



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
DOUTORADO EM CIÊNCIA ANIMAL

BEATRIZ DANTAS FERNANDES

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO
TRATADO COM PLASMA ATMOSFÉRICO FRIO NA SELEÇÃO DE
ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS DE CARNEIROS**

MOSSORÓ

2024

BEATRIZ DANTAS FERNANDES

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO
TRATADO COM PLASMA ATMOSFÉRICO FRIO NA SELEÇÃO DE
ESPERMATOZOIDES EPIDIDIMÁRIOS DE CARNEIROS**

Tese apresentada ao Doutorado em
Ciência Animal do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal da
Universidade Federal Rural do Semi-
Árido como requisito para obtenção do
título de Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e
Biotecnologia animal

Orientador: Marcelo Barbosa Bezerra,
Prof. Dr.

MOSSORÓ

2024

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

FF363 Fernandes, Beatriz Dantas.
d DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE DISPOSITIVO
MICROFLUÍDICO TRATADO COM PLASMA ATMOSFÉRICO FRIO
NA SELEÇÃO DE ESPERMATOZOÍDES EPIDIDIMÁRIOS DE
CARNEIROS / Beatriz Dantas Fernandes. - 2024.
81 f. : il.

Orientador: Marcelo Barbosa Bezerra.
Tese (Doutorado) - Universidade Federal Rural
do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em
Ciência Animal, 2024.

1. Produção in vitro. 2. Fertilização. 3.
Reprodução. 4. Pequenos ruminantes. 5. Seleção
espermática. I. Bezerra, Marcelo Barbosa, orient.
II. Título.

Ficha catalográfica elaborada por sistema gerador automático em conformidade
com AACR2 e os dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Biblioteca Campus Mossoró / Setor de Informação e Referência
Bibliotecária: Keina Cristina Santos Sousa e Silva
CRB: 15/120

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

BEATRIZ DANTAS FERNANDES

**DESENVOLVIMENTO E APLICAÇÃO DE DISPOSITIVO MICROFLUÍDICO
TRATADO COM PLASMA ATMOSFÉRICO FRIO NA SELEÇÃO DE
ESPERMATOZOÍDES EPIDIDIMÁRIOS DE CARNEIROS**

Tese apresentada ao Doutorado em
Ciência Animal do Programa de Pós-
Graduação em Ciência Animal da
Universidade Federal Rural do Semi-
Árido como requisito para obtenção do
título de Doutor em Ciência Animal.

Linha de Pesquisa: Morfofisiologia e
Biotecnologia animal

Defendida em: 26 /04/ 2024.

BANCA EXAMINADORA

Documento assinado digitalmente
 **MARCELO BARBOSA BEZERRA**
Data: 02/05/2024 17:24:08-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Marcelo Barbosa Bezerra, Prof. Dr. (UFERSA)
Presidente

Alexandre
Rodrigues Silva
Assinado de forma digital por
Alexandre Rodrigues Silva
Data: 2024.04.30 11:02:17
-8398

Alexandre Rodrigues Silva, Prof. Dr. (UFERSA)
Membro Examinador

Documento assinado digitalmente
 **CARLOS EDUARDO BEZERRA DE MOURA**
Data: 30/04/2024 19:34:58-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Carlos Eduardo Bezerra de Moura, Prof. Dr. (UFERSA)
Membro Examinador

Documento assinado digitalmente
 **CIBELE DOS SANTOS BORGES**
Data: 01/05/2024 16:41:35-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Cibele dos Santos Borges, Prof^a. Dra. (UFERSA)
Membro Examinador

Documento assinado digitalmente
 **MARICY APPARÍCIO FERREIRA**
Data: 30/04/2024 10:15:58-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Maricy Apparício Ferreira, Prof^a Dra. (UNESP)
Membro Examinador

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

BEATRIZ DANTAS FERNANDES – Nascida em Brasília – DF, no dia 29 de outubro de 1995, filha de Lucimar Dantas Fernandes e Josemar Fernandes de Oliveira, concluiu o Ensino Médio no Centro Educacional 02 (CED02), Guará (DF). Realizou a graduação em Bacharelado em Medicina Veterinária no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Paraíba (IFPB), localizando em São Gonçalo, Sousa, no ano de 2018, onde participou de projetos de pesquisa, extensão e inovação sob orientação do Prof. Dr. Daniel César da Silva. Em dezembro de 2019 concluiu o mestrado em Ciência Animal pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (PPGCA/UFERSA), sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Barbosa Bezerra. Durante o doutorado continuou pesquisas na área de seleção espermática e microfluídica, além de ser professora substituta na mesma instituição nas disciplinas de Anatomia Animal II, Fisiologia Animal II, Bioquímica, Fisiopatologia da Reprodução e Ginecologia e Obstetrícia.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35

*Dedico a toda a minha família, por me
mostrarem que o amor e a união superam
qualquer coisa.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e à Nossa Senhora, por sempre caminharem comigo e me darem forças para trilhar esse caminho, que apesar de difícil, é repleto de recompensas. Em diversos momentos o desânimo me fez pensar em desistir, mas graças a fé e a confiança em dias melhores, consegui persistir para chegar aqui.

A todos os funcionários do Abatedouro Frigorífico Industrial de Mossoró, em especial ao Sapinho, Reizinho, Caraúbas e Eduardo, por sempre serem solícitos às nossas necessidades e por toda boa vontade em separar e fornecer todo o material necessário para essa pesquisa. Aos animais, que apesar de já terem sido encaminhados para o abate, foram essenciais para as atividades de nosso laboratório.

Agradeço ao meu orientador, Marcelo Barbosa Bezerra, por disponibilizar todos os equipamentos e materiais disponíveis no Laboratório de Tecnologias Reprodutivas e Inovações em Modelos Animais (TRIMA) para execução do projeto e por não medir esforços em conseguir o que fosse necessário.

Aos meus amigos de laboratório, Ruan e Emanuel, por toda a parceria nesses últimos anos, obrigada por me auxiliarem e não me deixarem desistir, vocês são muito especiais. Ao colega Isaú por toda boa vontade e por ter me acompanhado e ensinado durante toda a etapa de aplicação do plasma atmosférico. Foram inúmeros dias de conversas e discussões que me auxiliaram à conclusão do trabalho.

Aos professores Carlos Eduardo, Alexandre Rodrigues e Marlón Feijó, por disponibilizarem seus laboratórios, equipamentos e equipes para auxiliarem durante as avaliações do projeto. O projeto foi bastante interdisciplinar, e esse apoio foi essencial para alcançar os resultados. À Andreia e Gabriel pelas avaliações dos espermatozoides coletados, obrigada pela disponibilidade e auxílio. Ao Caio por me auxiliar e ensinar sobre as avaliações microbiológicas e discussão de resultados. Vocês são exemplos de profissionais e de humanos. Que muitas outras pessoas possam ter essa sorte de conhecer vocês.

À Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA) e a todos os professores e funcionários, por terem me acolhido durante os 6 anos de mestrado, doutorado e como professora substituta. Foi uma etapa muito importante da minha vida, de grande crescimento e amadurecimento, que sempre será guardada com carinho. Espero poder ter contribuído de alguma forma durante o período que permaneci aqui.

1 À toda minha família, por todo apoio e energias positivas para que pudesse
2 alcançar essa vitória. Em especial ao meu esposo e grande parceiro de vida, Gilderlândio
3 Pinheiro, que sempre me apoiou e esteve ao meu lado durante toda a vida acadêmica, me
4 ajudando a ter mais equilíbrio e saúde mental.

5 Aos meus pais, por sempre investirem nos meus estudos e de meus irmãos, por
6 torcerem e vibrarem por cada conquista. Sabemos como foi difícil desde o dia que sai de
7 casa em busca de estudar fora, mas pude amadurecer e buscar meu próprio caminho
8 repleto de oportunidades. Obrigada por sempre fazerem de tudo, mesmo distantes, e por
9 serem exemplos de uma família.

10 Agradeço a Banca Examinadora por disponibilizarem algumas horas para
11 correção dessa tese e para participação na banca de defesa. Todos que foram escolhidos
12 são exemplos de profissionais para mim e que me espelho para ser cada vez melhor.
13 Abraço em todos.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36

“Comece fazendo o que é necessário,
depois o que é possível, e de repente
você estará fazendo o impossível.”

São Francisco de Assis

RESUMO

A seleção de espermatozoides viáveis é uma etapa crucial durante a produção *in vitro* de embriões, entretanto, os atuais métodos para isso envolvem centrifugação e podem ser prejudiciais às células. Por essa razão, estão sendo estudados dispositivos microfluídicos que permitem a seleção dos espermatozoides sem interferências externas. O polidimetilsiloxano (PDMS) é o material mais utilizado na confecção de dispositivos microfluídicos, porém é extremamente hidrofóbico, dificultado o preenchimento de canais do dispositivo. Até o momento não há estudos com seleção espermática em carneiros, assim como não há estudos avaliando a influência da aplicação do plasma atmosférico nos dispositivos microfluídicos. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi definir parâmetros para aplicação do plasma atmosférico para modificação de superfície de PDMS e avaliar a eficiência de um dispositivo microfluídico na seleção de espermatozoides de carneiros a partir da quimiotaxia. Para o primeiro experimento, foram fabricados discos de PDMS que receberam o tratamento com plasma e foram avaliados após 0h, 3h, 6h, 9h e 24h para molhabilidade. Após isso, foram fabricados dispositivos microfluídicos com PDMS para o segundo experimento, que possuíam um reservatório de entrada interligado a três reservatórios de saída. O grupo controle consistiu em dispositivos não tratados, enquanto o grupo tratamento correspondia aos dispositivos tratados com plasma durante 15 minutos. Imediatamente após a aplicação, os dispositivos eram preenchidos com três meios diferentes nos reservatórios de saída, sendo eles: meio de FIV, solução NaCl 0,9%, e meio de MIV. Após isso, o reservatório de entrada foi preenchido com amostra de espermatozoides epididimários de carneiro. O dispositivo foi incubado por 35 minutos e, posteriormente, as amostras foram coletadas para avaliar os parâmetros de motilidade através do CASA, morfologia com uso de rosa bengala, e viabilidade e integridade, através de microscopia de fluorescência e teste hisposmótico, respectivamente. Os dados foram expressos em valores de média $\pm$ desvio padrão. Primeiramente, os dados foram examinados quanto à normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk e para a homocedasticidade usando teste de Levene. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. Em relação à molhabilidade, foi possível verificar que a aplicação do plasma atmosférico alterou a superfície de PDMS para altamente hidrofílica até 3 horas ($27,31^\circ \pm 5,61^\circ$) após a aplicação do plasma ($p < 0,05$). Com o passar do tempo verificou-se que o ângulo de contato apresentou aumento gradual, porém ainda inferior ao avaliado antes do tratamento ($86,31^\circ \pm 8,16^\circ$). Já em relação à seleção espermática, observou-se que o meio FIV do grupo tratamento apresentou parâmetros superiores para motilidade total ($58,4 \pm 16,9$) e motilidade progressiva ($43,9 \pm 18,9$) em relação aos demais meios testados ($p < 0,05$) e sendo semelhante com as amostras selecionadas pelo gradiente de Percoll em todos os parâmetros. Além disso, a aplicação do plasma atmosférico não influenciou na seleção de espermatozoides, ou seja, o uso ou não do plasma atmosférico não causa melhorias ou facilidade na seleção. Dessa forma, a confecção de um novo dispositivo microfluídico foi eficiente na seleção de espermatozoides de carneiros quando comparado ao gradiente de Percoll.

Palavras-chave: Produção *in vitro*. Fertilização. Reprodução. Pequenos ruminantes. Seleção espermática.

ABSTRACT

The selection of viable sperm is a crucial step during the in vitro production of embryos, however, current methods for this involve centrifugation and can be harmful to cells. For this reason, microfluidic devices that allow sperm selection without external interference are being studied. Polydimethylsiloxane (PDMS) is the most widely used material in the manufacture of microfluidic devices, but it is extremely hydrophobic, making it difficult to fill the device's channels. To date, there are no studies with sperm selection in sheep, as well as no studies evaluating the influence of the application of atmospheric plasma on microfluidic devices. Thus, the objective of this study was to define parameters for the application of atmospheric plasma for PDMS surface modification and to evaluate the efficiency of a microfluidic device in the selection of sheep spermatozoa from chemotaxis. For the first experiment, PDMS discs were manufactured and treated with plasma and evaluated after 0h, 3h, 6h, 9h and 24h for wettability. After that, microfluidic devices with PDMS were manufactured for the second experiment, which had an inlet reservoir interconnected to three outlet reservoirs. The control group consisted of untreated devices, while the treatment group corresponded to the plasma-treated devices for 15 minutes. Immediately after application, the devices were filled with three different media in the outlet reservoirs, namely: IVF medium, 0.9% NaCl solution, and IVM medium. After that, the inlet reservoir was filled with sheep epididymal sperm samples. The device was incubated for 35 minutes and, subsequently, samples were collected to evaluate motility parameters through CASA, morphology with the use of rose cane, and viability and integrity, through fluorescence microscopy and hisposmotic test, respectively. Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation values. First, the data were examined for normality using the Shapiro-Wilk test and for homoscedasticity using the Levene test. Differences were considered significant when $p < 0.05$. Regarding the wettability, it was possible to verify that the application of atmospheric plasma changed the PDMS surface to highly hydrophilic up to 3 hours ($27.31^\circ \pm 5.61^\circ$) after plasma application ($p < 0.05$). Over time, it was found that the contact angle showed a gradual increase, but still lower than that evaluated before the treatment ($86.31^\circ \pm 8.16^\circ$). Regarding sperm selection, it was observed that the IVF medium of the treatment group presented superior parameters for total motility (58.4 ± 16.9) and progressive motility (43.9 ± 18.9) in relation to the other means tested ($p < 0.05$) and was similar to the samples selected by the Percoll gradient in all parameters. In addition, the application of atmospheric plasma did not influence sperm selection, i.e., the use or not of atmospheric plasma does not cause improvements or ease in selection. Thus, the manufacture of a new microfluidic device was efficient in the selection of spermatozoa from sheep when compared to the Percoll gradient..

Keywords: In vitro production. Fertilization. Reproduction. Small ruminants. Sperm selection.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	–	Ilustração dos quatro estados da matéria (a) e da diferenciação entre plasma térmico e frio (b).....	25
----------	---	--	----

CAPÍTULO I

Figura 1	–	Desenho de moldes e peças finalizadas de disco (1A-B) e dispositivo microfluídico (1C –D) fabricados em polidimetilsiloxano (PDMS) para molhabilidade e avaliação microbiológica antes e após o tratamento com plasma atmosférico.....	44
Figura 2	–	Imagens para mensuração de ângulo de contato e avaliação da molhabilidade de superfícies de PDMS antes (controle) e após 0, 3, 6, 9 e 24 horas do tratamento com plasma atmosférico frio.....	47
Figura 3	–	Avaliação microbiológica para <i>Staphylococcus aureus</i> de soluções depositadas em dispositivos microfluídicos sem tratamento (controle) e tratados com plasma atmosférico frio e, posteriormente, cultivadas em placas de Petri.....	49

CAPÍTULO II

Figura 1	–	Desenho de molde (A) e dispositivo microfluídico (B) contendo um reservatório de entrada e três reservatórios de saída para seleção de espermatozoides de carneiros	62
----------	---	---	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

- Tabela 1 – Ângulo de contato com a água (°) da superfície de PDMS de amostras controles e tratadas com plasma atmosférico frio após 0, 3, 6, 9 e 24 horas. 47
- Tabela 2 – Unidades formadoras de colônia (UFC) após avaliação microbiológica para *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em dispositivos microfluídicos sem aplicação de plasma atmosférico (controle) e com aplicação de plasma atmosférico (tratamento).....48

CAPÍTULO II

- Tabela 1 – Parâmetros avaliados pelo CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) de espermatozoides epididimários de carneiros (n=10) submetidos à seleção espermática a partir do uso do gradiente de Percoll e dispositivo microfluídico tratado ou não com plasma atmosférico a partir do uso da quimiotaxia.....67
- Tabela 2 – Viabilidade e atividade mitocondrial de espermatozoides epididimários de carneiros submetidos à seleção espermática a partir do uso do gradiente de Percoll e dispositivo microfluídico tratado ou não com plasma atmosférico a partir do uso da quimiotaxia.....68
- Tabela 3 – Avaliação de espermatozoides epididimários de carneiros com integridade de membrana plasmática submetidos à seleção espermática a partir do uso do gradiente de Percoll e dispositivo microfluídico tratado ou não com plasma atmosférico a partir do uso da quimiotaxia.....69
- Tabela 4 – Avaliação de morfologia (%) de espermatozoides epididimários de carneiros submetidos à seleção espermática a partir do uso do gradiente de Percoll e dispositivo microfluídico tratado ou não com plasma atmosférico a partir do uso da quimiotaxia.....70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFIM	Abatedouro Frigorífico Industrial de Mossoró
CAP	Plasma atmosférico frio (<i>cold atmospheric plasma</i>)
CASA	Sistema de análise computadorizado de sêmen (<i>computer assisted sperm analysis</i>)
DBD	Descarga de barreira dielétrica
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Et al	“e outros”
PC	Polycarbonato
PDMS	Polidimetilsiloxano
PMMA	Polimetilmetacrilato
OS	Poliestireno
PU	Poliuretano
PVC	Polivinil clorido
RNA	Ácido ribonucleico
XPS	Sociedade Brasileira de Gestão do Conhecimento
UFERSA	Universidade Federal Rural do Semi-Árido

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
°	Graus
®	Marca registrada
%	Porcentagem
™	Marca comercial

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
2.1. Microfluídica	21
2.2. Seleção espermática por Microfluídica	23
2.3. Plasma Atmosférico	26
2.4. Plasma atmosférico em PDMS	29
3. JUSTIFICATIVA	31
4. OBJETIVOS	33
4.1. Objetivo geral	33
4.2. Objetivos específicos	33
5. HIPÓTESES	34
6. REFERÊNCIAS	35
7. CAPÍTULO I: Influência do plasma atmosférico frio em superfície de polidimetilsiloxano (PDMS)	43
8. CAPÍTULO II: Seleção de espermatozoides de carneiros em dispositivo microfluídico: influência da quimiotaxia e plasma atmosférico	61
ANEXO I- CONFIGURAÇÕES UTILIZADAS NO CASA	76

1. INTRODUÇÃO

A criação de ovinos no Nordeste representa uma atividade extremamente importante, tanto a nível cultural, como econômico, pois representa importante fonte de renda para muitas famílias. Na região Nordeste, na maioria das vezes, são encontrados animais mestiços, cruzados com raças nativas, que permite que os animais apresentem boa produtividade e rusticidade ao clima da região semiárida (NASCIMENTO et al., 2022).

Apesar do crescimento no quantitativo de animais, poucas biotécnicas são aplicadas na produção de pequenos ruminantes, sendo necessário mais estudos para avançar o conhecimento. A produção *in vitro* de embriões consiste em uma biotécnica que pode ser utilizada para alcançar esse objetivo através do uso de gametas masculinos e femininos previamente selecionados (PARAMIO; IZQUIERDO, 2016).

A seleção espermática permite separar espermatozoides móveis e viáveis daqueles imóveis e mortos, além de eliminar o plasma seminal, diluentes e crioprotetores presentes na amostra de sêmen (VEGA-HIDALGO et al., 2022). Em laboratório, técnicas como o método de swim-up e o gradiente de densidade são comumente empregadas. No entanto, o processo de centrifugação associado a essas técnicas pode resultar em danos mecânicos aos espermatozoides, além de promover o aumento de radicais livres e reduzir a integridade da membrana. (SANO et al., 2010; LI et al., 2016).

A microfluídica passou a ser utilizada por proporcionar a seleção de espermatozoides móveis sem a necessidade de centrifugação, utilizando a manipulação de pequenos volumes de amostra e reagentes de forma rápida e eficiente (MARZANO et al., 2020). Atualmente, o polidimetilsiloxano (PDMS) destaca-se como o principal material para a fabricação de dispositivos microfluídicos, devido à sua fácil obtenção e manuseio, e por demonstrarem resultados positivos na seleção espermática (SMITH; ROCHA; KELLER, 2015).

Diversos estudos investigaram a eficácia da seleção espermática por meio de microfluídica em várias espécies, incluindo humanos (ZHANG; YIN; YANG, 2015; KISHI et al., 2015; OZCAN et al., 2021), camundongos (KOYAMA et al., 2006), equinos (GONZALEZ-CASTRO; CARNEVALE, 2019; ORSOLINI et al., 2022), bovinos (NAGATA et al., 2018; OGATA et al., 2021; FERNANDES et al., 2022; VEJA-HIDALGO et al., 2022) e suínos (SANO et al., 2010; MATSUURA et al., 2013), todos apresentando resultados promissores para o emprego de dispositivos microfluídicos. No

1 entanto, até o momento, não foram conduzidas pesquisas referentes à seleção de
2 espermatozoides ovinos através da quimiotaxia em dispositivo microfluídico.

3 Apesar das vantagens, alguns desafios persistem com o uso de PDMS na
4 fabricação de dispositivos para seleção espermática, sendo a hidrofobicidade da
5 superfície um dos principais obstáculos a serem superados (SHIELDS et al., 2017).
6 Atualmente, algumas técnicas têm sido empregadas para enfrentar esse problema, como
7 a hidrofilização do PDMS por meio da aplicação de plasma atmosférico. Essa abordagem
8 visa facilitar o enchimento e o fluxo de líquido no dispositivo. Entretanto, é importante
9 observar que a recuperação hidrofóbica tende a ocorrer em um curto período de tempo
10 devido à difusão das cadeias de baixo peso molecular da maior parte do PDMS para a
11 superfície (BODAS; KHAN-MALEK, 2007).

12 O uso do plasma atmosférico corresponde ao uso de plasmas frios à pressão
13 atmosférica (CAP), com plasmas que geram temperaturas não superiores a 40°C no local
14 alvo do tratamento. A maioria dos equipamentos de jato de plasma usa gases nobres como
15 o hélio ou argônio como gás de trabalho. A corrente de plasma resultante é conduzida ao
16 longo do fluxo de gás e pode ser colocado em contato direto com a superfície a ser tratada
17 (VON WOEDTKE et al., 2020).

18 Alguns estudos já abordaram a utilização de plasma atmosférico no dispositivo
19 microfluídico, seja para promover uma adesão mais robusta entre o PDMS e o vidro, ou
20 para contornar os desafios relacionados à hidrofobicidade (PHIPHATTANAPHIPHOP et
21 al., 2020). Contudo, permanece incerto se a aplicação do plasma atmosférico exerce
22 alguma influência na seleção de espermatozoides. Além disso, não há clareza quanto à
23 duração da hidrofilicidade no dispositivo ao longo do tempo.

24 Dessa forma, o objetivo deste estudo é avaliar a molhabilidade da superfície de
25 PDMS ao longo de 24 horas após aplicação de plasma atmosférico de hélio, verificar a
26 seleção espermática de espermatozoides de carneiros através de quimiotaxia e comparar
27 a influência do plasma atmosférico na seleção de espermatozoides.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Ovinocultura

No Nordeste, a ovinocultura desempenha um papel social e econômico de grande importância, sendo considerada uma atividade de subsistência para muitas famílias. O efetivo de ovinos na região Nordeste representa 69% do total do país, sendo que os estados da Bahia, Ceará e Pernambuco são os principais representantes (IBGE, 2022). Em geral, há predominância na criação de animais nativos, sem padrão racial definido e com boa adaptabilidade às condições climáticas da região (MENDES et al., 2014; DEBORTOLI et al., 2021).

A criação de ovinos permite a exploração de carne, pele e vísceras a partir de um baixo investimento inicial e, no Nordeste, estas atividades são realizadas tradicionalmente de forma extensiva, diferentemente do que é visto nas regiões Sul e Sudeste, em que os animais são criados em sistema de confinamento. Neste caso, um dos principais desafios na criação de ovinos no Nordeste é a falta de alimentação devido à irregularidade das chuvas, podendo se tornar uma atividade de risco durante períodos de estiagem (COSTA et al., 2010; SANTOS et al., 2023).

A falta de planejamento e organização durante momentos de redução de oferta de alimento causa déficit produtivo considerável nos animais, tanto em relação ao valor de mercado de carne, como nos índices reprodutivos (SANTOS et al., 2023). Dessa forma, a não adoção de tecnologias que visem aumentar o potencial produtivo dos rebanhos e minimizar os efeitos negativos da estacionalidade reprodutiva, pode reduzir consideravelmente o potencial produtivo da espécie (CAVALCANTE et al., 2005).

Na exploração de pequenos ruminantes, a eficiência reprodutiva é ponto crucial na viabilidade econômica e produtiva. Apesar dos machos contribuírem com 50% da genética de suas proles, o impacto que esses possuem na reprodução é superior, visto que será utilizado para diversas fêmeas do rebanho. Apesar disso, poucos produtores utilizam as tecnologias reprodutivas disponíveis atualmente para a espécie (MAQUIVAR; SMITH; BUSBOOM et al., 2021; AL-JARYAN et al., 2023).

As biotecnologias da reprodução permitem organizar o rebanho e melhorar índices produtivos com base no melhoramento genético dos animais (SIMÕES, 2021). O sucesso em biotecnologias, como inseminação artificial e produção *in vitro* de embriões (PIVE), estão diretamente relacionados à qualidade e maturação de oócitos, assim como à seleção de espermatozoides de boa qualidade (OLIVEIRAS et al., 2019).

1 A PIVE consiste em uma técnica de várias etapas, como maturação *in vitro* (MIV)
2 de oócitos recuperados de folículos de animais *in vivo* ou *pos-mortem*, fertilização *in vitro*
3 (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV) de zigotos até o estágio de blastocisto. Posteriormente, o
4 blastocisto pode ser transferido para uma fêmea receptora ou ser criopreservado para
5 posterior uso. Entretanto, em comparação com outros animais de produção, tecnologias
6 de reprodução assistida em pequenos ruminantes ainda necessitam de maior investigação
7 para avançar (PARAMIO; IZQUIERDO, 2014).

8 Antes de aplicar alguma biotécnica, uma etapa importante é ter o conhecimento
9 sobre a fisiologia reprodutiva e a capacidade de produção de espermatozoides, para então
10 alcançar o alto desempenho do rebanho, visto que há necessidade de desenvolver
11 estratégias na preparação dos espermatozoides, pois na maioria das biotécnicas, são
12 necessárias células criopreservadas. (COSTA et al., 2015; OLIVEIRAS et al., 2019).

13 A qualidade dos espermatozoides pode variar entre animais e em relação a
14 nutrição e estação. Quando a coleta de sêmen é realizada durante a primavera e o verão,
15 há menor produção de espermatozoides, além dos espermatozoides apresentarem maior
16 porcentagem de anormalidades, o que, consequentemente, causa redução geral na
17 fertilidade dos animais (BOLAND et al., 1985). Além disso, a manipulação e os métodos
18 de preservação do sêmen também podem interferir na qualidade da amostra.

19 O processamento do sêmen, como diluição, refrigeração, congelamento e
20 descongelamento reduz a longevidade dos espermatozoides. Apesar de ainda ter níveis
21 aceitáveis para inseminação cervical, a fertilidade pode diminuir, podendo ser indicada
22 em alguns casos a inseminação intrauterina ou a fertilização *in vitro* (DAVID et al., 2015;
23 KOP et al., 2015; FAIR et al., 2019).

24 Para a fertilização *in vivo* ou *in vitro*, a motilidade corresponde a uma das
25 características mais importantes do espermatozoide (TSAKMAKIDIS, 2010). A seleção
26 espermática representa uma etapa importante para isolar células com melhores
27 parâmetros. Para isso, métodos com o gradiente de Percoll e Swim-up podem ser
28 utilizados e apresentam bons resultados (OLIVARES et al., 2019). Entretanto, por
29 demandarem de centrifugação em uma ou mais etapas, podem acabar causando danos na
30 integridade dos espermatozoides, não atingindo todo o potencial que uma seleção
31 espermática pode providenciar. Por isso, novas técnicas, como a seleção por microfluídica
32 passaram a ser estudadas.

2.2. Microfluídica

Os dispositivos microfluídicos possuem importantes aplicações no ramo da medicina e biologia, sendo vinculados a tecnologias como “laboratório em um chip” (lab-on-a-chip) e órgão em um chip (organ-on-a-chip) (TONY et al., 2023). Devido à alta demanda por procedimentos de análises mais rápidos, houve expansão considerável nesse ramo da biotecnologia, tanto na pesquisa como na aplicação industrial (SHAKERI; KHAN; DIDAR, 2021).

A concepção de lab-on-a-chip começou a ser pensada na década de 1990, quando já se buscava realizar todas operações de bancada em um único microdispositivo. Dessa forma, os pesquisadores teriam maior controle sobre o volume de líquidos utilizados, redução de custos de amostras e reagentes, além do processo ocorrer de forma mais rápida (ABGRALL et al., 2007; TURIM et al., 2018).

Os dispositivos microfluídicos proporcionam uma ampla gama de vantagens, sendo aplicáveis na separação de células, na quantificação de biomoléculas como DNA, RNA, proteínas e lipídios e isolamento de células tumorais circulantes (COLUCCIO et al., 2019; AYUSO et al., 2022). Devido ao fato dos dispositivos serem capazes de mimetizar condições fisiológicas, esses podem ser aplicados como modelos capilares *in vitro* para compreender as características de vários tipos de células (SIVARAMAKRISHNAN et al., 2020).

Apesar das vantagens possibilitadas pelo uso de microtecnologia, há necessidade de se ter conhecimento operacional prévio para permitir a aplicação da técnica. Os operadores necessitam de treinamento para pipetar corretamente nos micropoços de entrada, evitando a introdução de ar ou formação de bolhas nos canais, e para depositar as células em tempo adequado, de forma não muito rápida, a fim de evitar estresse e morte celular (TURIM et al., 2018).

A classificação dos dispositivos microfluídicos quanto à separação de espermatozoides pode ser dividida em duas categorias principais: ativos e passivos. A distinção entre elas reside no processo de seleção. Nos dispositivos ativos, a separação é conduzida por forças externas, enquanto nos passivos, a geometria dos canais do dispositivo e as forças hidrodinâmicas desempenham o papel predominante na seleção. Portanto, é crucial que os pesquisadores realizem uma avaliação minuciosa durante o desenvolvimento e seleção de um dispositivo, garantindo que este atenda de maneira precisa às suas necessidades específicas (BHAGAT et al., 2010; SIVARAMAKRISHNAN et al., 2020).

1 Inicialmente, os primeiros dispositivos microfluídicos eram fabricados em sílico
2 e vidro, porém, para aplicações em medicina e biologia, seria necessário elaborar
3 dispositivos descartáveis para evitar contaminação de amostra, assim como ter produção
4 mais rápida e menos especializada (BECKER; GARTNER, 2008; TURIM et al., 2018).
5 Atualmente, dentre os materiais utilizados para fabricação de dispositivos microfluídicos,
6 o polidimetiloxano (PDMS) tem destaque, principalmente devido a sua fabricação
7 simples e rápida, sendo o elastômero mais utilizado para essa finalidade (JOHNSTON et
8 al., 2014).

9 Entretanto, o PDMS apresenta a desvantagem de possuir natureza hidrofóbica,
10 que leva ao acúmulo de microorganismos, desnaturação e formação de bolhas, podendo
11 ser problemática em aplicações biológicas. Ao trabalhar com soluções aquosas em
12 dispositivos microfluídicos de PDMS, o preenchimento de canais pode ser dificultado
13 devido a hidrofobicidade do material, aumentando a chance de formação de bolhas de ar
14 no dispositivo devido à falta de forças capilares e impedindo que haja conexão entre os
15 extremos do dispositivo (SHAKERI; KHAN; DIDAR, 2021).

16 Com o uso de técnicas de hidroxilação, é possível modificar a natureza do material
17 para hidrofílica, entretanto, essa característica adquirida é temporária. Diversas técnicas
18 foram desenvolvidas para permitir a modificação da superfície de PDMS, como plasma
19 de oxigênio, descargas corona (HILLBORG; GEDDE, 1998) e radiação UV (HU et al.,
20 2002; SHAHSAVAN et al., 2015). Park et al. (2012) demonstraram ainda que o
21 tratamento com água fervente por 1 hora também pode ser um método barato e eficaz
22 para gerar grupos hidroxila na superfície do PDMS. Entretanto, o período de estabilidade
23 da hidrofiliabilidade da superfície pode variar consideravelmente, tanto conforme as
24 proporções empregadas na fabricação do material quanto de acordo com os parâmetros
25 específicos de cada uma das técnicas utilizadas.

26 Dentre os métodos citados, o uso do plasma de oxigênio é um dos mais
27 conhecidos, sendo utilizado em diversos estudos para modificação de superfície de
28 PDMS. Nesse método, à medida que a potência e o tempo de aplicação do plasma
29 aumentam, o ângulo de contato do PDMS diminui, indicando maior hidrofiliabilidade da
30 superfície (JUÁREZ-MORENO et al., 2015). De acordo com Jofre-Reche et al. (2016),
31 após cerca de 24 horas do tratamento, ocorre a recuperação hidrofóbica parcial ou
32 completa, com redução visível das propriedades alcançadas com o tratamento do plasma.

2.3. Seleção espermática por Microfluídica

Devido ao aumento nos casos de infertilidade e à crescente comercialização de animais e de genética aprimorada, as biotecnologias da reprodução têm experimentado notável avanço nos últimos anos, sempre em busca de resultados superiores. A seleção de espermatozoides viáveis com danos mínimos é uma das vertentes de estudo com maior destaque nesse contexto, buscando aumentar o número e qualidade dos indivíduos de raça pura, para preservar espécies ameaçadas de extinção e para aprimorar o campo da pesquisa (MARZANO et al., 2019).

Os dois métodos comumente adotados na rotina clínica para seleção de espermatozoides são o método *swim up* e o gradiente de densidade. O *swim up* separa os espermatozoides de acordo com a motilidade espermática, enquanto o gradiente de densidade separa de acordo com a densidade dos espermatozoides. Apesar de ambos os procedimentos buscarem isolar células viáveis, estes dependem de etapas de centrifugação, que pode causar estresse oxidativo e, consequentemente, gerar danos aos espermatozoides (KIM et al., 2013; PALERMO; NERI, 2015).

No *swim up*, os espermatozoides móveis percorrem uma distância do pellet até uma camada de meio fresco na parte superior do tubo. No entanto, é necessário o uso de estímulos químicos e soluções tampão, os quais podem potencialmente ocasionar danos às células. Por outro lado, no método de centrifugação por gradiente de densidade, as forças geradas pela centrífuga são empregadas para separar os espermatozoides de acordo com seu gradiente de densidade. Entretanto, essa abordagem pode resultar em pressão excessiva e força de cisalhamento sobre os espermatozoides, podendo comprometer suas propriedades naturais (LAUGA; POWERS, 2009; ABED; ZADEHMODARRES, 2015; WU et al., 2017).

Além disso, foi observado que o Percoll[®], solução utilizada para criar gradiente de densidade durante a centrifugação é citotóxica, causando respostas inflamatórias no trato reprodutivo feminino e lesões ultraestruturais e endotóxicas aos espermatozoides, diminuindo a qualidade e a produção de embriões. Devido a isto, o Percoll[®] passou a ser proibido para uso em humanos e, para equinos, já há substituição dessa solução pelo Equipure[™], na tentativa de evitar danos aos espermatozoides (DE VOS et al., 1997; SODERLUND et al., 2000; ORSOLINI et al., 2021).

Com o intuito de mitigar essas questões e viabilizar uma seleção espermática mais eficiente e ágil, começaram a ser implementadas tecnologias que envolvem o uso de

dispositivos microfluídicos. O dispositivo de seleção de espermatozoides consiste em um reservatório de entrada, no qual a amostra de sêmen é inicialmente colocada, e um ou mais reservatórios de saída, no qual os espermatozoides selecionados são coletados. Diversos protótipos para seleção espermática foram propostos visando isolar células funcionais a partir da motilidade, viabilidade, morfologia e propriedades quimiotáticas (MARZANO et al., 2020).

Em humanos já há estudos avaliando a seleção espermática a partir da termotaxia, quimiotaxia e reotaxia (CHO et al., 2003; SEO et al., 2007; HUANG et al., 2017; ZHANG et al., 2015^a; WU et al., 2017). Os dispositivos microfluídicos foram amplamente estudados, com diversos modelos e formas de funcionamento. Yan et al. (2021) elaboraram dispositivo biomimético que permite o aquecimento e distribuição de gradiente químico para triagem de espermatozoides. Nesse, foi possível observar que os espermatozoides foram atraídos por gradiente de temperatura mais aquecida e de substância química na faixa fisiológica.

Um dos primeiros dispositivos foi desenvolvido por Cho et al. (2003), o qual era composto por 2 entradas e 2 saídas, e os espermatozoides deveriam ser capazes de nadar para fora de sua linha de corrente inicial e se direcionar para o outro canal, separando os espermatozoides viáveis daqueles não viáveis. Posteriormente, em dispositivo com a mesma configuração, Shirota et al. (2016) também encontraram resultados promissores, além de observarem menor fragmentação de DNA espermático após seleção por microfluídica em comparação com o gradiente de densidade e swim-up.

A seleção de espermatozoides através de dispositivo também foi verificada em equinos em estudo realizado por Gonzalez-Castro; Carnevale (2019). Nessa pesquisa foi possível observar que a microfluídica proporcionou a seleção de espermatozoides com parâmetros superiores em motilidade, morfologia, viabilidade e integridade de membrana e DNA em comparação aos espermatozoides selecionados através do *swim-up*. Em 2022, Orsolini et al. também compararam a eficácia da seleção de espermatozoides de equinos comparando o dispositivo microfluídico com o método de lavagem, swim up e centrifugação por gradiente de densidade. A motilidade total, motilidade progressiva, viabilidade e morfologia dos espermatozoides selecionados por microfluídica foi superior aos demais métodos de seleção. Dessa forma, os autores reforçaram o potencial da microfluídica como método de seleção espermática para realização de produção *in vitro* em equinos.

1 Em bovinos resultados promissores com o uso da microfluídica já foi descrito com
2 sêmen criopreservado descongelado (EAMER et al. 2015; NAGATA et al., 2018) e com
3 espermatozoides epididimários (FERNANDES et al., 2022). Em estudo realizado por
4 Eamer et al. (2015) foi possível verificar que espermatozoides com crioprotetor foram
5 selecionados através da microfluídica a partir do uso de substância viscosa, a
6 metilcelulose, e apresentaram resultados de concentração, viabilidade e motilidade
7 superiores em relação ao sêmen bruto.

8 Já Nagata et al. (2018), além de isolarem espermatozoides de melhor qualidade,
9 conseguiram estabelecer gestações bem-sucedidas com a inseminação artificial, apesar
10 de baixa dose, e ter nascimento de animais vivos a partir do uso da microfluídica.
11 Fernandes et al. (2022) demonstraram que espermatozoides epididimários viáveis e com
12 menos defeitos morfológicos poderiam ser selecionados a partir do uso da quimiotaxia
13 em dispositivo microfluídico em comparação ao gradiente de Percoll®.

14 Independentemente da espécie, os espermatozoides alcançam maiores taxas de
15 sucesso na fertilização se forem selecionados em condições que sejam mais próximas às
16 do ambiente uterino de uma fêmea *in vivo* (KO et al., 2018). A geometria do trato
17 reprodutor de fêmeas pode ser mimetizada em dispositivos microfluídicos, possibilitando
18 o estudo da biomimética de processos que ocorrem *in vivo*, associado ainda com outros
19 critérios fisiologicamente relevantes, como a temperatura e o gradiente químico
20 (NOSRATI et al., 2017).

21 A importância da termotaxia e a quimiotaxia na seleção espermática foi avaliada
22 por Ko et al. (2018) a partir de espermatozoides de camundongos. Nesse estudo observou-
23 se que os espermatozoides móveis se moviam mais rapidamente quando as temperaturas
24 estavam mais elevadas (37°C a 39°C) e que mais espermatozoides chegaram à saída do
25 dispositivo quando usada substância quimioatraente, no caso a acetilcolina. Huang et al.
26 (2014) observaram a capacidade dos espermatozoides de nadar em fluxo paralelo.
27 Durante o experimento, os espermatozoides imóveis foram arrastados ao longo do
28 percurso da corrente, enquanto os móveis conseguiram nadar em um fluxo contrário e
29 sair através de outra saída. Para confirmar a triagem, os autores utilizaram microscopia
30 de fluorescência e puderam observar os espermatozoides viáveis desviando o caminho
31 em relação aos não viáveis.

2.4. Plasma Atmosférico

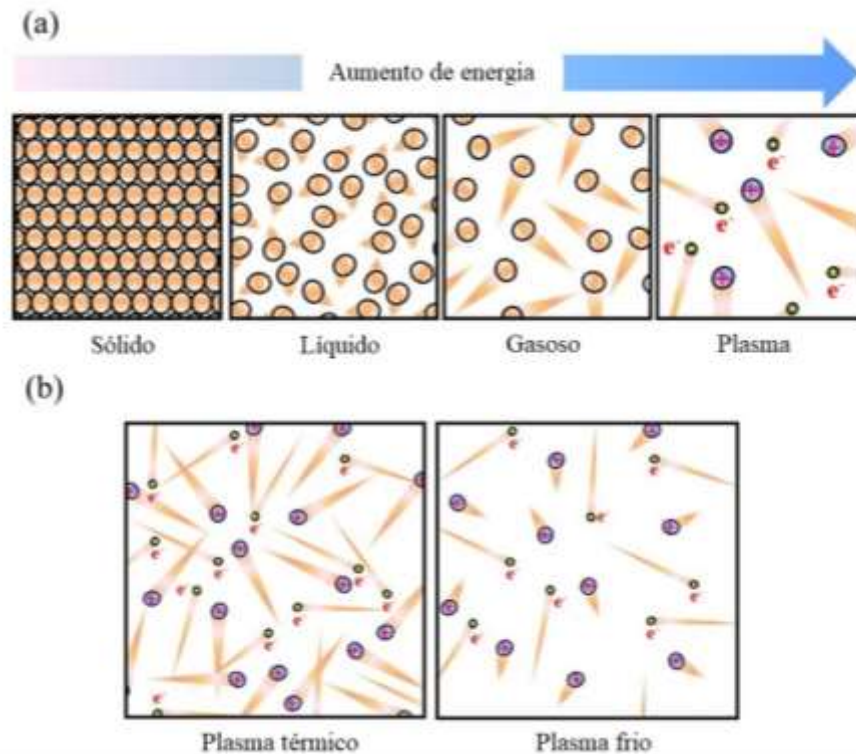
O plasma atmosférico já foi utilizado em diversos estudos, tanto para modificar as características da superfície do material, como para permitir a adesão do silicone com o vidro (WU et al., 2017; HUANG et al., 2017). O plasma representa o quarto estado da matéria, antecedido pelos estados sólido, líquido e gasoso, e consiste em um gás que recebe descarga elétrica e fica totalmente ou parcialmente ionizado (TORNÍN et al., 2021). Neste caso, ao invés de estarem ligados a um átomo ou molécula, elétrons e íons de grande energia estão livres no gás, com abundantes espécies radicais (MAKAMBA et al., 2003).

O processo de ionização ocorre quando o elétron consegue superar a barreira de potencial eletrostático, devido a uma alta energia, e é eliminado, criando um elétron livre e um íon com carga positiva. Isso ocorre à medida que átomos de líquido obtêm energia suficientemente grande para superar a força restritiva de Van der Waals dos átomos circundantes e são então transferidos para átomos de gás (YAN et al., 2016).

Na figura 1 é possível identificar os diferentes estados da matéria, e que, quando há aumento da temperatura, há alteração da matéria, que se transforma de sólida para líquida, em gás e plasma. A temperatura do plasma é determinada pelos movimentos térmicos dos elétrons e partículas pesadas, como átomos e íons (YAN et al., 2016). Além disso, dependendo das diferenças de potencial de temperatura das partículas que constituem o plasma, elas são classificadas como em equilíbrio termodinâmico e em equilíbrio não termodinâmico (THIRY et al., 2016).

As partículas em equilíbrio termodinâmico são caracterizadas por uma temperatura única, enquanto que as partículas fora de equilíbrio são denominados de plasmas frios, pois apesar da temperatura dos elétrons ser elevada, a sua baixa densidade e capacidade térmica permitem que as superfícies que rodeiam o plasma permaneçam em temperaturas baixas. O fato das partículas apresentarem esse desequilíbrio torna-se interessante, visto que os elétrons podem induzir diversas reações químicas sem causar alteração no material tratado por temperaturas elevadas (THIRY et al., 2016).

1 Figura 1- Ilustração dos quatro estados da matéria (a) e da diferenciação entre plasma
 2 térmico e frio (b).



Fonte: Adaptado de Yan et al., 2016

Legenda: As caudas triangulares representam a força do movimento térmico das partículas. Círculos marrons, violetas e iridescentes representam os átomos neutros, os íons carregados positivamente e os elétrons, respectivamente.

O plasma atmosférico frio (CAP) vem sendo utilizado de diversas formas, principalmente em aplicações médicas, como na proliferação de células endoteliais, cicatrização de feridas, coagulação sanguínea, tratamento antibacteriano e esterilização de materiais e superfícies (DUBUC et al., 2018). O plasma atmosférico pode ser gerado através de descargas diretas e indiretas. Na descarga direta, células vivas e tecidos atuam como um dos eletrodos e uma parte ativa da descarga, enquanto que numa descarga indireta, as espécies de plasma ativo são transportadas por um fluxo de gás proveniente do arco de descarga principal. A partir disso, dispositivos foram desenvolvidos para permitir a aplicação do plasma, como o jato de plasma e a descarga de barreira dielétrica (DBD) (YAN et al., 2016; BABINGTON et al., 2015).

O dispositivo de jato de plasma e o dispositivo DBD apresentam seus princípios físicos, componentes e materiais semelhantes. Em ambos os casos, um plasma violeta é gerado entre um ânodo e um cátodo, os quais são cobertos por uma camada de materiais dielétricos, como o quartzo (YAN et al., 2016). No DBD, a descarga elétrica é produzida

1 por dois eletrodos separados por uma barreira dielétrica e um gás contido entre os
2 eletrodos se torna ionizado e cria o plasma. Já o jato de plasma consiste em uma mistura
3 gasosa fluindo em alta taxa entre dois eletrodos, no qual um é alimentado por uma carga
4 de radiofrequência e o outro é aterrado, criando uma espécie reativa que sai do local em
5 alta velocidade (BABINGTON et al., 2015).

6 A formação do jato de plasma sob pressão é comumente realizada por meio da
7 utilização de um gás nobre, o qual é liberado por um tubo de diâmetro interno reduzido e
8 liberado no ar atmosférico a velocidades baixas para formar um jato laminar onde o gás
9 nobre se mistura com o ar. A partir da excitação promovida por eletrodos dispostos na
10 parte externa do tubo, um plasma luminoso é formado e se estende de forma contínua e
11 bem colimado (BREDEN; RAJA, 2014). Dentre os gases possíveis de serem utilizados,
12 o hélio representa o principal (35,8%), seguido pelo ar (26,3%) e pelo argônio (22,1%)
13 (DUBUC et al., 2018). O hélio e o argônio são gases favoráveis para formação de jato de
14 plasma em pressão atmosférica, pois produzem mais facilmente uma descarga estável e
15 homogênea em relação a outros gases mais reativos em tensão mais baixa (JONKERS et
16 al., 2002).

17 Quando a superfície a ser utilizada entra em contato com os gases ionizados e de
18 saída, os átomos de hélio da descarga criam espécies reativas, principalmente de oxigênio
19 singlete, que corresponde a uma espécie eletronicamente excitada do oxigênio molecular,
20 e radicais de hidroxila, devido reação ocorrida com o ar ambiente que interage com a
21 superfície de polímero. Com isso, há formação de grupos funcionais polares, como
22 carbonato e carbonila, tornando-se mais favoráveis para umectação da superfície e
23 contribuindo para modificação hidrofílica e aumento da molhabilidade do material
24 (TSOUGENI et al., 2009; WEST et al., 2016; BAGIATIS et al., 2019).

25 Para aplicação do plasma em superfície, diversos parâmetros podem ser ajustados
26 e, conseqüentemente, podem causar modificações na resposta esperada, como distância
27 da ponta do jato de plasma até a superfície, composição do gás, tempo de tratamento e
28 fluxo do gás (TORNÍN et al., 2021). Um dos materiais mais comumente tratados com
29 plasma é o polidimetilsiloxano (PDMS). Embora este seja utilizado constantemente em
30 diversas aplicações, o fato de ser hidrofóbico dificulta a introdução de soluções líquidas
31 nos microcanais de dispositivos fabricados com esse componente (ZHOU; ELLIS;
32 VOELCKER, 2009) e a alteração dessa característica pode ser alcançada com o plasma
33 atmosférico.

2.5. Plasma atmosférico em PDMS

Os polímeros representam substâncias que são bastante utilizadas na fabricação de microestruturas, como os dispositivos microfluídicos. Dentre os polímeros têm-se o polimetilmetacrilato (PMMA), polivinil clorido (PVC), policarbonato (PC), poliestireno (PS), poliuretano (PU) e polidimetilsiloxano (PDMS). Entretanto, dentre os polímeros usados, o PDMS representa o mais popular na fabricação de dispositivos microfluídicos, o qual é realizado através da técnica de litografia (MAKAMBA et al., 2003; KIM; JEONG, 2011).

Apesar de seu amplo uso, o PDMS é inerte e extremamente hidrofóbico, o que dificulta o preenchimento dos canais de dispositivos microfluídicos com soluções aquosas (MAKAMBA et al., 2003). A modificação da superfície de PDMS pode ser alcançada através do tratamento por plasma, a qual permite ser modificada para um estado hidrofílico. Entretanto, a recuperação da superfície hidrofóbica ocorre após alguns minutos e com isso há um crescente interesse no desenvolvimento de métodos de revestimento hidrofílico de longo prazo (EDDINGTON; PUCCINELLI; BEEBE, 2006; KIM; JEONG, 2011; TONY et al., 2023).

Em estudo realizado por Jiang et al. (2022), foi possível verificar que o ângulo de contato mensurado em superfície de PDMS diminuiu de acordo com o aumento do tempo de exposição ao plasma de oxigênio. Neste, o ângulo de contato inicial foi de 104°, diminuindo para 46° após 30 segundos de tratamento e para menos de 15° após 180 segundos de tratamento com plasma. Já ao avaliar o envelhecimento de superfícies de PDMS, Bashir et al. (2014) observaram que após tratamento com plasma de ar fresco, a superfície se tornou extremamente hidrofílica, com ângulo de 16°, porém após 3 dias o ângulo atingiu o valor de 59°, indicando a não estabilidade do PDMS tratado com plasma de ar.

Em estudos anteriores foi possível reduzir a taxa de hidrofobicidade de PDMS, após tratamento com plasma de oxigênio, armazenando o PDMS embaixo de água. Entretanto, este método não é interessante para ser aplicado em dispositivos microfluídicos, sendo necessário o armazenamento em condições secas (LEE; PARK; WHITESIDES, 2003; SAI; WHITESIDES, 2003; LEE; YANG, 2012). Já Eddington et al. (2006) demonstraram em seu estudo que superfícies de PDMS envelhecidas termicamente em um forno por vários dias pode prolongar o tempo de recuperação hidrofóbica após aplicação de plasma atmosférico de 15 minutos. Além disso, os autores

1 notaram que quanto mais fina a camada de PDMS, mais rapidamente a recuperação
2 ocorria.

3 Possivelmente, o retorno da hidrofobicidade ocorre devido a alterações da
4 rugosidade superficial, condensação dos grupos silanol na superfície e perda de espécies
5 voláteis ricas em oxigênio para a atmosfera (MAKAMBA et al., 2003). De acordo com
6 Eddington; Puccinelli; Beebe (2006) as superfícies hidrofílicas reverterem rapidamente aos
7 seus estados hidrofóbicos iniciais devido à difusão de cadeias de baixo peso molecular do
8 PDMS para a superfície oxidada. Devido a isso, a aplicabilidade dos dispositivos de
9 PDMS oxidados pode ser limitada em situações em que o ambiente hidrofílico se faz
10 necessário (MAKAMBA et al., 2003).

11 A hidrofobicidade ou hidrofiliabilidade podem ser caracterizadas a partir da
12 avaliação de molhabilidade de superfícies. A molhabilidade refere-se à realização da
13 medição do ângulo de contato entre uma gota de água e a superfície do material, à partir
14 da mensuração formada pela gota (BHATTACHARYA et al., 2005).

15 Além da molhabilidade, é possível avaliar a mudança química que ocorre na
16 superfície a partir da espectroscopia de fotoelétrons de raios X (XPS), que permite definir
17 a composição química do material analisado. Após aplicação do plasma de oxigênio, em
18 estudo realizado por Ruben et al. (2017), observou-se aumento no teor de oxigênio
19 superficial no PDMS tratado, indicando a formação de grupos óxidos e melhorando a
20 molhabilidade e o aumento do fluxo capilar dentro do microcanal, devido maior interação
21 entre a superfície e líquidos polares. O mesmo foi verificado em outro estudo, no qual ao
22 avaliar a concentração atômica do PDMS após tratamento com plasma de oxigênio, foi
23 possível observar aumento de 54,25% para 65,73% na proporção de átomos de oxigênio,
24 gerando grupos hidroxila, o que resultou em uma superfície extremamente hidrofílica
25 (JIANG et al., 2022).

3. JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento e a aplicação de dispositivos microfluídicos na rotina clínica têm crescido ao longo dos anos, tornando a técnica cada vez mais precisa e refinada. Na área da reprodução, esses dispositivos são amplamente utilizados para a seleção de espermatozoides, principalmente em humanos. Na medicina veterinária poucos estudos são relatados com animais de produção, como bovinos e suínos, porém nenhum estudo avaliou a eficiência da seleção espermática com uso da microfluídica em pequenos ruminantes. Apesar desses animais apresentarem alta visibilidade e interesse econômico em nível mundial, a utilização de dispositivos microfluídicos precisa ser melhor explorada.

A seleção de espermatozoides é fundamental para melhorar a qualidade da amostra de sêmen, resultando em melhores taxas de fecundação e, consequentemente, de prenhez. Embora existam técnicas laboratoriais como o gradiente de Percoll e o Swim-up capazes de realizar essa função, a centrifugação necessária nessas técnicas pode ser prejudicial para as células espermáticas. Nesse contexto, a microfluídica surge como uma alternativa promissora, permitindo a separação de espermatozoides viáveis através de processos como quimiotaxia, reotaxia e/ou termotaxia. Esses mecanismos possibilitam que os espermatozoides nadem voluntariamente para um ambiente mais propício, sem causar danos à sua estrutura.

O polidimetilsiloxano (PDMS) é o principal material utilizado na fabricação de dispositivos microfluídicos. No entanto, devido à sua extrema hidrofobicidade, pode ser difícil preencher os canais com meios e amostras de sêmen. Para contornar esse problema, o plasma atmosférico tem sido utilizado para tornar a superfície do PDMS hidrofílica. Embora alguns estudos tenham utilizado o plasma atmosférico antes da seleção de espermatozoides, ainda não se sabe qual é a influência dessa aplicação nos espermatozoides ou na seleção espermática, assim como parâmetros definidos para aplicação do plasma com gás hélio.

Além disso, já foi relatada a ação antibacteriana que o plasma atmosférico pode proporcionar em meios ou tecidos testados. No entanto, resultados positivos foram encontrados apenas quando o plasma foi aplicado diretamente sobre essas estruturas. Como um dos objetivos da microfluídica é possibilitar a realização de diversas aplicações laboratoriais em um mesmo dispositivo, processos subsequentes à fertilização in vitro, como a produção in vitro de embriões, seriam interessantes de se considerar. Para isso, o

dispositivo deve ser esterilizado e evitar a contaminação bacteriana da amostra. Nesse sentido, o plasma poderia auxiliar ainda mais na redução da carga bacteriana de superfícies e na prevenção da propagação de colônias bacterianas na amostra.

Este estudo tem como objetivo inicial identificar as características de modificação de superfície do PDMS por meio de parâmetros pré-determinados e avaliar o potencial antibactericida após a aplicação do plasma. Em um segundo momento, pretende-se avaliar a eficácia de um dispositivo microfluídico na seleção de espermatozoides de carneiros por meio da quimiotaxia, uma vez que não há estudos prévios com essa espécie. Além disso, será analisada a influência da aplicação do plasma atmosférico no dispositivo microfluídico na seleção de espermatozoides.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo geral

Desenvolver dispositivo microfluídico para realizar seleção de espermatozoides epididimários de carneiros por quimiotaxia, após tratamento de plasma atmosférico.

4.2. Objetivos específicos

- Testar os meios de Fertilização *in vitro*, Maturação *in vitro* e Solução NaCl 0,9% na quimiotaxia de espermatozoides;
- Determinar os parâmetros e o tempo de viabilidade da hidrofiliabilidade de superfície de PDMS após aplicação de plasma atmosférico;
- Avaliar a eficiência do dispositivo microfluídico na separação e seleção de espermatozoides com base em critérios como motilidade, morfologia e viabilidade;
- Investigar a influência do tratamento com plasma atmosférico com gás hélio nos dispositivos microfluídicos para seleção espermática;
- Comparar os resultados obtidos com a seleção convencional de espermatozoides, por gradiente de Percoll, com aqueles obtidos através do dispositivo microfluídico, analisando a qualidade dos espermatozoides selecionados em ambos os casos.

5. HIPÓTESE

A aplicação de plasma atmosférico com hélio promove modificação da superfície de polidimetilsiloxano (PDMS), além de melhorar a seleção de espermatozoides epididimários de carneiros.

6. REFERÊNCIAS

- ABED, F.; ZADEHMODARRES, S. A comparative study of swim-up and upstream methods for isolating sperm cell for intra uterine insemination. **Int Journal of Women's Health Reproduction Science**, v. 3, p. 103-106, 2015.
- ABGRALL, P.; GUE, A. M. Lab-on-chip technologies: making a microfluidic network and coupling it into a complete microsystem—a review. **Journal of micromechanics and microengineering**, v. 17, n. 5, p. 15, 2007.
- AL-JARYAN, I. L.; AL-THUWAINI, T. M.; MERZAH, L. H.; ALKHAMMAS, A. H. Reproductive physiology and advanced technologies in sheep reproduction. **Reviews in Agricultural Science**, v. 11, p. 171-180, 2023.
- AYUSO, J. M. et al. A role for microfluidic systems in precision medicine. **Nature communications**, v. 13, n. 1, p. 3086, 2022.
- BABINGTON, P. et al. Use of cold atmospheric plasma in the treatment of cancer. **Biointerphases**, v. 10, n. 2, 2015.
- BAGIATIS, V.; CRITCHLOW, G.W.; PRICE, D.; WANG, S. The effect of atmospheric pressure plasma treatment (APPT) on the adhesive bonding of poly(methyl methacrylate) (PMMA)-to-glass using a polydimethylsiloxane (PDMS)-based adhesive. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, v.95, p.102405, 2019.
- BASHIR, M. et al. Surface coating of bonded PDMS microchannels by atmospheric pressure microplasma. **Plasma Processes and Polymers**, v. 11, n. 3, p. 279-288, 2014.
- BECKER, H.; GÄRTNER, C. Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 390, p. 89-111, 2008.
- BHAGAT, A. A. S. et al. Microfluidics for cell separation. **Medical & biological engineering & computing**, v. 48, p. 999-1014, 2010.
- BHATTACHARYA, S.; DATTA, A.; BERG, J.M.; GANGOPADHYAY, S. Studies on surface wettability of poly (dimethyl) siloxane (PDMS) and glass under oxygen-plasma treatment and correlation with bond strength. **Journal of microelectromechanical systems**, v. 14, n. 3, p. 590-597, 2005.
- BODAS, Dhananjay; KHAN-MALEK, Chantal. Hydrophilization and hydrophobic recovery of PDMS by oxygen plasma and chemical treatment—An SEM investigation. **Sensors and actuators B: chemical**, v. 123, n. 1, p. 368-373, 2007.
- BOLAND, M.P.; AI-KAMALI, A.A.; CROSBY, T.F.; HAYNES, N.B.; HOWLES, C.M.; KELLEHER, D.L.; GORDON, I. The influence of breed, season and photoperiod on semen characteristics, testicular size, libido and plasma hormone concentrations in rams. **Animal Reproduction Science**, v. 9, p. 241–252, 1985.
- CAVALCANTE, A. C. R.; NEIVA, J. N. M.; CÂNDIDO, M. J. D.; VIEIRA, L. S. Produção de Ovinos e Caprinos de Corte em Pastos Cultivados sob Manejo

Rotacionado. Circular Técnica. **EMBRAPA**. Disponível em:
<https://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/534488/1/ct31.pdf> Acesso em: 01
 de Jun. de 2024.

COLUCCIO, M. L. et al. A passive microfluidic device for chemotaxis studies. **Micromachines**, v. 10, n. 8, p. 551, 2019.

COSTA, A.R.; LACERDA, C.; FREITAS, F. R. D. A criação de ovinos e caprinos em Campos Sales-CE. **Cadernos de Cultura e Ciência**, v. 2, n. 2, p. 55 a 63, 2010.

COSTA, D.F.; SOUTO, D.V.O.; ROCHA, E. F.; GUIMARÃES, L.J.; SILVA, M. S.; SOUZA, B. B.; SILVA, G. A. **Agropecuária Científica no Semiárido**, v.11, n.2, p.33-38, 2015.

DAVID, I.; KOHNKE, P.; FEHRENBACH, J.; SIMOES, A. L.; DEBREUVE, E.; DESCOMBES, X.; PLOURABOUE, F.; DEGOND, P.; DRUART, X. New objective measurements of semen wave motion are associated with fertility in sheep. **Reproduction, Fertility and Development**, v.30, n.6, p.889-896, 2015.

DEBORTOLI, E. C.; MONTEIRO, A. L. G.; GAMEIRO, A. H.; SARAIVA, L. C. V. F. Meat sheep farming systems according to economic and productive indicators: A case study in Southern Brazil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 50, p. e20200216, 2021.

DE VOS, A. et al. Percoll gradient centrifugation can be omitted in sperm preparation for intracytoplasmic sperm injection. **Human reproduction** (Oxford, England), v. 12, n. 9, p. 1980-1984, 1997.

DUBUC, A., MONSARRAT, P., VIRARD, F., MERBAHI, N., SARRETTE, J. P., LAURENCIN-DALICIEUX, S., & COUSTY, S. Use of cold-atmospheric plasma in oncology: A concise systematic review. **Therapeutic advances in medical oncology**, v. 10, 2018.

EAMER, L. et al. Microfluidic assessment of swimming media for motility-based sperm selection. **Biomicrofluidics**, v. 9, n. 4, 2015.

EDDINGTON, D.T.; PUCCINELLI, J.P.; BEEBE, D.J. Thermal aging and reduced hydrophobic recovery of polydimethylsiloxane. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 114, n. 1, p. 170-172, 2006.

EISENBACH, M. Sperm chemotaxis. **Reviews of reproduction**, v. 4, n. 1, p. 56-66, 1999.

FAIR, S.; MEADE, K. G.; REYNARUD, K.; DRUART, X.; GRAAF, S. P. The biological mechanisms regulating sperm selection by the ovine cervix. **Reproduction**, v. 158, n. 1, p. R1-R3, 2019.

- 1 GONZALEZ-CASTRO, R. A.; CARNEVALE, E. M. Use of microfluidics to sort
2 stallion sperm for intracytoplasmic sperm injection. **Animal reproduction science**, v.
3 202, p. 1-9, 2019.
- 4
- 5 HILLBORG, H.; G., U. W. Hydrophobicity recovery of polydimethylsiloxane after
6 exposure to corona discharges. **Polymer**, v. 39, n. 10, p. 1991-1998, 1998.
- 7
- 8 HU, S. et al. Surface modification of poly (dimethylsiloxane) microfluidic devices by
9 ultraviolet polymer grafting. **Analytical chemistry**, v. 74, n. 16, p. 4117-4123, 2002.
- 10
- 11 HUANG, H.Y. et al. Isolation of motile spermatozoa with a microfluidic chip having a
12 surface-modified microchannel. **Journal of laboratory automation**, v. 19, n. 1, p. 91-
13 99, 2014.
- 14
- 15 HUANG, H.Y.; HUANG, P.W.; YAO, D.J. Enhanced efficiency of sorting sperm
16 motility utilizing a microfluidic chip. **Microsystem Technologies**, v. 23, p. 305-312,
17 2017.
- 18
- 19 INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Efetivo dos
20 rebanhos, por tipo de rebanhos. **IBGE**. Disponível em:
21 [https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-](https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html)
22 [da-pecuaria-municipal.html](https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/9107-producao-da-pecuaria-municipal.html) Acessado em: 27 de maio de 2024.
- 23
- 24 JAHANGIRI, Ali Reza et al. Microfluidics: The future of sperm selection in assisted
25 reproduction. **Andrology**, 2023.
- 26
- 27 JIANG, B.; GUO, H.; CHEN, D.; ZHOU, M. Microscale investigation on the
28 wettability and bonding mechanism of oxygen plasma-treated PDMS microfluidic chip.
29 **Applied Surface Science**, v. 574, p. 151704, 2022.
- 30
- 31 JOFRE-RECHE, J. A. et al. Increased adhesion of polydimethylsiloxane (PDMS) to
32 acrylic adhesive tape for medical use by surface treatment with an atmospheric pressure
33 rotating plasma jet. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 49, n. 33, p. 334001,
34 2016.
- 35
- 36 JONKERS, J.; VAN DE SANDE, M.; SOLA, A.; GAMERO, A.; VAN DER
37 MULLEN, J. On the differences between ionizing helium and argon plasmas at
38 atmospheric pressure. **Plasma Sources Science and Technology**, v. 12, n. 1, p. 30,
39 2002.
- 40
- 41 JOHNSTON, I. D. et al. Mechanical characterization of bulk Sylgard 184 for
42 microfluidics and microengineering. **Journal of Micromechanics and**
43 **Microengineering**, v. 24, n. 3, p. 035017, 2014.
- 44
- 45 JUÁREZ-MORENO, J. A. et al. Effect of wettability and surface roughness on the
46 adhesion properties of collagen on PDMS films treated by capacitively coupled oxygen
47 plasma. **Applied Surface Science**, v. 349, p. 763-773, 2015.
- 48
- 49 KIM, H. T.; JEONG, O. C. PDMS surface modification using atmospheric pressure
50 plasma. **Microelectronic engineering**, v. 88, n. 8, p. 2281-2285, 2011.

- 1 KIM, S.; AGCA, C.; AGCA, Y. Effects of various physical stress factors on
2 mitochondrial function and reactive oxygen species in rat spermatozoa. **Reproduction,**
3 **Fertility and Development**, v. 25, n. 7, p. 1051-1064, 2013.
- 4
- 5 KISHI, K. et al. Frequency of sperm DNA fragmentation according to selection method:
6 Comparison and relevance of a microfluidic device and a swim-up procedure. **Journal**
7 **of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 11, p. QC14, 2015.
- 8
- 9 KO, Y. J. et al. Design, fabrication, and testing of a microfluidic device for thermotaxis
10 and chemotaxis assays of sperm. **SLAS TECHNOLOGY: Translating Life Sciences**
11 **Innovation**, v. 23, n. 6, p. 507-515, 2018.
- 12
- 13 KOP, P.A.L.; VAN WELY, M.; MOL, B.W.; MELKER, A.A.; JANSSENS, P.M.W.;
14 ARENDS, B.; CURFS, M.H.J.M.; KORTMAN, M.; NAP, A.; RIJNDERS, E.;
15 ROOVERS, J.P.W.R.; RUIS, H.; SIMONS, A.H.M.; REPPING, S.; VAN DER VEEN,
16 F.; MOCHTAR, M.H. Intrauterine insemination or intracervical insemination with
17 cryopreserved donor sperm in the natural cycle: a cohort study. **Human Reproduction**,
18 v.30, n.3, p.603-607, 2015.
- 19
- 20 KOYAMA, S. et al. Chemotaxis assays of mouse sperm on microfluidic devices.
21 **Analytical chemistry**, v. 78, n. 10, p. 3354-3359, 2006.
- 22
- 23 LAUGA, E.; POWERS, T. R. The hydrodynamics of swimming microorganisms.
24 **Reports on progress in physics**, v. 72, n. 9, p. 096601, 2009.
- 25
- 26 LEE, J. Ng; PARK, C.; WHITESIDES, G. M. Solvent compatibility of poly
27 (dimethylsiloxane)-based microfluidic devices. **Analytical chemistry**, v. 75, n. 23, p.
28 6544-6554, 2003.
- 29
- 30 LEE, D.; YANG, S. Surface modification of PDMS by atmospheric-pressure plasma-
31 enhanced chemical vapor deposition and analysis of long-lasting surface hydrophilicity.
32 **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 162, n. 1, p. 425-434, 2012.
- 33
- 34 LI, J. et al. Application of a microfluidic sperm sorter to in vitro production of dairy
35 cattle sex-sorted embryos. **Theriogenology**, v. 85, n. 7, p. 1211-1218, 2016.
- 36
- 37 MARZANO, G. et al. Altered morphokinetics in equine embryos from oocytes exposed
38 to DEHP during IVM. **Molecular reproduction and development**, v. 86, n. 10, p.
39 1388-1404, 2019.
- 40
- 41 MARZANO, G. et al. Sperm selection in assisted reproduction: A review of established
42 methods and cutting-edge possibilities. **Biotechnology advances**, v. 40, p. 107498,
43 2020.
- 44
- 45 MAKAMBA, H.; KIM, J.H.; LIM, K.; PARK, N.; HAHN, J.H. Surface modification of
46 poly(dimethylsiloxane)microchannels. **Electrophoresis**, v.24, p.3607-3619, 2003.
- 47
- 48 MATSUURA, K. et al. A microfluidic device to reduce treatment time of
49 intracytoplasmic sperm injection. **Fertility and sterility**, v. 99, n. 2, p. 400-407, 2013.
- 50

- 1
- 2 MAQUIVAR, M. G.; SMITH, S. M.; BUSBOOM, J. R. Reproductive management of
- 3 rams and ram lambs during the pre-breeding season in US sheep farms. **Animals**, v. 11,
- 4 n. 9, p. 2503, 2021.
- 5
- 6 MENDES, A. M. P.; AZEVEDO, M. D.; LOPES, P. M. O.; MOURA, G. B. D. A.
- 7 Zoneamento bioclimático para a raça ovina Dorper no Estado de Pernambuco. **Pesquisa**
- 8 **Agropecuária Brasileira**, v. 49, p. 986-993, 2014.
- 9
- 10 NAGATA, M. P. B. et al. Live births from artificial insemination of microfluidic-sorted
- 11 bovine spermatozoa characterized by trajectories correlated with fertility. **Proceedings**
- 12 **of the National Academy of Sciences**, v. 115, n. 14, p. 3087-3096, 2018.
- 13
- 14 NASCIMENTO, M. I. S. S.; FERREIRA, F. F. S.; ALBUQUERQUE, H. J. O.;
- 15 NASCIMENTO, T. L. F.; ALBUQUERQUE, H. O.; CABRAL, A. M. D.; SILVA, L.V.
- 16 D.; SANTOS, M. J. M. BARRETO, L. M. G.; LIMA, V. R. S.; SANTOS, G. C. L.
- 17 Insights dos principais produtos oriundos da caprinovinoculturano Nordeste brasileiro.
- 18 **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, 2022.
- 19
- 20 NOSRATI, R. et al. Microfluidics for sperm analysis and selection. **Nature Reviews**
- 21 **Urology**, v. 14, n. 12, p. 707-730, 2017.
- 22
- 23 OGATA, K. et al. In vitro survival kinetics of microfluidic-sorted bovine spermatozoa.
- 24 **Andrology**, v. 9, n. 3, p. 977-988, 2021.
- 25
- 26 OLIVARES, C. C. S.; SOUZA-FABJAN, J.M.G.; FONSECA, J. F.; SARAIVA, H. F.
- 27 R. A. CÔRTEZ, L. R.; ALFRADIQUE, V. A. P.; BALARO, M. F. A.; OLIVEIRA, R.
- 28 V.; BRANDÃO, F. Z. Mini-percoll gradient may be used for frozen-thawed sperm
- 29 selection in sheep. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.71,
- 30 n.2, 2019.
- 31
- 32 ORSOLINI, M. F.; MEYERS, S. A.; DINI, Pouya. An Update on Semen Physiology,
- 33 Technologies, and Selection Techniques for the Advancement of In Vitro Equine
- 34 Embryo Production: Section II. **Animals**, v. 11, n. 11, p. 3319, 2021.
- 35
- 36 ORSOLINI, M. F. et al. Characterization of sperm cell membrane charge and selection
- 37 of high-quality sperm using microfluidics in stallions. **Theriogenology**, v. 192, p. 1-8,
- 38 2022.
- 39
- 40 OZCAN, P. et al. Does the use of microfluidic sperm sorting for the sperm selection
- 41 improve in vitro fertilization success rates in male factor infertility?. **Journal of**
- 42 **Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 47, n. 1, p. 382-388, 2021.
- 43
- 44 PALERMO, G. D.; NERI, Q. V. Intracytoplasmic injection with suboptimal
- 45 spermatozoa. In: Non-Invasive Sperm Selection for In Vitro Fertilization: Novel
- 46 Concepts and Methods. New York, NY: Springer New York, 2014. p. 7-21.
- 47
- 48 PARAMIO, M. T.; IZQUIERDO, D. Current Status of In Vitro Embryo Production in
- 49 Sheep and Goats. **Reproduction in Domestic Animals**, v.49, n.4, p.37-48, 2014.
- 50

- PARAMIO, M. T.; IZQUIERDO, D. Recent advances in in vitro embryo production in small ruminants. **Theriogenology**, v. 86, n.1, p. 152-159, 2016.
- PARK, J. Y. et al. Surface chemistry modification of PDMS elastomers with boiling water improves cellular adhesion. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 173, p. 765-771, 2012.
- PHIPHATTANAPHIPHOP, C. et al. A novel microfluidic chip-based sperm-sorting device constructed using design of experiment method. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 17143, 2020.
- RUBEN, B. et al. Oxygen plasma treatments of polydimethylsiloxane surfaces: effect of the atomic oxygen on capillary flow in the microchannels. **Micro & Nano Letters**, v. 12, n. 10, p. 754-757, 2017.
- SANTOS, W.S.; ALBUQUERQUE, H. J. O.; ALBUQUERQUE, H. O.; CABRAL, A. M. D.; FERREIRA, F. F. S.; SANTOS, E. S. S.; NASCIMENTO, M. I. S. S.; SANTOS, G. C. L. Diagnóstico da cadeia produtiva de caprinos e ovinos no Brasil e na Região Nordeste. **Brazilian Journal of Development**, v. 9, n. 7, p. 21283-21303, 2023.
- SHAHSAVAN, H. et al. Surface modification of polydimethylsiloxane elastomer for stable hydrophilicity, optical transparency and film lubrication. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 482, p. 267-275, 2015.
- SHAKERI, A.; KHAN, S.; DIDAR, T. F. Conventional and emerging strategies for the fabrication and functionalization of PDMS-based microfluidic devices. **Lab on a Chip**, v. 21, n. 16, p. 3053-3075, 2021.
- SHIELDS IV, C. W. et al. Translating microfluidics: Cell separation technologies and their barriers to commercialization. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 92, n. 2, p. 115-125, 2017.
- SHIROTA, K. et al. Separation efficiency of a microfluidic sperm sorter to minimize sperm DNA damage. **Fertility and sterility**, v. 105, n. 2, p. 315-321, 2016.
- SIA, S. K.; WHITESIDES, G. M. Microfluidic devices fabricated in poly (dimethylsiloxane) for biological studies. **Electrophoresis**, v. 24, n. 21, p. 3563-3576, 2003.
- SIMÕES, M. D. R. S. Revisão sistemática sobre avaliações reprodutivas em ovinos. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 7, n. 12, p. 1742-1765, 2021.
- SIVARAMAKRISHNAN, M. et al. Active microfluidic systems for cell sorting and separation. **Current Opinion in Biomedical Engineering**, v. 13, p. 60-68, 2020.
- SMITH, G.D., DA ROCHA, A.M., KELLER, L. (2015). Microfluidics for Sperm Selection. In: Agarwal, A., Borges Jr., E., Setti, A. (eds) Non-Invasive Sperm Selection for In Vitro Fertilization. Springer, New York, NY.

- 1
- 2 SÖDERLUND, B.; LUNDIN, K.. The use of silane-coated silica particles for density
- 3 gradient centrifugation in in-vitro fertilization. **Human Reproduction**, v. 15, n. 4, p.
- 4 857-860, 2000.
- 5
- 6 TAN, H.M.L. et al. Surface modification of poly (dimethylsiloxane) for controlling
- 7 biological cells' adhesion using a scanning radical microjet. **Thin Solid Films**, v. 515,
- 8 n. 12, p. 5172-5178, 2007.
- 9
- 10 THIRY, D. et al. Plasma diagnostics for the low-pressure plasma polymerization
- 11 process: A critical review. **Thin Solid Films**, v. 606, p. 19-44, 2016.
- 12
- 13 TONY, A.; BADEA, I.; YANG, C.; LIU, Y.; WANG, K.; YANG, S. M.; ZHANG, W.
- 14 A Preliminary Experimental Study of Polydimethylsiloxane (PDMS)-To-PDMS
- 15 Bonding Using Oxygen Plasma Treatment Incorporating Isopropyl Alcohol. **Polymers**,
- 16 v. 15, n. 4, p. 1006, 2023.
- 17
- 18 TORINO, S. et al. Pdms-based microfluidic devices for cell culture. **Inventions**, v. 3, n.
- 19 3, p. 65, 2018.
- 20
- 21 TORNIN, J., LABAY, C., TAMPIERI, F., GINEBRA, M. P., CANAL, C. Evaluation
- 22 of the effects of cold atmospheric plasma and plasma-treated liquids in cancer cell
- 23 cultures. **Nature Protocols**, v.16, n.6, p.2826-2850, 2021.
- 24
- 25 TSAKMAKIDIS, I. A. Ram semen evaluation: Development and efficiency of modern
- 26 techniques. **Small Ruminant Research**, v. 92, n. 1-3, p. 126-130, 2010.
- 27
- 28 TSOUGENI, K.; VOUREDAS, N.; TSEREPI, A.; GOGOLIDES, E.; CARDINAUD, C.
- 29 Mechanisms of oxygen plasma nanotexturing of organic polymer surfaces: from stable
- 30 super hydrophilic to super hydrophobic surfaces. **Langmuir**, v. 25, n. 19, p. 11748-
- 31 11759, 2009.
- 32
- 33 VEGA-HIDALGO, J. et al. Sperm selection techniques in cattle: Microfilter device
- 34 versus conventional methods. **Andrologia**, v. 54, n. 11, p. e14585, 2022.
- 35
- 36 VON WOEDTKE, T. et al. Perspectives on cold atmospheric plasma (CAP)
- 37 applications in medicine. **Physics of Plasmas**, v. 27, n. 7, 2020.
- 38
- 39 XIE, L. et al. Integration of sperm motility and chemotaxis screening with a
- 40 microchannel-based device. **Clinical chemistry**, v. 56, n. 8, p. 1270-1278, 2010.
- 41
- 42 WEST, J.O.F.; CRITCHLOW, G.W.; LAKE, D.R.; BANKS, R. Development of a
- 43 superhydrophobic polyurethane-based coating from a two-step plasma-fluoroalkyl
- 44 silane treatment. **International Journal of Adhesion and Adhesives**, v. 68, p. 195-204,
- 45 2016.
- 46
- 47 WU, J.K. et al. High-throughput flowing upstream sperm sorting in a retarding flow
- 48 field for human semen analysis. **Analyst**, v. 142, n. 6, p. 938-944, 2017.
- 49

1 YAN, D.; SHERMAN, J.H.; KEIDAR, M. Cold atmospheric plasma, a novel promising
2 anti-cancer treatment modality. **Oncotarget**, v. 8, n. 9, p. 15977, 2017.

3
4 YAN, Yimo et al. A fully integrated biomimetic microfluidic device for evaluation of
5 sperm response to thermotaxis and chemotaxis. **Lab on a Chip**, v. 21, n. 2, p. 310-318,
6 2021.

7
8 ZHANG, B.; YIN, T. L.; YANG, J. A novel microfluidic device for selecting human
9 sperm to increase the proportion of morphologically normal, motile sperm with
10 uncompromised DNA integrity. **Analytical Methods**, v. 7, n. 14, p. 5981-5988, 2015.

11
12 ZHOU, J., ELLIS, A.V.; VOELCKER, N.H. Recent developments in PDMS surface
13 modification for microfluidic devices. **Electrophoresis**, v.31, n.1, p.2-16, 2009.

1 7. CAPÍTULO I: Influência do plasma atmosférico frio em superfície de
2 polidimetilsiloxano (PDMS)

3
4
5
6
7
8
9
10 Submetido para a revista: **Plasma Processes and Polymers**

11 Qualis: A1

12 Fator de Impacto: 2.921

Influência do plasma atmosférico frio em superfície de polidimetilsiloxano (PDMS)

Influence of cold atmospheric plasma on polydimethylsiloxane surface (PDMS)

Beatriz Dantas Fernandes^a, Isau Dantas Moraes^b, Ruan da Cruz Paulino^a, Emanuel

Lucas Bezerra Rocha^a, Carlos Eduardo Bezerra de Moura^c, Caio Sérgio Santos^d,

Francisco Marlon Carneiro Feijó^d, Clodomiro Alves Junior^e, Marcelo Barbosa Bezerra^{a*}

^aLaboratory of Reproductive Technologies and Innovations in Animal Models, Federal Rural University of the Semi-Arid, UFRSA, Mossoró, RN, Brazil

(beatriz_dfernandes@hotmail.com; ruan_paullino@hotmail.com; emanuellucasvet@gmail.com)

^bGraduate Program in Animal Science, Federal Rural University of Semiarid Region (UFRSA), Mossoró, RN, 59625-900 Brazil (isaudantas1@gmail.com)

^c Department of Animal Sciences, Federal Rural University of Semiarid Region (UFRSA), Mossoró, RN, 59625-900 Brazil (carlos.moura@ufersa.edu.br)

^d Laboratory of Veterinary Microbiology, Center of Agrarian Sciences, Federal Rural, UFRSA, 59625-900 Mossoró, Brazil (caiosergio@ufersa.edu.br; marlon@ufersa.edu.br)

^e Department of Exact and Natural Sciences, Federal Rural University of Semiarid Region (UFRSA), Mossoró, RN, 59625-900 Brazil (clodomiro.jr@ufersa.edu.br)

* Corresponding author: Marcelo Barbosa Bezerra (mbezerra@ufersa.edu.br) Address for corresponding author: Laboratory of Reproductive Technologies and Innovations in Animal Models, Department of Animal Science, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brazil, 59625-900

Resumo

O uso do plasma atmosférico a frio (CAP) para o tratamento de superfícies vem sendo amplamente empregado com o intuito de modificar as propriedades físico-químicas e, consequentemente, melhorar a biocompatibilidade desses materiais. Além disso, o CAP possui uma importante ação antibacteriana, associada a sua capacidade de promover maior molhabilidade das superfícies. O polidimetilsiloxano (PDMS) ou silicone é frequentemente escolhido como polímero para a fabricação de instrumentos em diversas áreas, como na biomedicina. No entanto, até o momento, não foram encontrados estudos que investigassem os efeitos do CAP sobre superfícies de PDMS. Para isso, no presente trabalho foram confeccionados discos e dispositivos de PDMS, nas proporções indicadas pelo fabricante e tratados com jato de CAP a 13kv e 600hz, com hélio 1,5 L/min como gás carreador. Assim, objetivou-se avaliar o efeito do tratamento de CAP na superfície do PDMS em relação à sua molhabilidade e sua ação antibacteriana. Para este propósito, foram produzidos 30 discos para análise da molhabilidade e 20 dispositivos microfluídicos para a avaliação microbiológica. Além do grupo controle, a molhabilidade foi monitorada após 0, 3, 6, 9 e 24 horas de tratamento com plasma. A molhabilidade foi avaliada pelo método da gota séssil. Para a avaliação microbiológica, os dispositivos foram tratados com CAP e culturas bacterianas contendo densidade celular de 10^8 UFC/ml. de *Staphylococcus aureus* (ATCC, 25923) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC, 27853) foram inoculadas em suas superfícies. Após 3 horas, as bactérias foram coletadas e cultivadas em placas de ágar por 24 horas para contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). Observou-se um aumento significativo na molhabilidade, tornando a superfície hidrofílica até 24 horas após o tratamento, entretanto apresentou redução significativa ($p < 0,05$) em relação ao controle até 3 horas de uso. Em relação à ação antibacteriana, o uso do plasma não resultou em uma redução significativa ($p > 0,05$) no número de UFC para *P. aeruginosa* ($4,2 \times 10^6$ vs. $5,7 \times 10^6$, tratado e controle, respectivamente) e *S. aureus* ($18,7 \times 10^6$ vs. $27,0 \times 10^6$, tratado e controle, respectivamente). O CAP pode ser utilizado para hidrofilização de superfícies nos parâmetros determinados neste estudo, entretanto não influencia na diminuição do número de UFC. A alteração dos parâmetros utilizados no plasma e a aplicação diretamente sobre as bactérias pode apresentar resultados mais promissores em relação à ação antibactericida.

Palavras-chave: antibactericida; ângulo de contato; dispositivo microfluídico; molhabilidade.

1. Introdução

Os dispositivos microfluídicos possuem importantes aplicações no ramo da medicina e biologia, sendo vinculado a tecnologias como “laboratório em um chip” (lab-on-a-chip) e órgão em um chip (organ-on-a-chip) (TONY et al., 2023). Devido à alta demanda por procedimentos de análises mais rápidos, houve expansão considerável nesse ramo da biotecnologia, tanto na pesquisa como na aplicação industrial (SHAKERI; KHAN; DIDAR, 2021).

Inicialmente, os primeiros dispositivos microfluídicos eram fabricados em silício e vidro, porém, para aplicações em medicina e biologia, seria necessário elaborar em

1 materiais descartáveis para evitar contaminação de amostra, assim como ter produção
2 mais rápida e menos especializada (BECKER; GARTNER, 2008; TURIM et al., 2018).
3 Atualmente, o polidimetilsiloxano (PDMS) tem destaque entre os materiais utilizados
4 para fabricação de dispositivos microfluídicos, principalmente devido a sua manipulação
5 simples e rápida, sendo o elastômero mais utilizado para essa finalidade (JOHNSTON et
6 al., 2014).

7 No entanto, o polidimetilsiloxano (PDMS) apresenta a desvantagem intrínseca de
8 ser naturalmente hidrofóbico, o que propicia o acúmulo de microrganismos, a
9 desnaturação de células (GRIGERA; MCCARTHY, 2010) e a formação de bolhas,
10 tornando-se potencialmente problemático em contextos biológicos. Ao trabalhar com
11 soluções aquosas em dispositivos microfluídicos de PDMS, o preenchimento dos canais
12 pode ser desafiador devido à hidrofobicidade do material, aumentando o risco de
13 formação de bolhas de ar e impedindo a conexão eficiente entre os extremos do
14 dispositivo (SHAKERI; KHAN; DIDAR, 2021). Portanto, é necessário realizar um
15 tratamento prévio para mitigar essas questões.

16 Dentre as diversas opções testadas para modificação de superfície, o uso do
17 plasma é bastante comum. O plasma atmosférico frio (CAP) corresponde a uma
18 tecnologia que utiliza descargas elétricas para criar um ambiente ionizado, que opera a
19 baixas temperaturas, e pode ser aplicado em tecidos vivos ou cultura de células (TORNIN
20 et al., 2021). Além de sua aplicação direta em tratamentos de superfícies (HONG et al.,
21 2006; BREDEN; RAJA, 2014; ENCINAS et al., 2012), o plasma atmosférico tem sido
22 utilizado para promover a cicatrização de feridas (WELTMANN et al., 2012) e estimular
23 o crescimento de plantas, ao mesmo tempo em que reduz a presença de patógenos
24 (RANDENIYA; DE GROOT, 2015).

25 Um estudo anterior foi conduzido para avaliar o impacto do uso do plasma
26 atmosférico na superfície do PDMS. No entanto, é relevante observar que as proporções
27 entre o polímero base e o agente de cura para a criação da superfície diferiram das
28 recomendações do fabricante, além de ter sido utilizado argônio e oxigênio como gases
29 de trabalho (KIM; JEONG, 2011). Vale salientar que as diversas configurações
30 disponíveis para jatos de plasma e fontes de alimentação podem exercer uma influência
31 significativa nos resultados obtidos em pesquisas (DARNY et al., 2017).

32 Diante disso, este estudo visa avaliar a influência que a aplicação do plasma
33 atmosférico frio (CAP) com uso do gás hélio tem sobre a superfície de polidimetilsiloxano
34 e sobre a redução na carga bacteriana em dispositivos submetidos a esse tratamento.

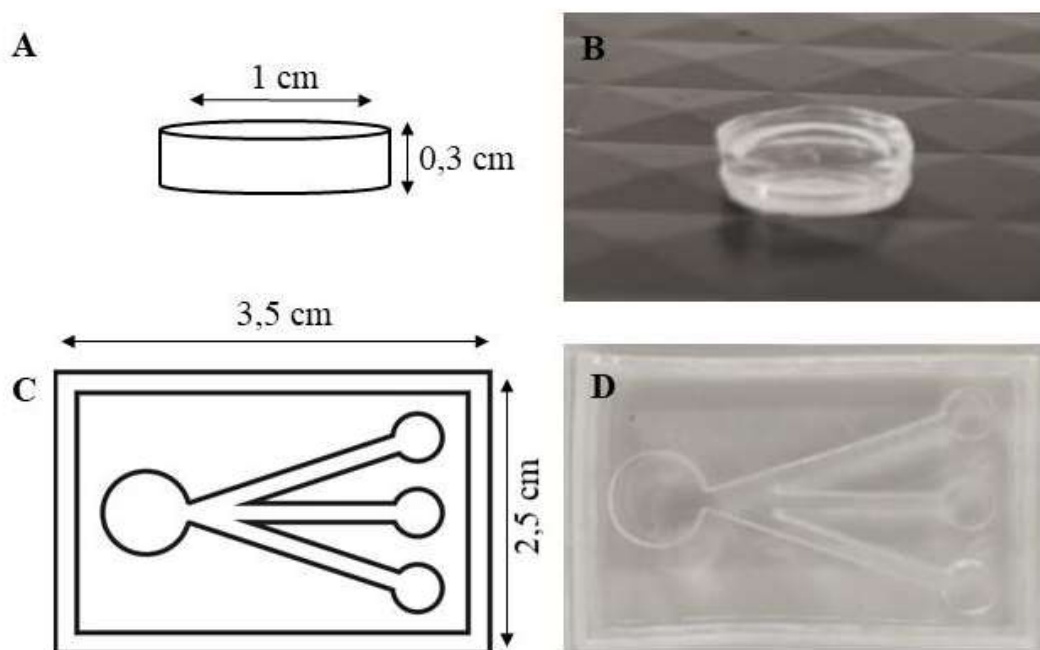
2. Materiais e método

2.1 Preparação da amostra

As amostras foram fabricadas a partir da mistura composta por uma base de polidimetilsiloxano (PDMS) e um agente de cura (Sylgard 184, Dow Corning) na proporção 10:1, conforme recomendado pelo fabricante. Dois moldes distintos foram desenvolvidos, um para a avaliação da molhabilidade e outro para avaliação microbiológica. O pré-polímero líquido foi cuidadosamente depositado sobre cada molde mestre, posteriormente foi submetido a vibrações mecânicas para remoção de bolhas de ar, curado a 50°C durante 2 horas e depois mantido em temperatura ambiente (25°C) por 24 horas para posterior utilização.

Para avaliação da molhabilidade foram fabricados discos de 1 cm x 1 cm e 0,3 cm de altura (Figura 1A e B), uma vez que uma superfície plana era necessária para o procedimento. Para avaliação microbiológica, os dispositivos microfluídicos apresentavam 3,5 cm x 2,5 cm e 0,5 cm de altura, sendo elaborados com 3 reservatórios de saída interligados ao reservatório de entrada por 3 canais independentes (Figura 1C e D). Essa configuração permitiu a adição de meio de cultura no interior dos dispositivos.

1 Figura 1. Desenho de moldes e peças finalizadas de disco (1A-B) e dispositivo
2 microfluídico (1C-D) fabricados em polidimetilsiloxano (PDMS) para molhabilidade e
3 avaliação microbiológica antes e após o tratamento com plasma atmosférico.



2.2 Tratamento de plasma

Após serem desmoldados, os discos e dispositivos foram destinados ao tratamento CAP durante 15 minutos com uma distância de 15 mm entre a amostra e a cabeça do bocal da fonte de plasma, tensão de 13 Kv, frequência de 600hz e utilizando hélio como gás de trabalho com fluxo de 1,5 L/minuto, no Laboratório de Plasma da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA).

Inicialmente, procedeu-se à comparação entre duas formas de aplicação do plasma atmosférico na superfície de PDMS. Essas incluíram a exposição da superfície de PDMS armazenada em um invólucro cirúrgico produzido em filme laminado de polipropileno e poliéster, comumente utilizado para embalar materiais destinados à esterilização, e a aplicação direta sobre a superfície de PDMS, sem qualquer embalagem adicional. Essa comparação foi conduzida com o intuito de avaliar se a hidrofiliabilidade poderia ser alcançada e mantida por um período prolongado ao ser devidamente embalada, evitando assim o contato com o ar ambiente. Entretanto, observou-se que somente a aplicação

1 direta do plasma sobre a superfície possibilita a alteração de suas propriedades,
2 destacando a escolha desse modo de aplicação para o restante da pesquisa.

3 Nos discos, o plasma foi aplicado em 5 pontos estratégicos, com cada ponto
4 recebendo 3 minutos de tratamento, garantindo, dessa forma, uma varredura completa em
5 toda a superfície do PDMS. Já nos dispositivos microfluídicos, o plasma foi
6 uniformemente aplicado em toda a extensão dos reservatórios de entrada e saída, bem
7 como nos canais que os interligam, durante o mesmo período de tempo.

8 A fim de investigar a ação que o plasma tem sobre a superfície e em até quanto
9 tempo a hidrofobicidade do material poderia ser mantida para posterior uso do dispositivo
10 microfluídico, os ângulos de contato foram mensurados até 24 horas após o tratamento
11 do plasma. Para avaliar a molhabilidade, foi mensurado o ângulo de contato de uma gota
12 de 20 µl de água deionizada na superfície das amostras, em ambiente de 25°C. As
13 avaliações foram conduzidas imediatamente após a aplicação do plasma (0 horas – T0) e
14 subsequentemente após 3 (T3), 6 (T6), 9 (T9) e 24 (T24) horas de tratamento. Cada
15 tratamento envolveu 5 amostras, totalizando 25 amostras tratadas, além de 5 amostras
16 usadas como controle. Os discos foram meticulosamente posicionados sobre uma base
17 diante de um gravador de vídeo, o qual gerou vídeos de 3 minutos para cada amostra.
18 Posteriormente, as imagens foram capturadas e enviadas ao software ImageJ para a
19 análise dos ângulos de contato. Os ângulos foram tabulados e avaliados como média e
20 desvio padrão.

21 Para a avaliação microbiológica, foram utilizadas bactérias tanto gram-positivas
22 (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) quanto gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*
23 ATCC 27853). Um total de 10 dispositivos microfluídicos foram empregados para
24 investigar o efeito do plasma atmosférico sobre o *S. aureus*, enquanto outros 10
25 dispositivos foram dedicados à avaliação da *P. aeruginosa*, sendo que cinco dispositivos
26 microfluídicos de cada grupo foram designados como controle (sem tratamento de
27 plasma), enquanto os outros cinco de cada grupo foram submetidos ao tratamento com
28 plasma atmosférico por 15 minutos. Imediatamente após a aplicação do plasma, os
29 dispositivos foram encaminhados ao Laboratório de Microbiologia para análise.

30 Uma colônia de *S. aureus* e de *P. aeruginosa* foram isoladas e diluídas em 5 ml
31 de água estéril. A densidade celular viável foi de aproximadamente 10⁸ UFC/ml. Foram
32 alocados 300 µl de solução contendo *S. aureus* (n=10) e *P. aeruginosa* (n=10) em cada
33 dispositivo microfluídico e armazenados em incubadora orbital a 35°C durante 3 horas.
34 Após esse período, o líquido de cada dispositivo foi coletado e diluído em placa de

micropoços nas concentrações de 10^{-1} até 10^{-6} . Para cada diluição foi depositada uma gota de solução em placas de Petri em ágar (drop plating) e levadas novamente para incubadora por mais 24 horas. Após esse período as colônias formadas foram contabilizadas e comparadas entre os controles e os tratamentos.

Os dados foram expressos em valores de média $\pm$ desvio padrão. Primeiramente, os dados foram examinados quanto à normalidade usando o teste de Shapiro-Wilk e para a homocedasticidade usando teste de Levene. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais para cada variável estudada foram verificadas, quando paramétricos, através da Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. Resultados

Os ângulos de contato na superfície de PDMS sem tratamento e nas superfícies tratadas com plasma atmosférico frio podem ser visualizados na Tabela 1. Logo após a aplicação do plasma atmosférico, a primeira avaliação foi realizada de forma imediata (0 horas). Nesse grupo, houve dificuldades em mensurar o ângulo de contato da gota de água das amostras, pois quase todo o líquido se espalhou pela superfície, resultando em uma superfície altamente hidrofílica, com média de $18,71^\circ (\pm 3,24)$, valor significativamente inferior ao observado nas amostras controle ($86,31 \pm 8,16$, $P < 0,05$).

Ao longo do tempo após o tratamento, houve aumento gradual dos ângulos de contato (Figura 2), tornando as superfícies progressivamente menos hidrofílicas. No entanto, após 24 horas, o ângulo de contato ainda permaneceu inferior ($65,08 \pm 8,61$) ao valor medido antes do tratamento ($p < 0,05$). Além disso, observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) no ângulo de contato nas avaliações após 6 horas ($58,55 \pm 4,53$) em comparação com as amostras avaliadas imediatamente e após 3 horas ($27,31 \pm 5,61$).

Em relação à avaliação microbiológica foi possível verificar que não houve redução significativa ($p > 0,05$) no quantitativo de bactérias entre as amostras controles e tratadas tanto para *P. aeruginosa* como para *S. aureus* (Tabela 2). Na figura 3 é possível verificar a formação de colônias de *S. aureus* nas placas de Petri em diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-6} .

1 Tabela 1. Ângulo de contato com a água (°) da superfície de PDMS de amostras controles
 2 e tratadas com plasma atmosférico frio após 0, 3, 6, 9 e 24 horas.

Tratamentos	Ângulo de contato com a água (°)
Controle	86,31 ± 8,16 ^a
T0	18,71 ± 3,24 ^b
T3	27,31 ± 5,61 ^b
T6	58,55 ± 4,53 ^c
T9	59,54 ± 5,11 ^c
T24	65,08 ± 8,61 ^c

3 Letras sobrescritas diferentes (a,b,c) na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Controle:
 4 superfície que não recebeu tratamento. T0: superfície avaliada imediatamente após o tratamento. T3:
 5 superfície avaliada após 3 horas de tratamento. T6: superfície avaliada após 6 horas de tratamento. T9:
 6 superfície avaliada após 9 horas de tratamento T24: superfície avaliada após 24 horas de tratamento.

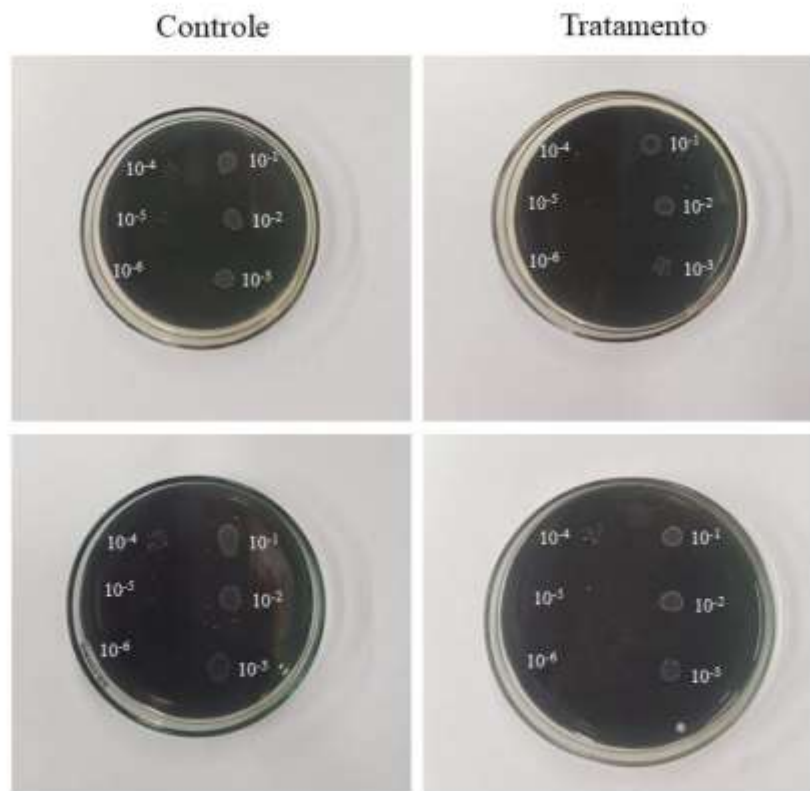
8 Figura 2. Imagens para mensuração de ângulo de contato e avaliação da molhabilidade
 9 de superfícies de PDMS antes (controle) e após 0, 3, 6, 9 e 24 horas do tratamento com
 10 plasma atmosférico frio.



Tabela 2. Unidades formadoras de colônia (UFC) após avaliação microbiológica para *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* em dispositivos microfluídicos sem aplicação de plasma atmosférico (controle) e com aplicação de plasma atmosférico (tratamento).

Amostras	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
	N (UFC/cm2)	N (UFC/cm2)
Controle	$5,7 \times 10^6$	$27,0 \times 10^6$
Tratamento	$4,2 \times 10^6$	$18,7 \times 10^6$

1 Figura 3. Avaliação microbiológica para *Staphylococcus aureus* de soluções depositadas
 2 em dispositivos microfluídicos sem tratamento (controle) e tratados com plasma
 3 atmosférico frio e, posteriormente, cultivadas em placas de Petri.



4
 5

6 4.Discussão

7 Para se alcançar os resultados esperados com o uso de dispositivos microfluídicos
 8 é essencial que se tenha, inicialmente, o máximo de controle e informações acerca das
 9 propriedades da superfície a ser utilizada (HONG et al., 2006). Dessa forma, tornou-se
 10 imperativo compreender as alterações resultantes do emprego do plasma atmosférico,
 11 bem como estabelecer parâmetros a serem seguidos posteriormente, para dar
 12 continuidade aos estudos relacionados com o dispositivo desenvolvido neste estudo.

13 Uma das finalidades mais esperadas com a aplicação do plasma atmosférico é sua
 14 propriedade de modificar a superfície para hidrofílica e reduzir a adesão bacteriana
 15 (PINTO et al., 2010). Porém, até o momento, não foram identificados estudos que
 16 abordassem o emprego de gás hélio, nas proporções recomendadas para a produção do
 17 dispositivo microfluídico, considerando os parâmetros estabelecidos neste estudo, e com
 18 duração de avaliação equivalente.

19 Verificou-se que o uso do plasma atmosférico com hélio, nas configurações
 20 selecionadas, possibilitou a modificação da superfície do polidimetilsiloxano para torná-

lo hidrofílico até 24 horas após a aplicação. Entretanto, observa-se que a superfície se apresentou altamente hidrofílica até 3 horas após o uso do plasma, mesmo em contato com o ar ambiente, alcançando melhor dispersão de amostras líquidas pela superfície. Ao comparar com as amostras embaladas e que foram tratadas da mesma forma, percebeu-se que o plasma não promoveu a modificação da superfície para torná-la hidrofílica e, devido a isso, não foram utilizados neste estudo.

O PDMS é adotado em diversos estudos devido suas propriedades de estabilidade térmica, inércia, propriedades não tóxicas e biocompatibilidade favorável. A biocompatibilidade pode ser considerada como uma combinação de características de superfície, como energia superficial, hidrofilicidade, grupos químicos de superfície e não toxicidade. Entretanto, o PDMS possui a limitação de ser hidrofóbica. Dessa forma, a aplicação de plasma, além de tornar a superfície hidrofílica, consequente pode levar ao aumento na biocompatibilidade com outras células (PONSONNET et al., 2003; MERCURI, 2013; AMERIAN et al., 2019).

Apesar de ser conhecido que a exposição das superfícies ao ar durante a medição do ângulo de contato pode contribuir para uma recuperação hidrofóbica mais rápida (ZHAO, LEE, SEN, 2012), é importante considerar que outros fatores também podem influenciar na avaliação. Além do tipo de material utilizado, outra variável que pode ser citada é a distância entre a superfície e a ponta do emissor do plasma atmosférico, sendo que o efeito máximo pode ser alcançado quando a distância é de 5 a 15mm (VAN DEYNSE et al., 2015), o que está de acordo com o realizado e observado no presente estudo.

Em outros estudos a recuperação hidrofóbica após tratamentos com plasma de pressão atmosférica foi mais rápida, havendo relatos de recuperação completa dos valores iniciais de ângulos após 30 minutos (ZHAO, LEE, SEN, 2012) e 1 hora de tratamento (ENCINAS et al., 2012). No primeiro estudo, independentemente de a superfície ter sido tratada por 5 ou 15 minutos com média ou alta intensidade, observou-se uma rápida recuperação da hidrofobicidade. Assim como no segundo estudo citado acima, isso pode ser atribuído ao fato de que o gás utilizado foi apenas o oxigênio, que não oxida uniformemente a superfície do PDMS (FRITZ; OWEN, 1995).

Em estudo realizado anteriormente por Kim; Jeong (2011), foi utilizado plasma de argônio e oxigênio para tratar superfícies de PDMS fabricadas nas proporções de 5:1 e 20:1 para base e agente de cura, sendo o ângulo inicial de 107,8° e 99,2°, respectivamente. Após 2 e 120 horas do tratamento com plasma foi possível verificar

1 diminuição do ângulo, para 14,6° e 74,3°, respectivamente, para a proporção de 5:1; e de
2 10,5° e 63,6° para a proporção de 20:1, respectivamente. Ao comparar essa modificação
3 no ângulo de contato com o presente estudo, nota-se que o ângulo de contato inicial foi
4 menor quando a proporção de PDMS foi de 10:1 e que o ângulo avaliado imediatamente
5 após aplicação do plasma foi superior ao ângulo avaliado após 2 horas do tratamento no
6 estudo citado acima. Isso possivelmente ocorreu devido às proporções de base e agente
7 de cura do PDMS, a taxa de fluxo de plasma atmosférico e a proporção de mistura gasosa
8 de argônio para oxigênio utilizada no estudo acima.

9 Em relação às proporções de base e agente de cura, quanto maior a concentração
10 de agente de cura em relação a base, maior é a quantidade de grupos com hidreto de silício
11 e grupo vinil na superfície do PDMS, que causam o efeito hidrofóbico.
12 Consequentemente, quanto maior a quantidade de polímero base, maior pode ser a ação
13 do plasma em modificar a superfície do PDMS com a adição de grupos hidroxil e maior
14 será a estabilidade hidrofílica a longo prazo (KIM; JEONG, 2011).

15 Uma superfície é considerada hidrofílica quando o ângulo de contato com a água
16 é <90° e hidrofóbica quando o ângulo de contato com a água se apresenta >90°. Além
17 disso, existe a definição de superhidrofobicidade, quando o ângulo de contato da água
18 com a superfície supera os 145° (LAW, 2014) e de superhidrofilicidade, quando o ângulo
19 de contato é visualmente próximo de 0° (DRELICH et al., 2011).

20 Em estudo realizado por Seo et al. (2014) foi possível verificar que o uso de
21 argônio na aplicação do plasma atmosférico em superfície de PDMS foi mais efetivo que
22 o uso de hélio, provavelmente devido a maior densidade de radicais de hidroxila presentes
23 no argônio. Os autores observaram que o ângulo de contato após 24 horas de tratamento
24 com plasma já excedia os 90°, demonstrando uma maior hidrofobicidade em comparação
25 com os resultados obtidos neste estudo. No entanto, é importante ressaltar que o tempo
26 de exposição ao plasma foi significativamente menor do que o utilizado neste estudo, o
27 que demonstra que tanto o tipo de gás quanto a duração do tratamento podem influenciar
28 na hidrofilicidade do material.

29 A taxa de fluxo configurada no equipamento de plasma também pode apresentar
30 considerável modificação na superfície de PDMS, sendo que quanto maior a pressão,
31 maior será a ação do plasma sobre a superfície, tornando o ângulo de contato super
32 hidrofílico. Além disso, o efeito da superfície hidrofílica pode ser proporcional ao
33 aumento do oxigênio na descarga do plasma, sendo eficiente na ativação da superfície

1 hidrofílica devido maior presença de oxigênio na composição do PDMS após o
2 tratamento com plasma (SHARMA et al., 2007; RUBEN et al., 2017).

3 A superfície de PDMS apresenta alteração em sua composição devido à
4 diminuição da intensidade do pico de carbono enquanto há aumento no pico de oxigênio
5 (HONG et al., 2006; KIM; JEONG, 2011). A aplicação de plasma atmosférico causa
6 alteração da superfície do PDMS devido à substituição de grupos metil (SI-CH₃) por
7 grupos silanol hidrofílicos (SI-OH) (KREIDER et al., 2013). Com o passar do tempo, a
8 hidrofobicidade vai sendo recuperada devido à perda de oxigênio volátil, reorientação dos
9 grupos silanóis presentes na superfície do polímero, craqueamento da estrutura SIO_x, o
10 qual fornece o movimento de cadeias para a superfície do PDMS e mudanças na
11 rugosidade da superfície (SHARMA et al., 2007).

12 Além do seu potencial na modificação da hidrofobicidade, o tratamento de
13 superfícies com plasma pode proporcionar desinfecção rápida e eficaz. Entretanto, o
14 efeito antibacteriano depende de fatores como a espécie de microrganismo e o tempo de
15 irradiação (KOVÁČOVÁ et al., 2020). O *S.aureus* e *P.aeruginosa*, normalmente, são
16 utilizados como modelos bacterianos para testar a adesão bacteriana e os efeitos do
17 crescimento do biofilme, pois são bactérias de grande importância e que podem se aderir
18 fortemente em superfícies (LU et al., 2016). A taxa de adesão bacteriana pode ser reduzida
19 significativamente após uso de CAP em superfícies, apresentando melhor eficiência
20 principalmente em bactérias gram-negativas do que bactérias gram-positivas (LEE et al.,
21 2019).

22 Entretanto, diferente dos demais estudos, neste buscou-se avaliar se a aplicação
23 do CAP na superfície poderia atuar de forma preventiva na redução da adesão bacteriana.
24 Neste caso não foi vista redução significativa na contagem de colônias de bactérias de *S.*
25 *aureus* e *E. coli* quando o plasma foi aplicado antes do contato com as bactérias
26 cultivadas. Possivelmente, a potência gerada pelo plasma atmosférico para alteração da
27 superfície não foi suficiente para permitir que houvesse ação bactericida durante as 3
28 horas de incubação das bactérias no dispositivo microfluídico. Apesar disso, sabe-se que
29 o plasma apresentaria sua ação bactericida se o tratamento ocorresse diretamente sobre a
30 superfície do dispositivo microfluídico contendo as bactérias.

31 A esterilização de células bacterianas a partir do uso de plasma atmosférico pode
32 ser vista por Korachi; Gurol; Aslan (2010) para *E.coli* e *S. aureus* após 2 minutos e 6
33 minutos, respectivamente, e por Sohbatzadeh et al. (2010) para *P. aeruginosa* após 10
34 minutos de tratamento com plasma. Entretanto, em ambos os casos, o plasma foi aplicado

1 diretamente sobre o meio líquido contendo as bactérias. Já no atual estudo buscou-se um
2 efeito preventivo, em que o objetivo era ter um material estéril que pudesse reduzir a
3 carga bacteriana em meios líquidos para cultivo de células. Entretanto, isso não foi
4 possível quando o plasma foi aplicado antes da deposição de bactérias no dispositivo.

5 O uso do plasma permite revestir uma superfície com polímero contendo agente
6 antibacteriano a partir de grupos funcionais carregados negativamente que induzem a
7 hidrofobicidade e impedem a adesão de bactérias à parede celular. Nesse caso, o
8 revestimento depositado por plasma exibe atividade antibacteriana direta através do
9 mecanismo anti-incrustante, no qual a adesão bacteriana e formação de biofilme são
10 evitadas pela criação de produtos químicos de superfície que inibem a fixação
11 (AKDOĞAN; ŞİRİN, 2021).

12 De acordo com Akdoğan; Şirin (2021) o *S.aureus* reduz sua viabilidade quando a
13 superfície está carregada positivamente e quando o ângulo de contato da superfície é
14 inferior a 90°. Porém, apesar do ângulo de contato no momento da avaliação apresentar
15 valor inferior, não foi possível observar redução significativa no número de UFC,
16 demonstrando que essa característica isolada não pode ser utilizada como parâmetro para
17 esterilização de materiais.

18 A esterilização por plasma pode ocorrer por meio de três mecanismos básicos.
19 Primeiramente, pela destruição direta do material genético dos microrganismos. Em
20 segundo lugar, através da erosão dos microrganismos via foto dessorção intrínseca. Por
21 último, devido à erosão atômica dos microrganismos através da corrosão para formar
22 compostos voláteis, como resultado da combustão lenta (KORACHI; GUROL; ASLAN,
23 2010).

24 Em estudo realizado por Kováčová et al. (2020), houve melhoria no efeito
25 antibacteriano de 2 logs após 8 minutos de tratamento de plasma em superfície para *S.*
26 *aureus* e *E. coli*. Entretanto, o tratamento de plasma foi realizado através da descarga de
27 barreira dielétrica (DBD), o qual possui uma grande densidade de potência, da ordem de
28 $100\text{W}/\text{cm}^3$, o que permite o tratamento de superfícies em alta velocidade. Dessa forma,
29 demonstraram que a exposição ao plasma danifica irreversivelmente as células
30 bacterianas, permitindo a esterilização *in situ* do biomaterial durante o processo de
31 modificação da superfície.

5. Conclusão

A aplicação de plasma atmosférico frio possibilitou a modificação da superfície do PDMS, resultando na redução do ângulo de contato até 24 horas após o tratamento com plasma, sendo considerado altamente hidrofílico até 3 horas após a aplicação. No entanto, não foi observada uma redução significativa no número de UFC de *P. aeruginosa* e *S. aureus* quando o plasma foi aplicado preventivamente sobre a superfície do dispositivo microfluídico. É possível que o aumento da intensidade do plasma atmosférico possa resultar em uma ação inibitória na adesão bacteriana mais eficaz. No entanto, são necessários mais estudos para determinar os parâmetros ideais que proporcionem os melhores resultados.

REFERÊNCIAS

- AKDOĞAN, E.; ŞIRIN, H. T. Plasma surface modification strategies for the preparation of antibacterial biomaterials: A review of the recent literature. **Materials Science and Engineering: C**, v. 131, p. 112474, 2021.
- AMERIAN, M.; AMERIAN, M.; SAMETI, M.; SEYEDJAFARI, E. Improvement of PDMS surface biocompatibility is limited by the duration of oxygen plasma treatment. **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, v. 107, n. 12, p. 2806-2813, 2019.
- BECKER, H.; GÄRTNER, C. Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 390, p. 89-111, 2008.
- BREDEN, D.; RAJA, L.L. Computational study of the interaction of cold atmospheric helium plasma jets with surfaces. **Plasma Sources Science and Technology**, n.23, 2014.
- DARNY, T. et al. Plasma action on helium flow in cold atmospheric pressure plasma jet experiments. **Plasma Sources Science and Technology**, v. 26, n. 10, p. 105001, 2017.
- DRELICH, J. et al. Hydrophilic and superhydrophilic surfaces and materials. **Soft Matter**, v. 7, n. 21, p. 9804-9828, 2011.
- ENCINAS, N. et al. Atmospheric pressure plasma hydrophilic modification of a silicone surface. **The Journal of Adhesion**, v. 88, n. 4-6, p. 321-336, 2012.
- FRITZ, J. L.; OWEN, M. J. Hydrophobic recovery of plasma-treated polydimethylsiloxane. **The Journal of adhesion**, v. 54, n. 1-4, p. 33-45, 1995.
- GRIGERA, J. R.; MCCARTHY, A. N. The behavior of the hydrophobic effect under pressure and protein denaturation. **Biophysical journal**, v. 98, n. 8, p. 1626-1631, 2010.

- 1 HONG, S. M. et al. Hydrophilic surface modification of PDMS using atmospheric RF
2 plasma. In: **Journal of physics: conference series**. IOP Publishing, 2006. p. 656.
- 3
- 4 JOHNSTON, I. D. et al. Mechanical characterization of bulk Sylgard 184 for
5 microfluidics and microengineering. **Journal of Micromechanics and**
6 **Microengineering**, v. 24, n. 3, p. 035017, 2014.
- 7
- 8 KIM, H. T.; JEONG, O. C. PDMS surface modification using atmospheric pressure
9 plasma. **Microelectronic engineering**, v. 88, n. 8, p. 2281-2285, 2011.
- 10
- 11 KORACHI, M.; GUROL, C.; ASLAN, N. Atmospheric plasma discharge sterilization
12 effects on whole cell fatty acid profiles of Escherichia coli and Staphylococcus aureus.
13 **Journal of Electrostatics**, v. 68, n. 6, p. 508-512, 2010.
- 14
- 15 KOVÁČOVÁ, M. et al. Increasing the effectivity of the antimicrobial surface of carbon
16 quantum dots-based nanocomposite by atmospheric pressure plasma. **Clinical Plasma**
17 **Medicine**, v. 19, p. 100111, 2020.
- 18
- 19 KREIDER, A. et al. Functionalization of PDMS modified and plasma activated two-
20 component polyurethane coatings by surface attachment of enzymes. **Applied Surface**
21 **Science**, v.273, p.562-569, 2013.
- 22
- 23 LAW, K.Y. Definitions for hydrophilicity, hydrophobicity, and superhydrophobicity:
24 getting the basics right. **The Journal of Physical Chemistry Letters**, v. 5, n. 4, p. 686-
25 688, 2014.
- 26
- 27 LEE, D.; YANG, S. Surface modification of PDMS by atmospheric-pressure plasma-
28 enhanced chemical vapor deposition and analysis of long-lasting surface hydrophilicity.
29 **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 162, n. 1, p. 425-434, 2012.
- 30
- 31 LU, N. et al. Fabrication of PDMS surfaces with micro patterns and the effect of pattern
32 sizes on bacteria adhesion. **Food control**, v. 68, p. 344-351, 2016.
- 33
- 34 MERCURI, L. G. Silicone elastomer implants in surgery of the temporomandibular
35 joint. **The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 51, n. 7, p. 584–586,
36 2013.
- 37
- 38 PINTO, S. et al. Poly (dimethyl siloxane) surface modification by low pressure plasma
39 to improve its characteristics towards biomedical applications. **Colloids and Surfaces**
40 **B: Biointerfaces**, v. 81, n. 1, p. 20-26, 2010.
- 41
- 42 PONSONNET, L., REYBIER, K., JAFFREZIC, N., COMTE, V., LAGNEAU, C.,
43 LISSAC, M., & MARTELET, C. Relationship between surface properties (roughness,
44 wettability) of titanium and titanium alloys and cell behaviour. **Materials Science and**
45 **Engineering: C**, v. 23, n. 4, p. 551–560, 2003.
- 46
- 47 RANDENIYA, L. K.; DE GROOT, G.J.J.B. Non-thermal plasma treatment of
48 agricultural seeds for stimulation of germination, removal of surface contamination and
49 other benefits: a review. **Plasma Processes and Polymers**, v. 12, n. 7, p. 608-623,
50 2015.

- 1 RUBEN, B. et al. Oxygen plasma treatments of polydimethylsiloxane surfaces: effect of
2 the atomic oxygen on capillary flow in the microchannels. **Micro & Nano Letters**, v.
3 12, n. 10, p. 754-757, 2017.
- 4
- 5 SASMAZEL, H. T.; et al. Atmospheric Pressure Plasma Surface Treatment of Polymers
6 and Influence on Cell Cultivation. **Molecules**, v. 26, n. 6, 2021.
- 7
- 8
- 9 SEO, K.S. et al. Surface treatment of glass and poly (dimethylsiloxane) using
10 atmospheric-pressure plasma jet and analysis of discharge characteristics. **Japanese**
11 **Journal of Applied Physics**, v. 54, n. 1S, p. 01-06, 2014.
- 12
- 13 SHAKERI, A.; KHAN, S.; DIDAR, T. F. Conventional and emerging strategies for the
14 fabrication and functionalization of PDMS-based microfluidic devices. **Lab on a Chip**,
15 v. 21, n. 16, p. 3053-3075, 2021.
- 16
- 17 SHARMA, V. et al. Surface characterization of plasma-treated and PEG-grafted PDMS
18 for micro fluidic applications. **Vacuum**, v. 81, n. 9, p. 1094-1100, 2007.
- 19
- 20 SOHBATZADEH, F. et al. E. coli, P. aeruginosa, and B. cereus bacteria sterilization
21 using afterglow of non-thermal plasma at atmospheric pressure. **Applied biochemistry**
22 **and biotechnology**, v. 160, p. 1978-1984, 2010.
- 23
- 24 TONY, A. et al. A Preliminary Experimental Study of Polydimethylsiloxane (PDMS)-
25 To-PDMS Bonding Using Oxygen Plasma Treatment Incorporating Isopropyl Alcohol.
26 **Polymers**, v. 15, n. 4, p. 1006, 2023.
- 27
- 28 TORNIN, J. et al. Evaluation of the effects of cold atmospheric plasma and plasma-
29 treated liquids in cancer cell cultures. **Nature Protocols**, v. 16, n. 6, p. 2826-2850,
30 2021.
- 31
- 32 VAN DEYNSE, A. et al. Surface modification of polyethylene in an argon atmospheric
33 pressure plasma jet. **Surface and Coatings Technology**, v. 276, p. 384-390, 2015.
- 34
- 35 WELTMANN, K.-D. et al. Plasma processes and plasma sources in medicine.
36 **Contributions to Plasma Physics**, v. 52, n. 7, p. 644-654, 2012.
- 37
- 38 WELTMANN, K.D.; WOEDTKE, T.V. Plasma medicine—current state of research and
39 medical application. **Plasma Physics and Controlled Fusion**, v. 59, 2017.
- 40
- 41 ZHAO, L. H.; LEE, J.; SEN, P. N. Long-term retention of hydrophilic behavior of
42 plasma treated polydimethylsiloxane (PDMS) surfaces stored under water and Luria-
43 Bertani broth. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 181, p. 33-42, 2012.
- 44
- 45
- 46
- 47
- 48
- 49
- 50

1
2 **8. CAPÍTULO II: Seleção de espermatozoides de carneiros em dispositivo**
3 **microfluídico: influência da quimiotaxia e plasma atmosférico**

4
5
6
7
8
9 Submetido para a revista: **Biology of Reproduction**

10 Qualis: A1

11 Fator de Impacto: 2.960
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48

Seleção de espermatozoides de carneiros em dispositivo microfluídico: influência da quimiotaxia e plasma atmosférico

Selection of spermatozoa from sheep in a microfluidic device: influence of chemotaxis and atmospheric plasma

Beatriz Dantas Fernandes^a, Ruan da Cruz Paulino^a, Emanuel Lucas Bezerra Rocha^a, Isau Dantas Moraes^b, Carlos Eduardo Bezerra de Moura^c, Caio Sérgio Santos^d, Andreia Maria da Silva^e, Gabriel Santos Costa Bezerra^e, Alexandre Rodrigues da Silva^e, Clodomiro Alves Junior^f, Marcelo Barbosa Bezerra^{a*}

^aLaboratory of Reproductive Technologies and Innovations in Animal Models, Federal Rural University of the Semi-Arid, UFERSA, Mossoró, RN, Brazil

(beatriz_dfernandes@hotmail.com; ruan_paullino@hotmail.com; emanuellucasvet@gmail.com)

^bGraduate Program in Animal Science, Federal Rural University of Semiarid Region (UFERSA), Mossoró, RN, 59625-900 Brazil (isaudantas1@gmail.com)

^c Department of Animal Sciences, Federal Rural University of Semiarid Region (UFERSA), Mossoró, RN, 59625-900 Brazil (carlos.moura@ufersa.edu.br)

^d Laboratory of Veterinary Microbiology, Center of Agrarian Sciences, Federal Rural, UFERSA, 59625-900 Mossoró, Brazil (caiosergio@ufersa.edu.br)

^e Laboratory of Animal Germplasm Conservation, Federal Rural University of Semi-Arid, Mossoró, RN, Brazil (andreia.m.silva@hotmail.com; alexrs@ufersa.edu.br)

^f Department of Exact and Natural Sciences, Federal Rural University of Semiarid Region (UFERSA), Mossoró, RN, 59625-900 Brazil (clodomiro.jr@ufersa.edu.br)

* Corresponding author: Marcelo Barbosa Bezerra (mbezerra@ufersa.edu.br) Address for corresponding author: Laboratory of Reproductive Technologies and Innovations in Animal Models, Department of Animal Science, Universidade Federal Rural do Semi-Árido, Mossoró, RN, Brazil, 59625-900

Resumo

A microfluídica é uma tecnologia com aplicações potenciais em diversas áreas, incluindo a reprodução. O desenvolvimento e a utilização de dispositivos microfluídicos permitem a avaliação do comportamento espermático e auxiliam na seleção de espermatozoides. Embora essa tecnologia já tenha sido testada em várias espécies, ainda não foram conduzidos estudos envolvendo carneiros. O objetivo deste estudo foi realizar a seleção de espermatozoides de carneiros em dispositivos microfluídicos e avaliar a influência da quimiotaxia e da aplicação de plasma atmosférico frio (CAP) nas células. Para isso, um dispositivo microfluídico, composto por um reservatório de entrada e três reservatórios de saída, foi fabricado utilizando polidimetilsiloxano (PDMS). Foram utilizados 10 complexos testículo-epididimários de carneiros maduros. As amostras espermáticas foram divididas em dois grupos: um grupo controle, composto por dispositivos que não sofreram nenhuma modificação, e um grupo de tratamento, no qual os dispositivos foram submetidos à aplicação de plasma atmosférico durante 15 minutos antes da seleção. Logo após, cada reservatório de saída dos dispositivos foi preenchido com um tipo de meio diferente, sendo eles o meio de fertilização *in vitro* (FIV), solução NaCl 0,9% e meio de maturação *in vitro* (MIV). Após preenchidos, a amostra contendo espermatozoides foi depositada no reservatório de entrada e os dispositivos do grupo controle e tratamento foram incubados em atmosfera de 37,5°C e 5% de CO₂ durante 35 minutos. Após esse período, o reservatório de entrada foi isolado e amostras dos três reservatórios de saída e do reservatório de entrada foram coletadas para avaliação. Os parâmetros cinéticos dos espermatozoides foram avaliados utilizando o sistema computadorizado de avaliação espermática (CASA). A morfologia foi realizada com rosa bengala, a integridade de membrana a partir do teste hiposmótico e a viabilidade e atividade mitocondrial por microscopia de fluorescência. Os dados foram expressos em valores de média $\pm$ desvio padrão. As diferenças estatísticas foram verificadas através da Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. O uso de CAP não influenciou nos parâmetros de qualidade de espermatozoides de carneiros após a seleção de espermatozoides epididimários. Em relação à quimiotaxia, o meio FIV apresentou maior motilidade total em relação ao meio MIV e à solução NaCl 0,9% e maior motilidade progressiva em relação ao meio MIV, tanto no grupo controle quanto no tratamento, demonstrando ser um meio de maior interesse para os espermatozoides.

Palavras-chave: CASA, fertilização *in vitro*, isolamento celular, microfluídica.

Introdução

O desenvolvimento e implantação de inovações dentro das biotecnologias reprodutivas assistidas apresenta grande impacto na economia, no aumento da qualidade genética e na produtividade de animais (RODRIGUEZ-MARTINEZ et al., 2012; DITSAYABUT et al., 2018). Para a produção de pequenos ruminantes, diversas ferramentas eficazes relacionadas à reprodução podem ser implementadas em busca de alcançar melhores índices reprodutivos, maior eficiência na utilização de recursos,

1 melhorias no manejo genético dos rebanhos, além de maximizar o valor dos insumos
2 alimentares a maior distribuição alimentar (DELGADILLO; MARTIN, 2015).

3 Em comparação com outras espécies domésticas, como bovinos, a taxa de
4 fertilidade em pequenos ruminantes após o uso de biotécnicas, como a inseminação
5 artificial ou Produção *in vitro* de embriões (PIVE), é considerada baixa, com porcentagem
6 de blastocistos que varia entre 20% a 30%. Entretanto, os resultados alcançados através
7 da PIVE são imprevisíveis e variáveis, com diferenças significativas entre laboratórios e
8 experimentos realizados (PARAMINO; ISQUIERDO, 2014; PARAMINO;
9 ISQUIERDO, 2016).

10 Uma das principais etapas da PIVE consiste na fertilização *in vitro* (FIV), cujo
11 procedimento requer uma seleção adequada de espermatozoides, capacitação espermática
12 e meios de fertilização *in vitro*. Dessa forma, antes de ocorrer a fecundação, a amostra
13 contendo espermatozoides precisa ser cuidadosamente preparada (PARAMINO;
14 ISQUIERDO, 2016). Dentre os métodos usualmente utilizados para seleção de
15 espermatozoides estão o swim-up e o gradiente de densidade, porém estes necessitam de
16 centrifugação, o que pode causar danos ao DNA dos espermatozoides, expondo-os a
17 espécies reativas intensas de oxigênio (KASHANINEJAD; SHIDDIKY; NGUYEN,
18 2018).

19 Em consequência das taxas reprodutivas inferiores encontradas em pequenos
20 ruminantes, a adoção dessas biotecnologias ainda não foram amplamente adotadas nas
21 criações de ovinos (STERBENC et al., 2019). Para alcançar aumento nas taxas de
22 fertilidade, mesmo de animais que tenham sêmen abaixo do padrão recomendado, a
23 seleção de espermatozoides, associada com a seleção de reprodutores, e a implementação
24 de métodos inovadores é fundamental dentro de um programa de reprodução
25 (ZUIDEMA; KERNS; SUTOVSKY, 2021).

26 Dessa forma, o desenvolvimento de novas técnicas para seleção de sêmen pode
27 ser uma alternativa para melhorar as taxas de concepção desses animais (GRASA et al.,
28 2004). Devido a isso, diversos dispositivos microfluídicos foram desenvolvidos e
29 estudados, obtendo resultados promissores na seleção espermática sem uso de
30 centrifugação em bovinos (NAGATA et al., 2018; OGATA et al., 2021; FERNANDES
31 et al., 2022; VEJA-HIDALGO et al., 2022), humanos (ZHANG; YIN; YANG, 2015;
32 KISHI et al., 2015; OZCAN et al., 2021), camundongos (KOYAMA et al., 2006), suínos
33 (SANO et al., 2010; MATSUURA et al., 2013), e equinos (GONZALEZ-CASTRO;
34 CARNEVALE, 2019; ORSOLINI et al., 2022).

Os dispositivos microfluídicos consistem em reservatórios de entrada e saída interligados por um ou mais canais que permitem que os espermatozoides vivos e com motilidade nadem para determinada direção (DITSAYABUT et al., 2018). Esses dispositivos podem funcionar de forma ativa ou passiva. Nos métodos ativos há necessidade de estimuladores externos, como temperatura, gradientes químicos ou fluxo de fluido ativo, enquanto que nos métodos passivos não existem estímulos externos, e dependem apenas do comportamento dos espermatozoides (KHODAMORADI et al., 2021).

A quimiotaxia é uma estratégia pela qual os espermatozoides respondem a substâncias específicas, direcionando-se para o local de fertilização desejado (KHODAMORADI et al., 2021). Em ambiente laboratorial, uma variedade de substâncias pode ser empregada para investigar o mecanismo de ação dos espermatozoides e selecionar aqueles mais ativos na amostra. Associados a essa abordagem, alguns estudos de seleção espermática também exploram o uso de plasma atmosférico na modificação da superfície de dispositivos microfluídicos, frequentemente fabricados a partir de polidimetilsiloxano (PDMS). Essa técnica tem sido amplamente documentada em diversos estudos, tanto para conferir caráter hidrofílico à superfície do material (KIM; JEONG, 2011; JOFRE-RECHE et al., 2016) quanto para facilitar a adesão de moldes de PDMS a superfícies de vidro (ZHU et al., 2016; KASHANINEJAD et al., 2018; SHARMA et al., 2022.).

Até o momento, não foram conduzidos estudos sobre a seleção de espermatozoides de carneiros utilizando dispositivos microfluídicos, tampouco foram realizadas pesquisas comparativas sobre os efeitos do plasma atmosférico na seleção espermática. Diante dessas lacunas de conhecimento, o propósito deste estudo é investigar a eficácia de um dispositivo microfluídico na seleção de espermatozoides de carneiros, empregando a técnica de quimiotaxia, e examinar os potenciais efeitos da aplicação de plasma atmosférico frio (CAP) sobre a seleção espermática.

Material e Métodos

Considerações éticas

Todos os complexos testículos-epidídimos utilizados no estudo foram coletados de abatedouro local e estão sob a legislação brasileira para cuidados e uso de animais em atividades de ensino ou pesquisa científica – DBCA (Capítulo UI; item 6.1.10, subitem B-II, 2016).

Produtos químicos

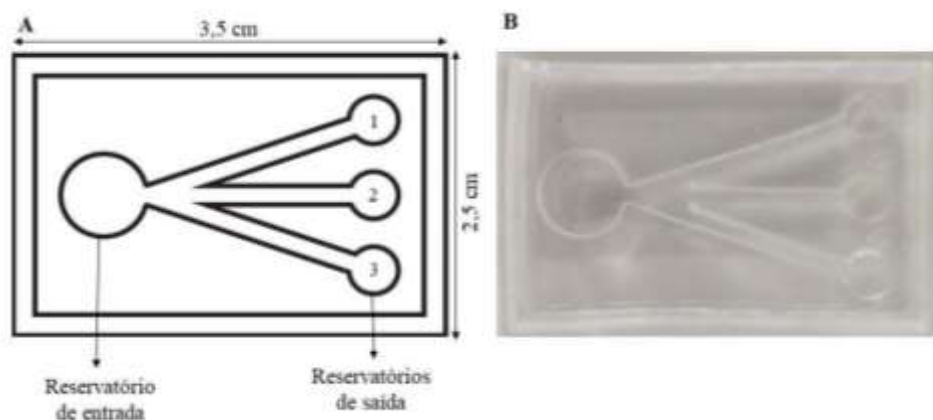
Todos os meios utilizados foram adquiridos da empresa de biotecnologia Vitrogen, salvo indicação em contrário.

Confecção do dispositivo microfluídico

Os dispositivos foram fabricados a partir da mistura composta por uma base de polidimetilsiloxano (PDMS) e um agente de cura (Sylgard 184, Dow Corning) na proporção 10:1, conforme recomendado pelo fabricante. O polímero líquido foi cuidadosamente depositado sobre o molde mestre, o qual foi submetido a vibrações mecânicas durante 20 minutos para remoção de bolhas de ar. Posteriormente o molde com silicone foi curado a 50°C durante 2 horas e depois mantido em temperatura ambiente (25°C) por 24 horas para posterior utilização.

O dispositivo microfluídico possuía dimensões de 3,5 cm x 2,5 cm e altura de 0,3 cm, e consistia em um reservatório de entrada conectado por três canais equidistantes a três reservatórios de saída, como ilustrado na Figura 1. Cada reservatório de saída do dispositivo foi preenchido com um meio diferente, totalizando três tipos de meios. Esses consistiam no meio de fertilização *in vitro* (FIV), solução NaCl 0,9% e meio de maturação *in vitro* (MIV). Após preenchimento dos reservatórios de saída com os meios, a amostra contendo os espermatozoides foi depositada no reservatório de entrada.

Figura 1. Desenho de molde (A) e dispositivo microfluídico (B) contendo um reservatório de entrada e três reservatórios de saída para seleção de espermatozoides de carneiros.



A: desenho de molde de dispositivo microfluídico; B: fabricação de molde do dispositivo microfluídico; Reservatório de entrada: local de deposição de espermatozoides para seleção espermática; Reservatórios de saída: local onde as amostras de espermatozoides eram coletadas após 35 minutos de incubação; 1:

1 reservatório contendo meio FIV; 2: reservatório contendo solução NaCl 0,9%; 3: reservatório contendo
2 meio MIV.

4 **Coleta e processamento de espermatozoides**

5 Foram coletados dez complexos testículo-epidídimo (CTE) de carneiros
6 sexualmente maduros do abatedouro local e encaminhados ao laboratório em caixa
7 térmica a 37°C em no máximo 30 minutos. Após a remoção do testículo, a cauda do
8 epidídimo foi lavada em solução NaCl 0,9% e, logo após, realizou-se a coleta de
9 espermatozoides pela técnica de flutuação, conforme realizado por Fernandes et al.
10 (2022). A amostra recuperada foi colocada em tubo cônico de plástico e foi mantida em
11 banho-maria a 37,5°C por 15 minutos para posterior início de avaliações. Foram
12 utilizados espermatozoides epididimários com pelo menos 80% de motilidade total.

14 **Análises espermáticas**

15 **CASA**

16 A avaliação da cinética do movimento dos espermatozoides foi realizada a partir
17 do sistema CASA (Hamilton Thorne IVOS II system, Hamilton Thorne Biosciences,
18 Beverly, MA, EUA), previamente configurado para analisar espermatozoides de
19 carneiros. Para isso, 2 µl da amostra foram inseridos em uma lâmina (Leja Slide, 4- quatro
20 câmaras, 20 µm). Os parâmetros analisados foram: motilidade total (MT); motilidade
21 progressiva (MP); velocidade curvilínea (VCL); velocidade média do caminho (VAP);
22 velocidade de reta (VSL); linearidade (LIN); retidão (STR); a amplitude de deslocamento
23 lateral da cabeça (ALH); e batimento/frequência cruzada (BCF).

25 **Viabilidade**

26 Para avaliar a viabilidade e a atividade mitocondrial dos espermatozoides, uma
27 alíquota da amostra espermática (10 µL) foi incubada a 34 °C durante 10 min em uma
28 solução composta pela associação das seguintes sondas fluorescentes: 2 µL de Iodeto de
29 propídio (Sigma-Aldrich, Co., St Louis, MO, USA), 0,5 mg/mL NaCl 0,9%, 5 µL de
30 Mitotracker CMXRos (Mito Tracker red®, Molecular Probes, M-7512) 500 nM (diluição
31 de 50 µg em 94µL de DPBS), e 3µL de Hoechst 33342 (H342; Sigma-Aldrich, St Louis,
32 MO, USA) (diluição 25 mg/mL de DMSO). As amostras foram avaliadas por microscópio
33 de epifluorescência (x400), sendo contabilizadas 200 células (CELEGHINI et al., 2010).
34 Aqueles espermatozoides marcados como vermelho (IP) foram classificados como
35 membrana plasmática comprometida e aqueles marcados em azul (H342) foram

classificados com membrana intacta. As células com peça intermediária marcadas em amarelo (Mitotracker) foram classificadas com atividade mitocondrial.

Morfologia

A morfologia dos espermatozoides foi determinada a partir da diluição da amostra com rosa bengala, na proporção de 1:1. Lâminas com as amostras de espermatozoides foram coradas e avaliadas em microscopia óptica com aumento de 1000x, avaliando 200 espermatozoides em cada amostra. Os espermatozoides foram classificados como normais ou como anormais ou defeituosos, sendo classificado como defeito de acrossoma, defeito de cabeça, defeito de peça intermediária ou defeito de cauda. Apenas um defeito foi pontuado por espermatozoide.

Design experimental: *Influência da aplicação do plasma atmosférico e da quimiotaxia na seleção de espermatozoides de carneiros em dispositivo microfluídico*

Após serem desmoldados, os dispositivos foram destinados ao tratamento com plasma atmosférico durante 15 minutos de forma uniforme em toda a superfície, com distância de 15 mm entre o dispositivo e a cabeça do bocal da fonte de plasma, com tensão de 13 Kv, frequência de 600 hz e utilizando hélio como gás de trabalho, com fluxo de 1,5 L/minuto.

Foram empregados 10 dispositivos microfluídicos como controle e outros 10 dispositivos foram tratados com plasma atmosférico. As amostras de espermatozoides epididimários foram introduzidas no reservatório de entrada, enquanto três meios distintos foram colocados em cada um dos reservatórios de saída. Os meios utilizados para avaliar a quimiotaxia dos espermatozoides consistiram no meio de fertilização *in vitro* (FIV), meio de maturação *in vitro* (MIV) e solução NaCl 0,9%. Inicialmente, foram adicionados 160 µl de cada meio em um dos reservatórios de saída e ao longo do canal próximo ao reservatório. Em seguida, 90 µl da amostra contendo espermatozoides epididimários foram depositados no reservatório de entrada, tanto nos dispositivos controles quanto nos dispositivos tratados.

Cada dispositivo foi incubado a 37,5°C, em atmosfera de 5% de CO₂ durante 35 minutos para que os espermatozoides pudessem ser atraídos e nadassem até o meio de maior preferência. Após finalizado o tempo, o reservatório de entrada foi isolado dos demais canais e as amostras dos reservatórios de saída e entrada foram coletadas para

avaliações. Além disso, foi realizada seleção espermática através da técnica de gradiente de Percoll, o qual foi escolhido como método controle para comparar a seleção realizada pelo dispositivo microfluídico.

Para avaliar o impacto do uso do plasma atmosférico, foram realizadas comparações entre os dispositivos tratados e não tratados. Para avaliar a quimiotaxia, foram realizadas análises a partir dos meios utilizados na seleção espermática, independentemente de serem tratadas ou do grupo controle. Por fim, para avaliar a eficácia do método de seleção espermática, foi realizada comparação dos parâmetros de espermatozoides selecionados tanto através do dispositivo microfluídico (controle e tratamento) quanto através do gradiente de Percoll.

Análise estatística

Os dados foram expressos em valores de média $\pm$ desvio padrão. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais para cada variável estudada foram verificadas através da Análise de Variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Resultados

Os parâmetros avaliados pelo CASA para seleção de espermatozoides epididimários de carneiros podem ser visualizados na Tabela 1, organizados entre grupo controle ou tratamento e pelos meios empregados na quimiotaxia.

Em relação aos parâmetros de motilidade total (MT) e progressiva (MP), todos os meios do grupo controle foram semelhantes ($p > 0,05$) aos seus respectivos meios do grupo tratamento. Isso sugere que, para esses parâmetros, não houve influência da aplicação do plasma atmosférico sobre a seleção e qualidade espermática. Ao analisar os valores dos parâmetros de velocidade (VCL, VSL e VAP), percebe-se que todos os meios foram semelhantes entre o grupo controle e o grupo de tratamento, com exceção do meio MIV. No meio MIV, os valores de VSL e VAP foram superiores ($p < 0,05$) no grupo em que o dispositivo microfluídico recebeu o tratamento com plasma atmosférico.

A seleção espermática realizada através do gradiente de Percoll foi semelhante ($p > 0,05$) à realizada através do meio FIV do grupo tratamento em todos os parâmetros avaliados pelo CASA, o que indica uma resposta positiva da quimiotaxia pelos espermatozoides para este meio. O meio FIV do tratamento apresentou MT superior a

1 todos os outros meios ($p < 0,05$) e em relação à MP, apresentou parâmetros semelhantes
2 aos meios FIV e solução NaCl 0,9% do grupo controle e tratamento ($p > 0,05$).

3 Na tabela 2 é possível verificar a porcentagem de espermatozoides viáveis e com
4 atividade mitocondrial a partir da avaliação com microscopia de fluorescência. Não houve
5 diferença significativa ($p > 0,05$) entre os meios do grupo controle com seus respectivos
6 meios do grupo tratamento tanto para viabilidade como para atividade mitocondrial.
7 Entretanto, a porcentagem de espermatozoides viáveis no meio FIV do grupo tratamento
8 ($31,3 \pm 21,5$) foi semelhante ($p > 0,05$) aos espermatozoides selecionados pelo gradiente
9 de Percoll ($57,9 \pm 24,4$), apresentando médias superiores aos demais meios do controle e
10 do tratamento. Ao avaliar apenas a atividade mitocondrial, observa-se que tanto o meio
11 FIV do grupo controle ($49,5 \pm 28,7$) quanto do grupo tratamento ($52,7 \pm 24,9$) foram
12 significativamente semelhantes ($p > 0,05$) ao Percoll ($59,3 \pm 25,4$) e à amostra inicial
13 ($77,9 \pm 12,4$), enquanto os demais meios foram semelhantes ($p > 0,05$) apenas ao Percoll..

14 A porcentagem de espermatozoides com integridade de membrana plasmática
15 pode ser visualizada na Tabela 3. Nesta avaliação não houve diferença significativa ($p >$
16 $0,05$) entre os meios testados no controle com seus respectivos meio do grupo tratamento.
17 Entretanto, todos estes meios apresentaram espermatozoides com integridade de
18 membrana inferior ($p < 0,05$) aos espermatozoides selecionados por meio do gradiente de
19 Percoll e da amostra inicial.

20 Em relação à morfologia, não houve diferença ($p > 0,05$) na porcentagem de
21 espermatozoides normais e com defeitos de peça intermediária entre todos os meios do
22 grupo controle e tratamento, com o gradiente de Percoll e com a amostra inicial. Os
23 espermatozoides selecionados pelo gradiente de Percoll apresentaram porcentagem
24 superior ($P < 0,05$) de defeitos em cauda em relação à amostra inicial, porém se
25 assemelham aos meios utilizados no dispositivo microfluídico do grupo controle e
26 tratamento.

Tabela 1. Parâmetros avaliados pelo CASA (Computer Assisted Sperm Analysis) de espermatozoides epididimários de carneiros (n=10) submetidos à seleção espermática a partir do uso do gradiente de Percoll e dispositivo microfluídico tratado ou não com plasma atmosférico a partir do uso da quimiotaxia.

Letras sobrescritas diferentes (a,b,c,d,e) na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Amostra inicial: amostra recém coletada do epidídimo; amostra residual: amostra restante

	MT(%)	MP (%)	VCL ($\mu\text{m/s}$)	VSL ($\mu\text{m/s}$)	VAP ($\mu\text{m/s}$)	LIN (%)	STR (%)	ALH (μm)	BCF (Hz)
Amostra inicial	94,4 $\pm$ 3,1 ^a	53,8 $\pm$ 12,9a	232,28 $\pm$ 37,8a	110,2 $\pm$ 26,3a	135,90 $\pm$ 27,4a	47,2 $\pm$ 5,3ab	78,4 $\pm$ 4,4ab	8,64 $\pm$ 0,6a	36,78 $\pm$ 5,9ab
Percoll	72,6 $\pm$ 12,3ab	33,0 $\pm$ 7,9 abc	172,78 $\pm$ 26,0ab	80,97 $\pm$ 8,2ab	102,15 $\pm$ 9,8ab	47,9 $\pm$ 8,0ab	75,9 $\pm$ 5,3ab	6,5 $\pm$ 0,9abc	39,9 $\pm$ 1,5ab
Controle									
Meio FIV	41,0 $\pm$ 21,1cd	32,5 $\pm$ 19,9abc	232,28 $\pm$ 40,6a	128,66 $\pm$ 30,7a	139,95 $\pm$ 31,7a	68,3 $\pm$ 10,8a	90,4 $\pm$ 4,9a	6,9 $\pm$ 1,8abc	39,78 $\pm$ 4,0ab
Solução NaCl 0,9%	28,8 $\pm$ 26,7de	21,4 $\pm$ 21,5bcd	133,5 $\pm$ 99,7bc	91,38 $\pm$ 71,8ab	99,16 $\pm$ 76,2ab	47,1 $\pm$ 34,9ab	61,8 $\pm$ 43,4ab	4,69 $\pm$ 3,3c	24,39 $\pm$ 19,2bc
Meio MIV	8,6 $\pm$ 12,7e	6,0 $\pm$ 10,9d	85,25 $\pm$ 81,4c	40,25 $\pm$ 51,3b	49,97 $\pm$ 54,5b	29,4 $\pm$ 33,8b	48,4 $\pm$ 49,2b	1,56 $\pm$ 2,7d	17,98 $\pm$ 23,9c
Amostra Residual	71,7 $\pm$ 18,9ab	45,7 $\pm$ 14,5a	223,83 $\pm$ 32,3a	123,39 $\pm$ 12,5a	144,47 $\pm$ 13,69a	55,40 $\pm$ 7,2ab	82 $\pm$ 3,5a	7,8 $\pm$ 1,58ab	39,01 $\pm$ 2,9ab
Tratamento									
Meio FIV	58,4 $\pm$ 16,9bc	43,9 $\pm$ 18,9ab	200,2 $\pm$ 44,7ab	123,51 $\pm$ 29,9a	134,91 $\pm$ 29,8a	63,6 $\pm$ 12,0a	88,2 $\pm$ 6,1a	6,9 $\pm$ 1,77abc	41,18 $\pm$ 3,1a
Solução NaCl 0,9%	44,2 $\pm$ 21,3cd	31,6 $\pm$ 15,7abc	214,66 $\pm$ 55,7ab	132,57 $\pm$ 36,8a	145,22 $\pm$ 39,5a	62,60 $\pm$ 8,7a	88,5 $\pm$ 4,8a	7,18 $\pm$ 1,4 abc	41,61 $\pm$ 5,9a
Meio MIV	25,5 $\pm$ 16,8de	18,8 $\pm$ 12,1cd	165,88 $\pm$ 82,1abc	116,09 $\pm$ 61,7a	125,32 $\pm$ 66,9a	63 $\pm$ 23,1a	81,1 $\pm$ 28,8ab	5,6 $\pm$ 2,76bc	34,34 $\pm$ 13,4ab
Amostra Residual	72,6 $\pm$ 23,2ab	44,6 $\pm$ 16,8a	208,02 $\pm$ 31,0ab	110,19 $\pm$ 21,0a	130,30 $\pm$ 21,7a	52,30 $\pm$ 8,6ab	79,2 $\pm$ 6,5 ab	7,75 $\pm$ 1,2ab	39,70 $\pm$ 2,4ab

no reservatório de entrada após o período de seleção espermática; Controle: dispositivos microfluídicos sem tratamento; tratamento: dispositivos microfluídicos que receberam a aplicação do plasma atmosférico. TM = total motility; PM = progressive motility; VCL = Curvilinear Speed; VSL = Progressive Linear Speed; VAP = Average Trajectory Speed; LIN = Linearity; STR= Retilinearity; ALH = Lateral Head Displacement Amplitude; BCF = Flagellar Beat Frequency.

Tabela 2. Viabilidade e atividade mitocondrial de espermatozoides epididimários de carneiros submetidos à seleção espermática a partir do uso do gradiente de Percoll e dispositivo microfluídico tratado ou não com plasma atmosférico a partir do uso da quimiotaxia.

	Viabilidade (%)	Atividade mitocondrial (%)
Amostra inicial	74,0 ± 14,4 ^a	77,9 ± 12,4 ^a
Percoll	57,9 ± 24,4 ^{ab}	59,3 ± 25,4 ^{abc}
<i>Controle</i>		
Meio FIV	27,1 ± 20,0 ^{cde}	49,5 ± 28,7 ^{abc}
Solução NaCl 0,9%	22,3 ± 23,1 ^{cde}	38,2 ± 26,3 ^{bc}
Meio MIV	10,1 ± 11,1 ^e	26,2 ± 28,8 ^c
Amostra Residual	43,4 ± 22,1 ^{bc}	64,7 ± 22,4 ^{ab}
<i>Tratamento</i>		
Meio FIV	31,3 ± 21,5 ^{bcde}	52,7 ± 24,9 ^{abc}
Solução NaCl 0,9%	21,6 ± 13,7 ^{cde}	40,4 ± 17,4 ^{bc}
Meio MIV	14,9 ± 10,6 ^{de}	32,8 ± 29,2 ^{bc}
Amostra Residual	37,1 ± 16,8 ^{bcd}	66,1 ± 16,6 ^{ab}

Letras sobrescritas diferentes (a,b,c,d,e) na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$). Viabilidade: espermatozoides marcados com Hoescht 33342. Atividade mitocondrial: espermatozoides marcados com Mitotracker. Amostra inicial: amostra recém coletada do epidídimo; amostra residual: amostra restante no reservatório de entrada após o período de seleção espermática; Controle: dispositivos microfluídicos sem tratamento; tratamento: dispositivos microfluídicos que receberam a aplicação do plasma atmosférico.

Tabela 3. Avaliação de espermatozoides epididimários de carneiros com integridade de membrana plasmática submetidos à seleção espermática a partir do uso do gradiente de Percoll e dispositivo microfluídico tratado ou não com plasma atmosférico a partir do uso da quimiotaxia.

Integridade de membrana plasmática (%)	
Amostra inicial	75,7 ± 8,0 ^a
Percoll	62,7 ± 11,6 ^a
<i>Controle</i>	
Meio FIV	35,7 ± 3,6 ^{bc}
Solução NaCl 0,9%	36,7 ± 12,5 ^{bc}
Meio MIV	26,9 ± 9,5 ^c
Amostra Residual	42,6 ± 11,0 ^b
<i>Tratamento</i>	
Meio FIV	42,1 ± 13,3 ^{bc}
Solução NaCl 0,9%	39,1 ± 13,0 ^{bc}
Meio MIV	32,4 ± 11,3 ^{bc}
Amostra Residual	37,6 ± 10,2 ^{bc}

Letras sobrescritas diferentes (a,b,c,d,e) na mesma coluna indicam diferença significativa (p < 0,05).

Tabela 4. Avaliação da morfologia (%) de espermatozoides epididimários de carneiros submetidos à seleção espermática a partir do uso do gradiente de Percoll e dispositivo microfluídico tratado ou não com plasma atmosférico a partir do uso da quimiotaxia.

	Morfologia (%)			
	Normal	Defeito de cauda	Defeito de PI	Defeito de cabeça
Amostra inicial	68,7 ± 8,1 ^a	11,6 ± 9,2 ^a	1,7 ± 1,5 ^a	18,0 ± 7,7 ^{ab}
Percoll	58,8 ± 12,1 ^a	23,2 ± 13,7 ^b	6,2 ± 4,1 ^a	11,8 ± 9,2 ^a
Controle				
Meio FIV	61,7 ± 8,7 ^a	13,2 ± 5,5 ^{ab}	3,7 ± 2,2 ^a	21,4 ± 9,1 ^{ab}
Solução NaCl 0,9%	59,0 ± 11,9 ^a	13,8 ± 8,3 ^{ab}	5,6 ± 3,2 ^a	21,6 ± 5,2 ^{ab}
Meio MIV	60,0 ± 10,7 ^a	13,9 ± 7,8 ^{ab}	6,3 ± 3,3 ^a	19,8 ± 9,1 ^{ab}
Amostra Residual	61,6 ± 9,3 ^a	11,7 ± 4,1 ^a	5,7 ± 3,4 ^a	21,0 ± 7,0 ^{ab}
Tratamento				
Meio FIV	64,4 ± 8,8 ^a	13,1 ± 6,6 ^{ab}	2,7 ± 2,5 ^a	19,8 ± 7,3 ^{ab}
Solução NaCl 0,9%	61,4 ± 10,3 ^a	13,1 ± 5,8 ^{ab}	5,6 ± 3,5 ^a	19,9 ± 6,7 ^{ab}
Meio MIV	61,9 ± 12,7 ^a	12,2 ± 6,3 ^{ab}	6,3 ± 5,6 ^a	19,6 ± 8,8 ^{ab}
Amostra Residual	56,6 ± 8,9 ^a	15,0 ± 6,6 ^{ab}	3,9 ± 2,9 ^a	24,5 ± 11,6 ^b

Letras sobrescritas diferentes (a,b,c,d,e) na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Discussão

Ao avaliar a seleção de espermatozoides em dispositivo microfluídico, diversos fatores podem influenciar nos resultados obtidos. Estes incluem o tipo de polímero e design empregados na fabricação do dispositivo, o comprimento dos canais, o tipo de fluxo de fluido, e a interferência de possíveis estímulos externos, como a aplicação de plasma atmosférico.

O dispositivo microfluídico fabricado neste estudo possuía dois canais divergentes, um para a esquerda e outro para a direita, mimetizando o trato reprodutor feminino. Essa abordagem, que busca replicar o ambiente fisiológico do trato reprodutor,

mostra-se promissora para a seleção de espermatozoides de alta qualidade (KHODAMORADI et al., 2021), além de oferecer uma plataforma valiosa para investigações sobre o comportamento celular dentro do sistema biológico. O dispositivo possuía ainda um canal intermediário com solução NaCl 0,9%, o qual serviu de divisor entre os canais das laterais com os meios ricos em componentes que poderiam ser mais interessantes para os espermatozoides.

Ao comparar os meios utilizados nos dispositivos de controle com os mesmos meios nos dispositivos tratados com plasma atmosférico, foi possível verificar que não houve diferença significativa ($P > 0,05$) nos parâmetros de motilidade, viabilidade, atividade mitocondrial, integridade de membrana plasmática ou morfologia, indicando que a aplicação do plasma, apesar de facilitar o preenchimento dos canais, não influenciou na melhoria da seleção de espermatozoides em dispositivo microfluídico.

Ao avaliar os meios separadamente, observou-se que o meio FIV do dispositivo tratado com plasma apresentou todos os parâmetros estatisticamente semelhantes ($P < 0,05$) com o método de seleção por gradiente de Percoll, com exceção apenas da integridade de membrana plasmática. Dessa forma, o meio FIV demonstra ser a melhor alternativa para a seleção espermática no dispositivo microfluídico. Já os espermatozoides selecionados a partir do meio MIV apresentaram os valores mais baixos referentes à motilidade, indicando que este não se mostra vantajoso para ser utilizado, visto que a motilidade é um dos parâmetros mais importantes para avaliação da qualidade da amostra (VAN DE HOEK; RICKARD; DE GRAAF, 2022).

O meio de fertilização *in vitro* foi desenvolvido para auxiliar na fertilização e na produção *in vitro* de embriões, possuindo boa eficácia e confiabilidade dentro da clínica reprodutiva. As substâncias presentes no meio de FIV proporcionam aceleração da capacitação espermática e hiperativação dos espermatozoides, o que normalmente leva ao aumento na porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva (MOSELEY et al., 2005). Devido a isso, o meio FIV pode ter apresentado maiores valores na maior parte dos parâmetros cinéticos avaliados pelo CASA.

Os demais parâmetros avaliados pelo CASA demonstraram ser semelhantes entre quase todos os meios, independentemente de serem controle ou tratamento, com o método de Percoll e com a amostra inicial. Além dos parâmetros de motilidade, a velocidade curvilínea (VCL), velocidade média de trajeto (VAP) e frequência de batimento flagelar (BCF) também são correlacionados com amostras de espermatozoides de carneiros com alta fertilidade (DEL OLMO et al., 2013).

Neste estudo esperava-se que os espermatozoides dos dispositivos tratados com plasma atmosférico tivessem maior facilidade de sair do reservatório de entrada e alcançar os reservatórios de saída. Isso porque a aplicação do plasma atmosférico em superfícies permite modificar suas propriedades, reduzindo o ângulo de contato formado pelos líquidos depositados e facilitando sua fluidez. Entretanto, não foram observadas diferenças entre dispositivos tratados ou não com plasma, indicando que seu uso pode servir para facilitar o preenchimento de dispositivos microfluídicos e diminuir as chances de formação de bolhas de ar, porém não influencia na qualidade espermática final.

Ao buscar outros fatores importantes para os resultados encontrados neste estudo, destaca-se o tempo utilizado para que os espermatozoides pudessem nadar de um reservatório a outro e a distância percorrida. O tempo de incubação utilizado para a seleção pode ser considerado dentro do padrão observado em outros estudos, entretanto, a distância entre o reservatório de entrada até os reservatórios de saída é considerada superior. Ao avaliar o melhor tempo para que os espermatozoides nadassem do reservatório de entrada até o reservatório de saída, Ditsayabut et al. (2018) verificaram que entre 30 a 35 minutos, um maior número de espermatozoides bovinos alcançaram o reservatório. Além disso, os autores verificaram que entre as distâncias de 5, 7, 10 e 15mm de comprimento de canal, os melhores resultados referentes à qualidade espermática foi obtida nos canais de 5mm, enquanto que aqueles de 15mm obtiveram menor qualidade. Dessa forma, um dispositivo com menores dimensões pode apresentar resultados superiores.

Possivelmente, a distância utilizada entre os reservatórios de entrada e saída influenciou nos parâmetros de viabilidade e integridade de membrana plasmática neste estudo. Devido ao maior comprimento, os espermatozoides poderiam necessitar de mais tempo para conseguir chegar em maior concentração nos reservatórios de saída, porém haveria maior gasto de energia e menor viabilidade. Como o número de espermatozoides necessários para realizar uma fertilização *in vitro* é pequeno, seria mais interessante ter menor quantidade de espermatozoides, porém de qualidade superior após a seleção (ORSOLINI et al., 2022). Dessa forma, a redução do comprimento dos canais poderia favorecer a seleção espermática, inclusive com a redução do tempo necessário.

O Percoll selecionou espermatozoides com maior integridade de membrana e viabilidade em relação aos demais meios utilizados nos dispositivos do grupo controle e tratamento. Isso se deve ao fato do gradiente de Percoll permitir a redução de espermatozoides com danos em membranas, permitindo que as células apresentem

melhor capacitação, hiperativação e, conseqüentemente, maior sucesso na fertilização (NOGUCHI et al., 2015).

A porcentagem de células normais apresentou média inferior a 70% em todas as amostras avaliadas, não havendo diferença estatística entre elas. Possivelmente, o período do ano em que a coleta foi realizada pode ter influenciado na qualidade dos espermatozoides, visto que ocorreu durante a época seca, sendo condizente com estudo realizado por Frazão Sobrinho et al. (2014), no qual espermatozoides coletados durante a seca apresentam parâmetros inferiores aos espermatozoides avaliados durante época de chuva. A avaliação morfológica é um dos fatores que influenciam a qualidade e a motilidade dos espermatozoides (MORRELL; RODRIGUEZ-MARTINEZ, 2009; VAN DE HOEK; RICKARD; DE GRAAF, 2022), dessa forma, quanto menor for as anormalidades da amostra, mais chances de se ter sucesso na fertilização .

CONCLUSÃO

O uso de CAP não influenciou nos parâmetros de qualidade de espermatozoides de carneiros após a seleção de espermatozoides epididimários. Em relação à quimiotaxia, o meio FIV apresentou maior motilidade total em relação ao meio MIV e à solução NaCl 0,9% e maior motilidade progressiva em relação ao meio MIV, tanto no grupo controle quanto no tratamento, demonstrando ser um meio de maior interesse para os espermatozoides.

REFERÊNCIAS

- CELEGHINI, E.C.C.; NASCIMENTO, J.; RAPHAEL, C.F.; ANDRADE, A.F.C.; ARRUDA, R.P. Simultaneous assessment of plasmatic, acrosomal, and mitochondrial membranes in ram sperm by fluorescent probes. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia.**, v. 62, n. 3, p. 536-543, 2010.
- DELGADILLO, J. A.; MARTIN, G. B. Alternative methods for control of reproduction in small ruminants: A focus on the needs of grazing industries. **Animal Frontiers**, v. 5, n. 1, p. 57-65, 2015.
- DEL OLMO, E. et al. Fertility of cryopreserved ovine semen is determined by sperm velocity. **Animal reproduction science**, v. 138, n. 1-2, p. 102-109, 2013.

DITSAYABUT, P. et al. Investigating the factors affecting the outcomes of the sperm sorting with microfluidic devices. **Biomedical Physics & Engineering Express**, v. 4, n. 6, p. 065016, 2018.

FRAZÃO SOBRINHO, J. M. et al. Características do sêmen de carneiros Dorper, Santa Inês e sem padrão racial definido, pré e pós-congelação, nos períodos chuvoso e seco. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, p. 969-976, 2014.

GRASA, P. et al. Ram sperm selection by a dextran/swim-up procedure increases fertilization rates following intrauterine insemination in superovulated ewes. **Journal of andrology**, v. 25, n. 6, p. 982-990, 2004.

JOFRE-RECHE, J. A. et al. Surface treatment of polydimethylsiloxane (PDMS) with atmospheric pressure rotating plasma jet. Modeling and optimization of the surface treatment conditions. **Plasma Processes and Polymers**, v. 13, n. 4, p. 459-469, 2016.

KASHANINEJAD, N.; SHIDDIKY, M. J. A.; NGUYEN, N. T.. Advances in microfluidics-based assisted reproductive technology: From sperm sorter to reproductive system-on-a-chip. **Advanced Biosystems**, v. 2, n. 3, p. 1700197, 2018.

KHODAMORADI, M. et al. Recent Microfluidic Innovations for Sperm Sorting. **Chemosensors**, v.9, n.6, p. 126, 2021.

KIM, H.T.; JEONG, O.C. PDMS surface modification using atmospheric pressure plasma. **Microelectronic Engineering**, v. 88, p.2281-2285, 2011.

MATSUURA K, TAKENAMI M, KURODA Y, HYAKUTAKE T, YANASE S, NARUSE K. Screening of sperm velocity by fluid mechanical characteristics of a cyclo-olefin polymer microfluidic sperm-sorting device. **Reproductive BioMedicine Online**, v.24, n.1, p.109-115, 2012.

MORREL, J.M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Biomimetic techniques for improving sperm quality in animal breeding: a review. **The open andrology journal**, v. 1, n. 1, 2009.

MOSELEY, F. L. C. et al. Protein tyrosine phosphorylation, hyperactivation and progesterone-induced acrosome reaction are enhanced in IVF media: an effect that is not associated with an increase in protein kinase A activation. **Molecular Human Reproduction**, v. 11, n. 7, p. 523-529, 2005.

NOGUCHI, M. et al. Centrifugation on Percoll density gradient enhances motility, membrane integrity and in vitro fertilizing ability of frozen–thawed boar sperm. **Zygote**, v. 23, n. 1, p. 68-75, 2015.

ORSOLINI, M. F. et al. Characterization of sperm cell membrane charge and selection of high-quality sperm using microfluidics in stallions. **Theriogenology**, v. 192, p. 1-8, 2022.

PARAMIO, M. T.; IZQUIERDO, D. Current status of in vitro embryo production in sheep and goats. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 49, p. 37-48, 2014.

PARAMIO, M. T.; IZQUIERDO, D. Recent advances in in vitro embryo production in small ruminants. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 152-159, 2016.

RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Assisted reproductive techniques for cattle breeding in developing countries: a critical appraisal of their value and limitations. **Reproduction in domestic animals**, v. 47, p. 21-26, 2012.

SHARMA, S.; KABIR, M. A.; ASGHAR, W. Selection of healthy sperm based on positive rheotaxis using a microfluidic device. **Analyst**, v. 147, n. 8, p. 1589-1597, 2022.

STERBENC, N. et al. Single layer colloid centrifugation technique improves motility, viability and chromatin integrity of ram spermatozoa after thawing. **Cryobiology**, v.86, p.77-83, 2019.

VAN DE HOEK, M.; RICKARD, J. P.; DE GRAAF, S. P. Motility assessment of ram spermatozoa. **Biology**, v. 11, n. 12, p. 1715, 2022.

ZHU, Z. et al. A versatile bonding method for PDMS and SU-8 and its application towards a multifunctional microfluidic device. **Micromachines**, v. 7, n. 12, p. 230, 2016.

ANEXO I
CONFIGURAÇÕES UTILIZADAS NO CASA

ANALYSIS SETUP #7: RAM

Apply Sort: 0
Frames Acquired: 30
Frame Rate: 60 Hz
Minimum Contrast: 60
Minimum Cell Size: 5 Pixels
Minimum Static Contrast: 1
Straightness (STR), Threshold: 80,0 %
Vap Cutoff: 21,9 $\mu\text{m/s}$
Prog. Min VAP: 75,0 $\mu\text{m/s}$
VSL Cutoff: 6,0 $\mu\text{m/s}$
Cell Size: 5 Pixels
Cell Intensity: 55
Static Head Size: 0,58 to 8,00
Static Head Intensity: 0,50 to 2,07
Static Elongation: 0 to 69
Slow Cells Motile: NO
Magnification: 1,89
Video Frequency: 60
Bright Field: NO
LED Illumination Intensity: 2200
IDENT Illumination Intensity: 0
Temperature, Set: 37,0 °C
Chamber depth: 20,7 μm
Chamber position: 3,5 mm
Chamber position B: 11,5 mm
Chamber position C: 19,5 mm
Chamber position D: 26,5 mm
Chamber type: Leja 20 μm
Field Selection Mode: SELECT
IDENT Fluorescent Option: OFF
Integrating Time: 1 Frames
Remote image recall: NO