de resfriamento, passando de $252,14^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (LN2) para $419,84^{\circ}\text{C}/\text{min}$ (SN2), mas não se verificou uma diferença significativa para o tempo de congelamento.

A comparação do volume para cada fluido criogênico pode ser melhor visualizada pela Figura 4.12, através das curvas de temperatura do DMSO 30% e Glicerol 30%.

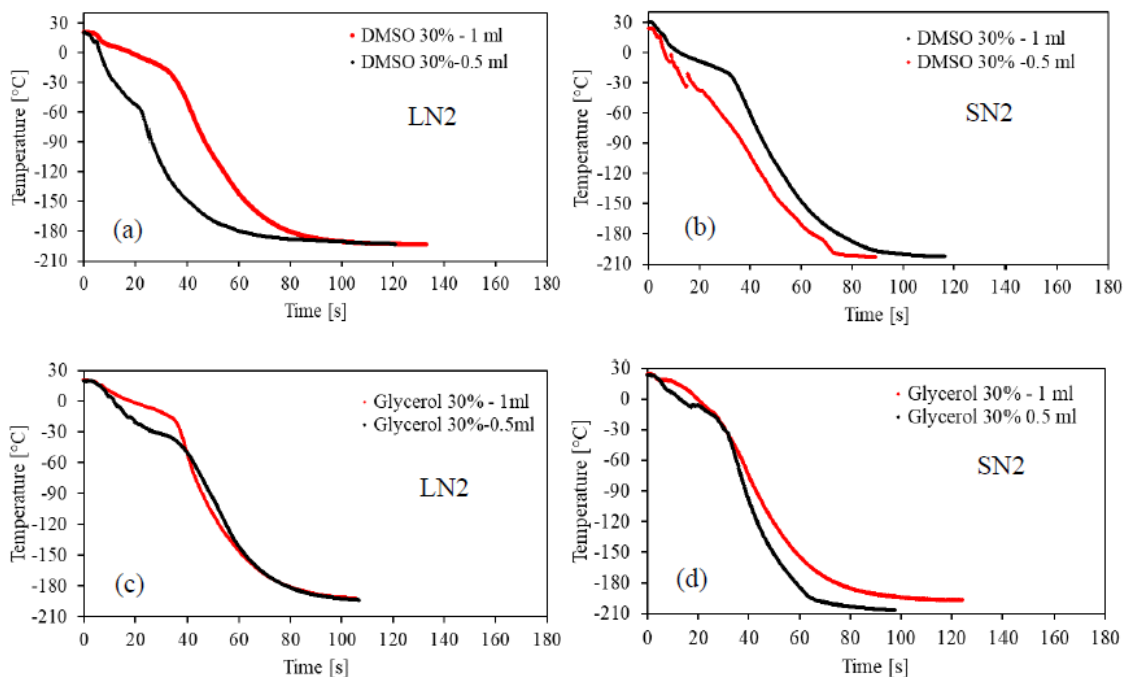


Figura 4.12 - Efeito do volume das amostras de CPAs a 30%: DMSO em LN2 (a) e SN2 (b) e Glicerol em LN2 (c) e SN2 (d).

4.2.2.3 Influência do Fluido Criogênico – Chip de PDMS

Testes de amostra de glicerol com concentração de 30% diluído na solução salina PBS dentro do dispositivo circular de PDMS com 2 mm de espessura e volume útil de 150 μL foram avaliadas na imersão com nitrogênio líquido (LN2), nitrogênio subresfriado (SR-LN2) e *Slush* (SN2). A taxa de resfriamento pode ser analisada de diversas formas, sendo as mais usuais através do ponto de início da desvitrificação, região de instabilidade termodinâmica dT/dt_{cr} , e início da estabilização da curva de temperatura (taxa global).

Durante os experimentos foi observado que a temperatura de desvitrificação é próxima de $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$, ou seja, a amostra tende a cristalizar quando aquecida acima desta temperatura. A Figura 4.13 apresenta os perfis de resfriamento dos diferentes meios de congelamento, LN2, SR-LN2 e SN2, bem como as regiões de coleta das taxas de resfriamento.

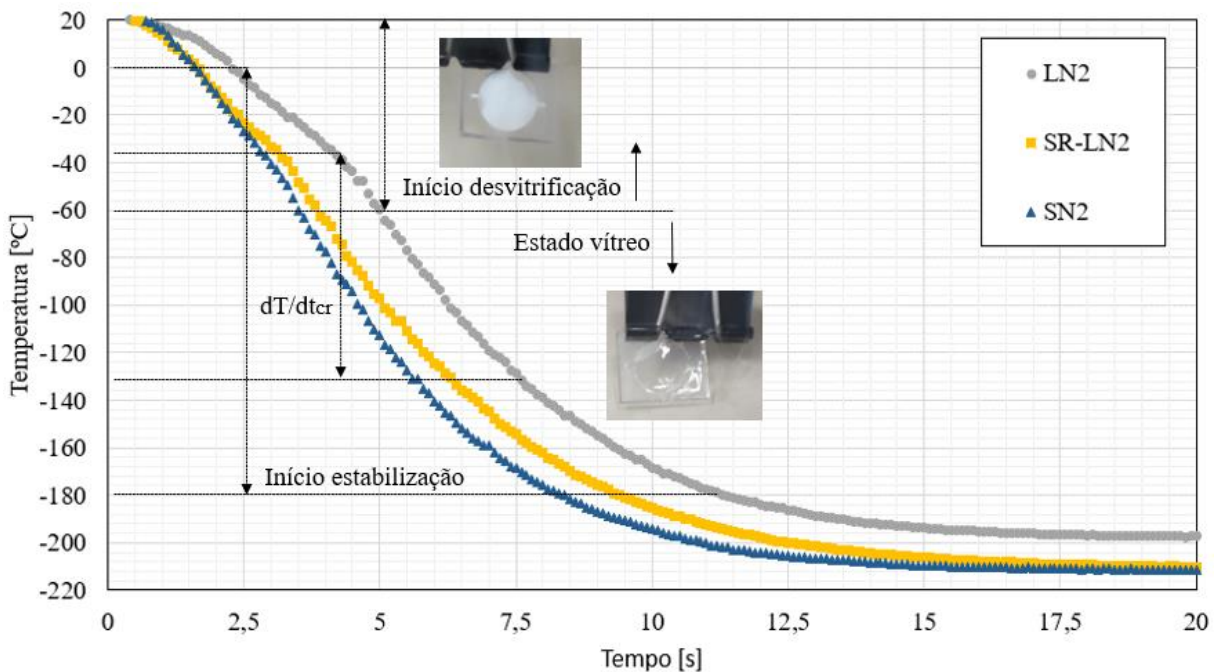


Figura 4.13 - Curvas de temperatura dos dispositivos de PDMS quando imersos em LN2, SR- LN2 e SN2.

Analisando as curvas de resfriamento, a amostra atinge a temperatura crítica de desvitrificação ($-60\text{ }^{\circ}\text{C}$) em 5 s para imersão em LN2, 3,8 s para imersão em SR-LN2 e 3,4 s para imersão em SN2. A Tabela 4.1 mostra a comparação sumarizada das taxas de acordo com cada região analisada, para os 3 fluidos criogênicos, LN2, SR-LN2 e SN2.

Tabela 4.1. Taxas de resfriamento para diferentes faixas de temperatura em 3 diferentes fluidos criogênicos e amostra de glicerol em chip de PDMS.

Faixa de temperatura [°C]	Região analisada [-]	LN2 [°C/min]	SC-LN2 [°C/min]	SN2 [°C/min]
+ 20 → - 60	Início desvitrificação	1005,23	1422,46	1680,23
- 38 → - 137	(dT/dt_{cr} água pura)	1652,167	1756,306	2007,56
0 → -180	Início estabilização (global)	1186,563	1388,815	1590,326

Analisando as curvas de temperatura, percebe-se que a imersão direta em nitrogênio *Slush*, SN2, aumentou a taxa de resfriamento em 67,15% em relação ao LN2 na faixa de 20 a - 60 °C (critério de desvitrificação), de 1005,23 para 1680,23 °C/min.

A maior taxa de resfriamento alcançada foi na região de instabilidade termodinâmica, de 2007,56 °C/min para SN2. O nitrogênio subresfriado, SR-LN2 também foi mais eficiente que o LN2 em termos de taxa de resfriamento, com aumento de 41,5% (critério de desvitrificação). A taxa global (região de estabilização) teve os menores valores para a taxa de resfriamento do SR-LN2 e SN2, 1388,815 °C/min e 1590,326 °C/min, respectivamente. Isto ocorre, pois, seus valores podem sofrer influência do número de dados coletados na região de estabilização, diminuindo o valor da taxa de resfriamento lida nas curvas de temperatura.

4.3 TESTES COM MATERIAL BIOLÓGICO – SÊMEN

Os ensaios com sêmen foram conduzidos em duas baterias de testes, verificando a influência da concentração de CPA, tipo de processamento utilizado para classificação dos espermatozoides, e efeito da configuração do recipiente para alocação das amostras, quanto à taxa de resfriamento, viabilidade e motilidade,

4.3.1 Bateria de testes I – Sêmen

Para a primeira bateria de testes foi empregado o método de lavagem simples para separação do plasma seminal e seleção dos espermatozoides, com 0,25 M de sacarose diluído diretamente no meio de vitrificação (HTF). Foram utilizados criotubos de polipropileno ($v =$

0,5 ml) e dispositivos de PDMS ($v = 0,15$ ml), com espessura de 4 mm. O volume de teste para criopreservação foi de $150 \mu\text{L}$ para ambos os casos.

4.3.1.1 Avaliação Térmica

A Figura 4.14 mostra as curvas de temperatura da bateria de teste I, com imersão em LN2 e SN2

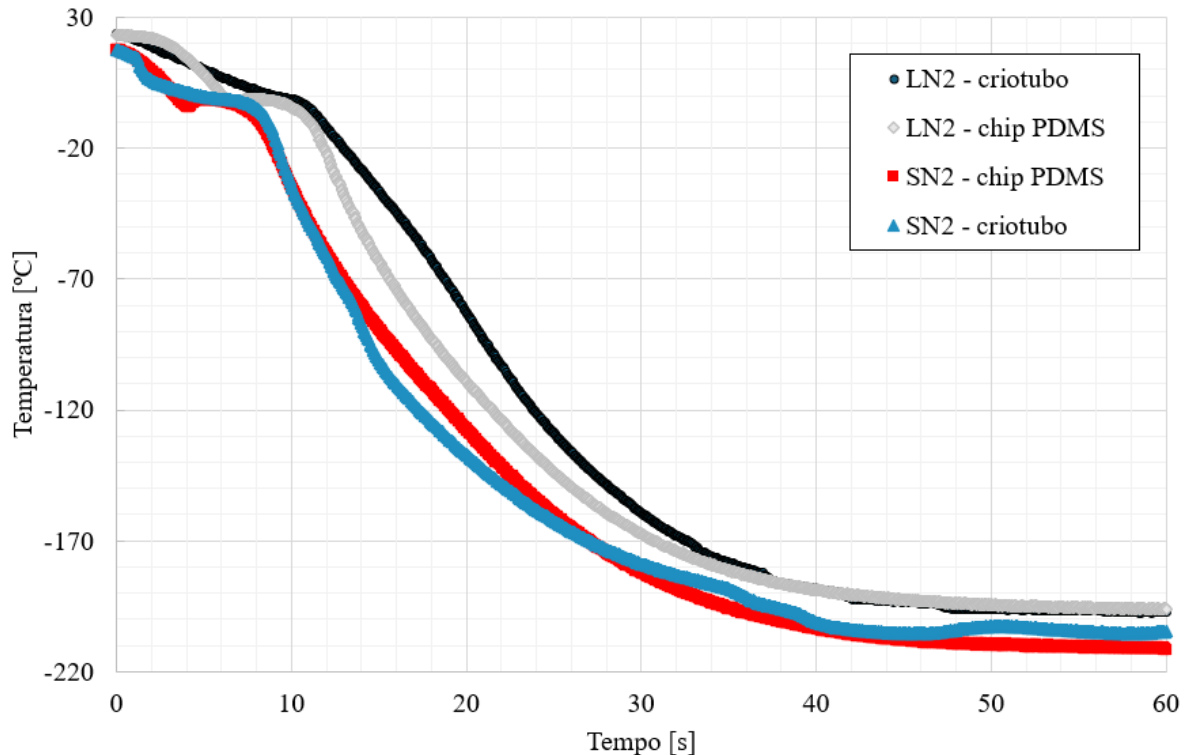


Figura 4.14 - Curvas de resfriamento dos testes de imersão em LN2 e SN2, com alocação da amostra em chip de PDMS e criotubo.

Tanto a imersão em SN2 como LN2 apresentaram um comportamento típico de cristalização/congelamento de água pura, com estabilização da curva na região próxima de 0°C , devido à baixa concentração de sacarose ($0,25$ M). Para a condição de imersão do criotubo em LN2, a amostra congelou completamente em $8,65$ s, comparado com $5,95$ s para chip de PDMS, uma diferença relativa de $45,4\%$. Já para imersão em SN2, o tempo foi de $4,7$ s para o criotubo e $3,4$ s para chip de PDMS, diferença de $38,2\%$. Comparando os meios de imersão, houve uma redução de $54,3\%$ no tempo de congelamento para o criotubo e $57,1\%$ para o chip de PDMS, quando utilizado o SN2. O fenômeno da cristalização pode ser visualizado também através da figura 4.15.

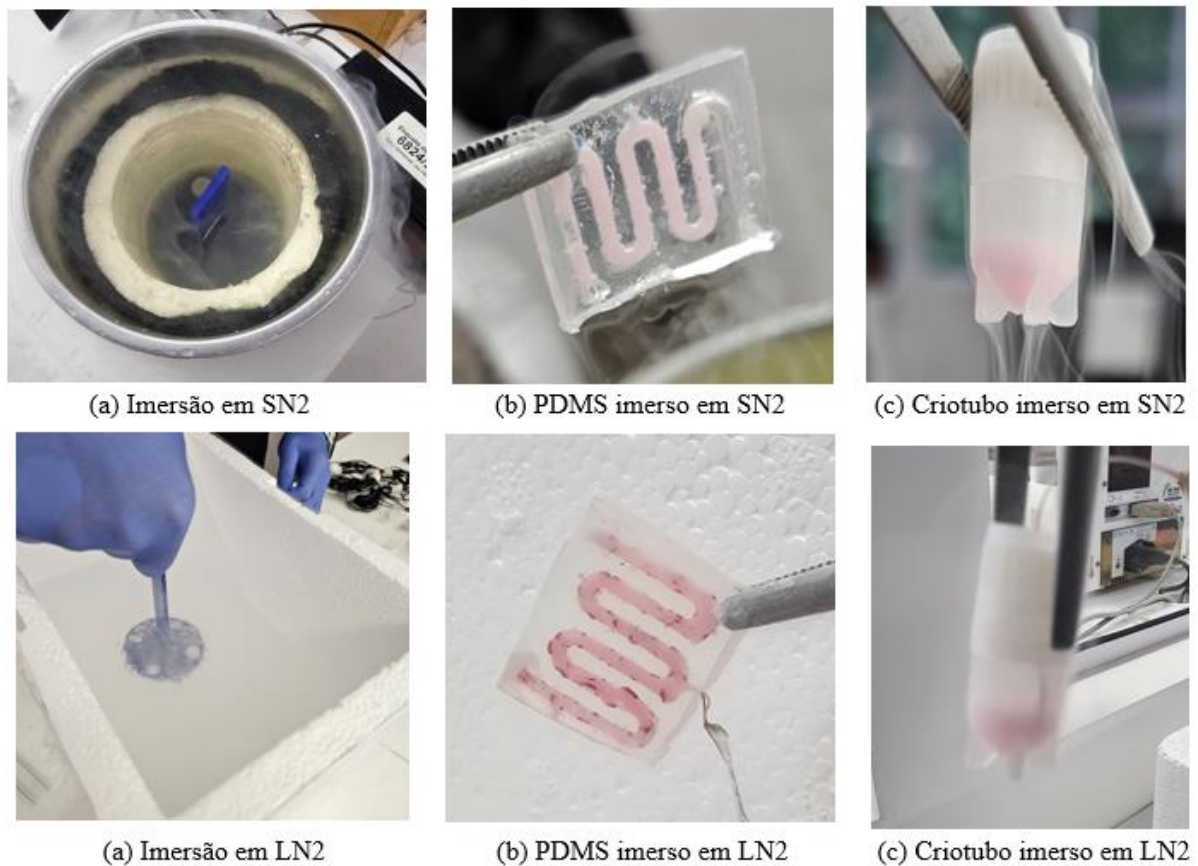


Figura 4.15 - Criopreservação das mostras de sêmen alocadas em criotubos e chips de PDMS, com imersão em LN2 e SN2.

Analisando a taxa global de resfriamento, o teste com criotubo imerso em LN2 atingiu uma taxa de 404,925 °C/min, comparado com 384,831 °C/min do chip de PDMS. Na imersão em SN2 o criotubo também teve uma taxa de resfriamento maior que o chip de PDMS, 419,794 °C/min e 415,438 °C/min, respectivamente. Os resultados estão coerentes com a física dos testes, onde a taxa de resfriamento dos dispositivos de PDMS foi prejudicada pela elevada espessura do mesmo, em torno de 4 mm, que além de possuir baixa condutividade térmica, sofreu consideravelmente o impacto do Efeito Leidenfronst. De modo geral, não se teve diferença significativa ao utilizar SN2 no lugar de LN2 quanto à taxa de resfriamento, nem em relação ao tipo de recipiente para alocação das amostras, dentro das configurações testadas.

4.3.1.2 Avaliação Biológica

As análises biológicas foram feitas quanto a viabilidade e motilidade dos espermatozoides, após 7 dias da criopreservação e armazenamento, seguindo os procedimentos

padrões estabelecidos pelo manual da OMS para vitrificação de sêmen (WHO, manual, 2021). Todos os testes de avaliação biológica foram realizados na empresa Hemocord, por uma equipe especializada. A Figura 4.16 mostra os gráficos de viabilidade e motilidade para a condição de amostra fresca (sêmen in natura), amostra concentrada (após processamento), e depois de descongelada.

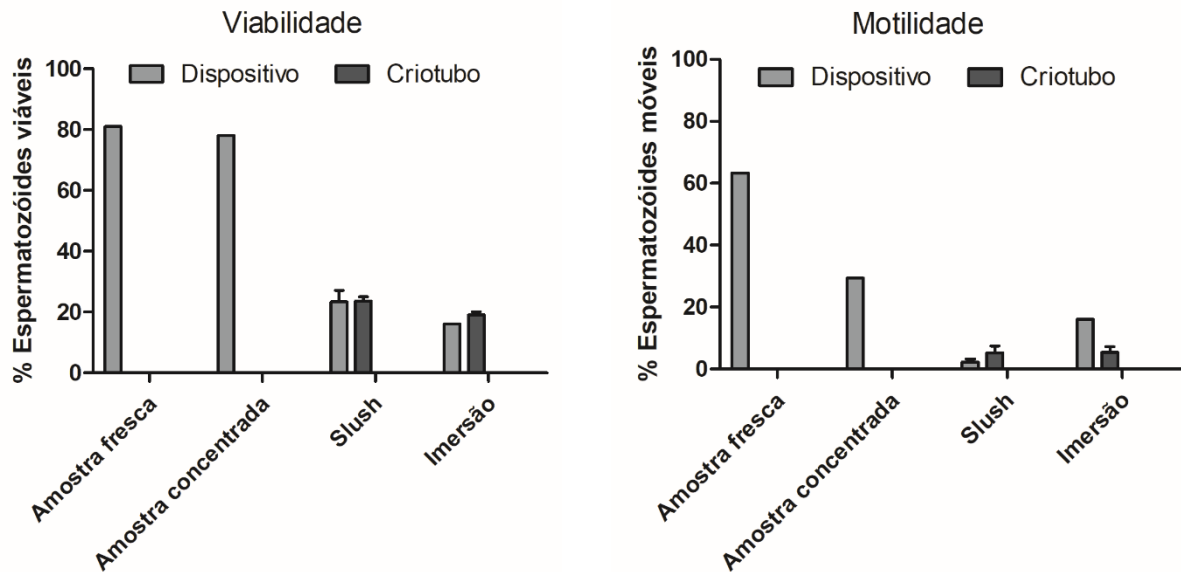


Figura 4.16 - Análise de viabilidade e motilidade após 1 semana de armazenamento.

O processamento para retirada do plasma seminal via centrifugação não alterou a viabilidade da amostra, reduzindo de 81% para 78% a quantidade de espermatozoides viáveis, bem acima do mínimo necessário recomendado pelo manual da OMS ($\geq 58\%$). No entanto, a motilidade foi fortemente influenciada pelo método de processamento de sêmen utilizado. A porcentagem de espermatozoides móveis, para a amostra fresca, foi de 63,4%, acima do mínimo necessário ($\geq 40\%$). Apesar de estar acima do valor de referência, é uma porcentagem baixa, o que indica que o tempo de processamento influenciou na motilidade dos espermatozoides. Após as centrifugações, a motilidade decaiu para 29,4%, mais da metade, indicando que a manipulação mecânica prejudicou a motilidade dos espermatozoides.

Analisando o meio de vitrificação, quanto à viabilidade, a imersão direta em SN2 resultou em maiores valores para a viabilidade dos espermatozoides quando comparada com a imersão em LN2. Para imersão com criotubo, foi obtido um valor de 25% para SN2 e 21% para LN2, e para imersão com chip de PDMS, 30% para SN2 e 17% para LN2, um aumento

significativo. Em relação à motilidade, tanto a imersão em SN2 como LN2 resultaram em baixos valores de espermatozoides móveis, na ordem de 3 – 16%.

Comparando a influência do tipo de recipiente utilizado na imersão, foi possível um incremento de 5% para a viabilidade utilizando PDMS, tanto para viabilidade como para motilidade. Existem duas hipóteses principais que podem esclarecer os baixos valores encontrados para viabilidade, e principalmente para motilidade. A primeira hipótese é referente ao tipo de processamento utilizado (lavagem simples) e ao tempo de processamento, que acabaram por estressar em excesso os espermatozoides devido a quantidade de manipulação mecânica empregada. A segunda hipótese, é devido à ocorrência da cristalização do sêmen, com concentração de 0,25 M de sacarose, não sendo suficiente para mitigar o avanço dos cristais de gelo na amostra, visto que em torno 50% do espermatozoide é constituído por água.

4.3.2 Bateria de Testes II

Na segunda bateria de testes foi empregado o método de *swim-up* para seleção dos espermatozoides mais aptos, com uma concentração de 4 M de sacarose. Estas concentrações foram definidas através de testes experimentais, de modo a definir qual a concentração mínima de CPA para alcançar a vitrificação. Igualmente na primeira bateria de testes, foram utilizados criotubos com volume de 0,5 ml e dispositivos PDMS com volume de 0,15 ml e espessura de 3 mm. O volume de testes foi de 150 µL.

4.3.2.1 Concentração mínima de CPA para Vitrificação

Como verificado nos testes iniciais, não foi possível vitrificar as amostras devido à baixa concentração de sacarose na solução de vitrificação. Deste modo, na bateria de testes II foi investigada qual a concentração mínima de sacarose diluída em HTF modificado que favorece a vitrificação da solução. Para tanto, foram testadas diferentes concentrações de CPA com valores de 1 – 5 M de sacarose. A espessura dos dispositivos foi reduzida para 3 mm, de modo a analisar a influência sobre a taxa de resfriamento e grau de cristalização. A figura 4.17 mostra a comparação do efeito da cristalização para cada concentração testada.

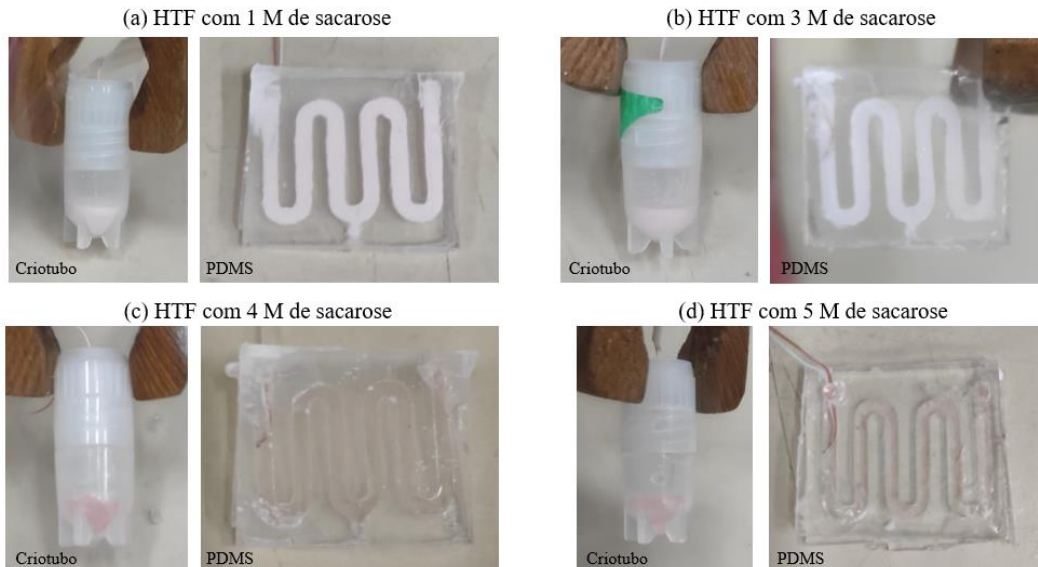


Figura 4.17 - Visualização da ocorrência da cristalização para as concentrações de 1 – 5 M de sacarose.

A concentração de 1 M de sacarose cristalizou totalmente, a concentração de 3 M teve um leve grau de vitrificação, quanto que as concentrações de 4 e 5 M vitrificaram completamente. Assim, a concentração escolhida para a bateria de testes II foi a de 4 M de sacarose, devido ao potencial de vitrificação, menor viscosidade que a concentração de 5 M, o que favorece o preenchimento da amostra dentro do chip de PDMS. A Figura 4.18 mostra a comparação das curvas de resfriamento do chip de PDMS e do criotubo para a concentração de 4 M de sacarose, imersas em LN2.

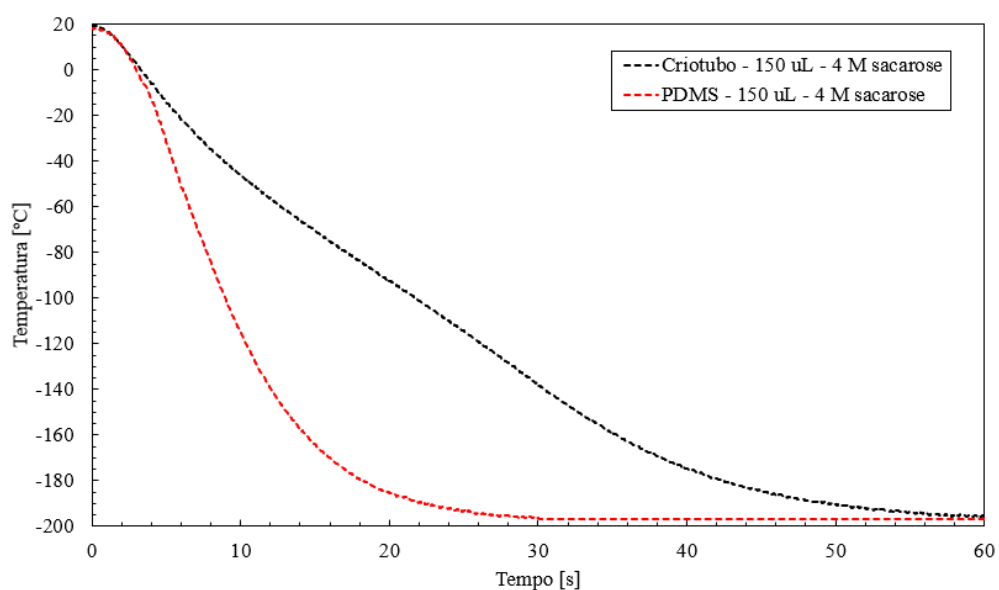


Figura 4.18 - Curvas de resfriamento para concentração de 4 M de sacarose, alocadas em criotubo e chip de PDMS, com imersão em LN2.

Utilizando a configuração do chip de PDMS com 3 mm de espessura foi possível incrementar a taxa de resfriamento em 228,6% ($280,47 \rightarrow 921,52 \text{ } ^\circ\text{C}/\text{min}$) quando comparada à imersão com criotubo (zona crítica $-38^\circ\text{C} \rightarrow -137^\circ\text{C}$), e 155,8% para a taxa de resfriamento global ($0 \text{ } ^\circ\text{C}$ até 180°C), incrementando de $276,12 \text{ } ^\circ\text{C}$ (criotubo) para $706,23 \text{ } ^\circ\text{C}/\text{min}$ (PDMS).

4.3.2.2 Influência da Espessura do PDMS na Taxa de Resfriamento

Conforme visualizado na seção anterior, reduzindo de 4 para 3 mm a espessura do chip de PDMS foi possível incrementar em 83,5% a taxa de resfriamento global ($384,83 \text{ } ^\circ\text{C}/\text{min} \rightarrow 706,23 \text{ } ^\circ\text{C}/\text{min}$). Logo, foi testada a configuração com apenas 2 mm de espessura, com as curvas de temperatura disponíveis na Figura 4.19.

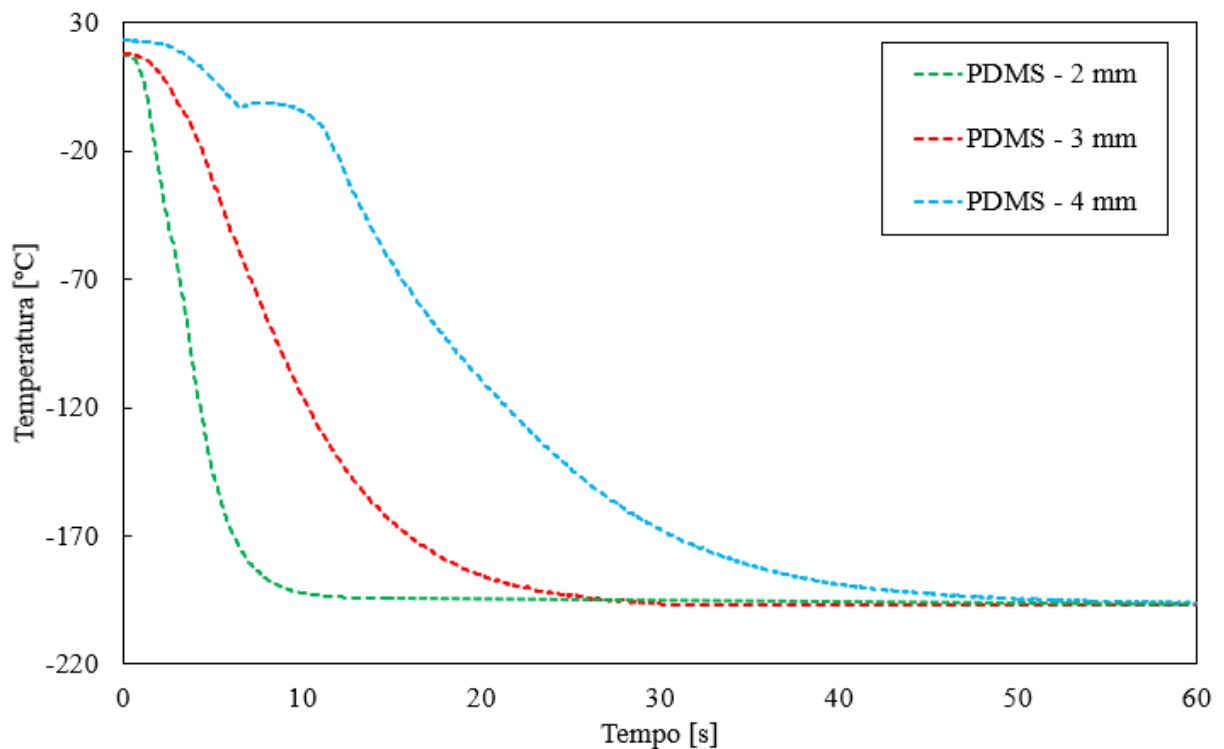


Figura 4.19 - Efeito da espessura do chip de PDMS na taxa de resfriamento, com imersão em LN2.

Reduzindo a espessura do dispositivo para 2 mm, foi possível atingir uma taxa de $2371,34 \text{ } ^\circ\text{C}/\text{min}$, referente a região de instabilidade termodinâmica, e de $1900,72 \text{ } ^\circ\text{C}/\text{min}$ para a taxa de resfriamento global. Comparando com os demais dispositivos, foi possível um incremento de 169,14% em relação ao chip de 3 mm ($706,23 \text{ } ^\circ\text{C}/\text{min} \rightarrow 1900,72 \text{ } ^\circ\text{C}/\text{min}$) e de

394% quando comparado com o chip mais grosso de 4 mm ($384,83 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min} \rightarrow 1900,72 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$). Assim, os testes com sêmen foram realizados utilizando o chip de PDMS com 2 mm de espessura.

4.3.2.3 Avaliação Térmica

A segunda etapa de testes utilizando sêmen foi realizada com concentração de CPA de 4 M de sacarose e volume de teste de $150 \text{ } \mu\text{L}$. Foi investigada a influência da nova configuração de recipiente, comparando os criotubos com os chips de PDMS de 2 mm de espessura. As imersões foram feitas tanto em LN2 como SN2. A Figura 4.20 mostra as curvas de temperatura da bateria de testes II.

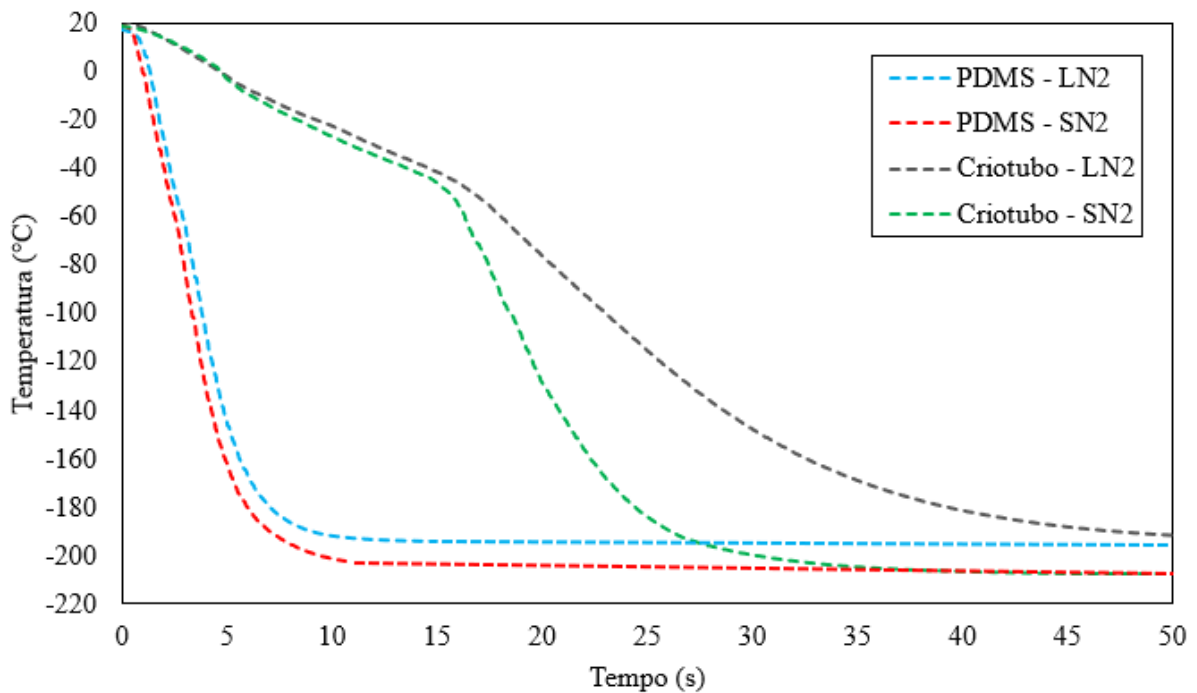


Figura 4.20 - Efeito do recipiente e do meio de imersão nas curvas de resfriamento utilizando sêmen como amostra, com concentração de 4 M de sacarose e volume de $150 \text{ } \mu\text{L}$.

Em termos gerais, o acondicionamento do sêmen em dispositivos de PDMS com 2 mm de espessura aumentou em mais de 6x a taxa de resfriamento global, quando comparada com criotubo imerso em LN2 ($311,24 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min} \rightarrow 1900,72 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$). Para imersão em SN2, a taxa global foi aumentada em aproximadamente 4x ($548,10 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min} \rightarrow 2179,55 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$). O tempo para estabilização da temperatura da amostra com o meio de resfriamento foi menor que 10 s

para os chips de PDMS, para imersão em LN2 e SN2, enquanto para os criotubos foi de aproximadamente 35 s para imersão em SN2, e mais de 50s quando imersos em LN2. A tabela 4.2 mostra a sumarização das taxas de resfriamento

Tabela 4.2 - Taxas de resfriamento obtidas para amostras de sêmen imersas em LN2 e SN2, alocadas em chips de PDMS e criotubos.

Faixa de temperatura [°C]	LN2 [°C/min]		SN2 [°C/min]	
	Criotubo	PDMS	Criotubo	PDMS
- 38 → - 137	422,80	2371,34	781,07	2643,39
0 → -180	311,24	1900,72	548,10	2179,55

A utilização do SN2 incrementou a taxa de resfriamento global dos chips de PDMS de 1900,72°C/min (LN2) para 2179,55 °C/min (SN2), enquanto a taxa na zona termodinamicamente afetada aumentou de 2371,34 °C/min para 2643,39 °C/min. O slush também elevou as taxas de resfriamento das amostras quando imersas em criotubos, de 311,24°C/min para 548,10 °C/min, em termos globais, e um aumento de 422,80°C/min para 781,07 °C/min, na região de instabilidade termodinâmica.

A avaliação do processo de criopreservação quanto ao sucesso da vitrificação/cristalização pode ser visualizada através da Figura 4.21.

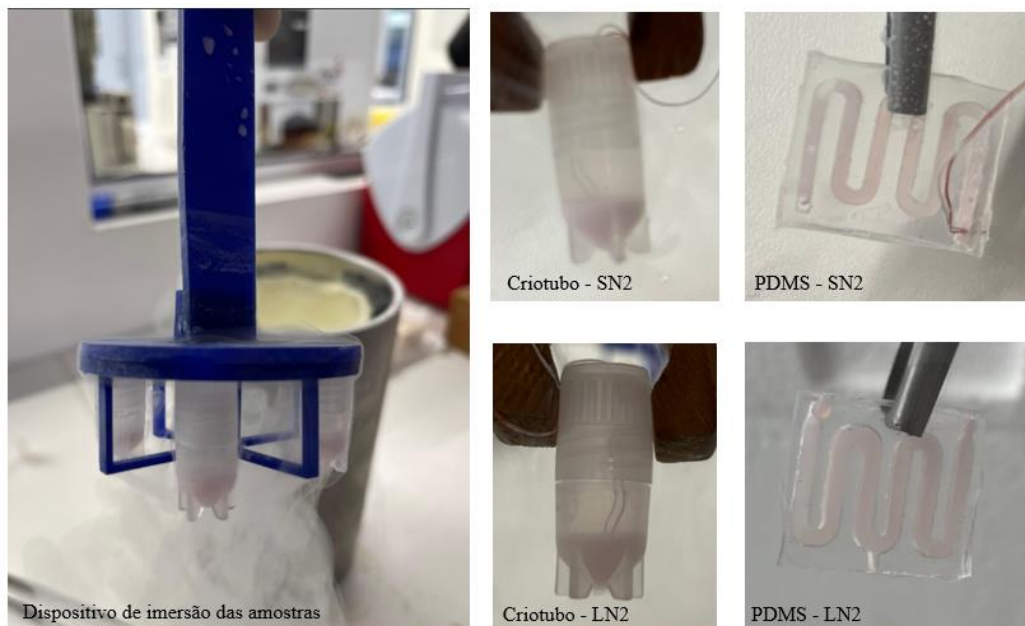


Figura 4.21 – Processo de criopreservação das amostras de sêmen quando imersas em LN2 e SN2, alocadas em criotubo e chip de PDMS, com concentração de 4 M de sacarose.

Mesmo com uma concentração de 4 M de sacarose, quando adicionado o sêmen, a solução teve ocorrência de cristalização. Quando utilizado os chips de PDMS, foi verificado um leve grau de cristalização, resultando em uma aparência semitranslúcida, conforme observado na figura 4.21. Já para os criotubos, a cristalização foi total, com aparência opaca. Esta cristalização parcial não era prevista, visto que foi avaliada previamente a concentração mínima para garantir a vitrificação completa. No entanto, não foi considerada a parcela de água que o sêmen carrega consigo, em torno de 50% de sua constituição, resultando em um grau de cristalização leve/moderado.

4.3.2.4 Avaliação Biológica

A segunda etapa de testes avaliou o método de processamento de *swim-up* com 4 M de sacarose. As análises biológicas foram feitas quanto a concentração, viabilidade e motilidade dos espermatozoides, após 3 dias da criopreservação e armazenamento, seguindo os procedimentos padrões estabelecidos pelo manual da OMS para vitrificação de sêmen (WHO, manual, 2021). A Figura 4.22 mostra os gráficos de concentração para a condição de amostra fresca (sêmen in natura), amostra concentrada (após processamento), e depois de descongelada.

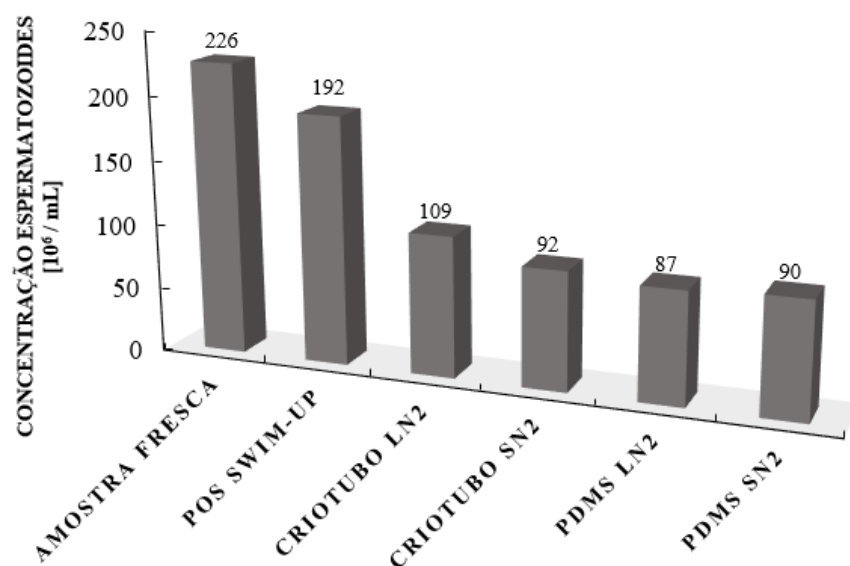


Figura 4.22 – Concentração de espermatozoides processados via *swim-up* com 4 M de sacarose.

A concentração de espermatozoides, ficou acima do mínimo recomendado pelo manual da OMS ($\geq 15 \times 10^6$ espermatozoides por ml de sêmen) para todos os casos. A concentração da amostra fresca foi de 226×10^6 para amostra fresca e 192×10^6 após processamento swim-up, evidenciando que o método não afetou a concentração espermática. Analisando o pós descongelamento, a concentração se manteve alta, sendo 109×10^6 para o criotubo imerso em LN2 e 92×10^6 para imersão em SN2. Para os chips de PDMS as concentrações encontradas foram de 87×10^6 para imersão em LN2 e 90×10^6 espermatozoides por ml, para imersão em SN2. Estes resultados mostram que os recipientes utilizados para imersão das amostras não impactaram significativamente a concentração, ou seja, não se perdeu espermatozoides após o descongelamento.

Em relação à viabilidade, figura 4.23, para amostra fresca, foi encontrado um valor relativamente baixo, de 60%, no limite do padrão estabelecido no manual da OMS ($\geq 58\%$). Após o processamento via método swim-up com 4 M de sacarose, a viabilidade decaiu para apenas 6%. Estes baixos valores de viabilidade podem ser explicados pela alta concentração de sacarose, que apesar de favorecer a vitrificação, acabou por desidratar em excesso os espermatozoides, devido ao método de processamento utilizado, em que as amostras ficam encubadas por um período de 1 hora. Como consequência, após o descongelamento, a viabilidade caiu para zero, tanto para criotubo como PDMS, independente do meio de imersão.

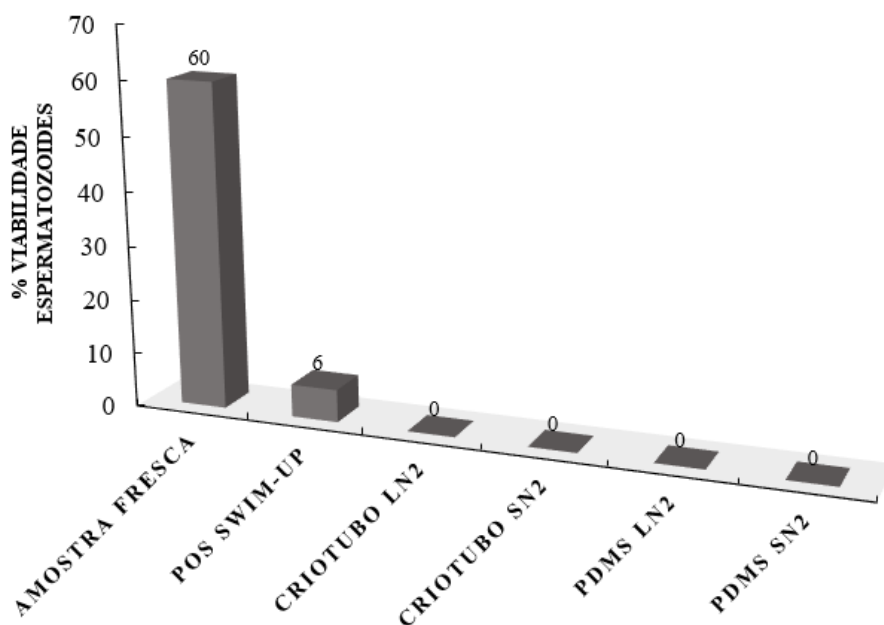


Figura 4.23– Viabilidade dos espermatozoides processados via *swim-up* com 4 M de sacarose.

Na mesma lógica dos resultados de viabilidade, a motilidade também decaiu para zero após descongelamento, vide Figura 4.24. A amostra fresca apresentou uma motilidade média de 50,45%, acima do mínimo descrito no manual da OMS ($\geq 40\%$). No entanto, após processamento, a motilidade dos espermatozoides diminuiu para zero, indicando que o tempo de processamento, bem como a alta concentração de CPA, foram fatores decisivos para esta redução drástica.

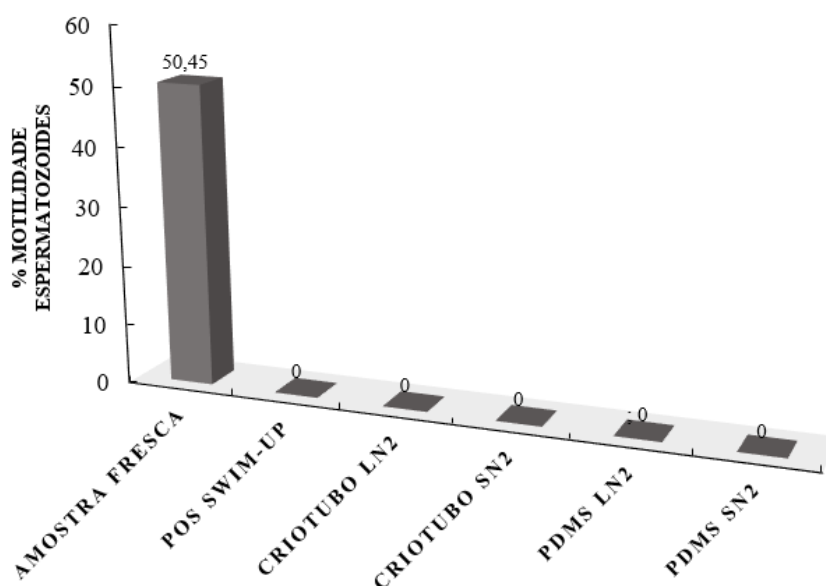


Figura 4.24 – Motilidade dos espermatozoides processados via *swim-up* com 4 M de sacarose.

Estes resultados evidenciam a importância da utilização de mais de um tipo de CPA (intracelular e extracelular), somados em baixas concentrações, como é o caso do meio comercial para vitrificação de oócitos e embriões, da marca FUJIFILM Irvine Scientific® tendo como agentes crioprotetores o DMSO (20% v/v), o etileno glicol (20% v/v) de etileno glicol e 0,5 M de sacarose, resultando em aproximadamente 50% de concentração total de CPA (SPECTRUN, 2024). Esta concentração vai de acordo com os testes de vitrificação realizados neste trabalho, onde a sacarose, o DMSO e o glicerol vitrificaram com concentrações próximas de 50%. Logo, não basta apenas utilizar a concentração recomendada no manual da OMS, que é de 0,5 M de sacarose, visto que a depender do tipo de recipiente utilizado, a amostra irá cristalizar.

Em parâmetros gerais, os resultados deste trabalho vão de acordo com o encontrado por Lee et al. (2019), que realizaram a comparação do processo de vitrificação com o congelamento convencional, em termos de viabilidade, motilidade e morfologia. A vitrificação foi feita depositando uma gota com volume de 30 μ L diretamente no nitrogênio líquido. O congelamento

convencional foi feito através de criorefrigeradores programáveis, com taxa de resfriamento de 20 °C/min até uma temperatura de -90°C, com posterior imersão dos criotubos (1,8 ml) diretamente no LN2 abaixo desta temperatura. Para ambos os casos, foi utilizado um meio comercial de vitrificação (Vitrolife®), na concentração de 1:1 com o sêmen. Os autores encontraram valores baixos de motilidade, em torno de 8 – 14% após descongelamento, indicando que a manipulação mecânica dos espermatozoides afeta consideravelmente a motilidade dos mesmos. O processo de vitrificação diminuiu levemente a porcentagem de espermatozoides viáveis quando comparado com a não vitrificação, reduzindo de 55% para 41% a viabilidade. Em relação ao processamento, os autores verificaram o processo de lavagem dos espermatozoides pode melhorar os parâmetros espermáticos pós-descongelamento.

Zhu et al. (2014), estudaram o método de congelamento por imersão de criotubos, comparando o volume (0,5 ml e 2 ml), procedimento de imersão (rápido e lento) e concentração de CPA (0,15 – 0,3 M de sacarose). Para o volume e 2 ml, as amostras foram preparadas com um meio de vitrificação comercial, na razão de 1:2, processadas através do método *swim-up*. O congelamento foi realizado inicialmente em vapor de LN2, durante 30 min, e logo após, realizando a imersão diretamente em LN2. Para o volume de 0,5 ml, as amostras foram diluídas na proporção de 1:1 com o meio de vitrificação, também processadas pelo método *swim-up*, porém com imersão direta em LN2. A melhor configuração encontrada em termos de viabilidade foi para imersão direta em LN2, com volume de 0,5 ml, preparado com 0,2 M de sacarose, aumentando a viabilidade de 35,9% para 53,7%. Para a motilidade, não teve diferença significativa, variando de 58,5% - 54,2%

Rahiminia et al. (2017) compararam 4 métodos de criopreservação, sendo imersão direta em LN2, imersão em vapor de LN2 e superfície sólida. Os autores utilizaram palhetas com volume de 0,25 ml, processamento via *swim-up*, utilizando um meio comercial para vitrificação na proporção de 1:1 com 0,5 M de sacarose. O processo de imersão direta resultou em 39,9% de motilidade e 65,5% de viabilidade. A imersão em vapor teve 28,8% de motilidade e 49,8% de viabilidade. A vitrificação por superfície sólida resultou em 33,6% de motilidade e 58,3% de viabilidade.

Huang et al. (2020), conseguiram resultados promissores quanto à motilidade e viabilidade de sêmen utilizando uma mistura de métodos, onde pequenas gotículas com volume de 2 µL foram inseridas em palhetas de 0,25 ml, que são inseridas novamente dentro de outra palheta de 0,5 ml. Os autores conseguiram incrementar a viabilidade em torno de 37,63% e até 38,17% para a motilidade das amostras espermáticas, quando comparadas com o método de congelamento lento, realizado por criorefrigerador programável a uma taxa de 0,5 °C/min.

O'Neil et al. (2019) desenvolveram uma adaptação ao método de imersão direta de gotas, onde gotas com volume de 20 μL são depositadas diretamente em LN2. Os autores testaram diferentes condições de processamento, utilizando o método de gradiente de densidade, obtendo os melhores resultados utilizando 0,3 M de sacarose. A motilidade alcançada via vitrificação foi aproximadamente 42% maior em relação ao congelamento tradicional, com valores de 30,1% e 21,2%, respectivamente. A viabilidade também foi maior para as amostras vitrificadas, aproximadamente 1,4 vezes, diminuindo a fragmentação do DNA de 25,5% para 18,1%.

Percebe-se então que os métodos de imersão direta, seja através de criotubos, palhetas, gotas ou dispositivos, podem manter a integridade dos espermatozoides, desde que, feitos os ajustes necessários no método de processamento, taxa de resfriamento, volume da amostra e concentração de CPA. Neste contexto, este trabalho avaliou diferentes condições para criopreservação de sêmen, como método de processamento e congelamento, tipo de recipiente para imersão, volume da amostra e concentração de CPA.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho foram desenvolvidos dois métodos comumente utilizados para criopreservação de sêmen, sendo o método de vitrificação por imersão direta e o método de vitrificação de gotículas por contato. Foi conduzida uma investigação experimental e numérica, através do projeto e construção de bancadas e equipamentos, simulações computacionais, avaliação e proposição de metodologias. Também foram realizados testes utilizando sêmen, avaliando a influência do método de processamento, concentrações de CPA e do recipiente de alocação da amostra, quanto à taxa de resfriamento, viabilidade e motilidade.

Quanto ao método de vitrificação de gotas por contato, investigou-se o comportamento do avanço da solidificação, taxas de resfriamento, ângulo de contato, geometria e material da superfície de resfriamento. Verificou-se que quanto maior o ângulo de contato, menor será a taxa de transferência de calor entre o substrato e a gota, consequentemente, reduzindo a taxa de resfriamento, favorecendo o aparecimento e avanço da cristalização. Através da abordagem numérica-experimental utilizada foi possível investigar o processo de congelamento das gotas, avaliando a taxa e o avanço da cristalização, estudando a dinâmica da interface líquido-sólido durante o processo de formação dos cristais de gelo, onde a cristalização cresce verticalmente, com oscilações na fase líquida ao longo do tempo. Também foram investigadas as flutuações hidrodinâmicas atuantes na interface gota-substrato durante o processo de congelamento, provenientes do Efeito Leidenfrost.

Foi possível simular o processo de congelamento até o ponto de solidificação, que envolve apenas transferência de calor sensível, com precisão de 97,4%. Após isto, o modelo matemático utilizado pelo software fluent® para modelar o processo de mudança de fase não consegue representar com acurácia os parâmetros físicos, visto que o modelo considera que 100% da fase sólida é cristal de gelo, sem levar em consideração porções vitrificadas.

A influência da geometria e do material da superfície de resfriamento foi investigada experimentalmente e numericamente. Geometrias como uma cavidade, por terem maior área de contato, aumentam a troca térmica entre a gota e o substrato, para um mesmo volume, aumentando a taxa de resfriamento em até 88,6% quando comparada com deposição de uma gota sobre superfície plana. Comparando o material do substrato, utilizando o cobre foi possível incrementar a taxa de resfriamento em até 174% quando comparado com o substrato de latão. No geral, para uma gota de água, com volume de 25 μL , foi possível alcançar taxas de resfriamento de 1836,36 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ para deposição sobre superfície plana (cobre), e de 3462,86 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ para deposição em cavidade (cobre).

Quando ao método de vitrificação por imersão direta, foi investigada a influência do meio de resfriamento, comparando a imersão em nitrogênio líquido (LN2) com slush de nitrogênio (SN2). Também foi avaliado o efeito do tipo de recipiente para alocação das amostras, comparando criotubos com chips de PDMS, comparando diferentes concentrações de CPA e o impacto do volume no processo de criopreservação.

Foram avaliados dois volumes de amostra, sendo 1 ml e 0,5 ml, alocadas em criotubos, com imersão em LN2 e SN2. Também foi investigado o tipo e percentual de CPA, nas concentrações de 10%, 30% e 50%, para sacarose, glicerol e DMSO. Para a concentração de 50%, foi possível vitrificar todas as amostras, com efeito significativo do tipo de CPA na taxa de resfriamento. Já para as concentrações de 30% e 10% não foi possível vitrificar nenhuma amostra.

Em relação ao meio de imersão, o SN2 não apresentou vantagem significativa em termos de taxa de resfriamento em comparação ao LN2, apenas para o tempo de congelamento da amostra. Ao reduzir o volume de amostra para 0,5 ml, o efeito do nitrogênio slush se tornou mais significativo, reduzindo o tempo de congelamento em até 43% e incrementando a taxa de resfriamento em até 67%. Também foi realizada uma validação numérico-experimental, com precisão de 98,2%, corroborando com os resultados previamente obtidos, em que o modelo matemático utilizado pelo fluent® consegue prever com acurácia os mecanismos do método de imersão direta, considerando congelamento pleno. Os resultados encontrados vão de encontro com o enunciado da probabilidade de vitrificação, proposto por Yavin e Arav (2007), onde quanto maior a taxa de resfriamento, maior a viscosidade e menor o volume da amostra, maior será a chance de vitrificar uma solução.

De maneira análoga às investigações com criotubos, foi estudado o método de imersão direta utilizando chips de PDMS, com volume de 150 μ L, investigando a espessura ideal dos chips de PDMS, de modo a obter a maior taxa de resfriamento possível, sem comprometer a integridade da amostra. Foram testadas três espessuras de chips, com 2 mm, 3 mm e 4 mm. Reduzindo de 4 para 3 mm a espessura do chip de PDMS foi possível incrementar em 83,5% a taxa de resfriamento global, e reduzindo para 2 mm, foi possível um incremento na taxa de resfriamento de 169,14% em relação ao chip de 3 mm, atingindo 2371,34 $^{\circ}$ C/min para imersão em LN2. Em relação ao meio de resfriamento, foi observado que quanto menor a espessura do dispositivo, maior será o efeito do SN2 no incremento da taxa de resfriamento, com taxa de resfriamento de 2643,39 $^{\circ}$ C/min.

Para realização dos testes com sêmen, foi investigada qual a concentração mínima de CPA que promove a vitrificação da amostra. Foram testadas concentrações de 1 – 5 M de

sacarose diluída diretamente em HTF, resultando em uma concentração ótima de 4 M. No entanto, ao adicionar sêmen, as propriedades do meio mudam consideravelmente, resultando em uma cristalização leve/moderada, devido à composição do sêmen, em torno de 50% de água.

As análises biológicas foram feitas quanto à viabilidade e motilidade dos espermatozoides, comparando a concentração de CPA e o método de processamento. A concentração de 0,25 M de sacarose foi processada através do método de lavagem simples, e a solução com 4 M de sacarose através do método *swim-up*. Para a concentração de 0,25 M, o processamento para retirada do plasma seminal via centrifugação não alterou a viabilidade da amostra, reduzindo de 81% para 78% a quantidade de espermatozoides viáveis. No entanto, a motilidade foi reduzida de 63,4% para 29,4%, indicando que a manipulação mecânica prejudicou a motilidade dos espermatozoides.

A utilização do chip de PDMS juntamente com o meio slush aumentou a viabilidade da amostra seminal, subindo de 25% para 30%, comparado com imersão de criotubos em LN2. Em relação à motilidade, tanto a imersão em SN2 como LN2 resultaram em baixos valores de espermatozoides móveis, na ordem de 3 – 16%. Isto pode estar relacionado a três fatores, como manipulação mecânica excessiva, cristalização da amostra (rompimento da célula) e tempo de processamento demorado.

Já para as amostras processadas pelo método *swim-up* com 4 M de sacarose, o meio de imersão e o recipiente não impactaram significativamente a concentração, ou seja, não se perdeu espermatozoides após o descongelamento. A viabilidade foi de apenas 6% após o processamento, e de zero após descongelamento. Já a motilidade, decaiu para zero logo após o processamento, indicando que a elevada concentração de sacarose, apesar de favorecer a vitrificação, acabou por desidratar em excesso os espermatozoides, devido ao contato prolongado do método *swim-up*.

A partir do exposto, este trabalho buscou avaliar diferentes condições e parâmetros de testes para aplicações de criopreservação de material biológico, corroborando para o aprimoramento e desenvolvimento de novos métodos e protocolos, especialmente para aplicações de vitrificação de sêmen. A promoção de mais pesquisas neste segmento é de extrema importância devido ao grande impacto social resultante, pois abrange milhões de pessoas no mundo todo que sofrem atualmente com algum tipo de problema de fertilidade. A partir dos resultados aqui apresentados, espera-se que mais avanços possam acontecer na área de bioengenharia, criopreservação e reprodução assistida.

REFERÊNCIAS

AKIYAMA, Y. et al. Cryoprotectant-free cryopreservation of mammalian cells by superflash freezing. **PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA**, v. 116, n. 16, p. 7738–7743, 2019.

ALI, J.; SHELTON, J. Development of vitrification solutions. *In*: TUCKER, M.J.; LIEBERMANN, J. **Vitrification in Assisted Reproduction**. Reino Unido: Informa Healthcare, 2007. p. 45-64. ISBN 978-0-415-40882-0.

ALIZADEH, |M., SHAHAVI, M.H., GANJI, D.D. Performance enhancement of nano PCM solidification in a hexagonal storage unit with innovative fin shapes dealing with time-dependent boundary conditions. *Energy Reports* v.8, p.8200–8214, 2022.

Associação Brasileira de Reprodução Assistida (SBRA). Notícias. *In*: Informação é saúde: junho, mês de conscientização da infertilidade. Disponível em: <https://sbra.com.br/noticias/informacao-e-saude-junho-mes-de-conscientizacao-da-infertilidade>.

BAGIS, H. et al. Production of transgenic mice from vitrified pronuclear-stage embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 61, n. 2, p. 173–179, 2002.

BAHARI, L. et al. Directional freezing for the cryopreservation of adherent mammalian cells on a substrate. **Plos One**. p. 1–17, 2018.

BAKER M.J., DENTON T.T., HERR C. An explanation for why it is difficult to form slush nitrogen from liquid nitrogen used previously for this purpose. **Cryobiology**, v.66, p. 43–46, 2013.

BANERJEE, K.; SIGLA, B. Procedure in Assisted Reproductive Technology. *In*: PATEL, N.H.; ESTEVES, S.C. **Advances in Assisted Reproductive Technology**. Londres: Jaypee, 2020. p. 114-120. ISBN 9789388958998.

BEHR, B.; SHU, Y. Cryopreservation of pronuclear stage human embryos. *In*: CHIAN, R-C.; QUINN, P. **Fertility Cryopreservation**. New York: Cambridge University Press, 2010. p. 76-88. ISBN 978-0-521-51778-2.

BOURTON, P. Comparison with the theory of kinetics and extend of ice crystallization and of the glass-forming tendency in aqueous cryoprotective solutions. **Cryobiology**. v. 23, p. 88-102, 1986.

BOURTON, P. Glass-Forming Tendency and Stability of the Amorphous State in Solutions of a 2,3 Butanediol Containing Mainly the Levo and Dextro Isomers in Water, Buffer, and Euro-Collings. **Cryobiology**. v. 30, p. 86-97, 1993.

BRUGGELLER, Peter; MAYER, Erwin. Complete Vitrification in Pure Liquid Water and Dilute Aqueous Solution. **Nature**. v. 288, p. 569-571, 1980.

BUNGE, R. G.; KEETTEL, W. C.; SHERMAN, J. K. Clinical use of frozen semen: report of four cases. **Fertility and sterility**, v. 5, n. 6, p. 520–529, 1954.

CELIK, I. B. et al. Procedure for estimation and reporting of uncertainty due to discretization in CFD applications. **Journal of Fluids Engineering, Transactions of the ASME**, v. 130, n. 7, p. 0780011–0780014, 2008.

CHAKRAVARTY B.N., BIWAS A., KALAPAHAR S. The Male Gamete: A Unique Cell. *In*: MUKHERJEE, G.G., KHASTGIR, G., CHATTOPADHYAY, R. **Practical Guide in Andrology and Embryology**. New Delhi: Jaypee Brothers Medical Publishers, 2018, p. 291-303. ISBN 9789352704859.

CHIMOTE, N. et al. Semen Banking. *In*: TANDULWADKAR, S.R. **The art and science of assisted reproductive technology**. New Delhi: Jaypee Brothers Medical, 2015, p.364-375. ISBN 9789351524755.

FAHY, G.M.; RALL, W.F. Vitrification: an overview. *In*: TUCKER, M.J.; LIEBERMANN, J. **Vitrification in Assisted Reproduction**. Reino Unido: Informa Healthcare, 2007. p. 1-20. ISBN 978-0-415-40882-0.

FAHY, G.M. Overview of biological vitrification. *In*: TUCKER, M.J.; LIEBERMANN, J. **Vitrification in Assisted Reproduction**. New York: CRC Press, 2016. p. 1-22. ISBN 978-1-4822-4258-4.

FAHY, G.M.; WOWK, B. Principles of Cryopreservation by Vitrification. *In*: WOLKERS, W.F.; OLDENHOF, H. **Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols**. New York: Humana Press. 2015, p. 21-82. ISBN 978-1-4939-2192-8.

FUKUSAKO, S. Thermophysical Properties of Ice, Snow, and Sea Ice. *International Journal of Thermophysics*, v.11(2), p.353-372, 1990.

HAN, X. et al. Investigations on the heat transport capability of a cryogenic oscillating heat pipe and its application in achieving ultra-fast cooling rates for cell vitrification cryopreservation. **Cryobiology**, v. 56, n. 3, p. 195–203, 2008.

HUANG, W. et al. Sequential interval micro-droplet loading in closed hemi-straw carrier system: A convenient and efficient method for ultra-rapid cryopreservation in extreme oligozoospermia. **Cryobiology**, v. 93, p. 75–83, 2020.

ISACHENKO, E. et al. Vitrification Technique - New Possibilities for Male Gamete Low-Temperature Storage. **Current Frontiers in Cryobiology**, 2012.

JONG, K. S. et al. The impact of cryoprotective media on cryopreservation of cells using loading trehalose. **Cryobiology**, v. 92. p. 258-259, 2020.

JÚNIOR, L. L. Z. et al. Cryopreservation at $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ of *Agaricus subrufescens* on wheat grains with sucrose. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 49, n. 2, p. 370–377, 2018.

KUWAYAMA, M.; VAJTA, G.; IEDA, S.; KATO, O. Comparison of open and closed methods for vitrification of human embryos and the elimination of potential contamination. **Reproductive BioMedicine** (Online), v 11(5), p.608–614, 2005.

LE, M. T. et al. Cryopreservation of human spermatozoa by vitrification versus conventional rapid freezing: Effects on motility, viability, morphology, and cellular defects. **European Journal of Obstetrics and Gynecology and Reproductive Biology**, v. 234, p. 14–20, 2019.

LEE, D.R., et al. Effect of using slush nitrogen (SN2) on development of microsurgically manipulated vitrified/warmed mouse embryos. **Human Reproduction**, v.22(9), p.2509-2514, 2007.

LI, Y. et al. Microencapsulation Facilitates Low-Cryoprotectant Vitrification of Human Umbilical Vein Endothelial Cells. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 5, p. 5273–5283, 2019.

MARCHESI, R.; MAFFÈ, M.; MORASCHI, M. Computational fluid dynamics analysis of cell cooling process. **Cell Preservation Technology**, v. 3, n. 4, p. 229–237, 2005.

MARIA, A. N. et al. Use of cryotubes for the cryopreservation of tambaqui fish semen (*Colossoma macropomum*). *Cryobiology*, v. 70, n. 2, p. 109–114, 2015.

MEHTA, R. H. Cryopreservation in ART. *In*: PATEL, N. H.; ESTEVES, S. C. **Advances in Assisted Reproductive Technology**. Londres: Jaypee, 2020. p. 299-306. ISBN 9789388958998.

MENON, P.; D'SOUZA, C.R. Cryopreservation of Semen Samples. *In*: GARCIA-VELASCO J.A.; BANKER, M.; PALACIOS I. R.; ZAPATA J.H. **Infertility Management Series: Basic Laboratory Procedure in ART**. Londres: Jaypee, 2018. p. 27-47. ISBN 9789352700615.

MOMOZAWA, K. et al. A new vitrification device that absorbs excess vitrification solution adaptable to a closed system for the cryopreservation of mouse embryos. **Cryobiology**, v. 88, p. 9–14, 2019.

NAKAYAMA, K. et al. Silk fibroin sheet multilayer suitable for vitrification of in vitro-matured bovine oocytes. **Theriogenology**. v. 145, 2020.

O'NEILL, H. C. et al. Improved cryopreservation of spermatozoa using vitrification: comparison of cryoprotectants and a novel device for long-term storage. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 36, n. 8, p. 1713–1720, 2019.

OSMAN E.K., ESBERT M., HANSON B.M., SCOTT R. Embryo vitrification in super cooled slush nitrogen results in superior post-thaw survival compared to conventional liquid nitrogen: a blinded, randomized controlled trial. **Fertility and Sterility**, v. 114(3): e38, 2020.

PASQUALOTTO, F.F.; PASQUALOTTO, E.B.; VINGRIS, L.S. Análise seminal, testes da função espermiática e processamento seminal. *In*: BORGES E.; FARAH L.M.S.; CORTEZZI S.S. **Reprodução Humana Assistida**. São Paulo: Atheneu, 2011, p. 73-84.

ROTHAN, Y.A. Thermal analysis for solidification of PCM including nanoparticles within a container. *Case Studies in Thermal Engineering*, v. 33,p.101920, 2022.

PRUß, D. et al. High-throughput droplet vitrification of stallion sperm using permeating cryoprotective agents. **Cryobiology**, v. 101, p. 67–77, 2021.

RAHIMINIA, T. et al. Modern human sperm freezing: Effect on DNA, chromatin and acrosome integrity. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 56, n. 4, p. 472–476, 2017.

REN, Y. et al. Freezing Nucleus Spectra for Hailstone Samples in China from Droplet Freezing Experiments. **Journal of Geophysical Research: Atmospheres**, v.129, e2023JD040505, 2024.

SANSINENA, M. et al. Numerical simulation of cooling rates in vitrification systems used for oocyte cryopreservation. **Cryobiology**, v. 63, n. 1, p. 32–37, 2011.

SANTOS, N. C. et al. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: Pharmacological, cellular, and molecular aspects. **Biochemical Pharmacology**, v. 65, n. 7, p. 1035–1041, 2003.

SEKI, S. Importance of cooling versus warming rates in vitrification techniques. *In*: TUCKER, M.J.; LIEBERMANN, J. **Vitrification in Assisted Reproduction**. New York: CRC Press, 2016. p. 43-46. ISBN 978-1-4822-4258-4.

SHAH, D. et al. A simple method of human sperm vitrification. **MethodsX**, v. 6, n. September, p. 2198–2204, 2019.

SHEHATA, F.; CHIAN, R-C. Cryopreservation of sperm: an overview. *In*: CHIAN, R-C; QUINN, P. **Fertility Cryopreservation**. New York: Cambridge University Press, 2010. p. 39–45. ISBN 978-0-521-51778-2.

SHI, M. et al. High-Throughput Non-Contact Vitrification of Cell-Laden Droplets Based on Cell Printing. **Scientific Reports**, v. 5, 2015.

SHI, M.; FENG, S.; ZHANG, X. Droplet based vitrification for cell aggregates: Numerical analysis Meng. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 82, p. 383–393, 2018.

SHIN, T. et al. **Gonadal Tissue Cryopreservation in Fertility Preservation**. Editores: Suzuki, N., Donnez, J. Japão: Springer, 2016. p. 125-140. ISBN 978-4-431-55961-0.

SILVA, A. A. R.; RODRIGUES, C. G.; Da SILVA, M. B. Avanços tecnológicos na criopreservação de células-tronco e tecidos, aplicados à terapia celular. **Revista da Biologia**, v. 17, n. 1, p. 13–18, 2017.

Sistema Nacional de Produção de Embriões (SisEmbrio). Publicações. *In*: Relatório de Produção de Embriões. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/acessoinformacao/dadosabertos/informacoes-analiticas/sisembrio>.

Sociedade Brasileira de Reprodução Assistida (SBRA). Publicações. *In*: Notícias. Disponível em: <https://sbra.com.br/noticias-nova>.

SPECTRUM. Kit para Vitriificação de Oócitos e Embriões NX (Next Generation). Disponível em: <https://www.spectrun.com.br/produto/90188>.

SU, F. et al. Ultra-Fast Vitrification Experiment of Hamster Ovary Cells utilizing Thin Film Evaporation. **International Congress of Refrigeration**. v.25, p. 9, 2019.

SU, F. et al. Thin-Film Evaporation Heat Transfer of Liquid Nitrogen and Its Application in Cell Vitrification. **Journal of Heat Transfer**, v. 142, p. 071602-1 a 071602-6, 2020.

SWAIN, J.E.; SMITH, G.D. Cryoprotectants. *In*: CHIAN, R-C; QUINN, P. **Fertility Cryopreservation**. New York: Cambridge University Press, 2010. p. 24-38. ISBN 978-0-521-51778-2.

TALEVI R., BARBATO V., FIORENTINO I., BRAUN S., DE STEFANO C., FERRARO R., SUDHAKARAN S., GUALTIERI R. Successful slush nitrogen vitrification of human ovarian tissue. **Fertility and Sterility**. v.105 (6), 2016. American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.

TIERSCH, C. J. et al. 3-D printed customizable vitrification devices for preservation of genetic resources of aquatic species. **Aquacultural Engineering**, v. 90, n. May, p. 102097, 2020.

VAJTA, G. et al. Open pulled straw (OPS) vitrification: A new way to reduce cryoinjuries of bovine ova and embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 51, n. 1, p. 53–58, 1998.

VANDERZWALMEN, P, et al. Vitrification of oocytes and embryos: finally, a recognized technique, but still a source of concern and debate. *In*: TUCKER, M. J.; LIEBERMANN, J. **Vitrification in Assisted Reproduction**. New York: CRC Press, 2016. p. 23-34. ISBN 978-1-4822-4258-4.

VOLLER, V.R., PRAKASH, C. A fixed grid numerical modelling methodology for convection-diffusion mushy region phase-change problems. **International Journal of Heat and Mass Transfer**. 30(8) 1709-1719, 1987.

VRIES, R. J. DE et al. Bulk Droplet Vitrification: An Approach to Improve Large-Scale Hepatocyte Cryopreservation Outcome. **American Chemical Society**, v. 35, 2019.

WANG, T., ZHAO, G., TANG, H., JIANG, Z. Determination of convective heat transfer coefficient at the outer surface of a cryovial being plunged into liquid nitrogen. *CryoLetters*, v.36 (4), p.285-288, 2015.

WENG, L.; BEAUCHESNE, P. R. Dimethyl sulfoxide-free cryopreservation for cell therapy: A review. *Cryobiology*, v. 94. p. 9-17, 2020.

WHO - World Health Organization, Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. Geneva, CH, 2021. Disponível em:
<https://www.who.int/publications/i/item/9789240030787>.

WHO - World Health Organization. Infertility. *In: HEALTH topics*. Geneva, CH, 2022. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/infertility>.

WU S.Q., WANG Q.D., LI Y.J., HUANG J.L., JIN T. Experimental Study on Pool Boiling Heat Transfer Characteristics of Slush Nitrogen. IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering, v. 755- 012026, 2020.

YAVIN, S., ARAV, A. Measurement of essential physical properties of vitrification solutions. *Theriogenology*, v. 67, n. 1, p. 81-89, 2007.

YOON T.K., LEE D.R., CHA S.K., CHUNG H.M., LEE W.S., CHA K.Y. Survival rate of human oocytes and pregnancy outcome after vitrification using slush nitrogen in assisted reproductive technologies. *Fertility and Sterility* v.88 (4), 2007. American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.

ZHANG, X. et al. Nanoliter droplet vitrification for oocyte cryopreservation. *Nanomedicine*, v. 7, n. 4, p. 553–564, 2012.

ZHANG, Y. et al. Isochoric vitrification: An experimental study to establish proof of concept. *Cryobiology*, v. 83, n. May, p. 48–55, 2018.

ZHAO, G.; FU, J. Microfluidics for cryopreservation. *Biotechnology Advances*, v. 35, p. 323–336, 2017.

ZHOU, X. et al. Theoretical investigations of a novel microfluidic cooling/warming system for cell vitrification cryopreservation. *International Journal of Heat and Mass Transfer*, v. 65, p. 381–388, 2013.

ZHOU, X. et al. Investigation on the thermal performance of a novel microchannel-aided device for vitrification of cells / tissues. ***Applied Thermal Engineering***, v. 119, p. 189–196, 2017.

ZHU, J. et al. Cryoprotectant-free ultra-rapid freezing of human spermatozoa in cryogenic vials. ***Andrologia***, v. 46, p. 642–649, 2014.

APÊNDICE 1 - CALIBRAÇÃO DO MODELO: AVALIAÇÃO DO ÂNGULO DE CONTATO

Primeiramente, de modo a calibrar as simulações do protocolo de gotas, foi avaliada numericamente a influência do ângulo de contato entre a base da gota e o substrato de congelamento. Para tanto, analisou-se 3 geometrias com diferentes ângulos de contato com o substrato, Figura A1.1, com $\theta=90^\circ$, $\theta=45^\circ$ e $\theta=135^\circ$, respectivamente, mantendo constante o volume da gota de $20 \mu\text{L}$, conforme utilizado por O'Neill et al., 2019.

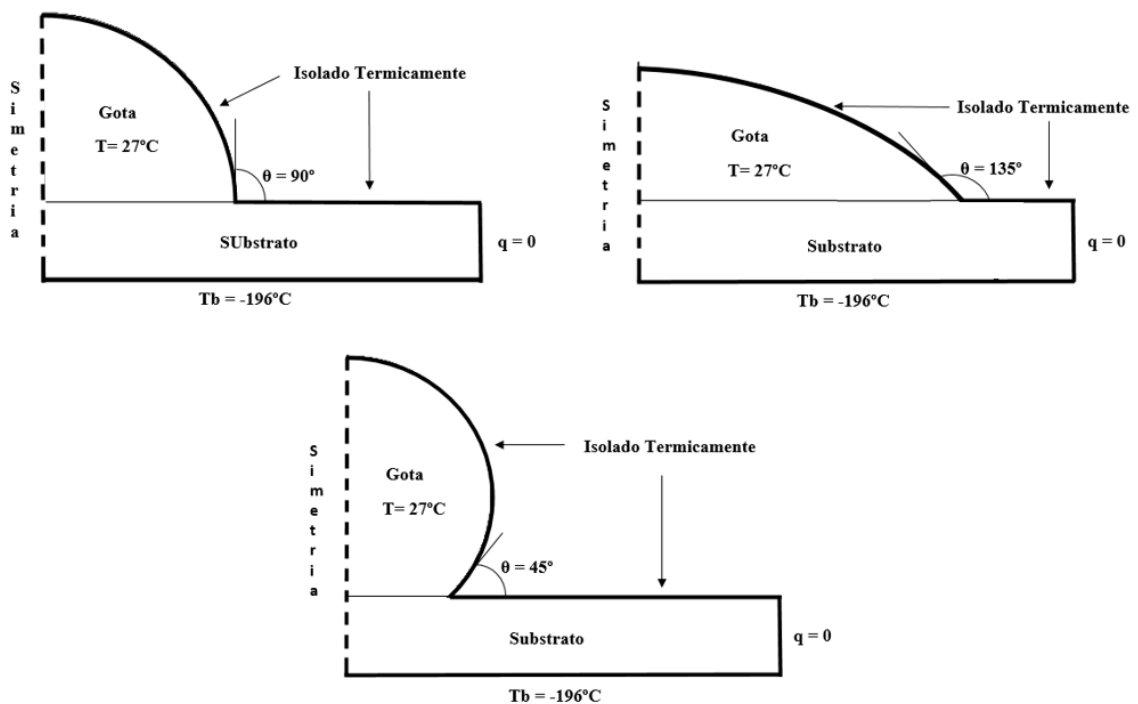


Figura A1.1 - Domínio numérico e condições de contorno para simulação da avaliação do ângulo de contato.

O sistema analisado é bidimensional, formado por uma gota de água disposta sobre uma superfície de vidro. As superfícies da gota e do substrato em contato com o ambiente são consideradas isoladas termicamente, com fluxo de calor apenas na interface gota-substrato por condução. A base do substrato é mantida a uma temperatura constante de -196°C e a gota é simulada inicialmente com temperatura de 27°C . O Domínio ao redor da gota é considerado $5x$ o diâmetro da gota, conforme empregado por Marchesi et al. (2005). As propriedades térmicas da gota e do substrato foram consideradas dependentes da temperatura.

Foi realizada a análise da malha computacional utilizando o método GCI, com razão de refino de malha de 1,5 entre si, com 35893, 16269 e 7278 elementos, respectivamente. A malha

escolhida foi a mais refinada, vide Figura A1.2, com GCI de 1,28%, abaixo dos 5% normalmente aceitáveis na literatura, indicando que a malha está apta para reproduzir com boa exatidão os fenômenos físicos envolvidos.

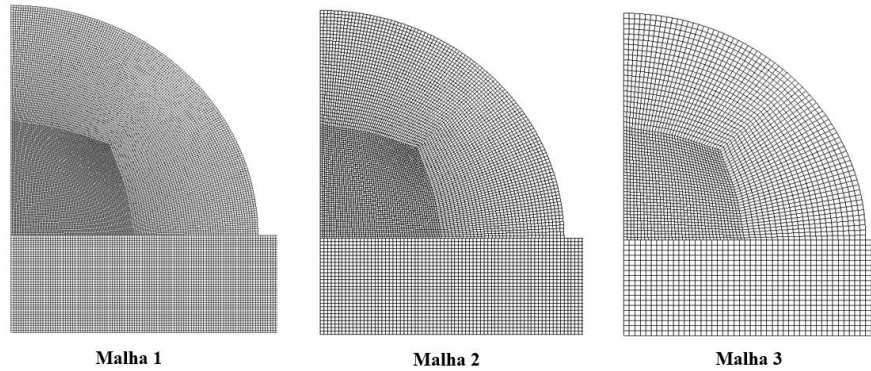


Figura A1.2 - Aparência das malhas empregadas no GCI.

A Figura A1.3 mostra a influência do ângulo de contato sobre as curvas de resfriamento e de solidificação, para os ângulos de $\theta=45^\circ$, $\theta=90^\circ$ e $\theta=135^\circ$, respectivamente.

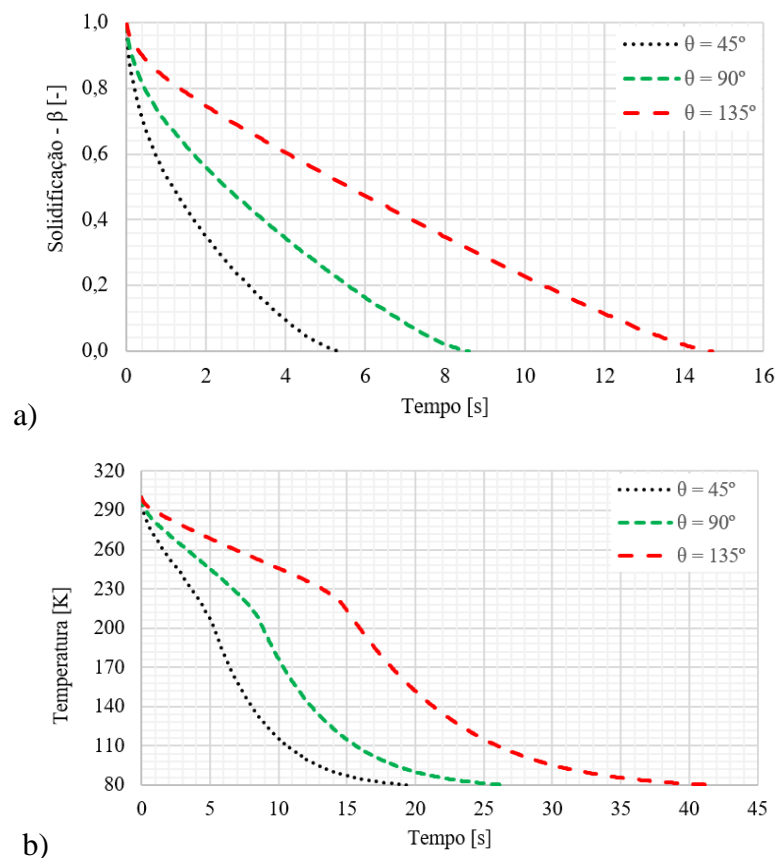


Figura A1.3 – (a) Curva de solidificação e (b) Curva de temperatura durante a etapa de congelamento.

Menores ângulos de contato (superfícies hidrofílicas) apresentam maiores taxas de resfriamento e de solidificação, devido ao fato de aumentar a interface amostra-substrato,

consequentemente, aumentado a taxa de transferência de calor. A Figura A1.4 mostra os campos de temperatura e de solidificação de acordo com os ângulos de contato.

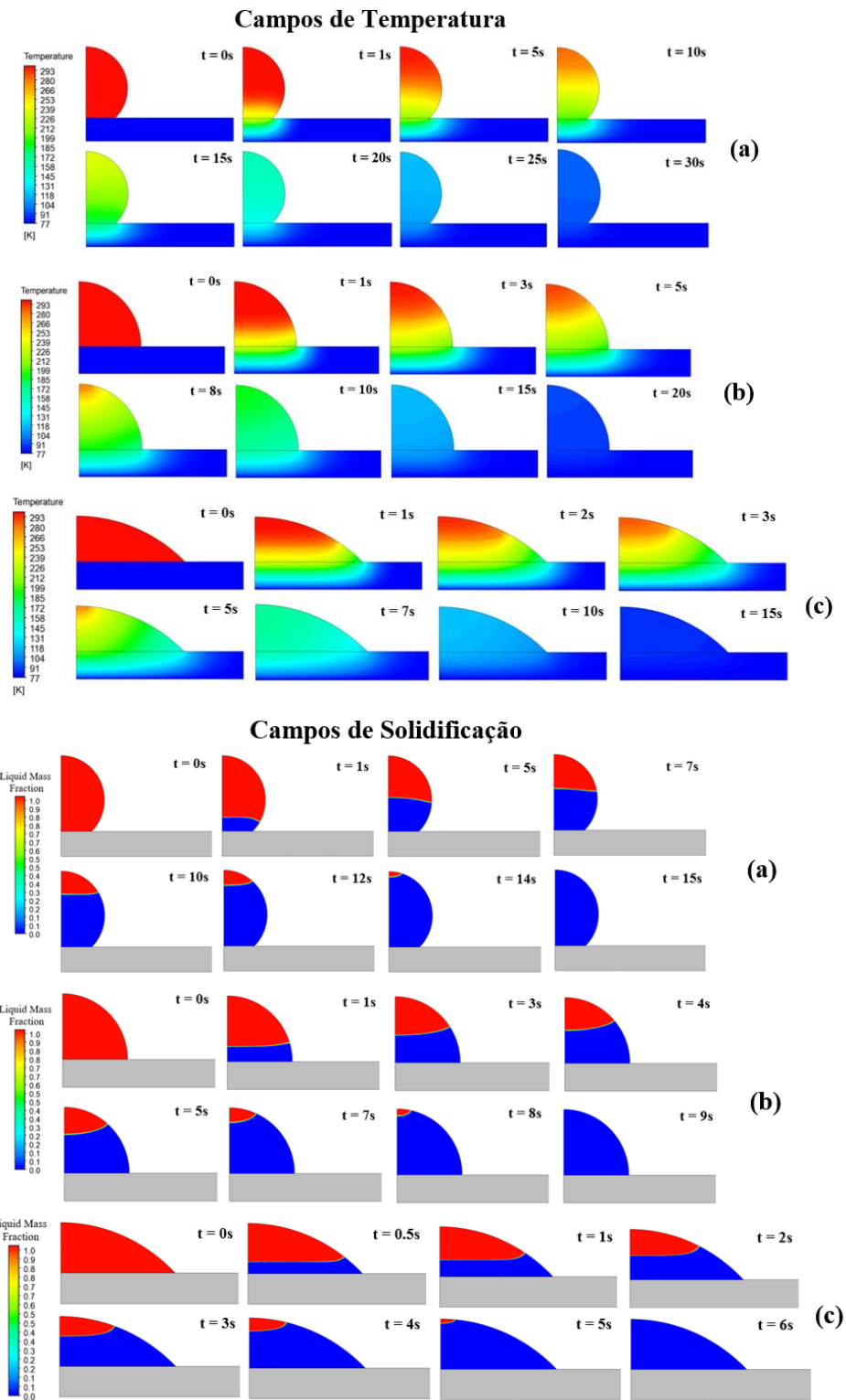


Figura A1.4 – (a) Campos de temperatura e de solidificação para $\theta = 135^\circ$, (b) $\theta = 90^\circ$ e (c) $\theta = 135^\circ$ em diferentes tempos.

A gotícula com $\theta = 45^\circ$ congelou completamente em menos de 6 segundos, menos da metade da gotícula com $\theta = 135^\circ$. Em relação a curva de resfriamento, $\theta = 45^\circ$ foi possível alcançar uma temperatura de -196°C em menos de 20 segundos, enquanto para $\theta = 135^\circ$ este tempo foi de mais de 40 segundos. A taxa de resfriamento para o caso com o menor ângulo de contato foi de $1132.55^\circ\text{C}/\text{min}$, quase quatro vezes maior que a taxa para $\theta = 135^\circ$. Isto é explicado devido a área molhada pela gota, que é inversamente proporcional ao ângulo de contato.

APÊNDICE 2 – FOLHAS 2D DOS MOLDES PARA FABRICAÇÃO DE PDMS

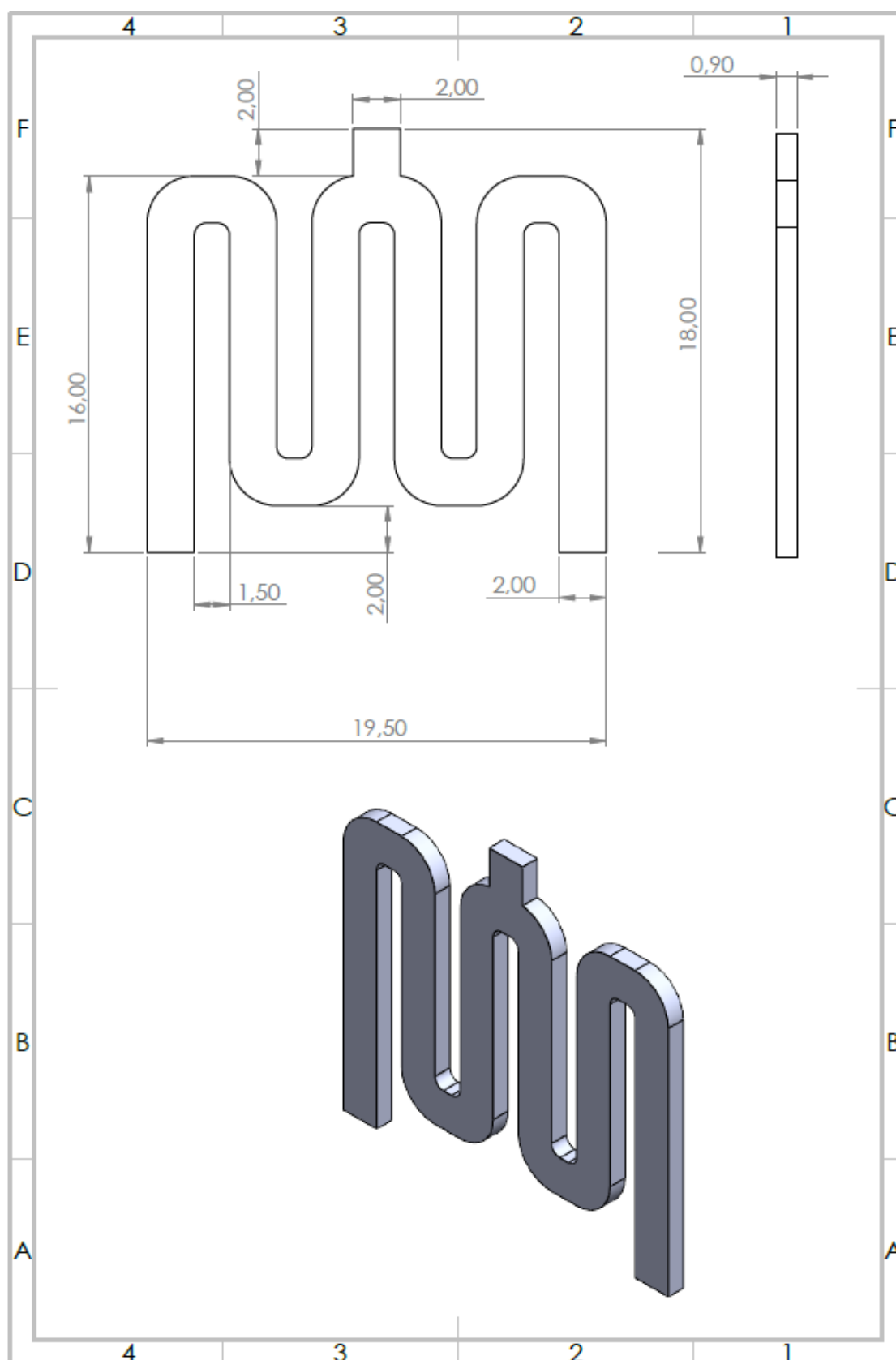


Figura A2.1 – Molde em serpentina para dispositivo em PDMS.

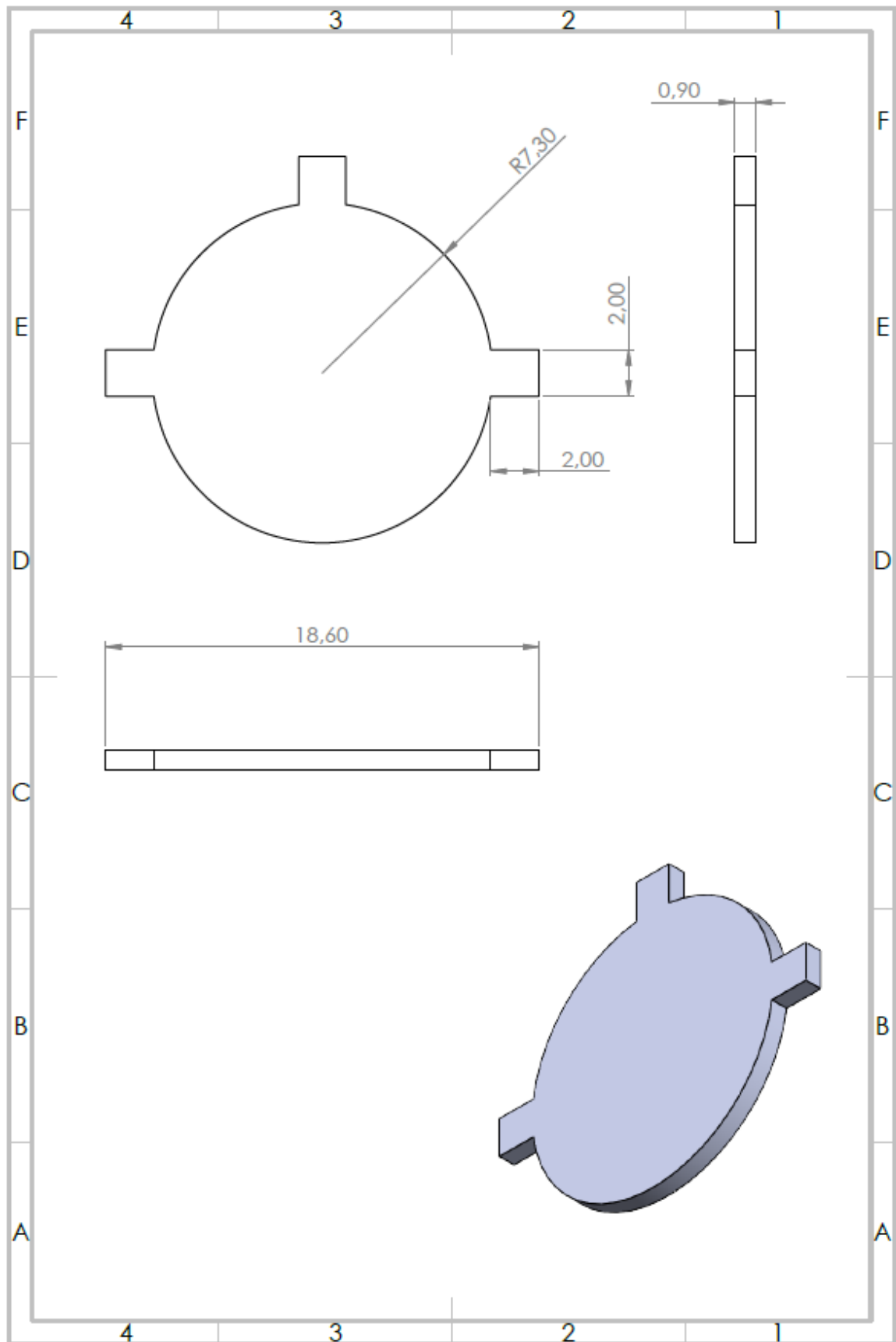


Figura A2.2 – Molde circular para dispositivo em PDMS.

APÊNDICE 3 - PROJETO DE UM PROTÓTIPO DE UM EQUIPAMENTO PARA TRATAMENTO DE SUPERFÍCIES COM PLASMA

O processo de geração de plasma é relativamente simples, consistindo basicamente em gerar uma diferença de potencial sobre um gás disposto à baixas pressões (em torno de 200 – 700 *mTorr*), de modo a ionizá-lo. Nesse trabalho foi desenvolvido um protótipo de um equipamento para tratamento superficial por plasma, com materiais de fácil acesso e com baixo custo. A figura A3.1 mostra o projeto do protótipo construído, bem como sua operação.

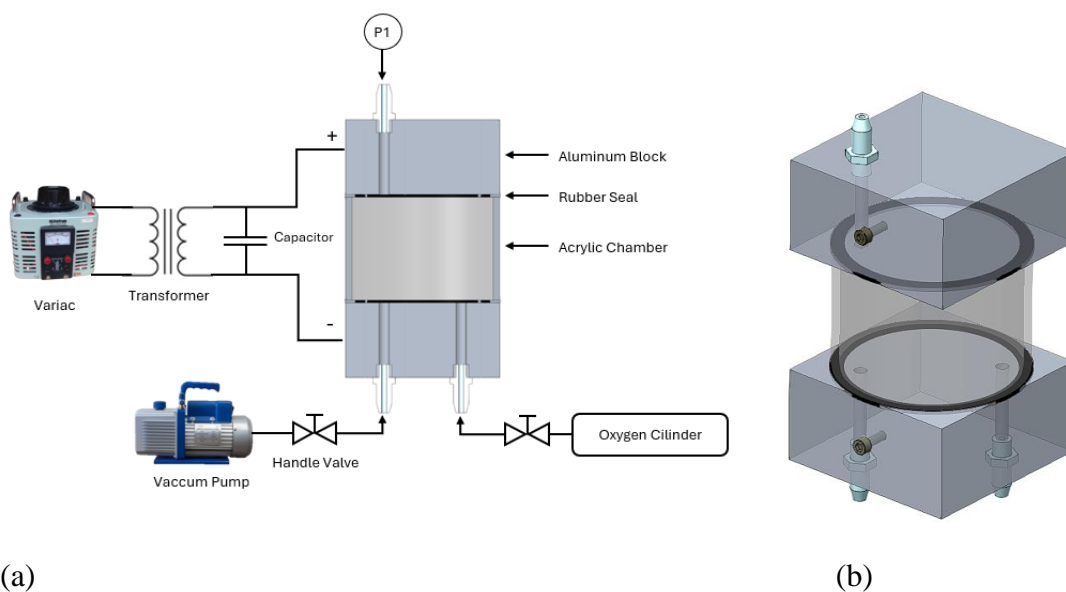


Figura A3.1 - Esquema do protótipo de um equipamento gerador de plasma para ionização de superfícies: a) Sistema completo e b) Câmara de vácuo.

O processo de geração de plasma do protótipo é idêntico ao de equipamentos comerciais. No esquema da Figura A4.1.(a) se tem um variac é utilizado para variar a tensão, alimentando um trafo elevador de tensão, podendo elevar a tensão a 2200 V. Do trafo, a corrente elétrica passa por um capacitor e um diodo, que ajuda na estabilidade da corrente para formação do plasma.

A câmara de vácuo, Figura A4.1.(b) é composta por 3 partes: suporte superior, suporte inferior e cilindro de visualização. O cilindro de visualização é feito de acrílico, com 114 mm de diâmetro interno, 100 mm de altura e 3 mm de espessura, resultando em um volume de aproximadamente 1 L. Tanto o suporte inferior como o superior são construídos em alumínio, devido às boas propriedades termo-elétricas Na parte superior da câmara de vácuo, fica a

conexão para o medidor de pressão da câmara, e na parte inferior, as conexões para a bomba de vácuo e o cilindro de gás, o qual será ionizado.

Foi utilizada uma bomba de vácuo com capacidade de 10 CFM. O controle da vazão de gás é realizado através de uma válvula do tipo agulha, com regulagem manual. Caso necessário, o tipo de gás pode ser alterado, a depender da finalidade do equipameto, apenas alterando o cilindro conectado à câmara de vácuo. Controles de pressão e temperatura da câmara também podem ser refinados, a depender do rigor da aplicação. Para geração do plasma, foi necessário elevar a tensão até um patamar entre 650 - 900 V, atingindo uma potência na ordem de 200 – 350 W. Durante a operação do plasma, a temperatura da câmara varia na faixa de 30 a 45 °C. A Figura A3.2 mostra o protótipo construído e seu funcionamento.

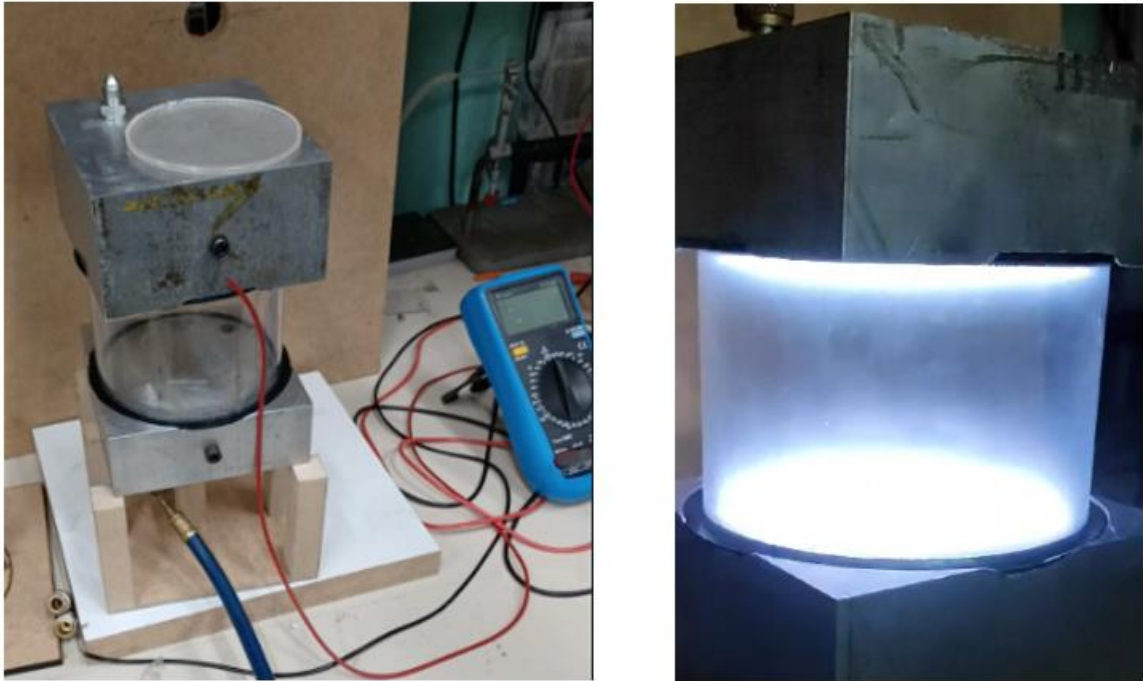


Figura A3.2 - Imagens do teste de funcionamento do protótipo da câmara de plasma.

APÊNDICE 4 – FOLHA 2D DO DISPOSITIVO PARA IMERSÃO DAS AMOSTRAS

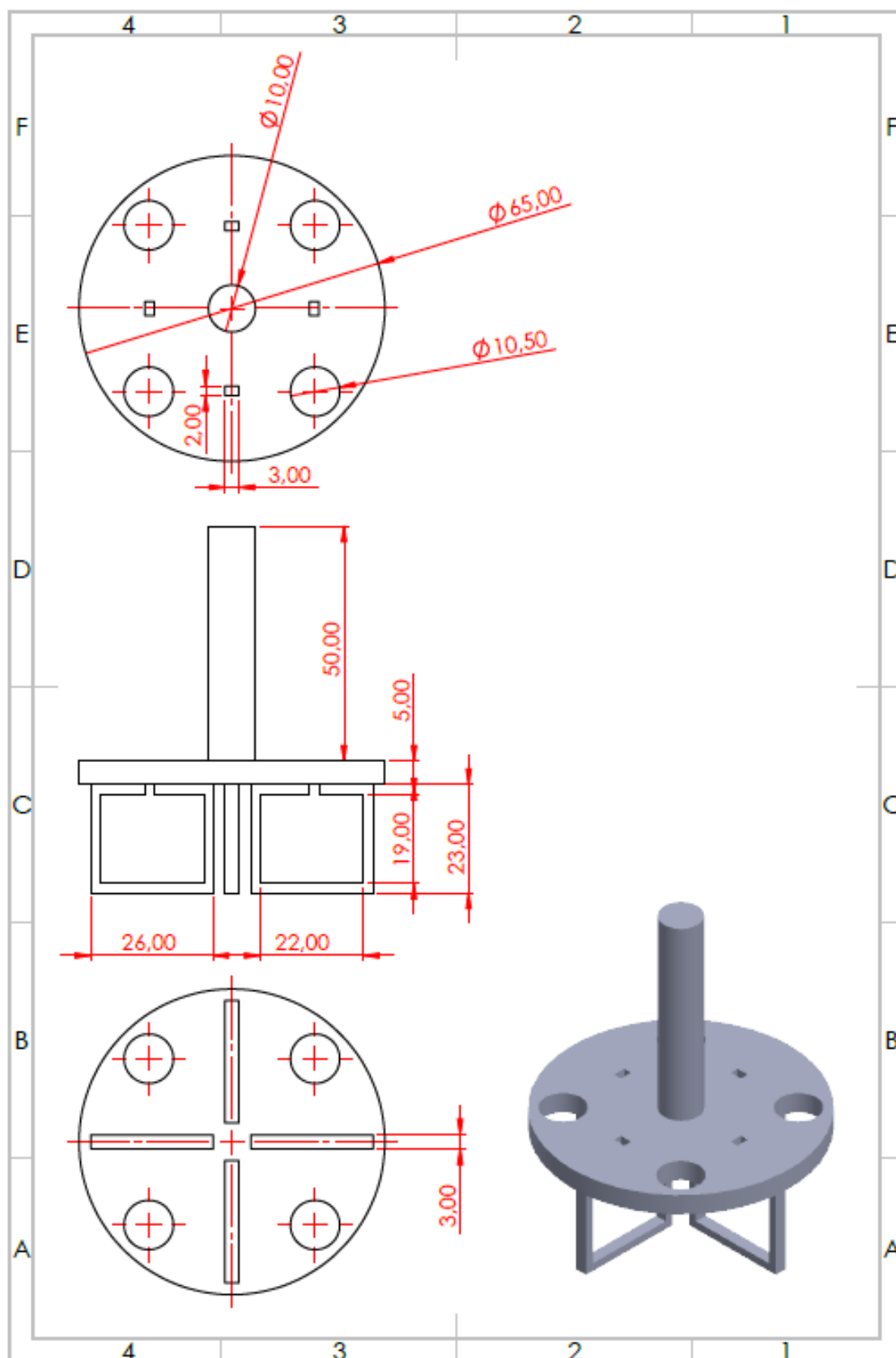


Figura A4.1 – Dispositivo para fixação dos chips de PDMS e criotubos.