



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

RAQUEL PEREIRA FREITAS DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE DERIVADOS DE  
QUITOSANA OBTIDA DE SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE  
CAMARÃO MARINHO**

Recife  
2018

RAQUEL PEREIRA FREITAS DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE DERIVADOS DE  
QUITOSANA OBTIDA DE SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE  
CAMARÃO MARINHO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas.

**Área de concentração:** Biotecnologia

**Orientador:** Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra

Recife

2018

Catálogo na fonte:  
Bibliotecária Claudina Queiroz, CRB4/1752

Silva, Raquel Pereira Freitas da

Caracterização e aplicação biotecnológica de derivados de quitosana obtida de subprodutos do processamento de camarão marinho / Raquel Pereira Freitas da Silva - 2018.

123 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Ranilson de Souza Bezerra

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas. Recife, 2018.

Inclui referências e apêndice

1. Quitosana 2. Antioxidante 3. Criopreservação  
I. Bezerra, Ranilson de Souza (orient.) II. Título

660.6

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-128

RAQUEL PEREIRA FREITAS DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO BIOTECNOLÓGICA DE DERIVADOS DE  
QUITOSANA OBTIDA DE SUBPRODUTOS DO PROCESSAMENTO DE  
CAMARÃO MARINHO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Área de Concentração Biotecnologia, da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 22/02/2018.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra (Orientador)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Dr. Janilson Felix da Silva (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof. Dr. Thiago Barbosa Cahú (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Maria Madalena Pessoa Guerra (Examinadora Externa)  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

---

Prof. Dr. Diego de Souza Buarque (Examinador Externo)  
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dedico esse trabalho à Deus, primeiramente, e aos meus familiares e amigos que sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus pelo dom da vida, amor, saúde, proteção e discernimento. Agradeço por tudo o que sou.

Aos meus familiares que sempre torceram por mim, pelo grande incentivo aos estudos, boa conduta, apoio sem limites, carinho, paciência, dedicação e compreensão.

Ao meu orientador, o professor Dr. Ranilson de Souza Bezerra, que me proporcionou a oportunidade de realizar este trabalho. À professora Dra. Maria Madalena Pessoa Guerra, que me concedeu a oportunidade de realizar parte dos meus experimentos em seu laboratório. E ao Dr. Thiago Barbosa Cahú, que sempre esteve disponível a me auxiliar quando precisei. Agradeço a confiança, atenção dispensada, ensinamentos, incentivo à pesquisa, competência e apoio que contribuíram para o bom desenvolvimento deste trabalho. Minha sincera e profunda gratidão aos três.

Aos companheiros e amigos do Laboratório de Enzimologia (LABENZ) pelo convívio, auxílio nos procedimentos experimentais, sugestões para o aprimoramento dos meus conhecimentos científicos e experiências generosamente compartilhadas.

Aos queridos que conheci no Laboratório de Andrologia (Androlab) pela generosidade, tempo e paciência disponibilizados durante as coletas e experimentos realizados.

Aos meus amigos de faculdade pela amizade e apoio nos bons e nos maus momentos, pela solidariedade e cumplicidade.

À Universidade Federal de Pernambuco e aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas que me forneceram suporte acadêmico e estrutural. Aos funcionários pelos serviços prestados com responsabilidade e eficiência.

À Netuno Pescados por ceder a matéria-prima utilizada neste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de doutorado que foi primordial para a minha manutenção e conclusão desta tese.

E, por fim a todos que contribuíram para a realização deste trabalho, seja de forma direta ou indireta, fica registrado aqui, a minha sincera gratidão a todos vocês!

## RESUMO

A expansão da indústria pesqueira aliado à maior demanda por pescados processados tem contribuído para a geração de quantidades significativas de subprodutos, que pode atingir até 80% da produção, dependendo do nível de processamento industrial e tipo de pescado. Dos produtos pesqueiros, podem ser obtidas uma variedade de moléculas bioativas com amplo potencial de aplicabilidade, como a quitosana. Com isso, a presente tese objetivou produzir derivados hidrossolúveis de quitosana, a partir de subprodutos da indústria pesqueira, com potenciais aplicações biotecnológicas. Os derivados de quitosana foram caracterizados e a citotoxicidade, atividade antioxidante, atividade antibacteriana e seus efeitos na criopreservação de sêmen foram avaliados *in vitro*. Quitosana foi obtida a partir de cabeças do camarão *Litopenaeus vannamei* e derivatizada quimicamente para a formação de quitosana carboximetilada, quitosana sulfada, quitosana carboximetilada-sulfatada, quitosana-glicose, quitosana-glicosamina e quitooligosacarídeos. A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), ressonância magnética nuclear de H<sup>1</sup> e C<sup>13</sup> e análise elementar comprovaram as modificações estruturais realizadas. As quitosanas não apresentaram citotoxicidade nas linhagens de células tumorais humanas de carcinoma de laringe, carcinoma mucoepidermoide de pulmão, câncer de mama e leucemia promielocítica aguda; a atividade antioxidante se mostrou variável entre as amostras, exibindo capacidade de sequestro do radical 1,1- difenil-2- picrilhidrazil (DPPH) entre 44,93 e 100 %, potencial redutor entre 0,17 e 1,32 e atividade quelante de íons ferrosos entre 5,1 e 90,12 % na concentração de 10 mg/mL; e atividade de inibição contra bactérias Gram-positivas e Gram- negativas. O efeito das quitosana produzidas na sobrevivência e funcionalidade de espermatozoides submetidos às condições armazenamento sob refrigeração a 5 °C foi investigado. Os derivados de quitosana promoveram desempenho melhorado nos parâmetros de cinética espermática, integridade de membrana plasmática e acrossomal, estabilidade e viabilidade celular. Os resultados obtidos no presente estudo podem ser usados como precursores para a geração produtos funcionais de alto valor agregado com potencial para contribuir na eficiência dos atuais procedimentos de criopreservação de sêmen, além de proporcionar avanços nas biotecnologias aplicadas à reprodução.

Palavras-chave: Antioxidante. Criopreservação. Espermatozoides. *Litopenaeus vannamei*. Quitosana. Subprodutos.

## ABSTRACT

The expansion of the fishing industry coupled with the increased demand for processed fish has contributed to the generation of significant quantities of by-products, which can reach up to 80% of production, depending on the level of industrial processing and type of fish. From fish products, a variety of bioactive molecules with broad application potential can be obtained, such as chitosan. Thus, the present thesis aimed to produce water-soluble chitosan derivatives, from by-products of the fishing industry, with potential biotechnological applications. Chitosan derivatives were characterized and cytotoxicity, antioxidant activity, antibacterial activity and their effects on cryopreservation of semen were evaluated *in vitro*. Chitosan was obtained from shrimp heads *Litopenaeus vannamei* and chemically derivatized for the formation of carboxymethylated chitosan, sulfated chitosan, carboxymethylated-sulfated chitosan, chitosan-glucose, chitosan-glucosamine and chito-oligosaccharides. Fourier transform infra-red spectroscopy (FTIR), H<sup>1</sup> and C<sup>13</sup> nuclear magnetic resonance and elemental analysis proved the structural modifications performed. The chitosan did not present cytotoxicity in human tumor cell lines of laryngeal carcinoma, mucoepidermoid carcinoma of the lung, breast cancer and acute promyelocytic leukemia; the antioxidant activity showed to be variable between the samples, showing the capacity of sequestration of 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) between 44,93 and 100% radical, reducing potential between 0.17 and 1.132 and chelating ferrous ions between 5.1 and 90.12% at the concentration 10 mg/ml; and inhibition activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. The effect of chitosan produced on the survival and functionality of spermatozoa subjected to storage conditions under refrigeration at 5 °C we investigated. The chitosan derivatives promoted better performance in the parameters of sperm kinetics, plasma and acrosomal membrane integrity, cell stability and viability. The results obtained in the present study can be used as precursors for the generation of high value-added functional products with the potential to contribute to the efficiency of current semen cryopreservation procedures, as well as to provide advances in biotechnologies applied to reproduction.

Keywords: By-products. Antioxidant. Cryopreservation. Spermatozoa. *Litopenaeus vannamei*. Chitosan. Processing waste.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Passado, presente e futuro da produção global da pesca extrativa e aquicultura.....	18
Figura 2 -	Exportação líquida de commodities agrícolas pelos países em desenvolvimento .....	19
Figura 3 -	Reação de origem da quitosana a partir da desacetilação da quitina, onde n é o grau de polimerização .....	23
Figura 4 -	Grupos funcionais reativos presentes na quitosana.....	25
Figura 5 -	Possibilidades de modificações químicas na estrutura da quitosana.	26
Figura 6-	Empresas multinacionais detentoras de patentes de uso de quitosana para a fabricação de seus produtos .....	30
Figure 7 -	FT-IR spectra of chitosan and derivates samples.....	46
Figure 8 -	<sup>1</sup> H spectrum of chitosan and derivates samples.....	47
Figure 9 -	<sup>13</sup> C NMR spectrum of chitosan and derivates samples.....	49
Figure 10 -	The inhibition effect of water-soluble chitosan derivates (25 µg/mL) in human tumor cell lines.....	51
Figure 11 -	Scavenging activity on DPPH radicals of water-soluble chitosan derivates from of <i>L. vannamei</i> .....	53
Figure 12 -	Chelating ability on ferrous ions of water-soluble chitosan derivates from of <i>L. vannamei</i> .....	54
Figure 13 -	Reducing Power of water-soluble chitosan derivates from of <i>L. vannamei</i> .....	55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Characterization of water-soluble chitosan derivatives .....	50
Tabela 2 -	Antibacterial activity, MIC (mg/mL) and MBC (mg/mL) of water-soluble chitosan derivates against various microorganism.....	57
Tabela 3 -	Análise da cinética espermática sêmen de carneiros em diluidor suplementado com ou sem derivados hidrossolúveis de quitosana, após acondicionamento refrigerado nos tempos 0 (T <sub>0h</sub> ), 24 (T <sub>24h</sub> ), 48 (T <sub>48h</sub> ), 72 (T <sub>72h</sub> ) e 96 hs (T <sub>96h</sub> ).....	70
Tabela 4 -	Análise da Integridade das Membranas Plasma e Acrosomal (iMPA), viabilidade e estabilidade em amostras de sêmen de carneiro suplementado com ou sem os derivados hidrossolúveis de quitosana, após acondicionamento refrigerado nos tempos 0 (T <sub>0h</sub> ), 24 (T <sub>24h</sub> ), 48 (T <sub>48h</sub> ), 72 (T <sub>72h</sub> ) e 96 hs (T <sub>96h</sub> ).....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BHT	Butylated Hydroxitoluene
CASA	Computer assisted system analysis
CH	Chitosan
CHCM	Chitosan carboxymethyl
CHCMS	Chitosan carboxymethyl sulfated
CH Glc	Chitosan-glucose
CHGlcN	Chitosan -glucosamine
CHS	Chitosan sulfate
COS	Chitoligossaccharides
CMB	Concentration Minimal Bactericidal
DD	Degree of Deacetylation
DMSO	Dimetilsulfóxido
DS	Degrees of Substitution
DPPH	1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
EDTA	Etilenodiaminotetracético
FAO	Food and Agriculture Organization
FITC-PNA	Isocianato de fluoresceína conjugado a <i>Peanut agglutinin</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogênio
Glc	Glucose
GlcN	Glucosamine
IA	Inseminação artificial
IP	Iodeto de propídio
iPAM	Integridade de membrana plasmática e acrossoma
LIN	Linearidade
MIC	Minimal Inhibitory Concentration
MP	Motilidade Progressiva
MPA	Ministério de Pesca e Aquicultura
MT	Motilidade Total
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Ânion superóxido
OH <sup>-</sup>	Radical hidroxila
PBS	Tampão fosfato de sódio

pH	Potencia Hidrogeniônico
ROS	Espécies reativas ao oxigênio
sptz	Espermatozoide
STR	Retilinearidade
TCA	Trichloroacetic acid
VAP	Velocidade média da trajetória
VCL	Velocidade curvilínea
VSL	Velocidade em linha reta
WOB	Índice de oscilação

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1	OBJETIVOS .....	16
1.1.1	<b>Objetivo Geral</b> .....	<b>16</b>
1.1.2	<b>Objetivos Específicos</b> .....	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
2.1	CENÁRIO ATUAL E PERSPECTIVAS FUTURAS DA PRODUÇÃO PESQUEIRA MUNDIAL .....	18
2.1.1	<b>Produção brasileira</b> .....	<b>19</b>
2.2	TENDÊNCIAS DO MERCADO DA PESCA E GERAÇÃO DE SUBPRODUTOS.....	20
2.3	SUBPRODUTOS PESQUEIROS COMO FONTE DE BIOMOLÉCULAS DE ALTO VALOR AGREGADO .....	21
2.4	QUITOSANA .....	21
2.4.1	<b>Estrutura, fontes e métodos de obtenção</b> .....	<b>22</b>
2.4.2	<b>Propriedades químicas e biológicas</b> .....	<b>23</b>
2.4.3	<b>Derivados hidrossolúveis</b> .....	<b>25</b>
2.4.4	<b>Mercado global</b> .....	<b>28</b>
2.5	BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO .....	31
2.5.1	<b>Criopreservação do sêmen</b> .....	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>35</b>
3.1	PRODUÇÃO DE QUITOSANAS HIDROSSOLÚVEIS A PARTIR DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA PESQUEIRA.....	35
3.2	TESTE DE CITOTOXICIDADE.....	36
3.3	TESTES ANTIOXIDANTES.....	36
3.4	TESTE ANTIBACTERIANO .....	36
3.5	TESTE EM SÊMEN .....	37
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	38

<b>4</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
4.1	WATER-SOLUBLE CHITOSAN DERIVATES FROM <i>LITOPENAEUS</i> <i>VANNAMEI</i> : CYTOTOXIC, ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES.....	39
4.2	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO SÊMEN REFRIGERADO DE CARNEIROS COM DILUIDOR SUPLEMENTADO COM DERIVADOS HIDROSSOLÚVEIS DE QUITOSANA.....	64
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>81</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>82</b>
	<b>APÊNDICE A – PATENTE DEPOSITADA NO INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL</b> .....	<b>91</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A produção mundial dos pescados tem registrado um crescimento nos últimos anos e as perspectivas para a próxima década é que ela continuará se expandindo. Os países asiáticos lideraram a produção em âmbito global, enquanto os países em desenvolvimento têm desempenhado um papel crescente no setor, dentre eles, o Brasil que deve se converter na quarta potência aquícola mundial até 2025 (FAO, 2016).

A indústria da pesca, como toda atividade econômica, tem a finalidade de transformar recursos naturais em produtos de valor para a sociedade, produzindo, inevitavelmente, subprodutos originados do processamento de pescados (NASCIMENTO, 1998). Dessa forma, anualmente, dependendo do nível de processamento e tipo de pescado, quantidades significativas de subprodutos formado, principalmente, por cabeça, pele, intestino, barbatanas e cauda de peixes, bem como cabeça, exoesqueleto e cauda de crustáceos são geradas anualmente (CORRÊA et al., 2012; FAO, 2016).

Os subprodutos pesqueiros foram, por muito tempo, considerados pelo mercado como “menos nobre” e um problema a ser descartado, no entanto, recentemente, tem havido uma tendência de conscientização para seus aspectos econômicos, sociais e ambientais. Eles têm sido reconhecidos e aproveitados por serem constituídos de moléculas bioativas com amplo potencial de aplicabilidade nos diversos setores, tais como: agrícola, alimentício, farmacêutico, cosmético, biomédico, construção civil e biotecnológico (BEZERRA, 2015; VALLE et al., 2015; BHAGWAT; DANDGE, 2016).

Uma das principais biomoléculas que podem ser obtidas a partir dos rejeitos do processamento de crustáceos é a quitosana, polissacarídeo pseudo-natural, que tem recebido considerável atenção para aplicações promissoras, por apresentar características e propriedades, como: baixa toxicidade, biocompatibilidade, biodegradabilidade, bioadesiva, analgésica, antitumoral, hemostática, antimicrobiana anti-angiogênica, anti-inflamatória e cicatrizante (XIA, 2003; COSTA SILVA et al., 2006; MUZZARELLI, 2009; WIJESEKARA et al., 2011).

No entanto, uma das limitações tem sido sua solubilidade limitada ao meio ácido. Diante disso, estudos têm sido desenvolvidos através de modificações químicas em sua estrutura, de forma a torná-la solúvel em meio neutro, próximo ao

pH fisiológico, o que amplia consideravelmente a sua gama de aplicações (PRASHANTH; THARANATHAN, 2007; RONCAL et al., 2007; KANATT et al., 2008; ZHANG et al., 2010).

Apesar da quitosana e seus derivados hidrossolúveis terem sido estudados e empregados em uma variedade de propósitos nos mais diferentes setores, como: farmacêutico, biomédico, cosmético, alimentício, construção civil, agrícola, têxtil, oftalmológico e biocombustíveis, ainda são escassos os conhecimentos acerca das suas possibilidades e funcionalidades nas biotecnologias aplicadas à reprodução, como na criopreservação do sêmen.

Dessa forma, este projeto identifica a oportunidade de aproveitamento de subprodutos do processamento de pescados, material abundante e de baixo custo, através de um método de recuperação reproduzível em escala industrial, para a obtenção de derivados hidrossolúveis de quitosana, e traz uma nova abordagem biotecnológica para estas biomoléculas, que possuem uma variedade de atributos e propriedades benéficas reconhecidas.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Produzir derivados hidrossolúveis de quitosana, a partir de subprodutos da indústria pesqueira, com potenciais aplicações biotecnológicas.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- a) Obter quitosana hidrossolúvel através de derivatização química, a partir de cabeças do camarão *Litopenaeus vannamei*;
- b) Caracterizar quimicamente as quitosanas através de espectroscopia de infravermelho (FT-IR), ressonância magnética nuclear ( $C^{13}$  e  $H^1$ ) e análise elementar;
- c) Avaliar a toxicidade das quitosanas em linhagens de células;
- d) Analisar a atividade antioxidante das quitosanas;
- e) Determinar a atividade antibacteriana dos derivados produzidos;

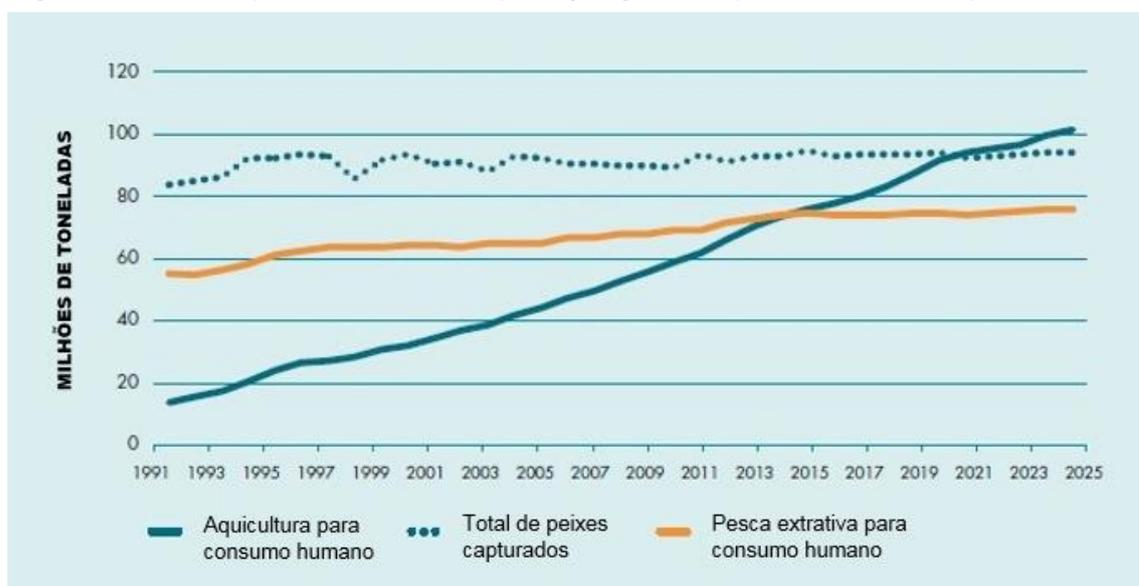
- f) Investigar o efeito das quitosanas na sobrevivência e funcionalidade de espermatozoides submetidos às condições de armazenamento sob refrigeração;
- g) Desenvolver um protocolo de criopreservação do sêmen, envolvendo o uso de quitosana hidrossolúvel como suplemento em diluente para a preservação do sêmen.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 CENÁRIO ATUAL E PERSPECTIVAS FUTURAS DA PRODUÇÃO PESQUEIRA MUNDIAL

A pesca e a aquicultura representam, para centenas de milhões de pessoas ao redor do mundo, importantes fontes de alimentação, nutrição, renda e meios de subsistência. Nas duas últimas décadas, o crescimento na produção aquícola tem impulsionado o consumo de pescados a nível global. Em 2014, a contribuição do setor da aquicultura para o abastecimento de pescado para consumo humano ultrapassou pela primeira vez a pesca por captura na natureza, com uma produção mundial 73,8 milhões de toneladas, enquanto que a aquicultura para consumo humano foi de 93,4 milhões de toneladas (Figura 1) (FAO, 2016).

Figura 1 - Passado, presente e futuro da produção global da pesca extrativa e aquicultura



Fonte: FAO (2016).

O peixe continua a ser um dos produtos alimentares mais comercializados, seguido pelo grupo dos crustáceos, e mais da metade das exportações, em valor, são originárias dos países em desenvolvimento. Nestes países, o comércio da pesca tem importante papel na economia, como fonte geradora de renda, emprego, segurança alimentar e nutrição, em tão alto grau que, recentemente, suas receitas líquidas de exportação (exportações menos importações) atingiram níveis superiores ao de outros

grandes commodities agrícolas, tais como carne, tabaco, arroz e açúcar (Figura 2) (FAO, 2016).

O comércio pesqueiro é amplamente conduzido por demanda dos países desenvolvidos, como a União Europeia, Estados Unidos da América e Japão, que são altamente dependentes das importações para satisfazer seu consumo interno. Enquanto que a China é, atualmente, o principal produtor e exportador de pescado, seguido pela Indonésia (FAO, 2016). Segundo o quadro geral dos atuais fluxos comerciais de pescado entre continentes, a América Latina e a região do Caribe constituem uma rede sólida exportadora de pescado, assim como os países da Ásia (FAO, 2016).

Figura 2 - Exportação líquida de commodities agrícolas pelos países em desenvolvimento



Fonte: FAO (2016).

### 2.1.1 Produção brasileira

O Brasil detém a 14<sup>a</sup> maior produção aquícola do mundo, de acordo com a Organização das Nações Unidas para Alimentação e a Agricultura (FAO), situando em um patamar semelhante ao de países com tradição no setor, como Chile, Vietnã e Noruega. A aquicultura brasileira apresentou crescimento de 123% entre 2005 e 2015, passando de 257 mil para 574 mil toneladas de pescado. Esse incremento na produção ocorreu devido à chegada de novas empresas (entrada de empreendimentos privados de maior porte), rápida profissionalização e intensificação tecnológica. As mudanças no padrão de consumo e o aumento da demanda por

pescado no mercado nacional tem sido os principais motivos para esse investimento no setor, que tem registrado taxas de crescimento anuais superiores a 10% no mesmo período (EMBRAPA, 2016).

De acordo com dados coletados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2016), a produção de peixes de água doce é a principal categoria dentro da aquicultura brasileira, respondendo por 84% da produção aquícola do país. A aquicultura marinha responde por apenas 16% da produção total, sendo composta pela carcinicultura (12%) e pela produção de ostras, vieiras e mexilhões (4%). Entre as espécies de peixe, a tilápia (*Oreochromis niloticus*) e o tambaqui (*Colossoma macropomum*) respondem por 62% da produção nacional. E, dentre as espécies mais cultivadas na carcinicultura, o camarão cinza (*Litopenaeus vannamei*) assume o papel de destaque. O camarão cultivado ocupa o 2º lugar da pauta das exportações do setor primário do Nordeste, com um total de produção de 562,5 mil toneladas. Atualmente, o Brasil é o 6º maior produtor de crustáceos no ranking mundial.

O relatório do Estado Mundial da Pesca e Aquicultura (2016) estima que a produção mundial total da pesca (captura mais aquicultura) se expandirá atingindo 196 milhões de toneladas em 2025. Isso significa que o mundo vai produzir 29 milhões de toneladas a mais de pescado do que o período compreendido entre 2013 a 2015 e quase todo esse aumento vai ocorrer nos países do Caribe, América Latina e América do Sul, por meio da aquicultura. Dessa forma, embora os países asiáticos continuem a liderar a produção em âmbito global, a próxima década será caracterizada por um papel crescente dos países em desenvolvimento nas exportações, particularmente o Brasil, que deve registrar um crescimento de 104% na produção, como resultado dos investimentos no setor nos últimos anos. Segundo estudo realizado, o Brasil poderá se converter na quarta potência aquícola mundial e a carcinicultura brasileira também ocupará lugar de destaque no cenário projetado (EMBRAPA, 2016).

## 2.2 TENDÊNCIAS DO MERCADO DA PESCA E GERAÇÃO DE SUBPRODUTOS

O comércio da pesca está se tornando mais complexo, dinâmico e altamente segmentado. As indústrias têm diversificado a forma como os seus produtos são comercializados, com pescados cada vez mais processado na forma de filés e outros coprodutos. Essa tendência foi motivada pela mudança nos padrões de consumo do mercado que está mais exigente e tem procurado os benefícios de uma dieta saudável

aliada à praticidade (CAHÚ, 2014). Hoje em dia, encontra-se uma ampla variedade de produtos preparados a partir de pescado processado: frescos, congelados, empanados, defumados ou enlatados, dependendo do commodity e do valor de mercado.

A tendência para um maior processamento de produtos da pesca dentro da cadeia de abastecimento tem gerado quantidades significativas de produtos secundários, que pode constituir até 80% da produção, dependendo do nível de processamento industrial e tipo de pescado. Estes produtos resultantes, geralmente, não são colocados à venda no mercado devido à baixa aceitação do consumidor ou porque as regulamentações sanitárias restringem seu uso (FAO, 2016). Os subprodutos pesqueiros são constituídos, principalmente, por cabeça, pele, intestino, barbatanas e cauda de peixes, assim como cabeça, carapaça e cauda de crustáceos (CORRÊA et al., 2012).

### 2.3 SUBPRODUTOS PESQUEIROS COMO FONTE DE BIOMOLÉCULAS DE ALTO VALOR AGREGADO

Os subprodutos gerados pelas indústrias de processamento de pescados foram, por muito tempo, considerados de baixo valor e um problema para ser descartado. Entretanto, nas últimas duas décadas, tem havido uma crescente conscientização sobre os aspectos econômicos, sociais e ambientais de seu uso otimizado (MAJETI; KUMAR, 2000; BEZERRA et al., 2005; AZEVEDO et al., 2007; SANTOS et al., 2012; GHALY et al., 2013; SILVA et al., 2014; CAHÚ et al., 2017). Pois, constituem uma rica fonte de biomoléculas de valor agregado (GHALY et al., 2013; BEZERRA, 2015), onde dos subprodutos do processamento de crustáceos podem ser extraídos: proteínas e pigmentos carotenoides para usos na indústria farmacêutica e alimentícia; glicosaminoglicanos com aplicações nos campos de biotecnologia, biomedicina e farmácia (CHAVANTE et al., 2014); e quitina e quitosana que possuem uma variedade de usos, tais como: tratamento da água, cosméticos, alimentos e bebidas, aditivos agrícolas e fármacos (MAJETI; KUMAR, 2000; RINAUDO, 2006; AZEVEDO et al., 2007; CAHÚ et al., 2014; CAHÚ et al., 2017).

### 2.4 QUITOSANA

### 2.4.1 Estrutura, fontes e métodos de obtenção

A quitosana é um heteropolímero pertencente ao grupo dos polissacarídeos. É constituída por unidades repetitivas de um dissacarídeo formado por 2-acetamido-2-desoxi-D-glicopiranoose e 2-amino-2-desoxi-D glicopiranoose (sendo este último encontrado em maior proporção na cadeia polimérica), unidos por ligação glicosídica do tipo  $\beta$  (1 $\rightarrow$ 4) (CAMPANA-FILHO. et al., 2007).

Embora a quitosana possa ser encontrada naturalmente na parede dos fungos dos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes*, sua maior fonte disponível é a partir do processo de desacetilação da quitina, biopolímero abundante na matriz da estrutura esquelética de invertebrados, como artrópodes, anelídeos, moluscos, celenterados, em algas diatomáceas e na parede celular de fungos ascomicetos, zigomicetes, basidiomicetes e deuteromicetos (DAMIAN et al., 2005; SILVA et al., 2006).

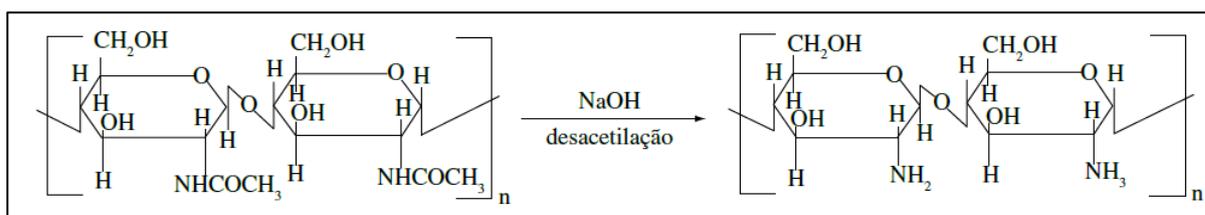
A quitina nativa, tal como ocorre na natureza, é um produto de composição variável quanto ao comprimento das cadeias, conteúdo de unidades de glicosamina acetiladas e desacetiladas, e distribuição dessas unidades ao longo das cadeias. Adicionalmente, também podem ocorrer variações em função da espécie considerada, bem como de seu estágio de desenvolvimento. A única exceção conhecida é a quitina obtida a partir de algas diatomáceas (*Thalassiosira fluviatilis* e *Cytlotella cryptica*). Sendo assim, a quitosana derivada da quitina de diferentes fontes apresentará variações em suas propriedades químicas e estruturais, resultante da estrutura variável da quitina utilizada (RICHARD, 1951; HACKMAN, 1960).

As principais matérias-primas para produção industrial de quitosana são as carapaças de crustáceos originadas do processamento industrial de frutos do mar. As cascas secas de crustáceos possuem cerca de 20 a 30% de quitina, 30- 40% de carbonato de cálcio, 30-50% fosfato de cálcio, além de, em menor proporção, pigmentos de natureza lipídica, como os carotenoides, astaxantina, cantaxantina, luteína e  $\beta$  – caroteno. Dessa forma, para a obtenção de quitosana é necessária a execução de tratamentos químicos sequenciais destinados a eliminar as substâncias que a acompanham, dentre os tratamentos, incluem-se as etapas de desmineralização, despigmentação e, por fim, a desacetilação (CANPANA-FILHO et al., 2007; CAHU et al., 2012; ARANCIBIA et al., 2014).

A Figura 3 ilustra a reação de obtenção da quitosana em solução alcalina, onde os grupamentos acetoamido (-NHCOCH<sub>3</sub>) da quitina são transformados, em graus

variados, em grupos amino ( $-\text{NH}_2$ ), dando origem à quitosana. É importante ressaltar que a completa desacetilação da quitina raramente é realizada, pois, à medida que esta aumenta, a possibilidade de degradação do polímero também aumenta. Assim, o termo quitosana abrange o conjunto de copolímeros que contém ao menos 50-60% de unidades 2-amino-2-desoxi-Dglicopiranosose (ABRAM; HIGUERA, 2004).

Figura 3 - Reação de origem da quitosana a partir da desacetilação da quitina, onde n é o grau de polimerização



Fonte: Spin-Neto (2008).

A presença de grupos amino livres ( $\text{NH}_2$ ) no carbono dois de cada resíduo monomérico da molécula confere a este polímero um comportamento de polieletrólito catiônico ( $\text{pK}_a = 6,5$ ). Em consequência disto, a quitosana é insolúvel em pH neutro, soluções básicas e solventes orgânicos, mas é solúvel na maioria das soluções orgânicas ácidas quando o pH da solução é menor que 6,5. Em meio aquoso ácido, a quitosana tem seus grupos amínicos protonados ( $\text{NH}_3^+$ ), apresentando uma elevada densidade de carga positiva (RODRÍGUEZ-PEDROSO et al., 2009).

#### 2.4.2 Propriedades químicas e biológicas

A quitosana é o único polímero pseudo-natural com caráter catiônico e esta característica diferenciada é responsável pela maioria de suas propriedades relacionadas, tais como, possibilidade de interação com cargas negativas, geralmente presentes na superfície de biomoléculas como proteínas, polissacarídeos aniônicos, ácidos nucleicos e ácidos graxos, justificando sua atividade sobre elas. Sua solubilidade também é influenciada pela presença dos grupamentos amínicos protonados que garante uma maior repulsão eletrostática entre suas cadeias e, assim, maior a solvatação em água, garantindo sua solubilização em soluções aquosas de diversos ácidos orgânicos e inorgânicos (SANTOS et al., 2003).

A quitosana é citocompatível, característica que tem sido evidenciada *in vitro* com células do miocárdio, disfunção endotelial, epitelial, fibroblastos, hepatócitos, condrócitos e queratinócitos. Apesar de estar ausente em mamíferos, a quitosana pode ser degradada *in vivo* por várias proteases, como por exemplo, lisozima, papaína e pepsina. Sua biodegradação leva à liberação de oligossacarídeos atóxicos de comprimento variável, que podem ser posteriormente incorporados à glicosaminoglicanos e glicoproteínas das vias metabólicas ou ser excretado (ARANAZ et al., 2009).

Dentre suas propriedades mais importantes, a sua capacidade quelante merece destaque, visto que promove seletividade à quitosana, ao permitir ligações com moléculas de colesterol, gorduras, proteínas, células tumorais e íons metálicos. De acordo com Goy et al. (2004) e Yen et al. (2008), o mecanismo dessa ação envolve a ligação com o grupo hidroxila no carbono seis e, principalmente, com grupo amino situado no carbono dois da quitosana. Esse grupamento tem sido apontado como responsável pela propriedade antioxidante da quitosana contra diferentes espécies de radicais instáveis, desempenhando importante papel na sua estabilização (ARANAZ et al., 2009; ARANCIBIA et al., 2014).

Helander et al. (2001) e Liu et al. (2001) identificaram mecanismos antimicrobianos da quitosana em estudos realizados com diferentes grupos de microrganismos, tais como bactérias, leveduras e fungos. A formação de uma camada impermeável através da interação com grupos aniônicos na superfície da célula, impedindo o transporte de solutos essenciais para o seu interior, foi um dos mecanismos propostos. O segundo mecanismo envolve a inibição da síntese de RNA e proteínas por permeação no núcleo da célula. A quitosana pode, ainda, inibir o crescimento microbiano, agindo como agente quelante de metais, oligoelementos ou nutrientes essenciais, tornando-os indisponíveis para o organismo, afetando o seu crescimento ou causando um distúrbio mais direto na função da membrana. No entanto, não está claro se essa atividade antimicrobiana é causada pela inibição do crescimento ou morte celular. Chien e Chu (2006) sugeriram que esta capacidade é dependente tanto do tipo de quitosana quanto do microrganismo utilizado.

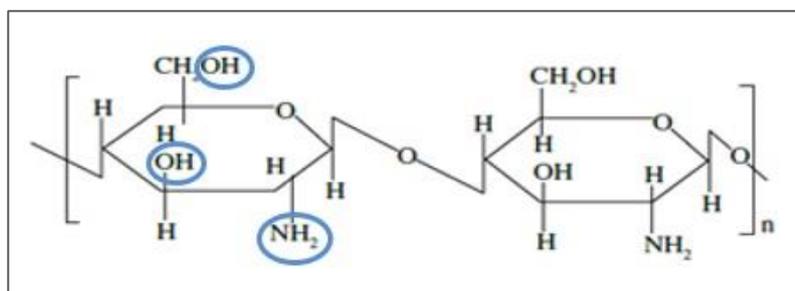
A quitosana se mostra susceptível a mudanças estruturais, devido à grande quantidade de grupos reativos, como as hidroxilas e, principalmente, os grupos amino presentes em sua molécula, possibilitando diversas reações de derivatização química (SANTOS et al., 2003; PRASHANTH; THARANATHAN, 2007).

### 2.4.3 Derivados hidrossolúveis

Embora a quitosana possua propriedades significativas, alguns deméritos limitam seu uso para aplicações específicas, como sua baixa estabilidade acima do pH 6,5. Desde a descoberta da quitosana, há cerca de 160 anos, sempre se acreditou que este polímero fosse insolúvel em meio alcalino. Porém, Muzzarelli et al. (2003), de forma inovadora, conseguiram explorar ainda mais o potencial deste polissacarídeo versátil, a partir de modificações químicas, e desenvolveram derivados solúveis em pH neutro e básico. Dessa forma, foi-lhe conferido maior funcionalidade e melhor solubilidade. Após essa descoberta, Mariappan et al. (1999), Ramesh et al. (2004), Roncal et al. (2007), Kanatt et al. (2008), Zhang et al. (2010) surgiram propondo metodologias de obtenção e otimização de derivados hidrossolúveis de quitosana.

A quitosana apresenta três tipos de grupos funcionais reativos, um grupo amino e dois grupos hidroxila na posição C-2, C-3 e C6, respectivamente (Figura 4) (KANATT et al., 2008).

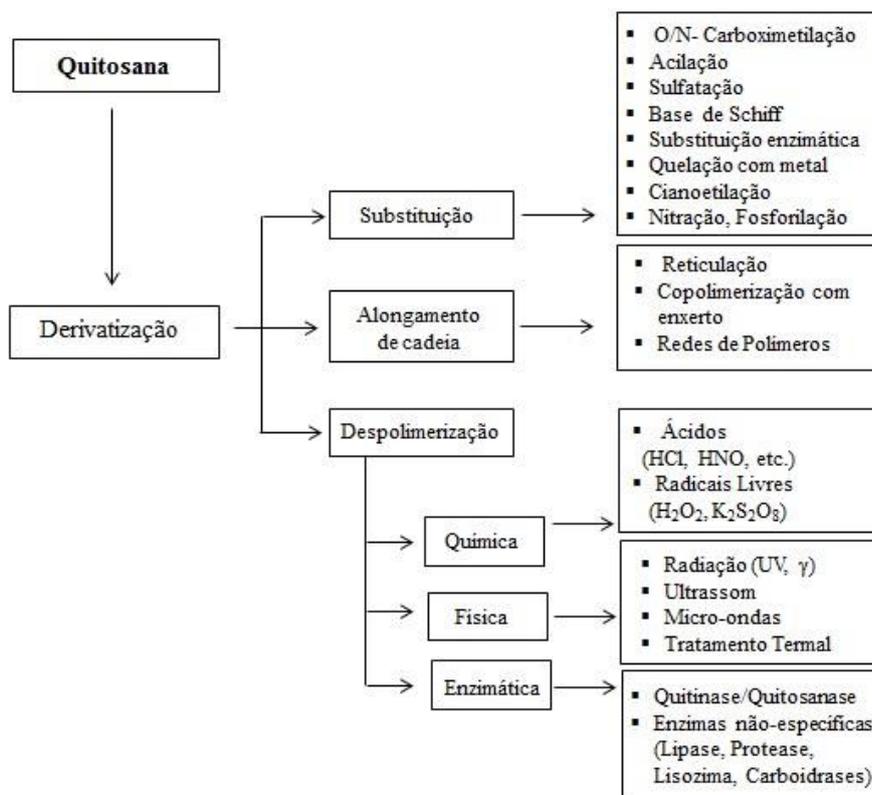
Figura 4 - Grupos funcionais reativos presentes na quitosana



Fonte: Adaptado de Spin-Neto (2008).

A Figura 5 ilustra as possibilidades de modificações químicas possíveis, podendo ser utilizadas na fixação vários grupos funcionais e controle das propriedades hidrofóbicas, catiônicas e aniônicas. Os derivados hidrossolúveis desenvolvidos apresentam um ilimitado potencial de uso para uma grande variedade de aplicações (MOURYA et al., 2008).

Figura 5 - Possibilidades de modificações químicas na estrutura da quitosana



Fonte: Adaptado de Prashanth & Tharanathan (2007).

Dentre os derivados formados por reações de substituição, os sulfatados representam uma família muito importante de derivados de quitosana que demonstram diversas atividades biológicas. Para sulfatação da quitosana, vários reagentes vêm sendo utilizados, os quais incluem o ácido sulfúrico concentrado, sulfúrio, trimetilamina-trióxido de enxofre e dióxido de enxofre, em diferentes temperaturas. A quitosana sulfatada obtida não é sempre monossubstituída, mas muitas vezes N, O-dissubstituídas e também pode ser parcialmente N, O, O-trissubstituídas (KANATT et al., 2008). Este derivado tem demonstrado atividade anticoagulante e hemaglutinante, devido à semelhança estrutural com a heparina. Outras atividades biológicas também têm sido demonstradas, como antiaterosclerótica, antiviral, anti-HIV, antibacteriana, antioxidante e atividades de inibição de enzimas. Na sulfatação da quitosana, alguns dos grupos amino são convertidos nos centros aniônicos e o polímero atinge melhor comportamento de polieletrólito que pode ser focalizado para o desenvolvimento de potenciais

transportadores de drogas na forma de micelas ou microcápsulas (MARIAPPAN et al., 1999; ZHANG et al., 2010).

Outro grupo que tem sido reportado por possuir propriedades vantajosas são os derivados carboximetilados. A quitosana carboximetilada é um derivado de éter anfótero, que contém grupos de COOH e grupos de NH<sub>2</sub> na molécula. Neste derivado, o grupamento hidroxila é substituído por um grupamento carboximetil em cada monômero, através da formação de uma ligação éter. Essas modificações estruturais conferem novas propriedades químicas e físicas para o polímero, tais como estabilidade, viscosidade elevada e comportamento tensoativo. Em comparação com quitosana, este derivado provou ser mais eficiente na perturbação de membrana em condições neutras, ácidas e básicas. As forças responsáveis por esse comportamento são, em condições neutras, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas e, em condições ácidas e básicas, interações eletrostáticas (PRASHANTH; THARANATHAN, 2007)

Dentre as derivatizações de alongamento de cadeia, pode-se citar a interação não enzimática entre quitosana e um açúcar, através da reação de Maillard que resulta da condensação entre o grupo carbonila dos açúcares redutores, aldeídos ou cetonas e um grupo amino de aminoácidos, proteínas ou qualquer composto nitrogenado, proporcionando melhoria nas propriedades funcionais e nos efeitos antimicrobianos das biomoléculas. O grupo amino da quitosana reage com o grupo carbonila de um açúcar redutor em condições de temperatura elevada para formar um produto da reação de Maillard (KANATT et al., 2008). O tipo de açúcar afeta não somente as características do composto gerado, mas também, possivelmente, as propriedades biológicas associadas (PHISUT; JIRAPORN, 2013).

Nas derivatizações de despolimerização, se destacam a obtenção de quitoooligossacarídeos, que são produtos parcialmente hidrolisados da quitosana, resultantes da despolimerização da cadeia pela clivagem nas ligações glicosídicas  $\beta$ -(1→4), no qual pentâmeros e hexâmeros são obtidos e apresentam atividades biológicas importantes. A despolimerização da quitosana aumenta a solubilidade em água e reduz a sua viscosidade em solução, facilitando sua aplicação em diferentes áreas (PRASHANTH; THARANATHAN, 2007). Vários métodos físicos, químicos e enzimáticos têm sido sugeridos para a preparação de oligossacarídeos de quitosana. No método químico, emprega-se a hidrólise ácida, no entanto este método apresenta algumas desvantagens, tais como alto custo, baixo rendimento devido à ausência de

especificidade, gerando uma grande quantidade de monômeros e acidez residual. Outro inconveniente é a necessidade de utilizar altas temperaturas e grandes concentrações de reagentes (RONCAL et al., 2007). A despolimerização também pode ser alcançada de forma eficiente pelo método físico, através da tecnologia de micro-ondas ou através de radiação gama, produzindo oligossacarídeos em menor tempo. No método enzimático, a hidrólise realizada por enzimas permite um maior controle da reação e, conseqüentemente, do grau de polimerização dos oligossacarídeos gerados, sem os inconvenientes apresentados pela hidrólise ácida. Na via enzimática, a quitosana pode ser facilmente despolimerizada por uma variedade de enzimas específicas, como a chitosanases e quitinases, e não específicas, como lisozima, pepsina, pectinase, celulasas, hemicelulasas, lipases, amilases e papaína. Devido ao alto custo das enzimas específicas, as enzimas não-específicas são preferíveis por serem uma opção mais barata, eficiente e economicamente viável do ponto de vista industrial (MOURYA et al., 2008). Em resumo, fica evidente que a quitosana e seus derivados modificados exibem um potencial ilimitado de aplicações para seu uso em grande escala.

#### **2.4.4 Mercado global**

O mercado mundial de quitosana e seus derivados atingiu US\$ 2,0 bilhões em 2016 e, segundo estimativas, alcançará US\$ 4,2 bilhões em 2021, com uma taxa composta anual de crescimento (CAGR) de 15,4% neste período (BCC Research, 2017).

Os principais fatores que impulsionam a indústria de quitosana são a abundante disponibilidade de matéria-prima, fácil processo de produção e as aplicações emergentes em vários segmentos de uso final. As atividades contínuas de pesquisa e desenvolvimento tecnológico (R&D) focadas em encontrar novas aplicações de quitosana, bem como desenvolver a tecnologias existentes, também tem contribuído significativamente para o crescimento do mercado (Chitosan Market, 2017). A quitosana tem ganhado importância nas pesquisas científicas e industriais por se tratar de um polissacarídeo com baixa toxicidade, biocompatível e biodegradável, sendo posicionada como alternativa mais segura, substituindo aos produtos convencionalmente utilizados, como os químicos nocivos e derivados do petróleo (Research and Markets, 2017).

A crescente conscientização a respeito da saúde e práticas sustentáveis impulsionará ainda mais o mercado de quitosana nos próximos anos. Prevê-se que o mesmo atinja preços superiores ao longo do prazo estimado, o que provavelmente aumentará as margens de lucro para os diferentes setores da indústria (BCC Research, 2017). Os principais setores que fazem parte do mercado de quitosana são: farmacêutico, biomédico, cosmético, alimentos e bebidas e tratamento de água. Embora outros, com menor expressão, também façam parte, como: construção civil, agricultura, produtos fotográficos, têxteis, oftalmológicos e biocombustíveis (Chitosan Market, 2017; Market Research Report, 2017, BCC Research, 2017).

O mercado mundial da quitosana é liderado pelos países da região Ásia-Pacífico, especialmente o Japão, China, Índia e Tailândia. Juntos, detêm mais da metade da participação em termos de valor e volume. A conscientização precoce sobre os benefícios oferecidos pela quitosana, aliado à presença de abundante matéria-prima e fortes investimentos pelos países participantes, contribuíram para seu domínio no mercado. Este grupo engloba os principais fabricantes de quitosana, bem como os maiores consumidores que a empregam, essencialmente, no tratamento de água da região (Market Research Report, 2017).

A rápida industrialização acompanhada da crescente urbanização impulsiona a demanda de água limpa e propulsiona o mercado de quitosana para aplicação no tratamento de água, segmento que representou mais de 30% do consumo global em 2015 (Global Market Insights, Inc., 2016). No tratamento de efluentes, tem sido registrado seu emprego, como: agente quelante de metais, como floculantes, como adsorventes de corantes, adsorventes de ânions metálicos e outros (SALAH et al., 2013; PITAKPOOLSIL; HUNSON, 2014).

A busca por melhor qualidade de vida, juntamente com a mudança dos hábitos alimentares, que tem ocorrido principalmente nos EUA, tem impulsionado o crescimento da indústria por questões de saúde nos setores alimentício, farmacêutico e biomédico (Global Market Insights, Inc. set, 2016; Market Research Store, 2016). Na indústria de alimentos, a quitosana tem sido empregada como aditivo alimentar, em nutrição animal e embalagem biodegradável para alimentos (ARANAZ et al., 2009; QIN et al., 2012; SANTOS et al., 2012); no setor biomédico, em membranas artificiais e suturas cirúrgicas; e na indústria farmacêutica, como agente cicatrizante, liberação controlada de drogas e controle de colesterol (ISLAM et al., 2014; SANSONE et al., 2014).

O uso de quitosana na fabricação de cosméticos é um outro segmento em expansão, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento, e tem estimulado o desenvolvimento de diversos produtos de beleza para atender às necessidades do mercado, como: maquiagem, cremes antienvhecimento, loções para cuidados do cabelo, pele, unhas. O aumento do uso destes produtos influenciará positivamente o mercado de quitosana (Global Market Insights, Inc. set, 2016; Market Research Report, 2017). Na Figura 6, é possível observar as trinta empresas que mais fazem uso de quitosana na fabricação de produtos atualmente no mercado.

Figura 6- Empresas multinacionais detentoras de patentes de uso de quitosana para a fabricação de seus produtos

 3,706	 1,764	 1,736	 1,728	 1,153
 1,117	 917	 916	 819	 815
 801	 785	 737	 720	 672
 667	 653	 601	 595	 576
 571	 560	 556	 532	 531
 518	 430	 402	 395	 384

Fonte: Lens.org (2017).

Qualquer que seja o campo de aplicação, este polímero tem potencial para apresentar uma melhor relação custo/benefício do que seus similares, atualmente no mercado, obtidos de outras fontes, e, na maioria das vezes, produzidos com tecnologia importada. Apesar de anos de estudos e pesquisas, ainda existem áreas onde a quitosana e seus derivados podem suprir necessidades e contribuir significativamente com avanços, como no campo das biotecnologias aplicadas à reprodução, particularmente na criopreservação do sêmen.

## 2.5 BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO

### 2.5.1 Criopreservação do sêmen

Para o sucesso da fertilização é necessário a disponibilidade de gametas viáveis e funcionalmente normais, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Neste contexto, as técnicas de preservação de sêmen tornaram-se essenciais para a aplicação das técnicas de reprodução, como: inseminação artificial, fertilização *in vitro* e engenharia genética, uma vez que promovem a funcionalidade do germoplasma masculino, por um tempo prolongado, fora do trato reprodutivo masculino (PARKS, 1985; HOLT, 2000).

As primeiras constatações de preservação de sêmen foram realizadas por Spallazani em 1776, ao observar que o resfriamento de espermatozoides os tornou temporariamente imobilizados e induzidos a um estado de letargia, do qual eles poderiam se recuperar assim que retornassem à condição de temperatura adequada. Dessa forma, esse pesquisador concluiu que a diminuição da temperatura causa redução reversível da atividade metabólica destas células, permitindo seu armazenamento e manutenção de sua viabilidade. Ao restringir a taxa metabólica das células, a produção de subprodutos metabólicos tóxicos, tais como peróxido de hidrogênio, aldeídos lipídicos e dióxido de carbono, são reduzidos e a depleção de ATP associada à manutenção de homeostase é minimizada (HAMMERSTEDT, 1993; VISHWANATH; SHANNON, 1997; MAIA, 2010).

Com o advento e comercialização da inseminação artificial no início do século XX, tem havido uma necessidade de reduzir as dificuldades logísticas associadas com a coordenação da coleta de sêmen e inseminação. Esta necessidade foi satisfeita por meio do desenvolvimento de várias abordagens para prolongar a longevidade dos

espermatozoides através da diluição do sêmen e da restrição metabólica induzida pela temperatura. Estas estratégias forneceram aos criadores uma ferramenta valiosa para o melhoramento genético de muitas espécies (GIBB et al., 2016).

Os efeitos da baixa temperatura na função espermática e na fertilidade têm sido estudados extensivamente em muitas espécies, como por exemplo, bovinos (LEITE et al., 2011), bubalinos (DHAMI et al., 1996; OHASHI, 2002; LAYEK et al., 2016), ovinos (BAG et al., 2002); caprinos (VIDAL et al., 2013; BITTENCOURT et al., 2007), equinos (FÜRST, 2006; AURICH, 2008; GIBB et al., 2016) , suínos (OHATA et al., 2001; ANTUNES, 2007; SILVA et al., 2013), caninos (SILVA et al., 2002; JAROSZ et al., 2016), aves (MOSCA et al., 2016; BUBLAT et al., 2017), peixes (SALMITO-VANDERLEY et al., 2014) e em seres humanos (SAEEDNIA et al., 2016; TIWARI et al., 2017).

O sêmen pode ser conservado através do procedimento de refrigeração, estocagem no estado líquido, em geral a temperaturas entre 0-5 °C ou 10-15 °C, para utilização em um curto período de tempo (SALAMON e MAXWELL, 2000); ou congelamento, estocagem no estado sólido, que ocorre a -196 °C em nitrogênio líquido, para utilizações que requerem um período mais prolongado, ou tempo indeterminado (NUNES, 1988). Por meio destas técnicas, torna-se possível: 1) formar bancos de gametas e embriões (Biobanco), a fim de garantir a diversidade e a preservação do material genético de espécies de interesse econômico e ambiental, bem como em programas de conservação de espécies ameaçadas de extinção (COMIZZOLI; HOLT, 2014; JEWGENOW et al., 2016; BUBLAT et al., 2017; COMIZZOLI, 2017); 2) transportar material genético através de longas distâncias, com baixo custo e maior segurança, preservando a integridade física do animal e evitando o risco de propagação de doenças, através da erradicação do contato direto entre macho e fêmea (CARNEIRO et al., 2012; GIBB et al., 2016); 3) permitir o uso do volume total do sêmen disponível, quesito importante principalmente quando o sêmen é de difícil obtenção e quando grandes quantidades de sêmen são retiradas em cativeiro; 4) disponibilizar sêmen em períodos menos favoráveis; 5) viabilizar programas de hibridização com espécies que apresentam diferentes estações reprodutivas no ano (VARAGO et al., 2009); e 6) promover o melhoramento genético (LIERZ et al., 2013; GELAYENEW et al., 2016; LAYEK et al., 2016).

Embora o processo de congelamento de sêmen apresente a vantagem de armazenamento dos gametas por longo período, ainda existem inconvenientes nesse

processo, devido a lesões às estruturas espermáticas, que comprometem a viabilidade dos gametas (VARAGO et al., 2009). A refrigeração, apesar de não permitir o armazenamento por um período de tempo tão prolongado, determina menos danos às células espermáticas, quando comparados à congelação, resultando em taxas mais elevadas de prenhez (MAIA, 2010).

O espermatozoide apresenta uma diversidade de atributos funcionais altamente diferenciados regionalmente, que devem ser mantidos até a fertilização. Por essa razão, a criopreservação ideal deve manter o maior número possível de células viáveis, bem como a integridade das suas diferentes estruturas (WATSON, 2000). Entretanto, as tecnologias atuais de processamento do sêmen carecem de aperfeiçoamentos, uma vez que os protocolos aplicados afetam a estrutura, a funcionalidade e a resistência dos espermatozoides (GÓMEZ-TORRES et al., 2017). Os procedimentos empregados ainda são, frequentemente, oxidativos por natureza, por envolver etapas e condições atípicas às células espermáticas, como variações de temperatura, pressão, luz, substâncias químicas, bioquímicas e concentração celular (BARROS, 2007; MAIA; BICUDO, 2009; SOARES; GUERRA, 2009; LEAHY et al., 2010; CÂMARA; GUERRA, 2011).

A geração controlada das ROS desempenha funções fisiológicas importantes nos diferentes tipos de células. Nos espermatozoides participa da regulação da taxa de hiperativação, da ocorrência da reação acrossômica e da fusão entre o espermatozoide e oócito (SENGOKU et al., 1998; NICHI, 2003). Contudo, elevadas concentrações de ROS são prejudiciais às funções celulares, podendo danificar todos os tipos de biomoléculas, incluindo DNA, proteínas e lipídeos (HALLIWELL; GUTERIDGE, 2015).

O espermatozoide e o plasma seminal apresentam sistemas de defesa antioxidantes que desempenham papel primordial na viabilidade espermática. Entretanto, durante o processamento, quando o sêmen é lavado ou diluído para a criopreservação, ocorre uma redução nas suas quantidades de defesas antioxidantes (CÂMARA; GUERRA, 2011). Em contrapartida, o próprio metabolismo dos espermatozoides, quando em altas concentrações espermáticas nas doses de sêmen, gera uma grande quantidade de ROS. Distúrbios no balanço oxidante-antioxidante levam ao estresse oxidativo, que pode ser causado por uma redução na quantidade de antioxidantes nos sistemas de defesa celular ou por uma produção elevada de ROS (HALLIWELL; GUTERIDGE, 2015). Esses fatores causam danos às células

espermáticas que já apresentam baixas concentrações de enzimas antioxidantes, uma vez que seu citoplasma é bastante reduzido (NICHII, 2003; BARROS, 2007; SOARES; GUERRA, 2009; LEAHY et al., 2010).

O processo de peroxidação lipídica inicia-se na presença de ROS, que ao ter contato com os ácidos decosa-hexanoicos da membrana espermática, retiram um hidrogênio de uma dupla ligação, transformando-o em radical livre, o qual, por sua vez, irá agir em outro ácido decosa-hexanoico. Esse processo desencadeia a cascata de peroxidação, causando lesões na membrana plasmática, com perda de fluidez e de sua capacidade de regular a concentração intracelular de íons envolvidos no controle do movimento espermático e, por fim, perda da sua função de fertilização (MAIA; BICUDO, 2009). A membrana do espermatozoide é altamente susceptível à essa reação, em função grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados em sua constituição, os quais são extremamente sensíveis ao ataque das ROS (AURICH et al., 1997; BARROS, 2007).

No intuito de reduzir os danos causados aos espermatozoides pela formação das ROS, diversos estudos vêm sendo realizados avaliando o efeito da administração oral de antioxidantes ou da inclusão dessas substâncias aos diluentes utilizados no sêmen de várias espécies. Os resultados obtidos até o momento são diversos, contraditórios e, alguns, decepcionantes (GIBB et al., 2016). No entanto, é notória a necessidade da realização de mais estudos, a fim de se obter resultados satisfatórios quanto à preservação e manutenção da viabilidade das células espermáticas até o momento de sua deposição no trato reprodutivo da fêmea e para que esta biotécnica reprodutiva possa ser aprimorada (GUERRA et al., 2004; SILVA; GUERRA, 2012)

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 PRODUÇÃO DE QUITOSANAS HIDROSSOLÚVEIS A PARTIR DE SUBPRODUTOS DA INDÚSTRIA PESQUEIRA

Cabeças de camarão fresco foram gentilmente cedidas por uma unidade local de processamento de pescado (Netuno Ldt., Pernambuco, Brasil) e levadas imediatamente para laboratório em gelo e congeladas a -20 °C até utilização. A metodologia para obtenção e purificação de quitosana foi realizada de acordo com o método de Cahú et al. (2012). Em seguida, a amostra foi liofilizada para se obter um pó branco fino. A preparação dos derivados hidrossolúveis, foram realizadas diferentes reações de modificação química: quitosana sulfata foi preparada de acordo com Mariappan et al. (1999), quitosana Carboximetilada, conforme relatado por Ramesh et al. (2004), quitooligossacarídeos foram obtidos por hidrólise enzimática com pepsina gástrica suína, de acordo com Roncal et al. (2007) e quitosana-glicose (CHGlc) e quitosana-glucosamina (CHGlcN), produto de reação de Maillard, foram preparadas com base no método de Kanatt et al. (2008).

A caracterização das amostras produzidas foi realizada em um analisador elementar Carlo Erba EA 1110 para C, H, N e S. O grau de substituição dos grupos químicos adicionados foi calculado pelos métodos de Moura Neto et al. (2011), utilizando %C e % S e massa atômica de carbono e enxofre para calcular o número de grupos sulfato no monômero hexose, utilizando assim a fórmula Grau de sulfatação (DS%) =  $2,55 (\% S / \% C)$ . Espectros de Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR) foram medidos em pastilhas de KBr em modo de transmissão dentro de uma faixa de 4000 a 500 cm<sup>-1</sup> usando um espectrofotômetro FT-IR Bomem MB100. O grau de desacetilação (DD%) foi calculado com base na relação A1320 / A1420 relatada por Brugnerotto et al. (2001):  $DD\% = 100 - [(A1320 / A1420 - 0,3822) / 0,03133]$ . Os espectros de C<sup>13</sup> e H<sup>1</sup> RMN foram obtidos utilizando um espectro Bruker Avance DRX-400 com uma sonda inversa de 5 mm. As aquisições de C<sup>13</sup>-RMN foram realizadas utilizando os seguintes parâmetros: FIDRES - 0,8466 Hz, AQ - 0,5906 s, DW 15,75 s, DE - 5,5 µs D1 - 110 mseg, D2 - 3,4 mseg, PL12 - 17dB (desacoplador H<sup>1</sup>), valsa 16 pulsos programa.

### 3.2 TESTE DE CITOTOXICIDADE

A atividade citotóxica foi realizada através do método do MTT brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazólio (ALLEY et al., 1988; MOSMANN, 1983). As linhagens de células tumorais humanas utilizadas foram HEP-2 (carcinoma de laringe humana) e NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano) mantidas em meio de cultura DMEM, MCF-7 (câncer de mama humano) e HL-60 (leucemia promielocítica aguda) mantidas em meio de cultura RPMI 1640. Os meios foram suplementados com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO<sub>2</sub>. O fármaco doxorrubicina (5 µg/mL) foi utilizada como padrão.

### 3.3 TESTES ANTIOXIDANTES

A atividade de sequestro do radical 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH) foi realizada conforme Blois et al. (1958). A atividade de sequestro do radical foi mensurada utilizando a seguinte equação: inibição do DPPH (%) =  $[1 - (\text{amostra} - \text{branco}) / \text{controle}] * 100$ , onde o branco foi a amostra misturada com metanol e o controle, a solução DPPH sem amostra. BHT foi usado como controle positivo. A atividade quelante de íons ferrosos foi determinada de acordo com a metodologia de Decker e Welch et al. (1990) com modificações. A atividade quelante quitosana foi expressa pela seguinte equação: Atividade Quelante (%) =  $[1 - (\text{amostra}/\text{controle})] * 100$ . O EDTA foi usado como controle positivo. O ensaio de poder redutor foi realizado como descrito por Zhu et al. (2002) com modificações. O hidroxitolueno butilado (BHT) foi usado como controle positivo.

### 3.4 TESTE ANTIBACTERIANO

Os efeitos inibitórios e bactericidas das quitosana produzidas foram determinados pelo método de concentração mínima inibitória (CMI), que é a concentração mínima de amostra capaz de inibir o crescimento bacteriano visível, e de concentração mínima bactericida (CMB), que corresponde à concentração mínima de amostra que inibe 100% do crescimento bacteriano. Cepas de *Staphylococcus*

*aureus* (UFPEDA 02), *Bacillus subtilis* (ATCC 19659), *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Salmonella enteritidis* (UFPEDA 41), *Vibrio Parahaemolyticus* (ATCC 17802), *Shigella sonnei* (UFPEDA 413) e *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396) foram fornecidas pelo Departamento de Antibióticos (DA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brasil, em Ágar Nutriente. Todas as estirpes bacterianas foram cultivadas e mantidas em ágar Mueller-Hinton a 37 °C. As bactérias foram cultivadas em caldo Mueller-Hinton e a turbidez foi, posteriormente, ajustada com NaCl (0,9% m/v) para obter o equivalente a 0,5 na escala de McFarland. A CMI foi determinada pelo teste de microdiluição de cultura bacteriana em caldo Mueller-Hinton (NCCLS, 2006). Os antibióticos cloranfenicol e canamicina foram utilizados como controle positivo para as cepas Gram-negativas e Gram-positivas, respectivamente. Para a determinação do CMB, as amostras que apresentaram inibição bacteriana foram semeadas em placas de ágar Mueller-Hinton e incubadas a 37 °C por 24 h. Os ensaios foram realizados com quatro repetições.

### 3.5 TESTE EM SÊMEN

Foram utilizados sêmen de quatro ovinos da raça Santa Inês, sexualmente maduros, com histórico de fertilidade, alojados no biotério do Hospital Veterinário da UFRPE (Brasil) (08 ± 03'14" S, 34 ° 52' 52" W), submetidos a manejo intensivo, alimentados com feno de capim Tifton e 400g/dia de ração comercial, além de suplementação mineral e água *ad libitum*. A cinética dos espermatozoides foi avaliada através do Sistema Computadorizado de Análise de Esperma (CASA, SCA™, Microptics, SL, Versão 5.1, Barcelona, Espanha). As análises de integridade de membrana, viabilidade e estabilidade espermática foram realizadas utilizando citômetro AmnisImageStream®x Mark II (EMD Millipore Corp., Seattle, Washington) equipado com um microscópio com a objetiva de 60 x (0,5 µm resolução pixel) com uma taxa de imagem de 5000 células/s. O Software INSPIRE® foi utilizado para aquisição de imagens brutas e o software IDEAS® 6.0, para análise das imagens. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Processo nº23082.026480//2017-28 CEUA-UFRPE).

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações estatísticas dos valores das médias foram avaliadas por análise de variância (ANOVA), utilizando o Origin (versão 8; GraphPad Software Inc., San Diego, E.U.A.) e um valor de  $P < 0,05$  foi considerado como o nível de significância estatística.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 WATER-SOLUBLE CHITOSAN DERIVATES FROM *LITOPENAEUS*

#### *VANNAMEI*: CYTOTOXIC, ANTIOXIDANT AND ANTIBACTERIAL ACTIVITIES

Raquel P. F. da Silva<sup>a</sup>; Thiago B. Cahú<sup>a</sup>; Suzan D. Santos<sup>a</sup>; Romero M. P. B. Costa<sup>a</sup>; Guilherme O. Firmino<sup>a</sup>; Teresinha G. da Silva<sup>b</sup> e Ranilson S. Bezerra<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Biochemistry, Centre of Biosciences, Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Professor Moraes Rego, 1235, Recife, PE 50670-901, Brazil

<sup>b</sup> Department of Antibiotics, Centre of Biosciences, Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Professor Moraes Rego, 1235, Recife, PE 50670-901, Brazil

#### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the biological potential of water-soluble chitosan derivatives obtained from *Litopenaeus vannamei* shrimp processing wastes (head) using enzyme autolysis technique. Biological properties were studied through cytotoxicity, antioxidant and antimicrobial activities. Chitosan water-soluble derivatives were achieved by derivatization method to obtain carboxymethyl chitosan, chitosan sulfate, carboxymethyl chitosan sulfate, chitosan-glucose, chitosan-glicosamina and chitoligosaccharides. Chitosan's obtained did not show cytotoxicity. Chitosan and their water-soluble derivatives exhibited DPPH scavenging ability of 44.93-100%, showed reducing powers of 0.17-1.32, chelating abilities on ferrous ions were 5.1- 90.12% at 10mg/mL and inhibitory activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. These results indicated water-soluble chitosan derivatives obtained from by-products of shellfish processing exhibits interesting functional properties and may be considered as an alternative ingredient or supplement in the food, biomedical, pharmaceutical and biotechnological approaches.

Keywords: Shrimp processing waste; Chitosan; Antioxidant; Antimicrobial.

#### Introduction

Global fish production has grown expressively in recent years, especially for aquaculture, which contributed greatly to the increase in the global supply of fishery products (FAO, 2016).

Shrimp farming, is an aquaculture modality that occupies a noticeable place in the global fishery economy, representing approximately 4.5 % of world aquaculture, with an estimated 4.8 million production. The growth of the fish market around the world together with greater diversification of processed products in order to satisfy the demand of consumers increasing needs, have contributed to the generation of an increasing volume of waste from fish processing industries (FAO, 2016).

However, in recent decades there has been a global trend in the awareness of economic, social and environmental aspects toward the recovery and utilization of fishery by-products (CORRÊA et al, 2012; MEDEIROS et al., 2015; BHAGWAT; DANDGE, 2016).

The by-products generated by shrimp processing are mainly, head, tail and exoskeleton, representing about 50% of total shrimp processed, this material is rich in different biomolecules: chitin which is about 20-30% of the solid residue; carbonate and calcium phosphate that represent approximately 50%, in addition to lipid pigments such as carotenoids, astaxanthin, canthaxanthin, lutein and  $\beta$ -carotene, as a smaller amount, composing the remaining portion together with proteins. Despite, these percentages vary according to the species, fishing location and season, it is rich in bioactive molecules with a wide potential biotechnology applicability (CAHÚ et al, 2012; BOUGATEF, 2013).

Among these biomolecules, chitin, has received considerable attention in recent years since it is a molecule which is used to obtain chitosan, another polysaccharide that has several properties, such as increased solubility and bioactivity relative to chitin, as well as low toxicity, biodegradability, biocompatibility, antimicrobial and antioxidant capacity allowing its use in various commercial applications in biomedical, food, pharmaceutical and industrial chemistry (OCLOO et al., 2011; SAMAR et al., 2013; CAHÚ et al., 2017). However, most applications of chitosan are limited due to its insolubility in water at neutral medium, a condition in which enzymes exert their physiological activity. To solve this problem and to further explore the potential of this versatile polysaccharide, several studies have emerged proposing methodologies for obtaining and optimization water-soluble chitosan derivatives, allowing a significant

increase in applications of this polymer ( RONCAL et al., 2007; KANATT et al., 2008; ZHANG et al., 2010).

Several studies have reported the development of different water-soluble derivatives from commercial chitosan (MUZZARELLI; MUZZARELLI., 2005; SUN et al, 2008; SOUZA et al, 2009.; ZHONG et al, 2010; CHO et al, 2011). However, few data are found in literature about its potential when obtained from residual sources, aimed in our work. Therefore, this study is justified by its biotechnological, environmental and economic importance, due to, obtaining water-soluble chitosan derivatives from shrimp by-products of industry (an abundant and inexpensive materials), has low toxicity, antioxidant and antimicrobial potential, while it minimize the environmental impact, resulting in a new, high added value for various biotechnological product.

## **Materials and methods**

### Chemicals

1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl (DPPH), Potassium persulfate and 3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-*p,p'*-disulfonic acid monosodium salt hydrate (ferrozine), hydroxytoluene (BHT), trimethylamine–sulfur trioxide, monochloroacetic acid, pepsin from gastric porcine, Chloramphenicol, Kanamycin, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) were purchased from Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and RPMI culture medium, containing antibiotics and fetal bovine serum was purchased from Gibco/Invitrogen (Gaithersburg, EUA). Other reagents used in this study were commercially available. All reagents used were in analytical grade.

### Production of chitosan from shrimp processing waste

Raw material (fresh shrimp heads) were kindly donated by a local fishery processing industry (Netuno Ltd., Pernambuco, Brazil), and immediately take to laboratory on ice, laced in 0.5 kg amounts in plastic bags and frozen at -20°C until use. The methodology to extract chitin and produce chitosan was performed according to Cahú et al.(2012) and purified as carried out by Weska et al. (2007). Chitosan was freeze dried to obtain a fine white powder.

## Preparation of water-soluble chitosan derivatives

Chitosan sulfate (CHS) was prepared according by Mariappan et al. (1999) with slightly modifications: chitosan (0.5%, w/v) was suspended in distilled water under magnetic stirring, added sodium carbonate (1%, w/v) and sulfur trioxide trimethylamine complex (2.25%, w/v). The mixture was incubated at 65°C for 48 h under constant stirring. Carboxymethyl chitosan (CHCM) was prepared as reported by Ramesh et al. (2004) with slight modification: chitosan (1%, w/v) suspension in 20 mL of isopropanol was stirred for 20 min and then added of 50 mL (40%, w/v) NaOH and stirred for additional 45 min. Followed, monochloroacetic acid (2.5 g) was slowly added and the mixture was kept at 60°C for 3 h under constantly agitation. The solution after cooled and pH adjusted to 7.0 with acetic acid, was washed with methanol and dried at 50°C.

The Maillard reaction product (MRP), chitosan-glucose (CHGlc) and chitosan-glucosamine (CHGlcN), was prepared based on method by Kanatt et al. (2008), by autoclaving chitosan (1%, w/v) and sugar (1%, w/v) for 15 min.

Chitoligosaccharides (COS) were obtained by enzymatic hydrolysis with pepsin from gastric porcine, according to Roncal *et al.*, (2007) with slightly modifications. Briefly, chitosan (1%, w/v) in 0.2 M sodium acetate buffer pH 4.5 and pepsin were incubated (1:100) in a water bath at 40°C for 20h. After this, pH was adjusted to 7.0 with 1 M NaOH and the reaction was boiled for 10 min to inactivate the enzyme and centrifuged. The supernatant was freeze dried and resuspended with methanol, and then precipitated and washed with acetone, and finally dried under vacuum.

## Characterization by Elemental analysis, Fourier Transform Infra-Red spectroscopy, $^1\text{H}$ and $^{13}\text{C}$ Nuclear Magnetic Resonance

Elemental composition of chitosan samples was performed in a Carlo Erba EA 1110 elemental analyzer for C, H, N, and S. The degree of substitution was calculated by methods of Moura Neto et al. (2011), using %C and %S and atomic mass of carbon and sulfur to calculate the number of sulfate groups in hexose monomer, thus using the formula Degree of sulfation (DS%)=2.55(%S/%C).

FT-IR spectra were measured in KBr pellets in transmission mode within a range of 4000–500  $\text{cm}^{-1}$  using an FT-IR Bomem MB100 spectrophotometer. The

degree of deacetylation (DD%) was calculated based on the ratio  $A_{1320}/A_{1420}$  reported by Brugnerotto et al (2001):  $DD\% = 100 - [(A_{1320}/A_{1420} - 0.3822)/0.03133]$ .

Decoupled  $^{13}\text{C}$  and  $^1\text{H}$  NMR spectra were obtained using a Bruker Avance DRX-400 spectrometer with a 5mm inverse probe.  $^{13}\text{C}$ -NMR acquisitions were performed using the following parameters: FIDRES- 0.8466 Hz, AQ- 0.5906 s, DW 15.75 s, DE- 5.5  $\mu\text{s}$  D1- 110 msec, D2- 3.4 msec, PL12-17dB (decoupler  $^1\text{H}$ ), waltz 16 pulse program.

### Cytotoxicity assay

The human tumor cell lines, HEp -2 (human larynx carcinoma), NCI- H292 (human pulmonary mucoepidermoid carcinoma), MCF-7 (human breast adenocarcinoma cell line) and HL -60 (acute promyelocytic leukemia), were obtained from the Type Culture Collection of the Department of Antibiotics (DA) of the Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil. The HEp -2 and NCI- H292 cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) and MCF-7 and HL -60, maintained in RPMI culture medium, both supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and 1% antibiotic solution (penicillin and streptomycin). The cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere (5%  $\text{CO}_2$ ).

The cytotoxicity of chitosan samples was measured using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (ALLEY et al, 1988; MOSMANN, 1983). The cells were grown in 96-well plates at a density of  $1 \times 10^5$  and  $0.3 \times 10^6$  cells/well, for HEp -2, MCF-7 and NCI- H292 cells, and HL-60 cell, respectively. After 24 h, the cells were treated with control medium or medium supplemented with chitosan (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). After incubation for 72 h, was added 25  $\mu\text{L}$  of MTT. The cells were then fixed with 50% trichloroacetic acid. Cell proliferation was determined by spectrophotometric quantification at 560 nm. The Doxorubicin chloridate compound (0.025 to 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), a drug widely used in chemotherapy for cancer, was used as a positive control.

### Antioxidant activities

DPPH scavenging activity was performed as Blois et al. (1958). 100  $\mu\text{L}$  of each chitosan sample (0.08–10  $\text{mg}/\text{mL}$ ) in distilled water were mixed with 100  $\mu\text{L}$  of

methanolic solution containing DPPH radicals ( $1.5 \times 10^{-4}$  M). This mixture was kept in the dark at room temperature for 30 minutes and the absorbances were determined by spectrophotometric quantification at 517 nm. The radical scavenging activity was measured using the following equation: DPPH inhibition (%) =  $[1 - (A_{\text{sample}} - A_{\text{blank}}) / A_{\text{control}}] \times 100$ . Where the blank was the sample mixed with methanol and the control was the DPPH solution without sample. BHT was used as positive control.

The  $\text{Fe}^{2+}$  ion chelant activity was determined by Decker and Welch et al. (1990) with modifications. 100  $\mu\text{L}$  of samples, at different concentrations (0.08-10mg/m), were mixed to 100  $\mu\text{L}$  of distilled water. Then 25  $\mu\text{L}$  of 0.5 mmol/L  $\text{FeCl}_2$  solution and 25  $\mu\text{L}$  of 2.5 mmol/L ferrozine solution were added. This mixture was kept at room temperature for 20 minutes and the absorbance was determined at 550 nm. Distilled water was used as control. The chitosan chelant activity was expressed by the following equation: Chelant Activity (%) =  $[1 - (A_{\text{sample}} / A_{\text{control}})] \times 100$ . All tests were performed antioxidants at concentrations of 0.08–10.0 mg/mL. EDTA was used as positive control.

Reducing power assay was made as described by Zhu et al. (2002) with modifications. Two hundred microliters of the samples, at different concentrations (0.08-10mg/m) were mixed to 200  $\mu\text{L}$  of 0.2M phosphate buffer (pH 6.6) and 200  $\mu\text{L}$  of potassium ferricyanide. This mixture was incubated at 50°C by 20 minutes and the reaction was stopped adding 200  $\mu\text{L}$  of a 10% TCA solution. Further, 125  $\mu\text{L}$  of these samples were mixed with 125  $\mu\text{L}$  of distilled water in a microplate and 20  $\mu\text{L}$  of  $\text{FeCl}_3$  was added to each well. The reducing power was observed by an increase in absorbance at 655 nm. BHT was used as positive control.

#### Assays for antibacterial activity

Bacteria provided by the Department of Antibiotics (DA) of the Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil, in Difco™ Nutrient Agar (NA) were used to determine the antibacterial activity of chitosan and six water-soluble derivatives. Strains of two Gram-positive bacteria: *Staphylococcus aureus* (UFPEDA 02) and *Bacillus subtilis* (ATCC 19659) and six Gram-negative bacteria: *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA 416), *Escherichia coli* (UFPEDA 224), *Salmonella enteritidis* (UFPEDA 41), *Vibrio parahaemolyticus* (ATCC 17802), *Shigella sonnei* (UFPEDA 413) and *Klebsiella pneumoniae* (UFPEDA 396) were used for evaluate inhibitory and

bactericidal effects. All of the bacterial strains were grown and maintained on Mueller-Hinton agar at 37 °C. The bacteria were subcultured overnight in Mueller-Hinton broth which was further adjusted in NaCl (0.9% w/v) to obtain turbidity equivalent to 0.5 in the McFarland scale, when required. The minimum inhibitory concentration (MIC) which is the minimum sample concentration able to inhibit visible bacterial growth was determined by microdilution teste of cultered bacteria in Mueller-Hinton broth (NCCLS, 2006). Accordingly, water-soluble chitosan derivates were dissolved in distilled water and chitosan, in 1% (v/v) latic acid, for each substance were added to Mueller-Hinton broth for final concentrations of 20–0,020 mg/ml. 10 $\mu$ L of suspension of test organisms (10<sup>6</sup> organisms per ml), (0.01 ml) was added to each Mueller-Hinton broth dilution. The antibiotic chloramphenicol and kanamycin were used as positive control for strains of Gram-negative and Gram-positive bacteria, respectively. After 24 hours of incubation at 37 °C, was added 15 $\mu$ l of resazurin, microbial growth developer dye, to estimated inhibition effect after 4 hours, through the change of color of the dye added. Afterwards, cultures that showed inhibition were seeded onto Mueller-Hinton agar plates and incubated at 37°C for 24 h. The minimum bactericidal concentration (MBC) corresponded to the minimum concentration of the sample that inhibited 100% growth. Assays were performed with four replicates.

### Statistical analysis

Statistical comparisons of the means values were evaluated by analysis of variance (ANOVA), using the Origin (version 8; GraphPad Software Inc., San Diego, U.S.A.) and a *P* value of <0.05 was considered as the level of statistical significance.

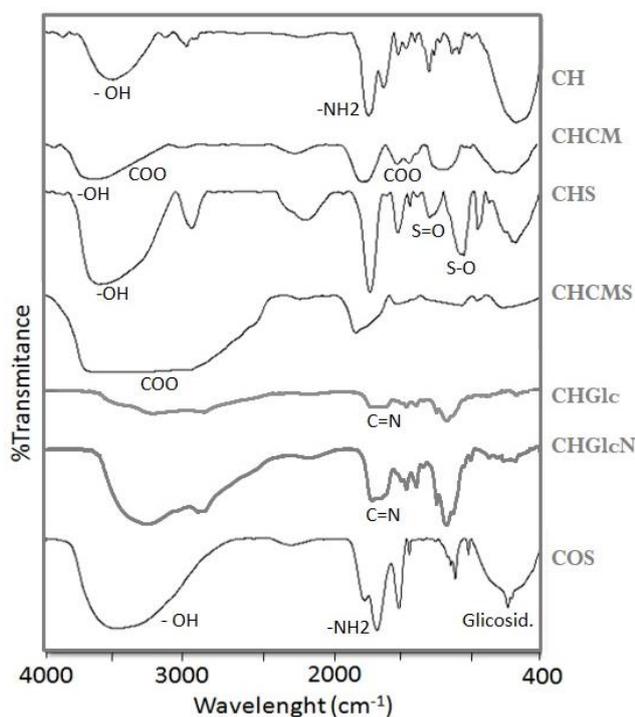
## Results and discussion

### Characterization of water-soluble chitosan derivatives

The properties of chitosan depend on various intrinsic parameters such as percentage of degree of deacetylation and degree of substitution and molecular weight (VINO et al., 2012). The IR spectrum are shown in Figure 7. Chitosan samples had widely different characteristics, probably due to the presence of -SO<sub>3</sub>H and -CH<sub>2</sub>-COOH groups. The broader band centred in 3400 cm<sup>-1</sup> of carboxymethyl chitosan

compared to chitosan reveals a more hydrophilic character, and the occurrence of a intense band at  $1588\text{ cm}^{-1}$  and a moderate band at  $1411\text{ cm}^{-1}$ , attributed respectively to symmetric and axial asymmetric deformations of COO confirmed the introduction of carboxymethyl groups (ABREU; CAMPANA-FILHO, 2009). S=O and S-O bonds appears characteristically at  $1265$ ,  $1235$ ,  $1067$  and  $807\text{ cm}^{-1}$  (Figure 1) (SUWAN et al., 2009). The absorption band at around  $1650\text{ cm}^{-1}$  of chitosan-glucose and chitosan-glucosamine had been assigned to the C=N linkage derived from the Schiff base. Therefore, the absorption band at  $1644\text{ cm}^{-1}$  may represent the overlap of the C=O group and C=N linkage, suggesting that the formation of MRPs in the model systems via the Schiff base. Schiff bases play a critical role, not only in initiating the Maillard reaction, but also in its propagation (WU et al., 2014).

Figure 7 - FT-IR spectra of chitosan and derivates samples



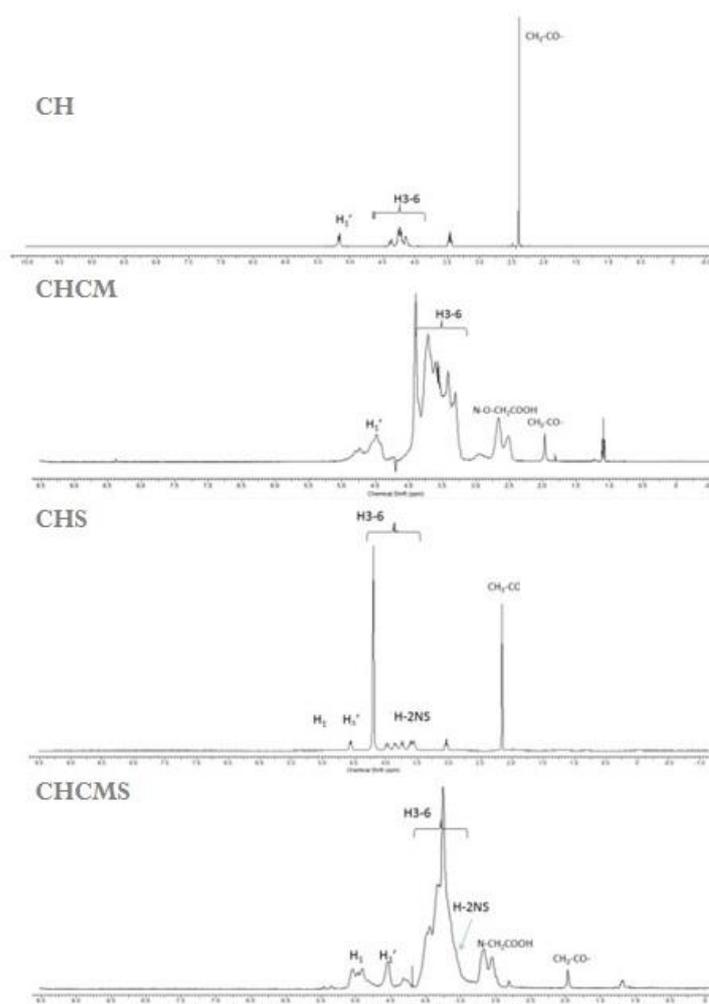
CH: chitosan; CHS: chitosan sulfate; CHCM: O-carboxymethyl chitosan; CHCMS: O-carboxymethyl chitosan sulfate; CH-Glc: chitosan–glucose; CHGlcN: chitosan-glicosamine; COS: chitooligosaccharide.

Source: Prepared by the author (2016).

The basic assignment of the chitosan  $^1\text{H}$  NMR is show in Figure 8. H-1 resonance at 4.8 ppm, H-1' resonance at 4.65 ppm, acetyl-protons (CH<sub>3</sub>) at 2.0 ppm, H3-6 ressonance at 3.6-3.9 ppm and H-2 proton resonance at 3.1 ppm (SHIGEMASA

et al., 2006). The region between 4.05 and 4.55 ppm the resonances are the protons of 3- and 6-substituted carboxymethyl (-O-CH<sub>2</sub>-COOH). The resonance signal of the protons from N-CH<sub>2</sub>-COOH can be found at 3.25 ppm. The resonance between 3.0 and 3.5 ppm, different from the H-2' signal at 3.15 shows that the amino groups were partly carboxymethylated along with the hydroxyl groups (CHEN; PARK, 2003).

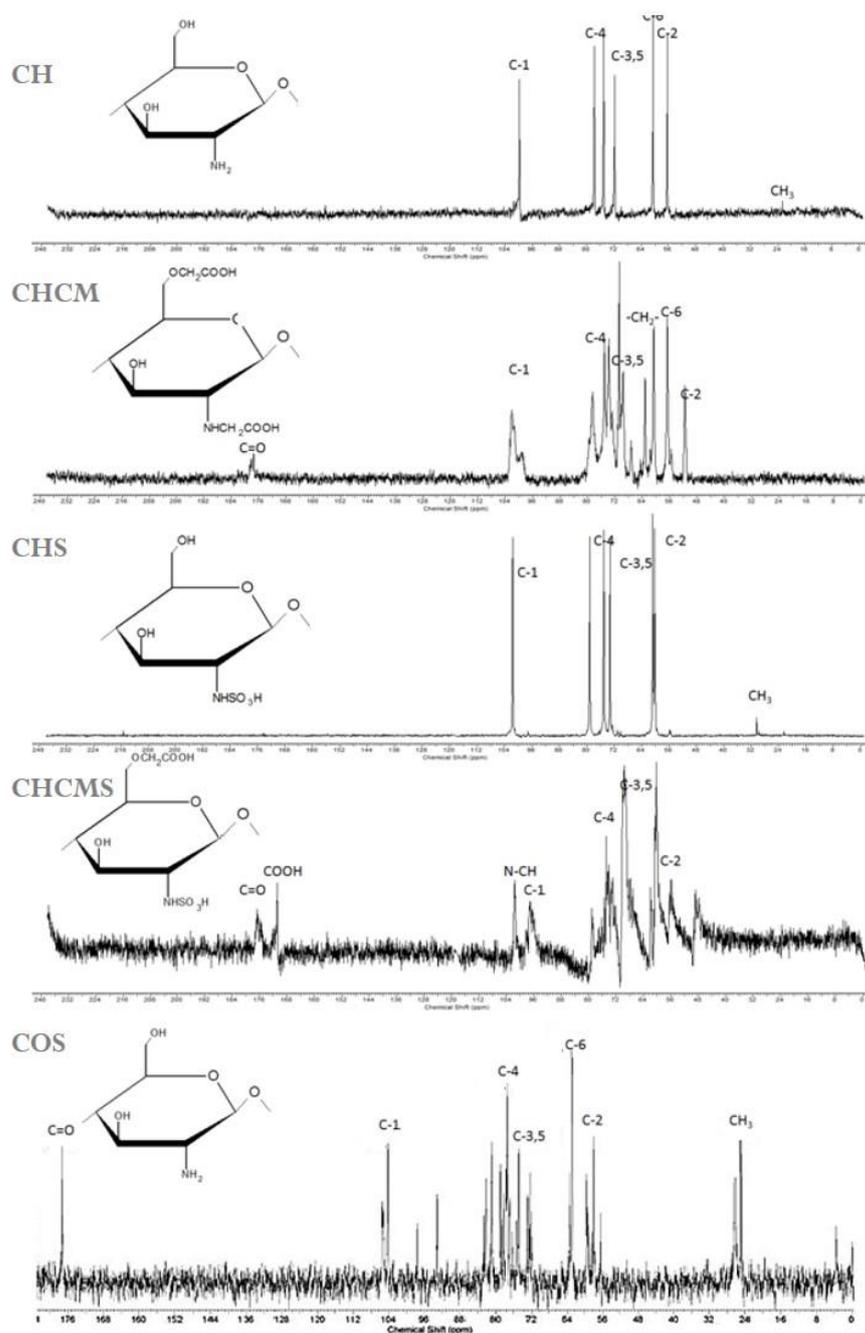
Figure 8 - <sup>1</sup>H spectrum of chitosan and derivates samples



CH: chitosan; CHS: chitosan sulfate; CHCM: O-carboxymethyl chitosan;  
 CHCMS: O-carboxymethyl chitosan sulfate.  
 Source: Prepared by the author (2016).

NMR assignments for chitosan and its derivates are virtually different, possible because of the electron withdrawing effect of sulfate and carboxymethyl groups (Figure 9). Since several different units occur in the structure of carboxymethyl chitosan, the

splitting of the signals present in the spectrum of chitosan are observed in the spectrum of carboxymethyl chitosan (ABREU; CAMPANA-FILHO, 2009). According to Zhao et al (2002), the signal at 180.7 ppm in  $^{13}\text{C}$  NMR is assigned to the carboxymethyl groups, while the one at 177.9 ppm corresponds to the residual acetyl groups of chitosan. The methylene groups (-CH<sub>2</sub>-) weak signal appears at 53-57.4 ppm can be probable assigned to the amino groups as evidence that the carboxymethylation occurred at the hydroxyl as well as the amino groups of chitosan (ABREU; CAMPANA-FILHO, 2009).

Figure 9 -  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of chitosan and derivatives samples

CH: chitosan; CHS: chitosan sulfate; CHCM: O-carboxymethyl chitosan; CHCMS: O-carboxymethyl chitosan sulfate; COS: chitooligosaccharide. Source: Prepared by the author (2016).

The Table 1 summarizes the results obtained by FT-IR, NMR and elemental analysis.

Table 1 - Characterization of water-soluble chitosan derivatives

Sample	Copolymer	Elemental analysis				Degree of Sulfation	Substitution (N/C ratio)
		%C	%N	%H	%S		
CH	(GlcNAc) <sub>0.2</sub>	36.97 ±	5.41 ±	7.375 ±	-		0.15/ 6.83
	(GlcN) <sub>0.8</sub>	0.05	0.02	0.005			
CHCM	GlcNac	33.95 ±	4.12 ±	5.43 ±	-	-	0.12/ 8.24
	GlcN GlcNCH <sub>2</sub> COO	0.035	0.01	0.01			
CHS	GlcNac	24.9 ±	4.75 ±	4.92 ±	8.64	0.34	0.19/5.24
	GlcN GlcNS	0.01	0.005	0.06			
CHCMS	GlcNAc	27.62 ±	3.68 ±	4.64 ±	5.10	0.19	0.13/7.5
	GlcN GlcNCH <sub>2</sub> COO GlcNS	0.13	0.03	0.065			
COS	(GlcNAc) <sub>0.21</sub>	22.66 ±	0.77 ±	6.25 ±	-	-	0.033/29.42
	(GlcN) <sub>0.79</sub>	0.5	0.04	0.1			

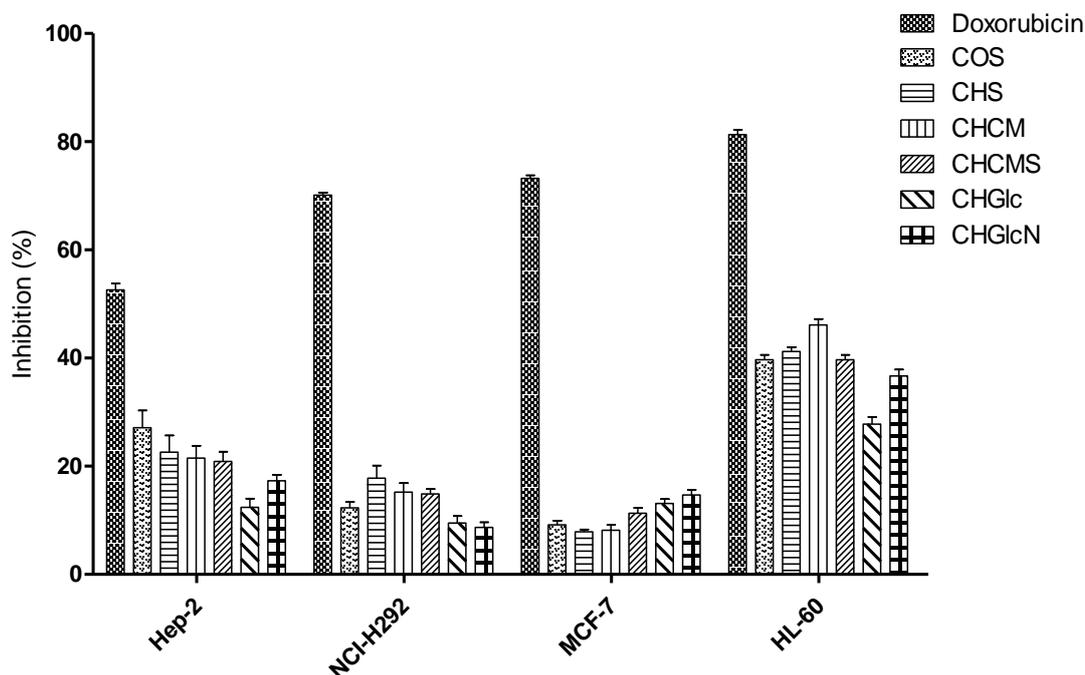
CH: chitosan; CHS: chitosan sulfate; CHCM: O-carboxymethyl chitosan; CHCMS: O-carboxymethyl chitosan sulfate; COS: chitooligosaccharide.

Source: Prepared by the author (2016).

### Cytotoxicity Assay

The chitosan derivatives did not exert any significant toxic effects on the HEp - 2, NCI- H292, HL -60 human tumor cell lines, after 72 h of treatment ( $p < 0.01$ ). The percent of maximum inhibition is shown in Figure 10. These data are consistent with Muzzarelli (2009) stating that chitosan presents cytocompatibility, this characteristic has been proven *in vitro* with myocardial cells, endothelial dysfunction, epithelial, fibroblasts, hepatocytes, chondrocytes and keratinocytes. This property also seems to be related to the increase in the positive charge of the polymers, since it has been proven that the interactions between chitosan and the cells increased greatly, due to the presence of free amino groups, this fact also explains its low toxicity.

Figure 10 - The inhibition effect of water-soluble chitosan derivates (25 µg/mL) in human tumor cell lines



Doxorubicin: Doxorubicin chloridate; CHS: chitosan sulfate; CHCM: O-carboxymethyl chitosan; CHCMS: O-carboxymethyl chitosan sulfate; CH-Glc: chitosan–glucose; CHGlcN: chitosan-glicosamine; COS: chitooligosaccharide.

HEp -2: human larynx carcinoma; NCI- H292: human pulmonary mucoepidermoid carcinoma; MCF-7: human breast adenocarcinoma cell line; HL -60: acute promyelocytic leukemia.

Source: Prepared by the author (2016).

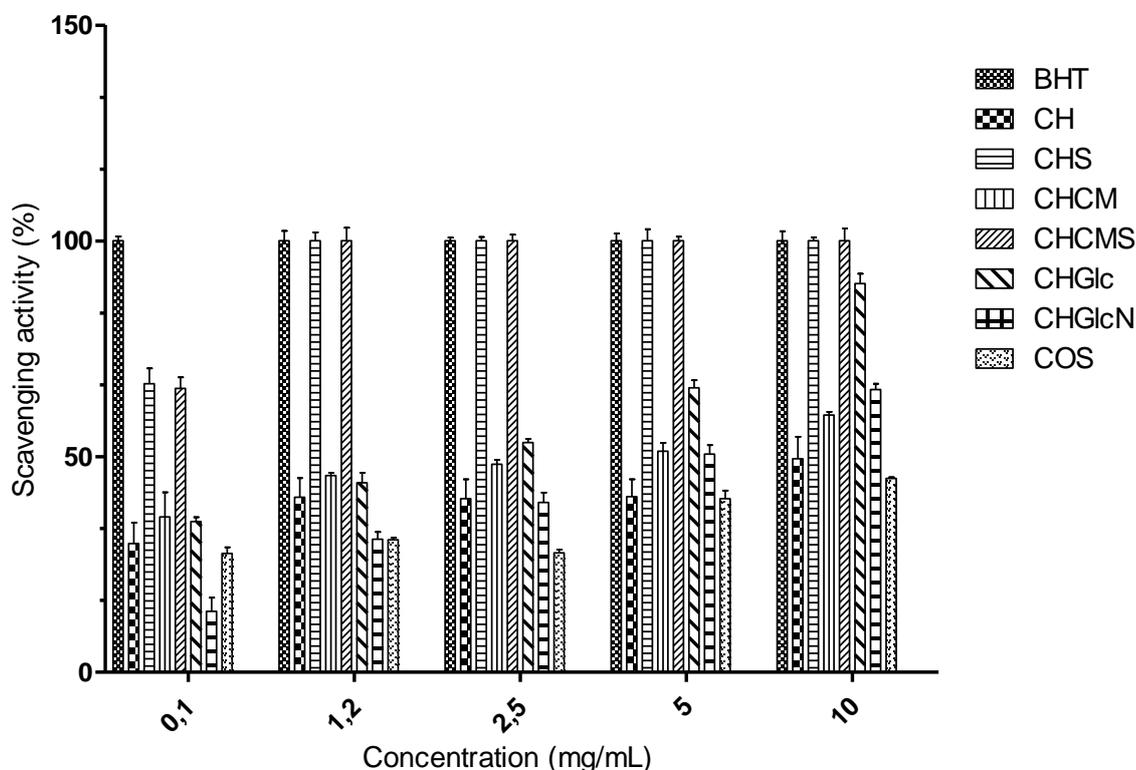
### Antioxidant activities

DPPH is a chromogen-radical-containing compound that has a proton free radical, this radical is scavenged by antioxidants through the donation of hydrogen to form DPPH-H molecule (SHON et al., 2003; SUN et al., 2008).

The scavenging ability of water-soluble chitosan derivates on DPPH radicals was depicted (Figure 11). The order of the scavenging ability of chitosan derivatives was as follows: CHS = CHCMS > CHGlc > CHCM > CHGlcN > CH > COS, with 50% inhibition concentrations (IC<sub>50</sub>) of 0.1, 2.1, 4, 5, 10 and 15 mg/mL, respectively. The BHT, a commonly used natural antioxidant, showed a high ability of 100%, with IC<sub>50</sub> of 0.0005 mg/mL. No significant difference was observed in activity of samples CHS, CHCMS and BHT; CHCM and CHGlcN; COS and CH at a concentration of 10 mg/ml ( $p < 0.05$ ). CHS and CHCMS showed excellent scavenging activity on DPPH radicals, 100% at 0.3 mg/mL, similar to the activity of BHT, and exhibiting higher activity

compared to the chitosan and the other derivatives. This result was in accordance by Xing et al. (2005) with commercial sulfated chitosan of C<sub>3,6</sub> and Zhao et al. (2011) with N,O-carboxymethylated chitosan from squid cartilage. CHGlc and CHGlcN also showed high scavenging abilities, 90.1% and 65.5 at 10mg/mL, respectively. Phisut et al. (2013) evaluated Maillard reaction products (MRPs) from four model systems including chitosan-glucose, fructose, maltose and lactose and concluded the MRPs derived from Glc showed greater scavenging activity on DPPH radicals compared to MRPs derived from other sugars. Li et al. (2013) and Phisut et al. (2013) attributed the high radical scavenging activity of the conjugates to the advanced Maillard reaction product melanoidins and hydrogen transmission by OH or NH<sub>2</sub> groups in the pyranose rings. CH and COS showed similar activities, whereas Wu et al. (2014) observed different scavenging activity of chitosan and chitooligosaccharides, despite the two were lower than the present study. Samar et al. (2013) identified increasing of the antioxidant activities correlated with chitosans of higher DD and more amino groups on C2. Siripatrawan et al. (2010) reported that the scavenging mechanism of chitosan is related to the fact that free radical can react with the residual free amino (NH<sub>2</sub>) groups to form radicals.

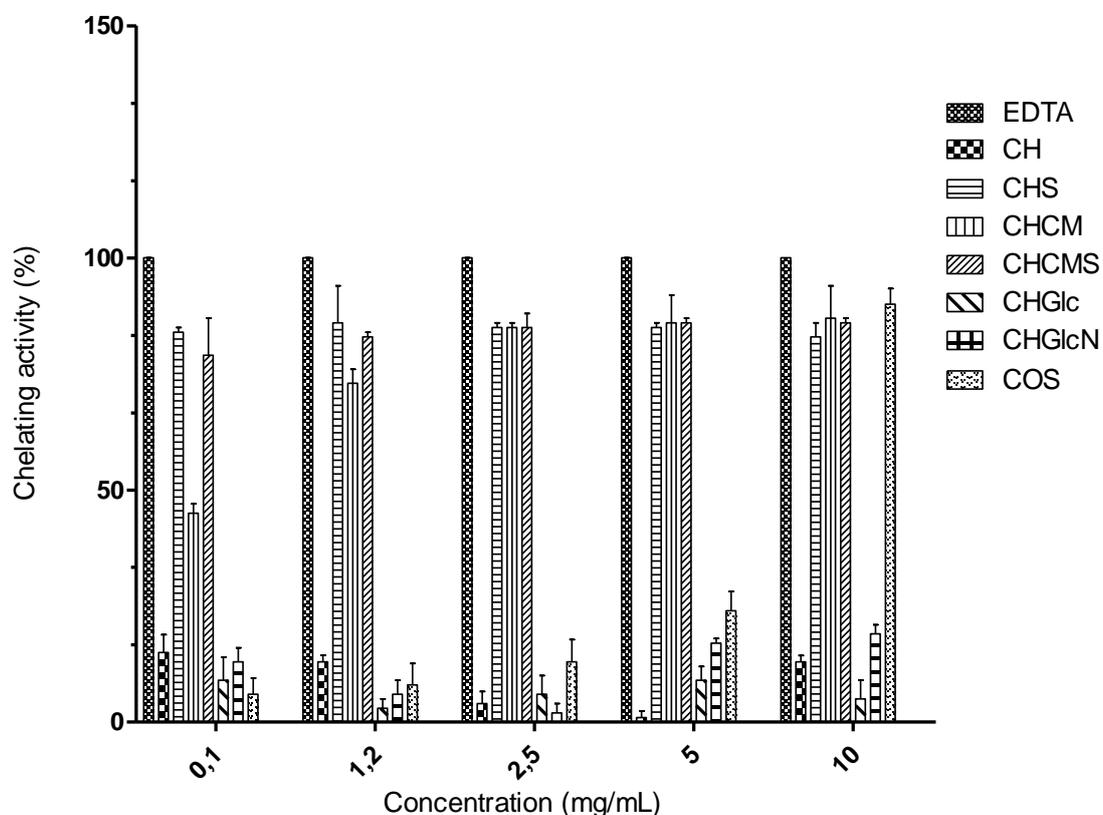
Figure 11 - Scavenging activity on DPPH radicals of water-soluble chitosan derivates from of *L. vannamei*



CH: chitosan; CHS: chitosan sulfate; CHCM: O-carboxymethyl chitosan; CHCMS: O-carboxymethyl chitosan sulfate; CH-Glc: chitosan-glucose; CHGlcN: chitosan-glicosamine; COS: chitooligosaccharide.

Source: Prepared by the author (2016).

Many radical reactions can be formed from ferrous iron ( $\text{Fe}^{2+}$ ) by virtue of its ability to transfer single electrons, starting even with relatively non-reactive radicals. Thus, the iron chelators are important because they are involved in the mobilization of this ion for the formation of soluble and complexes (ADJIMANI; ASARE, 2015). The chelating ability of water-soluble derivatives on ferrous was depicted in Figure 12. The derivatives CHS, CHCMS and CHCM showed excellent chelating ability with high levels in almost all concentrations. The COS showed ability concentration-dependent. The chelating effects of CHGlcN and CHGlc were low and unmodified chitosan not effective ion-chelating. The values of the concentration of chitosan samples and EDTA at which the chelating effect was 50%, was as follows: 0,018, 0.05, 0.078, 0.4, 7.0 of EDTA, CHS, CHCMS, CHCM and COS, respectively. At 10mg/ml, no significant difference was observed for CHS, CHCM, CHCMS, and COS; CHGlcN and GlcN; CH, CHGlc and Glc ( $p < 0.05$ ).

Figure 12 - Chelating ability on ferrous ions of water-soluble chitosan derivatives from of *L. vannamei*

CH: chitosan; CHS: chitosan sulfate; CHCM: O-carboxymethyl chitosan; CHCMS: O-carboxymethyl chitosan sulfate; CH-Glc: chitosan-glucose; CHGlcN: chitosan-glicosamine; COS: chitooligosaccharide.

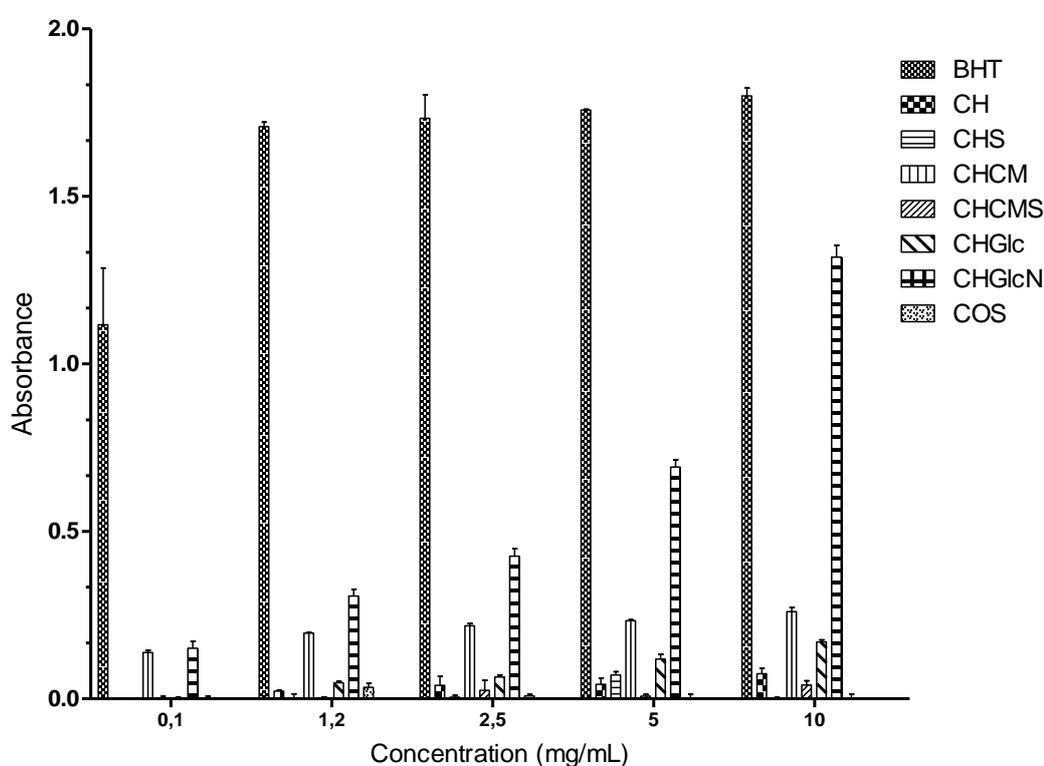
Source: Prepared by the author (2016).

Zhao et al. (2011) found similar chelating effects of N,O-carboxymethyl chitosan from squid cartilage in different degrees of substitution, they believed that this activity is due the binding of the carboxyl group on ferrous ion. Huang et al (2006) did not observed chelating ability of COS and its derivatives with higher substitution degree of carboxyl or quaternized amino groups. However, in present study, increased activity of this derivative was observed, which reached 90% inhibition at 10mg/ml. The metal ion-chelating effect of chitosan and its Maillard reaction products was related by Chang et al. (2011) that obtained activity with chitosan-glucose 9% at 10mg/mL. The authors stated that some extra functional groups, such as amino groups from saccharides, might have contributed to the chelating capacities of samples, despite, in present study, no statistical difference in chelating ability of these derivatives and their

associated sugars was observed. The low activity of unmodified chitosan in this study are similar to findings by Xing et al. (2005b), Zhao et al. (2011) and Vino et al (2012).

Reducing power assay has been used to evaluate the stability of antioxidants to donate electrons (PHISUT et al., 2013). The antioxidant activity of a compound has been attributed to various mechanisms, among which are prevention of chain initiation, binding of transition metal ion catalysts, decomposition of peroxides, reductive capacity, and radical scavenging (FENG et al., 2007). The antioxidant capacity of the chitosan's was also evaluated by the measurement of reducing power, as shown in Figure 13. The derivative CHGlcN showed reducing power more pronounced than the other samples and its activity improved with increasing concentration. COS, CHS and Glc showed no activity ( $p < 0.05$ ). The order of the reducing power of chitosan and their derivatives was as follows: CHGlcN > CHCM > CHGlc > CH > CHCMS, with absorbance of 1.32, 0.26, 0.17, 0.1 and 0.04 respectively, at 10mg/mL.

Figure 13 - Reducing Power of water-soluble chitosan derivates from of *L. vannamei*



CH: chitosan; CHS: chitosan sulfate; CHCM: O-carboxymethyl chitosan; CHCMS: O-carboxymethyl chitosan sulfate; CH-Glc: chitosan-glucose; CHGlcN: chitosan-glicosamine; COS: chitoooligosaccharide.

Source: Prepared by the author (2016).

Li et al. (2013a) evaluated the effect of chitosan molecular weight and MPRs, the conjugates showed an increase reducing power when prolonging the heating time, chitosan-maltose reached maximum of 0.2 at 15min and 1-1.2 at 360 min of reaction in the concentration of 10mg/ml, reaching higher power than derivative of lower molecular weight. There was no remarkable reducing activity of chitosan and maltose alone. The increase reducing power when prolonging the heating time was found by Li et al. (2013b) with chitosan-xylan. Reducing power of 0.2, 0.4 and 0.6 in the different heated times at 60 min, 120 min and 180 min, was observed, respectively. While no noteworthy reducing activity was exhibited for chitosan alone, these results were similar with Wu et al. (2014) who obtained maximum activity close to 1.0 with chitosan-xylan, at reaction time of 240 min. Phisut et al. (2013) observed changes in reducing power of different MPRs systems model of chitosan-sugar and heating time. Their results also indicated the involvement of the amino group and carbonyl group of sugar in the formation of MPRs derived from chitosan-sugar during heat treatment. The reducing power activity for Carboxymethyl chitosan was previously observed in studies by Zhao et al. (2011) with chitosan prepared from squid cartilage that exhibit maximum activity of 0.21 for the derived DS of 1.33-1.59. The derivative CHCMS in present study showed low activity compared with CHCM and slightly larger than CHS, because of the contribution of the carboxymethyl group, since the sulfate group did not evidence reducing power. Low potential of the sulfate group in the chitosan derivatives was also reported by Yen et al. (2007) with chitosan sulfated from crab shells, Vino et al. (2012) with chitosan from Cuttlebone of *Sepia aculeate* Orbigny, and Xing et al. (2005a) with sulfated samples in carbon C3, C6 and C2,3,6. Xing et al. (2005b) observed increase in the activity of this derivative correlated with the DS, increasing concentration and decrease molecular weight. The low reducing activity of CH and COS was also observed by, Yen et al. (2008) with crab chitosan and Wu et al. (2014) with chitooligosaccharides produced by neutral protease from *Bacillus subtilis*, respectively.

The different derivatives obtained in the current study showed different activity in performance. Sun et al. (2008) and Zhao et al. (2011) related that the charge properties of substituting groups may affect the antioxidant activity of the chitosan derivatives. However, the effect of properties of substituting groups is not always positive, due to, two factors: firstly, the substitution will reduce the amount of active amino and hydroxyl groups in the polymer chains; secondly, the substitution may partly destroy the intermolecular and intramolecular hydrogen bonds.

## Antibacterial activity

The antibacterial activity of water-soluble chitosan derivatives was determined by MIC and MBC. The values obtained are shown in Tabela 2. The results indicated the presence of activity in all water-soluble chitosan derivatives, with the exception of CHCM and COS, which proved inactive against most bacteria evaluated. The results varied between types of chitosan and different microorganisms. Glucose and glucosamine were also examined and, as expected, showed no activity, indicating that the inhibition values of derivatives produced by the Maillard reaction does not result only from the associated sugar but yes, by the junction.

Table 2 - Antibacterial activity, MIC (mg/mL) and MBC (mg/mL) of water-soluble chitosan derivatives against various microorganism

Bacteria	CH		CHS		CHCM		CHCMS		CHGlc		CHGlcN		COS	
	MI C	MB C												
<i>S. aureos</i>	10	10	5	10	-	-	5	10	5	6,6	5	6,6	-	-
<i>B. subtilis</i>	10	>10	10	>20	-	-	10	>20	0,6	0,6	2,5	2,5	-	-
<i>E. coli</i>	10	>20	5	>20	5	>5	5	>20	5	>10	5	>10	5	>20
<i>K. penumoniae</i>	10	>20	10	20	-	-	10	20	10	>10	10	>10	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	10	20	5	5	-	-	5	>20	2,5	>10	5	10	-	-
<i>S. sonnei</i>	0,6	20	10	20	10	10	10	10	2,5	2,5	5	>10	-	-
<i>S. enteretidis</i>	10	>20	5	>20	-	-	5	>20	10	>10	10	>10	-	-
<i>V. parahaemoly.</i>	10	>10	5	>20	-	-	5	>20	10	>10	5	>10	-	-

CHCM: O-carboxymethyl chitosan; CHS: chitosan sulfate; CHCMS: O-carboxymethyl chitosan sulfate; COS: chitooligosaccharide; CH-Glc: chitosan-glucose; CHGlcN: chitosan-glucosamine.

-: Not detected

Gram-positive (+) and Gram-negative (-) bacteria.

MIC: minimum inhibitory concentration corresponded to the minimum sample concentration that inhibited visible bacterial growth.

MBC: minimum bactericidal concentration was determined as the highest dilution (lowest concentration) at which no growth occurred on agar plates.

Source: Prepared by the author (2016).

There was no apparent difference in the activity of the derivatives with respect to the Gram-positive and Gram-negative strains. Similar results were found by Wang et al. (2004) with chitosan complexed to zinc and Samar et al. (2013) with chitosan from Egypt shrimp, noting also greater inhibition potential compared to the commercial chitosan. The unmodified chitosan showed inhibition at 10mg/mL concentration for almost all the microorganisms and MBC of 10 to >20mg/mL. Most water-soluble

chitosan derivatives obtained in this study showed better activity compared to unmodified chitosan as observed by Kumar et al. (2005), Chung et al. (2005), Du et al. (2009), Sun et al. (2006), Zhing et al. (2009). The COS produced with enzymatic hydrolysis showed no activity. Wu et al. (2014) explains the relatively weak activity from chitoligosaccharides may occur by the loss or partial reduction of the content of amino groups in the chain during the hydrolysis process. The products of the Maillard reaction, CHGlc and CHGlcN, showed very similar activity with MIC range of 0.63 to 10g/mL and MBC, 0.63 to >10mg/mL. However, Chung et al. (2005) observed different levels of activity between chitosan-maltose, chitosan-glucose, chitosan-fructose and chitosan-glucosamine. Chitosan-glucosamine was more effective than the other derivatives evaluated at a concentration of 0.18 to 0.9mg/mL against *E. coli* and *S. Aureos*. Rolle et al. (2002) reported that the bactericidal effect of Maillard reaction products is dependent on concentration, and that the minimum inhibitory concentrations of chitosan vary widely, of 0.01% to 1.0%(w/v).

CHS showed inhibition for all tested microorganisms, with MIC switching between 5 and 10mg and MBC of 10 to > 20mg/mL. There are no reports of the antimicrobial activity of this derived type. The CHCMS, despite having chemical groups in its structure from two different reactions by changing the density of initial charge and their conformation, showed great similarity to the activity presented by CHS, and therefore more bioactive than the CHCM. CHCM exhibited inhibition against two Gram-negative bacteria *E. coli* and *Shigella sonnei* at a concentration of 5 mg/mL, 10mg/mL also MBC >5 and 10mg/ml, respectively. However, showed no activity against the six other bacteria. Fouda et al. (2013) also found no activity against *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* and the yeast *Candida albicans*. Upadhyaya et al. (2013) studied the antimicrobial activity of N,O-carboxymethyl chitosan with *E. coli* and showed that the inhibitory activity follows the order of O-carboxymethyl chitosan > chitosan > N,O-carboxymethyl chitosan. The low activity in the last is due the small number of groups amino protonated. Once the amino group received carboxymethyl group, this cannot be protonated, reducing the polycationic character of the structure which has been reported to be the key to their activity. Therefore, the low activity of CHCM of the present study occurred because the added group N,O-carboxymethyl did not provide sufficient charge to provide electrostatic interaction with the bacteria.

Sun et al. (2006) observed that the chemical groups added, acts synergistically on the activity effect of chitosan, resulting a positive point or, on the contrary, when the polycationic character of chitosan is private or reversed, the corresponding antibacterial capacity will be weakened or lost. The amount of NH<sub>2</sub> groups, molecular weight, DD, DS, the sample concentration and the pH of the environment are factors that can affect the antimicrobial activity of the polymer (SAMAR et al, 2013; UPADHYAYA et al, 2013). According to Kong et al. (2010), the antibacterial mechanism of chitosan is the result of a series of reactions that starts with the interaction of the polysaccharide with the cell surface of the bacteria, causing a destabilization of the cell membrane and consequently malfunctioning of the cell, followed by leakage of intracellular important substances and, ultimately, cell death. The structure of the molecule is primarily responsible for the efficiency of these reactions.

## **Conclusion**

The water-soluble chitosan derivates obtained from *L. vannamei* shrimp heads did not present cytotoxicity and showed potential to contribute significantly towards the antioxidant activity. Further chitosan derivates also exhibit bacteriostatic effect. The results of the present study indicated water-soluble chitosan derivates obtained from by-products of shellfish processing, abundant and inexpensive materials, exhibits interesting functional properties and may be considered as an alternative ingredient or supplement in the food, biomedical, pharmaceutical and biotechnological approaches.

## **Acknowledgments**

The authors are thankful to the financing agencies CAPES and CNPq for funding this project; to “Financiadora de Estudos e Projetos”—FINEP, of the Brazilian government, responsible for funding “RECARCINA” (Project No. 01.13.0220.00); and to thanks to Netuno Lda. for providing the shrimp by-products.

## References

- ABREU, F. R.; CAMPANA-FILHO, S. P. Characteristics and properties of carboxymethylchitosan. **Carbohydrate Polymers**, v.75, n. 2, p. 214-221, 2009.
- ADJIMANI, J. P.; ASARE, P. Antioxidant and free radical scavenging activity of iron chelators. **Toxicology Reports**, v. 2, p. 721-728, 2015.
- ARANCIBIA, M.Y.; ALEMÁN, A.; CALVO, M.M.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; MONTERO, P. M.; GUILLÉN, M.C. Antimicrobial and antioxidant chitosan solutions enriched with active shrimp (*Litopenaeus vannamei*) waste materials. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 710-717, 2014.
- ALLEY, M. C.; SCUDIERO, D.A.; MONKS, A.; HURSEY, M. L.; CZERWINSKI, M.J.; FINE, D.L.; ABBOTT, B.J.; MAYO, J.G.; SHOEMAKER, R.H.; BOYD, M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, v. 48, p. 589- 601, 1988.
- BHAGWAT, P.K.; DANDGE, P. B. Isolation, characterization and valorizable applications of fish scale collagen in food and agriculture industries. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 234–240, 2016.
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of free radical. **Nature**, v. 26, p. 1199–1200, 1958.
- BRUGNEROTTO, J.; LIZARDI, J.; GOYCOOLEA, F.M.; ARGÜELLES-MONAL, C.; DESBRIÈRES, J.; RINAUDO, M. An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization. **Polymer**, v. 42, p. 3569-3580, 2001.
- CAHÚ, T.B.; SANTOS, S.D.; MENDES, A.; CÓRDULA, C. R.; CHAVANTE, S. F.; CARVALHO JR.; L.B., NADER, H.B.; BEZERRA, R.S. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 570–577, 2012.
- CAHÚ, T.B.; SILVA, R.A.; SILVA, R.P.F.; SILVA, M.M.; ARRUDA, I.R.S.; SILVA, J.F.; COSTA, R.N.P.B.; SANTOS, S.D.; NADER, H.B.; BEZERRA, R.S. Evaluation of Chitosan-Based Films Containing Gelatin, Chondroitin 4-Sulfate and ZnO for Wound Healing. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. DOI 10.1007/s12010-017-2462- z, 2017.
- CHEN, X. G.; PARK, H. J. Chemical characteristics of O-carboxymethyl chitosans related to the preparation conditions. **Carbohydrate Polymers**, p. 53, n. 4, p. 355-359, 2003.
- CHO, Y. S.; KIM, S. K.; AHN, C. B.; JE, J. Y. Preparation, characterization, and antioxidant properties of gallic acid-grafted-chitosans. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1617-1622. 2011.
- DECKER, E. A.; WELCH, B. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. **Journal of Agricultural and Chemistry**, v. 38, p. 674–677, 1990.

DU, Y.; ZHAO, Y.; DAÍ, S.; YANG, B. Preparation of water-soluble chitosan from shrimp shell and its antibacterial activity. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.10, p. 103–107, 2009.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2016. **Food and Agriculture Organization of The United Nations**, Fisheries e Aquaculture Departament. Roma, 2016.

GUZMAN, J.; SAUCEDO, I.; REVILLA, J.; NAVARRO, R. E. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 33, p. 57–65, 2003.

HASAN, M.F.; RAHMAN, M. Screening of antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of *Polygonum hydropiper L. stem* extracts. **International Journal of Biosciences**, v. 1, n. 6, p. 47-53, 2011.

HUANG, R.; MENDIS, E.; KIM, S-K. Factors affecting the free radical scavenging behavior of chitosan sulfate. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 36, p. 120–127, 2005.

HUANG, R.; RAJAPAKSEA, N.; KIM, S-K. Structural factors affecting radical scavenging activity of chitooligosaccharides (COS) and its derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 63, p. 122–129, 2006.

HUSSAIN, A.; WAHAB, S.; ZARIN I.; HUSSAIN, M.D.S. Antibacterial Activity of the Leaves of *Coccinia indica* (W. and A) Wof India. **Advanced Biomedical Research**, v. 4, n. 5, p. 241-48, 2010.

KONG, M.; CHEN, X.G.; XING, K.; PARK, H.J. Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: A state of the art review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 51–63, 2010.

KUMAR, A.B.V.; VARADARAJ, M.C.; GOWDA, L.R.; THARANATHAN, R.N. Characterization of chito-oligosaccharides prepared by chitosan analysis with the aid of papain and Pronase, and their bactericidal action against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. **Biochemical Journal**, v. 391, p.167–175, 2005.

LEAL, A.L.G.; CASTRO, P.F.; LIMA, J.P.V.; CORREIA, E.S.; BEZERRA, R.S. Use of shrimp protein hydrolysate in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*, L.) feeds. **Aquaculture International**, v. 18, p. 635–46, 2010.

LI, S-L.; LIN, J.; CHEN, M-X. Effect of chitosan molecular weight on the functional properties of chitosan-maltose Maillard reaction products and their application to fresh-cut *Typha latifolia* L. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, p. 21–26, 2013.

LIU, X. F.; GUAN, L. Y.; YANG, D. Z.; LI, Z.; YAO, K. D. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 79, n. 7, p. 1324–1335, 2001.

MEDEIROS, F. S.; MARCUSCHI, M.; ASSIS, C. R. D.; SILVA, J. F.; ESPOSITO, T.S.; BEZERRA, R. S. Potential Laundry Detergent Applications of Mutton Snapper (*Lutjanus analis*) Proteases. **Journal of Fisheries Sciences**, v. 9, p. 63-69, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, v. 65, p. 1-2, 55–63, 1983.

MUZZARELLI, R. A. A.; MUZZARELLI, C. Chitosan chemistry: Relevance to the biomedical sciences. **Advances in Polymer Sciences**, v. 186, p. 151–209, 2005.

MUZZARELLI, R.A.A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 167–82, 2009.

NO, H.K.; PARK, N.Y.; LEE, S.H.; MEYERS, S.P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 65–72, 2002.

OCLOO, F.C.K.; QUAYSON, E.T.; ADU-GYAMFI, A.; QUARCOO, E.A; ASARE, D.; SERFOR-ARMAH, Y.; WOODE, B.K. Physicochemical and functional characteristics of radiation-processed shrimp chitosan. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 80, p. 837–841, 2011.

ROBAK, J.; GRYGLEWSKI, R. J. Flavonoids are scavenging of superoxide anions. **Biochemical Pharmacology**, v. 37, p. 837–841, 1988.

ROLLER, S.; SAGOO, S.; BOARD, R.; O'MAHONY, T.; CAPLICE, E.; FITZGERALD, G., et al. Novel combinations of chitosan, carnocin and sulphite for the preservation of chilled pork sausages. **Meat Science**, v. 62, p. 165–177, 2002.

SAMAR, M.M.; EL-KALYOUBI, M.H.; KHALAF, M.M.; ABD EL-RAZI. M.M. Physicochemical, functional, antioxidant and antibacterial properties of chitosan extracted from shrimp wastes by microwave technique k. **Annals of Agricultural Science**, v. 58, n. 1, p. 33–41, 2013.

SHON, M.Y.; KIM, T.H.; SUNG, N.J. Antioxidants and free radical scavenging activity of *Phellinus baumii* extracts. **Food Chemistry**, v. 82, p. 593-597, 2003.

SIRIPATRAWAN, U.; HARTE, B.R. Physical properties and antioxidant activity of an active film from chitosan incorporated with green tea extract. **Carbohydrate Polymer**, v. 24, p. 770-775, 2010.

SUN, L.; DU, Y.; FAN, L.; CHEN, X.; YANG, J.J. Preparation, characterization and antimicrobial activity of quaternized carboxymethyl chitosan and application as pulp-cap. **Polymer**, v. 47, p. 1796–1804, 2006.

SUN, T.; YAO, Q.; ZHOU, D.; MAO, F. Antioxidant activity of N-carboxymethyl chitosan oligosaccharides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 5774–5776, 2008.

SUWAN, J.; ZHANG, Z., LI, B.; VONGCHAN, P.; MEEPOWPAN, P.; ZHANG, F.; LINHARDT, R. J. Sulfonation of papain-treated chitosan and its mechanism for anticoagulant activity. **Carbohydrate Research**, v. 344, n. 10, p.1190-1196, 2009.

UPADHYAYA, L.; SINGH, J.; AGARWAL, V.; TEWARIA, R.P. Biomedical applications of carboxymethyl chitosans. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 452–466, 2013.

VINO, A.B.; RAMASAMY, P.; SHANMUGAM, V.; SHANMUGAM, A. Extraction, characterization and in vitro antioxidative potential of chitosan and sulfated chitosan from Cuttlebone of *Sepia aculeate* Orbigny, 1848. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, p. S334-S341, 2012.

WANG, X. H.; DU, Y.M.; LIU, H. Preparation, characterization and antimicrobial activity of chitosan-Zn complex. **Carbohydrate Polymers**, v. 56, n. 1, p. 21–26, 2004.

XIE, W.; XU, P.; LIU, Q. Antioxidant activity of water-soluble chitosan derivatives. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 1, p. 1699–1701, 2001.

XING, R.YU, H., LIU, S., ZHANG, W., ZHANG, Q., LIA, Z; LIA, P. Antioxidant activity of differently regioselective chitosan sulfates *in vitro*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.13, p. 1387–1392, 2005a.

XING, R.; LIU, S.; GUO, Z.; YU, H.; WANG, P.; CUIPING LI. Relevance of molecular weight of chitosan and its derivatives and their antioxidant activities in vitro. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 1573–1577, 2005b.

ZHAO, D.; HUANG, J.; HU, S.; MAO, J.; MEIA, L. Biochemical activities of N, O-carboxymethyl chitosan from squid cartilage. **Carbohydrate Polymers**, v. 85, p. 832–837, 2011.

ZHENG, J.; WEI, L.; HONGWEI, C.; ZHANG, X.; CHEN, G.; WUB, H.; GUO, X.; ZHANG, Y.; KANG, H.; WANG, Y.; ZHAO, K. Antimicrobial activity and cytotoxicity of N-2-HACC and characterization of nanoparticles with N-2-HACC and CMC as a vaccine carrier. **Chemical Engineering Journal**, v. 221, p. 331–341, 2013.

ZHONG, Z.; ZHONG, Z.; XING, R.; LI, P.; MO, G. The preparation and antioxidant activity of 2-[phenylhydrazine (or hydrazine)-thiosemicarbazone]-chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, p. 93–97, 2010.

ZHU, Q. T.; HACKMAN, R. M.; ENSUNSA, J. L.; HOLT, R. R.; KEEN, C. L. Antioxidative activities of oolong tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6929–6934, 2002.

## 4.2 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO SÊMEN REFRIGERADO DE CARNEIROS COM DILUIDOR SUPLEMENTADO COM DERIVADOS HIDROSSOLÚVEIS DE QUITOSANA

Raquel P. F. da Silva<sup>a</sup>; Julianne C. Gonzalez<sup>b</sup>; Thalles, C.M. de Moura<sup>b</sup>; Lúcia C.P. Arruda<sup>b</sup>; Robespierre A.J.A. Silva <sup>b</sup>; Thiago B. Cahú<sup>a</sup>; Maria M.P. Guerra<sup>b</sup> e Ranilson S. Bezerra<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Enzimologia (LABENZ) Departamento de bioquímica. Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Cidade Universitária, 50670-420, Recife-PE, Brasil

<sup>b</sup>Laboratório de Andrologia (ANDROLAB) Departamento de Medicina Veterinária. Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Rua Dom Manuel Medeiros, s/n, Dois Irmãos, Recife-PE, Brasil.

### RESUMO

A criopreservação do sêmen tem um desempenhado papel primordial no desenvolvimento das tecnologias de reprodução assistida nos últimos anos. No entanto, alguns fatores inerentes ao processo, estimulam a geração de espécies reativas de oxigênio e comprometem a integridade estrutural e funcional dos espermatozoides. Quitosana e seus derivados são citocompatíveis e demonstraram ter propriedades antioxidantes atuando contra diferentes espécies de radicais instáveis. No presente estudo, foi avaliado o efeito da suplementação do diluidor de refrigeração do sêmen ovino com derivados hidrossolúveis de quitosana contra os danos ocasionados aos espermatozoides. O sêmen de carneiro foi preservado em diluente Tris-gema de ovo com adição de diferentes quitosanas solúveis e seus efeitos sobre a sobrevivência e a funcionalidade de espermatozoides nos tempos de armazenamento 0, 24, 48, 72 e 96h foram avaliados. A adição das quitosanas solúveis melhorou significativamente os parâmetros de motilidade, estabilidade e viabilidade espermática ( $p < 0,05$ ). Estes resultados sugerem que a inclusão dos derivados hidrossolúveis de quitosana ao diluente de refrigeração pode contribuir para a redução dos danos do processamento e preservação de espermatozoides ovinos.

Palavras-chave: Quitosana. Criopreservação. Espermatozoides. Sêmen. Ovinos

### Introdução

A reprodução animal tem sido alvo de intensos estudos, promovendo avanços cada vez mais explorados em seu aspecto aplicado, dentre eles, a criopreservação de sêmen, principalmente de animais de produção, pois promovem incremento produtivo e contribuem significativamente com a oferta de alimentos em escala global (MOSCARDINI et al., 2014).

A tecnologia de sêmen refrigerado é estudada com o intuito de manter o potencial fertilizante do espermatozoide por vários dias, possibilitando o transporte de material genético através de longas distâncias com baixo custo e maior segurança, preservando a integridade física do animal e evitando o risco de propagação de doenças, através da erradicação do contato direto entre macho e fêmea (CARNEIRO et al., 2012; GIBB; AITKEN, 2016). Embora possibilite o desenvolvimento da indústria animal, esta técnica sofre limitações em virtude dos efeitos prejudiciais da baixa temperatura sobre as células espermáticas, pois constitui evento atípico e estressante sobre as células, com estímulo à geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SILVA; GUERRA, 2012; GÓMEZ-TORRES et al., 2017). As ROS desencadeiam uma cascata de peroxidação lipídica, causando lesões na membrana plasmática, com perda de fluidez e de sua capacidade de regular a concentração intracelular de íons envolvidos no controle do movimento espermático, causando, por fim, perda da função de fertilização (NICHI, 2003; MAIA; BICUDO, 2009). Diante desta realidade, tem se buscado o aperfeiçoamento desta biotécnica reprodutiva com a adição de antioxidantes (GUERRA et al., 2012).

A quitosana é o único polímero catiônico pseudo-natural e, apesar de ser encontrado em algumas espécies de fungos, sua maior fonte disponível e economicamente viável é a partir do processo de desacetilação da quitina, biopolímero abundante nas carapaças de crustáceos originadas do processamento industrial de frutos do mar (CANPANA-FILHO et al., 2007; CAHU et al., 2012; ARANCIBIA et al., 2014). A quitosana possui uma variedade de propriedades físico-químicas e biológicas, tais como: biocompatibilidade, biodegradabilidade, antitumoral, anti-angiogênica, antibacteriana, antifúngica, cicatrizante, anti-inflamatória e antioxidante (SUN et al., 2008; MUZZARELLI, 2009; ZHONG et al., 2010; ZHAO et al., 2011; CHO et al., 2011; VINO et al., 2012; UPADHYAYA et al.; LI et al., 2013; GARCÍA et al., 2015). Estes atributos tem tornado atraente seu uso em diversas aplicações nos campos farmacêuticos e médicos, principalmente quando são considerados seus derivados hidrossolúveis, que conferirem maior solubilidade e funcionalidade a este

polissacarídeo. No entanto, nenhuma informação sobre a influência da quitosana na sobrevivência e funcionalidade de espermatozoides criopreservados está disponível na literatura. Portanto, no presente estudo, derivados hidrossolúveis de quitosana foram preparados e seu efeito no sêmen submetido ao processo de preservação por refrigeração foi investigado.

## **Material e métodos**

### **Animais**

Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (Processo nº23082.026480//2017-28 Ceua-UFRPE). Foram utilizados quatro ovinos da raça Santa Inês, sexualmente maduros, com histórico de fertilidade, alojados no biotério do Hospital Veterinário da UFRPE (Brasil) ( $08 \pm 03'14''$  S,  $34^\circ 52' 52''$  W), submetidos a manejo intensivo, alimentados com feno de capim Tifton e 400g/dia de ração comercial, além de suplementação mineral e água *ad libitum*.

### **Colheita e Avaliação do Sêmen**

Foram realizadas cinco coletas de sêmen por animal, em intervalos de 48 horas, para um total de 20 ejaculados. Os ejaculados foram obtidos pelo método da vagina artificial usando uma fêmea como manequim. Imediatamente após a coleta, as amostras de sêmen foram avaliadas subjetivamente em microscópio óptico de contraste de fase (100x; Olympus, Tóquio, Japão) para movimento de massa, vigor e motilidade. Cada ejaculado foi avaliado separadamente e somente ejaculados com movimento de massa e vigor  $\geq 3$  e valores de motilidade  $\geq 70\%$  foram utilizados para a formação do *pool* ( $n = 5$ ). Após a formação do *pool*, alíquotas foram retiradas para leitura da osmolaridade (mOsmol/L) (VAPRO® Vapor Pressure Osmometer, Modelo 5600, França), mensuração do pH (0-14; mediante uso de fitas reagentes) e diluídas na proporção de 1:400 de solução salina formolizada a 1% (v/v), para se estabelecer a concentração de espermatozoides em Câmara de Neubauer.

### **Preparação de derivados hidrossolúveis de quitosana**

Quitosana foi obtida a partir de resíduos do processamento de camarões. As matérias-primas foram doadas por uma unidade local de processamento de pescado (Netuno Ltda., Pernambuco, Brasil) e levadas imediatamente para laboratório em gelo, atadas em sacos de plástico de 0,5 kg e congeladas a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até utilização. A metodologia para obtenção e purificação de quitosana foi realizada de acordo com o método de Cahú et al. (2012). Em seguida, a amostra foi liofilizada para se obter um pó branco fino. Para a preparação dos derivados hidrossolúveis, foram realizadas diferentes reações de modificação química: quitosana sulfata foi preparada de acordo com Mariappan et al. (1999), quitosana Carboximetilada, conforme relatado por Ramesh et al. (2004), e os quitoooligossacarídeos foram obtidos por hidrólise enzimática com pepsina gástrica suína, de acordo com Roncal et al. (2007).

#### Diluição e Refrigeração do sêmen

O diluidor de Tris-gema de ovo (375 mM Tris, 124 mM de ácido cítrico, 41,6 mM de frutose, 20% de gema de ovo, pH 6,8) foi preparado e dividido para a formação de grupos experimentais, de acordo com o tipo de quitosana, na concentração final de  $15\mu\text{g/mL}$ : Control = diluidor Tris-gema sem adição de quitosana; ChS = diluidor Tris-gema + adição de quitosana Sulfatada; ChCm = diluidor Tris-gema + adição de quitosana Carboximetilada; ChCmS = diluidor Tris-gema + adição de quitosana Carboximetilada e Sulfatada; Oligo = diluidor Tris-gema + quitoooligossacarídeo. Os diluidores preparados foram submetidos à leitura da osmolaridade (mOsmol/L) e mensuração do pH antes da adição das amostras de sêmen. O pool de sêmen foi diluído em todos os grupos para uma concentração final de  $200 \times 10^6$  espermatozoides  $\text{mL}^{-1}$ . Amostras de cada grupo experimental foram colocadas em tubos de microcentrífuga (0,25 mL), etiquetados e acondicionadas em refrigerador (a  $5^{\circ}\text{C}$ ) até o momento da análise. Para maior controle da temperatura de refrigeração, foi colocado um termômetro digital, com visor externo.

#### Avaliação dos parâmetros espermáticos

Quando a temperatura das amostras atingiu  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$  (2 horas após refrigeração), foi determinado o tempo 0 ( $T_{0h}$ ) e os parâmetros do sêmen foram avaliados. As

análises subsequentes foram realizadas 24 (T<sub>24h</sub>), 48 (T<sub>48h</sub>), 72 (T<sub>72h</sub>) e 96 h (T<sub>96h</sub>) depois. Alíquotas de cada grupo experimental foram aquecidas em banho-maria (37 °C durante 5 min), quando atingiram os tempos pré-estabelecidos e analisados quanto aos diferentes parâmetros, como descrito a seguir.

### Cinética espermática

A cinética espermática foi avaliada através do Sistema Computadorizado de Análise de Esperma (CASA, SCA<sup>TM</sup>, Microoptics, SL, Versão 5.1, Barcelona, Espanha). Alíquotas de cada amostra (3,0 µL) foram analisadas individualmente sobre lâmina coberta com lamínula (18x18 mm), ambas pré-aquecidas a 37 °C e examinadas em microscópio de contraste de fase (Eclipse 50i, Nikon, Japão) com objetiva de 10x, acoplado ao sistema CASA. As imagens dos espermatozoides foram capturadas com Câmera de vídeo (Basler Vision Technologie<sup>TM</sup> A312FC, Ahrensburg, Alemanha) com aumento de 100x. Foram capturados pelo menos 300 espermatozoides por amostra, em cinco campos aleatórios não consecutivos, selecionados pelo mesmo operador. Os parâmetros fornecidos pelo programa e considerados no estudo, foram: motilidade total (TM; %), motilidade progressiva (PM; %), rápidos (RAP; %), velocidade curvilínea (VCL; µm/s), velocidade em linha reta (VSL; µm/s), velocidade média da trajetória (VAP; µm/s), linearidade (LIN; %), retilinearidade (STR; %), índice de oscilação (WOB; %), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH; µm) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF; Hz). Os parâmetros do sistema CASA foram mensurados com os seguintes ajustes: temperatura, 37 °C; ampliação, 100x; número de imagens, 25; imagens por segundo, 25; área da cabeça, 20-70 µm<sup>2</sup>; VAP: lento 10 µm/s < médio 45 µm/s < rápido 75 µm/s; progressividade, 80% STR; e circular, 50% LIN.

### Integridade de membrana, viabilidade e estabilidade espermática

Em cada análise, alíquotas de 50 µL de sêmen (200 x10<sup>6</sup> espermatozoides mL<sup>-1</sup>) foram diluídas em 1 mL de PBS (solução salina tamponada com fosfato, livre de Ca<sup>+2</sup> e Mg<sup>+2</sup>, Dulbecco) e centrifugadas (600 g/10 min) para retirada do diluidor e debrís celulares. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensado em 40 µL de PBS.

Para a avaliação de a integridade de membrana plasmática e acrossomal (iMPA), as amostras foram coradas por adição de 5,0  $\mu\text{L}$  de FITC conjugada a *Peanut agglutinin* (FITC-PNA, 0,04 mg/mL em PBS) e 5,0  $\mu\text{L}$  de Iodeto de propídio (IP: 0,1 mg/mL em PBS), fixadas com 5,0  $\mu\text{L}$  de paraformaldeído a 4%, incubadas por um período de durante 5 minutos à temperatura ambiente e avaliadas.

Para análise de viabilidade e estabilidade da membrana, as amostras foram coradas por adição de 5  $\mu\text{L}$  de Yo-Pro-1 (YP: 2,5  $\mu\text{M}$  em PBS) e incubadas a 37 °C por 15 minutos. Após essa etapa, foi adicionado 5  $\mu\text{L}$  de Merocianina 540 (M540: 270 $\mu\text{M}$  em PBS), fixadas com 5,0  $\mu\text{L}$  de paraformaldeído a 4%, incubada por um período de durante 5 minutos à temperatura ambiente e avaliadas.

As análises foram realizadas utilizando citômetro AmnisImageStream<sup>®x</sup> Mark II (EMD Millipore Corp., Seattle, Washington) equipado com um microscópio com a objetiva de 60 x (0,5  $\mu\text{m}$  resolução pixel) com uma taxa de imagem de 5000 células/s. O tamanho das células foi de 7,0  $\mu\text{m}$  e a velocidade de fluxo foi de 44 mm/s. As amostras foram analisadas com um laser de 488 nm e foram coletados 5000 eventos para todas as amostras. As imagens de campo claro foram coletadas usando um iluminador de campo brilhante baseado em LED. O FITC-PNA e o YP foram recolhidos no canal 2 (505-560 nm), M540 no canal 3 (560-595 nm) e o IP foi recolhido no canal 5 (640-745 nm). Para adquirir imagens brutas, o Software INSPIRE<sup>®</sup> foi utilizado, e a análise de imagem foi realizada usando o software de análise de imagem IDEAS<sup>®</sup> 6.0. Foram consideradas as células seguintes: células com membranas acrossomal e plasmática intactas, não coradas (PNA-/PI-), células com membranas acrossomal danificada e plasmática intacta, coradas apenas com FITC-PNA (PNA+/PI), células com membrana acrossomal intacta e membrana plasmática danificadas, coradas apenas por IP (PNA-/PI+) e células com membrana acrossomal e plasmáticas danificadas, duplamente coradas (PNA+/PI +). Na análise de viabilidade e estabilidade de membrana, as células viáveis com membrana plasmática estável foram as que não foram coradas (YP-/M540-), as células viáveis com membrana plasmática instável foram coradas apenas por M540 (YP-/M540+), e as células coradas pelo YP foram classificadas como inviáveis (YP+/M540+ e YP+/M540-).

Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o Origin 8 (versão 8.1, 2009). Os dados foram testados para normalidade e homogeneidade da variância usando o método de Kolmogorov-Smirnov e Brow-Forsythe test, respectivamente. A influência das quitosanas sobre os parâmetros de qualidade seminal foram testadas por análise de variância (ANOVA) para mensurações repetidas, seguidas pelo teste de comparação múltipla de Tukey. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média e as diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

## Resultados

Os ejaculados apresentaram volume médio de 0,91 mL, cor branco opalescente, aspecto cremoso a leitoso, motilidade total (TM) de  $78,7 \pm 6,56\%$ , motilidade progressiva (PM)  $29,3 \pm 6,28\%$ , pH 7 e 476,28 mOsmol/L.

Os diluidores preparados (Control, ChS, ChCm, ChCmS e Oligo) apresentaram os seguintes valores de osmolaridade: 482 mOsmol/L; 476,5 mOsmol/L; 465,5 mOsmol/L; 475 mOsmol/L; e 453,5 mOsmol/L, respectivamente. Todos os diluidores apresentaram pH na faixa 7,0.

A capacidade de autofluorescência dos derivados elaborados foi avaliada por citometria de fluxo, a fim de verificar se os mesmos poderiam interferir nas emissões das sondas fluorescentes utilizadas nos testes de integridade de membrana, viabilidade e estabilidade espermática. Nenhuma emissão de fluorescência quantificável foi expressa.

Os efeitos da suplementação do diluidor com os diferentes derivados hidrossolúveis de quitosana nos parâmetros de cinética espermática são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Análise da cinética espermática sêmen de carneiros em diluidor suplementado com ou sem derivados hidrossolúveis de quitosana, após acondicionamento refrigerado nos tempos 0 ( $T_{0h}$ ), 24 ( $T_{24h}$ ), 48 ( $T_{48h}$ ), 72 ( $T_{72h}$ ) e 96 hs ( $T_{96h}$ )

Parâmetros	Grupos	Tempo de Avaliação				
		$T_{0h}$	$T_{24h}$	$T_{48h}$	$T_{72h}$	$T_{96h}$
TM (%)	Control	$68,7 \pm 2,2$	$63,9 \pm 3,0$	$64,3 \pm 11,4$	$67,8 \pm 5,8$	$57,6 \pm 13,1$
	ChS	$69,5 \pm 4,2$	$70,4 \pm 5,8$	$70,7 \pm 9,8$	$64,8 \pm 9,0$	$66,6 \pm 6,7$
	ChCm	$71,3 \pm 5,9$	$67,2 \pm 7,7$	$70,2 \pm 6,7$	$67,9 \pm 5,6$	$63,7 \pm 10,7$

	ChCmS	66,7 ± 7,6	60,7 ± 11,1	66,4 ± 10,9	54,9 ± 9,9	62,9 ± 4,1
	Oligo	67,9 ± 3,4	67,9 ± 9,3	64,5 ± 2,4	65,8 ± 7,9	59,8 ± 8,4
<b>PM (%)</b>	Control	24,4 ± 1,9 <sup>b</sup>	34,2 ± 6,5	36,7 ± 6,8	40,5 ± 3,8 <sup>a</sup>	32,4 ± 13,5
	ChS	25,3 ± 2,9 <sup>ab</sup>	38,7 ± 7,0	44,8 ± 8,1	36,3 ± 3,7 <sup>b</sup>	43,5 ± 5,7
	ChCm	28,7 ± 1,9 <sup>ab</sup>	38,0 ± 5,1	44,5 ± 4,0	41,3 ± 1,6 <sup>ab</sup>	41,2 ± 7,1
	ChCmS	30,5 ± 3,6 <sup>a</sup>	37,9 ± 6,4	42,4 ± 4,8	35,1 ± 2,7 <sup>b</sup>	34,4 ± 3,6
	Oligo	29,1 ± 3,1 <sup>ab</sup>	35,6 ± 3,2	36,7 ± 3,7	38,8 ± 3,4 <sup>ab</sup>	35,2 ± 6,6
<b>RAP (%)</b>	Control	48,5 ± 5,1	36,3 ± 6,0 <sup>ab</sup>	31,8 ± 10,7	31,1 ± 4,0	20,4 ± 7,7
	ChS	45,2 ± 8,2	48,7 ± 9,2 <sup>a</sup>	30,2 ± 5,4	29,6 ± 8,0	25,9 ± 8,3
	ChCm	43,1 ± 8,6	30,0 ± 7,1 <sup>b</sup>	33,4 ± 7,2	25,5 ± 6,3	21,1 ± 9,2
	ChCmS	38,4 ± 9,2	29,4 ± 8,8 <sup>b</sup>	37,9 ± 4,0	21,9 ± 10,0	23,1 ± 9,9
	Oligo	40,3 ± 4,1	35,0 ± 6,7 <sup>ab</sup>	31,0 ± 9,3	36,3 ± 11,9	30,0 ± 12,7
<b>VCL (µm/s)</b>	Control	135,1 ± 4,4 <sup>ab</sup>	106,4 ± 5,2 <sup>b</sup>	114,1 ± 10,3	107,1 ± 4,5	93,7 ± 10,1
	ChS	142,5 ± 4,9 <sup>a</sup>	131,9 ± 4,7 <sup>a</sup>	108,0 ± 4,2	106,0 ± 5,8	104,3 ± 7,3
	ChCm	126,1 ± 4,6 <sup>b</sup>	110,2 ± 9,3 <sup>ab</sup>	105,8 ± 5,9	101,5 ± 6,8	95,5 ± 3,8
	ChCmS	135,5 ± 7,2 <sup>ab</sup>	113,8 ± 3,7 <sup>ab</sup>	107,4 ± 4,3	97,5 ± 9,6	104,3 ± 6,8
	Oligo	129,2 ± 4,9 <sup>ab</sup>	122,4 ± 8,7 <sup>a</sup>	106,9 ± 6,1	102,7 ± 5,1	102,6 ± 3,5
<b>VSL (µm/s)</b>	Control	55,7 ± 1,2	55,8 ± 4,5	56,0 ± 6,3	55,8 ± 2,9 <sup>ab</sup>	53,6 ± 0,9
	ChS	58,9 ± 4,5	60,3 ± 2,3	57,5 ± 3,1	55,3 ± 1,9 <sup>ab</sup>	58,4 ± 6,4
	ChCm	59,2 ± 4,0	58,1 ± 1,4	57,6 ± 4,3	54,4 ± 2,3 <sup>ab</sup>	57,1 ± 6,2
	ChCmS	55,0 ± 3,0	60,0 ± 3,8	61,3 ± 2,6	50,4 ± 2,9 <sup>b</sup>	56,9 ± 6,0
	Oligo	55,9 ± 3,3	58,6 ± 5,6	59,0 ± 6,8	61,2 ± 5,0 <sup>a</sup>	63,9 ± 6,2
<b>VAP (µm/s)</b>	Control	85,2 ± 4,1	72,8 ± 3,8	69,6 ± 7,9	72,2 ± 4,8	61,8 ± 10,3
	ChS	82,7 ± 7,2	82,7 ± 1,8	69,4 ± 3,8	71,3 ± 7,6	69,9 ± 6,1
	ChCm	79,3 ± 7,5	77,4 ± 7,3	71,0 ± 5,1	69,2 ± 5,0	67,7 ± 8,2
	ChCmS	80,7 ± 4,6	76,1 ± 5,3	75,0 ± 2,5	67,0 ± 10,2	67,9 ± 7,3
	Oligo	78,2 ± 6,2	75,3 ± 7,4	70,5 ± 8,2	74,0 ± 6,2	74,3 ± 10,8
<b>LIN (%)</b>	Control	41,1 ± 3,0	52,2 ± 3,7	51,6 ± 2,4	53,6 ± 4,6	48,5 ± 6,0
	ChS	42,1 ± 1,8	47,7 ± 3,7	56,1 ± 5,2	53,7 ± 1,7	54,2 ± 4,8
	ChCm	44,8 ± 3,4	45,1 ± 6,5	53,5 ± 2,6	53,8 ± 4,5	56,0 ± 3,5
	ChCmS	44,8 ± 4,9	49,6 ± 2,0	57,2 ± 3,8	52,9 ± 2,6	53,0 ± 5,1
	Oligo	45,9 ± 0,8	48,7 ± 1,6	53,1 ± 4,1	53,4 ± 2,1	56,7 ± 4,8
<b>STR (%)</b>	Control	69,9 ± 2,24	78,6 ± 3,0	80,6 ± 2,0	82,1 ± 1,3	76,2 ± 3,6
	ChS	68,9 ± 3,74	74,5 ± 3,8	82,5 ± 3,5	82,6 ± 0,9	81,9 ± 2,4
	ChCm	70,8 ± 3,51	71,9 ± 6,5	81,1 ± 2,8	81,6 ± 1,8	81,7 ± 1,7
	ChCmS	73,2 ± 2,17	77,4 ± 0,7	83,1 ± 3,8	81,7 ± 0,8	80,7 ± 3,1
	Oligo	74,0 ± 1,94	80,6 ± 2,8	81,1 ± 1,1	84,5 ± 3,2	83,0 ± 3,0
<b>WOB (%)</b>	Control	61,0 ± 0,4	64,0 ± 3,3	64,1 ± 2,2	65,9 ± 4,0	61,3 ± 6,4
	ChS	61,2 ± 1,3	68,1 ± 2,4	67,9 ± 3,5	66,0 ± 1,6	66,0 ± 5,2
	ChCm	63,2 ± 1,9	63,9 ± 2,7	65,9 ± 1,2	66,6 ± 4,2	68,6 ± 3,6
	ChCmS	61,7 ± 4,5	63,6 ± 1,2	69,0 ± 2,6	62,9 ± 2,5	65,8 ± 4,3
	Oligo	62,8 ± 1,3	62,7 ± 1,0	65,6 ± 4,2	67,9 ± 2,4	69,3 ± 5,6
<b>ALH (µm/s)</b>	Control	4,4 ± 0,4	4,1 ± 0,2	3,7 ± 0,1	3,6 ± 0,2	4,1 ± 0,3
	ChS	4,7 ± 0,5	4,1 ± 0,2	3,4 ± 0,1	3,4 ± 0,3	3,4 ± 0,4
	ChCm	4,4 ± 0,3	3,8 ± 0,4	3,6 ± 0,1	3,4 ± 0,4	3,3 ± 0,6
	ChCmS	4,7 ± 0,3	3,7 ± 0,1	3,6 ± 0,2	3,4 ± 0,3	3,5 ± 0,3
	Oligo	4,3 ± 0,3	4,0 ± 0,4	3,5 ± 0,2	3,4 ± 0,3	3,3 ± 0,3
<b>BCF (Hz)</b>	Control	13,7 ± 0,5	14,5 ± 0,3	14,5 ± 0,3	14,6 ± 0,6 <sup>b</sup>	13,8 ± 1,1
	ChS	13,6 ± 0,5	14,4 ± 0,5	14,9 ± 0,3	15,2 ± 0,3 <sup>ab</sup>	14,3 ± 0,8
	ChCm	13,8 ± 0,2	14,1 ± 0,5	15,0 ± 0,3	15,1 ± 0,3 <sup>ab</sup>	14,4 ± 0,8
	ChCmS	13,9 ± 0,2	14,6 ± 0,2	14,9 ± 0,5	15,6 ± 0,3 <sup>a</sup>	14,3 ± 0,8
	Oligo	14,2 ± 0,3	14,4 ± 0,4	15,1 ± 0,6	15,1 ± 0,3 <sup>ab</sup>	15,2 ± 0,2

Control: diluidor Tris-gema de ovo sem os derivados de quitosana, ChCm: diluidor Tris-gema de ovo com quitosana carboximetilada, ChS: diluidor Tris-gema de ovo com quitosana sulfatada, ChCmS: diluidor Tris-gema de ovo com quitosana carboximetilada e sulfatada, e Oligo: diluidor Tris-gema de ovo com quitooligosacarídeos.

TM, motilidade total; PM, motilidade progressiva; RAP, rápidos; VCL, velocidade curvilínea; VSL, velocidade em linha reta; VAP, velocidade média da trajetória; LIN, linearidade; STR, retilinearidade; WOB, índice de oscilação; ALH, amplitude de deslocamento lateral da cabeça; BCF, frequência de batimento flagelar cruzado.

Letras minúsculas distintas (a, b, c) quando presentes denotam diferenças estatística entre tratamentos (P < 0,05) dentro de cada tempo.

Fonte: Elaborada pela autora (2018).

Os dados apresentados na Tabela 3 revelaram que a adição dos derivados hidrossolúveis de quitosana ao diluidor de refrigeração influenciou o comportamento dos espermatozoides de carneiro em alguns parâmetros. Na avaliação PM houve diferença ( $P < 0,05$ ) entre grupo ChCmS e o grupo controle em  $T_{0h}$ , sendo o grupo suplementado com o derivado de quitosana sulfatada o que apresentou maior porcentual de células com movimento progressivo. No entanto em  $T_{72h}$ , o inverso foi encontrado, o grupo controle apresentou porcentual maior em relação ao grupo ChCmS, e também ao grupo ChS. Nos outros tempos ( $T_{24h}$ ,  $T_{48h}$  e  $T_{96h}$ ) não houve diferença significativa.

Na análise de VCL, constatou-se que em  $T_{24h}$ , os espermatozoides dos grupos ChS e Oligo apresentaram maiores índices de velocidade curvilinear, diferindo estatisticamente ( $P < 0,05$ ) do grupo controle. Não houve diferença significativa nos outros tempos ( $T_{0h}$ ,  $T_{48h}$ ,  $T_{72h}$  e  $T_{96h}$ ).

Na avaliação de BCF, foi observada diferença significativa entre o grupo ChCmS e o grupo Controle em  $T_{72h}$ , sendo este último inferior estatisticamente ( $P < 0,05$ ) no quesito frequência de batimento flagelar cruzado. Não houve diferença significativa nos outros tempos ( $T_{0h}$ ,  $T_{24h}$ ,  $T_{48h}$  e  $T_{96h}$ ).

Para os demais parâmetros de cinética (TM, RAP, VSL, VAP, LIN, STR, WOB e ALH) não foram observadas diferenças ( $P < 0,05$ ) entre os grupos tratados com adição dos derivados de quitosana e o grupo controle.

Estabelecendo uma correlação entre todas os parâmetros cinéticos avaliados, foi observado que no último tempo avaliado ( $T_{96h}$ ), com exceção de ALH, os grupos ChS, ChCm, ChCmS e Oligo, determinaram resultados numericamente superiores quando comparados com o grupo controle, sendo o grupo Oligo, aquele que dentre os grupos com derivados de quitosana, o que apresentou os valores mais altos em sete parâmetros, das onze consideradas.

A Tabela 4 mostra os efeitos da suplementação do diluidor com os diferentes derivados hidrossolúveis de quitosana nos parâmetros espermáticos avaliados por citometria de fluxo.

Tabela 4 - Análise da Integridade das Membranas Plasma e Acrosomal (iMPA), viabilidade e estabilidade em amostras de sêmen de carneiro suplementado com ou sem os derivados hidrossolúveis de quitosana, após acondicionamento refrigerado nos tempos 0 (T<sub>0h</sub>), 24 (T<sub>24h</sub>), 48 (T<sub>48h</sub>), 72 (T<sub>72h</sub>) e 96 hs (T<sub>96h</sub>)

Parâmetros	Grupos	Tempo de Avaliação				
		T <sub>0h</sub>	T <sub>24h</sub>	T <sub>48h</sub>	T <sub>72h</sub>	T <sub>96h</sub>
PNA-IP- (%)	Control	41,5 ± 3,7	42,9 ± 1,0 <sup>a</sup>	46,5 ± 2,1	40,9 ± 4,8	36,6 ± 6,0
	ChS	42,7 ± 5,5	44,5 ± 3,0 <sup>a</sup>	44,3 ± 4,6	41,3 ± 5,3	42,1 ± 5,6
	ChCm	41,0 ± 6,9	41,6 ± 5,3 <sup>a</sup>	41,9 ± 3,6	40,0 ± 8,7	43,2 ± 3,7
	ChCmS	38,7 ± 5,9	31,2 ± 6,1 <sup>b</sup>	43,8 ± 3,4	41,3 ± 7,3	40,9 ± 4,5
	Oligo	38,7 ± 6,7	37,3 ± 4,7 <sup>ab</sup>	45,7 ± 3,1	42,5 ± 3,3	43,2 ± 3,4
M540-YP- (%)	Control	25,5 ± 1,8	27,0 ± 0,4	24,3 ± 03,3 <sup>b</sup>	26,5 ± 3,4 <sup>b</sup>	21,3 ± 11,7
	ChS	34,1 ± 6,9	24,5 ± 5,2	27,0 ± 3,6 <sup>ab</sup>	27,4 ± 1,9 <sup>ab</sup>	29,0 ± 9,5
	ChCm	29,1 ± 8,4	29,3 ± 3,8	23,6 ± 2,9 <sup>b</sup>	30,4 ± 5,0 <sup>a</sup>	24,2 ± 12,8
	ChCmS	25,9 ± 1,6	28,8 ± 3,8	32,4 ± 4,1 <sup>a</sup>	27,6 ± 1,9 <sup>ab</sup>	28,7 ± 14,4
	Oligo	27,4 ± 10,2	30,6 ± 3,2	29,8 ± 2,6 <sup>ab</sup>	27,5 ± 2,2 <sup>ab</sup>	30,5 ± 10,8
Viáveis (%)	Control	41,0 ± 2,2 <sup>a</sup>	31,6 ± 5,5	34,4 ± 4,7	27,9 ± 1,2	32,9 ± 7,4
	ChS	42,5 ± 1,5 <sup>a</sup>	34,4 ± 6,6	32,3 ± 4,1	29,1 ± 1,3	34,7 ± 9,2
	ChCm	38,3 ± 2,2 <sup>ab</sup>	32,6 ± 6,1	29,8 ± 6,6	29,8 ± 5,2	35,9 ± 8,5
	ChCmS	33,0 ± 4,0 <sup>b</sup>	32,4 ± 5,4	34,4 ± 7,4	28,9 ± 2,4	30,8 ± 8,5
	Oligo	39,0 ± 3,8 <sup>ab</sup>	37,5 ± 5,0	34,7 ± 5,1	30,5 ± 4,9	36,0 ± 7,2

Control: diluidor Tris-gema de ovo sem os derivados de quitosana, ChCm: diluidor Tris-gema de ovo com quitosana carboximetilada, ChS: diluidor Tris-gema de ovo com quitosana sulfatada, ChCmS: diluidor Tris-gema de ovo com quitosana carboximetilada e sulfatada, e Oligo: diluidor Tris-gema de ovo com quitooligosacarídeos.

PNA-/PI- (células com acrossoma e membrana plasmática intactos, não coradas); YP-/M540- (células viáveis com membrana plasmática estável, não coradas); e viáveis (células viáveis, não coradas pelo YP).

Letras minúsculas distintas (a, b, c) quando presentes denotam diferenças estatística entre tratamentos (P <0,05) dentro de cada tempo.

Fonte: Elaborada pela autora (2018).

A análise de integridade de membrana plasmática acrosomal (iPAM), considerando cada tempo (T<sub>0h</sub>, T<sub>24h</sub>, T<sub>48h</sub>, T<sub>72h</sub> e T<sub>96h</sub>) de refrigeração, constatou-se que no T<sub>24h</sub>, o grupo controle apresentou maior porcentual de membrana e acrossoma íntegros, diferindo estatisticamente (P <0,05) do grupo ChCmS, embora não tenha diferido dos grupos ChS, ChCm e Oligo. Nos outros tempos (T<sub>0h</sub>, T<sub>72h</sub> e T<sub>96h</sub>) não foi observado diferença (P <0,05) entre tratamentos e o grupo controle, apesar dos grupos com adição dos derivados de quitosana apresentarem maior porcentagem de gametas com integridade de membrana plasmática e acrosomal, quando comparados com o grupo controle no T<sub>96h</sub>.

Na avaliação da estabilidade de membrana (M540-/YP-) não foi detectada diferença (P < 0,05) entre os tratamentos e o grupo controle em T<sub>0h</sub> e T<sub>24h</sub>. O grupo ChCmS apesar de ter apresentando maior porcentual de gametas estáveis em todos os tempos, houve diferença significativa em relação ao grupo controle apenas em T<sub>48h</sub>. O grupo ChCm apresentou um maior nível (P <0,05) de espermatozoides estáveis em

comparação com o grupo controle em T<sub>72h</sub>. Nenhuma diferença estatística dos grupos foi observada em T<sub>96h</sub>.

Na análise da viabilidade celular (YP-), houve diferença (P <0,05) entre grupo ChCmS e o grupo controle em T<sub>0h</sub>, sendo este último o que apresentou maior viabilidade celular, porém não diferiu significativamente dos grupos ChS, ChCm e Oligo. Nos outros tempos (T<sub>24h</sub>, T<sub>48h</sub>, T<sub>72h</sub> e T<sub>96h</sub>) não houve diferença significativa.

## **Discussão**

Estabelecendo uma correlação entre os parâmetros iPAM, M540-YP- e células viáveis, no último tempo avaliado (T<sub>96h</sub>) observa-se que os grupos Oligo, ChCm, ChS determinaram melhores resultados em comparação com o grupo controle, sendo o grupo Oligo, aquele que mais se destacou. Observa-se coerência nos resultados quando estes três parâmetros são analisados conjuntamente.

Durante o procedimento de refrigeração de sêmen, dois importantes processos acontecem. O primeiro é a produção de ROS (BAUMBER et al., 2005) que induzem mudanças na função e estrutura da membrana (GADEA et al.; 2005), o segundo é alteração no sistema de defesa antioxidante, incluindo uma redução nas concentrações dos agentes antioxidantes (BILODEAU et al., 2000). O efeito das ROS sobre as membranas do espermatozoide tem sido discutido, já que altas concentrações de ROS tem efeito deletério sobre a célula, dificultando sua sobrevivência por causar perda de sua integridade e funcionalidade devido a alterações desencadeadas pela peroxidação lipídica nas membranas celulares (BARROS, 2007; MAIA; BICUDO, 2009; COCCHIA et al., 2011). Assim, uma forma de melhorar a viabilidade espermática e consequente capacidade de fertilização, seria adicionar antioxidantes ao meio de preservação. Neste sentido, este estudo testou a hipótese de que a adição de derivados hidrossolúveis de quitosana favoreceria de alguma forma, a manutenção da viabilidade de espermatozoides sob refrigeração.

Com base nos resultados obtidos neste estudo, pode-se observar que todos os diluidores preparados com e sem adição dos diferentes derivados hidrossolúveis de quitosana apresentaram faixas semelhantes de osmolaridade e pH. Portanto, estes dois fatores não influenciaram nos resultados encontrados, quando avaliados os diferentes parâmetros de cinética e de integridade e estabilidade de membranas da célula espermática.

O mecanismo de atuação da quitosana que desencadeou os resultados observados nos parâmetros cinéticos podem estar relacionados à sua capacidade antioxidante. WANG et al. (2013) observaram correlação entre a diminuição da motilidade espermática e os danos causados pelas ROS, através da peroxidação lipídica às membranas plasmática, acrossomal e mitocondrial, foi observado que alterações transitórias na permeabilidade da abertura do poro mitocondrial, ocasionam a liberação de citocromo c e induzem a apoptose celular. A quitosana, como um polissacarídeo de caráter catiônico, possui a habilidade de doar prótons, atuando, dessa forma, contra diferentes espécies de radicais instáveis, pois o radical livre reage com o grupo  $\text{NH}_2$  da quitosana, formando o grupo  $\text{NH}^{3+}$  em consequência da absorção do íon hidrogênio da solução. Além destes grupos, as hidroxilas dos carbonos 3 e 6 do anel piranosídico também podem reagir com radicais livres instáveis para a formação de moléculas estabilizadas (KIM; RAJAPAKSE, 2005; YEN et al., 2008; ARANAZ et al., 2009; ARANCIBIA et al., 2014).

Quando foram analisados a influência dos grupos suplementados com os derivados de quitosana nos espermatozoides por citometria de fluxo, percebeu-se que nos parâmetros em que se observou diferença significativa, o efeito não foi manifestado antes das primeiras 24h, fato que talvez demonstre que a quitosana necessita de um tempo para atuar nas células, interferindo, assim, em sua dinâmica. Ou ainda, as primeiras 24h não foram suficientes para o sistema ter sido submetido a um estresse oxidativo considerável para que fossem demonstrados os efeitos dos antioxidantes. Afinal, um tratamento antioxidante é eficiente apenas em sistemas que estejam submetidos ao estresse oxidativo, que se caracteriza por um desbalanço entre uma maior produção de espécies reativas de oxigênio e/ou uma menor produção de antioxidante (JONES; MANN, 1977; HALLIWELL, 1991).

Um tratamento antioxidante pode também ser deletério ao espermatozoide, apesar das espécies reativas de oxigênio apresentam importante papel na fisiologia natural desta célula (LAMIRANDE et al., 1997). Apesar disto, nenhum dos grupos tratados com os derivados de quitosana apresentou efeito danoso a estes gametas, pois não foi evidenciado no maior tempo de análise ( $T_{96h}$ ). Pelo contrário, os grupos com os derivados apresentaram melhor desempenho nos parâmetros de cinética espermática, integridade de membrana plasmática e acrossomal, estabilidade e viabilidade espermática.

Com relação aos resultados observados na estabilidade e viabilidade espermática, acredita-se que os mecanismos de atuação dos derivados de quitosana, além do mecanismo antioxidante descrito acima, seja semelhante ao descrito por Koshimoto et al. (2000), Koshimoto et al. (2002) e Fernandez-Santos et al. (2007). Estes autores, ao avaliarem os efeitos da glicose, manose, maltose e sacarose na criopreservação espermática, observaram que estes açúcares interagem diretamente com a bicamada fosfolipídica que constitui as membranas dos espermatozoides, promovendo sua organização e estabilização, preservando, assim, sua funcionalidade, sem impedir a capacitação destes gametas. Nenhuma atuação protetora sobre a integridade de membrana foi demonstrada por estes açúcares.

O mecanismo de atuação da quitosana, descrito nos diferentes tipos celulares, envolvem interação química (entre as cargas positivas dos grupos amínicos livres da quitosana com as cargas negativas dos receptores) e ativação celular ocasionando, muitas vezes, a liberação de fatores de crescimento e moléculas sinalizadoras, como foi observado em fibroblastos, macrófagos, neutrófilos, hemácias, células tumorais e células-tronco. Os oligossacarídeos gerados a partir da hidrólise de quitosana são capazes, ainda, de se infiltrar nas células, regulando a expressão de proteínas (XIA, 2003; COSTA SILVA et al., 2006; MUZZARELLI, 2009; WIJESEKARA et al., 2011). Nas células espermáticas, entretanto, não se sabe ao certo, como os derivados de quitosana atuam, pois não há relatos desta na criopreservação de sêmen de nenhuma espécie.

Yang et al. (2016) também concordam que mais informações sobre a capacidade antioxidante de polissacarídeos na criopreservação de espermatozoides são requeridas na elucidação dos seus mecanismos de atuação. Eles avaliaram o efeito de polissacarídeos de *Rhodiola rósea* na criopreservação de sêmen de javali e observaram que a concentração ótima (4 a 8 mg/L) proporcionou grande capacidade crioprotetora em espermatozoides congelados-descongelados, melhorando significativamente a motilidade espermática, atividade mitocondrial, integridade acrosomal e integridade da membrana plasmática.

## **Conclusão**

Diante dos resultados do presente estudo, foi observado que os derivados de quitosana foram eficazes em alguns parâmetros de cinética espermática, na

estabilidade de membrana e viabilidade espermática. Estes resultados sugerem a necessidade de se realizar estudos adicionais visando avaliar a dose-resposta desses derivados de quitosana associados aos diluentes, a fim de se esclarecer a atuação destes no comportamento da célula espermática e determinar as concentrações ideais. Neste estudo, foi obtido sinais de que estas biomoléculas podem ser uma alternativa no que se refere à melhoria da qualidade e da viabilidade de sêmen refrigerado.

### Referências

- ARANCIBIA, M.Y.; ALEMÁN, A.; CALVO, M.M.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C. Antimicrobial and antioxidant chitosan solutions enriched with active shrimp (*Litopenaeus vannamei*) waste materials. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 710-717, 2014.
- BAUMBER, J.; BALL, B. A. Determination of glutathione peroxidase and superoxide dismutase-like activities in equine spermatozoa, seminal plasma, and reproductive tissues. **American Journal of Veterinary Research**, v. 66, n. 8, p.1415-1419, 2005.
- BARROS, P. M. H. **Estresse oxidativo e integridade do DNA em sêmen resfriado de gatodo-mato (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER,1775)**. 2007. 120 f. Tese (Doutor em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- BILODEAU, J.F.; SUVRO-CHATTER, J.E.E.; SIRARD, M.A. Levels of antioxidant defenses are decrease in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**, v.55, p.282-288, 2000.
- CAHÚ, T.B.; SANTOS, S.D.; MENDES, A.; CÓRDULA, C. R.; CHAVANTE, S. F.; CARVALHO JR., L.B.; NADER, H.B.; BEZERRA, R.S. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 570–577, 2012.
- CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R L. Extração, estruturas e propriedades de  $\alpha$  e  $\beta$ -quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.
- CARNEIRO, P. C.; AZEVEDO, H. C.; SANTOS, J. P.; MARIA, A. N. Cryopreservation of tambaqui (*Colossoma macropomum*) semen: extenders, cryoprotectants, dilution ratios and freezing methods. **Cryoletters**, v.33, n. 5, p. 385-393, 2012.
- CHO, Y. S.; KIM, S. K.; AHN, C. B.; JE, J. Y. Preparation, characterization, and antioxidant properties of gallic acid-grafted-chitosans. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1617-1622. 2011.

COCCHIA, N.; PASOLINI, M. P.; MANCINI, R.; PETRAZZUOLO, O.; CRISTOFARO, I.; ROSAPANE, I.; SICA, A.; TORTORA, G.; LORIZIO, R. PARAGGIO, G.; MANCINI, A. Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1201-1210, 2011.

COSTA SILVA H. S.R.; SANTOS K. S. C. R.; FERREIRA E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776-785, 2006.

FONSECA, J.F.; CRUZ, R.C.; OLIVEIRA, M.E.F.; SOUZA, J.M.G.; FERREIRA, M.I.C. Técnicas Aplicadas à Reprodução de Ovinos e Caprinos. **Embrapa**, 2012.

FONSECA, J. F.; CRUZ, R. C.; OLIVEIRA, M. E. F.; SOUZAFABJAN, J. M. G.; VIANA, J. H. M. Biotecnologias aplicadas à reprodução de ovinos e caprinos. **Embrapa**, 2014

GADEA, J.; GARCIA-VAZQUEZ, F.; MATÁS, C.; GARDÓN, J.C.; CÁNOVAS, S.; GRAHAM, J.K.; MOCÉ, E. Fertility evaluation of frozen/thawed semen. **Theriogenology**, v.64, p.492-504, 2005.

GARCÍA, F., DUCOLOMB, Y., MIRANDA-CASTRO, S. P., DE LA TORRE-SÁNCHEZ, J. F.; ROMO, S. 260 evaluation of porcine in vitro production with the addition of chitosan to culture media. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 1, p. 219-220, 2015.

GIBB, Z.; AITKEN, R.J. Recent developments in stallion semen preservation. *Journal of Equine Veterinary Science*. DOI: 10.1016/j.jevs.2016.06.006. 2016.

GÓMEZ-TORRES, M. J., MEDRANO, L., ROMERO, A., FERNÁNDEZ-COLOM, P. J.; AIZPURUA, J. (2017). Effectiveness of human spermatozoa biomarkers as indicators of structural damage during cryopreservation. **Cryobiology**, v. 78, p. 90-94.

GUERRA, M.M.P.; CÂMARA, D.R.; SILVA, E. C. B.; SILVA S.V. Uso de antioxidantes no sêmen ovino. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 354-364, 2012.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *American Journal of Medicine*, v. 91, p. 14-22, 1991.

JONES, R.; MANN, T. Damage to spermatozoa by peroxidation endogenous phospholipids. **Journal of Reproduction and Fertility**, v. 50, p. 261-268, 1977.

KANATT, S.R.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Chitosan glucose complex – A novel food preservative. **Food Chemistry**, v. 106, p. 521–528, 2008.

KIM, S. K & RAJAPAKSE, N. Enzymatic production and biological activities of chitosan oligosaccharides (COS): A review. **Carbohydrate Polymers**, v. 62, p. 357-368, 2005.

KOSHIMOTO, C.; GAMLIEL, E.; MAZUR, P. Effect of osmolality and oxygen tension on the survival of mouse sperm frozen to various temperatures in various concentrations of glycerol and raffinose. **Cryobiology**, v. 41, p. 204–231, 2000.

KOSHIMOTO, C.H. & MAZUR, P. Effects of cooling and warming rate to and from 70 C, and effect of further cooling from 70 to 196 C on the motility of mouse spermatozoa. **Biology of Reproduction**, v. 66, p.1477–1484, 2002.

LAMIRANDE, E.; JIANG, H.; ZINI, A; KODAMA H.; GAGNON, C. Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of Reproduction**. v. 2, n. 1, p. 48-54, 1997.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p. 183-193, 2009.

MARIAPPAN, M. R.; ALAS, E. A.; WILLIAMS, J. G.; PRAGER, M. D. Chitosan and chitosan sulfate have opposing effects on collagen–fibroblast interactions. **Wound Repair and Regeneration**, v. 7, p.400–406, 1999.

MOSCARDINI, M. M.; SCOTT, C.; MOURA, D. S.; LOURENÇO, T.T.; ARISTIZÁBAL, V.H.V.; SOUZA, F.F. Viabilidad de espermatozoides ovinos mantenidos a 5° y 15°C en diferentes sistemas de refrigeración. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.21, p. 122–126, 2014.

MUZZARELLI, R. A. A.; MUZZARELLI, C. Chitosan chemistry: Relevance to the biomedical sciences. **Advances in Polymer Sciences**, v. 186, p. 151–209, 2005.

MUZZARELLI, R.A.A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 167–82, 2009.

NICHI, M. **Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídeos seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS**. 2003, 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

RAMESH, H.P.; VISWANATHA, S.; THARANATHAN, R.N. Safety evaluation of formulations containing carboxymethyl derivatives of starch and chitosan in albino rats. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, p. 435–441, 2004.

RONCAL, T.; OVIEDO, A.; ARMENTIA, I. L.; FERNANDEZ, L.; VILLARÁN, C. High yield production of monomer-free chitosan oligosaccharides by pepsin catalyzed hydrolysis of a high deacetylation degree chitosan. **Carbohydrate Research**, v. 342, p.2750–2756, 2007.

SUN, T.; YAO, Q.; ZHOU, D.; MAO, F. Antioxidant activity of N-carboxymethyl chitosan oligosaccharides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p.5774–5776, 2008.

UPADHYAYA, L., SINGH, J., AGARWAL, V.; TEWARIA, R.P. (2013) Biomedical applications of carboxymethyl chitosans. **Carbohydrate Polymers**, v. 91, p. 452–466.

WANG, B.; VAN VELDHOFEN, P.; BREES, C.; RUBIO, N.; NORDGREN, M.; APANASETS, O.; KUNZE, M.; BAES, M.; AGOSTINIS, P.; FRANSEN, M. Mitochondria are targets for peroxisome-derived oxidative stress in cultured mammalian cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 882–894, 2013.

WIJESEKARA, I., PANGESTUTI, R.; KIM, S. K. Biological activities and potential health benefits of sulfated polysaccharides derived from marine algae. **Carbohydrate Polymers**, v. 84, n. 1, p.14-21, 2011.

XIA, W.S. Physiological activities of chitosan and its application in functional foods. **Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology**, v. 3, n. 1, p.77 - 81, 2003.

YANG, SHEN-MIN; WANG, TING; WEN, DUAN-GAI; HOU, JIAN-QUAN; LI, HAI-BO. Protective effect of *Rhodiola rosea* polysaccharides on cryopreserved boar sperm. **Carbohydrate Polymers**, v. 135, p. 44–47, 2016.

YEN, M-T.; YANG, J-H; MAU, J-L. Antioxidant properties of chitosan from crabshells. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, p. 840–844, 2008.

ZHONG, Z.; ZHONG, Z.; XING, R.; LI, P.; MO, G. The preparation and antioxidant activity of 2-[phenylhydrazine (or hydrazine)-thiosemicarbazone]-chitosan. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 47, p.93–97, 2010.

## 5 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo indicam que os derivados hidrossolúveis de quitosana obtidas a partir de resíduos de tratamento de camarão *Litopenaeus vannamei*, apresentaram baixa toxicidade, efeito bacteriostático e potencial para contribuir significativamente como antioxidante. Também foi evidenciado, embora os resultados ainda sejam iniciais, que a inclusão de derivados de quitosana como suplemento antioxidante em diluente preservação de sêmen proporciona melhora em parâmetros essenciais relacionados à qualidade do sêmen, tornando-se esta, uma alternativa útil para aprimoramento dos atuais procedimentos empregados na criopreservação, além de proporcionar avanços nas biotecnologias aplicadas à reprodução. Dessa forma, este estudo identifica a oportunidade de obter biomoléculas com propriedades interessantes, a partir de um material abundante e de baixo custo que são os subprodutos do processamento de pescados, possibilitando um amplo espectro de aplicações biotecnológicas.

## REFERÊNCIAS

- AMANN, R.P.; PICKETT, B.W. Principles of cryopreservation and review of cryopreservation of stallion spermatozoa. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 7, p. 145-173, 1987.
- ARANAZ, I.; MENGÍBAR, M.; HARRIS, H.; PAÑOS, I.; MIRALLES, B.; ACOSTA, N.; GALED, G.; HERAS, A. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. **Current Chemical Biology**, v. 3, p. 203-230, 2009.
- ARANCIBIA, M.Y.; ALEMÁN, A.; CALVO, M.M.; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; MONTERO, P.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C. Antimicrobial and antioxidant chitosan solutions enriched with active shrimp (*Litopenaeus vannamei*) waste materials. **Food Hydrocolloids**, v. 35, p. 710-717, 2014.
- AURICH, J.E.; SCHÖNHERR, U.; HOPPE, H.; AURICH, C. Effects of antioxidants on motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, p. 185-192, 1997.
- AURICH, C. Recent advances in cooled-semen technology. **Animal Reproduction Science**, v. 107, n. 3, p. 268-275, 2008.
- AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e Quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.
- BAG, S.; JOSHI, A.; NAQVI, S. M. K.; RAWAT, P. S.; MITTAL, J. P. Effect of freezing temperature, at which straws were plunged into liquid nitrogen, on the post-thaw motility and acrosomal status of ram spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 72, n. 3, p. 175-183, 2002.
- BARROS, P. M. H. **Estresse oxidativo e integridade do DNA em sêmen resfriado de gato-mato (*Leopardus tigrinus*, SCHREBER, 1775)**. 2007. 120 f. Tese (Doutor em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- BEZERRA, R. S.; LINS, E. J. F.; ALENCAR, R. B.; PAIVA, P. M. G.; CHAVES, M.E. C.; COELHO, L. C. B. B.; CARVALHO JR. L. B. Alkaline proteinase from intestine of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Process Biochemistry**, v. 40, p.1829-1834, 2005.
- BEZERRA, R.S. Aproveitamento integral do pescado - Novos horizontes para o fortalecimento da cadeia produtiva. **Revista Panorama da Aquicultura**, v. 25, n.148, 2015.
- BHAGWAT, P.K.; DANDGE, P. B. Isolation, characterization and valorizable applications of fish scale collagen in food and agriculture industries. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 234–240, 2016.

BITTENCOURT, R. F.; RIBEIRO FILHO, A. D. L.; ALVES, S. G. G.; BISCARDE, C. E.; VASCONCELOS, M. F.; OBA, E. Cryopreservation of goat semen: the effect of freezing rate and equilibration time. **Ciência Animal**, v. 17, n. 2, p. 75-82, 2007.

BOUGATEF, A. Trypsins from fish processing waste: characteristics and biotechnological applications e comprehensive review. **Journal of Cleaner Production**, v. 57, p. 257-265, 2013.

BUBLAT, A.; FISCHER, D.; BRUSLUND, S.; SCHNEIDER, H.; MEINECKE-TILLMANN, S.; WEHREND, A.; LIERZ, M. Seasonal and genera-specific variations in semen availability and semen characteristics in large parrots. **Theriogenology**, v. 91, p. 82-89, 2017.

CAHÚ, T.B.; SANTOS, S.D.; MENDES, A.; CÓRDULA, C. R.; CHAVANTE, S. F.; CARVALHO JR., L.B.; NADER, H.B.; BEZERRA, R.S. Recovery of protein, chitin, carotenoids and glycosaminoglycans from Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) processing waste. **Process Biochemistry**, v. 47, p. 570–577, 2012.

CAHÚ, T. B. **Extração de Biomoléculas de resíduos do processamento de camarão marinho: produção, caracterização e aplicação de quitinosa e derivados hidrossolúveis em modelos biomédicos**. 2014. 199 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2014.

CAHÚ, T.B.; SILVA, R.A.; SILVA, R.P.F.; SILVA, M.M.; ARRUDA, I.R.S.; SILVA, J.F.; COSTA, R.N.P.B.; SANTOS, S.D.; NADER, H.B.; BEZERRA, R.S. Evaluation of Chitosan-Based Films Containing Gelatin, Chondroitin 4-Sulfate and ZnO for Wound Healing. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. DOI 10.1007/s12010-017-2462-z. 2017

CÂMARA, D. R.; GUERRA, M. M. P. Refrigeração e criopreservação do sêmen ovino: danos inerentes à técnica e influência da suplementação do meio com antioxidantes sobre a qualidade espermática. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 1, p. 33-40, 2011.

CAMPANA-FILHO, S. P.; BRITTO, D.; CURTI, E.; ABREU, F. R.; CARDOSO, M. B.; BATTISTI, M. V.; SIM, P. C.; GOY, R. C.; SIGNINI, R.; LAVALL, R L. Extração, estruturas e propriedades de  $\alpha$  e  $\beta$ -quitina. **Química Nova**, v. 30, n. 3, p. 644-650, 2007.

CHIEN, P; CHOU, C. Antifungal activity of chitosan and its application to control post-harvest quality and fungal rotting of Tankan citrus fruit (*Citrus tankan Hayata*). **Journal Science Food Agriculture**, v. 86, p.1964-1969, 2006.

CORRÊA, N.C.F.; MACEDO, C.S.; MORAES, J.F.C.; MACHADO, N.T.; FRANCA, L.F. Characteristics of the extract of *Litopenaeus vannamei* shrimp obtained from the cephalothorax using pressurized CO<sub>2</sub>. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 66, p.176– 180, 2012.

DAMIAN, C.; LUIZ HENRIQUE BEIRÃO, L.H.; FRANCISCO, A.; ESPÍRITO SANTO, M.L.P.; TEIXEIRA, E. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, n. 2, p. 195-205, 2005.

DHAMI, A. J.; SAHNI, K. L.; MOHAN, G.; JANI, V. R. Effects of different variables on the freezability, post-thaw longevity and fertility of buffalo spermatozoa in the tropics. **Theriogenology**, v. 46, n. 1, p. 109-120, 1996.

FAO. The State of World Fisheries and Aquaculture 2006. **Food and Agriculture Organization of The United Nations**, Fisheries e Aquaculture Departament. Roma, 2016.

FÜRST, R. **Efeito de diferentes tempos de equilíbrio, taxas de congelamento e concentrações espermáticas na fertilidade do sêmen eqüino**. 2006. 96 f. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

ELDMAN, E. C.; NELSON. R. W. Artificial insemination, fresh extended semen, and frozen semen. In: \_\_\_\_ (eds), **Canine and Feline Endocrinology and Reproduction**. Philadelphia: W. B. Saunders, p. 734-739, 1996.

EMBRAPA. Aquicultura brasileira cresce 123% em dez anos. **Pesca e Aquicultura**, 13 dez, 2016. Disponível em: <https://www.embrapa.br/pescaeaquicultura>. Acesso em 27. mar. 2017.

GHALY, A.E.; RAMAKRISHNAN, V.V.; BROOKS, M.S.; BUDGE, S.M.; DAVE, D. Fish Processing Wastes as a Potential Source of Proteins, Amino Acids and Oils: A Critical Review. **Journal of Microbial and Biochemical Technology**, v. 5, p. 107-129, 2013.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; GIMÉNEZ, B.; LÓPEZ-CABALLERO, M. E.; MONTERO, M.P. Functional and bioactive properties of collagen and gelatin from alternative sources: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 8, p. 1813-1827, 2011.

GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; PÉREZ-MATEOS, M.; GÓMEZ-ESTACA, J.; LÓPEZ-CABALLERO, E.; GIMÉNEZ, B.; MONTERO, P. Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, n. 1, p. 3-16, 2009.

GOY, R.C.; ASSIS, O.B.G.; CAMPANA-FILHO, S.P. Produção de esferas de quitosana. **Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, v. 33, p. 31, 2004.

GUERRA, M.M.P.; EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C. Papel de oxidantes e anti-oxidantes na andrologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.28, p. 187-195, 2004.

GUERRA, M.M.P.; CÂMARA, D.R.; SILVA, E. C. B.; SILVA S.V. Uso de antioxidantes no sêmen ovino. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 354-364, 2012.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. **American Journal of Medicine**, v. 91, p. 14-22, 1991.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.MC. Free radicals in biology and medicine. **Oxford University Press**, USA, 2015.

HAMMERSTEDT, R.H. Maintenance of bioenergetic balance in sperm and prevention of lipid peroxidation: a review of the effect on design of storage preservation systems. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 5, n. 6, p. 675-690, 1993.

HELANDER, I.; NURMIAHO-LASSILA, E.; AHVENAINEN, R.; RHOADES, J.; ROLLER, S. Chitosan disrupts the barrier properties of the outer membrane of Gram-negative bacteria. **International Journal Food Microbiology**, v. 71, p.235-44, 2001.

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

IRITANI, A.; NISHIKAWA, A. Studies on the egg-coagulating enzyme in goat semen; IV. On the position of yolk constituents attacked by the coagulating enzyme. **Japanese Journal of Animal Reproduction**, v. 10, p. 44-51, 1961.

ISLAM, A.; YASINA, T.; REHMAN, I.U. Synthesis of hybrid polymer networks of irradiated chitosan/poly (vinyl alcohol) for biomedical applications. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 96, p. 115–119, 2014.

JAROSZ, Ł.; GRĄDZKI, Z.; KALINOWSKI, M.; LASKOWSKA, E. Quality of fresh and chilled-stored raccoon dog semen and its impact on artificial insemination efficiency. **BMC veterinary research**, v. 12, n. 1, p. 224, 2016.

KANATT, S.R.; CHANDER, R., SHARMA, A. Chitosan glucose complex – A novel food preservative. **Food Chemistry**, v. 106, p. 521–528, 2008.

LAYEK, S. S.; MOHANTY, T. K.; KUMARESAN, A.; PARKS, J. E. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. **Animal Reproduction Science**, v. 172, p. 1-9, 2016.

LEAHY, T.; MARTI, J. I.; MENDOZA, N.; PÉREZ-PÉ, R.; MUIÑO-BLANCO, T.; CEBRIÁN-PÉREZ, J. A.; EVANS, G.; MAXWELL, W. M. C. High pré-freezing dilution improves post-thaw function of RAM spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 119, p. 137-146, 2010.

LEITE, P. A.; SCHREDER, G. G.; ALMEIDA, C. L. R.; ZÚCCARI, C. E. S. N.; COSTA E SILVA, E. V. Criopreservação do sêmen bovino. **UNOPAR Científica Ciências. Biológicas e da Saúde**, v. 13, n. 4, p. 279-286, 2011.

LIERZ, M.; REINSCHMIDT, M.; MULLER, H.; WINK, M.; NEUMANN D. A novel method for semen collection and artificial insemination in *Large parrots* (Psittaciformes). **Scientific reports**, v.3, p. 2066, 2013.

LIU, X.F.; GUAN, T.L.; DONG, Z.Y.; ZHI, L.; YAO, K.D. Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. **Journal of Applied Polymer Science**, v.79, n. 7, p.1324-35, 2001.

MAIA, M. S.; BICUDO, S. D. Radicais livres, antioxidantes e função espermática em mamíferos: uma revisão. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 4, p. 183-193, 2009.

MAIA, V. N. **Efeito do diluente (Botu-sêmen® e ACP®) e da adição de antioxidante (glutathione peroxidase e cisteína) na viabilidade de espermatozoides refrigerado de equinos**. 2010. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2010.

MAJETI, N.V.; KUMAR, R. A review of chitin and chitosan. **Reactive and Functional Polymer**, v. 46, p. 1–27, 2000.

MARIAPPAN, M. R.; ALAS, E. A.; WILLIAMS, J. G.; PRAGER, M. D. Chitosan and chitosan sulfate have opposing effects on collagen–fibroblast interactions. **Wound Repair and Regeneration**, v. 7, p.400–406, 1999.

MEDEIROS, F. S.; MARCUSCHI, M.; ASSIS, C. R. D.; SILVA, J. F.; ESPOSITO, T.S.; BEZERRA, R. S. Potential Laundry Detergent Applications of Mutton Snapper (*Lutjanus analis*) Proteases. **Journal of Fisheries Sciences**, v. 9, p. 63-69, 2015.

MOURYA, V.K.; INAMDAR, M.M. Chitosan-modifications and applications: Opportunities galore. **Reactive & Functional Polymers**, v. 68, p. 1013–1051, 2008.

MOSCA, F.; MADEDDU, M.; SAYED, A. A.; ZANIBONI, L.; IAFFALDANO, N.; CEROLINI, S. Combined effect of permeant and non-permeant cryoprotectants on the quality of frozen/thawed chicken sperm. **Cryobiology**, v. 73, n. 3, p. 343-347, 2016.

MUZZARELLI, R.A.A.; TOSI, G.; FRANCESGANGELI, O.; MUZZARELLI, C. Alkaline chitosan solutions. **Carbohydrate Research**, v. 338, n. 21, p. 2247-2255, 2003.

MUZZARELLI, R.A.A. Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 167–82, 2009.

NASCIMENTO, I. A. Aquicultura marinha e ambiente: a busca de tecnologias limpas para um desenvolvimento sustentado. **TECBAHIA–Revista Baiana de Tecnologia**, v. 3, p. 44-67, 1998.

NICHI, M. **Sistemas de proteção enzimática e níveis de peroxidação espontânea dos lipídeos seminais de touros zebuínos e taurinos criados a campo na região de Dourados, MS**. 2003, 101 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

O'BRIEN, J. K.; NOLLENS, H. H.; SCHMITT, T. L.; STEINMAN, K. J.; DUBACH, J.M.; ROBECK, T. R. Male reproductive physiology and the development of artificial insemination in the Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) using chilled-stored semen. **Journal of Zoo and Wildlife Medic**, v. 47, n. 1, p. 206-222, 2016.

OH, H.; KIM, Y.; CHANG, E.; KIM, J. Antimicrobial Characteristics of Chitosans against Food Spoilage Microorganisms in Liquid Media and Mayonnaise. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, n.11, p.2378-2383, 2001.

OHATA, P. M.; WENTZ, I.; BERNARDI, M. L.; CASTAGNA, C.; BORTOLOZZO, F. P. Viabilidade do sêmen suíno congelado submetido a um período de equilíbrio pré-congelamento com ou sem a presença do plasma seminal. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v. 29, n. 2, p. 123-129, 2001.

PARKS, J. E.; HAMMERSTEDT, R. H. Development changes occurring in the lipids of ram epididymal spermatozoa plasma membrane. **Biology of Reproduction**, v. 32, n. 3, p. 653- 668, 1985.

PHISUT, N.; JIRAPORN, B. Characteristics and antioxidant activity of Maillard reaction products derived from chitosan-sugar solution. **International Food Research Journal**, v. 20, n.3, p. 1077-1085, 2013.

PITAKPOOLSIL, W.; HUNSOM, M. Treatment of biodiesel wastewater by adsorption with commercial chitosan flakes: Parameter optimization and process kinetics. **Journal of Environmental Management**, v.133, p.284-292, 2014.

POMMER, A.C.; LINFOR, J.J.; MEYERS, S.A. Capacitation and acrosomal exocytosis are enhanced by incubation of stallion spermatozoa in a commercial semen extender. **Theriogenology**, v.57, p.1493-1501, 2002.

PRASHANTH, K.V. H.; THARANATHAN, R.N. Chitin/chitosan: modifications and their unlimited application potential -an overview. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p.117-131, 2007.

QIN, Y.; XING, R.; LIU, S.; LIA, K.; MENGA, X.; LIA, R.; CUIA, J.; LIA, B.; LI P. Novel thiosemicarbazone chitosan derivatives: Preparation, characterization, and antifungal activity. **Carbohydrate Polymers**, v. 87, p. 2664–2670, 2012.

RAMESH, H.P.; VISWANATHA, S.; THARANATHAN, R.N. Safety evaluation of formulations containing carboxymethyl derivatives of starch and chitosan in albino rats. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, p. 435–441, 2004.

RICHARD, A. G. The integument of arthropods, University of Minnesota. **Press: Minneapolis**, p.110, 1951.

RINAUDO, M. Chitin and chitosan: Properties and applications. **Progress in Polymer science**, v. 31, p. 603–632, 2006.

RODRÍGUEZ-PEDROSO, A.T.; RAMÍREZ-ARREBATO, M.A.; RIVERO-GONZÁLEZ, D.; BOSQUEZ- MOLINA, E.; BARRERA-NECHA, L.L.; BAUTISTA-BAÑOS, S.

Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosana en microorganismos fitopatógenos. **Revista Chapingo Serie Horticultura**, v. 15, n. 3, p. 307-317, 2009.

RONCAL, T.; OVIEDO, A.; ARMENTIA, I. L.; FERNANDEZ, L.; VILLARÁN, C. High yield production of monomer-free chitosan oligosaccharides by pepsin catalyzed hydrolysis of a high deacetylation degree chitosan. **Carbohydrate Research**, v. 342, p.2750–2756, 2007.

ROY, A. Egg yolk coagulating enzyme in the semen and Cowper's gland of goat. **Nature**, v. 159, p. 318-319, 1957.

SAEEDNIA, S.; NASHTAEI, M. S.; BAHADORAN, H.; ALEYASIN, A.; AMIDI, F. Effect of nerve growth factor on sperm quality in asthenozoospermic men during cryopreservation. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 14, n.1, p. 29, 2016.

SALAH, T.A.; MOHAMMAD, A.M.; HASSAN, M.A.; EL-ANADOULI, B. E. Development of nano-hydroxyapatite/chitosan composite for cadmium ions removal in wastewater treatment. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 45, n. 4, p. 1571- 1577, 2013.

SALMITO-VANDERLEY; C.S.B.; PINHEIRO, J.P.S.; ALMEIDA, P.S.; LOPES J.T.; LEITE, L.V. Metodologias para criopreservação e mecanismos de avaliação do sêmen de peixes Characiformes. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 8, p. 343-350, 2014.

SANSONE, F.; PICERNO, P.; MENCHERINI, T.; PORTA, A.; LAURO, M. R.; RUSSO, P.; AQUINO, R. P. Technological properties and enhancement of antifungal activity of a *Paeonia rockii* extract encapsulated in a chitosan-based matrix. **Journal of Food Engineering**, v.120, p. 260–267, 2014.

SANTOS, J. E. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.13, p.242-249, 2003.

SANTOS, S.D.; CAHÚ, T.B.; FIRMINO, G.O.; CASTRO, C.M.M.B.; CARVALHO JR, L, B.; BEZERRA, R. S.; LIMA FILHO, J.L. Shrimp waste extract and astaxanthin: rat alveolar macrophage, oxidative stress and inflammation. **Journal of Food Science**, v.77, n.7, p.41-46, 2012.

SENGOKU, K.; TAMATE, K.; YOSHIDA, T.; TAKAOKA, Y.; MIYAMOTO, T.; ISHIKAWA, M. Effects of low concentrations of nitric oxide on the zona pellucida binding ability of human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v. 69, n. 3, p. 522-527, 1998.

SILVA, A. R.; CARDOSO, R. D. C. S.; UCHOA, D. C.; DA SILVA, L. M. Effect of tris-buffer, egg yolk and glycerol on canine semen freezing. **The Veterinary Journal**, v. 164, n. 3, p. 244-246, 2002.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E.I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29.n. 4, p.776-785, 2006.

SILVA, E. C. B. ; GUERRA, M. M. P. . Terapias antioxidantes na criopreservação espermática. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v. 111, p. 143-149-149, 2012.

SILVA, E.F.; CARDOSO, T.F.; TAVARES, G.C.; COSTA, V.G.G.; SILVA, J.F.; VARELA JR., A.S.; LEITE, F.P.L.; CORCINI, C.D. Criopreservação de sêmen suíno e a pesquisa com antioxidantes. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, v.108, n. 587-588, p. 103-112, 2013.

SILVA, J. F. X.; RIBEIRO, K.; SILVA, J. F.; CAHÚ, T. B.; BEZERRA, R. S. Utilization of tilapia processing waste for the production of fish protein hydrolysate. **Animal Feed Science and Technology**, v. 196, p. 96-106, 2014.

SOARES, A. T.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. **Tecnologia & Ciência Agropecuária**, v. 3, n. 2, p. 53-63, 2009.

SPALLANZANI L. Opuscoli di Fisica Animale, e Vegetabile. **Modena: Presso la Societa' Tipographica**, 1776.

SPIN-NETO, R.; PAVONE, C.; FREITAS, R.M.; MARCANTONIO, R.A.C.; MARCANTONIO-JR, E. Chitosan based biomaterials with medical and dental application: literature review. **Revista Odontologia UNESP**, v.37, n. 2, p. 155-161, 2008.

SQUIRES, E.L.; PICKETT, B.W.; GRAHAM, D.K.et al. Cooled and frozen stallion semen. **Animal Reproduction and Biotechnology Laboratory**, n. 9 p. 3-36, 1999.

SUN, T.; YAO, Q.; ZHOU, D.; MAO, F. Antioxidant activity of N-carboxymethyl chitosan oligosaccharides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p.5774–5776, 2008.

TIWARI, A.; TEKCAN, M.; SATI, L.; MURK, W.; STRONK, J.; HUSZAR, G. A new media without animal component for sperm cryopreservation: motility and various attributes affecting paternal contribution of sperm. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, p. 1-11, 2017.

VALLE, B.C.S.; DANTAS, E.M.; SILVA, J.F.X.; BEZERRA, R.S.; CORREIA, E.S.; PEIXOTO, S.R.M.; SOARES, R.B. Replacement of fishmeal by fish protein hydrolysate and biofloc in the diets of *Litopenaeus vannamei* postlarvae. **Aquaculture Nutrition**, v. 21, n. 1, p. 105-112, 2015.

VARAGO, F.C.; MOUSTACAS, V.S.; CRUZ, B. C.; CARVALHO, B.C.; MENDONÇA, L.F.; LAGARES, M.A.; HENRY, M.R.J.M. Biotécnicas da reprodução aplicadas a pequenos ruminantes. **Ciência Animal Brasileira**, Belo Horizonte, v.1, p. 1-17, 2009.

VIDAL, A. H.; BATISTA, A. M.; DA SILVA, E. C. B.; GOMES, W. A.; PELINCA, M. A.; SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 109, n. 1, p. 47-51, 2013.

VINO, A.B.; RAMASAMY, P.; SHANMUGAM, V.; SHANMUGAM, A. Extraction, characterization and in vitro antioxidative potential of chitosan and sulfated chitosan from Cuttlebone of *Sepia aculeate* Orbigny, 1848. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, n. 1, p. S334-S341, 2012.

VISHWANATH, R.; SHANNON, P. Do sperm cells age? A review of the physiological 363 changes in sperm during storage at ambient temperature. **Reproduction, Fertility and Development**, v.9, p. 321-332, 1997.

WANG. B.; VAN VELDHOFEN. P.; BREES. C.; RUBIO N.; NORDGREN M.; APANASETS, O.; KUNZE. M.; BAES M., AGOSTINIS P., FRANSEN M. Mitochondria are targets for peroxisome-derived oxidative stress in cultured mammalian cells. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 65, p. 882–894, 2013.

YEN, M.T.; YANG, J.H.; MAU, J. L. Antioxidant properties of chitosan from crabshells. **Carbohydrate Polymers**, v. 74, n. 4, p. 840–844, 2008.

ZHANG, K.; HELM, J. PESCHEL, D.; GRUNER, M.; GROTH, T.; FISCHER, S. NMR and FT Raman characterisation of regioselectively sulfated chitosan regarding the distribution of sulfate groups and the degree of substitution. **Polymer**, v. 51, p. 4698-4705, 2010.

ZHU, Q. T.; HACKMAN, R. M.; ENSUNSA, J. L.; HOLT, R. R.; KEEN, C. L. Antioxidative activities of oolong tea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6929–6934, 2002.

## APÊNDICE A – PATENTE DEPOSITADA NO INSTITUTO NACIONAL DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL



22/02/2019 870190018080  
08:36  
29409161901565741

### Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2019 003600 1

#### Dados do Depositante (71)

---

Depositante 1 de 2

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 24416174000106

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: AVENIDA DOM MANOEL DE MEDEIROS, S/N

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 52171-900

País: Brasil

Telefone: (81) 332 06104

Fax: (81) 332 06001

Email: [coordenacao.nit@ufrpe.br](mailto:coordenacao.nit@ufrpe.br)

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 22/02/2019 às 08:36, Petição 870190018080

**Depositante 2 de 2****Nome ou Razão Social:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica**CPF/CNPJ:** 24134468000108**Nacionalidade:** Brasileira**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa**Endereço:** Avenida Professor Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária**Cidade:** Recife**Estado:** PE**CEP:** 50670-901**País:** BRASIL**Telefone:****Fax:** (81) 212 68001**Email:** pitt\_positiva@ufpe.br**Dados do Pedido**

---

**Natureza Patente:** 10 - Patente de Invenção (PI)**Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):** DILUENTE CONTENDO DERIVADO DE QUITOSANA, GEMA DE OVO E ÁCIDO CÍTRICO EM SUA COMPOSIÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO MESMO**Resumo:** DILUENTE CONTENDO DERIVADO DE QUITOSANA, GEMA DE OVO E ÁCIDO CÍTRICO EM SUA COMPOSIÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO MESMO. A presente invenção trata de um diluente para criopreservação do sêmen, contendo derivado de quitosana em meio aquoso tamponado em associação com a gema de ovo e o ácido cítrico, juntamente com coadjuvantes; e seu processo de preparação. O diluente proposto promove efeitos benéficos nos parâmetros de motilidade, estabilidade e viabilidade espermática, podendo ser utilizado para prolongar a vida funcional do espermatozoide criopreservado e melhorar o seu desempenho reprodutivo. A invenção contribui para a eficiência dos atuais procedimentos de criopreservação empregados no campo técnico da reprodução assistida.

---

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 22/02/2019 às 08:36, Petição 870190018080

**Dados do Inventor (72)**

---

**Inventor 1 de 7**

Nome: RAQUEL PEREIRA FREITAS DA SILVA

CPF: 01344015492

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação

Endereço: Rua 22, nº 16, Maranguape I

Cidade: Paulista

Estado: PE

CEP: 53444-220

País: BRASIL

Telefone: (81) 997 659666

Fax:

Email: raquel.pfds@gmail.com

**Inventor 2 de 7**

Nome: RANILSON DE SOUZA BEZERRA

CPF: 74436767434

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Professor do ensino superior

Endereço: Rua Francisco Cunha, nº 70, apt 504, Boa viagem

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 51020-050

País: BRASIL

Telefone: (81) 988 231073

Fax:

Email: ransoube@uol.com.br

**Inventor 3 de 7****PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 22/02/2019 às  
08:36, Petição 870190018080

Nome: JULIANNE CORTIZO GONZALEZ

CPF: 05654679481

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Mestrando

Endereço: Rua Mamanguape,255, apt 402, Boa Viagem

Cidade: Recife

Estado: PE

CEP: 51020-250

País: BRASIL

Telefone: (81) 999 538993

Fax:

Email: julannecortizo@gmail.com

Inventor 6 de 7

Nome: THALLES CLOVES MACIEL DE MOURA

CPF: 06244778474

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Física: Doutorando

Endereço: Av. Dr Belmiro Correia,40,Capibaribe

Cidade: Sao Lourenço da Mata

Estado: PE

CEP: 54705-000

País: BRASIL

Telefone: (81) 997 023267

Fax:

Email: thallesmaciel@hotmail.com

Inventor 7 de 7

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 22/02/2019 às 08:36, Petição 870190018080

Nome: ANDREIA CYBELLE MARQUES FERREIRA  
 CPF: 05019639443  
 Nacionalidade: Brasileira  
 Qualificação Física: Estudante de Pós Graduação  
 Endereço: Av. Recife, Bl 4282, Modulo 3, apt 211, Arelas  
 Cidade: Recife  
 Estado: PE  
 CEP: 50781-000  
 País: BRASIL  
 Telefone: (81) 996 032062  
 Fax:  
 Email: cybelle.mvhorses@gmail.com

#### Documentos anexados

---

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento de GRU 200	Comprovantepagamento INPI Raquel.pdf
Portaria	Portaria Coordenador NIT 3.pdf
Procuração	Procuração UFPE.pdf
Relatório Descritivo	1. RELATÓRIO DESCRITIVO MADALENA GUERRA.pdf
Reivindicação	2. Reivindicações MADALENA GUERRA.pdf
Resumo	3. Resumo MADALENA GUERRA.pdf

#### Acesso ao Patrimônio Genético

---

- Declaração Negativa de Acesso - Declaro que o objeto do presente pedido de patente de invenção não foi obtido em decorrência de acesso a amostra de componente do Patrimônio Genético Brasileiro, o acesso foi realizado antes de 30 de junho de 2000, ou não se aplica.

#### Declaração de veracidade

---

- Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**PETICIONAMENTO  
ELETRÔNICO**

Esta solicitação foi enviada pelo sistema Petição Eletrônica em 22/02/2019 às 08:36, Petição 870190018080

1/25

**"DILUENTE CONTENDO DERIVADO DE QUITOSANA, GEMA DE OVO E ÁCIDO  
CÍTRICO EM SUA COMPOSIÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E PROCESSO DE  
PREPARAÇÃO DO MESMO"**

**RELATÓRIO DESCRITIVO**

**Campo da Invenção**

[001] O presente pedido de patente de invenção descreve uma composição de diluente para criopreservação de sêmen e seu processo de preparação, contendo pelo menos um derivado de quitosana em meio aquoso tamponado em associação com a gema de ovo e o ácido cítrico, juntamente com coadjuvantes. Esta composição pode ser utilizada sob diferentes condições de criopreservação visando prolongar a vida funcional dos espermatozoides, com aplicação no campo técnico da reprodução assistida, mais especificamente, no campo da tecnologia de criopreservação do sêmen.

**Antecedentes da Invenção**

[002] O avanço das investigações a respeito da tecnologia de criopreservação aplicada ao sêmen visando à melhoria da qualidade e viabilidade do sêmen tem ganhado notoriedade nos últimos anos, devido aos danos significativos sofridos pelos espermatozoides decorrentes, principalmente, de espécies reativas ao oxigênio geradas durante o procedimento (MAIA & BICUDO, *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 33(4):183-193, 2009; GÓMEZ-TORRES et al., *Cryobiology*. 78:90-94, 2017; TONIOLLI & COSTA, *Investigação*. 16(8):22-29, 2017). A injúria oxidativa compromete a fertilidade da célula espermática e a eficiência dos resultados obtidos após os procedimentos de criopreservação (SOARES & GUERRA, *Tecnol. & Ciênc. Agropec.* 3(2):53-63, 2009). As propostas de aperfeiçoamento envolvendo a inclusão de substâncias antioxidantes aos diluentes para criopreservação de sêmen com o intuito de minimizar estes efeitos

adversos e favorecer o desempenho do espermatozoide criopreservado tem sido amplamente estudadas, no entanto, ainda tem gerado resultados controversos e alguns inconvenientes por conta das particularidades das substâncias com ação protetora que são utilizadas (SILVA & GUERRA, *Rev. Port. Ciênc. Vet.* 111(583-584):143-149, 2012; SAEEDNIA et al., *Reprod. Biol. Endocrin.* 14(1):29, 2016). Diante disto, torna-se importante desenvolver diluentes que promovam melhores condições de conservação e mantenham eficientemente o potencial de fertilização dos espermatozoides submetidos à criopreservação.

[003] A criopreservação do sêmen é uma das tecnologias de reprodução assistida (ARTs) que permite a conservação do germoplasma masculino por um período prolongado, em condição de baixa temperatura, fora do trato reprodutivo animal (MOURA, SOUZA & SCHEFFER, *Rev. SBPH.* 12(2):23-42, 2009; TSAI & LIN, *Braz. Arch. Biol. Technol.* 55(3):425-434, 2012). Esta tecnologia tem como princípio básico a redução reversível da atividade metabólica e da motilidade dos espermatozoides por meio da diminuição gradativa da temperatura, podendo ser empregada de duas formas básicas: refrigeração ou congelação do sêmen (YOSHIDA, *Anim. Reprod. Sci.* 60:349-355, 2000).

[004] Além de proporcionar a estocagem do sêmen por um longo período de tempo, a criopreservação do sêmen permite o uso do volume total do sêmen (maximiza o poder reprodutivo do macho), quesito importante quando o sêmen é de difícil obtenção; disponibiliza sêmen em períodos menos favoráveis, fora da estação reprodutiva fisiológica do animal (quando o volume e a qualidade do sêmen tendem a diminuir), e após a morte do animal; favorece a rápida difusão de material genético entre locais distantes; reduz riscos e custos com a aquisição e transporte de reprodutores; e minimiza o risco de propagação de doenças, através da erradicação do contato direto entre macho e fêmea (VARAGO et al., *Ciênc. Anim. Bras.* 1:1-17, 2009; SILVA & GUERRA, *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 35(4):370-384, 2011; GIBB, & AITKEN, *J. Equine Vet. Sci.* 43:529-536, 2016). Esta tecnologia tem sido essencial para a aplicação das biotécnicas de reprodução, tais como: inseminação artificial, fertilização *in vitro*, sexagem de esperma e engenharia genética, seja ela destinada a animais de interesse econômico, espécies ameaçadas de extinção ou ao tratamento da infertilidade

masculina em humanos (GELAYENEW & ASEBE, *Global Journals Inc.* 16(8):51-56, 2016; GIBB & AITKEN, *J. Equine Vet. Sci.* 43:529-536, 2016; TORRA-MASSANA & ESBERT, *J. Reprod. Med. Clin. Embry.* 3(3):159-168, 2016; COMIZZOLI, *Anim. Reprod.* 14(1):30-33, 2017).

[005] O espermatozoide é considerado qualitativamente viável e potencialmente fértil quando possui morfologia, atividade metabólica e membranas íntegras (SILVA, *Dissertação de Mestrado*, USP, 2011). As organelas da célula espermática estão envolvidas por membranas que são particularmente vulneráveis a criopreservação, as membranas espermáticas mais afetadas por este procedimento, incluem: a membrana plasmática, a membrana acrossomal externa e as membranas mitocondriais (WATSON, *Reprod. Fert. Develop.* 7(4):871-891, 1995). A presença de membranas íntegras é pré-requisito para que os eventos relacionados ao processo de fertilização possam ocorrer, como: o metabolismo para produção de energia e sustento do movimento espermático, a capacitação espermática, a penetração do espermatozoide nos revestimentos do ovócito, ligação à zona pelúcida e fusão com o oócito (ARRUDA et al., *Acta Sci. Vet.* 33(1):145-150, 2005). Dessa forma, a criopreservação ideal do sêmen deve manter o maior número possível de células viáveis, bem como a integridade das suas diferentes estruturas (WATSON, *Anim. Reprod. Sci.* 60:481-492, 2000).

[006] Com o intuito de propiciar um ambiente favorável às células espermáticas após sua colheita, nas condições térmicas do procedimento, foram desenvolvidos os diluentes para criopreservação do sêmen que, além de contribuírem para a manutenção da viabilidade dessas células, possibilitam o aumento volumétrico do ejaculado (MIES FILHO, *Reprodução dos animais e inseminação artificial*, 5(1-2):783, 1982). Os constituintes básicos destes diluentes, incluem: açúcares (p. ex. glicose e frutose) que servem de fonte energética aos espermatozoides; agentes tamponantes (p. ex. citrato de sódio e Tris) que ajustam possíveis alterações do potencial de hidrogênio (pH) dentro dos padrões fisiológicos da espécie; substâncias iônicas e aniônicas que asseguram a pressão osmótica aproximada ao sêmen puro; crioprotetores, classificados em função da sua capacidade de atravessar a membrana espermática em: penetrantes (p. ex. glicerol, dimetilsulfoxido, dimetilformamida, acetamida, lactamida) e não penetrantes

(p. ex. lipoproteínas da gema de ovo, e lactose e as caseínas do leite), que atuam na redução dos efeitos negativos ocasionados pelo processo de resfriamento do sêmen e na proteção contra a formação de cristais de gelo intracelular; e antibióticos (p. ex. penicilina, estreptomicina e gentamicina) que inibem o crescimento bacteriano (EVANS & MAXWELL, *Salmons' artificial insemination of sheep and goats*, 2:194, 1987; SILVA; CARDOSO & SILVA, *Ciência Animal*. 11(2):119-129, 2001).

[007] Contudo, os atuais métodos de processamento do sêmen para criopreservação ainda carecem de aperfeiçoamentos, uma vez que os procedimentos empregados, seja na refrigeração ou congelamento, submetem as células espermáticas à etapas e condições atípicas, as quais envolve: manipulação do sêmen, exposição a temperaturas não fisiológicas, exposição a crioprotetores que ocasionam estresse osmótico e tóxico, e alta concentração espermática nas doses de sêmen (WATSON, *Anim. Reprod. Sci.* 60:481-492, 2000; SILVA & GUERRA, *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 35(4):370-384, 2011; GÓMEZ-TORRES et al., *Cryobiology*. 78:90-94, 2017). Estes fatores induzem à geração de espécies reativas ao oxigênio (ROS, de *reactive oxygen species*) que comprometem a integridade estrutural e funcional dos espermatozoides (WATSON, *Anim. Reprod. Sci.* 60:481-492, 2000; GUERRA, EVANS & MAXWELL, *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 28:187-195, 2004).

[008] Apesar do plasma seminal apresentar diferentes sistemas de defesa antioxidante que fornecem proteção ao espermatozoide e compensam a baixa concentração dos antioxidantes endógenos no seu citoplasma reduzido, quando o sêmen é lavado ou diluído, durante o processamento do sêmen para a criopreservação, ocorre uma redução de parte dessa proteção antioxidante fornecida pelo plasma seminal, tornando o espermatozoide vulnerável à ação de ROS (CARVALHO et al., *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 38:33-38, 2002; SIKKA, *J. Androl.* 25(1):5-18, 2004; SILVA & GUERRA, *Rev. Port. Ciênc. Vet.* 111(583-584):143-149, 2012).

[009] A célula espermática é capaz de gerar e degradar ROS, as quais, em concentração reduzida, são necessárias à sua função fisiológica normal (MAIA & BICUDO, *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 33(4):183-193, 2009). Nesta célula, as ROS desempenham papéis primordiais na capacitação espermática, regulação da taxa de

5/25

hiperativação, reação acrossômica e fusão dos pronúcleos do espermatozoide e oócito (SENGOKU et al., *Fertil Steril*. 69(3):522-527, 1998; NICHII, *Tese de Doutorado, USP*, 2003). Contudo, concentrações elevadas de ROS tem efeito prejudicial ao espermatozoide, pois desencadeiam uma cascata de peroxidação lipídica causando alterações nos componentes de membrana, provocando sua desestabilização, ruptura, perda de fluidez e da capacidade de regulação de íons envolvidos no controle do movimento espermático, resultando em declínio da motilidade, da viabilidade e, por fim, da sua função de fertilização (MAIA & BICUDO, *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 33(4):183-193, 2009; COCCHIA et al., *Theriogenology*. 75(7):1201-1210, 2011). Estes fatores infligem danos funcionais irreversíveis à célula espermática e compromete a qualidade do sêmen (TONIOLLI & COSTA, *Investigação*. 16(8):22-29, 2017).

[010] Diante desta realidade, tem sido proposta a intervenção terapêutica com antioxidantes nos diluentes para criopreservação do sêmen como forma de aprimorar esta técnica e garantir melhor desempenho do espermatozoide criopreservado (SILVA & GUERRA, *Rev. Port. Ciênc. Vet.* 111(583-584):143-149, 2012; SAEEDNIA et al. *Reprod. Biol. Endocrin.* 14(1):29, 2016).

[011] O termo antioxidante abrange um conjunto heterogêneo de moléculas e substâncias químicas que, mesmo presentes em baixas concentrações em relação ao substrato oxidante, podem prevenir ou reduzir os danos oxidativos em lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, com formação concomitante de produtos de baixa ou nenhuma toxicidade (DUARTE-ALMEIDA et al., *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 26(2):446-452, 2006; MAGALHÃES et al., *Anal. Chim. Acta.* 613(1):1-19, 2008; OLIVEIRA et al., *Quim. Nova.* 32(3):689-702, 2009). Os antioxidantes podem apresentar diferentes propriedades protetivas e agir, por mecanismos distintos, em diversas etapas do processo oxidativo: 1) prevenindo a produção das ROS; 2) interceptando as ROS produzidas pelo metabolismo celular ou fontes exógenas, impedindo que afetem os lipídeos, aminoácidos, as duplas ligações dos ácidos graxos poli-insaturados e as bases de DNA; 3) reparando lesões, processo relacionado à remoção de danos ao DNA e reconstrução das membranas celulares danificadas (BIANCHI & ANTUNES, *Rev. Nutr.* 12(2):123-130, 1999; LOBO et al., *Pharmacogn. Rev.* 4(8):118-126, 2010).

6/25

[012] Substâncias de origem natural ou sintética, de natureza lipofílica ou hidrofílica, enzimáticas ou não enzimáticas, apresentam potencial para atuar como antioxidantes no meio biológico, dentre elas estão: enzimas (p. ex. Glutathione-Peroxidase, Catalase e Superóxido Dismutase); vitaminas e seus derivados (p. ex. ácido ascórbico e tocoferóis); compostos fenólicos que abrangem, principalmente, os flavonoides (p. ex. catequina, catequina-galato, quercetina, kaempferol e miricetina); carotenoides (p. ex. licopeno,  $\beta$ -caroteno, xantofilas, zeaxantina, cantaxantina e luteína); ácidos orgânicos naturais (p. ex. ácido gálico e ácido ferúlico) e alguns polissacarídeos bioativos de organismos vegetais e animais (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, *Visão Acadêmica*. 5(1):33-40, 2004; YEN, YANG & MAU, *Carbohydr. Polym.* 74(4):840-844, 2008; CAROCHO & FERREIRA, *Food. Chem. Toxicol.* 51:15-25, 2013; GUO, *J. South. Agric.* 44(3):493-496, 2013).

[013] Diversos estudos empenharam-se em melhorar a qualidade do sêmen criopreservado por meio da inclusão de antioxidantes aos diluentes seminais de diversas espécies de animais, em suínos (BURANAAMNUAY et al., *Anim. Reprod. Sci.* 127(1-2):56-61, 2011), bovinos (SARIÖZKAN et al., *Cryobiology*. 68(1):129-133, 2014), caninos (LUCIO et al., *Cryobiology*. 72(2):135-140, 2016), peixes (LIU et al., *Fish Physiol. Biochem.* 41(2):413-422, 2015), equinos (FRANCO et al., *J. Equine Vet. Sci.* 33(10):787-793, 2013), ovinos (ARRUDA et al., *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 70:153-159, 2018) caprinos (SEIFI-JAMADI et al., *Cryobiology*. 75:15-20, 2017) e humanos (ZHANG et al., *Zygote*. 24(2):293-300, 2015).

[014] Apesar dos avanços nos protocolos de criopreservação, tanto em aditivos antioxidantes, quanto em métodos de processamento, ainda têm sido constatados resultados controversos e alguns inconvenientes nas diferentes substâncias antioxidantes atualmente empregadas, tais como: (1) efeitos deletérios em determinadas concentrações; (2) instabilidade às condições do processo; (3) dependência de metais para atuação; (4) conversão em pró-oxidantes quando exposto a metais ou em doses elevadas; e (5) baixa durabilidade (SILVA & GUERRA, *Rev. Port. Ciênc. Vet.* 111(583-584):143-149, 2012; SAEEDNIA et al., *Reprod. Biol. Endocrin.* 14(1):29, 2016).

7/25

[015] Desta forma, nota-se que a proteção adicional às células espermáticas durante os procedimentos de criopreservação estabelecidos ainda constitui um desafio. Dentro desta abordagem e tendo em vista as limitações técnicas do procedimento, a presente invenção vem solucionar os problemas mencionados quando propõe um diluente para criopreservação de sêmen constituído essencialmente de derivados de quitosana em associação com a gema de ovo e o ácido cítrico.

[016] A quitosana é descrita como uma família de polissacarídeos de cadeia linear composta de unidades monoméricas de D-glucosamina (GlcN) e N-acetil-D-glucosamina (GlcNAc), em quantidades e sequência variáveis, unidas por ligações glicosídicas  $\beta(1\rightarrow4)$  (RINAUDO, *Prog. Polym. Sci.* 31(7):603-632, 2006). Embora possa ser encontrada de modo natural na parede de fungos dos gêneros *Mucor* e *Zygomycetes*, o modo mais comum de obtê-la é a partir de uma reação de N-desacetilação da quitina (SILVA, DOS SANTOS & FERREIRA, *Quím. Nova.* 29(4):776-785, 2006). A quitina é o segundo polissacarídeo mais abundante na Terra com vasta distribuição na natureza, constituindo o principal componente estrutural em invertebrados, como artrópodes, anelídeos, moluscos, celenterados, diatomáceas e fungos (KURITA, *Mar. Biotechnol.* 8(3):203-226, 2006; DIAS et al., *J. Biotech. Biodivers.* 4(3):184-191, 2013).

[017] Na reação de N-desacetilação da quitina, que pode ser realizada por processos químicos ou enzimáticos, os grupos acetamida (-NHCOCH<sub>3</sub>) presentes na estrutura da quitina são transformados, em graus variados, em grupos amino (-NH<sub>2</sub>), dando origem a quitosana (YOUNES & RINAUDO, *Mar. Drugs.* 13(3):1133-1174, 2015). O produto desta reação pode apresentar grau de médio de desacetilação (GD), expresso em percentagem molar, de 40% a 98% e massa molecular de 50.000 a 2.000.000 Da (HEJAZI & AMJI, *J. Control. Release.* 89(2):151-165, 2003).

[018] O GD é o parâmetro que determina o conteúdo de grupos amínicos livres nos polissacarídeos e desempenha um papel primordial na determinação das características químicas da quitosana, como as propriedades ácido-base e solubilidade (KHAN, PEH & CH'NG, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 5(3):205-212, 2002; DAMIAN et al. *Alim. Nutr.* 16(2):195-205, 2005; HÉLIO et al., *Quím. Nova.* 29(4):776-785, 2006; DIAS et al., *J. Biotech. Biodivers.* 4(3):184-191, 2013). A solubilização da quitosana em meios

aquosos ocorre pela protonação do grupo amino (-NH<sub>2</sub>) do carbono 2 (C-2) dos resíduos de D-glucosamina, que confere a este polissacarídeo características policatiónicas e permite sua solubilidade em meio ácido (pH≤6,0), dado que o pK<sub>a</sub> do grupo amino da glucosamina é de 6,3, e insolubilidade em meio neutro e alcalino (pH≥7,0) (KLINKESORN, *Food Rev. Int.* 29(4):371-393, 2013).

[019] A quitosana é reconhecidamente um polissacarídeo atóxico, biocompatível, biodegradável e antioxidante (AZEVEDO et al., *Rev. Eletrônica Mat. Process.* 2(3):27-34, 2007; DIAS et al., *J. Biotec. Biodivers.* 4(3):184-191, 2013). Seu potencial antioxidante tem sido atribuído à presença, em sua estrutura, de grupos funcionais reativos, um grupo amino, bem como dois grupos hidroxil nas posições C-2, C-3 e C-6, respectivamente (ARANAZ et al., *Curr. Chem. Biol.* 3(2):203-230, 2009). Estes grupos possuem a capacidade de doar prótons e, assim, converter radicais livres instáveis em moléculas estabilizadas (KIM & RAJAPAKSE, *Carbohydr. Polymer.* 62(4):357-368, 2005; ARANCIBIA et al., *Food Hydrocoll.* 35:710-717, 2014). Outro mecanismo relatado está relacionado a capacidade da quitosana de mobilizar íons metálicos (que são capazes de interagir com radicais relativamente não-reativos e transformá-los em reativos) para a formação de complexos solúveis e estáveis (ADJIMANI & ASARE, *Toxicol. Rep.* 2:721-728, 2015).

[020] A partir de diversos estudos em culturas de células e modelos animais, foram descritas propriedades adicionais da quitosana, dentre elas: antitumoral, antiviral, antibacteriana, antifúngica, analgésica, hemostática, anti-inflamatória, cicatrizante e bioadesiva (KURITA, *Mar. Biotechnol.* 8(3):203-226, 2006; WIJESEKARA, PANGESTUTI & KIM, *Carbohydr. Polymer.* 84(1):14-21, 2011).

[021] O potencial deste polissacarídeo versátil pode ser ainda mais explorado quando considerados os grupos funcionais reativos distribuídos na sua matriz polimérica, os quais permitem inúmeras modificações químicas de substituição de grupos químicos, de alongamento de cadeia e de despolimerização (PRASHANTH & THARANATHAN, *Trends Food Sci. Tech.* 18(3):117-131, 2007). Como exemplo de tais modificações químicas, podem ser citadas as reações de quaternização, alquilação, carboxilação, acilação, ftalilação, sulfatação, siliilação, tosililação, tiolação, glicosilação,

9/25

fosforilação e amidação (KURITA, *Mar. Biotechnol.* 8(3):203-226, 2006; ZARGAR, ASGHARI & DASHTI, *ChemBioEng Rev.* 2(3):204-226, 2015). Estas reações são realizadas por meio de processos químicos, físicos ou enzimáticos entre os grupos amino e hidroxil da quitosana e reagentes adequados com o propósito de melhorar a efetividade das propriedades originais da quitosana ou introduzir características específicas, além de permitir sua solubilidade aquosa numa faixa mais ampla de pH, incluindo a faixa neutra (MOURYA & INAMDAR, *React. Funct. Polym.* 68(6):1013-1051, 2008). Os produtos resultantes destas referidas intervenções químicas são chamados de "derivados de quitosana", e estes ampliam, significativamente, as perspectivas de uso da quitosana nos mais diversificados setores (SILVA, DOS SANTOS & FERREIRA, *Quim. Nova.* 29(4):776-785, 2006).

[022] Com base nas propriedades intrínsecas mencionadas acima, o emprego dos derivados de quitosana tem sido sugerido e empregado com eficácia e segurança em uma grande variedade de propósitos como, por exemplo, no tratamento de águas contaminadas (PI 04043090 A2 (2004)); biomateriais (PI 04179749 A2 (2004)); composições cosméticas (PI 08041504 A2 (2008)); aditivos agrícolas (PI 09002073 A2 (2009)); biofungicidas (BR 1020120238594 A2 (2012)); tratamento farmacológico (BR 1120160037251 A2 (2014)); regeneração de tecidos (BR 1020150293577 A2 (2015)); e conservação de alimentos (CN 107586800 A (2017)).

[023] Um estudo conduzido por Silva (*Dissertação de Mestrado, UFPE, 2014*) revelou que os derivados quitosana carboximetilada, quitosana sulfatada, quitosana carboximetilada e sulfatada, e quito-oligossacarídeo exibiram propriedades funcionais relevantes, como atoxicidade, atividade antioxidante e efeito bacteriostático, apresentando, desta forma, potencial para contribuir significativamente como um ingrediente ou suplemento alternativo em abordagens alimentar, biomédica, farmacêutica e biotecnológica.

[024] Na presente proposta, os componentes gema de ovo e ácido cítrico apresentam propriedades e funções benéficas específicas nos diluentes para criopreservação do sêmen. Substâncias presentes na constituição da gema de ovo promovem intervenções essenciais no espermatozoide durante o armazenamento do

10/25

sêmen sob baixas temperaturas, garantindo proteção contra a ação deletéria do frio, redução nas perdas de enzimas acrossomais e prevenção de mudanças degenerativas do acrossoma (SALAMON & MAXWELL, *Anim. Reprod. Sci.* 62(1-3):77-111, 2000). O ácido cítrico, por sua vez, além de possuir ação antioxidante, atua na estabilização do pH e auxilia na manutenção do equilíbrio osmótico do diluente de criopreservação de sêmen (SILVA, *Tese de Doutorado*, UECE, 2005).

[025] O requerente verificou que o diluente que apresenta, em sua constituição, uma associação que alia as propriedades dos derivados de quitosana, da gema de ovo e do ácido cítrico origina uma composição antioxidante e crioprotetora que pode ser eficientemente capaz de manter parâmetros primordiais para a persistência do potencial de fertilização dos espermatozoides, após a condição de criopreservação. A invenção proporciona redução dos prejuízos ocasionados pelo método sobre a motilidade, estabilidade e viabilidade espermática, oferece uma alternativa eficaz aos diluentes para criopreservação de sêmen atualmente disponíveis, e contribui para a eficiência dos procedimentos de preservação empregados no campo técnico da reprodução assistida.

[026] Estudos envolvendo a inclusão de substâncias antioxidantes e crioprotetoras aos diluentes para preservação de sêmen visando combater os danos oxidativos às células espermáticas durante o procedimento de criopreservação foram desenvolvidos, e são apresentados em algumas patentes e artigos científicos descritos a seguir:

[027] O documento RU 2223718 C2 (2002) revela um método de processamento para sêmen bovino, compreendendo diluição do sêmen em meio crioprotetor à base de lactose-glicerol-gema, seguido de etapa de equilíbrio e congelação em vapor de nitrogênio líquido, caracterizado pela introdução de 0,1 a 0,3% de quitosana succinato ao meio de diluição do sêmen. O método minimiza o dano biológico ocasionado às estruturas membranosas dos espermatozoides durante o congelamento e aumenta sua viabilidade após o descongelamento. O documento difere da presente invenção por apresentar uma formulação crioprotetora distinta qualitativamente da presente invenção, a qual não contém ácido cítrico na constituição do meio de diluição do sêmen,

11/25

e integra a lactose e o glicerol na mesma. Estes dois últimos componentes não constam na composição para criopreservação de sêmen proposta na presente invenção.

[028] O documento EP 1627565 A1 (2004) descreve um meio para armazenar amostra biológica, incluindo espermatozoides, em estado refrigerado, congelado ou vitrificado. O referido meio compreende uma solução salina balanceada e um 4-tioderivado de flavan-3-ol com efeito crioprotetor. A invenção promove recuperação da motilidade espermática de alta qualidade pós-descongelamento. O documento difere da presente invenção por apresentar uma formulação de preservação caracterizada pela inclusão de flavonoides e não fazer qualquer referência a incorporação de derivados de quitosana na mesma.

[029] Hu et al. (*Cryobiology*, 59:244-249, 2009) investigaram os efeitos crioprotetores do polissacarídeo extraído da planta herbácea *Gynostemma pentaphyllum* (GPP) sobre a qualidade do sêmen suíno congelado-descongelado. O diluente de criopreservação de sêmen foi constituído de: Tris, ácido cítrico, glicose, antibiótico, gema de ovo, GPP e glicerol. A suplementação do diluente com GPP proporcionou melhoras nos parâmetros de qualidade de sêmen, como: motilidade espermática, integridade de membrana, integridade do acrossoma e atividade mitocondrial. Os efeitos da adição de outros polissacarídeos presentes na alga *Laminaria japonica* (HU et al., *Anim. Reprod. Sci.* 139:95-100, 2013) e em plantas da espécie *Salvia miltiorrhiza* (SHEN et al., *Anim. Reprod. Sci.*, 159:25-30, 2015) e *Rhodiola rosea* (YANG et al., *Carbohydr. Polym.* 135:44-47, 2016) em diluentes com constituição semelhante ao desenvolvido no estudo acima descrito também foram investigados e apresentaram resultados similares. Os documentos diferem da presente invenção por conterem polissacarídeos estruturalmente distintos dos derivados de quitosana, além de incluírem glicerol como crioprotetor na constituição do diluente para preservação de sêmen.

[030] O documento US 20170367324 A1 (2011) descreve composições e métodos para o tratamento do sêmen processado, com propósito de aumentar qualidade dos espermatozoides, incluindo sua viabilidade, motilidade, fertilidade, integridade do DNA e longevidade *in vitro*. A invenção compreende diluição do sêmen em meio constituído de: Tris, vitamina B12 e alfa-cetoglutarato e glicerol, podendo

12/25

também incluir substâncias orgânicas, como: monossacarídeos e dissacarídeos, gema de ovo, leite, albumina e antibióticos. O documento difere da presente invenção por agregar vitamina B12, alfa-cetoglutarato e glicerol nas composições, além de não conterem qualquer derivado de quitosana, juntamente com o ácido cítrico nas mesmas.

[031] O documento WO 2016009363 A1 (2014) descreve um diluente para a proteção, preservação e criopreservação de sêmen, contendo pelo menos um agente citoprotetor do grupo isopropilfenol, juntamente com agentes crioprotetores e coadjuvantes. O diluente, de acordo com este documento, contém: leite semidesnatado, caseinatos de sódio, sacarose, frutose, glicose, antibiótico, derivados de isopropilfenol (timol, carvacrol, isoespintanol e misturas destes), gema de ovo e dimetilformamida. A invenção reduz o estresse oxidativo no sêmen e prolonga a sobrevivência e a funcionalidade dos espermatozoides após a criopreservação. O documento difere da presente invenção, principalmente, pela inclusão dos compostos fenólicos na proposta do diluente; além de não apresentarem qualquer derivado de quitosana, juntamente com o ácido cítrico, associado a gema de ovo na mesma.

[032] Júnior et al. (*Rev. Bras. Ciênc. Vet.* 22(2):114-118, 2015) avaliaram os efeitos da adição de tocoferol (vitamina E) ao diluidor de congelação de sêmen bovino quanto a redução dos danos causados pelo estresse oxidativo, melhoria da capacidade fertilizante do sêmen e taxas de prenhez após inseminação artificial. O diluente foi constituído de: Tris, ácido cítrico, frutose, gema de ovo, antibiótico, glicerol e tocoferol. A adição de tocoferol ao meio crioprotetor do sêmen não melhorou a qualidade do sêmen congelado, nem a taxa de prenhez após a inseminação artificial. O documento difere da presente invenção por apresentar tocoferol e glicerol na constituição do diluente e não envolver qualquer derivado de quitosana na mesma.

[033] O documento BR 1120160279980 A2 (2015) propõe a enzima antioxidante aleno óxido sintase como um conservante para sêmen fresco ou congelado nos procedimentos reprodutivos assistidos em seres humanos e outros animais. A invenção proporciona maior tolerância e estabilidade do esperma ao processamento e criopreservação. O documento difere da presente invenção por apresentar uma

composição caracterizada pela presença da aleno óxido sintase e não abranger qualquer associação de derivado de quitosana com a gema de ovo e o ácido cítrico na mesma.

[034] Kia et al. (*Iran. J. Appl. Anim. Sci.* 6(4):783-789, 2016) relataram os efeitos do extrato da planta aromática *Origanum vulgare*, detentor de altos níveis de compostos fenólicos, sobre os parâmetros de qualidade do sêmen congelado-descongelado em touros. O diluente para criopreservação foi constituído de: citrato de sódio, antibiótico, gema de ovo, glicerol e extrato de *Origanum vulgare*. Os autores obtiveram melhora na motilidade, viabilidade e integridade da membrana plasmática dos espermatozoides após descongelamento do sêmen. Um estudo semelhante foi realizado por Sobeh et al. (*Molecules*. 22(11):1993, 2017) envolvendo extrato de folhas de *Albizia harveyi*. De acordo com esta investigação, o diluente para criopreservação foi constituído de: Tris, ácido cítrico, frutose, glicerol, gema de ovo, antibiótico e extrato de *Albizia harveyi*. Ambos os diluentes propostos promoveram melhora nos parâmetros de motilidade espermática, viabilidade e integridade de membrana dos espermatozoides. Os documentos diferem da presente invenção por apresentarem uma formulação para preservação de sêmen baseada na incorporação de extratos vegetais ricos em compostos fenólicos, bem como não conterem qualquer derivado de quitosana associado ao ácido cítrico e a gema de ovo na mesma.

[035] Souza et al. (*Biopreserv. Biobank*. 15(3):220-227, 2017) investigaram o efeito da adição do carotenoide cantaxantina a um diluente de criopreservação de sêmen ovino. A preparação do diluente consistiu de: Tris, ácido cítrico, frutose, gema de ovo, glicerol e cantaxantina. Os resultados deste estudo revelaram que o diluente produzido é capaz de proteger os espermatozoides ovinos de alterações cinéticas pós-descongelamento, contudo não foi observado efeito sobre a integridade de membranas plasmática e acrossomal, produção de ROS intracelular em espermatozoides viáveis e peroxidação lipídica. O documento difere da presente invenção por apresentar uma formulação de criopreservação caracterizada pela inclusão de carotenoides e glicerol, e não fazer qualquer referência ao acréscimo, no referido diluente, de derivados de quitosana.

14/25

[036] Ardeshirnia, Zandi & Sanjabi (*S. Afr. J. Anim. Sci.* 47(2):237-244, 2017) avaliaram os efeitos da quercetina, como um suplemento antioxidante, na qualidade de espermatozoides descongelados de carneiros. O diluente foi constituído de: Tris, ácido cítrico, glicose, glicerol gema de ovo, antibiótico e quercetina. Este estudo revelou que a suplementação com quercetina aumentou significativamente a quantidade de espermatozoides viáveis após o descongelamento, embora não tenha exercido efeitos nos parâmetros de motilidade total e progressiva dos mesmos. Arruda et al. (*Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 70:153-159, 2018) avaliaram o efeito da miricetina no diluente de sêmen ovino contra os danos ocasionados aos espermatozoides congelados-descongelados. O diluente de criopreservação do sêmen foi constituído de: Tris, ácido cítrico, frutose, gema de ovo, glicerol, antibiótico e miricetina. Os resultados deste estudo evidenciaram que a suplementação do diluidor com 10 e 100nM de miricetina afetou a cinética espermática sem provocar alterações na estrutura geral do gameta, enquanto que maiores concentrações acarretam efeitos adversos sobre os espermatozoides, associados ao dano peroxidativo. Os documentos diferem da presente invenção por incorporarem flavonoides e glicerol na formulação do diluente para criopreservação, além de não apresentarem derivados de quitosana na mesma.

[037] De acordo com o exposto, os ensinamentos descritos na presente invenção não foram antecipados, de forma que o diluente para criopreservação do sêmen e seu processo de preparação aqui propostos representam novidade frente ao atual estado da técnica.

#### Descrição da Invenção

[038] O diluente para criopreservação de sêmen revelado na presente invenção compreende ao menos um derivado de quitosana em meio aquoso tamponado em associação com a gema de ovo e o ácido cítrico, juntamente com coadjuvantes. Esta formulação pode ser utilizada para prolongar a vida funcional dos espermatozoides, com menor comprometimento na estrutura espermática decorrente do procedimento de

15/25

criopreservação do sêmen; e garantir melhor desempenho reprodutivo do espermatozoide criopreservado.

[039] A invenção poderá ser melhor compreendida pela descrição detalhada abaixo.

[040] O diluente para criopreservação de sêmen de que trata a presente invenção é constituído de: (1) entre 0,015 e 25 mg/mL de derivado de quitosana em solução tamponada, (2) entre 5 e 30% (v/v) de gema de ovo; (3) entre 10 e 30 g/L de ácido cítrico; e (4) agentes coadjuvantes.

[041] Os derivados de quitosana, na presente invenção, atuam, especialmente, com propriedades protetivas antioxidantes na prevenção e minimização do processo peroxidativo ocasionado pelas ROS (geradas durante o procedimento de criopreservação) aos espermatozoides *in vitro*. O papel das ROS e as suas implicações na função, sobrevivência e desempenho reprodutivo dos espermatozoides, bem como na qualidade do sêmen são reconhecidos e amplamente reportados na atualidade (MAIA & BICUDO, *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 33(4):183-193, 2009; COCCHIA et al., *Theriogenology*. 75(7):1201-1210, 2011; SILVA & GUERRA, *Rev. Port. Ciênc. Vet.* 111(583-584):143-149, 2012; GÓMEZ-TORRES et al., *Cryobiology*. 78:90-94, 2017). Assim, os derivados de quitosana no diluente proposto tem por função melhorar a tolerância da célula espermática às diferentes condições a que são submetidas durante o procedimento de criopreservação do sêmen.

[042] Nesta composição, a gema de ovo tem como principal atribuição estabilizar as membranas biológicas dos espermatozoides de mamíferos, reduzindo os efeitos negativos do choque térmico durante o processo de refrigeração inicial do sêmen (WILHELM, GRAHAM & SQUIRES, *Cryobiology*. 33(3):320-329, 1996; NEVES & HENRY, *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 36(4):209-214, 2012). Lipoproteínas de baixa densidade (LDL) presentes na gema de ovo aderem-se, por meio das suas porções fosfolipídicas, à membrana plasmática das células espermáticas formando uma película de proteção na superfície dessas células, restaurando fosfolipídios perdidos e induzindo alterações estruturais transitórias na membrana plasmática, de forma a prevenir a sua ruptura e

16/25

favorecer a adaptação do espermatozoide a condição de baixa temperatura (FARSTAD, *Anim. Reprod. Sci.* 42(1-4):251-260, 1996; MANJUNATH, *Anim. Reprod.* 9(4):809-815, 2012). Além de proteger a membrana espermática, a gema de ovo também atua na prevenção contra as mudanças degenerativas do acrossoma e na redução das perdas de enzimas acrossomais durante a estocagem do sêmen no estado líquido (SALAMON & MAXWELL, *Anim. Reprod. Sci.* 62(1-3):77-111, 2000).

[043] O ácido cítrico (ácido 2-hidroxi-1,2,3-propanotricarboxílico) é um ácido orgânico fraco que possui ação antioxidante, atua na estabilização do pH (pois serve como doador de prótons na produção do citrato) e auxilia na manutenção do equilíbrio osmótico do diluente (SALAMON & MAXWELL, *Anim. Reprod. Sci.* 62(1-3):77-111, 2000; SILVA, *Tese de Doutorado*, UECE, 2005).

[044] Os agentes coadjuvantes da composição da invenção são compreendidos de ao menos uma fonte de energia, ao menos um agente tamponante em solução aquosa e ao menos um antibiótico.

[045] Na presente proposta, ao menos uma fonte de energia compreende um ou mais monossacarídeos pertencentes ao grupo consistido de: frutose, manose, glicose, galactose, dextrose, xilose ou uma combinação destes. Preferencialmente, a fonte de energia consiste de 10 a 25 g/L de frutose.

[046] Os açúcares de baixa massa molecular, como os monossacarídeos, atuam como substrato energético para o metabolismo espermático, ou seja, são utilizados pelos espermatozoides *in vitro*, durante o armazenamento do sêmen, como fonte direta de energia através da via glicolítica e da fosforilação oxidativa mitocondrial para a manutenção da motilidade espermática (NAING et al., *Anim. Reprod. Sci.* 122(1-2):23-28, 2010). Estes açúcares também desempenham importante papel na manutenção da pressão osmótica do diluente (HOLT, *Theriogenology*. 53(1):47-58, 2000).

[047] Ao menos um agente tamponante que pode ser empregado na presente invenção, pertence ao grupo consistido de: bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), citrato de sódio, fosfato de sódio, glicina, PBS (tampão fosfato salina), Tris (tris(hidroximetil)aminometano), TES (ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-amino etanossulfônico), HEPES

17/25

(ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico), MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanossulfônico), MOPSO (ácido 3-(N-morfolino)-2-hidroxi propanossulfônico), MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico), BES (ácido N,N-Bis(2-hidroxietil)-2-aminoetanosulfônico), PIPES (piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfônico)), seus derivados ou uma combinação destes. Preferencialmente, o agente tamponante consiste de 20 a 40,0 g/L de Tris.

[048] Os sistemas tampões, nos diluentes de criopreservação do sêmen, são responsáveis pela manutenção do pH favorável à sobrevivência espermática e da capacidade fecundante do espermatozoide. Valores de pH considerados ótimos para os meios de preservação espermática estão entre 6,8 e 7,1 (BORGES, *Tese de Doutorado*, UNESP, 2008). Metabólitos produzidos pelos próprios espermatozoides, bem como por possíveis bactérias presentes no sêmen diluído são os principais fatores que tendem a reduzir o pH no meio extracelular (YÁNIZ, MATEOS & SANTOLARIA, *Anim. Reprod. Sci.* 122(1-2):142-149, 2011). Dentre os sistemas tampões, os de origem orgânica, como o Tris, demonstram melhor capacidade de regulação devido a capacidade que possuem de ultrapassar a membrana plasmática e reduzir variações intracelulares de pH, não influenciando na mobilidade e no metabolismo dos espermatozoides (SALAMON & MAXWELL, *Anim. Reprod. Sci.* 62(1-3):77-111, 2000).

[049] Na presente proposta de diluente, pode se fazer necessária a utilização de um agente capaz de impedir ou inviabilizar o crescimento microbiano, tal como um antibiótico inibidor da parede celular ou inibidor da síntese proteica bacteriana. Ao menos um antibiótico que pode ser empregado na presente invenção é pertencente ao grupo consistido de: gentamicina, penicilina, estreptomicina, seus derivados ou uma combinação destes. Preferencialmente, o agente antimicrobiano é uma combinação de antibióticos consistida de 1 a 50 UI/mL de penicilina e 0,05 a 0,5 mg/mL de estreptomicina ou gentamicina de 0,0005 a 0,25 mg/mL.

[050] A incorporação aos diluentes seminais de substâncias de efeito antimicrobiano é recomendado, uma vez que o procedimento de coleta de sêmen está, inevitavelmente, propenso à contaminação microbiana a partir do prepúcio, uretra e pênis do animal, mesmo quando técnicas assépticas e medidas de higiene são

18/25

empregadas (YÁÑIZ et al., *Anim. Reprod. Sci.* 122(1-2):142-149, 2010). Além disso, a gema de ovo, utilizada no diluente para criopreservação do sêmen, também apresenta susceptibilidade à contaminação (BOUSSEAU et al., *Theriogenology*. 50(5):699-706, 1998). O comprometimento da qualidade espermática, nos casos de contaminação bacteriana, pode afetar negativamente a fertilidade dos espermatozoides pela própria presença de bactérias, pela produção bacteriana de toxinas, pela degradação bacteriana dos componentes do diluente, ou ainda, pela utilização bacteriana dos substratos metabólicos presentes no diluente (SILVA, *Rev. Bras. Reprod. Anim.* 31(1):119-127, 2007).

[051] O diluente da presente invenção é constituído pelos componentes mencionados anteriormente, solubilizados em água bidestilada, osmose reversa, deionizada ou ultrapura.

[052] O segundo objeto da presente invenção trata de um processo de preparação de diluente para criopreservação de sêmen consistido das etapas: (a) Dissolução de ácido cítrico, (b) Adição de gema de ovo e (c) Adição de ao menos um derivado de quitosana em solução tamponada de pH entre 6,8 e 7,5.

[053] A preparação do diluente para a preservação de sêmen ocorre em um ambiente estéril, no qual o agente tamponante, o ácido cítrico e ao menos uma fonte de energia são dissolvidos em água primeiramente.

[054] Para fins desta invenção, o agente tamponante é consistido de uma solução aquosa de bicarbonato de sódio, citrato de sódio, fosfato de sódio, glicina, PBS, Tris, HEPES, MOPS, MOPSO, MES, BES, PIPES, seus derivados ou uma mistura destes. Preferencialmente, o agente tamponante é constituído de 20 a 40,0 g/L de Tris.

[055] O ácido cítrico presente nesta preparação está na faixa de concentração consistida de 10 a 30 g/L.

[056] A fonte de energia é um ou mais monossacarídeos pertencentes ao grupo consistido de: frutose, manose, glicose, galactose, dextrose, xilose ou uma combinação destes. Preferencialmente, a fonte de energia consiste de 10 a 25 g/L de frutose.

19/25

[057] Após dissolução do agente tamponante, ácido cítrico e um ou mais monossacarídeos, adiciona-se a gema de ovo à formulação, para que a mesma apresente proporção entre 5 e 30% (v/v) do volume final da preparação.

[058] O diluente da invenção compõe-se de ao menos um derivado de quitosana em uma concentração entre 0,015 e 25 mg/mL.

[059] Para fins desta invenção, o derivado de quitosana é um polissacarídeo ou oligossacarídeo produzido por reação de modificações química de substituição de grupos químicos, de alongamento de cadeia, de despolimerização da quitosana ou uma combinação destas. Exemplos destes tipos de reações, incluem: quaternização, alquilação, carboxilação, acilação, ftalilação, sulfatação, silitação, tosilção, tiolação, glicosilação, fosforilação e amidação. Em qualquer que seja o caso, o derivado de quitosana deve apresentar solubilidade aquosa na faixa de pH compreendida entre 6,8 e 7,5, que garante sua atuação em conformidade com os diluentes de preservação espermática.

[060] Em uma modalidade deste aspecto da invenção, o derivado de quitosana é, em particular, a quitosana carboximetilada, quitosana sulfatada, quitosana carboximetilada e sulfatada, quito-oligossacarídeo ou uma combinação destas.

[061] O pH da formulação final é ajustado entre 6,8 e 7,5 e a osmolaridade é ajustada de acordo com as características inerentes ao sêmen de cada espécie, conforme os métodos conhecidos pelos versados na área técnica. Ao final deste processo, se obtém o diluente para criopreservação de sêmen proposto na invenção.

[062] A invenção pode ser empregada na área técnica de biotecnologia aplicada à reprodução, especificamente, na reprodução assistida; mais especificamente ainda, na tecnologia de criopreservação do sêmen nas diferentes condições de criopreservação.

[063] A abrangência da presente invenção está estabelecida nos termos definidos nas reivindicações anexas. Portanto, os exemplos descritos a seguir devem ser considerados com uma das inúmeras maneiras de se concretizar a invenção e comprovar sua eficácia sem limitar o escopo da mesma, bem como os direitos dos titulares.

20/25

[064] As técnicas utilizadas nos exemplos que ilustram a invenção são convencionalmente bem estabelecidas entre os especialistas nas formas de realização e os reagentes utilizados são comercialmente disponíveis.

[065] Os versados na técnica e empresas com interesse no segmento valorizarão os conhecimentos aqui apresentados e poderão reproduzir a invenção na modalidade apresentada ou em seus equivalentes contemplados pelas reivindicações.

#### **Exemplo 1: Preparação de diluentes para a refrigeração de sêmen ovino**

[066] A presente invenção foi utilizada para preparar diluentes para refrigeração de sêmen ovino baseado na associação entre derivado de quitosana, gema de ovo e ácido cítrico. Quitosana foi obtida a partir de subprodutos do processamento industrial de camarão, com base na metodologia descrita por Cahú et al. (*Process Biochem.* 47(4):570-577, 2012). Posteriormente, foram empregadas metodologias de modificação química para a produção de diferentes derivados de quitosana: quitosana carboximetilada, conforme Ramesh, Viswanatha & Tharanathan (*Carbohydr. Polym.* 58(4):435-441, 2004); quitosana sulfatada, de acordo com Mariappan et al. (*Wound. Repair. Regen.* 7(5):400-406, 1999); quitosana carboximetilada e sulfatada, seguindo as duas metodologias citadas anteriormente; e quito-oligossacarídeos, segundo Roncal et al. (*Carbohydr. Res.* 342(18):2750-2756, 2007).

[067] Os diluentes de refrigeração de sêmen ovino foram constituídos de: 36,05 g/L de Tris; 20,24 g/L de ácido cítrico; 14,68 g/L de frutose, 20%(v/v) de gema de ovo, derivados de quitosana, 1 UI/mL de penicilina e 0,5 mg/mL de estreptomicina. Os três primeiros componentes foram pesados numa escala analítica, adicionados a um recipiente com 400 mL de água ultrapura e homogeneizados durante 20 minutos. Em seguida, foi adicionada à formulação 100 mL de gema de ovo para um total de 500 mL de diluidor que foi novamente homogeneizado durante 20 minutos. Posteriormente, o diluente foi subdividido em cinco tratamentos, incluindo um grupo controle e quatro grupos de teste modificados quanto ao tipo de derivado de quitosana adicionado. No tratamento controle, não houve complementação do diluidor com derivado de

21/25

quitosana. Nos grupos de teste, além dos antibióticos, foram adicionados os derivados de quitosana na concentração final de 15 µg/mL.

[068] Os tratamentos experimentais, conforme descrito acima, foram identificados quanto ao tipo de derivado de quitosana adicionado, sendo: o tratamento ChS, o diluente com adição de quitosana sulfatada; tratamento ChCm, diluente com adição de quitosana carboximetilada; tratamento ChCmS, diluente com adição de quitosana carboximetilada e sulfatada; e o tratamento Oligo, diluente com adição de quito-oligossacarídeos. Após as suplementações, os diluentes foram homogeneizados durante 20 minutos a 25 °C, e tiveram seu pH e osmolaridade mensurados e ajustados para faixas compatíveis com o sêmen da espécie ovina. Os tratamentos controle, ChS, ChCm, ChCmS e Oligo apresentaram pH 7,0 e osmolaridade de 482 mOsm/L; 476,5 mOsm/L; 465,5 mOsm/L; 475 mOsm/L; e 453,5 mOsm/L, respectivamente.

Exemplo 2: Efeitos dos diluentes para a refrigeração de sêmen ovino preparados sobre os parâmetros cinemáticos dos espermatozoides

[069] Este estudo foi realizado para avaliar o efeito de diluentes constituídos de uma associação entre derivado de quitosana, gema de ovo e ácido cítrico na refrigeração de sêmen ovino durante o acondicionamento de sêmen ovino à 5 °C, sobre os parâmetros cinemáticos dos espermatozoides. Foi utilizado sêmen ejaculado de 4 ovinos da raça Santa Inês (sexualmente maduros e com histórico de fertilidade) manejados sob as mesmas condições ambientais, alimentados com feno de capim Tifton e 400 g/dia de ração comercial, além de água e sal mineral *ad libitum*. As coletas de sêmen foram realizadas em dias alternados, totalizando 5 coletas por animal (20 ejaculados). Os ejaculados foram obtidos usando-se uma vagina artificial específica para pequenos ruminantes, pré-aquecida a uma temperatura média de 39 °C e acoplada a um tubo coletor graduado estéril, na presença de uma fêmea como manequim. Todos os procedimentos envolvendo animais foram conduzidos com aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), sob o número de licença 031/2018. Imediatamente após a coleta, os ejaculados foram submetidos a avaliações microscópicas para movimento de massa, vigor e motilidade, em microscópio de contraste de fase. Os ejaculados que apresentaram movimento de

22/25

massa e vigor  $\geq 3$  e valores de motilidade  $\geq 70\%$  foram aprovados e destinados à formação do pool (n=5). Após esta etapa, foi determinada a concentração dos espermatozoides no pool de sêmen em Câmara de Neubauer, seguindo a proporção de 1:400 de solução salina formolizada a 1% (v/v).

[070] Os diluentes para refrigeração de sêmen foram preparados de acordo com o Exemplo 1, e o volume de sêmen recém coletado foi diluído em todos os grupos experimentais para uma concentração espermática padrão de  $200 \times 10^6$  espermatozoides viáveis/mL. Amostras de cada tratamento experimental foram envasadas em palhetas de 0,25 mL, etiquetadas e armazenadas em refrigerador (previamente estabilizado à temperatura de 5 °C para o resfriamento do sêmen) até o momento da análise. Quando a temperatura das amostras atingiu 5 °C (aproximadamente, duas horas após refrigeração) foi determinado o tempo 0 ( $T_{0h}$ ) e os parâmetros cinemáticos dos espermatozoides de cada tratamento foram avaliados individualmente. As análises subsequentes foram realizadas 24 ( $T_{24h}$ ), 48 ( $T_{48h}$ ), 72 ( $T_{72h}$ ) e 96 horas ( $T_{96h}$ ) depois. A cinemática espermática foi avaliada utilizando um Sistema Computadorizado de Análise de Sêmen (Computer-Assisted Semen Analyses - CASA). Para este estudo, as amostras experimentais foram inicialmente aquecidas em banho-maria a 37 °C, durante 5 minutos. Em seguida, uma alíquota de 10  $\mu$ L de cada tratamento foi rediluída em diluidor, sem derivado de quitosana, para atingir uma concentração de  $50 \times 10^6$  espermatozoides/mL, e incubada em banho-maria a 37 °C durante 15 minutos. Após esta etapa, alíquotas de 2,5  $\mu$ L foram depositadas entre lâmina e lamínula, pré-aquecidas a 37 °C em microscópio de contraste de fase e um mínimo de 500 espermatozoides foram capturados em cinco campos aleatórios e avaliados pelo CASA. Os parâmetros espermáticos considerados neste estudo foram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP, %), rápidos (RAP, %), velocidade curvilínea (VCL,  $\mu$ m/s), velocidade em linha reta (VSL,  $\mu$ m/s), velocidade média da trajetória (VAP,  $\mu$ m/s), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %), índice de oscilação (WOB, %), deslocamento lateral da cabeça (ALH,  $\mu$ m) e frequência de batimento cruzado (BCF, Hz). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média e as diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

23/25

[071] Após análise da cinemática espermática do sêmen ovino refrigerado com os diferentes diluentes, observou-se que, a partir de  $T_{0h}$ , o tratamento ChCmS apresentou maior percentual no parâmetro MP ( $30,5 \pm 3,6\%$ ) e diferiu significativamente do tratamento controle ( $24,4 \pm 1,9\%$ ). Na análise de RAP, em  $T_{24h}$ , o tratamento ChS ( $48,7 \pm 9,2\%$ ) obteve maior percentual, diferindo significativamente dos tratamentos ChCm e ChCmS ( $30,0 \pm 7,1\%$  e  $29,4 \pm 8,8\%$ ). Na avaliação de VCL, em  $T_{0h}$ , foi constatada diferença significativa entre o tratamento ChS ( $142,5 \pm 4,9 \mu\text{m/s}$ ) e o tratamento ChCm ( $126,1 \pm 4,6 \mu\text{m/s}$ ). Ainda neste parâmetro, em  $T_{24h}$ , observou-se que os espermatozoides dos tratamentos ChS e Oligo obtiveram maiores índices de velocidade ( $131,9 \pm 4,7 \mu\text{m/s}$  e  $122,4 \pm 8,7 \mu\text{m/s}$ , respectivamente) em relação ao tratamento controle ( $106,4 \pm 5,2 \mu\text{m/s}$ ), diferindo significativamente deste. Quanto a VSL, em  $T_{72h}$ , o tratamento Oligo registrou valor superior ( $61,2 \pm 5,0 \mu\text{m/s}$ ) ao tratamento ChCmS ( $50,4 \pm 2,9 \mu\text{m/s}$ ) e, em  $T_{96h}$ , os tratamentos ChS, ChCm, ChCmS e Oligo registraram valores superiores ( $58,4 \pm 6,4 \mu\text{m/s}$ ;  $57,1 \pm 6,2 \mu\text{m/s}$ ;  $56,9 \pm 6,0 \mu\text{m/s}$  e  $63,9 \pm 6,2 \mu\text{m/s}$ ; respectivamente) ao tratamento controle ( $53,6 \pm 0,9 \mu\text{m/s}$ ). Na análise de VAP, em  $T_{24h}$ , os tratamentos ChS, ChCm, ChCmS e Oligo apresentaram maiores índices ( $82,7 \pm 1,8 \mu\text{m/s}$ ;  $77,4 \pm 7,3 \mu\text{m/s}$ ;  $76,1 \pm 5,3 \mu\text{m/s}$  e  $75,3 \pm 7,4 \mu\text{m/s}$ ; respectivamente) em relação ao tratamento controle ( $72,8 \pm 3,8 \mu\text{m/s}$ ). Os tratamentos ChS, ChCm, ChCmS e Oligo também obtiveram, em  $T_{96h}$ , maiores percentagens em LIN ( $54,2 \pm 4,8\%$ ;  $56,0 \pm 3,5\%$ ;  $53,0 \pm 5,1\%$  e  $56,7 \pm 4,8\%$ ; respectivamente), STR ( $81,9 \pm 2,4\%$ ;  $81,7 \pm 1,7\%$ ;  $80,7 \pm 3,1\%$  e  $83,0 \pm 3,0\%$ ; respectivamente) e WOB ( $66,0 \pm 5,2\%$ ;  $68,6 \pm 3,6\%$ ;  $65,8 \pm 4,3\%$  e  $69,3 \pm 5,6\%$ ; respectivamente) quando comparados com os resultados alcançados pelo tratamento controle ( $48,5 \pm 6,0\%$ ;  $76,2 \pm 3,6\%$  e  $61,3 \pm 6,4\%$  para LIN, STR e WOB, respectivamente). Nos parâmetros MT e ALH não foram observadas diferenças significativas. Com relação ao BCF, em  $T_{72h}$ , foi observada diferença significativa entre o grupo ChCmS ( $15,6 \pm 0,3 \text{ Hz}$ ) e o grupo controle ( $14,6 \pm 0,6 \text{ Hz}$ ), tendo este último menor frequência de batimento flagelar cruzado que o primeiro. Estabelecendo uma correlação entre todos os parâmetros cinéticos avaliados, com exceção de MT e ALH, foi observado que no quinto dia de armazenamento ( $T_{96h}$ ), os tratamentos que continham a associação derivado de quitosana, gema de ovo e ácido

24/25

cítrico apresentaram melhor conservação das características cinemáticas dos espermatozoides quando comparados com o tratamento controle.

Exemplo 3: Efeitos dos diluentes para refrigeração de sêmen ovino preparados sobre a integridade de membranas plasmática e acrossomal, estabilidade de membrana e viabilidade espermática

[072] Este estudo foi realizado para avaliar o efeito de diluentes constituídos de uma associação entre derivado de quitosana, gema de ovo e ácido cítrico na refrigeração de sêmen ovino durante o acondicionamento de sêmen ovino à 5 °C, sobre os parâmetros de integridade de membranas plasmática e acrossomal, estabilidade de membrana e viabilidade espermática. Os diluentes foram preparados de acordo com o Exemplo 1 e a coleta e refrigeração de sêmen foi conduzida como descrito no Exemplo 2. Após estes procedimentos, as avaliações pós-refrigeração foram realizadas. Os parâmetros de integridade de membranas plasmática e acrossomal, estabilidade de membrana e viabilidade dos espermatozoides foram identificados e investigados utilizando-se sondas fluorescentes, em conformidade com Arruda et al. (*Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 70: 153-159, 2018). As amostras foram examinadas por citometria de fluxo utilizando-se os softwares INSPIRE® e IDEAS® para as aquisições e análises dos dados, respectivamente. Todas as amostras foram analisadas e as populações foram divididas por meio de gráficos de pontos e histogramas, além da confirmação visual mediante as imagens das células. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média e as diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0,05$ .

[073] Na análise quanto a integridade de membranas plasmática e acrossomal foi constatado, em  $T_{36h}$ , que os tratamentos ChS, ChCm, ChCmS e Oligo apresentaram melhores percentagens neste parâmetro (42,1 $\pm$ 5,6%; 43,2 $\pm$ 3,7%; 40,9 $\pm$ 4,5% e 43,2 $\pm$ 3,4%; respectivamente) em relação ao tratamento controle (36,6 $\pm$ 6,0%). No que diz respeito à estabilidade de membrana plasmática, não foi constatada diferença significativa entre os tratamentos que continham a associação entre derivado de quitosana, gema de ovo e ácido cítrico e o tratamento controle nas primeiras 24 horas. No entanto, em  $T_{48h}$ , o tratamento ChCmS apresentou maior percentual de espermatozoides com membrana estável (32,4 $\pm$ 4,1%) comparado ao tratamento

## REIVINDICAÇÕES

1. "DILUENTE CONTENDO DERIVADO DE QUITOSANA, GEMA DE OVO E ÁCIDO CÍTRICO EM SUA COMPOSIÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO MESMO" caracterizado por constituir um produto diluente formado de entre 0,015 e 25 mg/mL de derivado de quitosana em solução tamponada, entre 5 e 30% (v/v) de gema de ovo, entre 10 e 30 g/L de ácido cítrico, e agentes coadjuvantes.
2. "DILUENTE CONTENDO DERIVADO DE QUITOSANA, GEMA DE OVO E ÁCIDO CÍTRICO EM SUA COMPOSIÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO MESMO" de acordo com a reivindicação 1, caracterizado por os agentes coadjuvantes compreenderem ao menos um ou mais monossacarídeos pertencentes ao grupo consistido de frutose, manose, glicose, galactose, dextrose, xilose ou uma combinação destes; ao menos um agente tamponante em solução aquosa pertencente ao grupo consistido de bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>), citrato de sódio, fosfato de sódio, glicina, PBS (tampão fosfato salina), Tris (tris(hidroximetil) aminometano), TES (ácido N-tris(hidroximetil)metil-2-amino etanosulfônico), HEPES (ácido N-2-hidroxiethylpiperazina-N'-2-etanosulfônico), MOPS (ácido 3-(N-morfolino) propanossulfônico), MOPSO (ácido 3-(N-morfolino)-2-hidroxi propanossulfônico), MES (ácido 2-(N-morfolino) etanosulfônico), BES (ácido N,N-Bis(2-hidroxiethyl)-2-aminoetanosulfônico), PIPES (piperazina-N,N'-bis(ácido 2-etanosulfônico)), seus derivados ou uma combinação destes; e ao menos um antibiótico inibidor da parede celular ou inibidor da síntese proteica bacteriana pertencente ao grupo consistido de gentamicina, penicilina, estreptomicina, seus derivados ou uma combinação destes.
3. "DILUENTE CONTENDO DERIVADO DE QUITOSANA, GEMA DE OVO E ÁCIDO CÍTRICO EM SUA COMPOSIÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO MESMO" de acordo com a reivindicação 2,

caracterizado por ao menos um monossacarídeo ser consistido de 10 a 25 g/L de frutose.

4. "DILUENTE CONTENDO DERIVADO DE QUITOSANA, GEMA DE OVO E ÁCIDO CÍTRICO EM SUA COMPOSIÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO MESMO" de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por, ao menos, um agente tamponante em solução aquosa ser consistido de 20 a 40,0 g/L de Tris.
5. "DILUENTE CONTENDO DERIVADO DE QUITOSANA, GEMA DE OVO E ÁCIDO CÍTRICO EM SUA COMPOSIÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO MESMO", de acordo com a reivindicação 2, caracterizado por conter uma combinação de antibióticos consistida de 1 a 50 UI/mL de penicilina e 0,05 a 0,5 mg/mL de estreptomicina ou gentamicina de 0,0005 a 0,25 mg/mL.
6. "DILUENTE CONTENDO DERIVADO DE QUITOSANA, GEMA DE OVO E ÁCIDO CÍTRICO EM SUA COMPOSIÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO MESMO" caracterizado por processo para obtenção do produto definido na reivindicação incluir as etapas de (a) Dissolução de ácido cítrico, (b) Adição de gema de ovo e (c) Adição de, ao menos, um derivado de quitosana em solução tamponada de pH entre 6,8 e 7,5.
7. "DILUENTE CONTENDO DERIVADO DE QUITOSANA, GEMA DE OVO E ÁCIDO CÍTRICO EM SUA COMPOSIÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO MESMO" de acordo com a reivindicação 6, caracterizado por processo para obtenção do produto definido na reivindicação utilizar ao menos um derivado de quitosana produzido por reação de modificações química de substituição de grupos químicos, de alongamento de cadeia, de despolimerização da quitosana ou uma combinação destas; com solubilidade aquosa na faixa de pH compreendida entre 6,8 e 7,5.
8. DILUENTE CONTENDO DERIVADO DE QUITOSANA, GEMA DE OVO E ÁCIDO CÍTRICO EM SUA COMPOSIÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO MESMO" de acordo com a reivindicação 7,

3 / 3

caracterizado por processo para obtenção do produto definido na reivindicação utilizar como derivado de quitosana uma quitosana carboximetilada, quitosana sulfatada, quitosana carboximetilada e sulfatada, quito-oligossacarídeo ou uma combinação destas.

1 / 1

## RESUMO

**"DILUENTE CONTENDO DERIVADO DE QUITOSANA, GEMA DE OVO E ÁCIDO CÍTRICO EM SUA COMPOSIÇÃO PARA CRIOPRESERVAÇÃO DE SÊMEN E PROCESSO DE PREPARAÇÃO DO MESMO".**

A presente invenção trata de um diluente para criopreservação do sêmen, contendo derivado de quitosana em meio aquoso tamponado em associação com a gema de ovo e o ácido cítrico, juntamente com coadjuvantes; e seu processo de preparação. O diluente proposto promove efeitos benéficos nos parâmetros de motilidade, estabilidade e viabilidade espermática, podendo ser utilizado para prolongar a vida funcional do espermatozoide criopreservado e melhorar o seu desempenho reprodutivo. A invenção contribui para a eficiência dos atuais procedimentos de criopreservação empregados no campo técnico da reprodução assistida.