

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

HENRIQUE ROTH VIDALETTI

**ESTUDO EXPERIMENTAL DE CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES
USANDO EVAPORAÇÃO DE FILME FINO DE NITROGÊNIO**

São Leopoldo

2024

HENRIQUE ROTH VIDALETTI

**ESTUDO EXPERIMENTAL DE CRIOPRESERVAÇÃO DE ESPERMATOZOIDES
USANDO EVAPORAÇÃO DE FILME FINO DE NITROGÊNIO**

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

Orientadora: Profa. Dra Jacqueline Biancon Copetti

Co orientador: Prof. Dr. Jeferson Diehl de Oliveira

São Leopoldo

2024

V649e

Vidaletti, Henrique Roth.

Estudo experimental de criopreservação de espermatozoides usando evaporação de filme fino de nitrogênio / Henrique Roth Vitaletti. – 2024.

93 f. : il. ; 30 cm.

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

“Orientadora: Profa. Dra. Jacqueline Biancon Copetti
Coorientador: Prof. Dr. Jeferson Diehl de Oliveira”

1. Criopreservação. 2. Crioprotetores. 3. Nitrogênio líquido. 4. Verificação por evaporação de filme líquido. I. Título.

CDU 621

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Bibliotecária: Silvana Dornelles Studzinski – CRB 10/2524)

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a minha família e minha namorada pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis no período desta pesquisa.

À minha orientadora, Profa. Dra. Jaqueline Biancon Copetti e coorientador Prof. Dr. Jeferson Diehl de Oliveira, pela 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 pelo empenho, momentos de descontração e pela assistência na realização dos testes e confecção dos dispositivos PDMS.

Aos laboratoristas da UNISINOS pelo apoio durante os testes experimentais.

AGRADECIMENTO À CAPES

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

RESUMO

A criopreservação de material biológico, especificamente do sêmen, possibilita o armazenamento de amostras por longos períodos, preservando sua viabilidade e função após o descongelamento, o que contribui para o aumento das taxas de sucesso nas tecnologias de reprodução assistida. Diversos protocolos de congelamento e técnicas de descongelamento têm sido desenvolvidos e avaliados, com o uso de novos agentes crioprotetores (ACPs), visando à vitrificação do material biológico e evitando a formação de cristais que podem danificar as células.

Neste estudo, o objetivo foi avaliar a vitrificação por evaporação de filme fino de nitrogênio líquido (EFF). Para isso, foi desenvolvido um aparato experimental com câmara de vácuo e criocautérios contendo nitrogênio líquido (LN2). A amostra foi armazenada em um dispositivo de PDMS entre duas placas de cobre com superfície de espuma microporosa metálica (níquel ou cobre). Jatos de LN2 foram aplicados, promovendo a evaporação e o congelamento ou vitrificação das amostras. A pressão na câmara e as temperaturas da amostra foram monitoradas ao longo dos experimentos.

Inicialmente, foram usados agentes crioprotetores como glicerol em solução de PBS (Fosfato-tampão salino) e uma solução com 1 mol de sacarose, 35% v/v de glicerol, 1% v/v de albumina humana e 64% v/v de HTF. As variáveis avaliadas incluíram volume da amostra, material e espessura da espuma metálica e espessura do reservatório de PDMS. Em seguida, testes com sêmen humano foram realizados com diferentes combinações de sacarose (0,25 mol/l, 0,5 mol/l e 1 mol/l), albumina humana (1% v/v), glicerol (35% v/v), HTF (*Human Tubal Fluid*) (64%) e TYB (*test yolk buffer*).

Os experimentos de EFF mostraram que a concentração de crioprotetores, o volume, o material e a espessura da espuma metálica, e a espessura do reservatório influenciam significativamente as taxas de resfriamento e vitrificação. Glicerol a 50% v/v favoreceu a vitrificação, enquanto espumas de cobre proporcionaram maiores taxas de resfriamento devido à sua condutividade térmica. Contudo, a presença de água residual nas amostras biológicas dificultou a vitrificação, ressaltando a necessidade de otimizações nas técnicas de preparo e estudos sobre novas soluções crioprotetoras.

Palavras-chave: criopreservação, vitrificação por evaporação de filme líquido, nitrogênio líquido, crioprotetores.

ABSTRACT

The cryopreservation of biological material, specifically semen, allows for the long-term storage of samples while preserving their viability and function after thawing, contributing to increased success rates in assisted reproductive technologies. Various freezing protocols and thawing techniques have been developed and evaluated, utilizing new cryoprotective agents (CPAs) aimed at vitrifying biological material and preventing the formation of crystals that can damage cells.

In this study, the objective was to evaluate vitrification through thin film evaporation of liquid nitrogen (LN₂). For this purpose, an experimental apparatus was developed, comprising a vacuum chamber and cryoprobes containing liquid nitrogen. The sample was stored in a PDMS device between two copper plates with a surface of microporous metal foam (nickel or copper). Jets of LN₂ were applied, promoting the evaporation and freezing or vitrification of the samples. The pressure in the chamber and the sample temperatures were monitored throughout the experiments.

Initially, cryoprotective agents such as glycerol in PBS (Phosphate-buffered saline) and a solution containing 1 mol of sucrose, 35% v/v glycerol, 1% v/v human albumin, and 64% v/v HTF (Human Tubal Fluid) were used. The evaluated variables included sample volume, material and thickness of the metal foam, and the thickness of the PDMS reservoir. Subsequently, tests with human semen were conducted using different combinations of sucrose (0.25 mol/l, 0.5 mol/l and 1 mol/l), human albumin (1% v/v), glycerol (35% v/v), HTF (Human Tubal Fluid) (64%), and TYB (test yolk buffer).

The EFF experiments demonstrated that the concentration of cryoprotectants, volume, material and thickness of the metal foam, and the thickness of the reservoir significantly influence cooling rates and vitrification. Glycerol at 50% v/v favored vitrification, while copper foams provided higher cooling rates due to their thermal conductivity. However, the presence of residual water in the biological samples hindered vitrification, highlighting the need for optimizations in preparation techniques and studies on new cryoprotective solutions.

Keywords: cryopreservation, vitrification by liquid film evaporation, liquid nitrogen, cryoprotectants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Diagrama esquemático para dois tipos de criolesões que ocorrem em processos de criopreservação.....	18
Figura 2 – Etapas do processo de criopreservação por congelamento lento: I – Adição de ACPs; II – Nucleação de gelo e decaimento térmico; III – Imersão em nitrogênio líquido; IV– Aquecimento rápido e V – Remoção de ACPs.	20
Figura 3 - Diagrama de fases da água de acordo com a temperatura. As setas representam a velocidade de resfriamento e o tamanho da formação de cristais de gelo associados. A seta A representa um resfriamento menos rápido que a seta B.	21
Figura 4 - Método OPS: (a) Oócitos ou embriões carregados na extremidade estreita da palheta a partir de uma gota por efeito capilar; (b) Resfriamento por imersão direta em nitrogênio líquido; (c) Aquecimento: meio de vitrificação torna-se líquido e posterior sedimentação dos ovócitos ou embriões na placa de cultura.....	23
Figura 5 - Laço de <i>nylon</i> do método de <i>Cryoloop</i>	24
Figura 6 - Domínio numérico da simulação computacional.	26
Figura 7 - Congelamento Super Flash - SFF.....	27
Figura 8 - Método de vitrificação por gotejamento proposto por Vries <i>et al.</i> (2019).	27
Figura 9 - Desenho esquemático da camada de vapor formada em processo de resfriamento OPS	28
Figura 10 – Equipamento Vit-Master®.....	29
Figura 11- Aparato instrumental do método de vitrificação cinética	29
Figura 12 - Diagrama esquemáticos de (a) ebulição nucleada versus (b) evaporação de filme fino (c) espessura da película de líquido	31
Figura 13 – Variação na força de adesão, curvatura, fluxo de calor e resistência térmica na região da linha de contato para um menisco evaporativo.....	32
Figura 14 - Esquema do evaporador constituído de duas placas aletadas de silício (a) e de duas placas microporosas de cobre (b), contendo a amostra no interior	34
Figura 15 - Variação de temperatura ao longo do tempo para resfriamento por ebulição em vaso (<i>pool boiling</i>) (a) e evaporação em filme fino (b)	35
Figura 16 - Resultados de taxas de sobrevivência celular para diferentes métodos de criopreservação.....	35
Figura 17 - Variação do coeficiente de transferência de calor (HTC) com o fluxo de calor q'' , para diferentes espessuras das espumas de cobre, Cu (a) e de níquel, Ni (b).....	36

Figura 18 - Aparato instrumental dos estudos de resfriamento de placas quadradas e cilíndricas por jato.....	37
Figura 19 – (a) Efeito do tamanho das partículas do revestimento microporoso no desempenho da transferência de calor do aquecedor plano. (b) Efeito da espessura do revestimento microporoso no desempenho da transferência de calor do aquecedor plano. Vazão volumétrica de água para ambos os casos de 1,75 ml/min.....	38
Figura 20 - Taxas de resfriamento necessárias para vitrificar soluções de água/crioprotetor de 0% a 50% w/w, $x = 0,2\%$. Os rótulos das curvas designam glicerol (G), etilenoglicol (E), dimetilsulfóxido (D), propilenoglicol (P) e 2,3-butanodiol (2,3BD)	41
Figura 21 – Câmara para testes de resfriamento/congelamento por EFF	46
Figura 22 - Aparato experimental desenvolvido	47
Figura 23 - Fotografia bancada de testes completa	48
Figura 24 – Configuração dos reservatórios PDMS de (a)30 μL e (b)64 μL	50
Figura 25 - Reservatório PDMS 150 μL	50
Figura 26 –Fotografia e renderização tridimensional da espuma metálica de cobre (a) e espuma metálica de níquel (b)	52
Figura 27 - Fluxograma das etapas do procedimento de testes do resfriamento com vácuo ...	56
Figura 28 – Evaporador da amostra.....	57
Figura 29- Processo de preparação da amostra seminal pelos métodos de <i>swim-up</i>	60
Figura 30 - Etapas e temperaturas da desvitrificação da amostra de glicerol 50% e 30 μl	62
Figura 31 – Efeito do pré-resfriamento do sistema na variação de temperatura e pressão para amostra de Glicerol 30%v/v, volume do reservatório de 30 μL (espessura 3 mm) e espuma microporosa de níquel nos testes de EFF	63
Figura 32 – Efeito da concentração de Glicerol na variação de temperatura e pressão com amostras de 50%v/v e 30%v/v, volume do reservatório de 30 μL (espessura 3 mm), espuma microporosa de cobre e pré-resfriamento nos testes de EFF.....	64
Figura 33 – Efeito da geometria do dispositivo circular na variação de temperatura e pressão, com volumes de 30 μL e 64 μL (espessura 3 mm) utilizando Glicerol, espuma microporosa de níquel e pré-resfriamento, nos testes de EFF.....	65
Figura 34 - Efeito da espuma microporosa do evaporador (espessura 1 mm), níquel e cobre na variação de temperatura e pressão, para amostra de Glicerol 50%v/v e volume de 30 μl (espessura 3 mm), com pré resfriamento nos testes de EFF.....	66

Figura 35 - Efeito da espessura da espuma microporosa do evaporador, espessuras de 1 mm e 2mm, para amostra de Glicerol 40%v/v e volume de 150 µl (espessura 2,5mm) com pré resfriamento nos testes de EFF.....	67
Figura 36 - Efeito da espessura do reservatório PDMS de 150 µl (serpentina) do evaporador, espessuras de 2 mm e 2,5 mm, para amostra com 1mol/l de sacarose, 35%v/v glicerol, 1%v/v albumina humana e 64%v/v HTF, com pré resfriamento nos testes de EFF.....	68
Figura 37 - Parâmetros de teste para o método da Evaporação de Filme Fino	69
Figura 38 - Taxas de resfriamento e aspecto visual das amostras com diferentes concentrações	70
Figura 39 - Viabilidade e motilidade da amostra fresca e após adição dos meios de congelamento.....	72
Figura 40 - Concentração espermática da amostra 3 - 0,25 mol/l sacarose e HTF (a) e amostra 4 – 50% TYB (b)	73
Figura 41 - Viabilidade e motilidade total da amostra 3 - Sacarose 0,25 mol/l, Albumina humana (1ml) e HTF.....	74
Figura 42 - Viabilidade e motilidade total da amostra 4 - TYB (50%).....	75
Figura 43 - Curvas de temperatura, pressão e aspecto visual das amostras com crioprotetores das composições 1, 2, 3 e 4	76
Figura 44 - Curva de resfriamento teste em triplicata amostra 50% TYB e 50% amostra biológica	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Constantes de cristalização de Boutron.....	40
Tabela 2 - Principais características das espumas metálicas	52
Tabela 3 - Testes de vazões dos criocautérios	55
Tabela 4- Soluções Crioprotetoras testadas.....	59
Tabela 5 - Resultados de análise de amostra fresca de pós descongelamento de processo de congelamento lento.....	76
Tabela 6 – Aspectos da repetibilidade para curvas (a) e (b), (b) e (c) e (a) e (c) e média total	78

LISTA DE SIGLAS

ACP	Agente Crioprotetor
DMSO	Dimetilsulfóxido
EFF	Evaporação em filme fino
HTF	Fluido Tubário Humano (<i>Human Tubal Fluid</i>)
PBS	Fosfato tampão salino (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
LN2	Nitrogênio Líquido
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
OPS	Palheta aberta (<i>Open Pulled Straw</i>)
PDMS	Dimetilpolissiloxano
PLA	Polímero Poliacido Láctico
TYB	<i>Buffer</i> da Gema de Ovo (<i>test yolk buffer</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

a	Diâmetro das células da espuma metálica	m
d_p	Diâmetro dos poros da espuma metálica	m
d_f	Diâmetro das fibras da espuma metálica	m
ρ	Massa específica da espuma metálica	kg/m ³
ε	Porosidade da espuma metálica	%
Δt	Variação de tempo durante o resfriamento	min
T_G	Temperatura de transição vítrea	[°C]
T_H	Temperatura de transição homogênea	[°C]
T_m	Temperatura do final da fusão	[°C]
T_o	temperatura no tempo inicial	[°C]
Q	Energia de ativação	[kcal/mol]
dT/dt	Taxa de resfriamento	[°C/min]
$(dT/dt)_{c_r}$	Taxa de resfriamento crítica	[°C/min]
k_4	Constante de cristalização	[°C/min]
g_{max}	Quantidade máxima de massa que pode ser congelada	[-]
V	Volume	m ³
μ	Viscosidade	Pa s
ϕ	Concentração de agente crioprotetor sobre o volume da mistura	%
x	Fração total de gelo	-

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
1.1	Objetivos	15
1.1.1	Objetivo geral	15
1.1.2	Objetivos específicos	15
1.2	Justificativa	15
1.3	Estrutura do trabalho	16
2	CRIOPRESERVAÇÃO CELULAR.....	17
2.1	Método de congelamento lento	19
2.2	Método de congelamento ultrarrápido - Vitrificação.....	20
2.2.1	Método de Vitrificação por imersão com Palheta Aberta (OPS)	22
2.2.2	Método de Vitrificação em <i>Cryoloop</i> (Laço Criogênico)	24
2.2.3	Método de vitrificação por gotículas (<i>Droplet Vitrification</i>).....	25
2.2.4	Método ultrarrápido de vitrificação cinética	28
2.2.5	Método de vitrificação por evaporação de filme fino de nitrogênio líquido.....	30
2.3	Caracterização da vitrificação	39
2.4	Agentes Crioprotetores	41
2.4.1	Crioprotetores Extracelulares	42
2.4.2	Crioprotetores Intracelulares	43
2.5	Preparação da amostra seminal	43
2.6	Descongelamento e tratamento da amostra.....	44
2.7	Síntese da revisão bibliográfica	45
3	METODOLOGIA.....	46
3.1	Aparato Experimental	46
3.1.1	Reservatório da Amostra.....	49
3.1.2	Criocautérios	51
3.1.3	Espumas metálicas do evaporador	51
3.1.4	Medições.....	53
3.1.5	Repetibilidade do procedimento.....	53

3.2	Ajuste de condições de teste	54
3.3	Testes de vazão dos criocautérios	54
3.4	Procedimento de testes de evaporação de filme fino	55
3.5	Preparação do Evaporador e das amostras	57
3.6	Testes de avaliação paramétrica.....	58
3.7	Avaliação de Soluções de Crioprotetores	58
3.8	Testes com Amostra Biológica	59
3.8.1	Preparação das amostras	59
3.8.2	Procedimento Experimental com Amostras Biológicas.....	61
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	62
4.1	Avaliação paramétrica.....	62
4.1.1	Avaliação da desvitrificação.....	62
4.1.2	Pré-resfriamento da câmara de testes e do sistema de injeção de nitrogênio ..	63
4.1.3	Influência da concentração de ACP na vitrificação.....	64
4.1.4	Influência da geometria do dispositivo circular	65
4.1.5	Influência da espuma metálica microporosa	66
4.1.6	Influência da espessura do dispositivo de PDMS em formato serpentina.....	67
4.2	Soluções crioprotetoras	69
4.3	Material Biológico	71
5	CONCLUSÕES.....	80
6	REFERÊNCIAS	83
7	APÊNDICE	90
7.1	Técnica de preparação - Lavagem simples	90
7.2	Técnica de preparação - <i>Swin up</i> direto	90
7.3	Técnica de preparação - Gradiente de Densidade Descontínua - GDD.....	91

1. INTRODUÇÃO

A criopreservação é uma técnica crucial para a conservação de células, tecidos e órgãos em temperaturas ultrabaixas, com amplas aplicações na ciência e medicina. Nesse contexto, esta pesquisa investiga a vitrificação para criopreservação por meio do método de evaporação de filme fino de nitrogênio líquido. A busca por uma metodologia de criopreservação mais eficiente e a compreensão aprofundada dos fenômenos envolvidos são fundamentais para otimizar a preservação de amostras biológicas e reduzir custos operacionais. As contribuições desta pesquisa têm o potencial de avançar no campo da criopreservação, beneficiando diversas áreas de pesquisa e aplicações práticas.

A criopreservação evoluiu como uma tecnologia para aplicações médicas, como terapia com células-tronco, engenharia de tecidos, reprodução assistida e terapia gênica. Este processo permite preservar o material biológico em baixas temperaturas, geralmente entre -80 e -196 °C, suprimindo o envelhecimento biológico e mantendo sua viabilidade. O congelamento e armazenamento são feitos através do contato do material com fluido criogênico e agentes crioprotetores (ACP), minimizando os danos osmóticos e evitando a formação de cristais de gelo intra e extracelulares, reduzindo assim as criolesões.

A viabilidade de sistemas vivos depende principalmente da presença de água. A remoção de água de tecidos, células ou biomoléculas através do congelamento normalmente ocasionam danos celulares. Essa remoção pode causar um estresse osmótico ou mudanças conformais que afetam a estrutura e função das células e biomoléculas. Além disso, a formação de gelo pode causar estresses mecânicos nos materiais biológicos (Wolkers *et al.*, 2021). Uma maneira de preservar a vida dessas células durante processos de congelamento é o desenvolvimento de formulações e estratégias focadas na proteção desses materiais, tais como o estudo de novos agentes crioprotetores (ACP) com menor toxicidade ou a redução da quantidade utilizada deles, a diminuição de danos na estrutura celular relacionado a taxas de resfriamento e aquecimento, o armazenamento deste biomaterial, dentre outros.

Nos protocolos convencionais, como a imersão da amostra em nitrogênio líquido (LN2) ou o congelamento lento com redução gradual da temperatura, as taxas de resfriamento são baixas, na ordem de 10 °C/min (Li *et al.*, 2019), o que pode resultar em problemas de cristalização e desidratação. Com a finalidade de se atingir maiores taxas de resfriamento, protocolos para vitrificação do material biológico são estudados, na qual a amostra passa diretamente do estado líquido para o estado vítreo e amorfo. No entanto, a vitrificação requer

concentrações mais elevadas de ACP para proteger as células de lesões causadas pela desidratação. Por isso, novas tecnologias de vitrificação estão sendo testadas e investigadas, utilizando menores volumes de material e concentrações mais baixas de ACP, de modo a reduzir a toxicidade e as lesões causadas às células pelos cristais de gelo durante o processo (Li *et al.*, 2019).

Existem métodos de vitrificação como o *Cryoloop* (Lane *et al.*, 1999), *Open Pulled Straw* (Vajta *et al.*, 1998), a Vitrificação por gotejamento direto (Shah *et al.*, 2019) e em Grades de Microscopia Eletrônica (Martino *et al.*, 1996), que podem alcançar a vitrificação completa ou parcial de pequenos volumes (1 a 3 μ l) de amostra alcançando taxas maiores que 20.000 °C/min, porém exigem o uso de altas concentrações de ACP.

Uma técnica baseada na evaporação de filme fino de nitrogênio líquido sobre uma superfície microaletada ou porosa tem sido proposta por Su *et al.* (2012, 2017, 2018, 2020) como uma abordagem para a vitrificação. Os pesquisadores realizaram experimentos com pequenos volumes de ACP em contato com estas superfícies, cedendo calor para evaporação do nitrogênio e, portanto, vitrificando. Os autores obtiveram resultados significativos utilizando amostras com concentração de Dimetilsulfóxido (DMSO) e um reduzido volume de 3 μ l, alcançando taxas de congelamento de aproximadamente 150.000 °C/min (Su *et al.*, 2018)

Este trabalho apresenta os resultados da pesquisa realizada utilizando o processo de evaporação de filme fino de nitrogênio líquido (LN₂) em superfície com revestimento de espuma metálica para vitrificação de amostras. O intuito foi analisar o processo de resfriamento considerando diferentes revestimentos de espuma, amostras de ACP em diferentes concentrações e volumes, de forma a caracterizar as condições de vitrificação e as taxas de resfriamento. Uma vez estabelecida a metodologia, esta foi aplicada para a vitrificação de material biológico, o sêmen.

Neste contexto, este trabalho atua no desenvolvimento experimental de uma metodologia de vitrificação de material biológico através de evaporação de filme fino, para aplicação comercial de criopreservação de sêmen, em parceria com a empresa de biotecnologia HEMOCORD, com sede em São Leopoldo, RS, desenvolvendo protocolo e aprimorando a metodologia, a fim de melhorar a eficiência térmica dos processos de vitrificação, bem como a viabilidade das amostras.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo geral

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

1.1.2 Objetivos específicos

- Avaliar as condições de vitrificação e as taxas de resfriamento para diferentes amostras de ACP;
- Avaliar o efeito de diferentes tipos e concentrações de ACP;
- Avaliar o efeito do volume de amostra e de diferentes espumas metálicas;
- Propor um dispositivo para acondicionamento da amostra para o congelamento e a crio armazenagem;
- Aplicar o método ao material biológico, sêmen, e testar sua viabilidade e motilidade total.

1.2 Justificativa

A vitrificação por meio da evaporação de filme fino de nitrogênio líquido surge como uma inovação promissora no campo da criopreservação, oferecendo um potencial significativo para melhorar a viabilidade e longevidade de amostras biológicas sensíveis, como células espermáticas. A técnica se destaca por permitir uma transição rápida para o estado vítreo, evitando a formação de cristais de gelo, que são altamente prejudiciais às células. No entanto, para garantir a eficiência desse método, é fundamental investigar e ajustar as condições de vitrificação, como as taxas de resfriamento e o uso correto de agentes crioprotetores (ACPs), que têm papel essencial na prevenção de danos celulares.

A análise das taxas de resfriamento é crucial, pois a vitrificação bem-sucedida depende de uma taxa suficientemente alta para impedir a nucleação e o crescimento de cristais de gelo. Diferentes amostras de ACP requerem ajustes específicos nessas taxas, e a inadequação pode comprometer a integridade do material biológico. Além disso, os tipos e concentrações de ACP precisam ser cuidadosamente avaliados, já que diferentes concentrações podem afetar a toxicidade e eficácia do processo de vitrificação. A toxicidade dos ACPs, quando usada em concentrações elevadas, pode reduzir drasticamente a viabilidade celular, enquanto concentrações muito baixas não protegem adequadamente contra o congelamento.

O volume da amostra também desempenha um papel importante no controle da taxa de resfriamento. Amostras maiores podem exigir tempos de resfriamento mais longos ou diferentes parâmetros de vitrificação para garantir que todas as células na amostra sejam preservadas de maneira uniforme. Nessa perspectiva, o uso de espumas metálicas pode proporcionar uma solução para otimizar a transferência de calor e garantir que o nitrogênio líquido atue de maneira eficaz em toda a superfície da amostra.

Uma das propostas deste trabalho é o desenvolvimento de dispositivo específico para acondicionamento da amostra durante o processo de vitrificação. Esse dispositivo visa otimizar a distribuição do nitrogênio líquido e assegurar um resfriamento uniforme, minimizando variações que poderiam comprometer a qualidade da preservação.

É importante ressaltar que o sêmen, por ser altamente sensível às variações de temperatura, concentração de ACPs, exige ajustes precisos em todas essas variáveis para garantir a viabilidade pós-descongelamento. A falta de controle adequado sobre esses parâmetros pode resultar na perda de integridade celular e funcionalidade reprodutiva, o que reforça a importância de uma abordagem sistemática e rigorosa ao avaliar as condições de vitrificação.

1.3 Estrutura do trabalho

Este trabalho está estruturado da seguinte forma:

O **Capítulo 1** apresenta a Introdução, os Objetivos e Justificativas deste trabalho.

O **Capítulo 2** apresenta uma revisão bibliográfica de pesquisas na área, apresentando o estado da arte dos estudos envolvendo a criopreservação, tais como os principais tipos de criolesões, técnicas de congelamento lento e vitrificação, e o processo de vitrificação utilizando a evaporação de filme fino de nitrogênio líquido.

O **Capítulo 3** apresenta a metodologia deste trabalho, abordando aspectos físicos da bancada experimental de teste, detalhando componentes e metodologias aplicadas ao estudo desenvolvido.

O **Capítulo 4** apresenta os resultados e a discussão sobre os mesmos.

O **Capítulo 5** são as conclusões e propostas de continuidade para este trabalho.

2 CRIOPRESERVAÇÃO CELULAR

A criopreservação é um método importante na engenharia celular e útil no armazenamento e preservação a longo prazo de material biológico. O principal fator que influencia a preservação de células ou tecidos a longo prazo é a diminuição das reações biológicas e químicas das células vivas em baixas temperaturas (JAISWAL e VAGGA, 2022).

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

O principal objetivo da criopreservação é cessar de maneira controlada e reversível, todas as funções biológicas das células em temperaturas ultrabaixas (SILVA *et al.*, 2017). A viabilidade obtida após submeter as células a esse processo depende basicamente de sua capacidade de resistir à desidratação e ao dano mecânico decorrente da formação de cristais de gelo no seu interior (MARQUEZ-CURTIS *et al.*, 2015).

No entanto, o congelamento mata a maioria dos tecidos vivos devido à formação de cristais de gelo extracelulares e intracelulares, que alteram a composição química da célula e causam danos. O resfriamento excessivo do tecido pode danificar sua estrutura original e função. A transição da fase líquida para a sólida é o principal desafio para as células sobreviverem as baixas temperaturas.

Os agentes crioprotetores ou ACPs são substâncias utilizadas na preservação de tecidos ou células. Essas substâncias reduzem a taxa de formação de cristais de gelo no citoplasma das células em uma determinada temperatura; mas a condição é que esses agentes crioprotetores penetrem no citoplasma e tenham baixa toxicidade. (JAISWAL e VAGGA, 2022).

Segundo Ozimic *et al.* (2023) a criopreservação é um processo no qual os espermatozoides, por exemplo, sofrem mudanças dramáticas que podem diminuir o seu potencial de fertilização. Essas alterações estão relacionadas a dois fatores principais: a formação de cristais de gelo e a adição e remoção de ACPs. Para reter as várias características necessárias para a fertilização do óvulo, é recomendado conhecer a fisiologia completa do espermatozoide e considerar o meio no qual os espermatozoides são expostos durante a criopreservação e como esse ambiente se comporta em diferentes taxas de resfriamento.

A desidratação excessiva pode ser induzida pela concentração do crioprotetor ou pela baixa velocidade do processo resultando em lesões celulares, além disso, a formação e o crescimento do gelo durante a criopreservação podem danificar mecanicamente a estrutura biológica das células resultando em lesões por gelo (YANG *et al.*, 2020), conforme mostra Figura 1.

Figura 1 – Diagrama esquemático para dois tipos de criolesões que ocorrem em processos de criopreservação



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

Existem diversas metodologias aplicadas à criopreservação de materiais biológicos que vem sendo estudadas, porém de maneira geral é possível categorizar em dois métodos: congelamento lento ou programável e congelamento ultrarrápido (vitrificação) (LOUTRADI *et al.*, 2008).

Alguns pesquisadores têm proposto a vitrificação ultrarrápida, na qual é possível alcançar taxas de resfriamento extremamente altas, superiores a 100.000 °C/min, com pequenos volumes de materiais biológicos, diminuindo a quantidade de ACPs ou até mesmo sem a necessidade de utilização de agentes crioprotetores (MARCHESI *et al.*, 2005; SU *et al.*, 2018; AKIYAMA *et al.*, 2019).

Estudos concordam que a maioria das criolesões ocorre devido ao congelamento das células em uma velocidade de congelamento incorreta, seja muito lenta ou muito rápida. Se a velocidade for muito rápida, a água não é removida e são produzidos cristais de gelo intracelulares que podem danificar as organelas celulares; e se a velocidade for muito lenta, as células eliminam água rapidamente e desidratam (OZIMIC *et al.*, 2023).

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 ACPs. Velocidades de resfriamento mais elevadas tendem a causar o rompimento das células, devido à geração de cristais de gelo intracelular, e seu oposto, a 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).

2.1 Método de congelamento lento

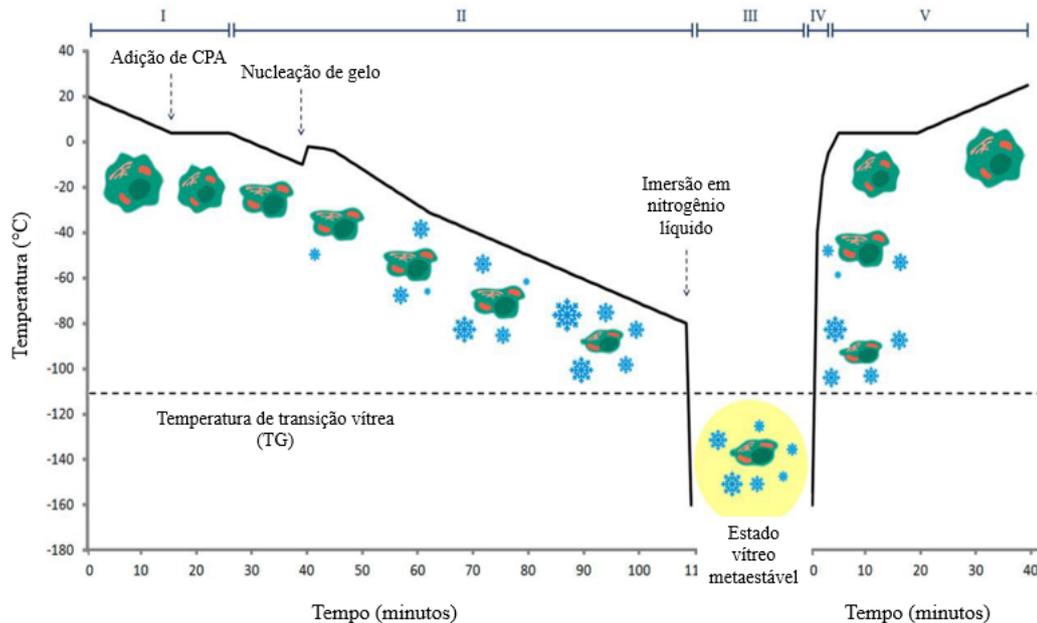
O processo de congelamento lento ocorre usualmente dentro de freezers de alta performance, com controle de temperatura. O material biológico é armazenado em um recipiente que suporta temperaturas criogênicas. O recipiente é adicionado ao sistema de refrigeração com a temperatura desejada previamente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

Em um dos primeiros estudos a respeito da criopreservação reprodutiva, Whittingham *et al.* (1972) realizaram o congelamento lento de embriões de camundongos em fases iniciais de clivagem até -196°C. Na presença do crioprotetor dimetilsulfóxido (DMSO), os autores realizaram um congelamento lento (0,3 a 2 °C/min) e um aquecimento lento (4 a 25 °C/min). Assim, foi observado que 50 a 70% dos embriões congelados e descongelados evoluíram para blastócito em cultura após armazenamento a -196°C por até 8 dias e dos aproximadamente 1000 sobreviventes transferidos para mães adotivas, 65% das receptoras ficaram fecundadas. Mais de 40% dos embriões deram origem a fetos normais.

Atualmente, as técnicas de congelamento lento evoluíram em equipamentos programáveis. Desta maneira as amostras são congeladas em um criorefrigerador programável, abaixo do ponto de congelamento, com controle das taxas de resfriamento e em etapas, juntamente com a utilização de soluções crioprotetoras. O tempo total de congelamento de amostras pode variar de 3 a 6 horas, com taxas de resfriamento de 1 a 25 °C/min. (BEHR e SHU, 2010; SHALOM-PAZ *et al.*, 2010; MENON e D'SOUZA *et al.*, 2018).

De acordo com a amostra biológica utilizada, existem diferentes maneiras de realizar qualquer processo de congelamento e criopreservação. Na figura 2 é possível ver as etapas do congelamento lento que ocorrem usualmente, variando para cada célula as taxas de resfriamento e os ACPs utilizados.

Figura 2 – Etapas do processo de criopreservação por congelamento lento: I – Adição de ACPs; II – Nucleação de gelo e decaimento térmico; III – Imersão em nitrogênio líquido; IV – Aquecimento rápido e V – Remoção de ACPs.



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

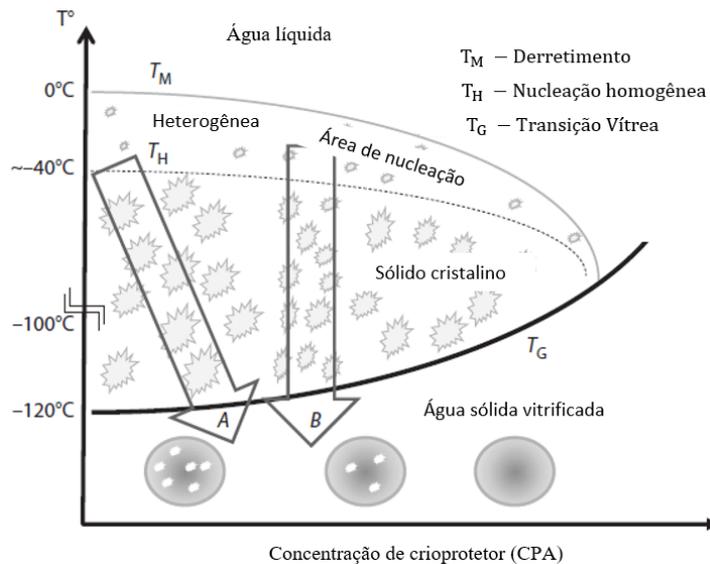
Conforme gráfico da Figura 2, inicialmente ocorre o processo de resfriamento com uma redução de temperatura, e somente por volta de 4 °C a solução de ACP é adicionada, evitando assim os efeitos citotóxicos da solução. Então a amostra é resfriada lentamente até que a nucleação do gelo ocorre, por volta de -7 °C. Depois a amostra continua seu resfriamento até - 80 °C, quando então as amostras são submersas em nitrogênio líquido, ultrapassando assim a temperatura vítrea de transição (TG), aproximadamente -160 °C, atingindo o estado vítreo metaestável. As amostras congeladas formam uma matriz solidificada composta por gelo, ACPs, soluto e uma biomassa composta por células extremamente desidratadas, sem a presença de gelo. Para reutilização das células preservadas, ocorre um descongelamento rápido, onde por volta de 4 °C ocorre a remoção dos ACPs e então a amostra estará pronta para ser utilizada novamente (GURRUCHAGA *et al.*, 2018).

2.2 Método de congelamento ultrarrápido - Vitrificação

A vitrificação é um processo físico em que a amostra biológica sofre uma transição direta do estado líquido para o estado vitrificado e amorfo, sem a presença de cristais de gelo, quando exposta a temperaturas extremamente baixas e altas taxas de resfriamento. Isto ocorre quando uma solução atinge a temperatura de transição vítrea (TG).

Quando a temperatura diminui, a água líquida pode ser convertida em um cristal sólido ou estado vítreo amorfo sólido, ou seja, a temperatura da água resfriada é instantaneamente reduzida abaixo da temperatura de transição vítrea (T_G), conforme indica a seta B da Figura 3.

Figura 3 - Diagrama de fases da água de acordo com a temperatura. As setas representam a velocidade de resfriamento e o tamanho da formação de cristais de gelo associados. A seta A representa um resfriamento menos rápido que a seta B.



Fonte: Adaptado de Vanderzwalmen *et al.* (2016).

Para evitar a formação de cristais de gelo, a amostra deve passar rapidamente pela região de instabilidade termodinâmica, ou seja, da nucleação homogênea ($T_H = -38\text{ °C}$) até a temperatura de transição vítrea ($T_G = -137\text{ °C}$), superando a taxa de resfriamento crítica da solução, pois a capacidade de evitar a nucleação de cristais dentro da célula — que pode ocorrer durante o resfriamento e aquecimento — será crucial para a viabilidade dos embriões após a criopreservação (VANDERZWALMEN *et al.*, 2016)

O processo físico pelo qual uma solução líquida superviscosa permanece super-resfriada durante a transição pela fase cristalina e alcança o estado sólido vítreo ao ser resfriada abaixo de sua T_G é chamado de vitrificação. De acordo com essa definição, com a aplicação do processo de vitrificação, a formação de cristais de gelo ainda é possível, tanto nos espaços intracelulares quanto extracelulares, mas a solidificação de uma solução líquida superviscosa que permanece super-resfriada durante o processo de resfriamento evitará essa possibilidade.

A questão fundamental em todos os métodos de vitrificação é alcançar e manter condições dentro das células que garantam um estado amorfo durante todo o processo de resfriamento, bem como durante o processo de aquecimento. Independentemente do método

utilizado que determina a taxa de resfriamento e/ou aquecimento, a chave para o sucesso, a fim de alcançar um estado vítreo, depende de um equilíbrio ótimo entre a velocidade de resfriamento, reaquecimento (tempo e temperatura) e a desidratação celular, e a penetração do ACP quando as células são expostas a soluções hipertônicas concentradas, com alta concentração de solutos em relação ao meio intracelular.

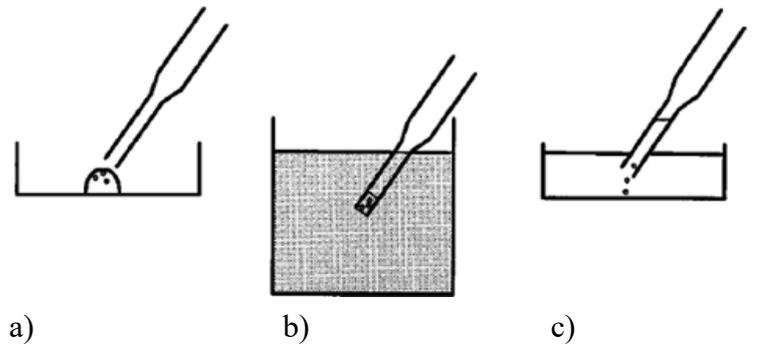
O processo de vitrificação é amplamente utilizado para preservar a viabilidade e a integridade de células, embriões e órgãos, tornando-se uma abordagem importante em áreas como reprodução assistida e preservação de material genético.

2.2.1 Método de Vitrificação por imersão com Palheta Aberta (OPS)

O método de vitrificação com palheta aberta ou *Open Pulled Straw* (OPS) é uma técnica reconhecida que envolve o congelamento rápido de células e tecidos biológicos utilizando palhetas modificadas. Vajta *et al.* (1998) descreveram o método em que utilizaram palhetas com um volume 250 μ l que são esticadas e cortadas ao meio para produzir duas palhetas OPS. Essas palhetas são termicamente amolecidas e tracionadas até atingirem um diâmetro interno e uma espessura de parede específicos, normalmente 0,8 mm e 0,07 mm, respectivamente, e um volume entre 1 e 2 μ l. Em seguida, as palhetas são resfriadas no ambiente e cortadas na ponta mais estreita com uma lâmina.

O carregamento de embriões bovinos na palheta OPS é realizado aproveitando o efeito da capilaridade, tocando a extremidade aberta da palheta em uma gota contendo as células, conforme Figura 4a. Posteriormente, essa extremidade é submersa em nitrogênio líquido, resultando na solidificação instantânea do líquido na palheta, sem perda de células (Figura 4b). Após a vitrificação, as células são aquecidas diretamente em um banho térmico a 37 °C (Figura 4c), onde o meio vitrificado rapidamente se liquefaz ao entrar em contato com o banho, permitindo que as células flutuem nesse meio para uso futuro.

Figura 4 - Método OPS: (a) Oócitos ou embriões carregados na extremidade estreita da palheta a partir de uma gota por efeito capilar; (b) Resfriamento por imersão direta em nitrogênio líquido; (c) Aquecimento: meio de vitrificação torna-se líquido e posterior sedimentação dos ovócitos ou embriões na placa de cultura.



Fonte: Vajta *et al.* (1998)

Segundo os autores, um dos principais benefícios do método OPS é sua alta taxa de resfriamento média, que pode atingir valores de 22.500 °C/min. Essas altas taxas de resfriamento são possíveis graças à geometria reduzida das palhetas OPS, que resulta em uma rápida dissipação do calor, reduzindo danos tóxicos e osmóticos às células, em oposição às palhetas sem as modificações (250 µl), que obtiveram a taxas de resfriamento na ordem 2.550 °C/min. Essa característica também permite o uso de menores concentrações de crioprotetores, melhorando ainda mais a viabilidade celular após a vitrificação.

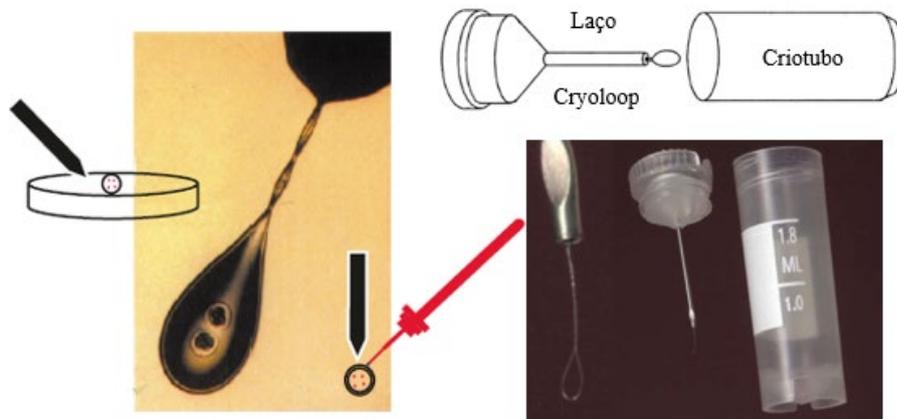
Em experimentos com embriões bovinos, o método OPS demonstrou excelentes resultados, alcançando taxas de 70% e 94% de embriões viáveis nos dias 6 e 7 após a vitrificação e descongelamento. Esses índices são significativamente superiores aos obtidos com as palhetas de 250 µl.

Segundo López-Béjar & López-Gatiús (2002), as taxas de sobrevivência embrionária, imediatamente após o descongelamento dos embriões são melhores com a utilização de OPS comparada às palhetas convencionais. Entretanto, o método OPS possui uma desvantagem, pois o meio contendo embriões fica em contato direto com o nitrogênio líquido, aumentando o risco de contaminação e tornando uma opção inviável para métodos estéreis. Este risco pode ser diminuído filtrando-se o nitrogênio líquido através de um filtro de 0,2 µl ou através de esterilização (VAJTA *et al.*, 1998). Além disso, alguns autores desenvolveram técnicas para selar as palhetas de OPS com algodão e álcool polivinílico, evitando assim a contaminação (LÓPEZ-BÉJAR & LÓPEZ-GATIÚS, 2002).

2.2.2 Método de Vitriificação em *Cryoloop* (Laço Criogênico)

O método de vitriificação através do Laço Criogênico ou *Cryoloop* foi desenvolvido por Lane *et al.* (1999) como um aprimoramento do método de vitriificação em OPS. Esse método utiliza uma alça de nylon montada em um tubo de aço inoxidável, acoplada a uma tampa de um criotubo, e permite a criopreservação de células biológicas com alta eficiência e uma taxa ultrarrápida de congelamento, em aproximadamente 5 minutos. A imagem do laço pode ser observada na figura 5.

Figura 5 - Laço de nylon do método de *Cryoloop*



Fonte: Lane et al. (1999)

Neste estudo, o processo de vitriificação via *Cryoloop* iniciou com a carga dos blastócitos em duas etapas com crioprotetores. Primeiro, os blastócitos foram expostos a uma solução crioprotetora A, contendo 10% de DMSO e 10% de etilenoglicol, durante 2 minutos. Após esse período, eles foram transferidos para a solução B, que possui 20% de DMSO, 20% de etilenoglicol, 10 mg/ml de Ficoll e 0,65 mol/l de sacarose, sendo mantidos nessa solução por aproximadamente 20 segundos.

Enquanto os blastócitos estavam na solução A, o *Cryoloop* foi imerso na solução B para criar uma fina película de crioprotetor em sua alça. Em seguida, os blastócitos foram transferidos da solução B para o *Cryoloop* e este então foi imerso em um criotubo com nitrogênio líquido e selado usando uma haste de aço inoxidável. Por fim, a amostra foi fixada em suportes e armazenada em nitrogênio líquido para preservação.

O método de vitriificação via *Cryoloop* demonstrou sucesso em estudos com blastócitos de ratos e humanos, permitindo a reutilização das células após o processo de criopreservação.

Além disso, esse método também foi aplicado em amostras de oócitos e embriões de hamsters e bovinos, com resultados promissores.

As amostras vitrificadas com *Cryoloop* mostraram significativas melhorias nas taxas de desenvolvimento, especialmente para embriões de hamsters em cultura, quando comparadas com o método de vitrificação OPS. No caso de embriões bovinos, mais de 80% dos blastócistos conseguiram expandir e eclodir após a vitrificação. Ainda, embriões bovinos de oito células vitrificadas com *Cryoloop* tiveram taxas de sobrevivência pós-aquecimento equivalentes às obtidas para embriões frescos não criopreservados.

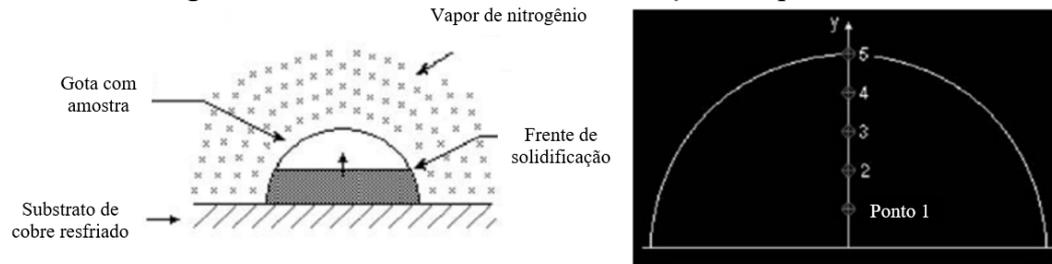
Contudo, o estudo também mostrou que oócitos bovinos são extremamente sensíveis aos danos causados pelo frio, e que poucos relatos demonstraram sucesso após a criopreservação nesse contexto.

2.2.3 Método de vitrificação por gotículas (*Droplet Vitrification*)

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

Em sua pesquisa teórica, Marchesi *et al.* (2005) se dedicaram ao estudo detalhado do processo de vitrificação através de análises computacionais fluidodinâmicas (CFD), adotando uma abordagem sem o uso de agentes crioprotetores (ACPs). Sua simulação, ilustrada na figura 6 consiste em uma gota de água depositada sobre uma placa de cobre mantida em equilíbrio térmico com nitrogênio líquido. Na simulação, as propriedades da amostra são consideradas como água e gelo, tendo em vista que os materiais biológicos apresentam altas concentrações de água. A mudança de fase de líquido para sólido é considerada na temperatura de 273 K (0 °C) com um calor latente de solidificação de 336 kJ/kg.

Figura 6 - Domínio numérico da simulação computacional.

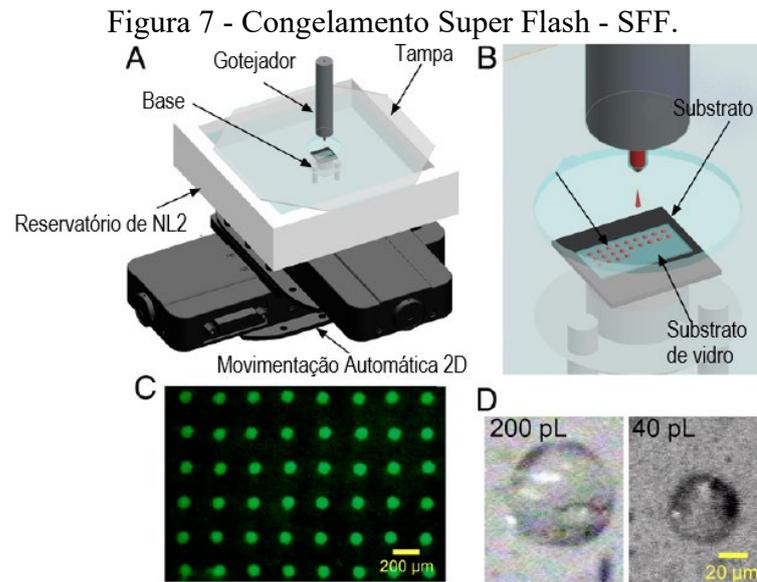


Fonte: Adaptado de Marchesi *et al.* (2005).

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 que a taxa de resfriamento dentro da amostra possui dependência espacial e temporal, variando conforme a posição dentro da amostra. Além disso, observou-se que os parâmetros que possuem maior influência na variação da taxa de resfriamento são a temperatura e espessura do substrato (ordem de 100x), onde foi possível encontrar taxas de resfriamento maiores que $150.000\text{ }^{\circ}\text{C/s}$ para gotículas de $0,26\text{ }\mu\text{l}$.

Akiyama *et al.* (2019) propuseram o Congelamento *Superflash* (SFF) para criopreservação de células de mamíferos por congelamento ultrarrápido, sem agentes crioprotetores. Utilizaram simulações numéricas via software COMSOL® para estimar as taxas de resfriamento, validadas experimentalmente. Empregaram a técnica de impressão de gotas, depositando microgotículas em temperatura extremamente baixa, alcançando velocidades de resfriamento extremamente altas, próximas à vitrificação, conforme ilustrado na figura 7.

Obtiveram taxas de resfriamento de $3,7 \times 10^4\text{ }^{\circ}\text{C/s}$, variando a espessura do substrato ($150\text{ }\mu\text{m}$ e $5\text{ }\mu\text{m}$) e o diâmetro do bocal gotejador ($60\text{ }\mu\text{m}$ e $40\text{ }\mu\text{m}$), resultando em gotículas de aproximadamente 200 pl e 40 pl . Os autores compararam o protocolo SFF com um convencional, evidenciando alta viabilidade celular para o SFF, especialmente em células pequenas, como espermatozoides e trombócitos, indicando aplicações potenciais em células-tronco e hematócitos para transfusão de sangue.



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

Estudos experimentais foram realizados por Vries *et al.* (2019) através do desenvolvimento de um sistema de vitrificação de células por gotejamento juntamente com o método de desidratação osmótica. A figura 8 mostra o aparato experimental projetado pelos autores.

Figura 8 - Método de vitrificação por gotejamento proposto por Vries *et al.* (2019).



Fonte: Vries *et al.* (2019).

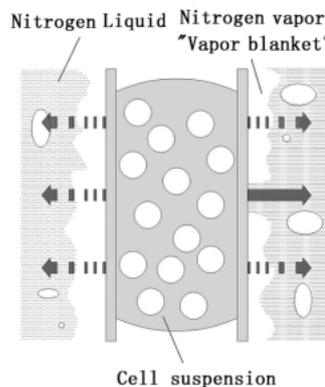
Os autores utilizaram gotículas de grandes volumes, com diâmetros de 3 e 5 mm, com baixas porcentagens de agente crioprotetor (15% em volume), de modo a minimizar a toxicidade e a perda de viabilidade da amostra. Foram alcançadas taxas de resfriamento de 1320 °C/min para gotículas com 3 mm de diâmetro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

2.2.4 Método ultrarrápido de vitrificação cinética

Os métodos mencionados anteriormente podem resultar em vitrificação completa ou parcial das amostras, porém muitas vezes exigem o uso de altas concentrações de crioprotetores. Para reduzir a concentração dos crioprotetores e, conseqüentemente, melhorar a sobrevivência celular, uma abordagem é aumentar a taxa de congelamento.

Quando o sistema contendo a amostra é imerso diretamente em nitrogênio líquido (LN2), ocorre o fenômeno conhecido como Leidenfrost. Esse fenômeno corresponde à vaporização do LN2 próximo à superfície da amostra, devido à significativa diferença de temperatura entre o nitrogênio e a superfície. Essa vaporização gera uma camada de vapor que funciona como um isolante térmico, conforme ilustra a Figura 9, e que dificulta a transferência de calor. Normalmente o coeficiente de transferência de calor convectivo é menor que $1000 \text{ W/m}^2\text{K}$ (WANG *et al.*, 2022).

Figura 9 - Desenho esquemático da camada de vapor formada em processo de resfriamento OPS



Fonte: Su *et al.* (2018)

Na tentativa de aprimorar a técnica de vitrificação, foi desenvolvido um novo equipamento, como apresentado na Figura 10, que reduz a temperatura do nitrogênio líquido para $-210 \text{ }^\circ\text{C}$ utilizando pressão negativa (Vit-Master®; Minitüb, Tiefenbach, Germany). Este procedimento pode aumentar em até quatro vezes as taxas de resfriamento ($24.000 - 130.000 \text{ }^\circ\text{C/min}$) obtidas pelo método OPS (ARAV *et al.*, 2002). O equipamento, utilizado para a produção de *Slush*, tem como objetivo evitar o efeito Leidenfrost, aumentando a taxa de resfriamento, e podendo ser adaptado a diferentes dispositivos.

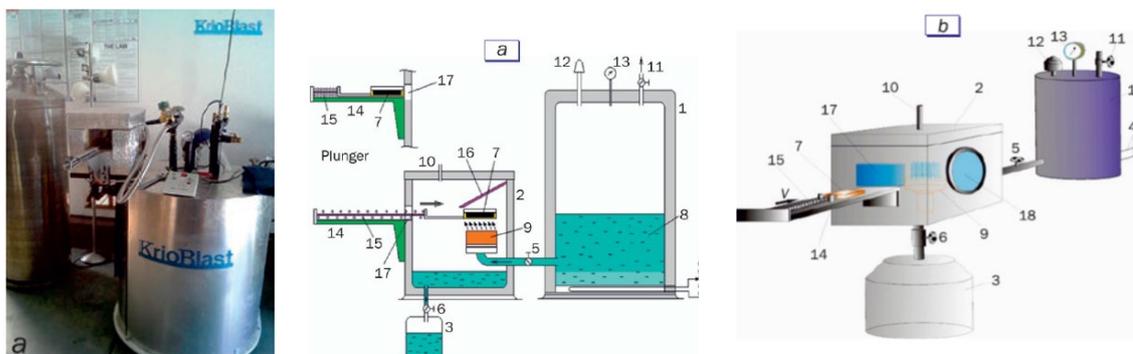
Figura 10 – Equipamento Vit-Master®



Fonte: <https://taawon.com/KSA/products/IVF&Genetics/IVFManagementTechnologies/IMTVitMasterIVFUltraRapidVitrificationSystem>

Katkov *et al.* (2018) desenvolveram um equipamento para criopreservação ultrarrápida de células tronco e espermatozoides humanos denominado KrioBlast™-2. O princípio de funcionamento do equipamento, mostrado na Figura 11, se baseia na pulverização (*spray*) de LN2 sobre a amostra com elevada velocidade (9), resultante da pressurização de um reservatório de LN2 (8). Uma resistência elétrica (4) é responsável pelo aquecimento e evaporação do nitrogênio líquido, aumentando a pressão interna no tanque. Ao abrir a válvula (5) a pressão é liberada e nitrogênio líquido *spray* incide sobre a amostra (7) realizando a vitrificação. Segundo os autores a pressão do impacto do nitrogênio líquido rompe a película de vapor na superfície resfriada, eliminando o efeito Leidenfrost.

Figura 11- Aparato instrumental do método de vitrificação cinética



Fonte: Adaptado de Katkov *et al.* (2018)

Os autores utilizaram espermatozoides humanos como amostras biológicas em uma solução de glicerol 12%. As amostras foram inseridas nos dispositivos (placas) desenvolvidos pelos autores, denominados VitriPlates™-2. Taxas de resfriamento na ordem de 100.000 a 200.000 °C/min foram atingidas e resultaram em amostras com os volumes de 1ml e 4 ml vitrificadas.

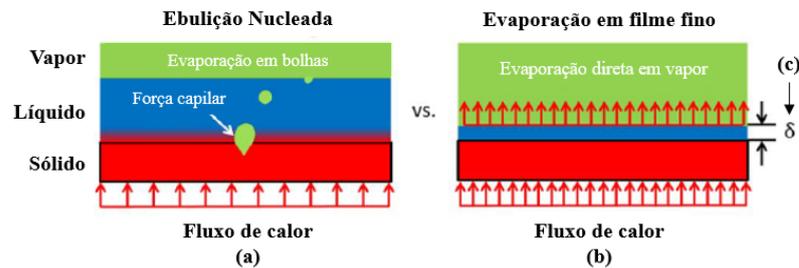
Observou-se também que durante o descongelamento lento, em banho térmico a 37°C, as amostras permaneceram transparentes durante todo o processo de aquecimento. Já utilizando o aquecimento lento ao ar após a vitrificação, as amostras se tornaram opacas devido à recristalização, resultando em perdas de viabilidade celular em comparação com o aquecimento em banho térmico.

2.2.5 Método de vitrificação por evaporação de filme fino de nitrogênio líquido

Estudos fundamentais de mecanismos de mudança de fase revelam um potencial substancial para aumentar os coeficientes de transferência de calor, passando da ebulição nucleada para a evaporação de película fina de nitrogênio líquido ou evaporação em filme fino. A ebulição nucleada ocorre em superfícies superaquecidas que estão submersas em um líquido sub-resfriado ou saturado. Sítios ou cavidades microscópicas ao longo da superfície superaquecida retêm o vapor, criando uma interface líquido-vapor onde ocorre a evaporação, que impulsiona a formação, expansão e saída de bolhas em um processo cíclico, mas requer um superaquecimento significativo para permitir que a bolha supere as pressões capilares e/ou estáticas que suprimem o crescimento da bolha (Figura 12a).

Em vez de evaporar em uma bolha - que deve crescer contra pressões capilares e estáticas e deve contar com a flutuabilidade ou um campo de fluxo para separar a bolha e transportá-la para o volume de vapor - seria mais eficiente para o líquido evaporar diretamente no volume de vapor. Contudo, na prática, a evaporação direta no vapor não ocorrerá a menos que a resistência térmica da condução direta através da película de líquido junto à base sólida seja menor que a resistência térmica da ebulição nucleada. Isto é possível à medida que a espessura da película ou filme líquido diminui (Figura 12c) à escala dos locais de nucleação, a sua resistência térmica se tornará comparável ou inferior à resistência térmica destes locais e dos processos de ebulição, causando um desvio de ebulição nucleada em direção à evaporação direta na massa de vapor. Isso é conhecido como evaporação em filme fino (Figura 12b) (MANDEL *et al.*, 2017).

Figura 12 - Diagrama esquemáticos de (a) ebulição nucleada versus (b) evaporação de filme fino (c) espessura da película de líquido



Fonte: Adaptado de Mandel *et al.* (2017).

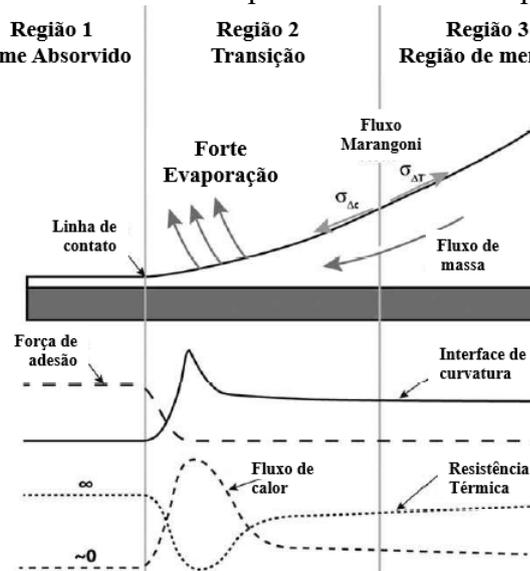
No estudo realizado por Plawsky *et al.* (2014), o objetivo foi compreender e explicar o processo de evaporação de um filme fino de líquido utilizando nano e microestruturas. De acordo com os autores, para o caso de um fluido molhante a evaporação de filme fino pode ser dividida em três regiões: região 1 de filme adsorvido/não evaporado, região 2 de transição ou região de evaporação, onde as forças atrativas do líquido no sólido são fracas e a interface líquido-vapor possui curvatura mensurável, e a região 3 de menisco, onde a curvatura da interface líquido-vapor se torna quase constante, atuando como um reservatório líquido para a região de transição, conforme mostra Figura 13.

No sentido do fluxo de massa, tem-se a região 3 que corresponde ao menisco onde as forças gravitacionais, viscosas e inerciais podem ser desprezadas devido a pequenas velocidades e escalas de comprimento envolvidas. Assim, nesta região as forças capilares dominam criando uma curvatura de interface constante, sendo o ângulo de contato a inclinação na interface líquido-vapor. Esta região atua como um reservatório que alimenta líquido para a região de transição e, devido a sua espessura do filme líquido, apresenta baixa evaporação.

A região 2 é a região de transição, onde as forças de atração entre o sólido e a interface líquido-vapor (pressão de separação) tornam-se significativas e atuam para espalhar o filme líquido devido a forças capilares e intermoleculares, quebrando o raio de curvatura constante encontrado no menisco intrínseco. Além disso, à medida que o filme se torna mais fino, a resistência à condução através do filme líquido é bastante reduzida, produzindo altas taxas de evaporação.

À medida que a espessura do filme diminui ainda mais, a pressão de separação se fortalece e atua para suprimir a evaporação devido aos efeitos combinados de forças atrativas entre o sólido e o líquido, pressão de vapor e temperatura do substrato, resultando em um filme uniformemente espesso e sem evaporação. Este intervalo (região 1) é conhecido como filme fino adsorvido.

Figura 13 – Variação na força de adesão, curvatura, fluxo de calor e resistência térmica na região da linha de contato para um menisco evaporativo.



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

O processo de transferência de calor pode ser analisado em termos destas três regiões e suas resistências térmicas associadas. No caso mais simples de um processo estático, existem três resistências em série: (1) uma resistência à condução através do substrato sólido, geralmente pequena devido à alta condutividade do material sólido; (2) uma resistência à condução através do filme líquido, que é uma função linear da espessura do filme; e (3) uma resistência à transferência de calor interfacial líquido-vapor.

A resistência interfacial depende da intensidade das forças intermoleculares e, portanto, da espessura do filme, da curvatura da interface vapor-líquido e do estado da massa de vapor. Esta resistência pode ser a dominante no sistema, especialmente para líquidos com um calor latente de vaporização muito elevado ou sistemas onde a área superficial entre o líquido e o sólido é extremamente alta. Uma representação qualitativa das resistências térmicas ao longo da evaporação menisco é mostrado na Figura 13.

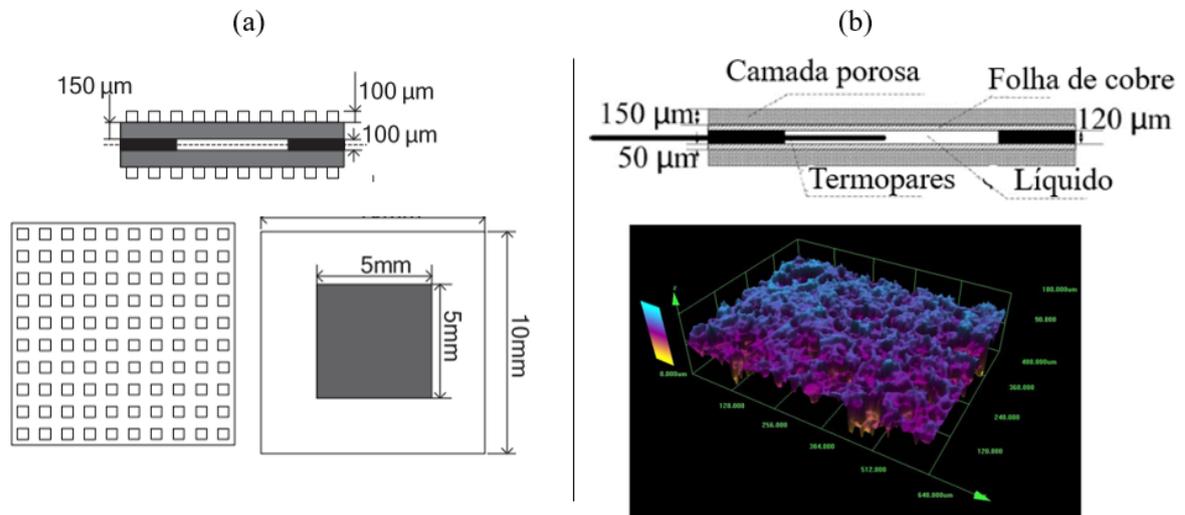
A resistência térmica global no filme adsorvido é efetivamente infinita porque não há evaporação nesta região. A resistência na região de menisco também pode ser muito alta devido a uma grande resistência de condução através da película líquida bastante espessa. A resistência térmica atinge um mínimo na região de transição. Nesta região, a espessura comparativamente fina do filme líquido impõe uma resistência de condução moderada, mas a espessura do filme é grande o suficiente para que a resistência interfacial diminua rapidamente à medida que a espessura do filme aumenta.

As resistências hidrodinâmicas são fatores que afetam o movimento de líquidos e vapores durante a evaporação, impondo limites sobre como os fluidos se comportam e impactando a eficiência do processo de transferência de calor. Um dos limites refere-se à rapidez com que novas moléculas de vapor podem ser adicionadas a um espaço já ocupado por vapor; se essa adição ocorrer muito rapidamente, pode haver acúmulo, dificultando a evaporação. Além disso, a espessura do filme líquido também apresenta um limite: se o filme for muito grosso, pode não evaporar corretamente, enquanto um filme muito fino pode se tornar instável e romper. A quantidade de líquido que pode ser fornecida à zona de evaporação é igualmente limitada, podendo ocorrer através de resistências ao movimento do líquido devido ao atrito ou por meio das forças que fazem o líquido subir ou descer em um menisco. Estruturas semelhantes a um pavio também podem limitar o quanto de líquido é transportado. Para melhorar a transferência de calor durante a evaporação, é importante aumentar a área onde a resistência à transferência de calor é menor, ao mesmo tempo que se minimizam as resistências hidrodinâmicas que dificultam o fluxo de líquido para a zona de evaporação e a remoção do vapor. Isso significa otimizar tanto a maneira como o líquido é fornecido quanto a forma como o vapor é retirado, permitindo uma evaporação mais eficiente.

Técnicas de modificação de superfície, como a utilização de superfícies microestruturadas ou microporosas, têm sido empregadas para controlar os processos de transporte no filme. A morfologia da superfície pode alterar as interações entre sólido, líquido e vapor, maximizando a região em que a mudança de fase é mais ativa. Além disso, a superfície microestruturada aumenta a área de contato sólido-líquido, o que favorece a absorção capilar e os locais de nucleação, melhorando a transferência de calor durante a mudança de fase (Maroo e Chung, 2013). Adicionalmente, a molhabilidade pode ser modificada, o que consequentemente afeta os processos de escoamento de fluido.

Alguns trabalhos utilizando a evaporação em filme fino para a vitrificação de amostras foram realizados por Su *et al.* (2012, 2017, 2018, 2019, 2020). Os autores desenvolveram aparatos experimentais para a aplicação de nitrogênio líquido *spray* sobre amostra acondicionadas dentro de um evaporador formado por dois chips de silício com microaletas no seu exterior (SU *et al.*, 2017) ou formado por duas placas microporosas (SU *et al.*, 2018), conforme apresentado na Figura 14.

Figura 14 - Esquema do evaporador constituído de duas placas aletadas de silício (a) e de duas placas microporosas de cobre (b), contendo a amostra no interior



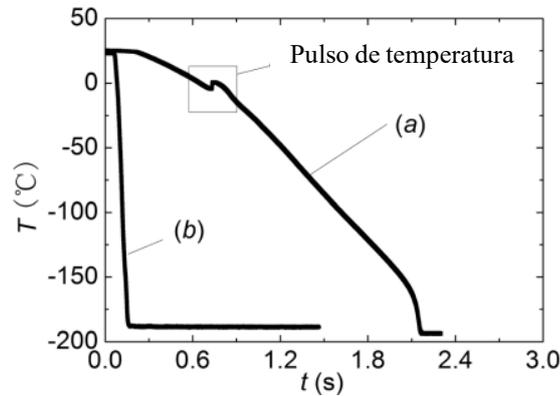
Fonte: Adaptado de Su *et al.* (2017, 2018).

Esse evaporador foi inserido dentro de uma câmara sob vácuo e jatos de nitrogênio líquido foram aplicados diretamente sobre os dois lados do evaporador. Quando o nitrogênio líquido entra em contato com a superfície microaletada ou microporosa esta produz força capilar e pressão de separação para formar uma fina película líquida na superfície e ocorre a evaporação de filme fino e o congelamento da amostra. Também ocorre a redução da formação de uma manta de vapor, que permite alcançar uma alta taxa de resfriamento.

Taxas de resfriamento maiores que aquelas utilizando o método de ebulição em vaso (*pool boiling*), onde o sistema é imerso no LN₂, são alcançadas.

A Figura 15 apresenta os resultados comparativos dos testes realizados pelos autores. Na evaporação de filme fino o processo de congelamento até a temperatura de -180 °C durou cerca de 0,074 s e no caso da imersão durou cerca de 1,75 s, para amostras do crioprotetor DMSO com volume de 3 µl utilizando concentrações de 0% a 30%; já as taxas de resfriamento encontradas foram de 150.000 °C/min e 6.500°C/min, respectivamente.

Figura 15 - Variação de temperatura ao longo do tempo para resfriamento por ebulição em vaso (*pool boiling*) (a) e evaporação em filme fino (b)

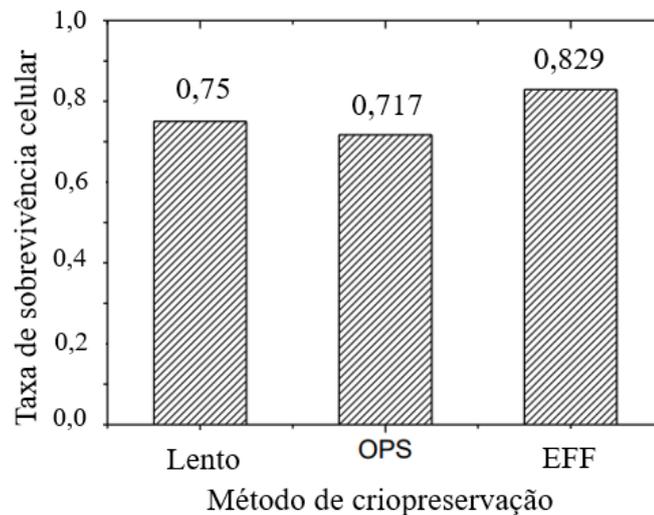


Fonte: Adaptado de Su *et al.* (2018).

Como principal resultado desses trabalhos, foi identificado que a estrutura das superfícies do evaporador apresenta um papel fundamental na transferência de calor entre o evaporador e o nitrogênio líquido, visto que a taxa de resfriamento encontrada no trabalho utilizando placas microporosas (150.000 °C/min) foi 3,4 vezes superior quando utilizado placas microaletadas (44.000 °C/min).

Quanto à viabilidade celular, testes utilizando amostras de células de ovário de hamsters em três métodos distintos mostraram resultados de sobrevivência celular superiores para o método de evaporação em filme fino (EFF) em comparação com o método OPS e o método de congelamento lento (SU *et al.* 2019), como é apresentado na Figura 16.

Figura 16 - Resultados de taxas de sobrevivência celular para diferentes métodos de criopreservação

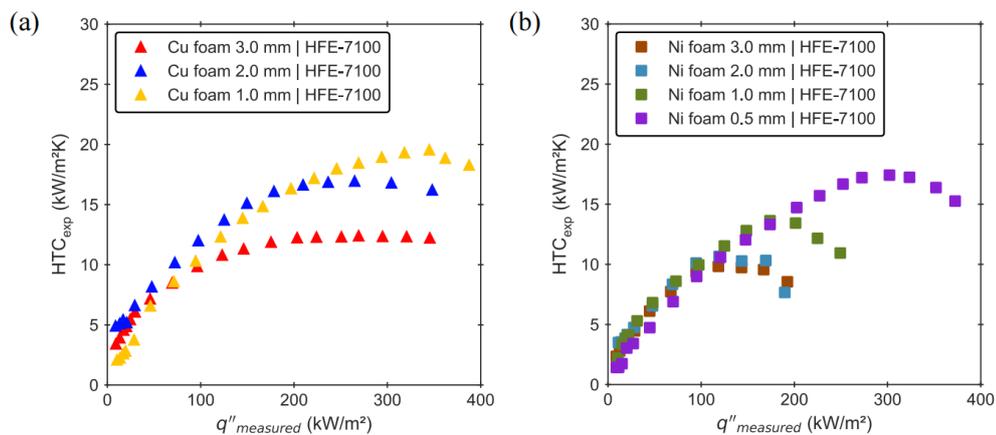


Fonte: Adaptado de Su *et al.* (2019).

Ao abordar os princípios relacionados à transferência de calor, é fundamental considerar que o aumento da superfície de contato destinada à troca térmica promove o incremento desta. Sendo assim, é interessante avaliar outras maneiras de aumentar a área de superfície do evaporador, para buscar melhores taxas de congelamento, que garantam a redução da utilização de ACPs.

Nesse contexto, Manetti *et al.* (2020) conduziram um estudo com o objetivo de investigar o emprego de estruturas porosas metálicas no processo de ebulição em vaso, visando avaliar o aprimoramento da transferência de calor. Os ensaios consistiram na ebulição de fluidos dielétricos, o etanol e HFE-7100, sobre dois tipos de estruturas porosas, uma de níquel e outra de cobre, com diferentes espessuras. As espumas de cobre apresentavam espessuras de 1, 2 e 3 mm, enquanto as de níquel foram testadas com espessuras de 0,5, 1, 2 e 3 mm. O processo de ebulição foi realizado em uma câmara com controle de pressão e temperatura, e um elemento de resistência foi utilizado para fornecer o fluxo de calor necessário para ebulição. As medições envolveram a aplicação de diferentes fluxos de calor e a subsequente determinação do coeficiente de transferência de calor para cada caso, conforme ilustrado na Figura 17. Os pesquisadores propuseram uma correlação para a ebulição em vaso (Manetti et al., 2021) baseada nos resultados experimentais, levando em consideração diferentes tipos de fluidos e variáveis relacionadas às superfícies porosas, tais como espessura, porosidade e diâmetro dos poros das estruturas.

Figura 17 - Variação do coeficiente de transferência de calor (HTC) com o fluxo de calor q'' , para diferentes espessuras das espumas de cobre, Cu (a) e de níquel, Ni (b)



Fonte: Manetti *et al.* (2021)

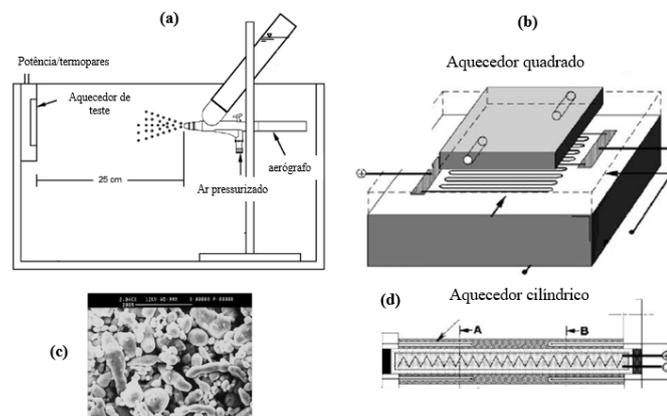
Os resultados dos experimentos indicaram que quanto menor a espessura das estruturas porosas, maior a propensão para aumento do coeficiente de transferência de calor em ambas as

situações de teste. A partir desses ensaios, foi possível estabelecer um modelo de previsão do coeficiente de transferência de calor para estruturas microporosas em estudos relacionados à ebulição em vaso. Adicionalmente, a pesquisa identificou a relevância das variações na espessura das estruturas porosas e, ainda, destacou a possibilidade de uso dessas estruturas em outras aplicações, como a evaporação de filme fino, uma vez que tendem a aumentar a superfície de contato para transferência de calor e facilitar a evaporação por meio do fenômeno capilar (Manetti *et al.*, 2020).

O estudo também incluiu uma caracterização detalhada das estruturas porosas metálicas em relação à porosidade e diâmetro dos poros. Foram comparadas porosidades variando de 0,8 a 0,98, sendo observado que valores menores de porosidade estão associados a maiores coeficientes de transferência de calor quando a taxa de calor trocada é incrementada. Quanto ao diâmetro dos poros, foram avaliados valores de 0,1 a 1, sendo evidenciado que os menores diâmetros impõem limitações à capacidade de transferência de calor, resultando em maiores coeficientes de transferência de calor para diâmetros maiores e taxas de calor mais elevadas.

Kim *et al.* (2004) desenvolveram estudos comparativos relacionados ao resfriamento de placas aquecidas com jatos de água *spray* com a utilização de superfícies microporosas e com placas lisas. Um aparato experimental, ilustrado na Figura 18, foi desenvolvido para a aplicação de *spray* de água em uma placa aquecida utilizando um aerógrafo pressurizado com 48 kPa. As vazões testadas foram de 1,25, 1,75 e 2,4 ml/min para placas aquecidas quadradas de 50 x 50 x 3,2 mm e 3,0 ml/min para placas aquecidas cilíndricas com diâmetro externo de 16 mm e comprimento de 78 mm.

Figura 18 - Aparato instrumental dos estudos de resfriamento de placas quadradas e cilíndricas por jato.



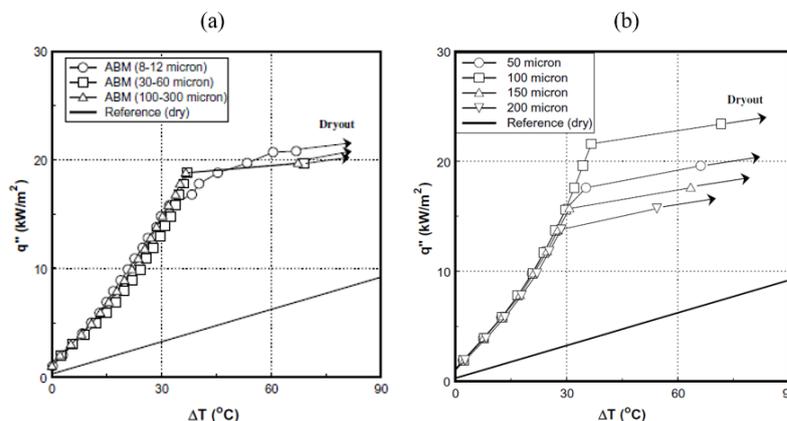
Fonte: Adaptado de Kim *et al.* 2004.

As placas quadradas e cilíndricas utilizadas no estudo foram patenteadas por O'Connor e You (1995) sendo estas beneficiadas com o material microporoso chamado ABM, composto por partículas de alumínio, composto epóxi cerâmico e metiletilcetona. A técnica de tratamento de superfície aumenta o volume de aprisionamento de vapor/gás e ativo no local de nucleação, formando uma estrutura porosa de cavidades.

Os autores testaram o comportamento do fluxo de calor para diferentes geometrias de partículas e espessuras das estruturas porosas, dentre elas: de 8 a 12 μm (espessura 50 μm); de 30 a 60 μm (espessura 150 μm); e de 100 a 300 μm (espessura 500 μm). Conforme pode ser observado na Figura 19(a) os tamanhos de partícula testados produziram curvas de transferência de calor semelhantes. O fenômeno da capilaridade deve ser mais forte à medida que o tamanho das partículas de revestimento diminui. Por outro lado, à medida que o tamanho das partículas diminui, a resistência ao escoamento do fluido no interior da estrutura porosa aumenta à medida que o tamanho das partículas diminui. Além disso, a temperatura da parede aumenta devido à resistência térmica adicional de condução à medida que a espessura da camada aumenta para um determinado fluxo de calor.

Porém, quando os autores analisaram simplesmente a variação da espessura mantendo o tamanho da partícula para 8 a 12 μm , observou-se que os revestimentos microporosos de 150 μm e 200 μm apresentaram menores incrementos no fluxo de calor se comparados com as espessuras de 50 μm e 100 μm . A espessura de 100 μm atingiu o maior coeficiente de transferência de calor dentre as espessuras testadas, conforme pode ser observado na Figura 19 (b).

Figura 19 – (a) Efeito do tamanho das partículas do revestimento microporoso no desempenho da transferência de calor do aquecedor plano. (b) Efeito da espessura do revestimento microporoso no desempenho da transferência de calor do aquecedor plano. Vazão volumétrica de água para ambos os casos de 1,75 ml/min.



Fonte: Adaptado de Kim *et al.* 2004.

O revestimento microporoso mais espesso retém mais gotas de água à medida que a espessura do revestimento aumenta devido ao maior número de cavidades microporosas. No entanto, o coeficiente de transferência de calor evaporativo degrada-se extensivamente devido à resistência térmica adicional à condução à medida que a espessura excede 100 μm .

2.3 Caracterização da vitrificação

A probabilidade (P_v) de uma substância atingir a condição de vitrificação pode ser calculada com base na relação entre suas propriedades. Essa relação envolve a taxa de resfriamento ou aquecimento (dT/dt), a viscosidade em função da concentração de ACP (μ) e o volume da solução (V). Essa abordagem é descrita na Equação (1), proposta por Yavin e Arav em 2007.

$$P_v = \frac{\left(\frac{dT}{dt}\right) \mu}{V} \quad (1)$$

Quanto maior a velocidade 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 $^{\circ}\text{C/s}$ para que não ocorra a formação de cristais de gelo (BRUGGELLER e MAYER, 1980).

Boutron (1986), caracterizou 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 ACPs. A Equação 2 apresenta a relação de Boutron para taxa de resfriamento versus cristalização, e permite prever a quantidade de cristais de gelo formados durante o processo de congelamento de uma solução.

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

onde k_4 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 é a taxa de resfriamento.

Quando se deseja uma pequena fração de gelo formado, na ordem de $x = 10^{-6}$, a equação pode ser simplificada pela Equação 3 (FAHY, 2016).

$$(dT/dt)_{cr} = 100 \frac{k_4}{3} \quad (3)$$

Boutron (1986) em seus estudos caracterizou diferentes amostras de crioprotetores e concentrações com diferentes valores da constante de cristalização k_4 , mostrado na Tabela 1.

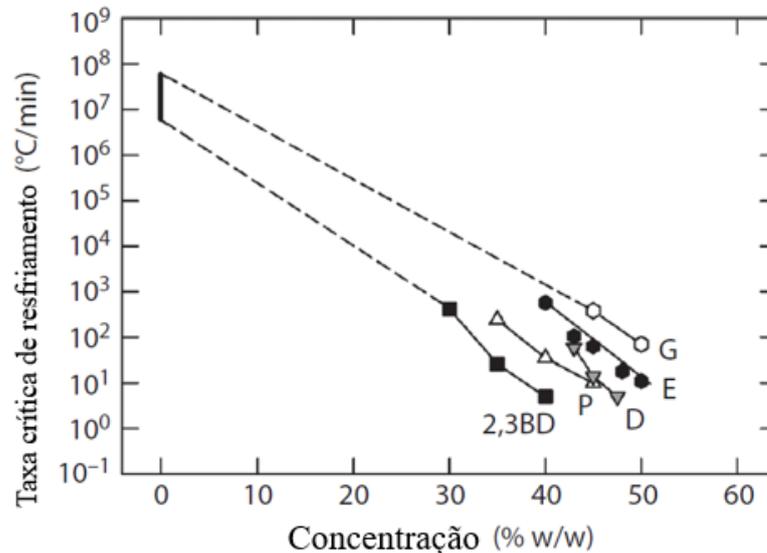
Tabela 1 - Constantes de cristalização de Boutron

	T _m (°C)	T _o (°C)	Q (kcal/mol)	k ₄ (T _o) (°C/min)
65% água, 35% 1,2 propanediol	-17,65	-31,15	12,2	515
60% água, 40% 1,2 propanediol	-22,15	-42,15	9,9	24,1
55% água, 45% glicerol	-19,15	-37,15	14	244
50% água, 45% glicerol	-23,15	-50,15	11,6	47
55% água, 45% etileno glicol	-29,65	-44,15	10	182
62,5% água, 37,5% 1,2 propanediol	-19,65	-	-	54,1
55% água, 27% 1,2 propanediol, 18% 1,3 propanediol	-24,65	-	-	14,3

Fonte: Adaptado de Boutron (1986)

Baldot e Odagescu (2004) e Baudot et al. (2000), usando a definição da taxa crítica de resfriamento, tabularam as taxas críticas de resfriamento de várias soluções crioprotetoras e água em diversas concentrações diferentes. A maioria destes resultados está expressa na Figura 20 que representa um gráfico elaborado por Fahy e Rall (2007).

Figura 20 - Taxas de resfriamento necessárias para vitrificar soluções de água/crioprotetor de 0% a 50% w/w, $x = 0,2\%$. Os rótulos das curvas designam glicerol (G), etilenoglicol (E), dimetilsulfóxido (D), propilenoglicol (P) e 2,3-butanodiol (2,3BD)



Fonte: Adaptado de Fahy e Rall (2007).

A linha vertical grossa a 0% de concentração representa a faixa estimada de taxa de resfriamento para a vitrificação de água pura (BRUGGELLER e MAYER, 1980).

2.4 Agentes Crioprotetores

Segundo Purdy (2006) agente crioprotetor (ACP) é a nomenclatura dada a qualquer substância que ofereça, temporariamente, energia, proteção aos danos ocasionados pela redução de temperatura e manutenção de ambiente favorável à sobrevivência da célula armazenada.

Os crioprotetores são substâncias de baixo peso molecular utilizadas para minimizar o estresse produzido pelo congelamento e descongelamento, especialmente o estresse induzido pela formação de gelo. Eles ajustam o ambiente celular (intra e extracelular) e previnem a formação de gelo ao abaixar o ponto de congelamento da solução e manter o ambiente extracelular na fase líquida a qualquer temperatura (mesmo abaixo de zero), aumentando a concentração total de todos os componentes presentes no meio crioprotetor. No entanto, eles são eficazes apenas em concentrações apropriadas: se a concentração for muito alta, podem ser tóxicos para as células, tornando a composição do meio crioprotetor muito importante em todas as técnicas de congelamento. Todos os crioprotetores são altamente solúveis em água e atuam diretamente na membrana, mas possuem composições químicas diferentes, podendo ser divididos em duas classes: crioprotetores permeáveis e não permeáveis. A diferença entre esses

dois grupos é se eles atravessam ou não a membrana: os crioprotetores permeáveis (intracelulares) atravessam a membrana, enquanto os não permeáveis (extracelulares) não o fazem (OZIMIC *et al.*, 2023).

Segundo Brockbank *et al.* (2007), os ACPs são utilizados para suprimir altas concentrações de sais, reduzir o encolhimento celular, reduzir o congelamento parcial da solução e reduzir a formação de gelo intracelular. Além disso, os ACPs são comumente divididos em intracelular, que é permeável às células e apresenta um baixo peso molecular, onde destacam-se como principais agentes utilizados o glicerol, etilenoglicol e DMSO (FICKEL *et al.*, 2007), e o extracelular, representado por macromoléculas com peso molecular elevado, tais como açúcares complexos (rafinose, trealose, sacarose), lipoproteínas da gema do ovo e água de coco (NUNES, 2002).

Castro *et al.* (2011) esclarecem que o sucesso do processo de criopreservação depende da utilização adequada de um agente crioprotetor considerando uma delicada e complexa relação entre fatores como tempo, temperatura de exposição, bem como a concentração e o tipo desse agente. Apesar de indispensável para o sucesso da criopreservação, nenhum dos agentes crioprotetores atualmente empregados são isentos de oferecer riscos às células. Neste sentido, inúmeros trabalhos têm sido realizados com o intuito de estabelecer as condições ideais para a utilização de um determinado crioprotetor para a conservação de um dado tipo celular ou tecido.

2.4.1 Crioprotetores Extracelulares

Os agentes crioprotetores não penetrantes aumentam a osmolaridade do meio extracelular, são responsáveis pela passagem da água do interior da célula espermática para o meio extracelular impedindo assim a formação de cristais de gelo de seu interior durante o congelamento. São moléculas de alto peso molecular como açúcares, lipoproteínas da gema de ovo, proteínas do leite e em alguns casos, aminoácidos (AMANN; PICKETT, 1987). Estes crioprotetores atuam por meio de mecanismo osmótico, promovendo a desidratação celular controlada durante o congelamento e impedindo a formação de grandes cristais de gelo no interior da célula (HOLT, 2000).

Bucak *et al.* (2007) relatam que a ação dos açúcares não penetrantes consiste em elevar a pressão osmótica, resultando na desidratação celular, com conseqüente redução da formação de gelo intracelular. Além disso, os açúcares podem interagir com os fosfolípidos da membrana plasmática, reorganizando-a e, a partir disto, aumentando a capacidade de sobrevivência celular submetidos ao processo de criopreservação.

2.4.2 Crioprotetores Intracelulares

Os crioprotetores penetrantes são solutos que atuam tanto interna quanto externamente no espermatozoide, desidratando a célula espermática devido ao efluxo de água intracelular para equilibrar o meio extracelular. Esta categoria de crioprotetores penetra na membrana celular por meio de difusão passiva, permanecendo na membrana e no citoplasma, uma vez que, semelhante aos agentes não penetrantes, atua na desidratação celular por meio do seu efeito osmótico, criando um meio hipertônico que induz a saída de água das células espermáticas (PURDY, 2006).

Holt (2000) relata que etilenoglicol, dimetilsulfóxido (DMSO), glicerol, propanodiol, butanodiol e metanol são os crioprotetores intracelulares mais comumente utilizados. A ação protetora destas substâncias é atribuída às suas propriedades coligativas e ligantes com a água, diminuindo o ponto crioscópico intracelular e, portanto, aumentando a quantidade de água que permanece no estado líquido sob baixas temperaturas, reduzindo a concentração intracelular de solutos e os danos causados pela solução.

Para a criopreservação de embriões, a inclusão do crioprotetor que permeia para dentro da célula, é essencial, segundo Kasai (2002). O mecanismo de proteção dos agentes permeantes é o mesmo, mas suas toxicidades são diferentes. Para um congelamento lento, a concentração molar do crioprotetor é limitado a 1-2 M e a toxicidade é relativamente baixa. No entanto, tratando-se de um estado onde não há um equilíbrio – a vitrificação – a concentração pode ser tão alta quanto 8 M.

2.5 Preparação da amostra seminal

A separação dos espermatozoides do plasma seminal é fundamental para diversos propósitos, incluindo testes diagnósticos, avaliações de competência funcional e recuperação para tecnologias de reprodução assistida (ART). A escolha da técnica de preparação de espermatozoides deve garantir alta qualidade espermática e eliminar fatores que possam prejudicar a fertilização. É essencial que a separação ocorra dentro de uma hora após a ejaculação para minimizar danos causados por células não espermáticas e reduzir os efeitos adversos da osmolalidade crescente.

Entre as técnicas de preparação, destacam-se a lavagem simples, a técnica de *swim-up* e a técnica de gradiente de densidade descontínua (GDD), descritas nos Apêndices 7.1, 7.2, 7.3, respectivamente. A lavagem simples pode oferecer um bom rendimento de espermatozoides,

mas não remove completamente detritos e leucócitos. A técnica de *swim-up* é eficaz na seleção de espermatozoides móveis e é recomendada para amostras normais. Já a DGC é preferida em casos de oligozoospermia, teratozoospermia ou asthenozoospermia, devido ao maior rendimento de espermatozoides móveis e sua capacidade de produzir uma preparação mais limpa, livre de contaminantes. Cada técnica apresenta suas vantagens e desvantagens, sendo crucial a escolha com base nas características da amostra e nos objetivos do procedimento.

Em conclusão, a implementação de técnicas de preparação de espermatozoides deve ser rigorosamente padronizada e adaptada às necessidades específicas de cada caso clínico ou de pesquisa, visando maximizar a recuperação de espermatozoides morfologicamente normais e funcionais, livres de contaminação e com baixa fragmentação do DNA, assegurando assim melhores resultados em ART (WHO manual, 2021).

2.6 Descongelamento e tratamento da amostra

O descongelamento de sêmen criopreservado através do método lento é um processo delicado que deve ser realizado com cuidado para garantir a viabilidade das células espermáticas. Antes de iniciar, é importante remover a quantidade necessária de palhetas ou *cryovials* (criotubos) do tanque de nitrogênio líquido ou de vapor. Esses recipientes devem ser imediatamente colocados em banho térmico a uma temperatura constante de 37 °C.

Após o descongelamento completo, a extremidade da palheta deve ser cortada com tesouras estéreis. Nesse momento, o conteúdo pode ser carregado em um dispositivo de inseminação para uso terapêutico ou expelido para avaliar a motilidade pós-descongelamento, um passo essencial para verificar a eficácia do processo de congelamento.

Em seguida, é necessário remover o crioprotetor. Isso é feito adicionando um meio de cultura antes de centrifugar o sêmen por 10 minutos a 500g. Após a centrifugação, o sobrenadante deve ser cuidadosamente removido, e o pellet de espermatozoides deve ser diluído no meio de cultura na quantidade apropriada (WHO manual, 2021).

Já para o descongelamento de amostras vitrificadas indica-se utilizar altas taxas de aquecimento, sendo uma condição necessária para a alta taxa de sobrevivência de espermatozoides congelados. Estudos relataram que a sobrevivência de espermatozoides diminuiu quando eles foram aquecidos a uma taxa abaixo do ideal (10–100 vezes) após serem congelados a uma taxa ótima (20 °C – 130 °C por minuto). Os autores sugeriram que essa diminuição na sobrevivência ocorreu devido à lesão física causada pela recristalização do gelo fora das células durante o aquecimento lento.

A taxa extremamente alta parece proteger células e embriões ao impedir a recristalização de pequenos cristais de gelo formados durante o resfriamento. Em resumo, taxas rápidas de congelamento e descongelamento são necessárias para a criopreservação bem-sucedida do esperma (HUANG *et al.*, 2022).

2.7 Síntese da revisão bibliográfica

Neste estudo foi realizado uma revisão abrangente da literatura sobre métodos de criopreservação, destacando uma carência de pesquisas experimentais no tocante ao método de criopreservação por evaporação de filme fino de nitrogênio líquido. A ausência de estudos aprofundados nesse domínio indica uma falta de entendimento sobre os potenciais benefícios e desafios associados a esse método específico.

Ao direcionar a pesquisa para a caracterização experimental do mencionado método, com foco na vitrificação de amostras e caracterização experimental do método, busca-se preencher essa lacuna no conhecimento científico. A importância clínica e social da preservação da viabilidade do sêmen para futuras necessidades reprodutivas devem ser observadas.

Os resultados desta pesquisa têm o potencial não apenas de ampliar o entendimento sobre o método de criopreservação por evaporação de filme fino de nitrogênio líquido, mas também de contribuir para o avanço da tecnologia de criopreservação, especialmente no contexto da vitrificação de amostras de sêmen humano.

3 METODOLOGIA

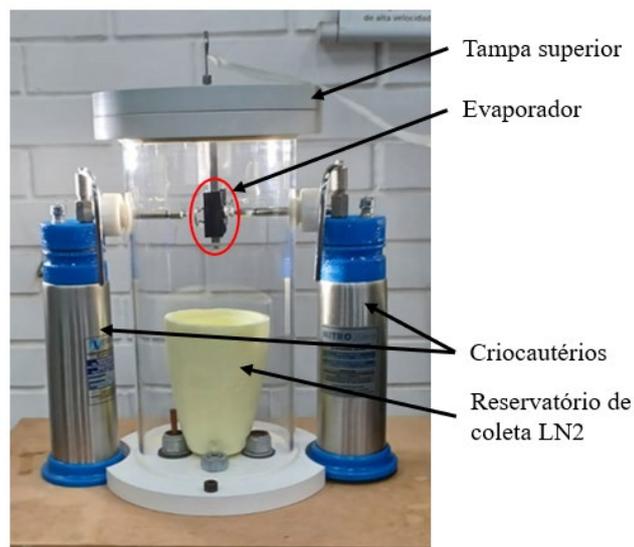
Nesta seção será descrita a metodologia utilizada neste trabalho experimental de resfriamento/congelamento utilizando o método de evaporação de filme fino de nitrogênio líquido (LN2).

3.1 Aparato Experimental

Um aparato experimental foi desenvolvido com o objetivo de realizar estudos de congelamento e vitrificação de amostras por evaporação de filme fino (EFF) de LN2.

O aparato é apresentado na Figura 21 e consiste em uma câmara de acrílico hermeticamente selada com uma tampa na parte superior, possibilitando a aplicação de vácuo. A câmara foi projetada com corpo cilíndrico em acrílico com diâmetro interno de 150 mm e espessura de 5 mm, fixado em uma base de policloreto de vinil, PVC, com quatro orifícios para conexões dos instrumentos, e em um flange superior para vedação com a tampa através de um anel o'ring. Na parte interna da câmara está posicionado o evaporador de filme fino, formado por duas placas metálicas com superfícies externas microporosas e a amostra acondicionada entre as placas. As superfícies porosas recebem os jatos de nitrogênio proveniente de dois criocautérios.

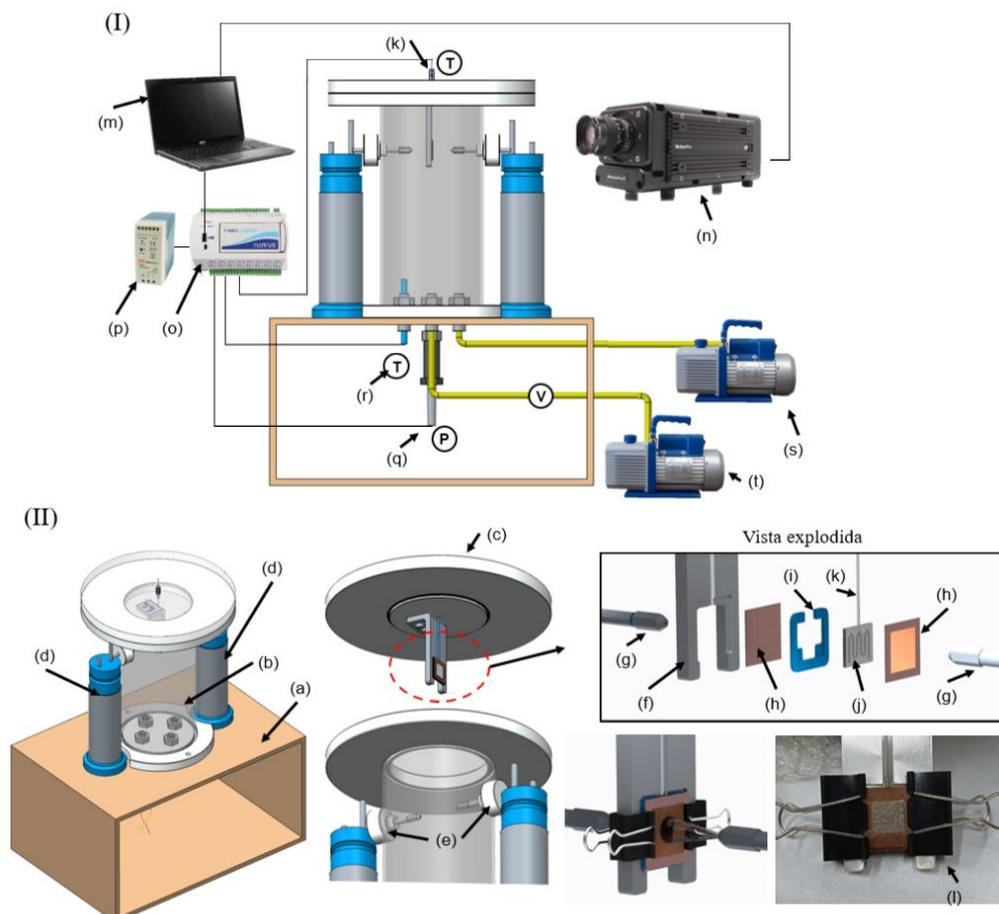
Figura 21 – Câmara para testes de resfriamento/congelamento por EFF



Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 22(I) apresenta o aparato experimental completo com a câmara de testes, bombas de vácuo (s,t), câmera de vídeo de alta velocidade (n) e sistema de aquisição de dados (m,o,p). Na Figura 22(II) são apresentados detalhes da câmara de testes (b), posicionada sobre uma mesa (a) com abertura inferior para o posicionamento da instrumentação; os criocautérios (d), cujo acionamento é manual, estão dispostos em lados diametralmente opostos à câmara, de modo que a ponteira fique a 25 mm da espuma metálica microporosa (h) e acoplados por uma haste de 8 mm de diâmetro através de um conjunto roscado de nylon (e), que garantem a vedação. Na extremidade, as ponteiros dos criocautérios são rosqueadas (g). O evaporador contendo a amostra (l) está posicionado no suporte de alumínio acoplado na tampa (f) e é constituído por placas de cobre de 0,3 mm de espessura, uma espuma porosa na parte externa (h), um espaçador em polímero poliácido láctico (PLA) (i) de mesma espessura do reservatório da amostra (3 mm), reservatório da amostra em material dimetil polissiloxano (PDMS) (j) e o termopar tipo T (k). O evaporador suspenso é preso no suporte através de presilhas, conforme mostrado em (l).

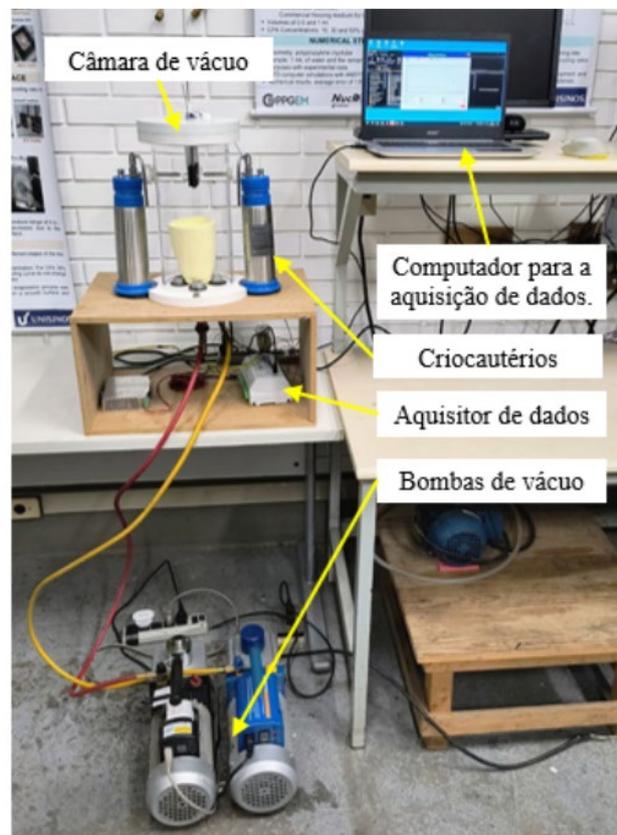
Figura 22 - Aparato experimental desenvolvido



Fonte: Elaborado pelo autor.

A instrumentação e controle da bancada de teste (Figura 22) é realizada através de um computador (m) que armazena dados de temperatura e pressão dos testes e das imagens adquiridas através de uma câmera de alta velocidade (n) Motion Pro Y4. O aquisitor de dados Novus FieldLogger (o) é alimentado por uma fonte de 24 V (p). A medição de pressão interna na câmara é realizada por um transdutor de pressão Keller (q) e as medições de temperatura são realizadas através de dois termopares tipo T do fabricante Ômega posicionados na amostra (k) e internamente na câmara (r). Os testes são realizados sob vácuo, para isto são utilizadas duas bombas EOS (s e t). A Figura 23 ilustra a bancada de testes montada no laboratório localizado nas dependências da Universidade do Vale do Rio dos Sinos - Unisinos.

Figura 23 - Fotografia bancada de testes completa



Fonte: Elaborado pelo autor.

A pressão na câmara com o evaporador deve ser reduzida abaixo da pressão de saturação do nitrogênio, antes da etapa de distribuição do LN2 sobre a superfície do evaporador. Quanto mais abaixo da pressão de saturação, à temperatura ambiente do nitrogênio, a pressão na câmara for mantida, maior será a taxa de evaporação e mais rapidamente as moléculas de vapor serão afastadas da interface líquido-vapor. A alta taxa de transferência de massa de nitrogênio faz com que a temperatura na interface líquido-vapor diminua rapidamente.

As bombas de vácuo devem ser operadas continuamente durante o experimento para remover parte do vapor de nitrogênio de dentro da câmara. A pressão dentro da câmara aumenta, do vácuo para a atmosférica, durante o teste e este aumento se deve ao vapor de nitrogênio que não foi removido, ou seja, a quantidade de nitrogênio que sai é inferior à quantidade de nitrogênio líquido evaporando dentro da câmara.

Como a resistência térmica através do filme fino de líquido é muito pequena, resulta em um maior coeficiente de transferência de calor, que, por sua vez, faz com que a temperatura do evaporador caia acentuadamente da temperatura ambiente para a temperatura de saturação do nitrogênio.

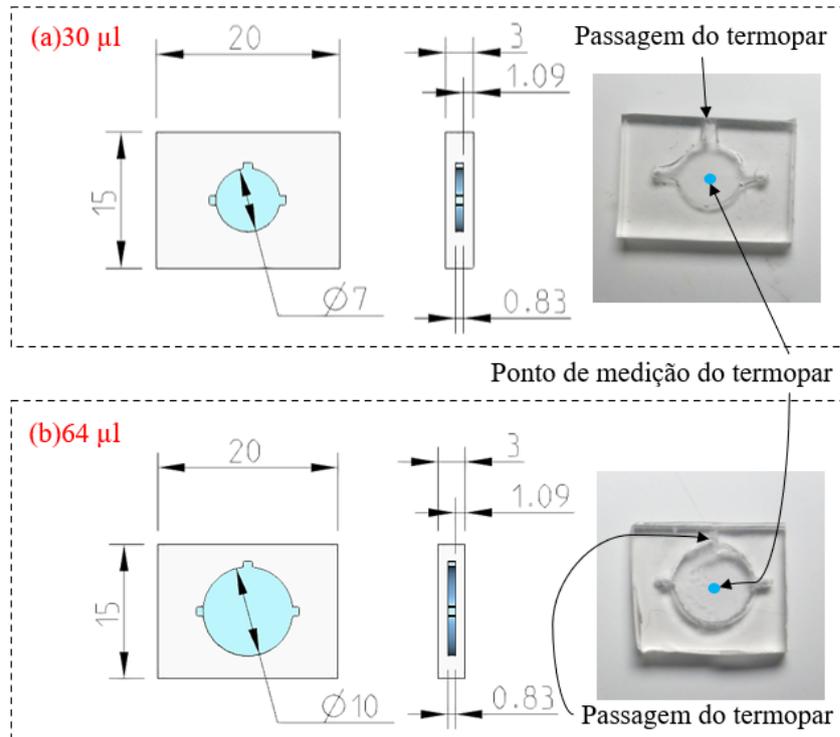
3.1.1 Reservatório da Amostra

A amostra é acondicionada em um dispositivo desenvolvido em PDMS, dimetilpolissiloxano, que se trata de um polímero orgânico à base de silício com diversas aplicações. Esse composto é transparente, inerte, não tóxico e não inflamável, tornando-o uma alternativa viável para a preservação de amostras biológicas.

Devido às suas características, o PDMS é amplamente utilizado em várias áreas, como lentes de contato, dispositivos médicos, elastômeros, xampus, alimentos, calafetantes, lubrificantes e outros materiais. Quanto às suas propriedades mecânicas, ele apresenta viscoelasticidade, comportando-se como um óleo em altas temperaturas e como uma borracha em temperatura ambiente ou negativa. Além disso, possui uma característica hidrofóbica, o que facilita o manuseio de amostras em seu interior.

Inicialmente duas geometrias de PDMS foram desenvolvidas, com volumes internos de 30 μL e 64 μL , área de troca térmica total (ambos os lados) de 77 mm^2 e 157 mm^2 respectivamente, e ambas com 3 mm de espessura, conforme mostrados na Figura 24. Os reservatórios possuem um orifício na parte superior para a passagem do termopar, que fica posicionado no centro da amostra, e dois canais nas laterais para a injeção da amostra e saída do ar contido internamente.

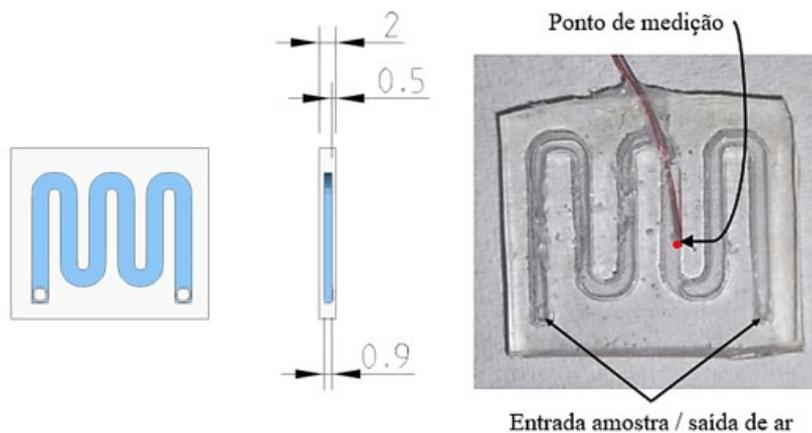
Figura 24 – Configuração dos reservatórios PDMS de (a)30 μL e (b)64 μL



Fonte: Elaborado pelo autor.

No decorrer do desenvolvimento do procedimento juntamente com equipe de pesquisa da empresa Hemocord, optou-se por redefinir a geometria do reservatório PDMS visando um aumento de capacidade interna e facilidade de introdução das amostras biológicas e preenchimento. Portanto foi desenvolvida uma geometria em formato de serpentina com capacidade interna de 150 μL e área de troca térmica total de 179 mm^2 , conforme pode ser observado na Figura 25.

Figura 25 - Reservatório PDMS 150 μL



Fonte: Elaborado pelo autor.

Embora o dimetilpolissiloxano (PDMS) apresente excelentes propriedades, sua condutividade térmica é relativamente baixa, em torno de $0,15 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{°C}^{-1}$ (MARK, 2009), especialmente quando comparada ao cobre, que varia entre 350 e $400 \text{ W}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{°C}^{-1}$. Por essa razão, foram realizados testes com reservatórios de PDMS para avaliar a influência de diferentes espessuras na otimização da taxa de resfriamento, considerando dispositivos com espessuras de 2 mm e 2,5 mm.

3.1.2 Criocautérios

Criocautérios são dispositivos predominantemente utilizados para tratamentos dermatológicos para lesões de pele, pois possibilita a aplicação de nitrogênio líquido “spray” em baixas temperaturas (-196 °C), danificando células atingidas pelo jato.

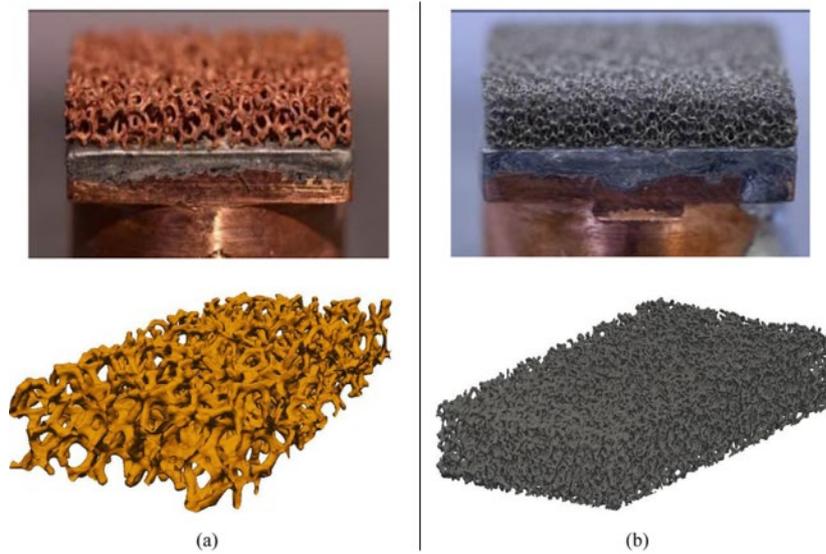
Neste trabalho foram utilizados dois criocautérios (Nitrospray) de capacidades internas de 500 ml. O acionamento dos dispositivos para a liberação dos jatos de nitrogênio líquido através das ponteiros de aplicação é realizado de forma manual através de uma alavanca disposta no topo do dispositivo.

3.1.3 Espumas metálicas do evaporador

A amostra dentro do dispositivo de PDMS foi montada entre duas placas metálicas de cobre com superfície externa revestida com espuma metálica, caracterizando a superfície microporosa onde foi realizada a evaporação do filme de nitrogênio.

Espumas metálicas de níquel e de cobre foram soldadas sobre uma placa de cobre, conforme pode ser observado na Figura 26. Essa etapa foi realizada com o auxílio do grupo de pesquisa NEST-n (Núcleo de Estudos em Transferência de Calor e Nanotecnologia), da Universidade Estadual Paulista (UNESP).

Figura 26 –Fotografia e renderização tridimensional da espuma metálica de cobre (a) e espuma metálica de níquel (b)



Fonte: Manetti *et al*, 2020.

A estrutura de metal poroso soldada à placa foi caracterizada por Manetti *et al.* (2020) e possui as propriedades apresentadas na Tabela 2, incluindo porosidade (ε), massa específica (ρ), diâmetro das células (a) e diâmetros dos poros e fibras (d_p e d_f , respectivamente).

Tabela 2 - Principais características das espumas metálicas

Espuma		Estrutura da espuma				
	MEV	ρ_{espuma} (kg/m ³)	ε (%)	a (mm)	d_p (mm)	d_f (mm)
Níquel		138 ±	98,4 ±	0,46 ±	0,25 ±	0,07 ±
		14,12	0,15	0,10	0,09	0,02
Cobre		908 ±	90 ±	1,08 ±	0,52 ±	0,09 ±
		28,63	0,32	0,24	0,22	0,04

Fonte: Elaborado pelo autor.

Além dos dois materiais que constituem as espumas microporosas, foram consideradas duas espessuras das espumas, de 1 mm e 2 mm. Portanto testes foram conduzidos para se avaliar a influência da espessura da espuma microporosa metálica na taxa de resfriamento.

3.1.4 Medições

Os experimentos consistiram em analisar a evaporação de filme fino no processo de resfriamento/congelamento através das medidas de temperatura da amostra ao longo do tempo e medição de pressão da câmara para garantir estabilidade do processo.

A medição de temperatura da amostra e da câmara durante o processo foi realizada através de termopares tipo T (0,076 mm) da marca Ômega, com incerteza de medição de 1 °C. Com a medição da temperatura no interior da amostra ao longo do tempo, é possível calcular a taxa de resfriamento, por meio da variação de temperatura ao longo de um determinado tempo, conforme Equação (4),

$$\frac{\Delta T}{\Delta t} = \frac{T_{Final} - T_{Inicial}}{t_{Final} - t_{inicial}} \quad (4)$$

onde T é a temperatura e t é o tempo.

As medidas de pressão foram realizadas com um transdutor de pressão absoluta da marca Keller 21Y, com precisão de 0,5% na faixa de 0 a 20 bar. Os dados de temperatura e pressão foram coletados pelo aquisitor de dados a uma taxa de aquisição de 20 Hz.

3.1.5 Repetibilidade do procedimento

Para a avaliação de repetibilidade dos testes e EFF foi aplicado nos conjuntos de dados, para mesmas variáveis dentro da faixa de interesse de 5 °C até -60 °C, o cálculo da correlação de Pearson e o cálculo do erro médio absoluto, sendo a primeira uma ferramenta estatística que retorna o coeficiente, de -1 a 1. Quando mais próximo de 1, maior é o grau de associação linear entre dois conjuntos de dados. A correlação de Pearson é dada pela Equação (5):

$$Correl(X, Y) = \frac{\sum(x - \bar{x})(y - \bar{y})}{\sqrt{\sum(x - \bar{x})^2 \sum(y - \bar{y})^2}} \quad (5)$$

onde $\bar{x} - \bar{y}$ são as médias de amostras das variáveis X e Y.

O erro médio absoluto (EMA) para duas séries de dados mede a diferença média absoluta entre os valores correspondentes das duas séries, sendo útil para avaliar a proximidade entre essas séries. Isso pode ser aplicado, por exemplo, para verificar se duas curvas são semelhantes ou se existe algum desvio médio entre elas. O cálculo do erro médio absoluto é dado por:

$$EMA = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n |x_i - y_i| \quad (6)$$

onde n é o número de observações em cada série, x_i é o valor da primeira série no ponto i , y_i é o valor da segunda série no ponto i , $|x_i - y_i|$ representa o valor absoluto da diferença das duas séries no ponto i .

3.2 Ajuste de condições de teste

Nesta seção serão descritos os procedimentos realizados para ajustar as condições para os testes envolvendo a evaporação em filme fino (EFF).

3.3 Testes de vazão dos criocautérios

Juntamente com os criocautérios, o fornecedor do instrumento disponibiliza 5 ponteiros de diferentes diâmetros para acoplamento na haste do dispositivo. Para melhor compreensão do processo, foram realizados testes para avaliação da vazão mássica correspondente às diferentes geometrias das ponteiros.

Para determinação das vazões mássicas de acordo com a ponteira utilizada, foram realizados os testes com o seguinte procedimento experimental:

- enchimento do criocautério até volume máximo indicado pelo fabricante, correspondendo ao peso total do equipamento de 750 ± 20 g;
- pesagem do equipamento antes da aplicação;
- acionamento manual do criocautério durante 1 minuto;
- pesagem do criocautério após a aplicação utilizando uma balança digital da marca BEL, modelo M500 com faixa de incerteza de ± 1 g.

A vazão mássica é obtida através da relação entre o consumo de nitrogênio e o tempo de aplicação, conforme Equação (7).

$$\dot{m} = \frac{\text{massa inicial} - \text{massa final}}{\text{tempo de acionamento}} \quad (7)$$

Para cada ponteira foram realizados 4 testes, sendo o valor final de vazão mássica a média aritmética dos resultados, conforme mostrado na Tabela 3.

Tabela 3 - Testes de vazões dos criocautérios

Diâmetro da ponteira de aplicação (mm)	Média aritmética das vazões mássicas (g/s)
0,6	0,32± 0,033
0,7	0,44 ± 0,033
0,8	0,55 ± 0,033
1,0	1,13± 0,033

Fonte: Elaborado pelo autor

Durante a execução dos testes utilizando vácuo na câmara observou-se que o acionamento dos criocautérios utilizando as ponteiras de diâmetros de 0,8 e 1,0 mm resultaram em um aumento brusco da pressão, visto que estas ponteiras produzem maiores vazões mássicas. Com isso as bombas de vácuo não conseguiram remover o vapor de nitrogênio no interior da câmara, acarretando um rápido aumento da pressão assim que os criocautérios foram acionados, ou seja, o vácuo interno na câmara não se manteve por um período suficiente que permitisse a evaporação do nitrogênio em filme fino.

Observou-se que a ponteira de 0,7 mm possibilitou que a pressão se mantivesse abaixo da atmosférica durante aproximadamente 26 s de acionamento, enquanto a ponteira de 1,0 mm foi de 3 segundos.

Ponteiras iguais ou menores que 0,6 mm, produziram baixa vazão de nitrogênio e embora possibilitem manter a pressão abaixo da atmosférica na câmara por mais tempo, resultaram em um processo bastante lento.

Assim, a ponteira de 0,7 mm foi escolhida para utilização nos experimentos com amostras de soluções de ACPs, que serão utilizadas inicialmente, e logo com a amostra biológica.

3.4 Procedimento de testes de evaporação de filme fino

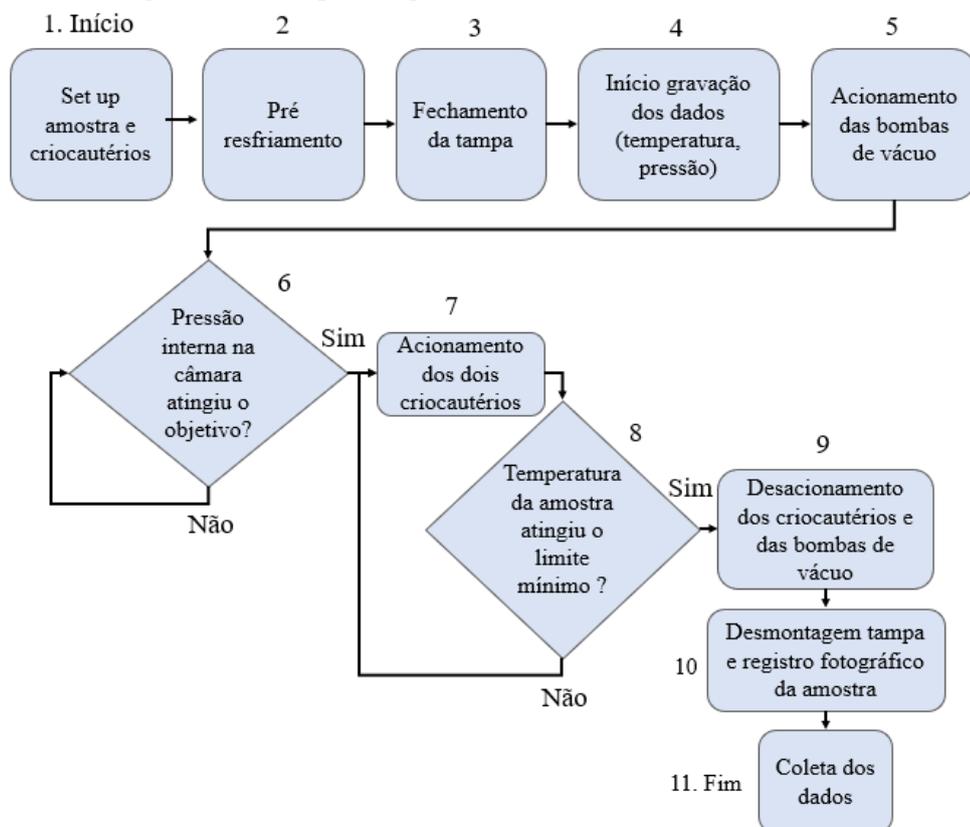
A Figura 27 apresenta as etapas para realização dos testes para resfriamento utilizando EFF. Conforme pode ser observado em (1), a etapa inicial é a preparação das amostras e dos

criocautérios; sendo este último preenchido com volume máximo estabelecido pelo fabricante, correspondendo a um peso total de cada criocautério de $750 \pm 20\text{g}$.

O pré-resfriamento das ponteiros dos criocautérios (2) é realizado com o acionamento sem a amostra durante 10 s com o objetivo de diminuir a diferença de temperatura entre as ponteiros e o nitrogênio no início do resfriamento. Imediatamente após o pré-resfriamento, a tampa da câmara com a amostra é inserida (3), iniciando-se o registro dos dados (4) e o acionamento das bombas de vácuo (5), levando a pressão até $16 \sim 19\text{ kPa}$. Assim que a pressão atinge este valor é realizado o acionamento dos criocautérios de forma manual (7) até que a temperatura se estabilize em valores mínimos (na ordem de -180 °C). Durante o processo de resfriamento se registra em vídeo o processo de evaporação do nitrogênio na superfície microporosa com a câmera de alta velocidade.

Após o resfriamento máximo da amostra é realizado o desligamento das bombas de vácuo e o desacionamento dos criocautérios (9), seguido pela retirada da tampa, registro fotográfico da amostra (10) e coleta dos dados (11).

Figura 27 - Fluxograma das etapas do procedimento de testes do resfriamento com vácuo

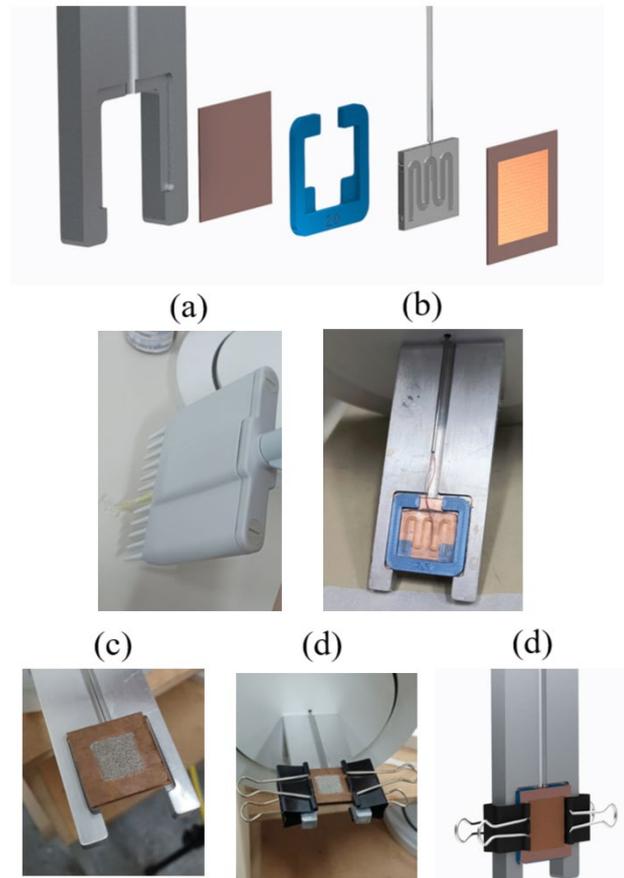


Fonte: Elaborado pelo autor.

3.5 Preparação do Evaporador e das amostras

A preparação para montagem do evaporador da amostra segue os passos apresentados na Figura 28, iniciando pela remoção da tampa superior com o suporte da amostra. Após realiza-se a montagem da placa porosa no suporte da amostra e o posicionamento da moldura sobre a placa porosa. O reservatório da amostra de PDMS é previamente preenchido (a) utilizando uma micropipeta ou seringa com a solução e concentração escolhida e com o termopar inserido na parte central interna (b). Fechando o conjunto, este é montado sobre a moldura da segunda placa porosa (c). Para fixar o evaporador no suporte são colocadas presilhas nas laterais(d).

Figura 28 – Evaporador da amostra



Fonte: Elaborado pelo autor.

Com a finalidade de garantir a padronização e confiabilidade dos experimentos, todos os testes foram realizados com temperatura e umidade do laboratório controladas através de ar condicionado em torno de 25 °C e 40%, respectivamente. Além disso se adotou o procedimento de secagem do condensado proveniente do teste anterior que surgia no interior do reservatório,

bicos, hastes dos criocautérios, placas microporosas e demais componentes utilizando papéis absorventes e soprador térmico.

Os testes de evaporação de filme fino realizados podem se dividir em dois tipos:

- Os testes de avaliação paramétrica com o objetivo de se investigar os mecanismos e parâmetros que conduzem ao aumento da taxa de resfriamento e à vitrificação, utilizando amostras de glicerol em diferentes concentrações e amostras com 1mol de sacarose, 35%v/v Glicerol, 1%v/v albumina humana e 64%v/v HTF;

- Os testes com material biológico, sêmen, utilizando amostras juntamente com o meio e crioprotetores ou utilizando somente soluções crioprotetoras voltadas a aplicação de criopreservação.

3.6 Testes de avaliação paramétrica

Os testes de avaliação paramétrica para o método de evaporação de filme fino foram realizados em ambiente de laboratório nas dependências da Universidade. A preparação das amostras foi feita utilizando a solução tampão salina com fosfato (PBS) juntamente com diferentes concentrações de glicerol (intracelular) para os testes 1 a 5, já para o teste 6 foi utilizado a solução com 1mol de sacarose, 35%v/v Glicerol, 1%v/v albumina humana e 64%v/v HTF; e avaliou-se o efeito da variação de alguns parâmetros nas taxas de resfriamento, no aspecto visual das amostras e na vitrificação, que foram:

1. O efeito do pré resfriamento;
2. O efeito das concentrações de glicerol de 30% e 50%;
3. O efeito dos volumes dos reservatórios da amostra de 30 μ L e 64 μ L;
4. O efeito dos materiais das espumas metálicas microporosas de níquel e cobre;
5. O efeito das espessuras das espumas metálicas microporosas de 1 e 2 mm;
6. O efeito das espessuras dos reservatórios PDMS de 2 mm e 2,5;

3.7 Avaliação de Soluções de Crioprotetores

Utilizando os parâmetros que resultaram nas melhores taxas de resfriamento nos testes de avaliação paramétrica, novos testes foram conduzidos utilizando como amostras soluções com o meio de criopreservação HTF (*Human Tubal Fluid*), uma solução estéril e tamponada, com os crioprotetores sacarose (extracelular), glicerol (intracelular) e albumina humana, para avaliar

possíveis crioprotetores e concentrações para os testes com as amostras biológicas. A Tabela 4 mostra composição das soluções testadas.

Tabela 4- Soluções Crioprotetoras testadas

Solução	Sacarose mol/l	Glicerol % v/v	Albumina Humana % v/v	HTF % v/v
S1	0,5	28	1	71
S2	0,5	35	1	64
S3	1,0	28	1	71
S4	1,0	35	1	64

Fonte: Elaborado pelo autor

3.8 Testes com Amostra Biológica

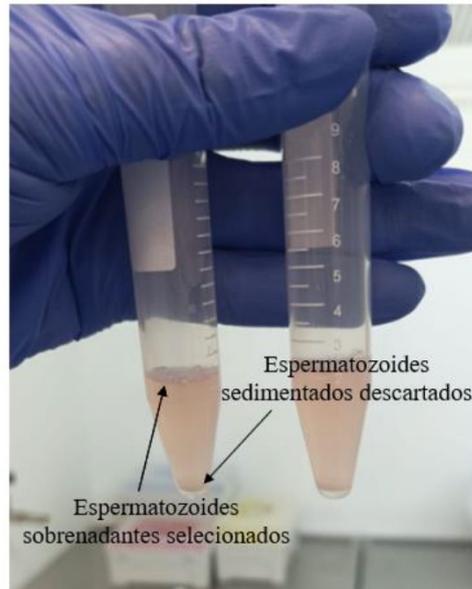
3.8.1 Preparação das amostras

Os testes com sêmen foram conduzidos no laboratório da empresa Hemocord-Biotecnologia, localizado em São Leopoldo. O processamento do sêmen seguiu as diretrizes atualizadas do manual da OMS para exame e processamento de sêmen humano voltado para vitrificação (WHO, 2021).

A coleta foi realizada em conformidade com as boas práticas para processamento de sêmen, envolvendo voluntários saudáveis que mantiveram uma abstinência sexual mínima de 3 dias e utilizaram um recipiente estéril. O tempo decorrido entre a coleta e o congelamento foi inferior a 2 horas para prevenir a perda de motilidade dos espermatozoides.

Após a coleta, as amostras foram analisadas para avaliar motilidade, viabilidade e concentração espermática. Até o início da preparação do swim-up, o sêmen foi mantido em uma placa aquecida a 37 °C, preservando sua motilidade e viabilidade. A seleção dos espermatozoides foi realizada exclusivamente pelo método de swim-up (Figura 29), conforme descrito no Apêndice A.

Figura 29- Processo de preparação da amostra seminal pelos métodos de *swim-up*.



Fonte: Modificado de Silva (2024)

Para a preparação do swim-up, as amostras de sêmen foram colocadas em tubos Falcon, cada um com 1 ml de sêmen. Na parte superior de cada tubo, foram adicionados 300 μ l do meio HTF (Human Tubal Fluid) modificado (FUJIFILM Irvine Scientific®) para promover a migração dos espermatozoides móveis. Os tubos foram incubados por 1 hora em estufa a 37 °C. Em seguida, o sobrenadante celular foi cuidadosamente recolhido e centrifugado a 1200 rpm por 10 minutos, obtendo-se um pellet contendo os espermatozoides selecionados (Figura 29). Esse pellet foi então combinado com o meio de vitrificação para os testes subsequentes.

A solução para os testes foi preparada utilizando 2 ml do meio HTF modificado, testando-se duas concentrações de sacarose: 0,5 mol/l e 1 mol/l, respectivamente, junto com 0,1 ml de albumina humana e glicerol (35%). Outra solução foi preparada com 0,25 mol/l de sacarose e 0,1 ml de albumina humana.

Após a separação do plasma seminal e a seleção dos espermatozoides, as amostras foram novamente analisadas para verificar a motilidade e a concentração espermática, garantindo que os parâmetros estivessem de acordo com as recomendações da OMS.

Também foram realizados testes utilizando o meio específico para congelamento de sêmen, o TYB (FUJIFILM Irvine Scientific®), contendo proteína de gema de ovo, glicerol e gentamicina. Após a técnica de swim-up, o sobrenadante, contendo uma porção de líquido seminal, foi recolhido, totalizando 1 ml. Esse volume foi então misturado com 1 ml do TYB, obtendo-se uma proporção de 1:1 para o congelamento.

3.8.2 Procedimento Experimental com Amostras Biológicas

Os testes de evaporação de filme fino com amostra biológica foram realizados utilizando os resultados da avaliação paramétrica, que maximizassem as taxas de resfriamento, utilizando o reservatório PDMS de 150 μ L. O procedimento experimental com amostras biológicas pode ser dividido em duas etapas:

- a primeira foi a etapa de congelamento de amostras destinadas a análises de viabilidade e motilidade, ou seja, sem a coleta de dados de temperatura ao longo de cada teste;

- a segunda etapa foi a de congelamento de amostras com sensor de temperatura no interior do reservatório PDMS, possibilitando o registro da temperatura no decorrer do processo de congelamento.

Devido à impossibilidade de realizar-se leitura de temperatura das amostras que serão posteriormente removidas do aparato instrumental para armazenamento criogênico (etapa 1), admitiu-se que o perfil de decaimento térmico da amostra com leitura de temperatura é o mesmo que a amostra sem leitura de temperatura, destinada à análise de viabilidade e motilidade.

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 -196 °C. Depois de um período de 1 semana de armazenamento, as amostras foram aquecidas, em banho térmico com temperatura de 37 °C, e as análises de motilidade e viabilidade foram realizadas para verificar o sucesso dos procedimentos de criopreservação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os resultados são apresentados conforme os testes foram realizados. Inicialmente para avaliar e estabelecer as melhores condições e parâmetros que influem na taxa de resfriamento e no processo congelamento/vitrificação, logo foram realizados testes com diferentes ACPs e e, finalmente, com o material biológico, o sêmen.

4.1 Avaliação paramétrica

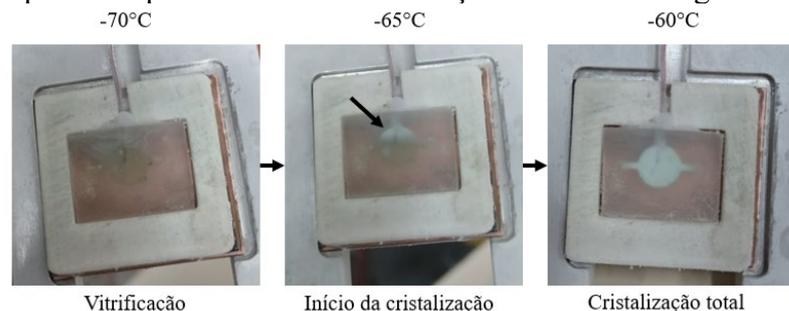
Os resultados apresentados a seguir foram realizados com amostra de solução de glicerol a 50% (v/v) diluída em solução salina PBS, em um dispositivo de PDMS circular de 3 mm de espessura.

4.1.1 Avaliação da desvitrificação

Testes foram realizados utilizando uma solução de glicerol a 50% (v/v) diluída em solução salina PBS, dentro de um dispositivo circular com 30 μ l de volume e 3 mm de espessura. Essas amostras foram submetidas ao processo de evaporação de filme fino (EFF) para caracterizar e diferenciar as temperaturas de amostra vitrificada e congelada, sendo realizada no processo de aquecimento. Observou-se que a amostra apresentava um aspecto vitrificado a -70 °C, enquanto se tornava totalmente congelada a -60 °C, devido ao aquecimento gradual e não forçado, conforme mostra a Figura 30. Portanto, conclui-se que, para a concentração de glicerol testada, a faixa mínima necessária para a vitrificação é de -70 °C a -60 °C.

O mesmo foi observado para outras soluções crioprotetoras vitrificadas, porém em faixas superiores a do glicerol.

Figura 30 - Etapas e temperaturas da desvitrificação da amostra de glicerol 50% e 30 μ l.

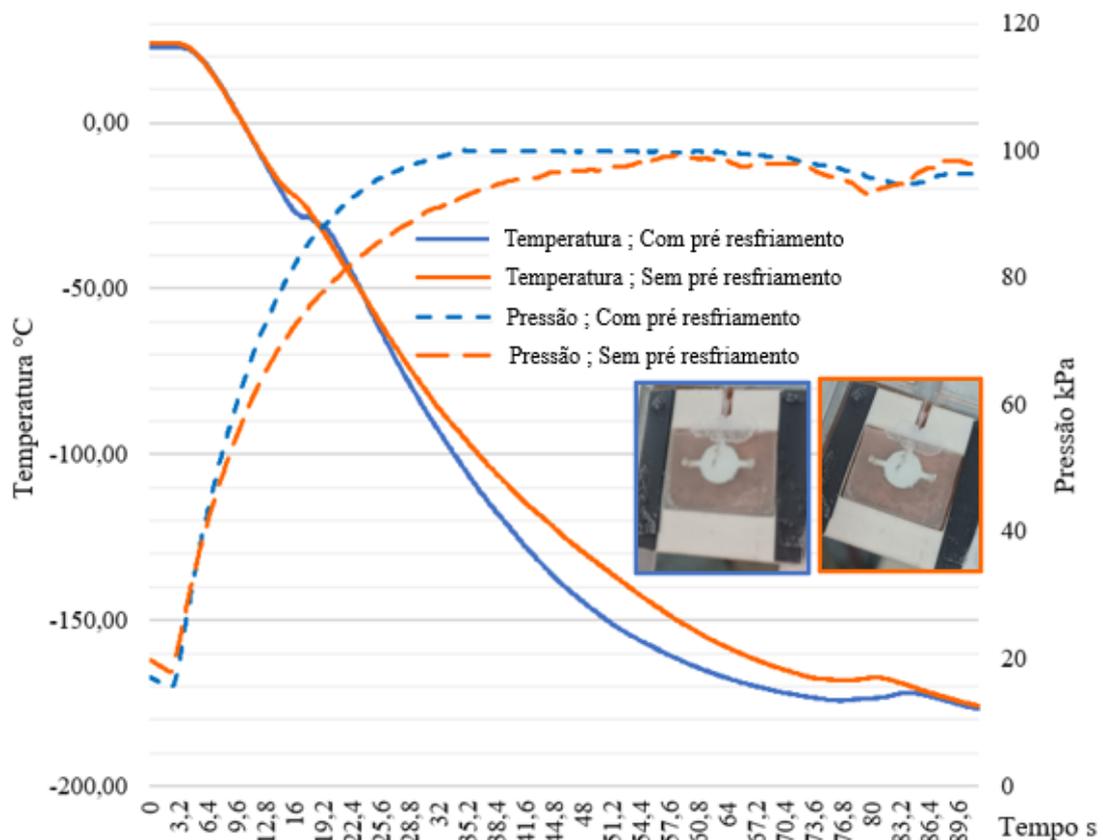


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.2 Pré-resfriamento da câmara de testes e do sistema de injeção de nitrogênio

Ao avaliar-se a influência do pré-resfriamento do sistema no processo de resfriamento das amostras, observou-se que até a temperatura de $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ não há influência sobre a taxa de resfriamento, visto que o comportamento das curvas é semelhante, conforme mostra Figura 31. Taxas de resfriamento mais altas foram observadas no teste com utilização de pré-resfriamento a partir da temperatura citada até o final do congelamento. Os resultados se mantiveram semelhantes entre outros dois testes em duplicata. Por este motivo optou-se por realizar os testes seguintes utilizando pré-resfriamento das ponteiros e tubos dos criocautérios e do ambiente da câmara.

Figura 31 – Efeito do pré-resfriamento do sistema na variação de temperatura e pressão para amostra de Glicerol 30%v/v, volume do reservatório de $30\text{ }\mu\text{L}$ (espessura 3 mm) e espuma microporosa de níquel nos testes de EFF



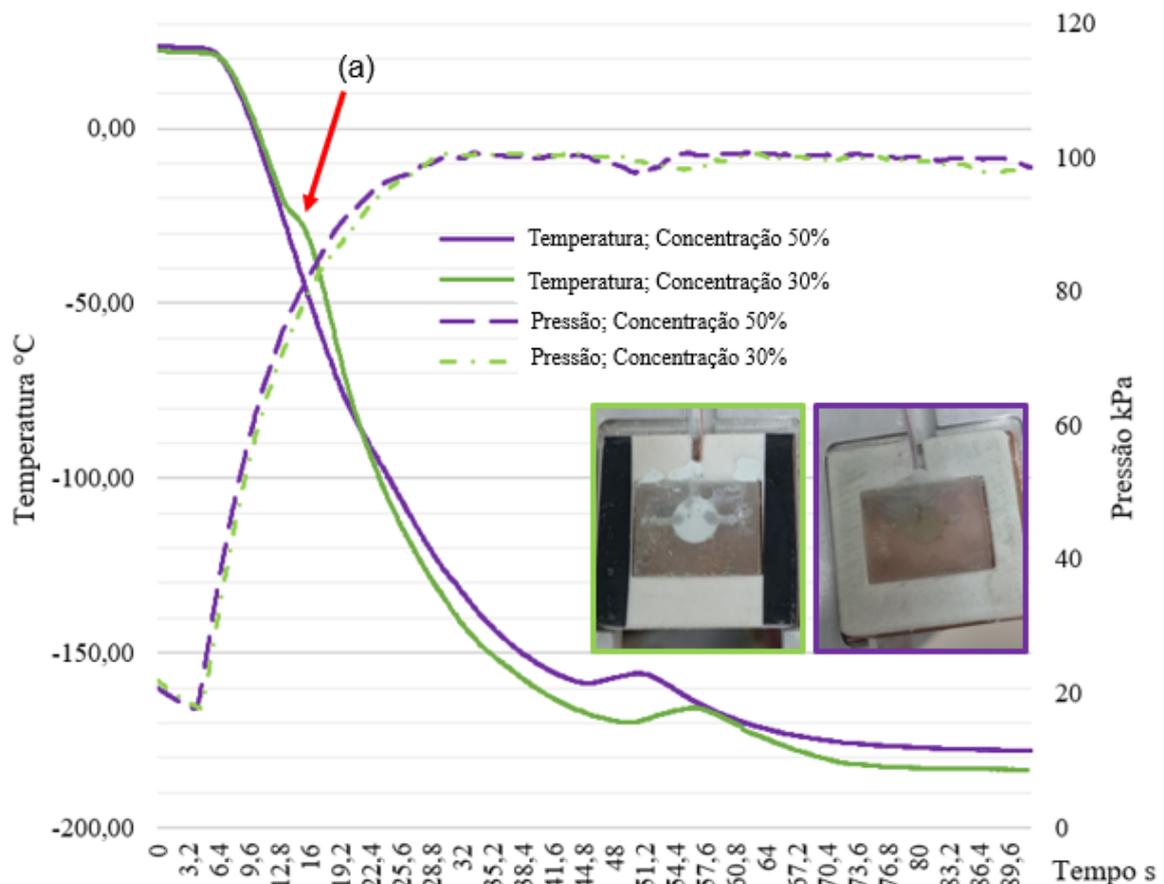
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.3 Influência da concentração de ACP na vitrificação

Ao avaliar-se a influência da concentração do crioprotetor glicerol observou-se que taxas de resfriamento similares foram obtidas entre os dois testes (30%v/v – 435 °C/min e 50%v/v – 490 °C/min), conforme pode ser observado na Figura 32, porém houve vitrificação para a amostra com a concentração de 50%v/v, enquanto amostra de 30%v/v cristalizou.

Observou-se também que as curvas resultantes de testes com amostras cristalizadas apresentaram uma pulsação característica, que pode ser observada nas Figura 32(a) e 33(a), a qual também foi evidenciada por Su *et al.* (2018) para processos onde há baixa velocidade de congelamento, como na ebulição em vaso (*pool boiling*), devido à passagem do calor sensível para o calor latente da amostra relacionada com a mudança de fase.

Figura 32 – Efeito da concentração de Glicerol na variação de temperatura e pressão com amostras de 50%v/v e 30%v/v, volume do reservatório de 30 μ L (espessura 3 mm), espuma microporosa de cobre e pré-resfriamento nos testes de EFF



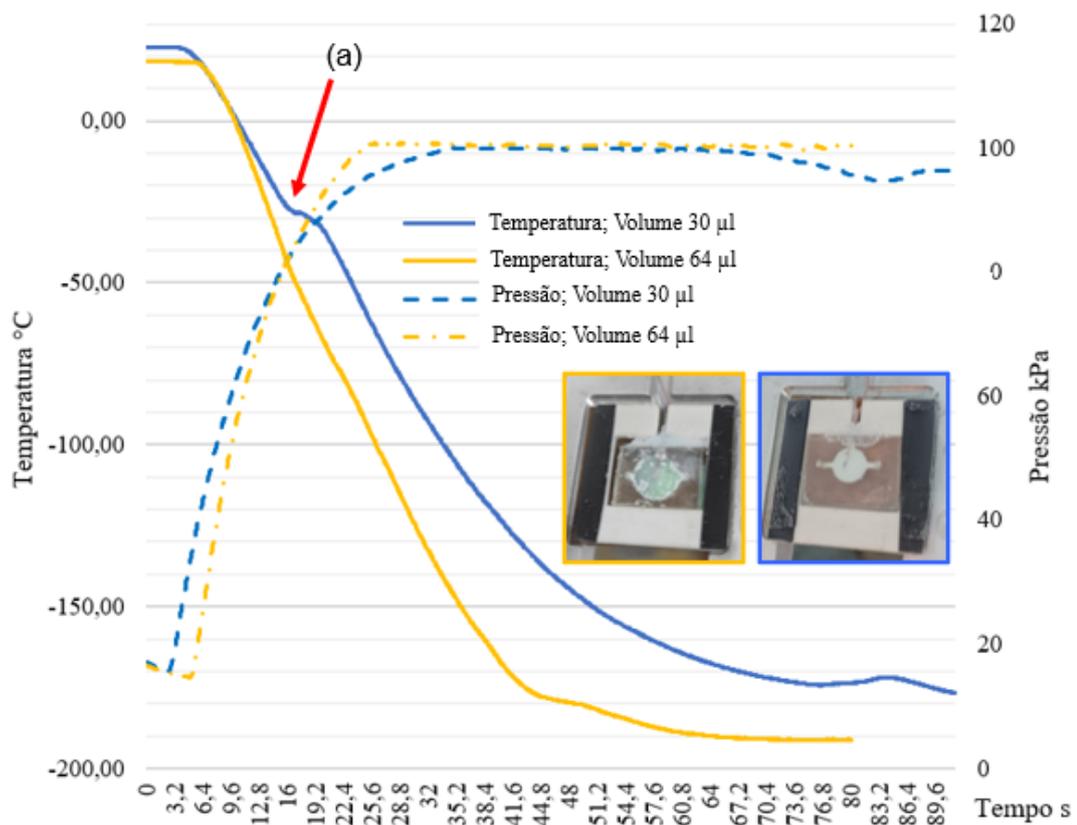
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.4 Influência da geometria do dispositivo circular

Reservatórios circulares de PDMS de 30 μl e 64 μl com amostra de glicerol 30%v/v foram testados e observou-se amostras totalmente cristalizadas para o menor volume, ao contrário do maior volume do reservatório onde amostras foram parcialmente vitrificadas, conforme pode ser observado na Figura 32. Isso se deve ao aumento da área de troca térmica da amostra de PDMS com a placa microporosa, visto que a amostra de maior volume possui também maior diâmetro da geometria circular, conforme mostra Figura 24, correspondendo a um aumento da área de troca térmica de aproximadamente 104 %. Ambas as amostras possuem mesma espessura de parede.

Evidenciou-se também que para o teste com amostra de 64 μl não houve a presença da característica de pulsação da curva de temperatura, citada anteriormente, e foram obtidas maiores taxas de resfriamento em comparação com o teste com amostra de 30 μl , de 412 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ e 246 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, respectivamente, um aumento de aproximadamente 67,48%.

Figura 33 – Efeito da geometria do dispositivo circular na variação de temperatura e pressão, com volumes de 30 μL e 64 μL (espessura 3 mm) utilizando Glicerol, espuma microporosa de níquel e pré-resfriamento, nos testes de EFF

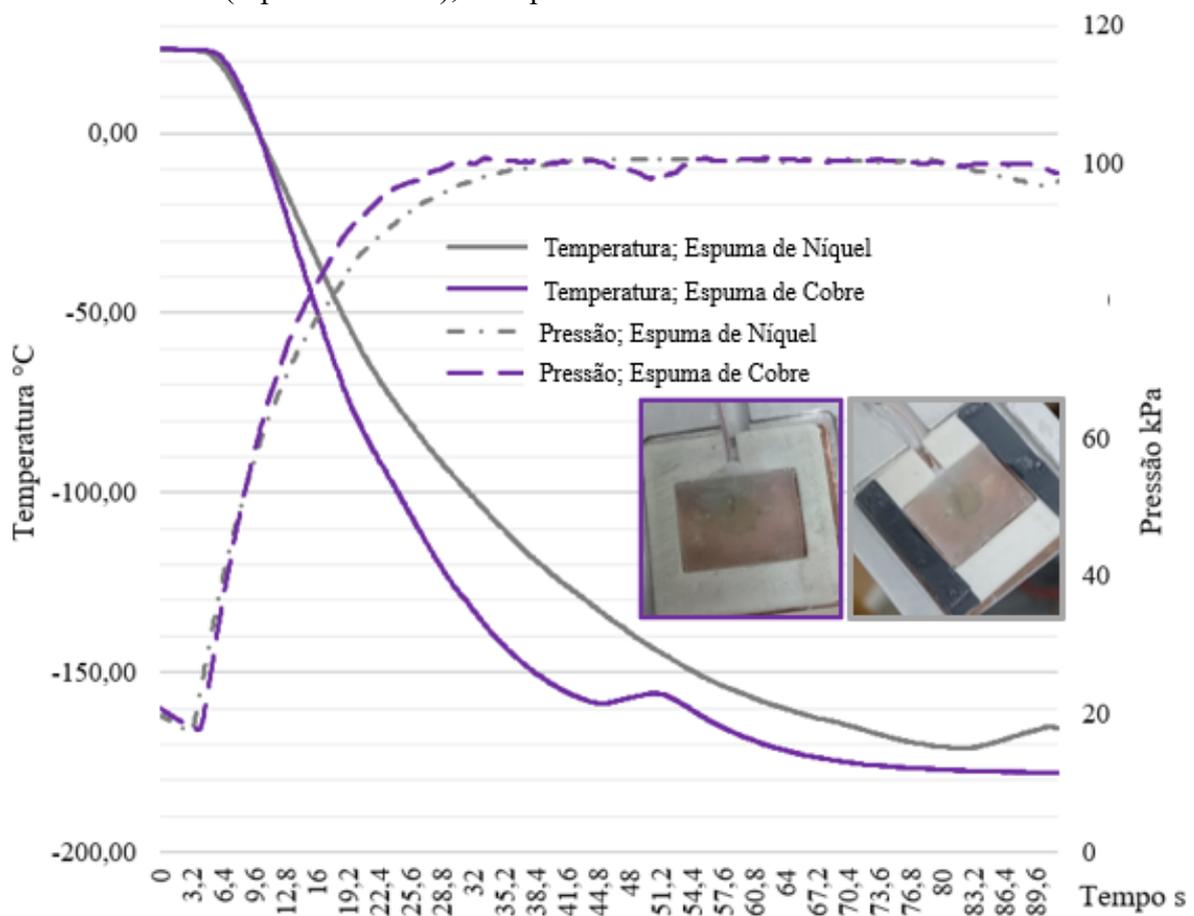


Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.5 Influência da espuma metálica microporosa

Ao se avaliar a influência da espuma metálica microporosa do evaporador no resfriamento de glicerol 50%v/v, observou-se que ambas as espumas metálicas testadas resultaram em amostras vitrificadas, conforme pode-se observar na Figura 34. Com relação às taxas de resfriamento, a espuma metálica microporosa de cobre resultou em maiores valores em relação à espuma de níquel, de 490 °C/min e 343,6 °C/min, respectivamente. Isto porque conforme explica Manetti et al. (2020), a espuma de cobre apresenta melhor desempenho se comparado com a espuma de níquel devido a maior condutividade térmica do cobre e esta característica desempenha um papel fundamental na transferência de calor, mesmo a espuma de níquel proporcionando a maior área superficial efetiva em contato com o fluido.

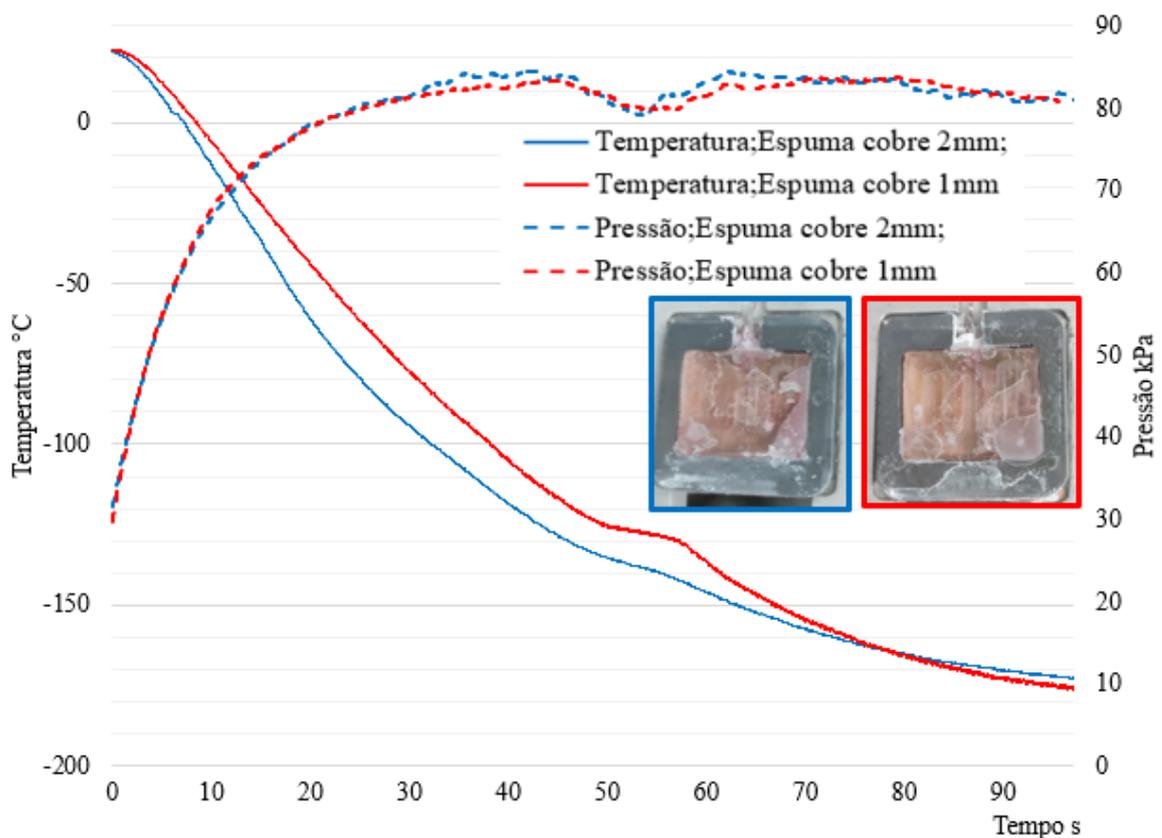
Figura 34 - Efeito da espuma microporosa do evaporador (espessura 1 mm), níquel e cobre na variação de temperatura e pressão, para amostra de Glicerol 50%v/v e volume de 30 μ l (espessura 3 mm), com pré resfriamento nos testes de EFF



Fonte: Elaborado pelo autor.

Com relação às espessuras das espumas metálicas de cobre testadas de 1 e 2 mm, observou-se que a espuma com maior espessura resultou em taxas de resfriamento ligeiramente maiores nos diferentes testes realizados. Conforme pode ser verificado na Figura 35, para uma amostra de 40%v/v glicerol, no intervalo de 5 a -60 °C, o teste com espuma metálica de cobre de 1 mm de espessura produziu uma taxa de resfriamento de 226,1°C/min, enquanto a espuma metálica de cobre de 2 mm resultou em uma taxa de resfriamento de 275,6°C/min, correspondendo a um aumento de 21,89% em comparação com a espuma anterior.

Figura 35 - Efeito da espessura da espuma microporosa do evaporador, espessuras de 1 mm e 2mm, para amostra de Glicerol 40%v/v e volume de 150 µl (espessura 2,5mm) com pré resfriamento nos testes de EFF



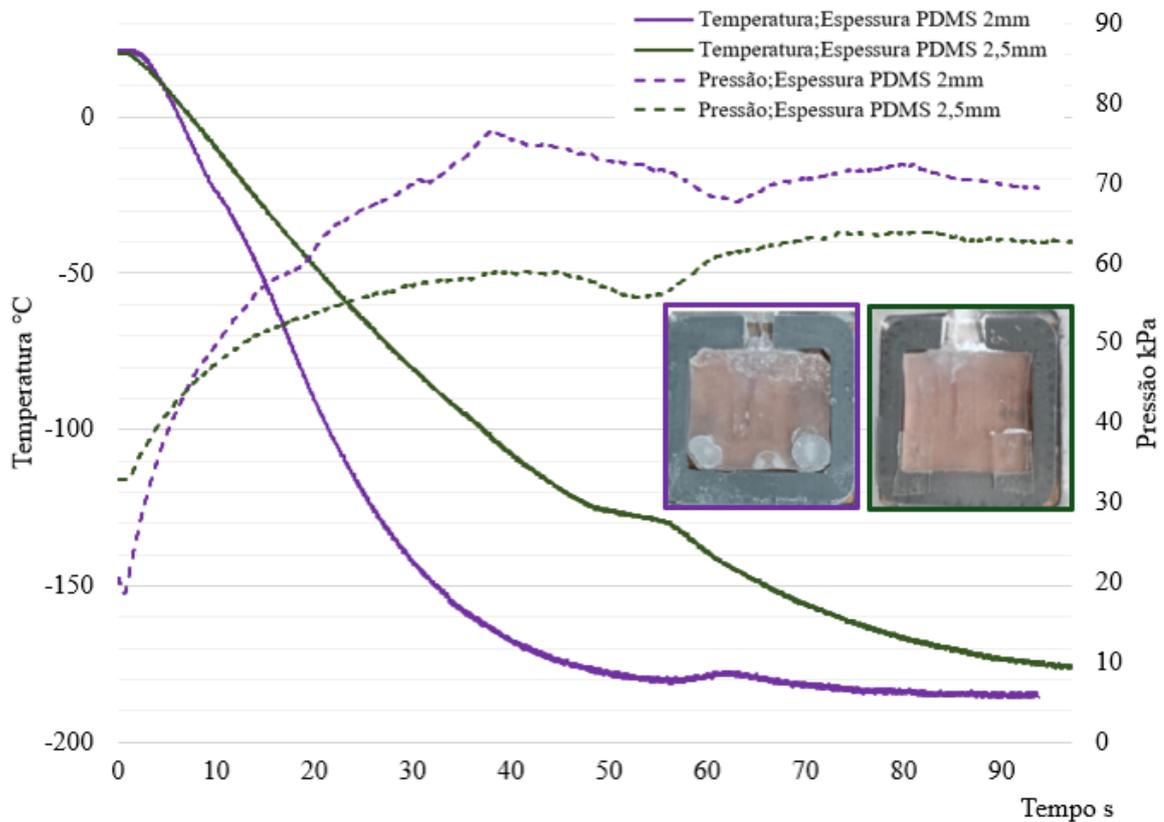
Fonte: Elaborado pelo autor.

4.1.6 Influência da espessura do dispositivo de PDMS em formato serpentina

O dispositivo de PDMS em formato serpentina (Figura 25) e com um volume maior de 150 µl foi avaliado por apresentar maior praticidade de uso. Testes com amostras de 1mol/l de sacarose, 35%v/v Glicerol, 1%v/v albumina humana e 64%v/v HTF, com evaporador de espuma microporosa de cobre de 2 mm de espessura foram realizados para verificar a influência

da espessura do dispositivo no processo. Os resultados mostraram uma brusca diminuição da taxa de resfriamento, conforme curvas da Figura 36. O dispositivo com 2 mm de espessura produziu taxas de resfriamento maiores se comparado com o de 2,5 mm de espessura, sendo 373,2 °C/min e 226,1°C/min, respectivamente, correspondendo a um aumento de aproximadamente 65% na taxa de resfriamento no intervalo de 5 a -60 °C.

Figura 36 - Efeito da espessura do reservatório PDMS de 150 µl (serpentina) do evaporador, espessuras de 2 mm e 2,5 mm, para amostra com 1mol/l de sacarose, 35%v/v glicerol, 1%v/v albumina humana e 64%v/v HTF, com pré resfriamento nos testes de EFF.

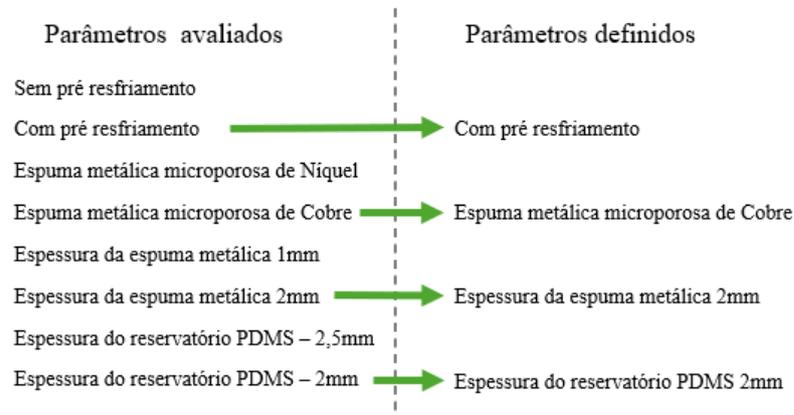


Fonte: Elaborado pelo autor.

Com os resultados dos testes da avaliação paramétrica realizados definiu-se os melhores parâmetros que geraram as maiores taxas de resfriamento das amostras e foram utilizados nos testes subsequentes, com soluções de ACPs e amostras biológicas.

A Figura 37 apresenta um resumo dos parâmetros avaliados e os parâmetros definidos como melhores.

Figura 37 - Parâmetros de teste para o método da Evaporação de Filme Fino



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Soluções crioprotetoras

Testes com as soluções crioprotetoras apresentadas na Tabela 4, com diferentes concentrações de sacarose, como crioprotetor extra celular, e glicerol, como intracelular, foram realizados e verificaram-se diferentes comportamentos das taxas de resfriamento e nos aspectos visuais resultantes do processo de evaporação de filme fino.

Assim como os testes da avaliação paramétrica evidenciaram anteriormente, amostras que cristalizaram após o procedimento de EFF, apresentam em determinada faixa de temperatura um comportamento de pulsação na curva de temperatura, conforme pode ser observado na Figura 38, nas amostras S1 e S3 (sacarose 0,5 mol/l, albumina humana 1%v/v para ambas, mas glicerol 28%v/v e 71% HTF para S1 e glicerol 35%v/v e 64% HTF).

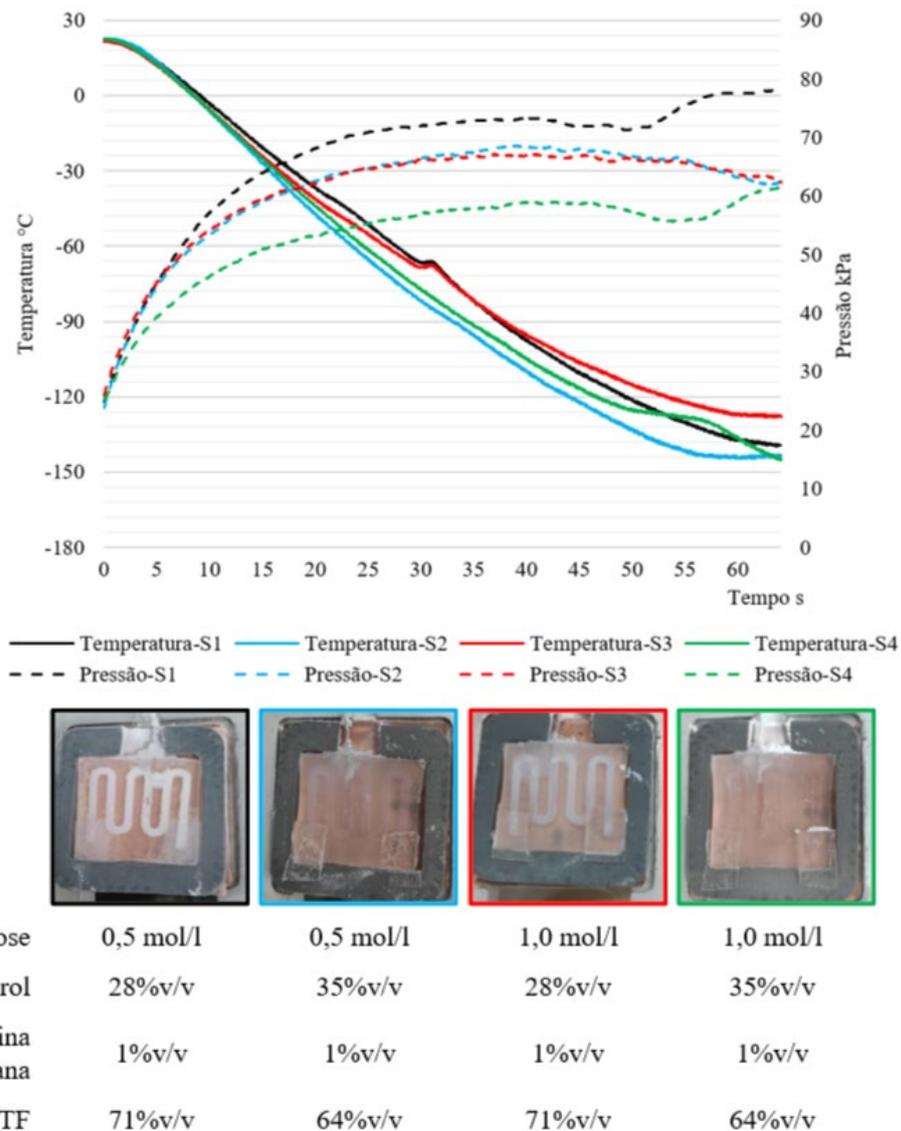
A amostra S3, apresenta, pelo aspecto visual, um menor nível de congelamento, ou opacidade, se comparado com a amostra S1. Isso pode ser explicado pelo aumento da concentração de sacarose de 0,5 mol/l para 1 mol/l, mantendo os mesmos percentuais de glicerol, HTF e albumina humana, assim sendo, o aumento do teor de sacarose aproxima a amostra da vitrificação.

Assim como a sacarose, o aumento da concentração de glicerol possibilita a vitrificação da amostra conforme pode ser observado se compararmos as amostras S1 com S2 e S3 com S4 (de 28%v/v a 35%v/v), pois ambos crioprotetores aumentam a viscosidade da solução. A maior viscosidade reduz formação de cristais de gelo e favorecendo o estado amorfo, assim com os estudos descritos de Vanderzwalmen *et al.* (2016). Portanto, tanto a sacarose (extracelular) quanto o glicerol (intracelular) atuam de forma sinérgica para possibilitar a vitrificação das soluções.

Evidenciou-se ainda que a amostra que apresenta maior transparência após o procedimento de EFF é a solução S4, da qual apresenta os maiores percentuais de componentes crioprotetores.

Taxas de resfriamento para as curvas onde obteve-se congelamento da amostra em S1 e S3 foram de 193,1°C/min e 198,9 °C/min, respectivamente, enquanto as amostras vitrificadas S2 e S4 alcançaram taxas de resfriamento de 243,2°C/min e 223,5 °C/min, respectivamente.

Figura 38 - Taxas de resfriamento e aspecto visual das amostras com diferentes concentrações



Fonte: Elaborado pelo autor.

O processo de evaporação da película de nitrogênio líquido ocorre de forma efetiva e permite alcançar taxas maiores, quando a pressão na câmara se mantém abaixo da pressão atmosférica. Como se pode observar nas curvas de pressão da Figura 38, ao iniciar o processo

de injeção de LN2 a pressão estava em torno de 20 kPa, e logo após o início começa a subir. No decorrer do processo de resfriamento se verificou grande variação de pressão, na faixa de 60 a 75 kPa, aproximadamente, que pode ser explicada por diversos fatores como vedação do conjunto tampa e conexões, pressão instável nos criocautérios e variação no acionamento dos criocautérios.

4.3 Material Biológico

Os testes com material biológico, sêmen humano, foram realizado em duas etapas: Na primeira etapa as amostras foram preparadas conforme descrito anteriormente, colocadas em meio com crioprotetores e logo congeladas e armazenadas para as análises subsequentes de motilidade e a viabilidade do sêmen.

Para essa fase, foram selecionadas quatro composições das amostras para que fossem adicionadas ao material biológico e posterior congelamento:

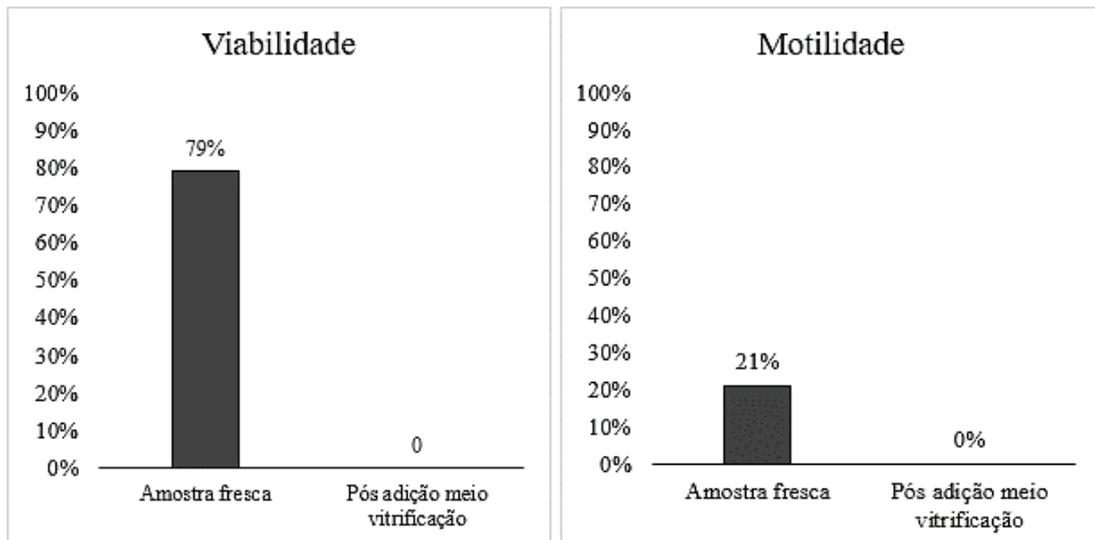
- Amostra 1: Sacarose 1 mol/l, Glicerol (35%v/v), Albumina humana (1% v/v) e HTF (64% v/v);
- Amostra 2: Sacarose 0,5 mol/l, Glicerol (35% v/v), Albumina humana (1% v/v) e HTF (64% v/v);
- Amostra 3: Sacarose 0,25 mol/l, Albumina humana (1% v/v) e HTF;
- Amostra 4: TYB (50%).

Cada uma das amostras foram congeladas em triplicata, resultando em três reservatórios PDMS por composição para posterior avaliação biológica por uma equipe qualificada da empresa Hemocord, totalizando 12 reservatórios PDMS.

Os testes de congelamento das amostras 1 e 2 foram realizadas em determinado dia e os testes com as amostras 3 e 4 foram realizadas outra data, assim obteve-se resultados distintos de viabilidade e motilidade nas análises pré congelamento.

A análise das amostras 1 e 2 após a adição de ambos os agentes crioprotetores revelou um impacto negativo na sobrevivência celular das composições testadas, mesmo antes do procedimento de criopreservação por EFF. A amostra fresca apresentou viabilidade e motilidade de 79% e 21%, respectivamente; no entanto, após a adição dos meios de congelamento, esses índices caíram para 0%, conforme ilustrado na Figura 39.

Figura 39 - Viabilidade e motilidade da amostra fresca e após adição dos meios de congelamento



Fonte: Elaborado pelo autor.

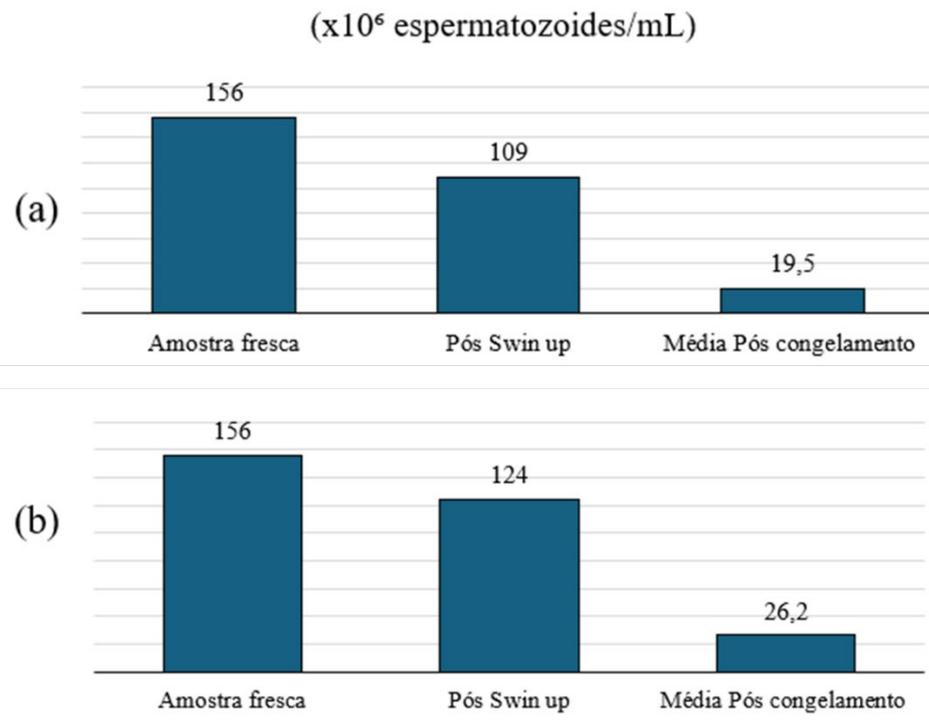
Em contraste, os testes realizados com a técnica de evaporação de filme fino (EFF) revelaram a inviabilidade dos espermatozoides quando a solução com crioprotetor (Amostra 1 e 2) foi misturada ao material biológico. Conforme sugerido por Morris et al. (2012), concentrações elevadas de crioprotetores permeantes estão diretamente associadas a choques osmóticos, que afetam negativamente a integridade celular, comprometendo a viabilidade do material biológico e o sucesso do processo de criopreservação.

A análise inicial da amostra fresca (Amostra 1 e 2) revelou uma concentração de aproximadamente 120×10^6 espermatozoides por ml. Após o procedimento de *swin up* e a adição dos meios crioprotetores 1 e 2, as concentrações médias observadas foram de $29,27 \times 10^6$ e $30,5 \times 10^6$ espermatozoides por ml, respectivamente.

Já para as amostras 3 e 4, a análise inicial da amostra fresca revelou uma concentração espermática de aproximadamente 156×10^6 espermatozoides por ml. Após o procedimento de *swin up* e a adição dos meios crioprotetores 3 e 4, as concentrações médias observadas foram de 109×10^6 e 124×10^6 espermatozoides por ml, respectivamente.

Após o congelamento, as amostras foram novamente submetidas à análise de concentração espermática. Os resultados obtidos para as amostras 3 e 4 foram, respectivamente, $19,5 \times 10^6$ e $26,2 \times 10^6$ espermatozoides por ml, como ilustrado na Figura 40. Esses valores estão acima do mínimo recomendado pelo manual da WHO (2021), que é $\geq 15 \times 10^6$ espermatozoides por ml de sêmen.

Figura 40 - Concentração espermática da amostra 3 - 0,25 mol/l sacarose e HTF (a) e amostra 4 - 50% TYB (b)



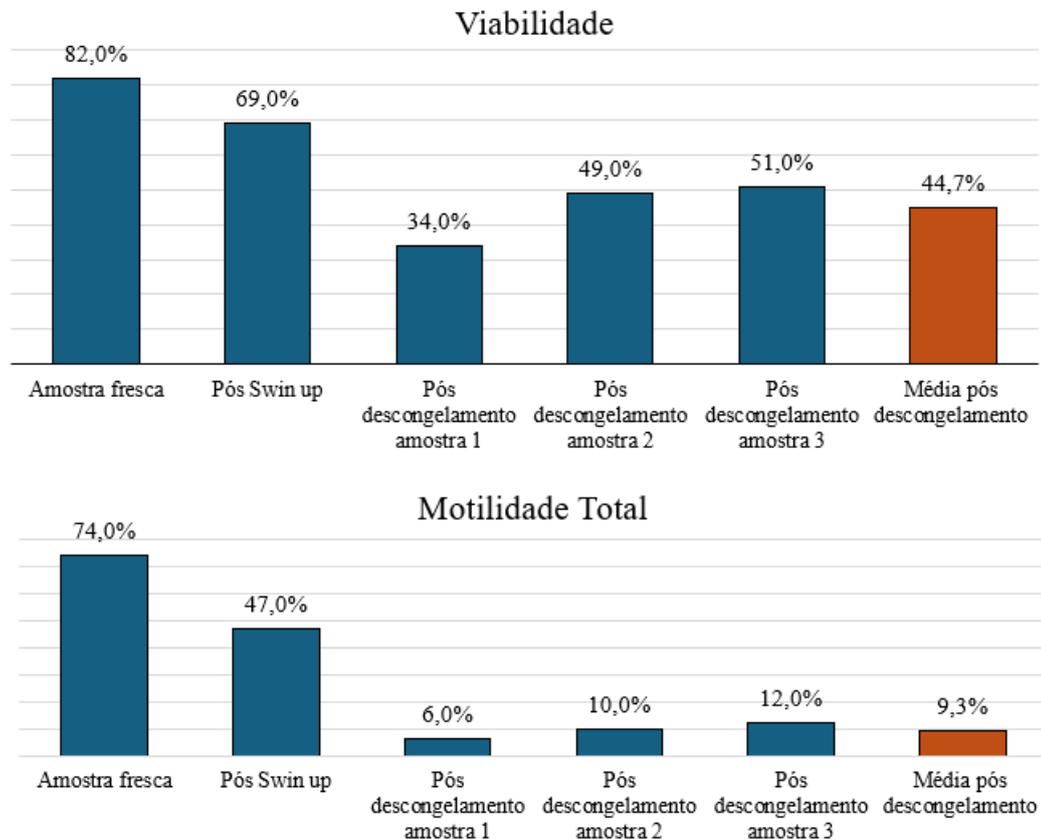
Fonte: Elaborado pelo autor.

As análises de viabilidade e motilidade total das amostras 3 e 4 indicaram que não houve impacto negativo significativo na sobrevivência celular, mesmo antes do processo de EFF, diferente das amostras 1 e 2. Esses resultados estão ilustrados na Figura 41 e Figura 42, que apresenta a viabilidade e motilidade total do material biológico em diferentes etapas do procedimento (amostra fresca, pós *swim up* e após descongelamento).

Para a amostra 3, a viabilidade e motilidade total da amostra fresca foram de 82% e 74%, respectivamente, enquanto para a amostra 4 a viabilidade e motilidade total foram de 82% e 68,5% respectivamente. Estes valores estão acima do limite estabelecido pelo manual da OMS de 2021 que estabelece viabilidade acima de 58% e motilidade total acima de 40%.

A análise da amostra 3 mostrou que a técnica de *swim up* influenciou levemente a viabilidade celular das amostras, havendo maior impacto a técnica de congelamento por EFF na motilidade e viabilidade das amostras. Dentre as três amostras analisadas após o procedimento de congelamento, observou-se uma redução média de 24,3% na viabilidade celular das amostras quando comparadas aos valores pós *swim up*, conforme mostra Figura 42.

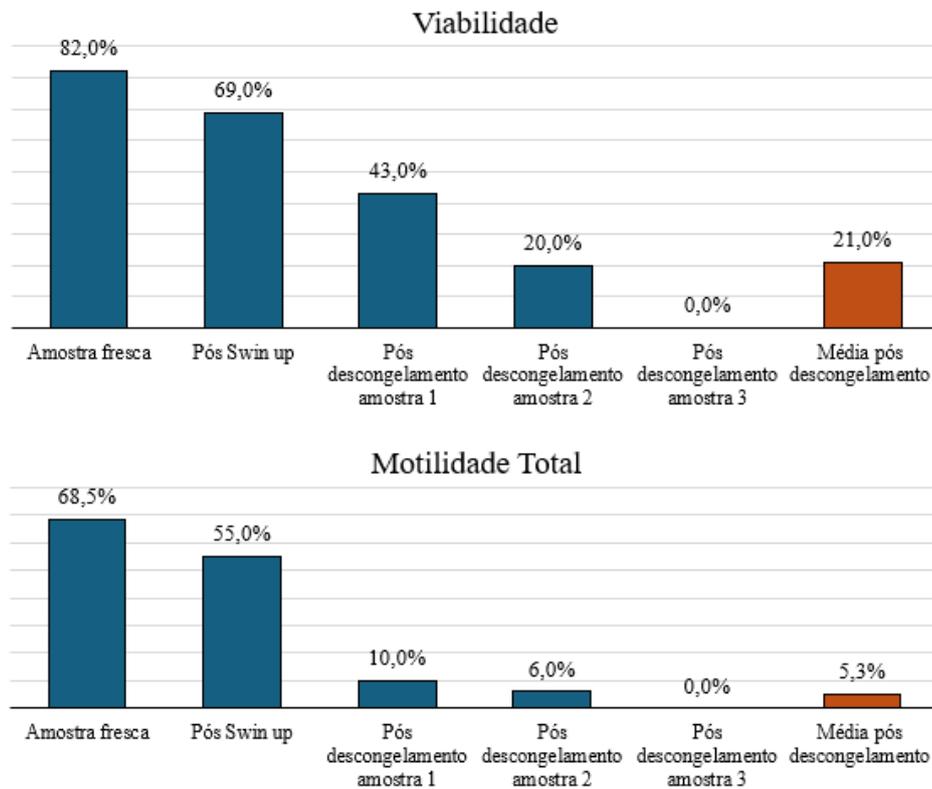
Figura 41 - Viabilidade e motilidade total da amostra 3 - Sacarose 0,25 mol/l, Albumina humana (1ml) e HTF



Fonte: Elaborado pelo autor.

Observou-se uma queda acentuada na motilidade total da amostra com 0,25 mol/L de sacarose e HTF, em torno de 27%, indicando que a técnica de separação afeta parcialmente a capacidade de movimento dos espermatozoides, conforme ilustrado na Figura 41. No entanto, o maior impacto na motilidade total foi provocado pelo congelamento por EFF, que resultou em uma motilidade média de 9,3% nos testes realizados com a Amostra 3, representando uma perda de 37,7%. Devido não ser um meio específico para a vitrificação de material biológico, e sim para o congelamento, uma redução ainda mais brusca foi observada nas amostras submetidas ao meio TYB (50%), com uma queda de 49,7%, alcançando uma motilidade final de 5,3%, conforme mostrado na Figura 42.

Figura 42 - Viabilidade e motilidade total da amostra 4 - TYB (50%).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação à viabilidade da amostra com TYB 50%, observa-se um comportamento semelhante ao da Amostra 3, com uma leve redução após o procedimento de *swin up* e uma diminuição mais acentuada após o congelamento por EFF. Nesse caso, a redução foi de 48%, alcançando uma viabilidade final de 21%, conforme mostrado na Figura 42. É importante destacar que, em uma das amostras, foi registrada viabilidade nula, possivelmente devido a problemas pontuais durante o procedimento, o que impactou negativamente a média geral tanto da viabilidade quanto da motilidade total.

Utilizando a mesma técnica de preparação de amostras, Ogliari et al. (2021) realizaram estudos analisando amostras frescas e pós-descongelamento, utilizando TYB na proporção de 1:1 com a amostra biológica. O congelamento foi realizado com o equipamento Thermo Scientific™ CryoMed™ 7401 (ThermoFisher Scientific), que resfriou gradualmente as amostras de 37°C até -120°C ao longo de 2 horas, com uma taxa aproximada de 1,3°C/min. Resultados obtidos neste estudo são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5 - Resultados de análise de amostra fresca de pós descongelamento de processo de congelamento lento

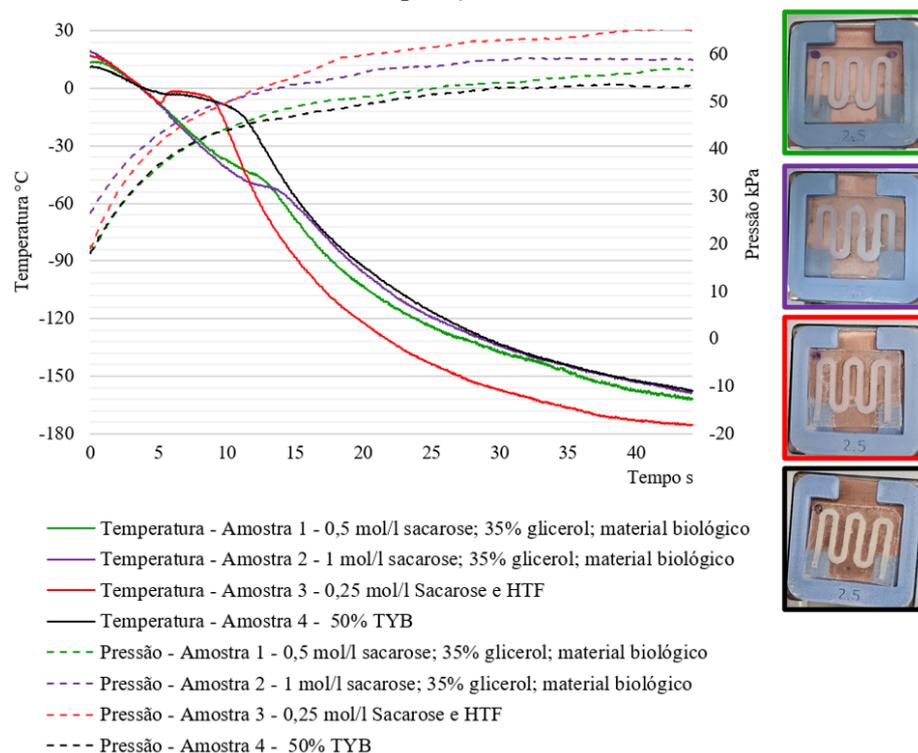
Parâmetro	Amostra fresca	Pós descongelamento
Concentração ($\times 10^6$ espermatozoides/ml)	97,7 \pm 22,0	77,6 \pm 15,0
Viabilidade (%)	53,1 \pm 12,4	34,9 \pm 3,0
Motilidade Total (%)	53,5 \pm 13,0	31,3 \pm 9,2

Fonte: Modificado de Ogliari *et al.* (2021)

Com base nos resultados deste estudo é possível observar que os autores também evidenciaram uma diminuição dos indicadores de concentração, viabilidade e motilidade total após o procedimento de congelamento das amostras, porém de forma mais branda, com reduções de viabilidade e motilidade total na ordem de 20,2% e 22,2%, respectivamente em comparação com a amostra fresca.

Na segunda etapa dos testes com material biológico, foi realizado o monitoramento da temperatura durante o procedimento de congelamento. Cada amostra foi testada em triplicata para garantir a precisão dos registros de temperatura.

Figura 43 - Curvas de temperatura, pressão e aspecto visual das amostras com crioprotetores das composições 1, 2, 3 e 4



Fonte: Elaborado pelo autor.

Após a realização dos testes com amostras biológicas e crioprotetores, observou-se que as concentrações utilizadas não resultaram na vitrificação das amostras, conforme mostrado nas fotos da Figura 43. No entanto, testes anteriores indicaram que as soluções crioprotetoras utilizando 0,5 mol/l e 1 mol/l de sacarose, 35% de glicerol e 64% de HTF, conseguem vitrificar quando submetidas isoladamente ao processo de criopreservação por EFF, vide Figura 38

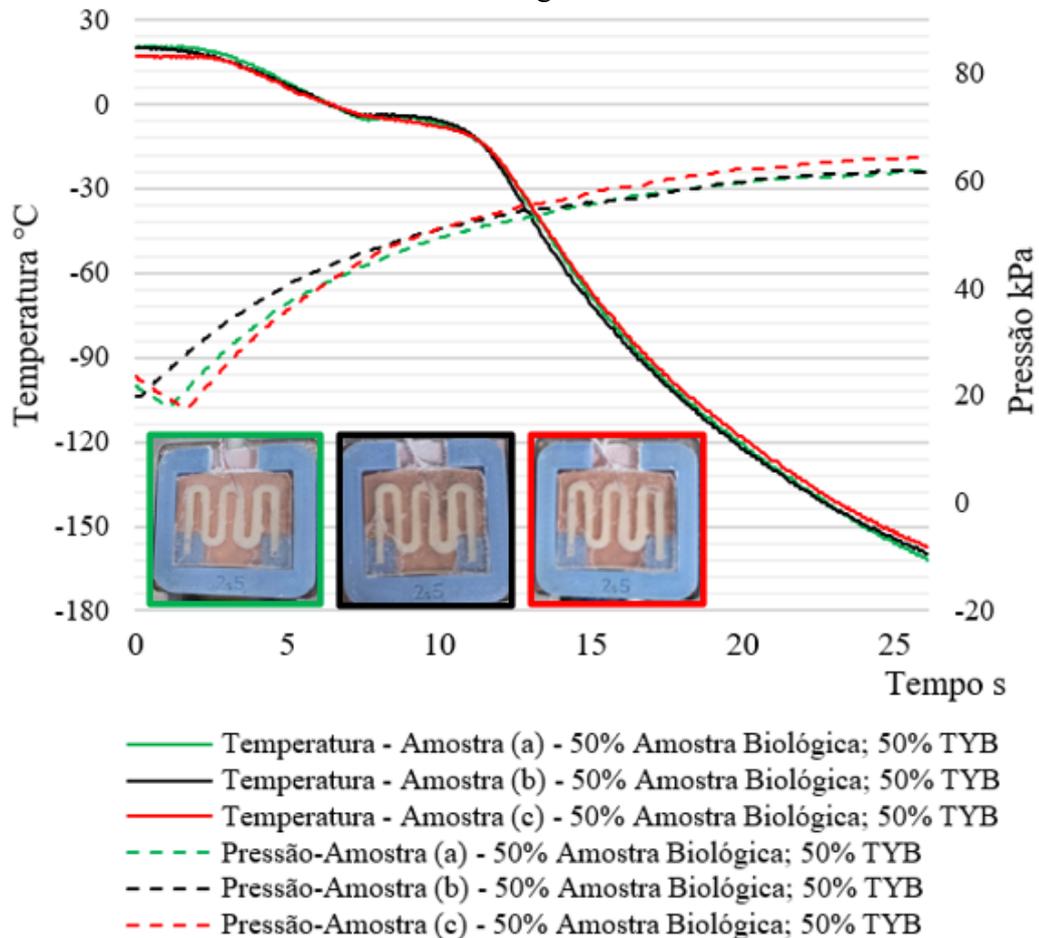
A ausência de vitrificação da amostra pode ser explicada pela presença de água na extração do material biológico após o procedimento de *swim up*, o que altera as características de viscosidade da composição, dificultando a formação da estrutura vítrea desejada. Adicionalmente é importante notar que o HTF modificado, utilizado neste contexto, não é destinado à vitrificação, mas sim ao congelamento, o que reforça a necessidade de selecionar cuidadosamente os métodos e agentes crioprotetores adequados para preservar a viabilidade do sêmen.

Taxas de resfriamento obtidas nestes testes foram de 396,4 °C/min a 394°C/min para a amostra (1); de 381,5°C/min a 494°C/min para a amostra (2); de 496,6°C/min a 503°C/min para a amostra (3); e de 351,2°C/min a 357,2°C/min para a amostra (4)

Taxas de vitrificação, variando entre 300 e 600 °C/min, foram observadas nos estudos de Dupesh et al. (2019), que utilizaram a técnica de gotejamento com amostras biológicas contendo 0,5 mol/l de sacarose em uma proporção de 1:1. Embora taxas semelhantes, os autores obtiveram a motilidade pós-*swim-up* e após os processos de criopreservação e aquecimento de $94,3 \pm 3,06\%$ e $68,00 \pm 8,47\%$, respectivamente, enquanto a viabilidade final das amostras atingiu $77,21 \pm 7,52\%$, resultados que podem estar associados ao volume das gotículas, muito inferior ao utilizado nos testes com EFF.

Com base nos dados obtidos a partir dos testes em triplicata realizados com a amostra composta por 50% v/v de material biológico e 50% v/v de TYB, conforme mostra Figura 44, foi possível conduzir uma avaliação estatística entre as curvas de resfriamento, com o objetivo de analisar a repetibilidade dos testes. A avaliação foi realizada utilizando dois parâmetros principais: o coeficiente de correlação de Pearson e o erro médio absoluto. Esses parâmetros permitem medir, respectivamente, a correlação entre as curvas e a variação média nas diferenças absolutas de temperatura entre os testes.

Figura 44 - Curva de resfriamento teste em triplicata amostra 50% TYB e 50% amostra biológica



Fonte: Elaborado pelo autor.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 6, que mostra a comparação entre as curvas da triplicata: (a) e (b), (b) e (c), e (a) e (c), além da média total dos parâmetros analisados.

Tabela 6 – Aspectos da repetibilidade para curvas (a) e (b), (b) e (c) e (a) e (c) e média total

Curvas	Coefficiente de Pearson	Erro médio absoluto
(a) e (b)	0,9987	1,30 °C
(b) e (c)	0,9980	1,81 °C
(a) e (c)	0,9988	0,87 °C
Média	0,9984	1,33 °C

Fonte: Elaborado pelo autor.

Conforme observado, o coeficiente de Pearson médio entre os testes em triplicata foi de 0,9984, utilizando-se a série de dados de temperatura variando de 5°C até -60°C. Esse valor

indica uma forte correlação linear entre as curvas de resfriamento obtidas, sugerindo alta repetibilidade nos resultados.

Quanto ao erro médio absoluto, o valor médio encontrado foi de $1,33^{\circ}\text{C}$, indicando uma pequena variação térmica entre os diferentes testes. Esse valor demonstra que as discrepâncias entre as curvas são mínimas, reforçando a consistência dos resultados do equipamento e a confiabilidade do processo de resfriamento térmico para a amostra em questão.

Esses resultados confirmam a alta repetibilidade do equipamento e a estabilidade do processo experimental em termos de controle de temperatura, o que é fundamental para a validade dos testes com amostras biológicas.

5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados experimentais apresentados, pode-se concluir que o processo de criopreservação por evaporação de filme fino (EFF) foi significativamente influenciado por fatores como o pré-resfriamento, a concentração de crioprotetores, o volume das amostras, o tipo de espuma microporosa utilizada no evaporador e a espessura dos reservatórios de PDMS. A análise detalhada dessas variáveis revela aspectos importantes que poderão ser utilizados para a melhoria dos protocolos de criopreservação, especialmente no que diz respeito à vitrificação, a qual é essencial para preservar a integridade estrutural e funcional de amostras biológicas.

Os resultados indicaram que o pré-resfriamento a partir de -30°C tem um impacto positivo na eficiência do resfriamento. A semelhança nas curvas até essa temperatura sugere que o pré-resfriamento não influencia significativamente as taxas de resfriamento iniciais. No entanto, após essa faixa, o pré-resfriamento mostrou-se eficaz em aumentar as taxas de resfriamento, especialmente quando associado a outras variáveis, como o tipo de material utilizado no processo (ex.: espumas microporosas e crioprotetores). Esse comportamento corrobora estudos anteriores que indicam a relevância do controle preciso de temperatura em processos de criopreservação para evitar a formação de cristais de gelo que podem danificar as amostras.

A variação na concentração de glicerol (30% v/v e 50% v/v) demonstrou ser um fator crítico para a obtenção de vitrificação. Observou-se que, apesar das taxas de resfriamento serem similares para ambas as concentrações, o glicerol a 50% v/v favoreceu a vitrificação, enquanto a amostra com 30% cristalizou. Isso evidencia que a vitrificação não depende apenas da taxa de resfriamento, mas também da composição da solução crioprotetora. A maior concentração de glicerol aumenta a viscosidade da solução, inibindo a formação de cristais de gelo e favorecendo a formação de uma matriz vítrea. Esse fenômeno é fundamental para a preservação da estrutura celular durante a criopreservação, porém estudos devem ser desenvolvidos para avaliação do meio crioprotetor e técnicas de preparação de amostras para minimizar impactos gerados por choque osmótico.

A análise da influência do volume das amostras no processo de vitrificação revelou que a taxa de resfriamento é afetada pela área de troca térmica do reservatório de PDMS. Um aumento de aproximadamente 104% na área de troca térmica ao passar de um reservatório de 32 μl para um de 64 μl resulta em um incremento de cerca de 65% na taxa de resfriamento. Essa melhoria é atribuída à geometria do reservatório, que proporciona uma maior área de troca térmica. Esses resultados enfatizam a importância de otimizar essa área para aumentar a

eficiência do processo de criopreservação, garantindo, ao mesmo tempo, a integridade das amostras.

Os testes com espumas microporosas de cobre e níquel mostraram que, apesar da espuma de níquel ter maior área de superfície efetiva, a espuma de cobre, devido à sua maior condutividade térmica, proporcionou maiores taxas de resfriamento. Essa observação está em concordância com a literatura, que destaca o papel fundamental da condutividade térmica nos processos de troca de calor. A espuma de cobre resultou em taxas de resfriamento até 42% maiores do que a de níquel, evidenciando a importância de materiais com alta condutividade térmica no projeto de sistemas de criopreservação eficientes. Além disso, a variação na espessura das espumas de cobre (1 mm e 2 mm) também mostrou que espessuras maiores aumentam a eficiência do resfriamento, embora de forma menos significativa, indicando que o fator predominante na melhoria do processo é o material da espuma.

A influência da espessura do reservatório PDMS também foi claramente observada. Reservatórios mais finos (2 mm) resultaram em taxas de resfriamento maiores em comparação com reservatórios mais espessos (2,5 mm). Essa diferença pode ser explicada pela menor resistência térmica em paredes mais finas, facilitando a transferência de calor durante o processo de resfriamento. A redução da espessura do reservatório mostrou-se, portanto, um método eficaz para aumentar a taxa de resfriamento e favorecer a vitrificação das amostras.

Nos testes com amostras biológicas (sêmen), verificou-se que a adição dos crioprotetores, mesmo em composições previamente eficazes para vitrificação de amostras isoladas, não foi suficiente para impedir a cristalização das amostras biológicas. Isso provavelmente se deve à presença de água residual no material biológico, que dificulta o processo de vitrificação. A presença de água interfere na viscosidade e no comportamento térmico das soluções crioprotetoras, ressaltando a necessidade de técnicas de preparação mais rigorosas, como o uso de métodos de preparação mais eficientes antes da criopreservação.

As amostras utilizando material biológico foram preparadas em duas etapas: na primeira, foram imersas em soluções crioprotetoras e, em seguida, congeladas através do método de EFF para posterior análises de motilidade total e viabilidade. Foram selecionadas quatro composições, que resultaram em três amostras por composição, totalizando 12 amostras para avaliação biológica. As composições contendo glicerol apresentaram impacto negativo na sobrevivência celular, com viabilidade e motilidade do sêmen fresco em 79% e 21%, respectivamente, que caíram para 0% após a adição dos meios de criopreservação,

possivelmente devido aos choques osmóticos causados por altas concentrações de crioprotetores permeantes, comprometendo a viabilidade do sêmen.

Entretanto, as amostras 3 e 4 demonstraram melhores resultados de viabilidade e motilidade total, com valores de 44,7% e 9,3%, respectivamente, para a amostra contendo 0,25 mol/l de sacarose e HTF, e de 21% e 5,3% para a amostra com TYB (50%). Dessa forma, pode-se concluir que, para o procedimento e EFF realizado, é mais apropriado utilizar o meio HTF suplementado com 0,25 mol/l de sacarose em vez do meio TYB, que, conforme indicado pelo fabricante, é recomendado para congelamento lento.

Por fim, a análise da repetibilidade dos testes mostrou resultados bastante satisfatórios. O coeficiente de correlação de Pearson entre as curvas de resfriamento apresentou uma média de 0,9984, o que indica uma forte correlação linear entre os testes realizados, demonstrando alta repetibilidade nos resultados. O erro médio absoluto foi igualmente baixo, com uma média de 1,33 °C, sugerindo que as variações entre os testes foram mínimas. Esses resultados indicam que o equipamento utilizado é confiável e proporciona consistência no controle das taxas de resfriamento, mesmo sob diferentes condições experimentais.

Os resultados experimentais permitiram identificar os melhores parâmetros para maximizar as taxas de resfriamento e promover a vitrificação das amostras. A utilização de pré-resfriamento, maiores concentrações de crioprotetores (especialmente o glicerol), e espumas microporosas de cobre de 2 mm de espessura, bem como a redução da espessura do reservatório, são determinantes para o sucesso do processo de criopreservação. No entanto, o impacto da criopreservação em amostras biológicas, como observado nos testes com sêmen, aponta para a necessidade de otimizações adicionais, principalmente no que tange à remoção de água e ao ajuste das composições crioprotetoras para melhorar a viabilidade celular.

Para estudos futuros, recomenda-se investigar novas combinações de crioprotetores que possam aumentar a sobrevivência celular sem comprometer o processo de vitrificação e novos testes e avaliações com crioprotetores comerciais específicos para a vitrificação de materiais biológicos. O desenvolvimento de métodos que minimizem a presença de água residual nas amostras biológicas e a implementação de novos materiais e geometrias do reservatório PDMS mais finas com maior eficiência térmica poderão ser cruciais para aprimorar a criopreservação em larga escala, especialmente no campo biomédico. Sugere-se então para trabalhos futuros a diminuição da espessura de parede do reservatório PDMS de 0,5 mm mostrado na Figura 25 para 0,2 mm possibilitando atingir taxas de resfriamento significativamente mais altas que as encontradas neste trabalho.

6 REFERÊNCIAS

AMANN, R. P.; PICKETT, B. W. Principles of cryopreservation and a review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, n. 3, p. 145–173, 1987.

AKIYAMA, Y. et al. Cryoprotectant-fremammalian 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.

BAUDOT, A.; ALGER, L.; BOUTRON, P. Glass-Forming Tendency in the System Water–Dimethyl Sulfoxide. **Cryobiology**, v. 40, n. 2, p. 151–158, 2000.

BAUDOT, A.; ODAGESCU, V. Thermal properties of ethylene glycol aqueous solutions. **Cryobiology**, v.48, p.283–294, 2004.

BAUST, J.G.; GAO, D.; BAUST, J.M. Cryopreservation: An emerging paradigm change. **Organogenesis** Volume 5, Issue 3, p. 90-96. 2009.

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.

BOUTRON, 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.

BOUTRON, 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, P.; MAYER, E. Complete Vitrification in Pure Liquid Water and Dilute Aqueous Solution. **Nature**. v. 288, p. 569-571, 1980.

BROCKBANK, K.G.M.; COVAULT, J.C.; TAYLOR, M.J. Cryopreservation Guide. **Thermo Fisher Scientific**. 2007.

BUCAK, MN; ATEŞŞAHIN, A; VARIŞLI, Ö; YÜCE, A; TEKIN, N; AKÇAY, A. The influence of trehalose, taurine, cysteamine and hyaluronan on ram semen. Microscopic and oxidative stress parameters after freeze-thawing process. **Theriogenology**, v.67, p.1060-1067, 2007.

CASTRO, S.V.; CARVALHO, A.A.; SILVA, C.M.G; FAUSTINO, L.R.; FIGUEIREDO, J.R.; RODRIGUES, A.P.R. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.39, n.2 (957), p. 1-17. 2011.

DUPESH, Shah; RASAPPAN; SHILA; GUNASEKARAN, Karthik. A simple method of human sperm vitrification. **MethodsX**, v.6, p.2198-2204, 2019.

FAHY, M, G; Vitrification in Assisted Reproduction - Overview of biological vitrification. 2^aed. CRC PressTaylor & Francis Group. 2016.

FICKEL, J; WAGENER, A; LUDWIG, A. Semen cryopreservation and the conservation of endangered species. **European Journal of Wildlife Research**, v.53, p.81-89, 2007.

GURRUCHAGA, H. et al. Advances in the slow freezing cryopreservation of microencapsulated cells. **Journal of Controlled Release**, v. 281, p. 119–138, 2018.

HOLT, W. V. Basic aspects of frozen storage of semen. **Animal Reproduction Science**, v. 62, n. 1-3, p. 3–22, ago. 2000.

HUANG, C., TANG, Y.-L., HU, J.-L., ZHOU, W.-J., HUANG, Z.-H., LUO, X.-F., LI, Z., & ZHU, W.-B. (2022). Update on techniques for cryopreservation of human spermatozoa. **Asian Journal of Andrology**, 24(5), 563–569. <https://doi.org/10.4103/aja20229>

JAISSWAL, A. N.; VAGGA, A. Cryopreservation: A Review Article. **Cureus**, v.14(11):e31564, 2022.

KASAI, M. Advances in the cryopreservation of mammalian oocytes and embryos: Development of ultrarapid vitrification. **Reproductive Medicine and Biology**, v.1, p.1-9, 2002.

KATKOV I.I., BOLYUKH V. F., SUKHIKH G. T. KrioBlast™ as a New Technology of Ultrafast Cryopreservation of Cells and Tissues. Kinetic Vitrification of Human Pluripotent Stem Cells and Spermatozoa. **Cell Technologies in Biology and Medicine**, n. 1, 2018.

KIM, J. H.; YOU, S. M.; CHOI, S. U. S. Evaporative spray cooling of plain and microporous coated surfaces. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 47, n. 14-16, p.3307–3315, 2004.

LANE, M.; SCHOOLCRAFT, W.B.; GARDNER, D.K. Vitrification of mouse and human blastocysts using a novel cryoloop container-less technique. **Fertility and Sterility** Vol. 72. 1999.

LI, Y.; ZHOU, L.; LV, M.; GE, P.; LIU, Y.; ZHOU, D.; Vitrification and conventional freezing methods in sperm cryopreservation: A systematic review and meta-analysis. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology** 233, p. 98-92. 2019.

LÓPEZ-BÉJAR, M., LÓPEZ-GATIUS, F. Nonequilibrium cryopreservation of rabbit embryos using a modified (sealed) open pulled straw procedure. **Theriogenology** v. 58, n. 8, p.1541-52, 2002.

LOUTRADI, K. E., et al. Cryopreservation of human embryos by vitrification or slow freezing: a systematic review and meta-analysis. **Fertility and Sterility**, v. 90, n. 1, p. 186–193, 2008.

MANDEL, R.; AMIR SHOOSHTARI; OHADI, M. M. Thin-film evaporation on microgrooved heatsinks. **Numerical Heat Transfer Part A-applications**, v. 71, n. 2, p. 111–127, 2017.

MANETTI, L. L. et al. Pool boiling heat transfer of HFE-7100 on metal foams. **Experimental Thermal and Fluid Science**, v. 113, p. 110025, 2020.

MANETTI, L.L.; CARDOSO, E.M.; MOITA, A.S.O.H. A new pool boiling heat transfer correlation for wetting dielectric fluids on metal foams. **International Journal of Heat and Mass Transfer**, v. 171, 121070, 2021.

MANZUR, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. **Science**. v.168, p. 939-49, 1970.

MARCHESI, R.; MAFFÈ, M.; MORASCHI, M. Computational fluid dynamics analysis of cell cooling process. **Cell preservation technology**. v.3, n.4. 2005.

MAROO, S. C.; CHUNG, J. N. Fundamental Roles of Nonevaporating Film and Ultrahigh Heat Flux Associated with Nanoscale Meniscus Evaporation in Nucleate Boiling. **Journal of Heat Transfer**, v. 135, n. 6, 2013.

MARQUEZ-CURTIS, L. A. et al. Mesenchymal stromal cells derived from various tissues: Biological, clinical and cryopreservation aspects. **Cryobiology**, v. 71, n. 2, p. 181–197, 2015.

MARTINO A.; SONGSASEN, N.; LEIBO, S.P. Development into blastocysts of bovine oocytes cryopreserved by ultra-rapid cooling. **Biology of Reproduction**, v.54 p. 1059-1069, 1996.

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.

MORRIS, G. J. ACTON, E.; MURRAY, B.J.; FONSECA, F. Freezing injury: The special case of the sperm cell. **Cryobiology**, v. 64, n. 2, p. 71-80, 2012.

NUNES, J. F. Inseminação artificial em caprinos. *In*: GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. (Eds.). **Biotecnias aplicadas à reprodução animal**. 1ª. ed. São Paulo: Varela, p. 111–125, 2002.

OGLIARI, K. S.; IMMIG, M. L.; HALON, M. L.; LOTH, F.; BONI, L.; GRUDZINSKI, P.; BECKENKAMP, R.; FRITSCH, M. Development of a Validation Protocol for Laboratory Personnel Training in Sperm Analysis and Cryopreservation (brief report). **Medical Laboratory Journal**, v. 16, n. 4, p. 47-53, 2021. DOI: 10.52547/mlj.16.4.47.

OZIMIC, S.; FRANGEŽ, H.B.; STIMPFEL, M. Sperm Cryopreservation Today: Approaches, Efficiency, and Pitfalls. **Current Issues in Molecular Biology**. v. 45, n. 6, p. 4716–4734, 2023.

O'CONNOR, J. P.; YOU, S. M. A Painting Technique to Enhance Pool Boiling Heat Transfer in Saturated FC-72. **Journal of Heat Transfer**, v. 117, n. 2, p. 387–393, 1995.

PLAWSKY, J.L.; FEDOROV, A.G.; GARIMELLA, S.V.; MA, H.B.; MAROO, S.C.; CHEN, L.; NAM, Y. Nano and microstructures for thin-film evaporation – A review. **Nanoscale and Microscale Thermophysical Engineering**, 18 - p. 251-269. 2014

PURDY, P.H. A review on goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v.63, p.215-225, 2006.

SHALOM-PAZ, E. et al. Fertility preservation for breast-cancer patients using IVM followed by oocyte or embryo vitrification. **Reproductive BioMedicine Online**, v.21, n.4, p.566–571, 2010.

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

SILVA, A. R. S. D. Análise teórico-experimental de métodos de vitrificação para aplicações de criopreservação de sêmen. **Tese (Doutorado em Engenharia Mecânica)** – Universidade do Vale do Rio dos Sinos, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica, São Leopoldo, 2024.

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

SU, F. *et al.* Ultra-high cooling rate utilizing thin film evaporation. **Applied Physics Letters**. v.101, p11, 2012.

SU, F. *et al.* Evaporation heat transfer of liquid nitrogen on microstructured surface at high superheat level. **International Communications in Heat and Mass Transfer**. v. 87, p.192-197, 2017.

SU, F. *et al.* An Ultrafast Vitrification Method for Cell Cryopreservation. **Journal of Heat Transfer**, v. 140, n. 1, p. 1–4, 2018.

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, n.7: 071602, 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.

VRIES, R. J. *et al.* Bulk Droplet Vitrification: An Approach to Improve Large-Scale Hepatocyte Cryopreservation Outcome. **Langmuir (American Chemical Society)**, v.35, p.7354–7363, 2019.

WANG, L.; DING, Y.; QIU, Y.; YU, Y.; XIE, J.; CHEN, J. Numerical Study on Spreading and Vaporization Process of Liquid Nitrogen Droplet Impinging on Heated Wall. **Energies**, v.15, p.8700, 2022.

WHITTINGHAM, D.G.; LEIBO, S. P.; MAZUR, P. Survival of mouse embryos frozen to -196 degrees and -269 degrees C. **Science**, v. 178, n. 4059, p. 411–414, 1972.

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>.

WOLKERS F.W.; OLDENHOF, H. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Springer Protocols. 4th ed., 2021.

YANG, J.; GAO, L.; LIU, M., SUI, X.; ZHU, Y; WEN, C.; ZHANG, L. Advanced biotechnology for cell cryopreservation. **Transactions of Tianjin University** 26 p. 409-423. 2020.

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

7 APÊNDICE

7.1 Técnica de preparação - Lavagem simples

A lavagem simples consiste na diluição da amostra de sêmen em um meio de cultura apropriado, seguida pela centrifugação. Esse processo permite a concentração dos espermatozoides em um pellet no fundo do tubo, enquanto o plasma seminal e outros contaminantes permanecem na fase líquida, que é descartada. O procedimento é composto por 9 etapas que são (WHO manual, 2021):

1. Mistura do Sêmen: A amostra de sêmen deve ser bem misturada;
2. Diluição: O sêmen é diluído em uma proporção de 1:2 com o meio de cultura para promover a remoção do plasma seminal;
3. Transferência: A suspensão diluída é transferida para múltiplos tubos de centrifugação, com um volume máximo de 3 ml por tubo;
4. Centrifugação: Os tubos são centrifugados a 300–500 g por 5–10 minutos.
5. Remoção do Supernatante: O supernatante é cuidadosamente aspirado e descartado;
6. Resuspensão: O pellet de espermatozoides é resuspendido em 1 ml de meio de cultura por meio de pipetagem suave;
7. Centrifugação Adicional: A suspensão é centrifugada novamente a 300-500 g por 3-5 minutos;
8. Remoção do Supernatante: O supernatante é novamente aspirado e descartado.
9. Resuspensão Final: O pellet de espermatozoides é resuspendido em um volume adequado de meio de cultura, de acordo com a finalidade do uso (por exemplo, inseminação).

7.2 Técnica de preparação - *Swin up* direto

A técnica de *swim-up* é um método de seleção de espermatozoides que aproveita a capacidade dos espermatozoides móveis de nadar para fora do plasma seminal e entrar em um meio de cultura.

Na técnica de *swim-up*, os espermatozoides são separados com base na sua motilidade. A amostra de sêmen não deve ser diluída ou centrifugada antes do procedimento, pois isso pode causar danos às membranas dos espermatozoides. Os espermatozoides móveis nadam para o meio de cultura, permitindo que sejam coletados de forma mais eficaz. Este procedimento é

classificado em 8 etapas, de acordo com o manual de exame e processamento de sêmen da OMS (WHO manual, 2021).

1. Mistura do Sêmen: A amostra de sêmen deve ser bem misturada;
2. Colocação no Tubo: 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. Inclinação do Tubo: Inclinare o tubo em um ângulo de cerca de 45° para aumentar a interface entre o sêmen e o meio de cultura, incubando por 1 hora a 37 °C;
4. Retirada do Meio Superior: Após a incubação, retornar o tubo à posição vertical e remover 1 ml do meio superior, que conterá os espermatozoides altamente móveis;
5. Diluição: Diluir a fração coletada com 1,5–2,0 ml de meio de cultura;
6. Centrifugação: Centrifugar a 300 - 500 g por 5 minutos e descartar o supernatante;
7. Resuspensão e Avaliação: Resuspender o pellet de espermatozoides em 0,5 ml de meio para a avaliação da concentração, motilidade total e motilidade progressiva;
8. A amostra pode ser usada diretamente para fins terapêuticos ou de pesquisa.

A técnica de *swim-up* oferece a vantagem de selecionar espermatozoides móveis, refletindo sua capacidade funcional. Contudo, o rendimento de espermatozoides recuperados geralmente é menor em comparação a outras técnicas, como a centrifugação em gradientes de densidade.

Esta técnica é amplamente utilizada em procedimentos de reprodução assistida, como fertilização *in vitro* (IVF) e injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), onde a seleção de espermatozoides móveis é fundamental para o sucesso das intervenções.

7.3 Técnica de preparação - Gradiente de Densidade Descontínua - GDD

A técnica de gradiente de densidade descontínua é um método eficaz e adaptável para a coleta de espermatozoides de alta qualidade, sendo amplamente utilizada em procedimentos de reprodução assistida. Este método permite uma seleção eficiente de espermatozoides móveis, livres de outros tipos celulares e detritos.

A técnica utiliza centrifugação sobre gradientes de densidade, que separam os espermatozoides com base na sua densidade. Isso resulta em uma fração enriquecida de espermatozoides altamente móveis e morfologicamente normais. Além disso, é mais fácil de padronizar em comparação com a técnica de *swim-up*, proporcionando resultados mais consistentes.

Este método é descrito em 7 etapas de acordo com o manual de exame e processamento de sêmen da OMS (WHO manual, 2021).

1. Preparação do Gradiente: Em um tubo de ensaio, preparar o meio de gradiente de densidade, colocando 1 ml de solução a 40% (v/v) sobre 1 ml de solução a 80% (v/v);
2. Mistura do Sêmen: Utilizar pipetas estéreis com diâmetro de aproximadamente 1,5 mm para misturar o sêmen, aspirando e dispensando a amostra cerca de 10 vezes. É importante controlar a intensidade da sucção e descarga para evitar a formação de bolhas de ar e minimizar danos aos espermatozoides;
3. Aplicação do Sêmen: Depositar 1 ml da amostra de sêmen sobre o gradiente de densidade e realizar a centrifugação a uma força de 300 a 400 g por 15 a 30 minutos;
4. Coleta do Sedimento: Após a centrifugação, coletar o sedimento de espermatozoides e suspender em 5 ml de meio suplementado com o auxílio de uma micropipeta;
5. Centrifugação Adicional: Centrifugar a mistura recém-preparada a 200 g por 4 a 10 minutos;
6. Repetição da Lavagem: Repetir os passos de coleta e centrifugação (4 e 5) para purificar ainda mais os espermatozoides;
7. Avaliação Final: Misturar o sedimento final dos espermatozoides em meio suplementado para avaliar a concentração e motilidade.