



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

JOSÉ ADELSON ALVES DO NASCIMENTO JUNIOR

**ANÁLISE DOS MECANISMOS DE AÇÃO E MODIFICAÇÕES NO PROTEOMA DE
ESPERMATOZOIDES POR AÇÃO DE COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DE ÓLEOS
ESSENCIAIS**

Recife
2020

JOSÉ ADELSON ALVES DO NASCIMENTO JUNIOR

**ANÁLISE DOS MECANISMOS DE AÇÃO E MODIFICAÇÕES NO PROTEOMA DE
ESPERMATOZOIDES POR AÇÃO DE COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DE ÓLEOS
ESSENCIAIS**

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 Reprodutiva.

Orientador: Profa. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia

Coorientadores: Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro

Dr. Túlio Diego da Silva

Recife
2020

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Nascimento Júnior, José Adelson Alves do

Análise dos mecanismos de ação e modificações no proteoma de espermatozoides por ação de compostos majoritários de óleos essenciais / José Adelson Alves do Nascimento Júnior. - 2020.

134 f. : il.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia.

Coorientadores: Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro, Dr. Túlio Diego da Silva.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2020.

Inclui referências e apêndices.

1. Reprodução. 2. Fertilização in vitro. 3. Biotecnologia. I. Correia, Maria Tereza dos Santos (orientador). II. Carneiro, Gustavo Ferrer (coorientador). III. Silva, Túlio Diego da (coorientador). IV. Título.

636.0824

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2021 - 195

JOSÉ ADELSON ALVES DO NASCIMENTO JUNIOR

**ANÁLISE DOS MECANISMOS DE AÇÃO E MODIFICAÇÕES NO PROTEOMA DE
ESPERMATOZOIDES POR AÇÃO DE COMPOSTOS MAJORITÁRIOS DE ÓLEOS
ESSENCIAIS**

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.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dr^a. Maria Tereza dos Santos Correia (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Gustavo Ferrer Carneiro
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Dr. Tulio Diego da Silva
Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste (CETENE)

Profa. Dr^a. Ana Lúcia Figueiredo Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Profa. Dr^a. Luana Cassandra Breitenbach Barroso Coelho
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico esta tese a Deus, aos meus pais, aos meus avós e à minha irmã que sempre estiveram comigo. À minha esposa que lutou comigo nesses anos, especialmente, dedico esta tese ao meu querido, Tiago José Correia Alves (*in Memoriam*), por me mostrar que a vida vale muito e que devemos aproveitar cada segundo que nela estamos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por me proporcionar estar aqui e conseguir realizar meus sonhos, de uma forma que planejei, mas que nunca imaginei que conseguiria.

Agradeço aos meus familiares, em especial, a meu avô que talvez tenha sonhado mais que eu com esse momento, à minha avó que desde a graduação está comigo me esperando dias e noites para fazer meu “só um cafezinho”, a meu pai por todo apoio financeiro e emocional, desde o início, para estar naquela cidade tão complicada, à minha mãe por em momento algum me fazer duvidar dos meus sonhos, à minha Zé (minha filha) que me ajudou em momentos psicologicamente terríveis.

Agradeço com zelo e calor à minha esposa, que hoje posso chamar de esposa, mas que no começo desse doutorado era minha namorada, e que sofreu tanto com a distância, mas sempre esteve ao meu lado, mesmo em momentos que tudo parecia terrível, me ajudou e me deu total apoio, principalmente, agora neste final pra essa tese sair do 0, minha enfermeira que me inspira tanto a crescer, e agora por fim posso dizer: “Gracias”, né, amor? Te amo.

Quero agradecer aos meus tios *Sandro, Bruno e César* que são minha referência de como lidar em equipe familiar, mostrando que assim é que se deve viver, sempre unidos, seja qual for o momento.

Agradeço ao meu anjo, que ao longo dessa trajetória de doutorado perdi, meu boyzinho Tiago José, que me ensinou muito, o como é bom viver, o como é necessário aproveitar todos os momentos em família e amigos, porque não sabemos quanto tempo teremos no futuro.

Por fim, agradeço à minha orientadora *Maria Tereza dos Santos Correia* e aos coorientadores *Gustavo Ferrer Carneiro* e *Tulio Diego da Silva*, que confiaram no meu trabalho, como a minha própria epigrafe já diz uma “ideia absurda”, os quais não trabalhavam na área completa desta empreitada, que no final gerou frutos, agradeço muito, a minha evolução se deve a vocês, hoje sou um pesquisador diferente, muito obrigado mesmo.

“Se, a princípio, a ideia não é absurda, então não há esperança para ela.”
(Albert Einstein)

RESUMO

Com a ascensão da biotecnologia, técnicas de reprodução ganharam destaque no cenário de conservação e propagação do material genético animal. A introdução destas técnicas, como a criopreservação de espermatozoides, tem despertado o interesse do mercado e de grandes criadores, que enxergam nessa técnica o caminho para aumentar o sucesso e o potencial reprodutivo de muitos animais. Entretanto, muitos estudos envolvendo a manipulação do sêmen, com o objetivo de conservá-lo para uma utilização posterior, relatam uma série de danos causados à estrutura do gameta masculino. Acontece que, durante o processo de resfriamento e/ou congelamento, a célula espermática passa por mudanças químicas e físicas que podem interferir diretamente na integridade e na qualidade da célula espermática, alterando a sua função biológica. Apesar da maioria das pesquisas evidenciarem que a criopreservação espermática ser um desafio para a comunidade científica, esse procedimento também traz alguns benefícios inerentes a sua utilização, como a redução de riscos na disseminação de doenças, a diminuição de custos com transporte de animais e a preservação de espécies raras ameaçadas de extinção. Este trabalho objetivou-se analisar a utilização do óleo essencial de *Abarema Cochliacarpus* como agente antioxidante na diminuição das possíveis lesões ocasionadas pela criopreservação. Para alcançar tal objetivo foram utilizados sêmen equino, ovino e bovino, em idade reprodutiva, sendo coletado o material seminal em triplicata em dias alternados, os mesmos foram congelados com a adição do óleo ao diluente de criopreservação nas seguintes concentrações: 0 (controle); 1mg; 0,5mg; 0,25mg; 0,125mg e 0,067 mg;, com posterior descongelamento e avaliação dos parâmetros cinéticos no sistema computadorizado CASA, avaliando-se também a integridade da membrana plasmática e do potencial de membrana mitocondrial por sondas de fluorescência. Os dados obtidos após transformação pelo arco seno foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), sendo as médias dos tratamentos comparados com o Teste Tukey à 5% de significância. Na avaliação do CASA não houve diferenças significativas entre as concentrações nos parâmetros de: Motilidade Total (MT), Velocidade Curvilínea (VCL), Velocidade Progressiva (VSL), Velocidade de Trajeto (VAP), WOB e Amplitude do Deslocamento Lateral da Cabeça (ALH). No entanto, houve diferença significativa entre as concentrações quando avaliados os parâmetros de Motilidade Progressiva (MP), Linearidade (LIN), Retilinearidade (STR) e Frequência de Batimento Flagelar Cruzado (BCF) com um destaque para a concentração de 0,125mg de *Abarema Cochliacarpus*. Dessa forma, os resultados indicam que não houveram efeitos adversos do *Abarema Cochliacarpus* na integridade de membrana plasmática ou potencial mitocondrial nas

diferentes concentrações desse experimento, com isso, constata-se que não ocorreu diferença estatística entre os tratamentos na integridade de membrana ou no potencial mitocondrial. A concentração de 0,125mg do extrato, apresentou-se como a concentração mais indicada neste experimento. Concluindo, assim, que o extrato de *Abarema Cochliacarpus* pode ser usado na criopreservação de sêmen de variadas espécies.

Palavras-chave: biotecnologia reprodutiva; antioxidante; fertilização in vitro; espermatozoide.

ABSTRACT

With the rise of biotechnology, reproduction techniques have gained prominence in the scenario of conservation and propagation of animal genetic material. The introduction of these techniques, such as the cryopreservation of sperm, has aroused the interest of the market and of great breeders, who see in this technique the way to increase the success and reproductive potential of many animals. However, many studies involving the manipulation of semen, with the objective of preserving it for later use, have reported a series of damages caused to the structure of the male gamete. It turns out that during the cooling and / or freezing process, the sperm cell undergoes chemical and physical changes that can directly interfere with the integrity and quality of the sperm cell, thereby altering its biological function. Although the vast majority of research shows that sperm cryopreservation is still a challenge for the scientific community, this procedure also brings with it some benefits inherent to its use, such as reducing risks in the spread of diseases, reducing costs with transporting animals and the preservation of rare species threatened with extinction. The objective of this work was to analyze the use of essential oil of *Abarema Cochliacarpus* as an antioxidant agent that can reduce the possible injuries caused by cryopreservation. To achieve this objective, equine, ovine and bovine semen of reproductive age were used, and seminal material was collected in triplicate on alternate days, they were frozen with the addition of the extract to the cryopreservation diluent in the following concentrations: 0 (control); 1mg; 0.5mg; 0.25mg; 0.125 mg and 0.067 mg; being subjected to freezing, with subsequent thawing and evaluation of the kinetic parameters in the CASA computerized system, also evaluating the integrity of the plasma membrane and the potential of the mitochondrial membrane by fluorescence probes. The data obtained after transformation by the sine arc were subjected to analysis of variance (ANOVA), with the means of treatments compared with the Tukey Test at 5% significance. In the assessment of CASA there were no significant differences between the concentrations in the parameters of: MT, VCL, VSL, VAP, WOB and ALH. However, there was a significant difference between the concentrations when the parameters of Progressive Motility (MP), Linearity (LIN), Straightness (STR) and Frequency of Cross-Flagellar Beat (BCF) were evaluated, with an emphasis on the concentration of 0.125mg of *Abarema Cochliacarpus*. There was no statistical difference between treatments for membrane integrity or mitochondrial potential. These results indicate that there was no adverse effect of *Abarema Cochliacarpus* on the integrity of the plasma membrane or mitochondrial potential in the different concentrations of this experiment. The concentration of 0.125mg of the extract, presented itself as the most indicated concentration in

this experiment. Concluding that the extract of *Abarema Cochliacarpus* can be used in the cryopreservation of semen of different species.

Keywords: reproductive biotechnology; antioxidant; in vitro fertilization; sperm.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	15
2.1	MERCADO DE EQUINOS NO BRASIL.....	15
2.2	TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO <i>IN VITRO</i>	17
2.2.1	Importância das técnicas de criobiologia.....	17
2.3	DANOS CAUSADOS NO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO A CÉLULA.....	20
2.3.1	Danos celulares.....	21
2.3.2	Danos ao citoesqueleto.....	22
2.3.3	Danos as membranas.....	22
2.3.4	Danos mitocondriais.....	23
2.3.5	Apoptose.....	24
2.3.6	Estresse oxidativo.....	25
2.4	ANTIOXIDANTES	28
2.4.1	Ácido ascórbico.....	30
2.4.2	Alfa-tocoferol.....	30
2.4.3	Resveratrol.....	31
2.4.4	Catalase.....	33
3	ARTIGOS.....	34
3.1	ARTIGO 1 – EFEITO DE ANTIOXIDANTE NO CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES BOVINOS	34
3.2	ARTIGO 2 – EFEITO ANTIOXIDANTE NO CONGELAMENTO DE SÊMEN OVINO.....	44
3.3	ARTIGO 3 – AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICO DE PLANTAS DA CAANTIGA.....	55

3.4	ARTIGO 4 – CARACTERIZAÇÃO FÚNGICA E FORMAÇÃO DE BIOFILME EM ÉGUAS COM ENDOMETRITE.....	76
4	CONCLUSÃO.....	87
	REFERÊNCIAS.....	88
	APÊNDICE A – ARTIGOS PUBLICADOS.....	93
	APÊNDICE B – PATENTE 1.....	95
	APÊNDICE C – PATENTE 2.....	117

1 INTRODUÇÃO

A composição membranar do espermatozoide tem um alto nível de ácidos graxos poli-insaturados que os leva a sofrer diversos danos oxidativos (POULOS; DARIN BENNET; WHITE, 1973). Essa sensibilidade, ocasiona a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), causando danos significativos ao reduzir seu potencial reprodutivo (VALENÇA; GUERRA, 2007).

Na espécie equina, a seleção dos reprodutores não baseia-se nas características reprodutivas, mas nos fatores fenotípicos que não consideram a qualidade ou viabilidade espermática. Dessa forma, existe uma necessidade da utilização de estratégias visando a melhoria da qualidade espermática e da fertilidade desses animais (BALL, 2008).

Estudos mostram que a técnica de criopreservação acarreta no estresse oxidativo à célula espermática, ocasionando um comprometimento de até 50% dos espermatozoides da amostra (WATSON, 2000). A presença de antioxidantes nos meios de congelamento e refrigeração de sêmen auxiliam na proteção do espermatozoide contra as injúrias induzidas pelos radicais livres, reduzindo danos sobre a sua motilidade, viabilidade, além de interromper a reação em cadeia da peroxidação dos lipídios das membranas espermáticas, em diversas espécies animais (AISEN et al., 2005; BUCAK et al., 2009).

Os compostos utilizados para a melhoria da qualidade do sêmen são substâncias que previnem o estresse oxidativo a célula espermática (UPRETI et al., 1998; KRYZOSIAK et al., 2000). Apesar de ser um método de fácil acesso, ainda apresenta um alto custo e resultados controversos. Dessa maneira, é necessário uma alternativa a estes agentes, como os antioxidantes à base de plantas, que possuem baixa citotoxicidade e baixo custo. Diversos estudos descrevem a atividade antioxidante em plantas, como a constituição de uma redução dos radicais livres, capaz de promover a preservação do sêmen de garanhões (PEREIRA et al., 2009).

Metodologias que auxiliam na preservação seminal e na fertilidade em garanhões, também auxiliariam os produtores na seleção de possíveis reprodutores. Segundo Baumber et al. (2002), diversas técnicas que visam melhorias para a reprodução, à exemplo a utilização de antioxidantes, vem sendo testadas a fim de contribuir para a redução de efeitos deletérios causados pelos radicais livres. Assim, os antioxidantes agem na redução direta de danos a membrana, a motilidade e a fertilidade (AURICH et al., 1997; BRUEMMER et al., 2002).

Ao avaliar a capacidade espermoprotetora de plantas endêmicas da região Nordeste, encontra-se materiais como fontes de subsídios protetores eficazes na regulação da fertilidade capazes de melhorar aspectos como a ativação espermática pós descongelamento. Adicionalmente, diante da velocidade do fenômeno de devastação da caatinga, há o risco de que muitas propriedades medicinais dessas plantas não sejam reconhecidas, tornando os investimentos nessa área ainda mais urgentes.

Além disso, os mecanismos de ação dos óleos essenciais sobre as proteínas do espermatozoide ainda não são bem elucidados, sendo necessário estudos moleculares, em especial, o estudo do proteoma para a complementação aos estudos fisiológicos e de genômica permitindo examinar simultaneamente as alterações e classificar padrões temporais de acúmulo ou diminuição de proteínas que ocorrem durante o processo de ação dos óleos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 MERCADO DE EQUINOS NO BRASIL

Os cavalos estão inseridos nas mais diversas formas de atividades humanas. É datada das civilizações mais antigas a utilização de cavalos como meio de transporte, destacando-se, principalmente, por sua incrível versatilidade no mundo dos esportes, dentre os quais são mencionados a vaquejada e o hipismo. Conforme os dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abaste (MAPA) no ano de 2016, cerca de 72% dos equinos utilizados para o trabalho, estão vinculados a atividades pecuárias, como criação de bovinos. Os animais brasileiros que não estão voltados a pecuária, correspondem a cerca de 1,3 milhões de animais lotados em 500 mil estabelecimentos.

Uma estimativa do crescimento populacional de cavalos em milhões de cabeças por ano, como mostra a figura abaixo (figura 1), evidencia que existe uma evolução ao longo dos anos. Os valores referentes ao ano de 2018, são parciais considerados até o presente momento.

Figura 1 – Crescimento populacional de equinos em milhões.



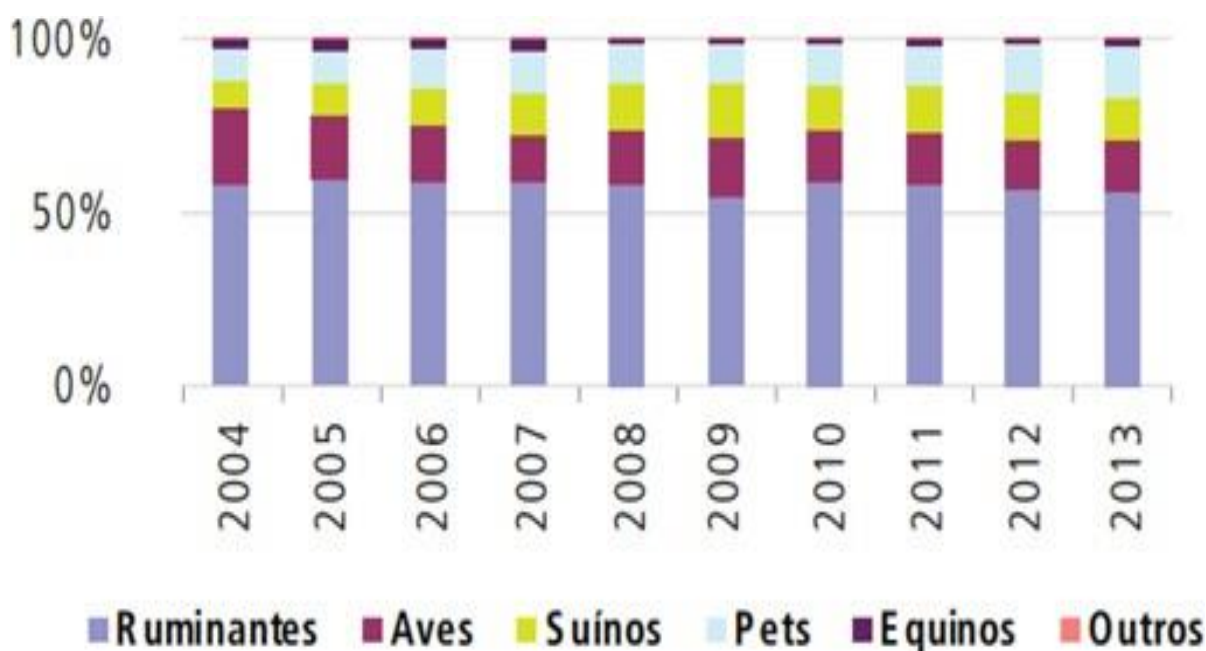
Fonte: IBGE (2018).

É errôneo acreditar que devido à alta procura, este tipo de animal receberia mais cuidados que alguns outros. Segundo dados do MAPA no ano de 2016, o baixo investimento no tratamento associa-se à dificuldade de verba por parte dos criadores. Ao considerar que são

animais utilizados na agricultura familiar ou em atividades ligadas à agropecuária, a movimentação econômica dentro da classe de equinos é consideravelmente pequena e isso faz com que não se tenha tanta preocupação com o bem-estar animal.

A comparação de gastos com medicamentos veterinários entre equinos e outros animais, retratada pela figura 2 em porcentagem, evidencia que não existe grande investimento na saúde desses animais quando comparados aos gastos feitos com ruminantes e pets.

Figura 2 – Faturamento da indústria veterinária, por espécie animal de 2004 a 2013 no Brasil.



Fonte: SINDAN (2015).

A utilização de animais em modalidades competitivas revela um grande aumento em seu rebanho, gerando, principalmente, um aumento significativo nos trabalhos diretos e indiretos frente a este rebanho. Dando visibilidade e importância, considerando que a movimentação econômica ocorre em demasia, quando retratados em questão de números, Santos, Brandi e Gameiro (2018), destacam que o Brasil possui um rebanho de aproximadamente 5,8 milhões de equinos, em que cerca de 8.700 estão vinculados ao hipismo sendo registrado na associação que os representa, movimentando cerca de R\$ 16,15 bilhões ao ano e geram em torno de 610 mil empregos diretos e indiretos.

Em um patamar internacional, os números de importações e exportações destes animais excedem os cálculos do crescimento esperado para tal área. Os Estados Unidos da América (EUA) se apresenta como o primeiro colocado em exportações, com números que ultrapassam os 180 mil. Quando comparado com o capital gerado pelos Estados Unidos, o Brasil não é visto

como grande adversário, pois conta com pouco mais de 3 mil exportações por ano. Entretanto, devido a recente evolução deste mercado e com base nos dados do MAPA no ano de 2017, o Brasil fica à frente de países como Uruguai e Argentina.

Quando refere-se a dados econômicos sobre gastos com bem-estar animal, deparamo-nos com números não tão expressivos, que se esperaria de uma classe em ascensão. Os números apesar de baixos devem ser considerados necessários a criação e manutenção destes animais que despontam grande interesse. Tanto os cavalos que representam grande maioria do rebanho brasileiro, quanto os destinados ao esporte e ao lazer despontam ativos gastos para uma possível ampliação de vida útil convertida em bem-estar.

Os investimentos e os gastos em pesquisas que auxiliem em áreas de saúde e bem-estar equino, como pesquisas na área da biotecnologia no desenvolvimento de técnicas reprodutivas menos invasivas e mais eficazes, em que há também inovação terapêutica para uma possível diminuição da mortalidade e uma maior humanização dos tratamentos.

2. 2 TÉCNICAS DE REPRODUÇÃO *IN VITRO*

2.2.1 Importância das técnicas de criopreservação.

A reprodução assistida tanto humana quanto animal tem passado nos últimos anos por uma grande evolução, incluindo neste meio os avanços das biotécnicas reprodutivas. O uso da criobiologia tem assumido papel fundamental para a preservação de gametas femininos e masculinos, mostrando-se assim como parte crucial das tecnologias de reprodução (FAUSTINO et al., 2011).

A criobiologia favorece a conservação da capacidade de fecundação tanto de células germinativas femininas como masculinas, além de preservar a viabilidade e a sobrevivência embrionária por longos períodos para o uso posterior através da congelação ou da vitrificação (RODRIGUES et al., 2001). Atualmente, o uso destas técnicas que manipulam os gametas masculinos e femininos funcionam como instrumentos significantes nas técnicas de reprodução assistida. Graças ao aprimoramento nos processos de criopreservação tornou-se possível a preservação de embriões, tecidos e células. A possibilidade de criopreservar embriões e ovócitos passou a ser considerada como um ponto fundamental na reprodução assistida, tanto em humanos quanto na medicina veterinária. Segundo Boité (2008), biotécnicas como produção *in vitro* e transferência nuclear têm sua taxa de sucesso otimizada quando ligadas a um processo eficiente de criopreservação seja de células, gametas ou embriões.

São descritos dois métodos para criopreservação: congelação lenta ou congelação convencional e a vitrificação. Por muitos anos a congelação convencional dominou as técnicas de criobiologia, neste método não é raro a formação intracelular de cristais de gelo, e estes podem gerar danos na membrana, ocasionando morte celular (SILVA, 2015). Por outro lado, a vitrificação, método que consiste em rápidas taxas de resfriamento e aquecimento e que não ocasiona a formação de cristais de gelo, além de ser uma opção mais simples e rápida e com um custo relativamente baixo, a desvantagem deste método é alta concentração de crioprotetores na solução, que em índices elevados torna-se altamente tóxico (LIMA, 2012).

A criobiologia oferece as mulheres e aos homens envolvidos em Fertilização *in vitro* (FIV) ou Injeção Intra Citoplasmática de Espermatozoide (ICSI) a chance de realizar tratamentos com a transferência de embriões sem a necessidade de recorrer ao procedimento de estimulação ovárica, evitando dessa maneira desconforto físico, emocional e afetivo, bem como custo financeiro. Observa-se, nesse caso, a redução do risco da síndrome de hiper estimulação ovárica que pode provocar alterações no funcionamento do corpo das mulheres, além da oportunidade de armazenar os embriões excedentes e viáveis do procedimento anterior e promover a possibilidade de doação destes embriões excedentes para casais ou para pesquisa (PEREIRA, 2014).

Muitos casais recorrem a técnicas de reprodução com a fertilização *in vitro* (FIV), cujo procedimento ocorre à transferência do embrião diretamente no tubo uterino da mulher. Neste procedimento, é produzido um número de embriões em excesso, em que apenas alguns poderão ser implantados no útero e os demais ganharão outro destino: o congelamento. De acordo com Gasda (2015), o congelamento desse material biológico figura entre as principais técnicas complementares de reprodução assistida. A criopreservação de embriões depende do estágio de desenvolvimento e da qualidade morfológica dos mesmos, podendo estes ser congelados desde o estágio de zigoto até de blastocistos (VIEIRA, 2012).

Holt (1998) descreve claramente os objetivos das técnicas de criobiologia, para a medicina humana, a meta é solucionar problemas reprodutivos associados à infertilidade e na medicina veterinária, o objetivo é aumentar a procriação de animais que apresentam elevado valor genético, e até mesmo a preservação de espécies raras ameaçadas de extinção, as quais podem ser utilizadas para disseminar e proteger a biodiversidade. Dessa maneira, a criopreservação de embriões tem despontado como uma parte inerente da reprodução assistida em animais, em especial, de espécies domésticas (PYLES, 2003).

A inseminação artificial é uma técnica que está sendo bastante recorrida na reprodução de animais, como equinos, em que seleciona-se os melhores garanhões, a fim da redução de

riscos de acidentes e minimização da incidência de doenças venéreas, tendo esse resultado como consequência do congelamento da célula espermática do gauri (LORENZONI, 2010). Estudos científicos sobre a utilização das técnicas de criopreservação estão sendo realizados com o intuito de formar bancos de gametas femininos, onde estes poderão ser usados para pesquisas e/ou aplicações comerciais. Naturalmente, uma vaca de valor genético alto, pode gerar de seis a oito crias em toda a sua existência, mas com a superovulação podem ser gerados até 60 bezerros do mesmo animal em um período de 12 meses, com o uso da transferência de embriões para fêmeas receptoras (LIMA, 2012).

Os avanços na criobiologia têm surgido como importante ferramenta, principalmente, para aqueles que em um dado momento de sua vida, possam apresentar estados que comprometam a sua fertilidade como o câncer. A grande maioria dos tratamentos oncológicos são dirigidos para aquelas células que apresentam um índice elevado de proliferação celular, acontece que estas terapêuticas além de danificarem as células tumorais, comprometem outras células saudáveis do corpo humano, e uma das consequências aos sobreviventes do crânio é enfrentar problemas em sua saúde reprodutiva, como a infertilidade, devido aos efeitos tóxicos nas células da linhagem germinativa (CARVALHO, 2010).

A criopreservação tem sido indicada para mulheres que apresentam enfermidades como o câncer, visto que estas biotécnicas permitem a preservação de células germinativas femininas antes da manipulação dos medicamentos anticancerígenos, assim, torna-se uma alternativa de grande relevância para aquelas pacientes que almejam gerar e conceber uma criança após a cura do câncer (SILVA, 2015). A preservação do tecido ovariano é uma das alternativas para aquelas que apresentam neoplasias, para um posterior autotransplante (ALMEIDA, 2005). O congelamento do tecido ovárico é um caminho simples e efetivo de preservar a linhagem germinativa feminina, o tecido armazenado em nitrogênio líquido poderá ser descongelado e reimplantado no organismo da paciente oferecendo a chance de uma gravidez futura (RÔLO, 2012).

A criopreservação de tecido ovariano tem como finalidade preservar a fertilidade de mulheres jovens que se encontram em idade reprodutiva antes que deem início ao tratamento contra doenças malignas. Isso tem mostrado o quanto a criopreservação do tecido ovariano é uma importante tecnologia, com proveitos médicos e científicos (FAUSTINO et al., 2011). Para os homens que sofrem com a mesma enfermidade, a modernidade e o avanço das técnicas de criopreservação, permitem a preservação da fertilidade em homens adultos com câncer, preservando amostras de sêmen antes do início da terapêutica, assegurando assim a

possibilidade de paternidade biológica, mesmo em casos em que a azoospermia seja o resultado obtido pós o tratamento (ALVARENGA et al., 2012).

Para aqueles homens com câncer no período pré-puberal que apresentam apenas espermatogônias e espermátócitos podem recorrer à criopreservação do tecido testicular, através de uma biópsia testicular em que os túbulos seminíferos são aspirados e as células-tronco de espermatogônias são congeladas, essa técnica oferece a oportunidade para que após o tratamento e comprovada a cura, as células possam ser reimplantadas no testículo, ou até mesmo diferenciadas e produzidas *in vitro* para extração de espermatozoides que serão utilizados para fertilização de ovócitos por meio de ICSI, possibilitando ao homem a paternidade biológica (OLIVEIRA, 2015).

É notável a contribuição da criobiologia para o potencial reprodutivo de humanos e animais. Dentre as técnicas mais comuns oferecidas na procriação medicamente assistida, encontra-se: Inseminação Intra-Uterina (IIU); Fertilização *in vitro* (FIV) e a Micro injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI), ambas utilizam esperma a fresco ou esperma congelado, como nas situações de pacientes oncológicos para preservação da fertilidade. De acordo com Carvalho (2010), a criopreservação espermática aliada ao conjunto das técnicas de reprodução assistida veio a somar e possibilitar aos doentes de crânio a possibilidade de paternidade, devido à preservação das células germinativas em período de idade reprodutiva, para uso futuro.

2.3 DANOS CAUSADOS NO PROCESSO DE CRIOPRESERVAÇÃO A CÉLULA ESPERMÁTICA

A criopreservação tem sido um processo amplamente utilizado na procriação, sendo um meio procurado para aumentar o potencial reprodutivo de muitos animais e uma ferramenta de grande valor em técnicas de inseminação artificial e produção *in vitro* de embriões (LEITE et al., 2011). Prien e Lacovides (2016), descrevem o uso da criopreservação como a capacidade de armazenar células por um tempo indeterminado, mantendo a sua viabilidade e integridade a uma temperatura abaixo de zero para um uso posterior.

Apesar de ser uma técnica bastante procurada, a criopreservação tem enfrentado problemas para garantir a sobrevivência de espermatozoides e o sucesso de fertilização. Durante esse processo, os espermatozoides passam por uma via de etapas: resfriamento, congelamento e descongelamento. E, estas são responsáveis por causar danos à célula espermática, diminuindo sua capacidade de fertilidade se comparada ao sêmen fresco (THOMSOM, 2009). Essa diminuição

para Watsom (2000), se atribui a perda da viabilidade espermática e da motilidade dos espermatozoides sobreviventes. No resfriamento e congelamento do sêmen, mudanças químicas e físicas afetam o espermatozoide causando a desidratação parcial, a reorganização estrutural dos lipídios e proteínas da membrana, a penetração dos crioprotetores na célula, a exposição às altas concentrações de solutos e aos cristais de gelo são consequências da criopreservação (SOUZA, 2013).

A integridade da célula espermática é indiscutível para a fertilização acontecer, pois a preservação das estruturas espermáticas após o processo de congelamento se dá através da interação entre diluentes, crioprotetores, curvas de resfriamento, congelamento e descongelamento, e de acordo com cada particularidade seminal de cada espécie (CASTELO, 2008). Estudos têm demonstrado que a qualidade do próprio sêmen interfere na criopreservação, pois alguns indivíduos produzem ejaculados mais aptos e resistentes à criopreservação do que outros (CIPRIANO; FREITAS, 2013). A variedade de temperatura nas etapas de refrigeração, congelamento e descongelamento são responsáveis por causar danos à morfologia e a função espermática. Silva e col. (2012), relatam em um estudo com catetos (P. Tajacu) que houve uma redução da motilidade espermática após refrigeração a 5 °C, m, dos fatores mais avaliados na criopreservação é a taxa de congelamento, que quando lenta leva a desidratação celular e o choque osmótico, devido à elevada concentração de sal do meio e a formação de gelo extracelular em temperaturas abaixo de zero. Por outro lado, a taxa de congelamento rápida não permite que ocorra a desidratação da célula, favorecendo a formação de cristais de gelo intracelular (ANZAR, 2011).

Os crioprotetores são substâncias usadas com o intuito de proteger os espermatozoides durante a criopreservação, sendo o glicerol o crioprotetor mais usado nesse processo, vez que seu efeito na membrana plasmática acontece por uma ligação direta aos fosfolipídios da membrana, reduzindo sua fluidez e interferindo na permeabilidade seletiva da membrana celular à água e aos íons. No entanto, os próprios crioprotetores podem ser tóxicos quando usados em altas concentrações, uma vez que os espermatozoides são vulneráveis a ataques osmóticos (SAID; GAGLANI; AGARWAL, 2010).

2.3.1 Danos celulares

Ribas-Maynou et. al (2014), em seus estudos recentes revela que o efeito da criopreservação sobre o dano no DNA do esperma, mostrando que o principal responsável por induzir a danos nucleares durante o processo de congelamento e descongelamento do sêmen,

são as espécies reativas de oxigênio, pois levam a descondensação da cromatina, desnaturação do DNA e a indução da vacuolização nuclear (MUKHOPADHYAY et al., 2011).

A criopreservação prolongada aumenta o nível de espécies reativas de oxigênio (ROS), o sêmen criopreservado sofre fragmentação do DNA prejudica o potencial fertilizante (MUKHOPADHYAY et al., 2011). As espécies reativas de oxigênio (EROs), causam danos à cromatina de espermatozoides submetidos a um período longo de armazenamento em nitrogênio líquido (SOUZA, 2013). A formação de espécies reativas de oxigênio inibe a atividade antioxidante do corpo, essas moléculas derivadas do oxigênio como o peróxido de hidrogênio, agem como poderosos oxidantes e são normalmente formados tanto no trato genital masculino como no genital feminino. Espermatozoides criopreservados são propensos ao estresse oxidativo, que leva a um aumento do número de ROS presentes, causando uma redução no nível de antioxidantes importantes, como a glutathione (YELUMALAI et al., 2012).

2.3.2 Danos ao citoesqueleto

As membranas celulares são ancoradas no citoesqueleto e qualquer alteração nessas estruturas terão efeitos negativos na função. Saunders e Parks (1999), identificaram que a despolarização prematura dos filamentos de actina em embriões bovinos que sofreram resfriamento trazem complicações na criopreservação dos espermatozoides, pois muitas dessas proteínas estruturais apresentam despolimerização e repolimerização de acordo com a temperatura a qual são submetidas (SOUZA, 2013).

O decaimento da motilidade, observado após congelação e descongelação da célula espermática pode ser explicado, em parte, pelas mudanças no transporte ativo e permeabilidade da membrana plasmática na região da cauda, como também à interferências na disponibilidade de energia ou danos nos elementos do axonema (WATSOM, 1995).

2.3.3 Danos as membranas

A capacidade de fertilização dos espermatozoides é caracterizada pela integridade funcional e estrutural da membrana plasmática e do acrossoma (SOUZA, 2013). No entanto, durante a etapa de refrigeração, a membrana celular dos espermatozoides passa por algumas mudanças relacionadas à sua estrutura, principalmente, aos lipídios. No processo de congelação rápida, aliado à descongelação lenta, crioinjúrias serão geradas pela formação de pequenos

cristais de gelo, os quais podem se agrupar formando cristais grandes, rompendo a membrana. (WATSOM, 2000).

A membrana plasmática da célula espermática é rica em fosfolipídios, com fosfatidilcolina e esfingomiélinas encontradas no folheto externo da bicamada lipídica, enquanto fosfatidilserina e fosfatidiletanolamina localizam-se no folheto interno (LADHA, 1998). Durante a criopreservação, a membrana plasmática sofre modificações para se adaptar às mudanças de temperatura, como o movimento de translocação de fosfolipídios, com externalização da fosfatidilserina (SILVA; GUERRA, 2011). Thomas (2006), relata que a criopreservação ocasiona uma maior fluidez na membrana plasmática e exposição a sítios de ligação a moléculas externas, requerendo menor tempo para a célula se capacitar.

Na membrana plasmática encontram-se as proteínas integrais, que são agrupadas pela separação da fase lipídica, os lipídios e proteínas celulares podem ser danificados (YELUMALAI et al., 2012). Robert e Watson (1986), relatam que algumas dessas proteínas, como os canais iônicos (Ca^{++}), têm sua função afetada pelo fato da permeabilidade da membrana aumentar após o resfriamento, ocasionando implicações deletérias sobre a função espermática, já que a regulação do cálcio reflete em sérios efeitos, levando a complicações na capacitação e na fusão entre a membrana plasmática e a porção externa da membrana do acrossomo (CRITSER, 1998). Para Watson (1995) e Souza (2013), o choque frio causado pela congelação e descongelação provoca um conjunto de alterações que afetam as membranas plasmáticas, como a do acrossoma, interferindo na morfologia dessa estrutura. Em estudos com elefantes, Sa-Ardrit et al. (2006), verificaram por imagens de ultraestrutura, danos ao acrossoma de espermatozoides pós-descongelados, como: ruptura da membrana, vazamento do conteúdo acrossomal, acrossoma edemaciado e perda completa da estrutura. A integridade da membrana é um fator importante para a viabilidade e motilidade espermática (SAID; GAGLANI; AGARWAL, 2010).

2.3.4 Danos mitocondriais

A integridade mitocondrial e seu funcionamento são importantes para que a célula espermática seja capaz de exercer sua função, localizadas na peça intermediária, as mitocôndrias são responsáveis pela produção da energia necessária para a motilidade espermática, estas produzem energia em forma de adenosina trifosfato (CARREIRA, 2012). Os cristais de gelo intracelulares formados causam danos às membranas e afetam o funcionamento

das organelas, gerando a redução da sobrevivência celular (OBEROI; KUMAR; TALWAR, 2014).

Danos mitocondriais como mudanças na sua estrutura ou alterações na forma, condensação e perda de material mitocondrial (SILVA; GUERRA, 2011). A diminuição da motilidade espermática tem sido atribuída a danos à membrana mitocondrial, de acordo com Keel e Webster (1993), a motilidade dos espermatozoides diminui em 50% após a fase de descongelamento por congelamento. Em 1995, Watson, relatou que a perda do conteúdo estrutural e a formação de grandes cristais de gelo nas mitocôndrias espermáticas no processo de congelamento, afetaram a produção de adenosina trifosfato (ATP), ocasionado por alterações na fosforilação oxidativa e no transporte de prótons na crista mitocondrial interna. A criopreservação é responsável ainda, por ativar o processo de apoptose mitocondrial, devido à abertura dos poros mitocondriais e posterior liberação dos fatores pró-apoptóticos dessa organela, suscitando a diminuição no potencial de membrana (SOUZA, 2013).

2.3.5 Apoptose

A apoptose é outra crioinjúria causada no processo de criopreservação. A morte celular programada é um processo que pode ocorrer em todas as células, considerando de acordo com Wang (2003), Said, Gaglani e Agarwal (2010), alguns fatores contribuem para a apoptose em espermatozoides humanos, grandes concentrações de espécies reativas de oxigênio (ROS), foram relacionadas com a indução a apoptose.

Acontece, que quando as concentrações de enzimas antioxidantes caem ou as concentrações de ROS aumentam, o efeito de ROS oprime a célula levando a apoptose. Durante a criopreservação a célula espermática passa por uma série de mudanças físicas e químicas, que resultam em danos ao DNA, como também uma mudança estrutural na membrana plasmática causando uma desordem lipídica. Esses fatores têm sido reconhecidos por ativarem vias apoptóticas. Em conformidade com os estudos atuais de Prien e Lacovides (2016), percebe-se que a criopreservação tem sido indicada como fator para apoptose, devido a permeabilidade da membrana e fosfatidilserina. Martin et al. (2004), mostrou em seu estudo, que a criopreservação foi associada à ativação das caspases 3, 8 e 9, uma comparação entre espermatozoides criopreservados e frescos demonstrou que a criopreservação aumenta significativamente a porcentagem de caspases ativadas de 21% para 47% (SAID; GAGLANI; AGARWAL, 2010).

A principal fonte de estresse oxidativo para espermatozoides é a mitocôndria. A produção de ROS aumenta em mitocôndrias da célula espermática devido à congelamento e

descongelamento, enquanto que um estresse osmótico pode levar o aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial, ativando assim a apoptose (PRIEN; LACOVIDES, 2016). A externalização da fosfatidilserina na membrana do espermatozoide é outro marcador de apoptose, sendo reconhecida por vários receptores em fagócitos para destruição, a fragmentação do DNA também é um indicador para apoptose em espermatozoides, causada pela ativação da caspase-3 (SAID; GAGLANI; AGARWAL, 2010).

2.3.6 Estresse oxidativo

O sucesso da criopreservação para Souza e Moraes (2016) é parcial, vez que o processo de congelamento-descongelamento prejudica cerca de 50% das células, ocorrendo devido ao fato da célula espermática apresentar alta sensibilidade ao estresse oxidativo graças às espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas durante o processo de criopreservação, pois todas as células vivas que se encontram sob condições aeróbicas estão continuamente sujeitas aos efeitos paradoxos do oxigênio (FERREIRA; ABREU, 2007). Isto acontece porque o oxigênio molecular ao mesmo tempo em que tem um papel vital para a sobrevivência celular pode ser extremamente deletério para a mesma, sendo responsável por causar danos à célula (LUZ et al., 2011).

Nas condições fisiológicas (aeróbicas), o oxigênio é o aceptor final de elétrons durante a fosforilação oxidativa, sendo responsável para a síntese de ATP, indispensável para a célula. Mas, para que aconteça a síntese de energia, a molécula de oxigênio passa por uma redução tetravalente, ou seja, ganha quatro elétrons na sua última camada de valência, durante esse processo são produzidos vários compostos intermediários relativamente instáveis, como: o ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (OH), denominados de espécies reativas de oxigênio ou simplesmente ROS (MAIA; BICUDO, 2009).

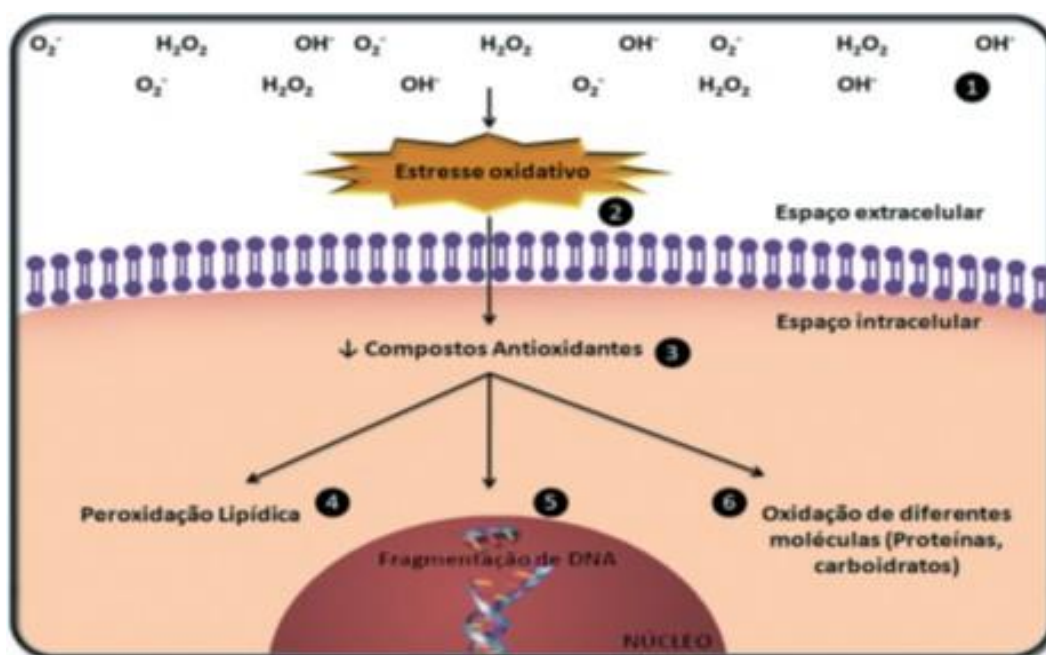
Os espermatozoides maduros e imaturos, células oriundas de diferentes fases da espermatogênese, os leucócitos e outros tipos de células, como as células epiteliais, são considerados células seminais. Entre estes, os espermatozoides imaturos e os leucócitos são considerados as principais fontes de espécies reativas de oxigênio. O acúmulo dessas ROS na célula promove o estresse oxidativo, condição na qual acontece um desequilíbrio na produção de ROS, que são radicais livres, moléculas que possuem elétrons desemparelhados (ARRUDA et al., 2005).

O O_2 é um composto que apresenta uma vida curta e não é capaz de permear a membrana biológica, no entanto, quando ocorre permeabilidade da mesma, este pode ser

extremamente danoso no local que foi produzido, além disso, o O_2 pode transformar-se espontaneamente ou enzimaticamente em outros ROS, como o H_2O_2 , que possui vida longa e alta capacidade de atravessar membranas biológicas e gerar o radical $OH^\cdot$ (TREVIZAN, 2013). O radical hidroxila ($OH^\cdot$) é apontado como o radical livre mais reativo nos sistemas biológicos, sendo o responsável por causar mais danos do que qualquer outra ROS. Este é formado a partir do peróxido de hidrogênio em uma reação catalisada por íons metais (Fe^{++} ou Cu^+), o radical hidroxila reage rapidamente com biomoléculas desencadeando a cascata de peroxidação dos lipídios nas membranas da célula espermática (SILVA, 2011).

Segundo estudos, acredita-se que a gravidade e a letalidade das ROS deve-se aos danos oxidativos que estas podem causar a diversas moléculas como: lipídios, proteínas e DNA. Vários fatores estão ligados ao desencadeamento do *stress* oxidativo, partindo do pressuposto de que esse estresse surge do aumento da produção excessiva de ROS e a redução de antioxidantes disponíveis. A escassez de antioxidantes, a colheita de sêmen, a sujeição de animais a condições de stress e a geração natural de ERO nos espermatozoides são alguns desses fatores (PENA et al., 2009). O sêmen submetido à congelamento e vários passos no seu processamento podem levar a produção de ROS, bem como a redução de antioxidantes naturais (ASSUNÇÃO, 2016).

Figura 3 – Superprodução de ROS (1) ocasionando estresse oxidativo (2) devido à redução dos compostos antioxidantes intracelulares (3) promovendo diversas alterações: peroxidação lipídica (4), fragmentação do DNA (5) e oxidação de diferentes moléculas, levando a célula à morte.



Fonte: Adaptado de Luz et al. (2011).

O dano mais comum envolvendo ROS é a peroxidação de lipídios. A membrana é um dos componentes celulares mais atingidos devido à oxidação dos ácidos graxos ou peroxidação lipídica, pois leva a alterações na sua estrutura e permeabilidade, promovendo a perda da seletividade iônica, a formação de produtos citotóxicos, a liberação do conteúdo das organelas, e, conseqüentemente, à morte celular (LUZ et al., 2011). Braga (2014), pondera que a membrana plasmática da célula espermática é extremamente rica em fosfolipídios (ácidos gordos poli-insaturados), o que faz com que essas células se tornem suscetíveis aos efeitos degenerativos causados pelas ROS. Sendo assim, alterações morfológicas na membrana plasmática durante o processo de criopreservação causam à peroxidação da bicamada lipídica, devido à excessiva produção de ROS, produzidas durante o processo de congelamento-descongelamento (SOUZA et al., 2016). O dano oxidativo causado aos espermatozoides é atribuído às diferenças individuais na composição de ácidos graxos da membrana das células espermáticas, ou seja, depende da proporção de ácidos gordos saturados e poli-insaturados nos fosfolipídios presentes na membrana destas células (GARCIA et al., 2011).

Entende-se que o estresse oxidativo ocasiona a baixa geração dos níveis de ATP intracelular, e estes são responsáveis pela motilidade da célula, resultando na diminuição da motilidade espermática dando início a um processo chamado de peroxidação lipídica, o qual tem sido apontado como a causa da reação acrossômica anormal e a perda de fluidez da membrana, acarretando a diminuição de potencial fertilizante dos espermatozoides. Portanto, o estresse oxidativo é considerado um vilão para a técnica de criopreservação, pois em alguns casos, é capaz de comprometer o congelamento, visto que além dos efeitos negativos das ROS sobre os espermatozoides, estas também são responsáveis por causarem danos aos constituintes do sêmen (proteínas, aminoácidos, lipídios e carboidratos), que são componentes indispensáveis para o processo de fecundação, assim, qualquer alteração nesses compostos do ejaculado tem potencial para a uma redução das taxas de fecundidade (CHENOWETH e LORTON, 2014).

A peroxidação lipídica é um processo no qual oxidantes, como os radicais livres, atacam os lipídios que contêm cadeias duplas de carbono. Ácidos graxos poli-insaturados são aqueles em que se encontram duas ou mais ligações carbono-carbono ($H_2C=CH_2$). Os lipídios mais atacados são os ácidos gordos poli-insaturados, que sofrem a remoção de hidrogênio de um carbono, com a adição de oxigênio, resultando em radicais peroxil lipídicos e hidroperóxidos (BRAGA, 2014).

Ferrusola et al. (2009), relata que a mitocôndria quando congelada e descongelada, aumenta a produção de ERO, que por meio da cadeia transportadora de elétrons, é a principal

fonte geradora de ROS, enquanto a osmose tende a aumentar a permeabilidade da membrana, favorecendo as ROS uma difusão rápida, ativando um mecanismo celular semelhante à apoptose.

Em espécies distintas de mamíferos, mais de 60% dos lipídios presentes na membrana plasmática da célula espermática, são ácidos graxos insaturados, estes conferem excelente fluidez à membrana celular, aumentando a sua elasticidade e resistência para mudanças de volume. Entretanto, essas insaturações tornam as células espermáticas mais vulneráveis à ação de ROS, levando a lipoperoxidação de membranas (ASSUNÇÃO, 2016). Aitiken et al. (1993), em seus estudos, notaram uma estreita relação entre os níveis de peroxidação no ejaculado humano e a morfologia dos espermatozoides (movimento espermático) e a capacidade de fusão espermatozoide-ovócito considerados de extrema importância para o sucesso da fertilização.

A cascata da peroxidação lipídica se inicia quando a OH, conhecida como a ROS iniciadora da peroxidação, retira um átomo de hidrogênio dos ácidos graxos poli-insaturados da membrana celular (NUNES; OLIVEIRA; MORAIS, 2006). Esse processo acontece porque os ácidos poli-insaturados das membranas celulares possuem duplas ligações e estão mais propensos ao ataque desses radicais. A lipoperoxidação pode ser utilizada para medir os danos causados durante o processo de criopreservação e, conseqüentemente, a redução da fertilidade (TREVIZAN, 2013).

Ferreira e Matsubara (1997), definem que a peroxidação lipídica possui três etapas: iniciação, propagação e terminação. A iniciação se dá pelo ataque a um lipídio por qualquer ROS que tenha reatividade suficiente para abstrair um átomo de hidrogênio de um grupo metileno (-CH₂-). O seu término ocorre quando os radicais lipídicos e peroxila (R-C• e -ROO•) produzidos propagam-se até se destruírem (MAIA; BICUDO, 2009). Ao fim das etapas da reação em cadeia da peroxidação lipídica têm-se o acúmulo de hidroperóxidos (LOOH) e, em sequência, a formação de produtos citotóxicos, como o malonaldeído, que é responsável por causar prejuízos à célula espermática alterando a membrana dessas células (LUZ et al., 2011).

2.4 ANTIOXIDANTES

Com o propósito de melhorar o grau de sucesso de fertilidade através da utilização da técnica do sêmen criopreservado, estudos têm sido desenvolvidos com o intuito de manter a integridade e funcionalidade da célula espermática nas etapas da criopreservação. O estresse oxidativo e os danos causados têm evidenciado a necessidade e a importância do uso de

antioxidantes, durante a manipulação do ejaculado com o objetivo de reduzir as criolesões ocasionados durante esse processo (SILVA; GUERRA, 2011).

Durante as etapas da conservação do sêmen, o desequilíbrio entre a produção de ROS e a atividade antioxidante pode ser gerado tanto pelo comprometimento da capacidade protetora dos antioxidantes presentes no próprio ejaculado, para Watson (2000) a partir do momento em que acontece uma atenuada redução de suas concentrações após diluição do sêmen, quanto pelo estímulo à produção de ROS, durante a criopreservação. Tal desequilíbrio, favorecendo os oxidantes, resulta em efeitos totalmente tóxicos que comprometem a funcionalidade celular, o que conduz, conseqüentemente, a apoptose (morte celular) e redução da fertilidade dos espermatozoides (SOUZA et al., 2016).

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias ou moléculas que têm capacidade de converter as ROS em água, cuja a finalidade é prevenir a produção excessiva, essas substâncias quando usadas em baixas concentrações, em comparação ao substrato oxidável, retardam ou inibem, significativamente, a oxidação de um determinado substrato oxidável (ASSUNÇÃO, 2016). Nas células, os antioxidantes podem atuar por meio de dois sistemas: o sistema enzimático e o sistema não enzimático, enquanto os antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos são responsáveis por trabalhar no combate ao estresse oxidativo (BANSAL; BILASPURI, 2010).

O próprio plasma seminal e nas próprias células sexuais masculinas, encontram-se vários antioxidantes e enzimas antioxidantes que são responsáveis por proteger os espermatozoides durante o processo de criopreservação, de forma a prevenir o dano oxidativo, esse sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir ou reduzir os danos causados pela ação degenerativa dos radicais livres. Os antioxidantes enzimáticos ou também chamados de antioxidantes naturais é o primeiro sistema a agir. Esse sistema é composto pelas enzimas superóxido dismutase (SOD), glutathione (GSH), glutathione reductase (GSH reductase), glutathione peroxidase (GSH peroxidase) e catalase (CAT), que agem neutralizando o excesso de ROS e prevenindo estas de causarem danos na estrutura celular (LUZ et al., 2011).

No entanto, mesmo o espermatozoide contendo antioxidantes dentro do citoplasma, durante o seu período de maturação, a célula espermática perde grande parte do seu citoplasma, resultando numa deficiência do mecanismo que regule essa defesa. Bilodeau et al. (2000), descrevem que o sêmen congelado perde cerca de 78% de glutathione peroxidase e 50% de superóxido dismutase, reduzindo a viabilidade do sêmen em consequência do stress oxidativo. No meio extracelular, ele é protegido pelo plasma seminal que contém agentes redutores de ROS, enzimáticos e não enzimáticos, como: vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (alfa-

tocoferol), ubiquinonas (coenzima Q), resveratrol, entre outros (TREVIZAN, 2013). O sistema de defesa antioxidante da célula pode atuar através de mecanismos distintos de ação, um deles é inibindo a formação dos radicais livres ou espécies não-radicais (sistemas de prevenção), impedindo a ação desses (sistemas varredores) ou, atuando no reparo e na reconstituição das estruturas biológicas lesadas (sistemas de reparo) (BARBOSA et al., 2010).

2.4.1 Ácido ascórbico

O ácido ascórbico, ou simplesmente vitamina C, ou ainda, ascorbato, é uma vitamina hidrossolúvel encontrada abundantemente nas células vegetais e animais, podendo estar ligada a uma proteínas ou de forma livre, possui uma alta solubilidade em água e pertence a um grupo orgânico chamado de lactonas que são ácidos carboxílicos e apresenta uma estrutura molecular com $C_6H_8O_6$ (COSTA, 2015).

Tem sido considerado o mais importante antioxidante do fluido extracelular, sendo apontado com um importante limpador de espécies reativas de oxigênio e seu uso é de extrema importância no combate aos danos gerados pelo estresse oxidativo, como a peroxidação lipídica (RODRIGO; GUICHARD; CHARLES, 2007). No entanto, estudos têm demonstrado que ao entrar em contato com metais de transição como o ferro podem atuar como pró-oxidantes, tornando-se capaz de produzir espécies radicais como OH.

Branco e col. (2009), notaram que o uso do ascorbato minimiza os danos oxidativos e mantém a integridade do DNA de espermatozoides humano, elevando assim os níveis de fertilidade. Por outro lado, trabalhos utilizando ácido ascórbico como antioxidante em coelhos machos, mostrou que este reduziu significativamente as concentrações de radicais livres e aumentou a atividade de enzimas antioxidantes (GST, SOD e CAT) em comparação com animais não tratados (ANDRADE et al., 2010).

2.4.2 Alfa-tocoferol

O α -tocoferol, conhecido popularmente como vitamina E, é uma substância lipossolúvel, reconhecida por possuir uma alta atividade inibidora da peroxidação lipídica. Sua presença na membrana é de valor inestimável, pois a protege contra a oxidação lipídica e também contra o extravasamento de material intracelular (TONIOLLI, 2012). A vitamina E, é um antioxidante estrutural, predominante na membrana plasmática das células animais e são encontradas no ovário e no fluido folicular.

Na criopreservação, estudos apontam que o uso deste antioxidante (α -tocoferol) adicionado ao ejaculado de suíno, reduziu os danos oxidativos, melhorou a motilidade espermática, manteve a integridade mitocondrial e da membrana plasmática e ainda, reduziu a expressão de genes pró-apoptóticos (LUZ et al., 2011). Através de pesquisas, acredita-se que esta vitamina remova, principalmente, o ânion superóxido gerado por enzimas ligadoras de membrana que participam na oxidação biológica (SILVA; GUERRA, 2011). A vitamina E ao oxidar interrompe a reação em cadeia da peroxidação lipídica de biomembranas e lipoproteínas, esse antioxidante contém um grupo hidroxila por que reage com elétrons desemparelhados, podendo assim, reduzir radicais peroxil (GUIMARÃES, 2011).

O uso de tocoferol durante a conservação dos ejaculados tem demonstrado efeitos variados, visto que o processo de oxidação atua distintamente entre as estruturas das células espermáticas de acordo com a particularidade de cada espécie, pouco efeito da adição deste antioxidante foi visto no sêmen refrigerado de equinos e no sêmen congelado de homens (TONIOLLI, 2012). Por outro lado, no sêmen ovino, observou-se que a adição de tocoferol prolonga o período de conservação do sêmen, melhora a motilidade do espermatozoide e reduz o grau de danos celulares (ANDRADE et al., 2010). Estes dados indicam que o processo de oxidação pode ter efeito diverso, dependendo da espécie animal e das estruturas afetadas na célula espermática. Desta forma, os efeitos da vitamina E variam de acordo com a dose utilizada como também da quantidade de radicais hidroxilas a serem inativados. Apesar dos efeitos benéficos, o α -tocoferol pode agir como pró-oxidante em determinadas concentrações.

O mecanismo de ação do alfa-tocoferol consiste na destruição do radical hidroxila, uma vez que funciona quebrando cadeias causadas pelas ROS, entretanto, não apresenta uma função de limpeza, na presença de glutathione e ascorbato. A função da vitamina E em quebrar ligações em cadeia é mantida, na maioria das vezes, pelo ácido ascórbico, já a glutathione trabalha atuando como um antioxidante preventivo. Dessa forma, mesmo quando a quantidade de vitamina E encontra-se em baixas concentrações, ao unir-se com a capacidade redutiva do ascorbato garante a atividade de quebrar as cadeias formadas pelas ROS, protegendo assim a célula contra a peroxidação lipídica (BRAGA, 2014).

2.4.2 Resveratrol

O resveratrol (trans-3, 5, 4-trihidroxi-trans-estilbeno) é um tipo de polifenol que pode ser encontrado em alguns grupos de plantas como o pinhão, as uvas, as amoras entre outras, e

através de estudos, essa substância têm indicado um alto poder antioxidante no combate aos radicais livres (ASSUNÇÃO, 2016).

Esse composto pode ser sintetizado naturalmente da planta sob duas formas isômeras: trans-resveratrol e cis-resveratrol. Os efeitos benéficos deste antioxidante contra as lesões oxidativas *in vitro* e *in vivo* deve-se a regulação de antioxidantes endógenos, atuando como um limpador de ROS, este também mostra uma alta eficácia na inibição da formação de radicais livres de oxigênio, e ainda, quela o metal de transição cobre, o qual é responsável por gerar espécies reativas de oxigênio que levam a peroxidação lipídica (OURIQUE, 2012).

O resveratrol tem uma ação antioxidante comprovada, pois de acordo com Yen et al. (2003), percebe-se que este composto em concentrações de 10-100 mM, concede uma elevada proteção contra o dano oxidativo. Alguns pesquisadores propõem que sua ação antioxidante pode ser explicada pela regulação de cascatas sinalizadoras intracelulares e também pela remoção de ROS, modulação de enzimas e quelação de metais.

Em estudos sobre o congelamento do ejaculado humano, notou-se que o antioxidante preveniu a peroxidação de lipídios na célula espermática, por outro lado, observou-se também que o mesmo levou a uma diminuição de motilidade no sêmen quando comparado ao grupo controle, este efeito foi atribuído por alguns autores, ao fato do resveratrol ser conhecido como um inibidor da COX1, uma enzima que está envolvida na síntese de prostaglandinas-2 que relacionam-se com a motilidade espermática (ASSUNÇÃO, 2016).

A ação do resveratrol é dependente da composição da membrana plasmática de cada indivíduo, a qual existe diferenças na composição lipídica, tal diferença pode explicar uma menor ou maior ação de um antioxidante usado na proteção da célula espermática. Os estudos que foram realizados com este antioxidante têm usado diferentes concentrações de antioxidantes, em diferentes espécies, o que pode gerar controvérsias quanto ao benefício deste. Silva e Guerra (2012), utilizando o resveratrol, não notaram melhoria significativa dos parâmetros espermáticos pós-descongelação, em amostras de sêmen ovino tratadas com diferentes concentrações (5, 10, 15 e 20 µg/mL). De outro modo, Bucak et al. (2014), em testes com ejaculado bovino, utilizando uma concentração de 1 mM no diluente, constatou que a utilização do resveratrol é altamente benéfica, pois aumentou a motilidade, a atividade mitocondrial e, por fim, a diminuição de danos ao DNA, contudo, em outros aspectos como integridade do acrossoma e estresse oxidativo não houve diferença em comparação com grupo controle.

2.4.3 Catalase

A catalase consiste em uma hemoproteína citoplasmática (enzima antioxidante) localizada na região do peroxissoma e mitocôndria das células, a qual desempenha importante papel protetor contra os danos oxidativos (SILVA; GUERRA, 2011). Esse antioxidante é uma das mais eficientes enzimas conhecidas, pois o mesmo não pode ser saturado por nenhuma concentração de seu substrato, a catalase tem como função prevenir a formação da hidroxila a partir do H_2O_2 , vez que essa enzima catalisa a redução do H_2O_2 que produzirá água e o oxigênio molecular. A catalase é encontrada na célula espermática e no plasma seminal de humanos, ratos e coelhos e é capaz de neutralizar as ROS gerados durante as etapas de criopreservação, favorecendo assim para que o sêmen continue em boas condições (GUIMARÃES, 2011).

A catalase tem sido um antioxidante muito utilizado na técnica de criopreservação com o intuito de obter um maior percentual de células vivas e capacitadas após o armazenamento em nitrogênio líquido em diferentes espécies. Em estudos com humanos, foi revelado que o uso da catalase na manipulação de sêmen reduziu significativamente os níveis de ROS e melhorou a qualidade de espermatozoides após o processo de descongelação, tornando a célula mais capacitada para a fertilização. Em diferentes espécies de animais a utilização da catalase no meio de diluição para a criopreservação de sêmen melhorou os aspectos espermáticos, sêmen de caninos, ovinos e bovinos também mostraram uma qualidade melhorada quando a catalase foi utilizada (LUZ et al., 2011).

3 ARTIGOS

3.1 ARTIGO 1 – EFEITO DE ANTIOXIDANTES NO CULTIVO IN VITRO DE EMBRIÕES BOVINOS

José Adelson Alves do Nascimento Junior¹, Tulio Diego da Silva¹, Gustavo Ferrer Carneiro², Maria Tereza dos Santos Correia¹.

¹Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife-PE, Brasil

² Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

Autor Correspondente: Maria Tereza dos Santos Correia

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife-PE, Brasil Fone: (081) 994508770

E-mail: mtscorreia@yahoo.com.br

RESUMO

A Fertilização *in vitro* (FIV) de bovinos é uma biotécnica da reprodução utilizada mundialmente, cuja finalidade está associada a aceleração na obtenção de bovinos geneticamente superiores. Contudo, essa ferramenta de reprodução ainda apresenta certas limitações, pois embriões cultivados *in vitro* são submetidos a espécies reativas ao oxigênio (EROs), capazes de provocar estresse oxidativo, resultando em danos celulares e, consequentemente, diminuindo a viabilidade embrionária. Diante disso, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito do óleo essencial da *Abarema Couchlicarpos* durante o cultivo de embriões bovinos, afim de obter uma maior recuperação embrionária. Por esse motivo, foi adicionado ao meio de cultivo óleo da *Abarema Cochliacarpos* em três diferentes concentrações no meio de fluido sintético de tuba uterina (SOF), formando os seguintes tratamentos: 0 mg (controle); 0,125 mg (C 12,5); 0,25 mg (C 0,25); 0,50 mg (C 0,50). Após 48 horas foram observadas as características morfológicas das estruturas encontradas. No C 0,25 não foi observado a ocorrência de clivagem, tampouco a contaminação no meio de cultura, enquanto que o controle desenvolvido nas mesmas condições mostrou-se com contaminação, sugerindo que o extrato atuou como agente antimicrobiano. No C 0,50 foi possível identificar a progressão do desenvolvimento embrionário no estágio de mórula no D6 com aproximadamente 16 células, que corresponde a 35% (7/20), não havendo contaminação. E, no C 0,125 não foi verificado

ocorrência de clivagem e de contaminação, todavia nessa concentração do extrato mostrou-se deletéria, não permitindo o desenvolvimento embrionário. A análise realizada no estudo permite afirmar que o óleo da *Abarema Cochliacarpus* atuou como agente antimicrobiano nos três tratamentos nas concentrações de 0,125 mg, 0,25 mg; 0,50 mg. Contudo, na maior concentração estudada, verificou-se que, mesmo diante de condições desfavoráveis, o extrato favoreceu o desenvolvimento do zigoto. Diante da baixa taxa de clivagem nos grupo controle e dos tratamentos, tornou-se necessário pesquisar causas do insucesso da produção *in vitro*. Levando-se em consideração que o sêmen é a principal fonte de contaminação dos meios de fertilização e cultivo, vez que não é um material possível de ser esterilizado. Concluindo que, os resultados obtidos demonstraram que o extrato de *Abarema Cochliacarpus* em todas as concentrações estudadas apresentaram atividade antibacteriana, prevendo-se um potencial farmacológico para sua utilização em meios de FIV.

Palavras-Chave: FIV; *abarema cochliacarpus*; atividade antimicrobiana.

INTRODUÇÃO

A criação de bovinos é uma das maiores atividades de importância econômica para o mercado brasileiro. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no ano de 2015, o país possui um rebanho de 215,2 milhões de cabeças. Assumindo assim o posto de segundo maior produtor de carne bovina, sendo superado apenas pelos Estados Unidos (SCHLESINGER, 2010).

O cenário econômico nacional da pecuária tem sofrido alterações nas últimas décadas, em razão dos investimentos em biotécnicas da reprodução, visando o melhoramento genético do rebanho, assim como encurtando o intervalo entre as gerações e intensificando a seleção e o ganho genético. Dentre as biotecnologias reprodutivas que visam a melhoria da qualidade genética e aumento do rebanho bovino podemos citar, de acordo com Freitas et. al (2005) e Moraes (2011), a inseminação artificial, criopreservação de sêmen, transferência de embriões, produção de animais transgênicos e a produção de embriões *in vitro*.

A Produção *in vitro* de embriões bovinos é uma técnica indispensável na obtenção de animais geneticamente superiores e na compreensão de vários processos reprodutivos. Esta técnica é uma excelente ferramenta para pesquisa de fenômenos biológicos como maturação, fecundação e cultivo de ovócitos, e no estudo do desenvolvimento embrionário. Além de permitir o aproveitamento de fêmeas que ainda não alcançaram a idade reprodutiva, ou

adquiriram alterações de forma natural, ou aquelas que seriam destinadas ao descarte. Apesar da criação de condições semelhantes às encontradas fisiologicamente no organismo materno, o índice de sucesso da técnica ainda é baixo, quando comparado aos resultados obtidos *in vivo*. Freitas et al. (2005), Crocomo et al. (2012) e Gouveia (2011), destacam que dentre os fatores que interferem na produção de embriões, a qualidade oócitária, as condições do meio de maturação e o cultivo são determinantes na obtenção de embriões viáveis.

Uma das maiores problemáticas na viabilidade dos embriões cultivados *in vitro* consiste na produção de espécies reativas ao oxigênio (EROs), que provocam estresse oxidativo. Assim, dentre as EROs, a peroxidação lipídica tem sido associada à diminuição da viabilidade ovócitária e embrionária. A alta tensão de oxigênio associada à interferência da luz e outros fatores favorecem a formação de radicais livres, e por possuírem elétrons desemparelhados em sua órbita mais externa apresentam alta instabilidade e reatividade com o oxigênio. Portanto, para se tornarem estáveis, reagem com moléculas ao seu redor como carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos, provocando assim, a oxidação dessas moléculas. Resultando em reações em cadeia que levam a danos celulares como a peroxidação de lipídios, desnaturação de proteínas, alterações mitocondriais, entre outros (CROCOMO et al., 2012).

Diante desse contexto, o uso de antioxidantes têm se mostrado necessário a fim de diminuir os danos celulares, provocados pela formação de radicais livres na maturação e cultivo de embriões bovinos com o intuito de melhorar a sua eficiência. Sendo assim, têm se estudado a utilização de agentes alternativos com esse propósito, como antioxidantes naturais extraídos de plantas da caatinga, como por exemplo a *Abarema Couchilicarpos* que possuem baixa citotoxicidade e baixo custo. Assim, a atividade antioxidante de plantas é promissora na redução de radicais livres, resultando na melhoria da técnica e aumentando as taxas de viabilidade embrionária.

MATERIAL E METÓDOS

COLETA DE OVÁRIOS

Os ovários foram coletados de fêmeas em abatedouro na cidade de Garanhuns, localizada no estado de Pernambuco, Brasil. Após a coleta, foram transportados imediatamente, em solução salina 0,9% (NaCl), suplementada com antibióticos à temperatura de 36°C, para o Laboratório de Reprodução Animal da Universidade Federal Rural de Pernambuco – Unidade Acadêmica de Garanhuns (UFRPE/UAG).

RECUPERAÇÃO E ASPIRAÇÃO FOLICULAR

Folículos antrais de 2 a 8 mm foram puncionados utilizando-se agulhas 40 x 12 e seringas de 10 mL, o fluido folicular obtido foi depositado em tubos de 15 mL. Terminada a punção, os tubos permaneciam em repouso por aproximadamente 5 a 10 minutos para decantação. O sedimento foi transferido para uma placa de petri esteril de poliestireno de 35 mm de diâmetro, contendo Meio 199 com tampão Hepes acrescido 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) (v/v), 0,22mM de piruvato, 62,6µg/mL de penicilina, 50µg/mL de gentamicina (H- 199). O rastreamento foi realizado em lupa estereomicroscópica sob um aumento de 16 x.

SELEÇÃO DE OÓCITOS

Conforme Gonçalves et al. (2002), os CCOs foram selecionados de acordo com sua qualidade, que vai de 1 a 4:

Qualidade 1: Cumulus compacto, presente, contendo mais de três camadas de células, ooplasma com granulações finas e homogêneas, preenchendo o interior da zona pelúcida e de coloração marrom.

Qualidade 2: Cumulus compacto, parcialmente presente em volta do oócito ou rodeando completamente o oócito, com menos de três camadas celulares, ooplasma com granulações distribuídas heterogeneamente, podendo estar mais concentradas no centro e mais claras na periferia ou condensadas em um só local aparentando uma mancha escura. O ooplasma preenche o espaço do interior da zona pelúcida.

Qualidade 3: Cumulus presente, mas expandido, ooplasma contraído com espaço entre a membrana celular e a zona pelúcida, preenchendo irregularmente o espaço perivitelínico, degenerando, vacuolizando ou fragmentando.

Qualidade 4: oócito desnudo (sem cumulus). Após a seleção os oócitos foram lavados em meio de manipulação (MM; TCM - 199 com sais de Earle, HEPES a 25 mM) e divididos em grupos de 15 a 20 CCOs e encaminhados para estufa para maturação.

MATURAÇÃO *IN VITRO*

Os oócitos foram lavados e incubados em meio de MIV: (MM; TCM-199 com sais de Earle, HEPES a 25 mM) + 10% de soro de égua em estro (EMS), suplementado com 26,2 mM de bicarbonato de sódio, 0,2 mM piruvato de sódio, 0,01 UI/mL FSHp (Folltropin, Bioniche,

Saúde Animal, Belleville, Ontário, Canadá), 0,5 mg de LH (Lutropin, Bioniche, Saúde Animal, Canadá). A incubação foi feita em placas de petri com gotas de 100 µL sob óleo mineral estéril com (15 a 20 oócitos por gota), em estufa de CO₂ a 5%, com 38,5°C de temperatura e atmosfera úmida, durante 24 horas.

FECUNDAÇÃO *IN VITRO*

Para o processo de FIV células espermáticas de bovinos criopreservadas foram descongeladas e os espermatozoides vivos foram separados do diluidor por sedimentação em gradiente Percoll (ADONA et al., 2008). Após os procedimentos de cada grupo experimental, a concentração espermática foi ajustada para 2 x10⁶ SPTZ/mL e, então, foram depositados junto com os oócitos maduros em gotas de 80 µL de meio de FIV meio TALP, suplementado com albumina sérica bovina (BSA) heparina, penicilamina, hipotaurina, epinefrina conforme destaca (PARRISH et al., 1995). Os gametas permaneceram co-incubados sob as mesmas condições citadas para a MIV por um período de 18 horas.

CULTIVO *IN VITRO*

Após fecundação, os zigotos foram parcialmente desnudados e transferidos para microgotas de 90 µL de meio sintético de fluido de oviduto (SOF) suplementados com diferentes concentrações de antioxidantes. O cultivo foi conduzido em incubadora à temperatura de 38,5°C, contendo 5% de CO₂ em ar atmosférico e 99% de umidade durante 7 dias. A cada 48 horas, 50% do meio de cultivo foi renovado.

AVALIAÇÃO DA TAXA DE CLIVAGEM DE BLASTOCISTO

De acordo com a STRINGFELLOW E SEIDEL (1998), a avaliação da taxa de clivagem foi realizada 48 horas pós-fecundação – D2 e a taxa de blastocisto e qualidade embrionária foi realizada no D7.

DIVISÃO DE GRUPOS EXPERIMENTAIS

Grupo 1: Produção in vitro de embriões na ausência de antioxidantes da *Abarema Couchilicarpos* (Grupo Controle).

Grupo 2: Produção in vitro de embriões adicionando antioxidantes da *Abarema Couchilicarpus* no meio de cultivo nas seguintes concentrações: 0,25 mg (C 0,25); 0,50 mg (C 0,50); 12,5 mg (C 12,5).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Obteve-se no total de 468 ovários e 1423 oócitos recuperados, o que implica dizer que, o índice médio de ovócitos recuperados foi de 3 por animal. Contrapondo Teixeira et al. (2009), que afirma que a aspiração de ovários de matadouro permite obtenção média de dois complexos cumulus-oócito por ovário, reafirmando que os ovários de abatedouros são uma fonte de oócitos de menor custo e mais abundante para produção de embriões, embora o uso seja limitado devido ao histórico e condições higiênico-sanitárias serem inespecíficas (LÉGA et al., 2009). Os dados referentes a esse contexto estão demonstrados no gráfico 1, abaixo:

Gráfico 1 – Número de oócitos por coleta.



Fonte: Nascimento Junior e col. (2020).

A análise do gráfico deixa evidente a inconsistência do número de oócitos recuperados por ovário de fêmeas bovinas de abatedouro, o que pode ser justificado devido ao perfil de vacas abatidas. Pois, são em grande parte vacas velhas, descartadas quando o desempenho produtivo não corresponde mais as expectativas esperadas ou ainda quando apresentam problemas reprodutivos. Segundo alguns autores, constata-se que há diminuição na contagem de folículos antrais e menor recuperação dos oócitos, desencadeando menor produção embrionária de fêmeas mais velhas quando comparadas com as mais jovens (MELLO et al.,

2016). Ao considerar que os bovinos da região são submetidos ao sistema de criação intensivo ou semi-intensivo, é evidente que a qualidade do pasto na nutrição das vacas interfere diretamente na sua capacidade reprodutiva e, consequentemente, na qualidade do oócito.

Dessa forma, este é outro fator que pode justificar a variabilidade de oócitos recuperados. De acordo com Almeida et al. (2007), o oócito se desenvolve em um perfil bioquímico variável no interior do folículo, que reflete as mudanças nutricionais, interferindo diretamente no desenvolvimento e na qualidade dos oócitos.

No C 0,25 não foi observado a ocorrência de clivagem, embora o extrato tenha atuado como agente antimicrobiano. Conforme Neto et al. (2016), o extrato da *Abarema Couchilicarpos* possui atividade antimicrobiana e ainda, ensaios desenvolvidos com os extratos ciclohexânico, acetônico e etanólico da casca de *Abarema Cochliocarpos* demonstraram atividade antibacteriana (TENÓRIO et al., 2016). Outros resultados foram encontrados por Silva et al. (2009), que confirmaram a presença de saponinas, catequinas, taninos, fenóis. Segundo Santos et al. (2017), a capacidade de inibição do crescimento bacteriano do extrato da casca de *A. Cochliocarpos*, provavelmente, pode estar diretamente relacionada com a estrutura da parede celular. No C 0,50 foi identificada progressão do desenvolvimento embrionário no estágio de mórula no D6 com aproximadamente 16 células, que corresponde a 35% (7/20), não havendo contaminação. No C 1,0 não foi verificada ocorrência de clivagem e de contaminação, todavia nessa concentração do extrato mostrou-se deletéria, não permitindo o desenvolvimento embrionário. Nos tratamentos C 0,25 e C 1,0, repetindo as observações no D3, D5 e D8, pôde ser verificado que as estruturas não clivaram, portanto não houve desenvolvimento embrionário, quando deveriam apresentar aproximadamente 8, 32 e 256 células respectivamente.

Nas circunstâncias do presente estudo, o uso de diferentes concentrações do óleo de *Abarema Couchilicarpos* no meio de cultivo, objetivando a diminuição de formação de EROs e consequente melhora na produção de embriões bovinos, mostrou diferentes resultados para cada tratamento. Logo, a análise realizada no estudo permite afirmar que o extrato da *Abarema Couchilicarpos* atuou como agente antimicrobiano nos três tratamentos nas concentrações de 0,25 mg; 0,50 mg e 12,5 mg. Contudo, na concentração intermediária estudada verificou-se que, mesmo diante de condições desfavoráveis, o extrato favoreceu o desenvolvimento do zigoto.

Diante da baixa taxa de clivagem nos grupo controle e dos tratamentos, tornou-se necessário pesquisar causas do insucesso da produção in vitro. Levando-se em consideração que o sêmen é a principal fonte de contaminação dos meios de fertilização e cultivo e sendo um

material não possível de ser esterilizado, pois agentes químicos e fontes de calor proporcionariam alterações morfológicas nas células espermáticas, comprometendo consequentemente a fertilização e obtenção de embriões. Tornou-se oportuno a realização de análise microbiológica do sêmen. O sêmen foi cultivado em BHI líquido e observado após 24 horas, onde observou-se turvação do meio, indicando contaminação bacteriana, onde foi confirmado através da observação de colônias após semeadura em Ágar sangue, podendo ser observado a formação de colônias. Em um estudo realizado por Melo et al. (2013), constata-se que de 64 amostras de sêmen analisadas 61,6% apresentavam cocobacilos negativos, o que demonstra o alto grau de contaminação do sêmen (FOIZER et al., 2014).

De acordo com os estudos de Foizer (2014), em meios de cultura de placas de cultivo, constatou-se que a contaminação microbiológica aumentou o número de embriões de baixa qualidade, dessa forma, os micro-organismos presentes no meio interferem diretamente no desenvolvimento embrionário. Portanto, as condições *in vitro*, que apresentam baixa taxa de sucesso comparado ao *in vivo*, associada a agentes estranhos que produzem toxinas, estão diretamente ligados a diminuição das taxas de sucesso da técnica. Por isso há a necessidade do uso de antibióticos nos meios utilizados, embora Souza (2006), evidencie que bactérias como *Staphylococcus spp*, *Proteus sp*, *Enterobacter* e *Pseudomonas Aeruginosa* sejam resistentes aos agentes antimicrobianos comumente utilizados nos meios de cultivo como penicilina e estreptomicina.

Diante disso, a ocorrência da contaminação do sêmen foi imprescindível para constatar a atividade antimicrobiana do óleo em estudo. No entanto, isso enfatiza a importância de realização de análise microbiológica no sêmen utilizado nos procedimentos de produção *in vitro*, pois apesar do meio de diluição e meio de fertilização e cultivo apresentarem antibióticos, existe a possibilidade de bactérias resistentes persistirem nessas condições. A utilização de óleo de *Abarema Couchilicarpos* pode constituir-se como uma alternativa viável na adição dos meios de cultivo com função antibacteriana.

Os resultados obtidos em nosso experimento, demonstraram que o óleo de *Abarema Couchilicarpos* em todas as concentrações estudadas apresentaram atividade antibacteriana prevendo-se um potencial farmacológico para sua utilização. Além disso, pode se constituir também como uma alternativa viável e econômica para utilização em meios de cultivo de FIV como compostos bioativos de ação antibacteriana. Entretanto, maiores estudos serão necessários para determinar o mecanismo de ação e as concentrações mais adequadas a serem utilizadas nesse modelo.

CONCLUSÃO

Diante dos experimentos realizados no presente estudo, é notório a possibilidade de utilização do óleo vegetal de *Abarema Cochliacarpus* como agente antimicrobiano em meio de cultivo, visto que não foi verificado presença de contaminação nos tratamentos com extrato, ao contrário do que ocorreu na C 0,25, onde o grupo controle foi contaminado. Ainda foi possível verificar que, no C0,50 ainda promoveu o desenvolvimento embrionário, o que não foi observado no controle. Portanto, o extrato pode favorecer na obtenção de embriões, embora seja necessário mais estudos para que possa precisar a concentração necessária a ser utilizada, capaz de promover ação antimicrobiana e antioxidante, sem causar efeito deletério, como foi verificado na concentração maior estudada de C 12,5. Vale ressaltar que o experimento em estudo foi o pioneiro no uso do agente fitoterápico *A. Cochliacarpus* nos meios de produção in vitro, pois até então existe pouca produção científica acerca da utilização do extrato obtido da casca da planta, popularmente conhecida como barbatimão. Embora empiricamente seja conhecido por seu potencial cicatricial.

Portanto, os resultados obtidos demonstram que o extrato da *Abarema Cochliacarpus* possui atividade antimicrobiana e antioxidante, mostrando-se uma alternativa viável e econômica para utilização nos meios de produção in vitro.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, A. P. et al. Recentes avanços na relação entre nutrição e reprodução em ruminantes. **Revista Brasileira de Nutrição Animal**, v. 1, n. 2, p. 34-65, 2007.

CROCOMO, L.F; FILHO, W. C. M; ALVARENGA, F.C.L; BICUDO, S.D. Produção de embriões in vitro: estresse oxidativo e antioxidantes. **Veterinária e Zootecnia**. 2012 dez.; 19(4): 470-479.

CROCOMO, Letícia Ferrari et al. Peculiaridades da coleta de oócitos para produção in vitro de embriões ovinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, p. 25-31, 2012.

DE SOUZA, A.F. Avaliação microbiológica do sêmen fresco e congelado de reprodutores caprinos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 43, n. 3, p. 329-336, 2006.

FOIZER, B.R.R. Contaminação microbiológica em laboratório de reprodução humana e suas implicações no sucesso da reprodução assistida. **Reprodução & Climatério**, v. 29, n. 2, p. 66-70, 2014.

FREITAS, A.R; LOIBEL, S. M.C; ANDRADE, M.G; VAL. J.B.R. Modelagem do Crescimento Populacional do Rebanho Bovino Brasileiro. **Revista Brasileira de Zootecia**, v.34, n.6, 2005.

GALLEGO, G.; HENAO, D.; OSPINA, L.; GÓMEZ, A. A.; ARANGO, C.V.; MAYA, C.W.C.; CADAVID, C.A. Efeito de cinco extratos de plantas colombianas sobre espermatozoides humanos. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 17, n. 1, p. 84-92, 2012.

GONÇALVES, P. B. D.; FIGUEIREDO, J. R.; FREITAS, V. J. F. Biotécnicas aplicadas à reprodução animal. São Paulo: **Varela**, p. 195-226, 2002.

GONÇALVES, P. B. D.; VISINTIN, J. A.; OLIVEIRA, M. A. L.; MONTAGNER, M. M.; COSTA, L. F. S. Produção in vitro de embriões. In: embryonic development. **Theriogenology**, v.44,p.859-869, 1995.

GONÇALVES, P.B.D; BARRETA, M. H; SANDRI, L.R; FERREIRA R; ANTONIAZZI, A.Q. Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Revista Brasileira Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.212-217, abr./jun. 2007.

GOUVEIA, F.F. **Produção in vitro de Embriões Bovinos**. Brasília, 2011.

LÉGA, E.; AGOSTINHO, J.M.A. Índice de recuperação de oócitos bovinos obtidos de ovários adquiridos em abatedouro como contribuição para os estudos de fecundação e produção de embriões in vitro. **Nucleus Animalium**, v. 1, n. 1, 2009.

LOIOLA, M.V.G. **Validação de um programa de produção in vitro de embriões bovinos com transporte de oócitos e de embriões por longas distâncias**. Bahia, 2013.

MELLO, R.R.C.; FERREIRA, J.E.; SOUSA, S.L.G.; MELLO, M.R.B.; PALHANO, H.B. Fatores ligados à doadora que influenciam na produção de embriões in vitro (PIVE). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, p. 51-57, 2016.

MORAIS, I.C.O. **Importância do desempenho reprodutivo de bovinos**. Goiânia, 2011.

NETO, J.R.L.; UCHÔA, A.D.A.; MOURA, P.A.; FILHO, C.M.B.; TENÓRIO, J.C.G.; SILVA, A.G.; XIMENES, R.M.; SILVA, M.V.; CORREIA, M.T.S. Phytochemical screening, total phenolic content and antioxidant activity of some plants from Brazilian flora. **Journal of Medicinal Plants Research**. Vol 10(27), pp.409-416, 2016.

PARRISH, J.J.; KROGRNAES, A.; SUSKO-PARRISH, J.L. Effect of bovine sperm separation by either swim-up and percoll method on success of “in vitro” fertilization and early, 2013.

SANTOS SC, FERREIRA FS, ROSSI-ALVA JC, FERNANDEZ LG. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de Abarema cochliacarpus (Gomes) Barney & Grimes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2007; 17(2): p.215-219.

SCHLESINGER, Sérgio. **O gado bovino no Brasil**, 2010.

SILVA, N.C.B.; ESQUIBEL, M.A.; ALVES, M.; VELOZO, E.S.; ALMEIDA, M.Z.; SANTOS, J.E.S. Antinociceptive effects of *Abarema cochliacarpus* (Gomes Barneby & J. W. Grimes (Mimosaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. 2009; 19(1): p. 46-50.

TEIXEIRA, T.F.; SOUZA, N.M.; MACEDO, A.T.M; CAMPO, M.D.S.M.; AZEVEDO, M.V.; FREITAS, B.C.; ALVES, J.D.R.A.; OLIVEIRA, M.A.L. **Maturação e fertilização in vitro de oócitos caprinos utilizando espermatozoides sexados**. Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão. Recife 2009.

TENÓRIO, Rodrigo Ferreira Lima et al. Atividade antibacteriana in vitro do extrato de *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & JW Grimes contra bactérias isoladas de feridas cutâneas de cães. **Ciência Animal Brasileira**, v. 17, n. 2, p. 252-259, 2016.

3.2 ARTIGO 2 – EFEITO DO ANTIOXIDANTE NO CONGELAMENTO DE SÊMEN OVINO

José Adelson Alves do Nascimento Junior¹, Tulio Diego da Silva¹, Gustavo Ferrer Carneiro², Maria Tereza dos Santos Correia¹.

¹Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife-PE, Brasil

² Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife-PE, Brasil.

Autor Correspondente: Maria Tereza dos Santos Correia

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife-PE, Brasil Fone: (081) 994508770

E-mail: mtscorreia@yahoo.com.br

RESUMO

A expressividade da ovinocultura no setor agropecuário para a região Nordeste torna importante o desenvolvimento de biotecnologias da reprodução que aprimorem o rebanho e ajudem no crescimento econômico deste setor. O uso de biotécnicas da reprodução como a inseminação artificial (IA) e a criopreservação de sêmen causam extensivos danos às membranas espermáticas, os quais são atribuídos a alterações na transição da fase lipídica e/ou aumento na peroxidação lipídica. Diversos estudos têm relatado o papel dos oxidantes na fisiologia espermática, assim como a possibilidade de preservar a integridade destes gametas ao se adicionar substâncias antioxidantes aos diluentes de criopreservação. *Abarema cochliacarpus*, é uma espécie vegetal pertencente à família Fabaceae, contendo em sua composição química, catequinas (seus dímeros e trímeros), saponinas, taninos e proantocianidinas. Pesquisas tem

demonstrado uma ação antioxidante, anti-inflamatória, anti-ulcerogênica e cicatrizante. O trabalho objetivou testar o efeito do extrato desta planta na criopreservação de sêmen ovino. Foram utilizados ovinos, mestiços, em idade reprodutiva, sendo coletado o sêmen em triplicata e congelados com a adição do extrato ao diluente de criopreservação nas seguintes concentrações: 0 (Controle), 2,5mg; 1,25mg; 0,67mg; 0,31mg e 0,2 mg; sendo submetido ao congelamento, com posterior avaliação dos parâmetros cinéticos no sistema computadorizado CASA, avaliando-se também a integridade da membrana plasmática e do potencial de membrana mitocondrial. Os dados obtidos após transformação pelo arco seno foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA), sendo as médias dos tratamentos comparados com o Teste Tukey à 5% de significância. Na avaliação do CASA não houve diferenças significativas entre as concentrações nos parâmetros de: Motilidade Total (MT), Velocidade Curvilínea (VCL), Velocidade Progressiva (VSL), Velocidade de Trajeto (VAP), WOB e Amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH). No entanto, houve diferença significativa entre os tratamentos quando avaliados os parâmetros de motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) com um destaque para a concentração de 1,25mg de *Abarema Cochliacarpus*. Não houve diferença estatística entre os tratamentos na integridade de membrana ou no potencial mitocondrial. Esses resultados indicam que não houve um efeito adverso do *Abarema Cochliacarpus* na integridade de membrana plasmática ou potencial mitocondrial nas diferentes concentrações desse experimento. A concentração de 1,25mg do extrato, apresentou-se como a concentração mais indicada neste experimento. Conclui-se que o extrato fitoterápico da *Abarema Cochliacarpus* pode ser usado na criopreservação de sêmen ovino, no entanto mais estudos serão necessários para mensurar a concentração adequada do extrato para que este desempenhe o papel antioxidante esperado.

INTRODUÇÃO

A ovinocultura é uma das atividades agropecuárias que mais se adaptou as condições edafoclimáticas do Nordeste brasileiro. Segundo dados lançados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no ano de 2015, em Pesquisa Pecuária Municipal, o rebanho ovino no Brasil estava estimado em 18.433.810 cabeças. No ranking de maiores rebanhos o Nordeste se destaca na criação de ovinos, sendo Pernambuco (3º na criação de ovinos) um dos principais estados detentor dos maiores rebanhos com cerca de 2.416.977 cabeças.

Diante do número do rebanho de ovinos observa-se uma cadeia produtiva em crescimento (NÓBREGA, 2016). Fatores como genética, nutrição e a sanidade auxiliam no processo mercantil, pois todos estão interligados. O manejo reprodutivo influencia diretamente no desempenho produtivo do rebanho, portanto, deve-se agrupar um conjunto de práticas diárias adequadas que permitam os animais expressarem todo o seu potencial produtivo, usando além da genética associada uma correta nutrição e um eficiente programa de prevenção e controle de doenças (FILHO, 2009).

Uma das técnicas mais utilizadas para a melhoria do potencial produtivo dos animais é a inseminação artificial (IA). Essa técnica biotecnológica é uma das mais antigas aplicadas com finalidade de melhoramento genético animal e a que provocou o maior ganho genético em decorrência da facilidade de seu domínio prático se tornou a mais difundida.

Para realização da IA podem ser usados sêmen de animais testados, sendo estes utilizados a fresco ou conservados sob refrigeração e congelação. Os primeiros diluentes desenvolvidos usavam em sua base gema de ovo e citrato, visando proteger o sêmen contra os danos causados pelo choque térmico, para o sêmen ovino além destes citados, podem ser usados diluente à base de leite e/ou água de coco (NUNES, 2010). O uso do diluente se faz necessário devido ao fato de que o ejaculado, da maioria dos animais domésticos, apresenta uma maior concentração espermática que a necessária para fecundação, possibilitando diluí-lo, maximizando assim seu uso tendo um maior aproveitamento do ejaculado (CASTELO, 2008).

O sêmen quando congelado sofre vários danos estruturais, químicos e físicos aos espermatozoides, levando à diminuição nos parâmetros de motilidade, viabilidade e fertilidade (GUERRA et al., 2009). Estes danos causados não estão relacionados com a permanência do sêmen a temperatura de -196°C , já que nessa temperatura não ocorrem reações bioquímicas. Mas estão ligados aos processos de resfriamento, congelação e descongelação (BITTENCOURT et al., 2007). Vale ressaltar que a ocorrência destes danos difere entre as espécies, devido à variação de tamanho e forma dos espermatozoides, bem como a composição lipídica. As alterações causadas por esse processo se deve a mudança na temperatura, injúrias oxidativas, formação de cristais de gelo, lesões no DNA, alterações na membrana do espermatozoide, estresse osmótico, além da toxicidade dos crioprotetores (SOARES, 2009).

Com intuito de minimizar as injúrias oxidativas diversos estudos tem lançado mão de meios com substâncias antioxidantes melhorando assim a qualidade espermática pós-descongelamento, mas os resultados ainda são contraditórios (GUERRA et al., 2009). Nesse panorama, o uso de antioxidantes torna-se imprescindível, pois fisiologicamente a concentração de oxigênio é reduzida nos fluidos do sistema reprodutor feminino, exceto no momento em que

ocorre a ovulação, para não ser prejudicial aos espermatozoides. Daí compreende-se o uso do antioxidante nos meios diluentes com a função de reduzir as espécies reativas de oxigênio (ROS), sendo essa ação necessária para que o espermatozoide adquira capacidade fertilizante, caso isso, não ocorra, o sêmen será afetado. Pois, as concentrações de ROS estando elevadas comprometem a motilidade, a viabilidade, o metabolismo energético e a integridade do DNA dos espermatozoides (SOARES, 2009).

A adição de antioxidantes à base de substratos de origem vegetal é uma alternativa viável. Além disso, a utilização desses extratos possibilita um maior controle sanitário do produto utilizado. Com o passar dos anos e a evolução tecnológica, o conhecimento sobre as plantas evoluiu e ocasionou a possibilidade de isolamento dos princípios ativos presentes nestas fontes vegetais (BITTENCOURT et al., 2013).

Nascimento (2016), constatou que ao testar extrato de *Mauritia Flexuosa* em sêmen caprino, apesar de o tratamento controle ter sido o melhor em determinados parâmetros pós-descongelamento quando comparado aos demais grupos tratamentos contendo o extrato, ocorreu uma melhora nos parâmetros de motilidade e vigor nos tratamentos contendo este extrato, podendo dessa forma sugerir que este poderia ser uma alternativa viável para o congelamento de sêmen, no entanto, requereria mais estudos quanto à determinação de uma concentração mais segura a ser usada.

Abarema Cochliacarpus é uma espécie nativa do Brasil presente, principalmente, na Mata Atlântica, pertencente à família Leguminosae-Mimosiodae, caracteriza-se como uma árvore frondosa de pequeno a médio porte, possuindo inflorescência em glomérulos globosos, frutos do tipo legume contorcido, flores ligeiramente amareladas, folhas compostas e sementes brancas acinzentadas, amplamente utilizada *in natura* no Brasil como planta medicinal, e é considerada uma espécie vulnerável à extinção. Essa planta apresenta inúmeras propriedades medicinais, pois estudos fitoquímicos primários relataram a presença de saponinas, catequinas, taninos, fenóis e antraquinonas. Nas catequinas mostram evidências de atividade antioxidante e capacidade de combate aos radicais livres (LINS NETO, 2015; TENORIO et al., 2016). Segundo Lins-Neto (2015), as folhas de *A. Cochliacarpus* apresentam relevante ação antioxidante naturais, que agem de maneira benéfica sobre o estresse oxidativo, esses resultados foram obtidos frente aos ensaios do DPPH, ABTS e Capacidade Antioxidante Total (CAT).

Diante disso, o trabalho objetivou-se a testar o efeito na qualidade seminal de ovinos antioxidante de origem vegetal extraído da *Abarema Cochliacarpus*, visando diminuir as espécies reativas de oxigênio nas amostras de sêmen ovino criopreservado.

METODOLOGIA

ANIMAIS, LOCAL E PERÍODO DO EXPERIMENTO

O presente trabalho de pesquisa foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal de Pernambuco (LABRAPE), localizado nas dependências da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Unidade Acadêmica de Garanhuns (UAG), em que foram utilizados ovinos, oriundos de propriedades rurais no município de Garanhuns, na Mesorregião do Agreste Pernambucano, localizada a uma latitude: 08° 53' 25" S e longitude: 36° 29' 34" W. Distante cerca de 230 km da capital pernambucana, Recife. O experimento foi realizado no mês de janeiro de 2018 e teve aprovação do Comitê de Ética para Uso dos Animais (CEUA), licença número 127/2017.

PREPARO DO EXTRATO

Para o preparo do extrato aquoso foram utilizadas 20 g de pó seco das folhas de *Abarema Cochliacarpus* para 1000 mL de água destilada, em 5 etapas de preparação para obtenção do extrato aquoso estéril: 1) Vinte gramas (20 g) de matéria vegetal seca (pó) foram suspensos em 300 mL de água destilada a 100°C, permanecendo em infusão por 24h, devidamente fechado e protegido da luz; 2) Após este período, procedeu-se a filtração e foram adicionados mais 350 mL de água destilada ao resíduo vegetal da filtração à temperatura de 100°C, sendo este mantido em infusão por mais 24 horas de forma semelhante à primeira fase; 3) A extração obtida nesta segunda fase foi filtrada e ao resíduo resultante da filtração, foram adicionados mais 350 mL de água destilada a 100°C e mantidos em infusão por mais 24 horas, concluindo o processo de extração; 4) Ao final da última filtração foram obtidos três extratos aquosos brutos que foram misturados resultando em um único extrato; 5) O extrato final foi submetido à filtração a vácuo, sendo que no momento da realização do experimento o volume de extrato que seria utilizado foi previamente submetido à filtração microbiológica com membrana Milipore® de 0,22 µm, e esta solução foi acondicionada em tubos estéreis de vidro, mantidos a 4°C e protegidos da luz.

COLETA DO SÊMEN

Foram utilizados dois ovinos machos adultos, selecionados após exame andro-lógico, que após serem condicionados a coletar com vagina artificial, passaram a ser coletados em dias

alternados dando descanso aos animais de 72 horas entre as coletas. Durante a coleta fazia-se uso de ovelhas como manequins não necessariamente em estro, a qual era contida manualmente. A recepção do sêmen foi em cone coletor de silicone e tubos Falcon® graduados.

AVALIAÇÃO DO SÊMEN FRESCO

À medida que o sêmen era coletado o mesmo era encaminhado ao Laboratório de Reprodução Animal de Pernambuco (LABRAPE) para realização do espermograma, quantificando os seguintes parâmetros: volume (mL), concentração espermática ($\times 10^9$ espermatozoide/mL), motilidade individual progressiva (MIP, 0-100%), e vigor (0-5), de acordo com os critérios preconizados pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013). Pipetava-se uma alíquota de 2,5 μ L de sêmen diluindo em 997,5 μ L de água ficando dessa forma numa concentração de 1:400, onde a partir dessa amostra foi realizado a contagem espermática, definindo a concentração espermática usando-se a câmara de Neubauer.

ADIÇÃO DO ÓLEO AO SÊMEN.

O sêmen foi diluído adicionando o meio diluente, já acrescido do óleo de *Abarema Cochliacarpus*. O sêmen recebeu concentrações de extrato já preestabelecidas. O óleo obtido através da extração aquosa foi submetido a diversos testes quanto à atividade antioxidante (SILVA et al., 2009; BIANCHETTI, 2014). Posteriormente, foi feito a análise juntamente com sêmen de carneiro utilizando-se as concentrações: C0 (controle); C2,5; C1,25; C0,67; C0,31; C0,2 miligramas do extrato.

CONGELAMENTO DE SÊMEN

Após a diluição o sêmen foi envasado em palhetas de 0,25ml e submetido ao processo de congelamento, utilizando-se a máquina TK3000® (TK Tecnologia em congelação LTDA, Uberaba, Brasil), utilizando-se uma curva rápida de congelamento (P3:S1) com um período de uma (01) hora de estabilização conforme estudos anteriores em nosso laboratório (CARNEIRO, 2008). Em seguida, foi iniciada a curva de congelamento (-20 C/ min), até atingir -120 °C. Então, as palhetas foram imersas e estocadas em nitrogênio líquido (-196°C), até o momento das análises.

AValiação Pós Descongelamento

Realizado o congelamento das amostras pretendidas realizou-se a avaliação dos parâmetros espermáticos após o descongelamento (37 °C por 30 segundos).

COMPUTER ASSISTED SPERM ANALYSIS

A análise da cinética espermática foi realizada utilizando o *Computer Assisted Sperm Analysis* (CASA). Uma alíquota (3 µL) da amostra diluída foi colocada sobre lâmina e coberta com lamínula (18 x 18 mm), ambas pré-aquecidas (37 °C) e avaliada em microscópio de contraste de fase (Eclipse 50i, Nikon, Japão, 100x). As imagens foram capturadas por uma câmera de vídeo alemã *Basler Vision Technologies™ A312FC*. Para cada amostra, cinco campos aleatórios foram selecionados, com registro de, no mínimo, 500 células espermáticas. As variáveis analisadas foram: motilidade total (MT, %), motilidade progressiva (MP,%), linearidade (LIN, %), retilinearidade (STR, %); velocidade curvilínea (VCL, µm/s), velocidade em linha reta (VSL, µm/s); velocidade média da trajetória (VAP, µm/s), amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH, µm/s); frequência de batimento flagelar cruzado (BCF,%). Os valores do sistema CASA foram mensurados com as seguintes configurações: temperatura 37 °C; magnificação, 100x; número de imagens, 25; imagens por segundo, 25; área da cabeça, 20 a 70 µm²; VAP: lentos 10 µ/s < médios 45 µ/s < rápidos 75 µ/s; progressividade, 80% STR; circular, 50% LIN. Integridade de membrana plasmática (IMP).

Os seguintes procedimentos foram realizados para análise de integridade da membrana plasmática (IMP). Alíquotas (40 µL) de sêmen de cada grupo experimental foram distribuídas em microtubos (1,5 mL), para cada uma das avaliações, aos quais foram adicionados 5 µL de iodeto de propídio, 5 µL de CFDA (6 carboxifluoresceína) e 5 µL de paraformol. A seguir, foram colocados 5 µL de cada amostra sobre lâmina e coberta com lamínula (18 x 18 mm) e submetidas a avaliação em microscópio de fluorescência. Para cada amostra, cinco campos aleatórios foram selecionados com registro de 200 células espermáticas, sendo classificadas como íntegras aquelas que apresentaram coloração verde.

POTENCIAL DE MEMBRANA MITOCONDRIAL (PMM)

Para análise do potencial de membrana mitocondrial (PMM), adicionou-se 5 µL de JC-1 (Solução estoque 5 mg/mL em DMSO; Solução de trabalho 153 µM em DMSO) às amostras

de sêmen contendo 40 μ L, distribuídas em microtubos de 1,5 ml. A seguir, as amostras foram incubadas por 5 min a temperatura ambiente e avaliadas. Células com peças intermediárias coradas em laranja foram classificadas com portadoras de alto potencial de membrana mitocondrial. Para cada amostra, cinco campos aleatórios foram selecionados, com registro de 200 células espermáticas.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado (DIC), com seis tratamentos e seis repetições, 3 por animal) Os tratamentos foram compostos das concentrações C0 (controle); C2,5; C1,25; C0,67; C0,31 e C0,2 mg do extrato. Os dados obtidos foram submetidos pós-transformação pelo arco seno ($\arcsen P/100$) à análise de variância (ANOVA) pelo teste “F”, sendo as médias dos tratamentos comparados com o Teste Tukey à 5% de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram realizadas as coletas de sêmen que de imediato foi transportado para o laboratório e avaliado. Os resultados estão de acordo com as características para sêmen ovino (CBRA, 2013) obtendo-se os resultados demonstrados na Tabela 1, abaixo:

Tabela 1 – Valores médios dos parâmetros avaliados pré - congelamento de sêmen ovino.

	Animal 1	Animal 2	Média Geral
Volume(ml)	0,93 $\pm$ 0,20	0,92 $\pm$ 0,22	0,93 $\pm$ 0,19
CONCENTRAÇÃO	107,25 $\pm$ 11,17	115,75 $\pm$ 11,78	111,5 $\pm$ 11,56
MOTILIDADE (%)	80,00 $\pm$ 8,16	77,5 $\pm$ 6,45	78,75 $\pm$ 6,94
VIGOR (0-5)	3,50 $\pm$ 0,57	3,75 $\pm$ 0,50	3,62 $\pm$ 0,51

Fonte: Nascimento Junior e col. (2020).

Foram usadas cinco concentrações diferentes do óleo nas amostras de sêmen, formando os seguintes tratamentos: 0mg (controle), 2,5 mg(C2,5), 1,25 mg (C1,25), 0,67 mg (C0,67),

0,31 mg (C0,31) e 0,2 mg (C0,2) do extrato. As amostras foram submetidas a avaliação no sistema CASA obtendo-se os resultados demonstrados na Tabela 2, em que observou-se que não houve diferenças significativas entre as concentrações nos seguintes parâmetros: MT, VCL, VSL, VAP, WOB e ALH.

Tabela 2 – Valores médios pós descongelamento de sêmen ovino com adição do extrato vegetal, com avaliação no sistema computadorizado CASA.

Parametros avaliados	Controle	C.2,5	C.1,25	C.0,67	C.0,31	C.0,2
MT(%)	49,40a	51,01a	50,37a	45,37a	51,72a	47,36a
MP(%)	27,34a,b	30,80a,b	33,91b	25,76a	29,87a,b	28,07a,b
VCL(µm/s)	64,68a	69,13a	73,00a	62,25a	74,23a	72,50a
VSL(µm/s)	41,06a	49,81a	54,58a	40,95a	47,96a	44,90a
VAP(µm/s)	50,25a	62,18a	60,80a	49,63a	58,48a	55,62a
LIN(%)	52,82a,b	53,56a,b	59,01b	54,15a,b	53,13a,b	51,92a
STR(%)	64,75a	64,12a	70,69b	65,25a,b	64,61a	64,05a
WOB(%)	61,80a	63,30a	65,17a	63,30a	62,39a	61,11a
ALH(µm/s)	2,36a	2,28a	2,26a	2,03a	2,35a	2,54a
BCF(Hz)	10,48a,b	10,08a	11,50b	9,36a	10,33a,b	10,46a,b

Fonte: Nascimento Junior e col. (2020).

No entanto, houve diferença significativa entre os tratamentos quando avaliados os parâmetros de motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) e em ambos os parâmetros destacou-se a concentração contendo 1,25mg de extrato de *Abarema Cochliacarpus*, sendo que apenas o STR apresentou diferença em relação ao controle e os demais parâmetros citados não diferiram do controle. Porém, ficou demonstrado que concentrações menores que 1,25 mg do extrato apresentaram menores valores percentuais dos parâmetros avaliados no CASA, concluindo que concentrações menores que esta podem não apresentar ação antioxidante esperada.

Contudo, uma hipótese que pode explicar o fato de que valores superiores a este podem comprometer a qualidade espermática pós-descongelamento também não sendo indicado uso de concentrações mais altas deste extrato. Essa hipótese corrobora com trabalho de Marsico (2016), em que foram observados diferentes extratos em diferentes concentrações podem apresentar comportamentos bioquímicos diferentes entre si.

Tabela 3 – Valores médios da avaliação de Integridade de membrana plasmática (IMP) e Potencial de membrana mitocondrial (PMM) através de sondas fluorescentes.

	CONTROLE	C2,5	C1,25	C0,67	C0,31	C0,2
IMP	28,50a	37,25a	31,50a	22,25a	21,25a	38,00a
PMM	58,25a	66,50a	69,25a	88,75a	81,25a	73,00a

Fonte: Nascimento Junior e col. (2020).

Neste experimento, não foi observado diferenças significativa entre os tratamentos no que diz respeito ao comprometimento da integridade de membrana plasmática e do potencial de membrana mitocondrial. Corroborando com resultados encontrados por Santos (2014) que também fez uso de um extrato vegetal à base de própolis verde como antioxidante no resfriamento de sêmen equino e demonstrou que não houve comprometimento da funcionalidade mitocondrial e integridade de membrana plasmática, entretanto houve diminuição da motilidade espermática. Não há nenhuma evidência, a nosso conhecimento, sobre o efeito do extrato de *Abarema Cochliacarpus* especialmente no padrão de atividade mitocondrial e estado apoptose em espermatozoides de mamíferos.

CONCLUSÃO

Conclui-se com esse trabalho, que é possível a utilização de antioxidante a base de óleo vegetal da *Abarema cochliacarpus* em sêmen ovino, visto que não houve comprometimento nos parâmetros de integridade de membrana e potencial mitocondrial. Observou-se ainda um efeito positivo na avaliação computadorizada de espermatozoide, visto que foi possível observar diferença entre os tratamentos nos parâmetros de motilidade progressiva (MP), linearidade (LIN), retilinearidade (STR) e frequência de batimento flagelar cruzado (BCF), havendo um destaque para a concentração de 1,25mg de *Abarema Cochliacarpus*.

Conclui-se que os óleos fitoterápicos da *Abarema Cochliacarpus* podem ser usados na criopreservação de sêmen ovino, no entanto maiores estudos serão necessários para indicar a concentração adequada que pode ser utilizada do extrato para que este desempenhe o papel antioxidante esperado.

Além disso, vale ressaltar que o presente estudo foi o pioneiro avaliando o efeito deste extrato sobre os parâmetros pós-descongelamento de espermatozoides ovinos.

REFERÊNCIAS

- BIANCHETTI, P. **Avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana de extratos aquosos e etanólicos de plantas da família Mytaceae frente ao micro-organismo Escherichia coli.** (Dissertação de mestrado). Lajeado: Mestrado em Biotecnologia – UNIVATES; 2014. p.47.
- BITTENCOURT, R. F. et al. Criopreservação do sêmen caprino: efeito da curva de resfriamento e do tempo de equilíbrio; **Ciência Animal**, 17(2): 75-82, 2007.
- BITTENCOURT, R. F. et al. Avanços na criopreservação do sêmen ovino I: diluidores e crioprotetores. **Cienc. anim. bras.**, Goiânia, v.14, n.4, p. 522-536, out./dez. 2013.
- CARNEIRO, G.F. Biotécnicas da Reprodução Assistida em Pequenos Ruminantes. **Tecnologia & Ciencia Agropecuaria**, v.2, p.23-28, 2008.
- CASTELO, T. S.; FROTA, T. R.; SILVA, A. R. Considerações sobre a criopreservação do sêmen de caprinos; **Acta Veterinaria Brasilica**, v.2, n.3, p.67-75, 2008.
- CBRA - COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal.** 3.ed. Belo Horizonte, 2013. 104 p.
- FILHO, C. G. Manejo Básico de ovinos e caprinos; **Guia do educador** / Brasília ; Sebrae, 2009.
- GUERRA, M. M. P. et al. Aspectos críticos da congelação do sêmen caprino. **Rev. Bras Reprod Anim Supl**, Belo Horizonte, n.6, p.42-49, dez. 2009.
- IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Pecuária Municipal em 2015** / Agropecuária > Efetivos da agropecuária.
- LINS-NETO, J. R. **Potencial antioxidante de plantas da flora Pernambucana.** 2015. Dissertação (programa de pós-graduação em Bioquímica e Fisiologia), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE).
- MARSICO, T. V. **Análise de estresse oxidativo em células espermáticas congeladas de bovinos com a adição dos antioxidantes naturais.** 2016. Trabalho de conclusão de curso (TCC III) apresentado ao curso de graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Pampa – Campus SG/RS.
- NASCIMENTO, D. M. **Avaliação in vitro de sêmen caprino criopreservado em diluente Tris contendo extrato bruto de Mauritia flexuosa.** 2016. Dissertação (Programa de Pós-Graduação Zootecnia, na área de Produção Animal - Linha de pesquisa Me- lhoramento e Reprodução Animal), Campus Profa. Cinobelina Elvas da Universidade Federal do Piauí, Bom Jesus/PI.
- NOBREGA, A. Estudo aponta tendências para a caprinocultura e ovinocultura nos cenários nacional e internacional / **Embrapa Caprinos e Ovinos** - CE / Produção animal, 2016.

NUNES, J. F.; **Biotécnicas reprodutivas aplicadas a pequenos ruminantes** / Fortaleza: Tecnograf, 2010.

ONDRIZEK R. R. et al. **An alternative medicine study of herbal effects on the penetration of zona-free hamster oocytes and the integrity of sperm deoxyribonucleic acid**. Fertil Steril. 1999.

SANTOS, F. C.C. **Utilização de extrato de própolis verde no resfriamento de sêmen equino**. 2014. Dissertação (Programa de pós-graduação em Veterinária), Universidade Federal de Pelotas.

SILVA, N. C. B. et al. Antinociceptive Effects of Abarema cochliacarpus (B.A. Gomes) Barneby & J.W. Grimes (Mimosaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.** 19(1): 46-50, 2009.

SOARES, A. T.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre a viabilidade espermática. **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, João Pessoa, v.3, n.2, p.53-63, jun. 2009.

TENÓRIO, R. F. L. et al. Atividade antibacteriana in vitro do extrato de Abarema cochliacarpus (GOMES) barneby & j.w. Grimes contra bactérias isoladas de feridas cutâneas de cães / **Cienc. anim. bras.**, Goiânia, v.17, n.2, p. 252-259 abr./jun. 2016.

VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M.; HARING, R.M.; KAALLANSBERGEN, L.M.T.E.; DEN DAAS, J.H.G.; Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soy bean extract. **Theriogenology**, New York, v.54, p.57-67, 2000.

3.3 ARTIGO 3 – AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE E CITOTÓXICO DE PLANTAS DA CAATINGA

José Adelson Alves do Nascimento Junior¹, Bruno S. dos Santos¹, Tulio Diego da Silva¹, Patricia M. G. Paiva¹, Tiago H. Napoleão¹, Marcia Vanusa da Silva¹, Maria Tereza dos Santos Correia¹.

¹Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife-PE, Brasil

Autor Correspondente: Maria Tereza dos Santos Correia

Laboratório de Biologia Molecular, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, 50670-420, Recife-PE, Brasil Fone: (081) 994508770

E-mail: mtscorreia@yahoo.com.br

RESUMO

A prospecção de substâncias antioxidantes naturais é uma prática que vem crescendo nas últimas décadas devido à descoberta de produtos de origem natural com propriedades

terapêuticas e também porque eles representam uma alternativa para o uso de antioxidantes sintéticos. A região do Nordeste do Brasil, onde se localiza boa parte da Caatinga tem sido alvo de diversos estudos etnofarmacológicos, mesmo apresentando a maior parte da sua vegetação seca. Radicais livres são produzidos normalmente pelos organismos vivos mas, quando em excesso podem causar várias patologias como: câncer, o envelhecimento precoce, choque hemorrágico, catarata, disfunções cognitivas, doenças cardiovasculares etc. O organismo é capaz de produzir substâncias antioxidantes, como um mecanismo de proteção contra os efeitos deletérios dos radicais livres. Dentro dessas perspectivas esse estudo investigou as atividades antioxidantes o conteúdo fenólico total e teor de flavonoides, e a atividade citotóxica de três plantas da caatinga. A metodologia utilizada foi de ABTS, DPPH, FRAP, Poder Redutor, Flavonoides e fenóis e fitoquímica e HPLC, como também atividade citotóxica dos extratos. As dosagens de fenóis totais e flavonoides dos extratos variaram de 97,13 a 112,39 (mg EAG. g⁻¹ extrato) e 23,54 a 28,96 (mg EQ. g⁻¹ extrato), respectivamente. Os valores de CI50 da atividade sequestradora de radicais DPPH variaram de 0,457 a 1,162 µg/mL. A CI50 de sequestro de radicais ABTS variou de 244,2 a 281,1 e a porcentagem da capacidade antioxidante total (%CAT) de 11,50 a 24,38 %. A atividade de redução do íon do ferro pelo método de FRAP ficou entre 477,78 e 850,89 µg/mL, e atividade de poder redutor indicou uma absorbância de 1.4 para o extrato SP seguido de 1.1 e 0.89 dos extratos AC e TC onde obtiveram leituras próximas a absorbância do controle quercetina que foi 1.5. A atividade hemolítica de todos os extratos apresentaram hemólise abaixo de 3% o que indica que não obtiveram atividade citotóxica contra células humanas, a avaliação dos ensaios de atividade citotóxica contra células tumorais mostrou que os extratos não apresentam atividade contra células tumorais. Neste estudo pode-se verificar o papel que desempenham os compostos fenólicos na atividade contra os radicais livres que desempenham os extratos utilizados, e que os não foi observado citotoxicidade. Mais estudos são necessários para isolar esses compostos para melhor caracterizá-los, assim como a realização de testes de atividade antioxidante in vivo.

INTRODUÇÃO

No organismo, espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) estão envolvidos em processos metabólicos, tais como a produção de energia, regulação do crescimento celular, a sinalização intercelular, fagocitose e síntese de moléculas biológicas importantes. No entanto, estas espécies reativas podem estar relacionados com efeitos adversos

para a saúde tais como danos de peroxidação lipídica e a proteína, tecidos de membrana, enzimas, hidratos de carbono e ácidos nucleicos [2,3].

A quantidade de radicais livres no corpo é contrabalançado pela disponibilidade de antioxidantes, que são compostos capazes de prevenir qualquer formação de radicais livres. O desequilíbrio de radicais livres / antioxidantes em favor de radicais livres pode levar à criação de estresse oxidativo, uma situação caracterizada pela insuficiência de biomoléculas e, conseqüentemente, perigo a saúde humana [4]. Os antioxidantes são tem um papel importante na prevenção de várias doenças [5]. Os efeitos terapêuticos de vários medicamentos derivados de plantas estão correlacionados com a atividade antioxidante [6].

Entre as moléculas produzidas pelas plantas os polifenóis são uma das classes mais estudadas, cuja capacidade antioxidante é notável, principalmente devido às suas propriedades redutoras e estrutura química [7]. Estudos indicam que o consumo de frutos e vegetais que contêm antioxidantes fenólicos e outros fitoquímicos é vantajosa para a saúde [8].

Os antioxidantes são aplicados na indústria alimentar como agentes que impedem a auto-oxidação de carne, frutos e óleos, em vários compostos são produzidos para o efeito, tais como hidroxitolueno butilado (BHT), hidroxianisole butilado (BHA) e terc-butil-hidroquinona (TBHQ) (Karpínska., 2014) No entanto, Juntachote (2006) pondera que há uma crescente preocupação sobre os possíveis efeitos cancerígenos de antioxidantes sintéticos em alimentos.

No entanto, Mohamed (2011) salienta que os potenciais riscos para a saúde pelo uso de antioxidantes sintéticos tem provocado o interesse na busca de antioxidantes naturais. Por essa razão, este estudo teve como objetivo realizar uma análise quantitativa da atividade antioxidante citotóxica em células HepG2 e hémacias, bem como a fenóis totais e conteúdo de flavonóides em extratos metanólico de folhas de três plantas do ecossistema Caatinga localizado no estado de Pernambuco, Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

COLETA, PROCESSAMENTO E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS VEGETAIS

Folhas do *T.Cyrthanthum*, *A.Couchiliacarpus* e *S.Pulcherrimum* foram coletadas no Parque do Catimbau, em Buíque Pernambuco. O material foi levado à estufa de circulação de ar forçado (40-45 C) por um período de três a quatro dias. O material vegetal foi processado em moinho de bancada seguindo extração à frio em mesa agitadora, seguindo a ordem eluotrópica dos solventes: Ciclohexano, Clorofórmio, Acetato de Etila e Metanol. As amostras

foram rotaevaporadas e deixadas em temperatura ambiente para secagem completa do solvente. Das frações obtidas foi utilizada somente a metanólica para o presente estudo.

SEQUESTRO DE RADICAIS LIVRES (SRL) PELO MÉTODO DO DPPH•

Neste ensaio a atividade sequestradora de radical livre do extrato, foi medida em termos de doação de hidrogênio usando o radical estável 2,2-difenil1-picrilhidrazil (DPPH•). (Blois, 1958). Foi misturado 250 µL da solução de DPPH• (1 mM) em 40 µL de diferentes concentrações do extrato metanólico (3,90; 7,81; 15,625; 31,25; 62,5; 125; 500 µg/mL). Após 25 minutos foi medida a absorbância em 517 nm. Ácido gálico e BHT foram usados como composto de referência e o controle negativo foi o DPPH adicionado a 40 µL de metanol (solvente utilizado para diluir as amostras). A eliminação de radicais de DPPH• foi calculada pela fórmula: $\text{Eliminação [DPPH•]} (\%) = ((\text{Abs amostra} - \text{Abs controle})) / (\text{Abs controle}) \times 100$, onde: Abs = Absorbância.

SEQUESTRO DO RADICAL ABTS•+

A atividade de captura do radical ABTS•+ foi determinada de acordo com Re et al. (1999). O radical ABTS•+ foi produzido pela reação entre uma solução de ABTS•+ 14 mM e uma solução de persulfato de potássio (K₂S₂O₈) a 4.9 mM, mantida à temperatura ambiente e protegida da luz por 16 h. Antes de ser usada, esta solução foi diluída com etanol para se obter uma absorbância a 734 nm de $0,700 \pm 0,020$. Para a reação, foram misturados 1 mL da solução de ABTS•+ e 10 µL do extrato vegetal (concentração 1 mg/mL). A mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 6 min. Após a incubação, foram mensuradas as absorbâncias das amostras a 734 nm. A partir das leituras das absorbâncias, foi calculada a porcentagem de inibição do ABTS•+, através da fórmula: $\% \text{ Redução de ABTS•+} = [(Ac - As) / Ac] \times 100$, onde Ac representa a absorbância do controle e As a absorbância das amostras.

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE TOTAL

Os extratos foram diluídos para concentração de 1 mg/mL em metanol. Em seguida, 0,1 mL de cada amostra foi misturado a 1 mL da solução de fosfomolibdênio (ácido sulfúrico 600 mM, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônio 4 mM) e posteriormente incubados a 95°C por 90 min. As absorbâncias das amostras foram medidas a 695 nm contra um branco (1 mL de

solução de fosfomolibdênio e 0,1 mL do metanol) (Pietro et al., 1999). A atividade antioxidante total foi expressa em relação ao ácido ascórbico (100%), calculada pela fórmula abaixo e comparada com a atividade do BHT (hidroxitolueno butilado) e Ácido Gálico. $TAC (\%) = ((Aa - Ac))/((Aaa - Ac)) \times 100$, onde: Ac = Absorbância do controle, Aa = Absorbância da amostra e Aaa = Absorbância do ácido ascórbico.

PODER REDUTOR

A avaliação do poder de redução dos extratos foi realizada de acordo com a metodologia citada por Yen e Chen (1995), com modificações. As amostras dos extratos foram diluídas nas concentrações: 0,1; 0,250; 0,5 mg/mL. Transferiu-se 50 µL da amostra para um tubo e em seguida, foram adicionados: 125 µL de tampão fosfato 0,2 M (pH 6,6) e 125 µL de K₃[Fe(CN)₆] a 1% (p/v). A mistura foi incubada a 45 °C por 20 min. Foram adicionados 125 µL de ácido tricloroacético a 10% (p/v) à solução, com posterior agitação. Um volume de 125 µL da mistura foi transferido para outro tubo de ensaio, no qual foram adicionados 125 µL de água destilada e 25 µL de FeCl₃ a 0,1% (p/v), sob agitação. A leitura da absorbância foi realizada a 700 nm. A intensidade na coloração é proporcional ao poder redutor da amostra. As leituras foram realizadas em triplicata e neste teste utilizou-se como 100% de atividade a absorbância do padrão BHT nas concentrações referidas para as amostras (0,1; 0,5; 1,0 e 5,0 mg/mL).

FRAP

Nesse método o complexo férrico-tripiridiltiazina (Fe^{III}-TPTZ) é reduzido ao complexo ferroso (Fe^{II}-TPTZ), na presença de um antioxidante em condições ácidas (BENZIE; STRAIN, 1996). Inicialmente, 20 µL do extrato foram misturados com 180 µL do reagente de trabalho do FRAP (25 mL de tampão acetato 0,3 M, 2,5 mL de uma solução de TPTZ 10 mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico 20 mM), incubado a 37°C durante 40 minutos e posteriormente feita a leitura da absorbância em espectrofotômetro a 593 nm. O sulfato ferroso é utilizado para fazer uma curva de calibração (concentrações entre 0 e 100 µg/mL) foi preparada através da representação gráfica da absorbância em função da concentração onde Y é a absorbância e X a concentração dos compostos e os resultados são expressos em mg equivalentes de FeSO₄ / g de extrato.

ATIVIDADE CITOTÓXICA

A atividade citotóxica dos compostos foi avaliada contra linhagens HeLa através do método do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (Mosmann,1983;Alley et al.,1988). Foi utilizado nos ensaios o meio de cultura DMEM foi suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 1 % de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina (200 μ M). As células foram cultivadas em placas de 96 poços na concentração de 1×10^6 células/mL e incubadas em estufa a 37°C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂, durante 24 h. Em seguida, os compostos foram dissolvidos em DMSO 0,5 % (v/v) para se obter soluções-estoque de 10 mg/mL (extrato) ou 5 mg/mL (composto puro), adicionados aos poços e submetidos a diluições seriadas para se obter as faixas de concentração 0,39–50 μ g/mL para os extratos orgânicos e 0,195–25 μ g/mL para os compostos puros. O fármaco doxorrubicina (0,009–5 μ g/mL) foi utilizado como controle positivo e DMSO (0,5 mg/mL) como controle negativo. Após 72 h de incubação foram adicionados em cada poço 25 μ L de MTT (5 mg/mL) e após 3 h o meio de cultura com o MTT foi aspirado e 100 μ L de DMSO foram adicionados a cada poço para a dissolução dos cristais de formazan. A absorbância dos compostos foi medida em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm.

O percentual de inibição do crescimento celular foi determinado considerando a média da absorbância controle negativo como 100% de proliferação celular. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas: amostras sem atividade (inibição variando de 1 a 50%), com pouca atividade (inibição variando de 50 a 70%), com moderada atividade (inibição variando de 70 a 90%) e com elevada atividade (inibição variando de 90 a 100%) (RODRIGUES et al., 2014). A concentração que inibe 50% do crescimento celular (IC₅₀) foi calculada se amostras promovessem uma inibição maior que 70%, a partir de regressão logarítmica, utilizando o programa GraphPad Prism 5.0.

ATIVIDADE HEMOLÍTICA

O sangue foi obtido através de material doado por laboratório de análises clínicas do Recife. O sangue total foi centrifugado (1,500 rpm, 10 min at 4°C) e foi feita a lavagem dos eritrócitos por três vezes em PBS pH 7.4. O tubo para o teste recebeu 1.1 mL de uma suspensão de eritrócitos (1%) e 0.4 mL de várias concentrações dos extratos (0.05–0.5 mg/mL) diluídos em DMSO a 20%. Um controle negativo somente com solvente (DMSO a 20%) e um positivo

com Triton-X(Sigma-Aldrich) (0.1%, p/v) foram realizados. Depois de 60 min de incubação as células foram centrifugadas e o sobrenadante foi retirado e medida a absorbância a 540 nm. A atividade hemolítica foi expressa pela fórmula: Hemólise (%) = $[(As - Ab) / (Ac - Ab)] \times 100$, onde, Ab = absorbância no controle negativo, As = absorbância do teste; Ac = absorbância do controle positivo.

ANÁLISE FITOQUÍMICA

Os extratos foram avaliados quanto à composição fitoquímica por análise em tubo, foram pesquisados os seguintes metabolitos: fenóis, taninos, antocianidinas, antocianinas, flavonóides, leucoantocianidinas, catequinas, flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanóis, xantonas, saponinas, quinonas, esteróides e triterpenóides (MARCO et al., 2007).

DOSAGEM DE FENÓIS TOTAIS

O conteúdo fenólico total foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu, segundo Li et al. (2008), com algumas modificações. Diferentes concentrações de ácido gálico foram dissolvidas em metanol. Em cada tubo foi adicionado 1 mL do reagente de Folin diluído 1:10 (v/v) e 0,2 mL da amostra diluída na concentração 1 mg/mL em metanol. Após 3 minutos no escuro, 0,8 mL de carbonato de sódio a 7,5% (p/v) foi adicionado, deixando por mais 120 min no escuro a 25°C. Após esse período as absorbâncias a 765 nm foram lidas contra um branco (reagentes adicionado ao metanol ao invés da amostra) Uma curva de calibração de ácido gálico(concentrações entre 0 e 100 µg/mL) foi preparada através da representação gráfica da absorbância em função da concentração onde Y é a absorbância e X a concentração dos compostos diante disso foi encontrada a equação linear ($Y = 0.0121x + 0.032$, $R^2 = 0.9967$). A concentração de fenol total na amostra foi determinada a partir da curva de calibração. O teor total de fenol no extrato foi expresso em termos de equivalente de ácido gálico (mg EAG / g de extrato).

DOSAGEM DE FLAVONOIDES

A técnica colorimétrica com cloreto de alumínio descrita por Woisky e Salatino (1998), foi utilizada para estimativa de flavonóides, com algumas modificações. Diferentes concentrações de quercetina (concentrações entre 0 e 50 µg/mL) foram dissolvidas em metanol.

Em cada tubo foi adicionado 0,5 mL cloreto de alumínio (2 g diluído em 100mL de etano) e em seguida foi adicionado 0,5 mL da amostra. A mistura foi mantida em temperatura ambiente durante 60 min. A absorbância a 420 nm foi então lida. Foi então preparada através da representação gráfica da absorbância em função da concentração onde Y é a absorbância e X a concentração dos compostos foi preparada através da representação gráfica da absorbância em função da concentração e foi encontrada a equação linear ($y = 0.0486x + 0.0417$, $R^2 = 0,997$). A concentração de flavonóides foi determinada a partir da curva de calibração. O teor de flavonóides total no extrato foi expresso como equivalentes de quercetina (mg QE / mg de extrato), os extratos foram avaliados na concentração de 1 mg para todos os extratos.

HPLC

A identificação dos compostos fenólicos nas amostras foi determinado através de Cromatografia Líquida de Alta Performance (Agilen 1260 infinity) usando a coluna Zorbax SB (C18), 4,6 x 250 mm, 5 μ m, com temperatura de 30 °C. A separação cromatográfica foi realizada usando a fase móvel de gradiente: A (água acidificada) e B (acetona), 0-15 min = 92% de A e 8% de B, 16-30 min = 65% de A e 35% de B, com fluxo de 2,4 mL/min, usando detector UV à 280 nm, em um volume de injeção de 5 μ L.

Para preparação das curvas padrões as diluições (0,1 – 100 μ g/mL) foi preparada dissolvendo os compostos padrões puros (Sigma Aldrich): Ácido caféico, Ácido clorogênico, Ácido gálico, Ácido elágico, Ácido trans-ferúlico, Catequina, Quercitina e Rutina. A identificação de cada composto foi estabelecida por tempo de retenção e comparando o espectro UV dos picos obtidos com os previamente obtidos pela injeção dos padrões puros.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os experimentos foram realizados em triplicata, onde os resultados foram expressos em média e desvio padrão. As análises estatísticas, as concentrações que inibem 50% de atividade (CI50) e os gráficos foram executados pelo programa GraphPad PRISMA 5.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste estudo, foram utilizados diversos métodos para avaliação da atividade antioxidante. Os resultados obtidos estão apresentados na Figura 1 e os valores de IC50 estão

na Tabela 1. O extrato que apresentou melhor atividade foi o da *S. Pulcherrimum*, seguido do extrato da *A. Cochiliacarpus* e da *T. Cyrtathum*. O método de DPPH•, se baseia na capacidade de componentes dos extratos de transferir hidrogênio para o DPPH•, um radical livre, lipofílico e estável, ocasionando a mudança da coloração da solução de púrpura para amarelo. A atividade antioxidante de todos os extratos estudados foi mais eficaz do que as apresentadas pelos padrões utilizados (ácido gálico e BHT) no método de DPPH•.

Com o ABTS pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica; enquanto que o DPPH só pode ser dissolvido em meio orgânico.

O método inibição do ABTS tem habilidade de avaliar a atividade de compostos hidrofílicos e lipofílicos, enquanto o DPPH só pode verificar compostos dissolvidos em meio orgânico (KUKOSKI et al., 2005). No ABTS ocorre um decaimento da absorbância a 734 nm quando o radical é reduzido por algum composto antioxidante capaz de doar elétrons ou átomos (CHRISTODOULEAS et al., 2014). Os resultados obtidos neste ensaio não apresentaram uma diferença grande entre os extratos, se aproximando das leituras do padrão BHT e Trolox (Figura 2). As porcentagens máximas de inibição do radical ABTS foram observadas na concentração de 1000 µg/mL, na seguinte ordem: *A. Cochiliacarpus* < *T. Cyrtathum* < *S. Pulcherrimum*.

A Capacidade Antioxidante Total (CAT) é um ensaio que fundamenta-se na redução do complexo de molibdênio pela ação de uma substância antioxidante, gerando ao fim um fosfato com coloração verde com um máximo de absorção a 695 nm (Floegela et al., 2011). A maior CAT (%) foi exibida pelo extrato de *S. Pulcherrimum* (24,38% ± 2,75), seguida do extrato de *A. Cochiliacarpus* (22,56% ± 1,46), e o extrato de *T. Cyrtathum* (11,50% ± 1,60). Esses resultados são superiores aos padrões utilizados que foram o BHT (8,75% ± 2,33) e o ácido gálico (5,49% ± 0,98).

O método FRAP mede a capacidade de redução do complexo formado entre 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) e cloreto férrico hexa-hidrato (FeCl₃ • 6H₂O), quando na presença de algum composto antioxidante, havendo um aumento na absorbância devido à formação de íons ferrosos (OU et al., 2002). Os resultados obtidos no ensaio indicaram atividade dos três extratos, com significativa diferença entre a atividade de todos os extratos estudados tiveram atividade muito superior quando comparados com o controle BHT. Neste ensaio, destaca-se o extrato de *S. Pulcherrimum* o qual obteve valores mais de 2 vezes o equivalente em sulfato ferroso, em comparação com os resultados obtidos para o BHT.

Chanda e Dave, (2009) descreve o poder redutor como um potente método de análise da atividade antioxidante, constituindo-se como um ensaio de oxirredução. Neste ensaio, os

compostos com atividade antioxidante convertem o íon férrico (Fe^{3+}) para ferroso (Fe^{2+}), o que é verificado pelo aumento da absorbância a 700 nm (Jayanthi and P Lalitha.,2011). Os resultados estão apresentados na Figura 3. O maior poder redutor, na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, foi obtido no extrato de *S. Pulcherrimum* ($\text{OD}_{700} = 1.4 \pm 0,008$), seguido pelo extrato de *A. Cochiliacarpus* ($\text{OD}_{700} = 1,1 \pm 0,015$) e extrato de *T. Cyrtathum* ($\text{OD}_{700} = 0.890 \pm 0,017$). O extrato da *S. Pulcherrimum* apresentou um poder redutor muito próximo do obtido com o padrão utilizado, a quercetina ($\text{OD}_{700} = 1,5 \pm 0,014$).

A atividade antioxidante obtida nos extratos metanólicos das três plantas utilizadas comprovam a atividade antioxidante de espécies de plantas endêmicas da caatinga, onde a extração por solvente metanol foi capaz de extrair compostos, os quais obtiverem atividade antioxidante maiores que antioxidantes sintéticos conhecidos no mercado como BHT.

AVALIAÇÃO DA AÇÃO CITOTÓXICA E HEMOLÍTICA

O ensaio de MTT foi utilizado para avaliar a ação sobre o crescimento de células de hepatocarcinoma HepG2. Hepatocarcinoma é o principal tipo de câncer de fígado e as células HepG2 conseguem manter várias propriedades hepáticas, por isso, representam um excelente modelo celular para estudar a ação dos produtos naturais *in vitro* sobre as funções do fígado, como processos de detoxificação enzimática e metabolização de compostos (SADI et al., 2015).

A Figura 4 mostra o efeito dos extratos em três concentrações sobre a viabilidade das células de carcinoma após 24 horas. A inibição promovida pelos extratos sobre a proliferação celular foi significativamente mais baixa que o controle doxorrubicina após 24 horas, bem como indicam que os extratos não apresentaram atividade citotóxica relevante pois nenhum dos extratos teve atividade melhor que 50% (SUFFINESS; PEZZUTO, 1990).

Os ensaios para determinar a capacidade hemolítica sobre eritrócitos humanos mostraram que nas concentrações de 125 a 500 $\mu\text{g/mL}$ os três diferentes extratos causaram porcentagem de hemólise abaixo de 5%, como mostra a Figura 5. Os resultados mostram claramente que os extratos não causam alto grau de hemólise nas concentrações estudadas para atividade antioxidante.

Na busca por novas substâncias que tem promissora atividade farmacológica e que não causem efeitos nocivos para o corpo, ensaios investigando a capacidade dos produtos naturais de causar ação hemolítica, dissolvendo ou aumentando a permeabilidade da membrana celular dos eritrócitos, são amplamente usados (ARAÚJO et al., 2013).

CONTEÚDO FENÓIS TOTAIS E FLAVONÓIDES TOTAIS

No presente estudo, o conteúdo de fenóis totais dos extratos metanólicos das três plantas foram determinados pelo método de *Folin-Ciocalteu* e os resultados foram expressos como ácido gálico equivalentes por grama de extrato (EAG). O extrato de *S. Pulchferrium* teve o maior conteúdo de fenois totais ($112.72 \pm 10,28$ mg EAG/g extrato), seguido pelo extrato de *A. Cochliacarpus* (110.73 ± 13.23 mg EAG / g extrato) e *T. Cyrthathum* (97.13 ± 9.76 mg EAG/g extrato).

Compostos fenólicos são utilizados pelas plantas nos mecanismos de defesa contra herbivoria ou para atração para polinizadores, proteção UVA, defesa antimicrobiana, cicatrização (HARBONE; WILLIAMS, 2000; NACKZ, 2006; TAIZ; ZEIGER, 2006; ANITHA; KANIMOZHI, 2012). Os compostos fenólicos são conhecidos como componentes altamente efetivos antioxidantes e sequestradores de radicais livres, seus mecanismos de ação incluem: impedimento da oxidação de íons metálicos, eliminação de qualquer intermédio que possa causar oxidação, incluindo ROS, e inativação de enzimas pró-oxidantes (NACKZ; SHAHIDI, 2006). Devido a evidências consideráveis, o aumento do dano oxidativo está associado com o desenvolvimento da maior parte das principais doenças degenerativas relacionadas com o envelhecimento, tem-se especulado que os polifenóis podem ter efeitos protetores contra tais condições (TABART et al., 2009). Entretanto, devido a diversidade estrutural e mecanismos de reação, único ensaio antioxidante para compostos fenólicos não reflete com precisão todos os antioxidantes em um sistema misto ou complexo. Assim, o uso de ensaios antioxidantes diferentes pode ajudar a identificar variações na resposta dos extratos de plantas (TABART, 2009; CRISTIANE C., 2015).

O método colorimétrico do cloreto de alumínio foi utilizado para determinação do conteúdo de flavonóides totais, que se baseia na reação do cloreto de alumínio com grupos hidroxil ou ceto adjacentes das flavonas ou flavonols, gerando complexos ácido-estáveis, que tem uma absorção máxima em 415 nm. (DENARDIN et al., 2015). A maior quantidade de flavonóides foi verificada no extrato de *S. Pulchferrium* (28.96 ± 1.42 mg EQ/g extrato), seguido do extrato de *T. Cyrthathum* (25.35 ± 1.77 mg EQ/g extrato) e do *A. Cochliacarpus* (23.54 ± 1.22 mg EQ/g extrato).

Entre os polifenóis a subclasse mais estudados são os flavonoides (Gurib et al 2014). O ensaio comprovou a presença desses compostos entre os principais constituintes de *A. Couchiliacarpus*. Silva et al., (2010b), descreveu que espécies do gênero *Styphnodendron* são conhecidas pelo seu alto teor de taninos. Entretanto, o *T. Cyrthanthum* não detém de muitos

estudos na literatura porém também apresentou elevado teor de flavonoides, podendo estar diretamente relacionado com sua atividade antioxidante.

Para Silva et al. (2007), a biossíntese e a acumulação de fenóis em plantas é considerada como resposta evolutiva das vias bioquímicas por influências adaptativas a fatores ambientais desfavoráveis, como exposição a luz como um mecanismo de filtração contra radiação UV, pluviosidade, temperatura e salinidade. Esses aspectos tornam a região semi-árida da caatinga um ambiente favorável para a pesquisa de plantas com potencial antioxidante. *Screening* Fitoquímico e Análise HPLC dos principais componentes fenólicos dos extratos das três plantas, a análise fitoquímica dos extratos metanólicos indicou a presença de uma variedade de metabólitos secundários ativos, como saponinas, glicosídeos cardiotônicos, terpenóides, taninos nos três extratos testados como mostrado na tabela 3, entretanto, o grupo dos alcalóides não foi detectado em nenhum dos extratos a presença de antraquinona foi encontrada apenas no extrato de *T. Cyrthathum*.

A quantificação dos compostos fenólicos a partir do perfil cromatográfico foi obtido por HPLC. Os principais componentes identificados no extrato de *A. Cochliacarpus* foram ácido gálico (32.6µg/mg - Tr 1.81 min), rutina (13.6µg/mg - Tr 8.20 min), catequina (12.8 µg/mg - Tr 4.45 min), ácido trans-ferúlico (15 µg/mg - Tr 8.36 min) e quercetina (36 µg/mg - Tr 13.79 min). No extrato de *S. pulcherrimum*, os maiores componentes foram catequina (3.4 µg/mg - Tr 4.45 min), ácido caféico (70 µg/mg - Tr 5.44 min), rutina (0.7 µg/mg - Tr 8.20 min), ácido elágico (10 µg/mg - Tr 8.42 min) e quercetina (36 µg/mg - Tr 13.79 min). A partir do perfil cromatográfico do extrato de *T. Cyrthathum*, identificou-se apenas a presença de rutina (8 µg/mg - Tr 8.20 min).

O perfil preciso de constituintes ativos de espécies do gênero *Styphnodendrum* ainda não é totalmente conhecido. A prospecção fitoquímica qualitativa de *S. Rotundifolium* foi realizada, detectando a presença de taninos pirogálico, flavonas, flavonóis, flavonóis, xantonas, chalconas, flavonóis e esteróides como metabólitos secundários em espécie (OLIVEIRA et al., 2011).

No entanto, taninos e flavonóides podem ser considerados dentre as substâncias mais importantes, devido ao seu alto teor (OLIVEIRA et al., 2011). A análise por HPLC do extrato hidroalcoólico de *S. rotundifolium* revelou a presença de flavonóides (rutina e campferol), ácidos fenólicos (ácido caféico) e catequina (VANDESMET, 2015). Da mesma forma, nossos resultados do perfil HPLC de *S. Pulcherrimum* foram consistentes com os resultados dos pesquisadores acima, indicando que a presença destes fitoquímicos são comuns no gênero *Styphnodendrum*.

Taninos são metabólicos secundários descritos por estarem envolvidos em diversas atividades biológicas, como anti-câncer e atividades antioxidantes (JASSIM; NAJI, 2003; CARVALHO, 2006; GURIBFAKIM, 2006; NEUKAM et al., 2008). Todos os extratos apresentaram taninos na sua composição, sugerindo, portanto, um indício da origem da atividade antioxidante observada. Outras espécies do gênero *Styphnodendrum* apresentaram atividade antioxidante associada a taninos, corroborando os dados encontrados (LOPES et al., 2009).

Estudos fitoquímicos prévios realizados com extratos aquosos e metanólicos da casca e caule de *A. Cochliacarpus* revelaram a presença de saponinas, catequinas, taninos, fenóis e antraquinonas, porém alcalóides e esteróides/triterpenóides estavam ausentes (SILVA et al., 2009). Silva (2010), evidenciou o alto conteúdo de taninos condensados com catequinas como componentes majoritários nos extratos de extratos metanólicos da casca de *A. Cochliacarpus*.

As plantas conhecidas como "barbatimão" são comumente espécies do gênero *Stryphnodendron*, entretanto outras espécies como *Dimorphandra Mollis* e *Abarema Cochliacarpus* (SANTOS et al., 2002; SILVA et al., 2006, 2009). São conhecidas também como "barbatimão" e popularmente usadas para tratar as mesmas doenças. Em muitos casos, produtos comerciais feitos com as cascas de *Stryphnodendron Adstringens* são adulteradas com estas outras espécies devido a características botânicas em comum como indumentum dos ramos (SANTOS et al., 2002; IGANCI; MORIN, 2012). Assim, estudos sobre a composição química destas espécies são fundamentais para diferenciá-las e definir um perfil de atividade biológica para cada uma.

Foi observada também a presença de ácido gálico em dois dos extratos analisados. Estudos mostram que dentre todos os ácidos hidrobenczoicos presentes nos produtos naturais, o ácido gálico é o que apresenta maior efetividade na inativação de radicais livres, como ABTS. (YEN et al., 2006). A presença do ácido t-ferúlico nos os extratos também pode estar relacionada com a atividade antioxidante presente nos extratos testados. Estudos relatam que até mesmo em concentrações muito baixas o ácido ferúlico age como sequestrante de radicais livres (HSIEH et al., 2005).

As catequinas são abundantes nas cascas das espécies da família Mimosaceae (SANTOS et al., 2002). Catequinas possuem atividade antioxidante pela eliminação de radicais livres, inibindo fatores de transcrição ativos redox, inibindo enzimas pró-oxidantes, e induzindo enzimas antioxidantes, por isso podem exercer efeitos protetores vasculares através de vários mecanismos, incluindo anti-inflamatório, anti-hipertensivos, anti-trombogênico, e controle lipêmico (KURITA-OCHIAI et al., 2015).

Quercetina e rutina são flavonoides presentes em plantas e alimentos com potencial antioxidante por bloquear a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e proteger contra peroxidação lipídica. Além disso, vários estudos têm investigado suas ações em vias bioquímicas para proteger contra citotoxicidade (COSTA, 2016). Nossas análises também revelaram a presença de ácido caféico e ácido elágico, que fazem parte do grupo dos ácidos fenólicos e exibem uma forte atividade antioxidante *in vitro* (BOGUCKA-KOCKA, 2016).

Desta forma é possível sugerir a associação da atividade antioxidante com os compostos identificados por análise do HPLC. As atividades antioxidantes vistas nos extratos estão ligadas aos metabolitos secundários que podem estar presentes majoritariamente como ocorreu nos extratos SP e AC ou até mesmo um sinergismo entre a mistura de compostos minoritários como o que ocorre no extrato TC.

CONCLUSÕES

Nossas descobertas mostraram que os extratos apresentaram potencial atividade antioxidante, equiparando-se aos controles ou em alguns testes os superando, podendo ser consideradas como promissoras fontes de antioxidantes. Portanto, faz-se necessárias investigações futuras que visem identificar frações, para obtenção dos compostos purificados de cada extrato para analisar qual ou quais são responsáveis por esta bioatividade. Nossos resultados dão suporte para comprovação científica e utilização medicinal da plantas da caatinga, ajudando para a viabilidade e padronização de um potencial produto biotecnológico a ser aplicado nas indústrias de cosméticos, farmacêutica e alimentos.

REFERÊNCIAS

- Agra, M.F., Silva, K.N., Basilio, I.J.L.D., Freitas, P.F., Barbosa-Filho, J.M., 2008. Survey of medicinal plants used in the region northeast of Brazil. **Braz J Pharma** 18, 472–508.
- Albuquerque U.P, Muniz de Medeiros P, Almeida A.L, Monteiro J.M, Machado de Freitas Lins Neto, Gomes de Melo J, dos Santos JP.,2007. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **J Ethnopharmacol** 114 325–354.
- 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.,1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, vol 48, pp. 589- 601.

Anitha, R.; Kanimozhi, S.,2012. Pharmacognostic Evaluation of *Alternanthera Sessilis* (L.) **R.Br.ex.DC.** Phcog J , v. 4, p. 31-34.

Araújo L.C.C, Aguiar J.S, Napoleão T.H, Mota F.V.B, Barros A.L.S., 2013. **Evaluation of Cytotoxic and Anti-Inflammatory Activities of Extracts and Lectins from Moringa oleifera Seeds.** PLoS ONE 8(12): e81973. doi:10.1371/journal.pone.0081973).

Benzie IFF, Strain JJ.,1996 The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of “Antioxidant Power”: The FRAP Assay. **Anal Bioch.** Volume 239, Issue 1, 15 July 1996, Pages 70–76

Blois, MS.,1958. **Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical.** Nature 181:1199-1200 (26 April 1958); doi:10.1038/1811199a0.

Bogucka-Kocka A. , Zidorn C., Kasprzycka M., Szymczak G., Szewczyk K.,2016. **Phenolic acid content, antioxidant and cytotoxic activities of four Kalanchoe” species.** Saudi J Biol Sci, <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.01.037>.

CARVALHO J.E.,2006. Atividade Antiulcerogênica e Anticâncer de Produtos Naturais e de Síntese. **Construindo a História dos Produtos Naturais**, v 7, p 1-18.

Chanda S,Dave R.,2009.In vitro models for antioxidant activity evaluation and some medicinal plants possessing antioxidant properties: **An overview.** Afr. J. Microbiol. Res. 3(13):981-996.

Christodouleas D.C , Fotakis C., Nikokavoura A., Papadopoulos K, Calokerinos A.C.,2014. Modified DPPH and ABTS Assays to Assess the Antioxidant Profile of Untreated Oils. **Food Anal Method**, p.1-9.

Costa, S.L , Silva, V.D.A, Souza, C.S, Santos, C.C, Paris, I, Muñoz, P.,2016. Segura-Aguilar, J. Impact of Plant-Derived Flavonoids on Neurodegenerative Diseases. **Neurotox Res.**

Denardin C.C. , Hirsch G.E , Rocha R.F , Vizzotto, M, Henriques,A.T , Moreira J.C.F ,Guma F.T.C.R , Emanuelli T.,2015. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits, **J Food Drug Anal**, Volume 23, Issue 3, September , Pages 387-398

Fankam, A.G, Kuiate, J.R , Kuete ,V.,2014.Antibacterial activities of *Beilschmiedia obscura* and six other Cameroonian medicinal plants against multi-drug resistant Gram-negative phenotypes, **BMC Comple Alternative Med.**, 1

FAZOLIN M.,ESTRELA J.L.V ,CATANI V. ,ALÉCIO M.R, LIMA M.S.,2007. Atividade inseticida do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. & K. Shum (Bignoneaceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motsch. (Coleoptera: Curculionidae). **Acta Amaz.** [online]. vol.37, n.4

Floegela A., Kimb D, Chung S., Kooa S.I, Chuna O.K., 2011. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure Antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **J Food Compo Anal.**24:1043–8.

GURIB-FAKIM, A.,2006. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Mol Aspects Med**, v 27, p 1-93.

HARBORNE, B. J.; WILLIAMS, A. C. Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochemistry**. v. 55, p. 481-504, 2000

Hsieh CL, Yen GC, Chen HY.,2005. Antioxidant activities of phenolic acids on ultraviolet radiation-induced erythrocyte and low density lipoprotein oxidation. **J Agr Food Chem**, v. 53, p. 6151-6155.

Hua-Bin Li, Chi-Chun Wong, Ka-Wing Cheng, Feng Chen.,2008. Antioxidant properties in vitro and total phenolic contents in metanol extracts from medicinal plants. **LWT**. 41:385–390

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Brazilian Institute of Geography And Statistics), 2016. Disponível em: <http://ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/20152004biomashtml.shtm>. Acesso em: 13 de mai. de 2020.

Iganci, J.R.V. & Morim, M.P. 2012. Abarema (Fabaceae, Mimosoideae) in the Atlantic Domain, Brazilian. **Bot J Linn Soc** 168: 473.

J.R.V. & Morim, M.P. 2012. Abarema (Fabaceae, Mimosoideae) in the Atlantic Domain, Brazilian. **Bot J Linn Soc** 168: 473.

JASSIM, S.A.A.; NAJI, M.A.,2003. Novel antiviral agents: a medicinal plant perspective. **J Appl Microbiol**, v 95, p 412–427

JAYANTHI AND P. LALITHA.,2011. REDUCING POWER OF THE SOLVENT EXTRACTS OF EICHHORNIA CRASSIPES (MART.) SOLMS. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**; Vol 3, Suppl 3.

Kurita-Ochiai, Tomoko, Jia, Ru, Cai, Yu, Yohei Yamaguchi and Masafumi Yamamoto, 2015. **Periodontal Disease-Induced Atherosclerosis and Oxidative Stress**. Antioxidants 4 (3), 577-590; doi:10.3390/antiox4030577.

Lai, L.-S., Chang, P.-C., & Chang, C.-T.,2008. Isolation and characterization of superoxide dismutase from wheat seedlings. **J Agric Food Chem**, 56(17), 8121–8129.

Leal Inara .R, Tabarelli M, Silva J.M.C., 2003. **Ecologia e conservação da Caatinga**. Recife (Brazil): Editora Universitária – Universidade Federal de Pernambuco; 806 p.

Lopes, G.C., Sanches, A.C.C, Nakamura, C.V., Dias Filho, B.P., Hernandez, L, Mello, J.C.P., 2005. Influence of extracts of Stryphnodendron polyphyllum Mart and Stryphnodendron obovatum Benth. on the cicatrization of cutaneous wounds in rats. **J Ethnopharmacol**. 99, 265–272.

Lopes G.C ; Sanches A.C.C; Toledo C.E.M ; Isler, A.C ; Mello,J.C.P.,2009. Determinação quantitativa de taninos em três espécies de Stryphnodendron por cromatografia líquida de alta eficiência. **Braz J Pharma Sci** vol. 45, n. 1, jan./mar.

Luize, P.S., Tiuman, T.S., Morello, L.G., Maza, P.K., Ueda-Nakamura, T., Dias-Filho, B.P., Cortez, D.A.G., Mello, J.C.P., Nakamura, C.V., 2005. Effects of medicinal extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Braz. J. Pharma. Science**. 41, 1–10.

MARCO, C.A.; INECO, R.; MATTOS, S. H.; BORGES, N.S.S.; NAGAO, E. O., 2007. Características do óleo essencial de capim-citronela em função de espaçamento, altura e época de corte. **Hort Bras**, v.25, p.429-32.

Monteiro D., Ramalho M., 2010. Abelhas Generalistas (Meliponina) e o Sucesso Reprodutivo de *Stryphnodendron pulcherrimum* (Fabales: Mimosaceae) com Florada em Massa na Mata Atlântica, BA. **Neotrop Entomol** 39 (4):519-526.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods**, vol. 65, n. 1-2, pp. 55–63.

Nacz M, Shahidi F., 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. **J Pharma Biomed Anal**. 41:1523–42

Nazareno A.G, Carlsen M, Lohmann L.G., 2015 Complete Chloroplast Genome of *Tanaecium tetragonolobum*: The First Bignoniaceae Plastome. **PLoS ONE** 10 (6): e0129930.

Neukam K., Pastor, N., Cortés, F., 2008. Tea flavanols inhibit cell growth and DNA topoisomerase II activity and induce endoreduplication in cultured Chinese hamster cells. **Mutat Res**, v 654, p 8–12.

Oliveira, D.R., Brito, F.E., Bento, E.B., Matias, E.F.F., Sousa, A.C.A., Costa, J.G.M., Coutinho, H.D.M., Kerntopf, M.R., Menezes, I.R.A., 2011. Antibacterial and modulatory effect of *Stryphnodendron rotundifolium*. **Pharm. Biol.** 49, 1265–1270.

Ou B, Huang D, Hampsch-Woodill M, Flanagan J.A, Deemer E.K., 2002. Analysis of antioxidant activities of common vegetables employing oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP) assays: a comparative study. **J Agr Food Chem**, v. 50, n. 11, p. 3122-3128.

Passos, D.C, Mesquita P.C.M.D & Diva Maria Borge-Nojosa., 2016. Diversity and seasonal dynamic of a lizard assemblage in a Neotropical semiarid habitat, **Stud Neotrop Fauna E**.

Pham-Huy, Ai L., He H, and Pham-Huy C., 2008. Free Radicals, Antioxidants in Disease and Health. **Int J Biomed Sci**. Jun; 4(2): 89–96.

Pietro P, Pineda M, Aguilar M., 1999. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Anal Bioch**. Volume 269, Issue 2, 1 May .Pages 337–341.

Pimentel F.A; Cardoso M.G; Batista L.R; Guimarães, L.G.L ; Silva, D.M., 2010. Ação fungitóxica do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. e K. Shum sobre o *Aspergillus flavus* isolado da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*). **Acta Amaz**. [online]. vol.40, n.1

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C.,1999 Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic Biol Med**, Volume 26, Issues 9–10, May , Pages 1231–1237

Ribeiro T.G, Nascimento A.M, Henriques B.O, Chávez-Fumagalli M.A, Franca J.R, Duarte M.C, Lage P.S, Andrade P.H, Lage D.P, Rodrigues L.B, Costa L.E, Martins V.T, Faraco A.A, Coelho E.A, Castilho R.O.,2015. Antileishmanial activity of standardized fractions of *Stryphnodendron obovatum* (Barbatimão) extract and constituent compounds. **J Ethnopharmacol**, 165 238–242.

Rodrigues F.A, Bomfim Ida S, Cavalcanti B.C, Pessoa C, Goncalves R.S, Wardell J.L, Wardell S.M, de Souza M.V.,2014. Mefloquine–Oxazolidine Derivatives: A New Class of Anticancer Agents. **Chem Biol & Drug Des**, vol. 83, pp. 126–131.

Sadi G, Emsen B, Kaya A, Kocabaş A, Çınar S, Kartal Dİ.,2015. Cytotoxicity of some edible mushrooms extracts over liver hepatocellular carcinoma cells in conjunction with their antioxidant and antibacterial properties. **Pharmacogn Mag**. 11(Suppl 1):S6-S18.

Santos, S.C., Costa, W.F., Ribeiro, J.P., Guimarães, D.O., Ferreira, H.D., Seraphin,J.C., 2002. Tannin composition of barbatimao species. **Fitoterapia** 73, 292–299.

Santos, A.L.S., 2008. **Interação de comunidades rurais com recursos vegetais: o caso dos remanescentes de floresta estacional do município de Junqueiro (ALBRASIL)**, PhD Thesis, Federal University of Pernambuco, Recife, 133 f.

Silva E.M, Souza J.N.S, Rogez, Rees J.F, Larondelle Y.,2007 Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazon region. **Food Chem.**, 101 pp. 1012–1018.

Silva, N.C.B., Esquibel, M.A., Alves, I.M., Velozo, E.S., Almeida, M.Z., Santos, J.E.S., Campos-Buzzi, F., Meira, A.V., Cechinel-Filho, V., 2009. Antinociceptive effects of *Abarema cochliacarpus* (B.A. Gomes) Barneby & J.W. Grimes (Mimosaceae). **Braz J Pharma** 19, 46–50.

Silva M.S, Sánchez-Fidalgo S, Talero E, Cárdeno A, da Silva M.A, Villegas W, Souza Brito A.R, de La Lastra C.A., 2010. Anti-inflammatory intestinal activity of *Abarema cochliacarpus* (Gomes) Barneby & Grimes in TNBS colitis model. **J Ethnopharmacol** 128 (2010) 467–475.

SILVA, L. A. F.; EURIDES, D.; PAULA, J. R.; LIMA, C. R. O.; MOURA, M. I., **Caracterização dos metabólitos secundários do barbatimão. Manual do Barbatimão**. Goiânia: Kelps, 2010. cap.7, p.61-68.B.

SILVA, M. L. C, Costa,R.S , Santana, A.S , Koblitiz, M.G.B, . Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010. C

Souza, T.M., Severi, J.A., Silva, V.Y.A., Santos, E., Pietro, R.C.L., 2007. Bioprospection of antioxidant and antimicrobial activities in the bark of *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae–Mimosoideae). **Rev Cienc Farm Basc Apli** 28, 221–226.

- Stratil P, Klejdus B, Kuban V.,2006. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables – evaluation of spectrophotometric methods. **J Agric Food Chem**, 54:607–616.
- Suffiness, M., Pezzuto, J., 1990. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann, K. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity*. Academic Press, London, pp. 71–133.
- Tabart J, Kevers C, Pincemail J, Defraigne J, Dommes J.,2009. Comparative antioxidant capacities of phenolic compounds measured by various tests. **Food Chem**.113:1226;1233.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. São Paulo: Editora Artmed, 2006. 322 p.
- Vandesmet V.C.S, Felipe C.F.B, Kerntopf M.R, Rolón M.,Vega C., Coronel C., Barbosa A.G.R, Coutinho H.D.M, Menezes I.R.A.,2015. **The use of herbs against neglected diseases: Evaluation of in vitro leishmanicidal and trypanocidal activity of *Stryphnodendron rotundifolium* Mart.** Saudi J Biol Sci <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.03.001>.
- Werneck F.P., 2011. The diversification of eastern South American open vegetation biomes: historical biogeography and perspectives. **Quaternary Sci Rev**. 30:1630–1648.
- Woisky RG & Salatino A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control.,1998. **J Apic Res**. Volume 37, Issue 2, pages 99-105.
- YEH, C. T.; YEN, G. C.,2003. Effects of phenolics acids on human phenolsulfotransferases in relation to their antioxidant activity. **J Agr Food Chem**, v. 51, p. 1474-1479.
- Yen, G. C.; Chen, H. Y.; J. Agric. **Food Chem**. 1995, 67, 415

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade antioxidante dos extratos metanólicos de *S. Pulcherrimum*, *A.Couchiliacarpos* e *T.Cyrthathum* pelos métodos *in vitro* de DPPH , ABTS e FRAP.

Método	SP	AC	TC	Ácido Gálico	BHT
DPPH (IC ₅₀ - µg/mL)	0.457 ± 0,03	0.596 ± 0,04	1,162 ± 0,07	8,654 ± 7,90	35,04 ± 2,2
ABTS (IC ₅₀ - µg/mL)	244.2 ± 2.2	281,1± 3,5	258,1± 5,60	250±7,2 (Trolox)	1366±89,0
FRAP (mg EFeSO ₄ / g extrato)	850,89	489,87	477,78	--	329,8 ± 49,1

Legenda: Resultados apresentados em média e desvio padrão. SP - *S. pulcherrimum*, AC - *A. cochiliacarpos*, TC - *T. cyrthathum* e BHT – Butil-hidroxi-tuoleno.

Tabela 2 – Absorbâncias dos extratos de *S.pulcherrimum* e *A.cochliacarpus* e *T.Cyrthathum* , para a avaliação de RP.

Extratos/Concentrações	500µg	250µg	125µg
S. Pulcherrimum	1.4±0.020	1.1±0.1	1.050±0.038
A. Couchiliacarpus	1.1±0.034	1.0±0.052	0.9±0.054
T. Cyrthathum	0.89±0.022	0.820±0.019	0.780±0.039
Quercitina(P)	1.5±0.043	1.2±0.06	1.1±0.02

Fonte: Nascimento Junior e col. (2020).

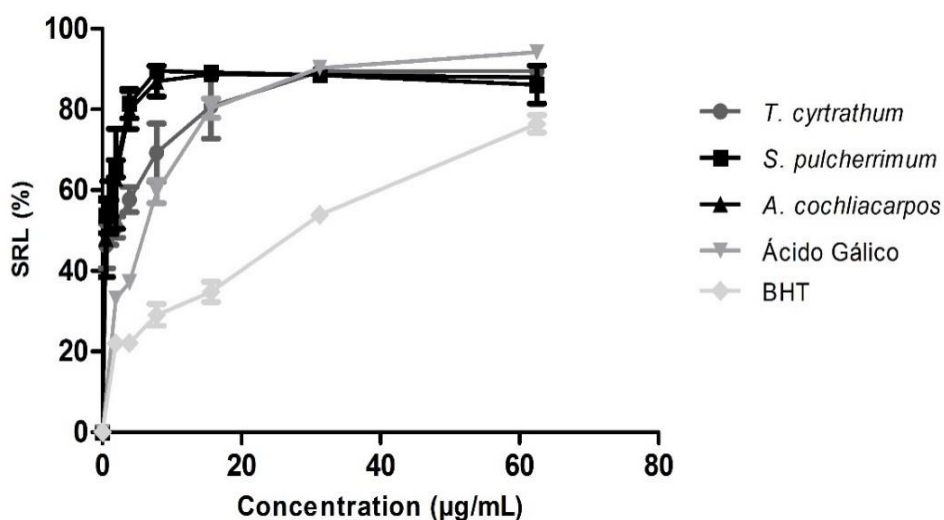
Tabela 3 – Classes de metabólitos secundários avaliadas nos extratos vegetais.

Secondary Metabolites	<i>T. cyrthathum</i>	<i>S. pulcherrimum</i>	<i>A. cochliacarpus</i>
Alkaloids	-	-	-
Saponins	+	+	+
Cardiac glucose	+	+	+
Terpenoids	+	+	+
Pholabatannis	+	-	+
Tannins	+	+	+
Anthraquinones	+	-	-

Legenda: Resultados expressos em presença (+) e ausência (-) do metabólito.

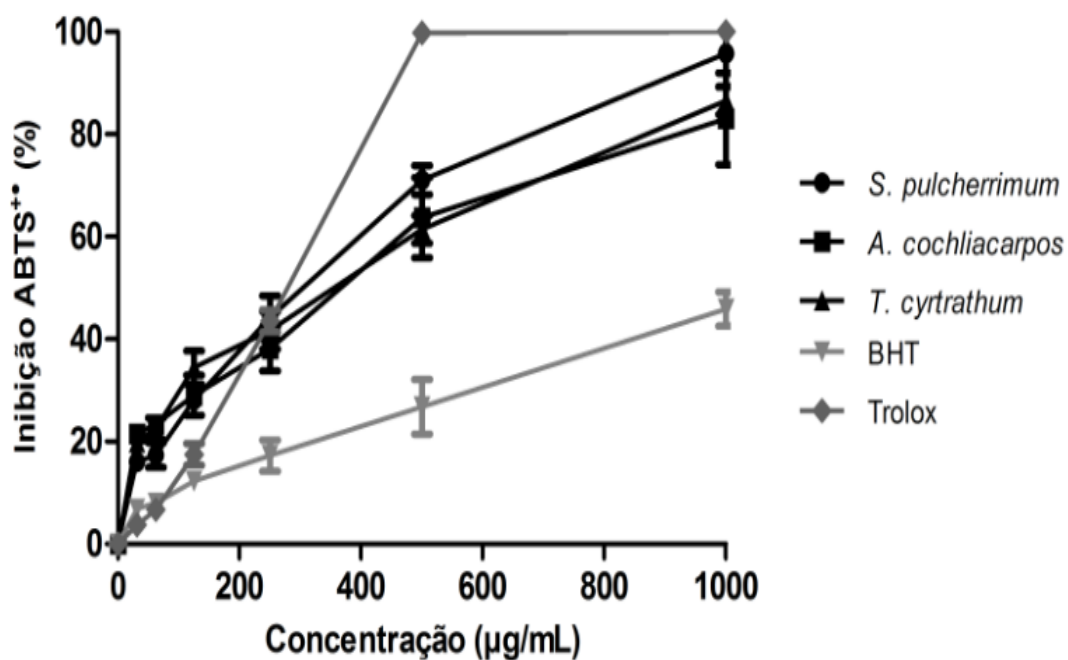
LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Gráfico de concentração x sequestro de radicais livres DPPH para os extratos de *T.cyrthathum*, *S.pulcherrimum* e *A.cochliacarpus*.



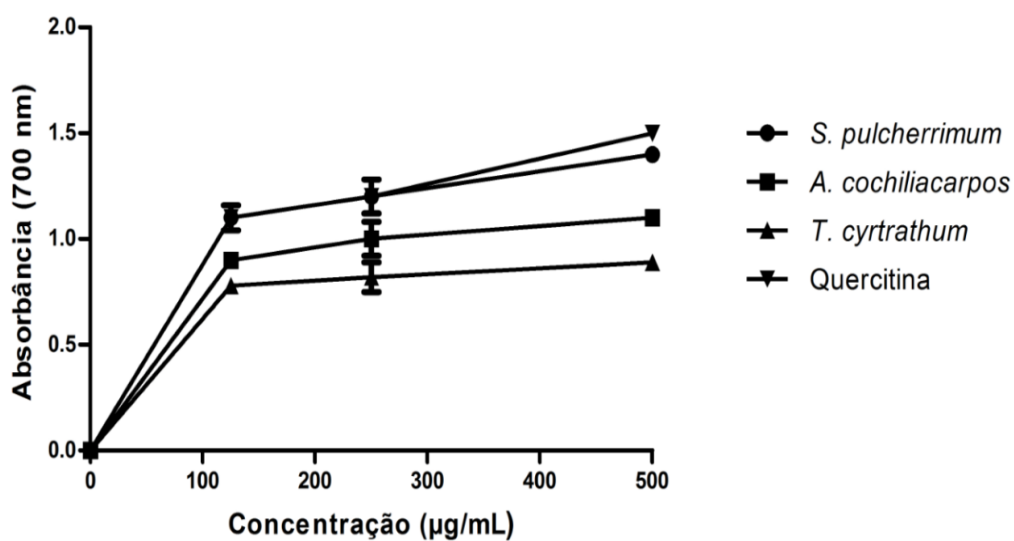
Fonte: Nascimento Junior e col. (2020).

Figura 2 – Gráfico de concentração x Inibição do Radical ABTS para os extratos de *t.Cyrtrathum*, *S.Pulcherrimum* e *A.Cochliacarpus*.



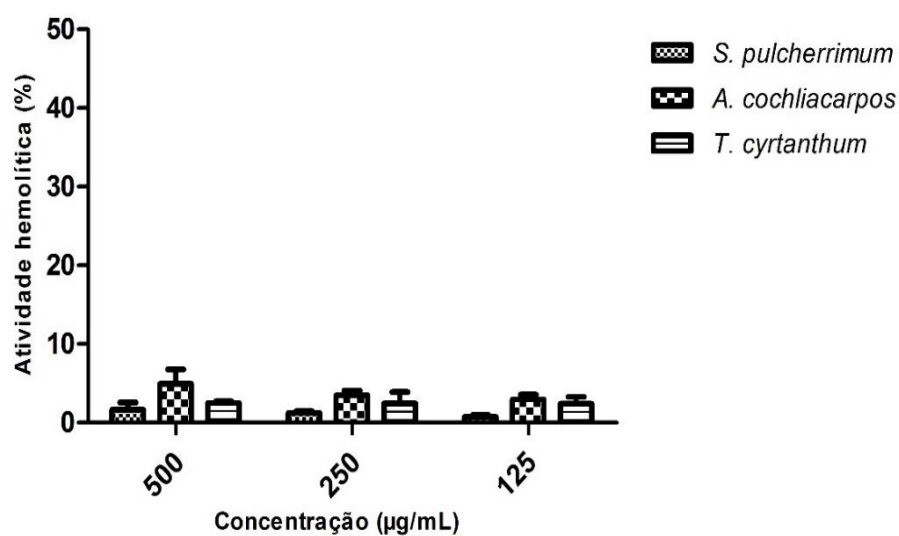
Fonte: Nascimento Junior e col. (2020).

Figura 3 – Gráfico de concentração x Absorbância(Reduction Power) para os extratos de *T.Cyrtrathum*, *S.Pulcherrimum* e *A.Cochliacarpus*.



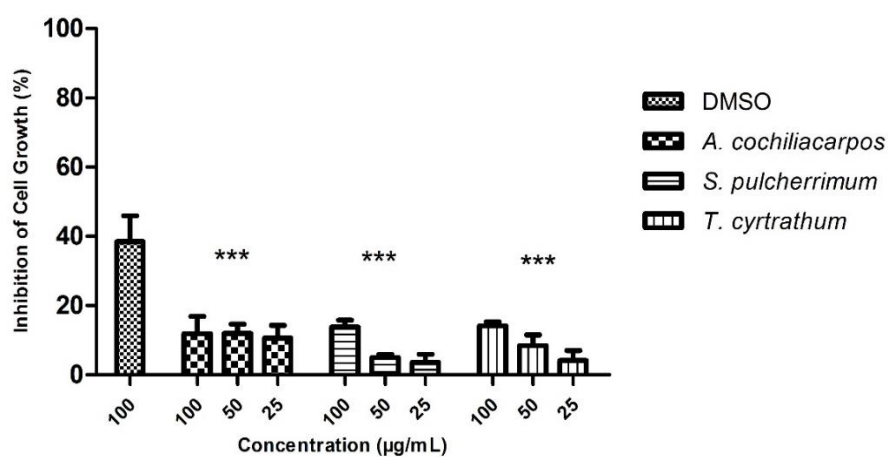
Fonte: Nascimento Junior e col. (2020).

Figura 4 – Atividades Hemolítica em Diferentes concentrações dos Extratos, SP, AC e TC.



Fonte: Nascimento Junior e col. (2020).

Figura 5 –Atividades Inibição de células HEPG2 em Diferentes concentrações dos Extratos, SP, AC e TC.



Fonte: Nascimento Junior e col. (2020).

3.4 ARTIGO 4 – CARACTERIZAÇÃO FÚNGICA E FORMAÇÃO DE BIOFILME EM ÉGUAS COM ENDOMETRITE

Fungal characterization and biofilm formation in mares with endometritis

José Adelson Alves do Nascimento JÚNIOR¹, Emanuel Felipe de OLIVEIRA FILHO¹, Maria Tereza dos Santos CORREIA¹, Gustavo Ferrer CARNEIRO^{2*}.

¹Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFPE, Recife, PE Brasil;

²Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE, Departamento de Medicina Veterinária-DMV. Rua Dom Manoel de Medeiros, S/N, Dois Irmãos, Recife-PE, Brasil.

E-mail: carneirogustavo1@gmail.com

RESUMO

A endometrite é a principal causa de infertilidade em éguas, além de gerar grandes transtornos econômicos e produtivos. Objetivou-se caracterizar a citologia, cultura microbiológica e fúngica, além da identificação da formação de biofilme em éguas com endometrite. Amostras de setenta éguas foram coletadas para citologia uterina e exame microbiológico. A determinação da formação de biofilme foi realizada através da técnica de cristal violeta. Das setenta éguas diagnosticadas com endometrite 43 (61,4%) apresentaram infecção bacteriana e/ou fúngica. Das 43 éguas, 30,2% (13/43) apresentaram infecção fúngica, os mais evidenciados foram *Aspergillus spp* e *Candida albicans*, *Curvalaria spp*, *Cladosporium spp* e *Zygomices spp*. Dos fungos identificados, 9/13 (69,2%) formaram biofilme. Esses resultados revelam números de infecção fúngica acima da média em comparação com a literatura. Várias causas são reportadas ao aumento dos casos de endometrite fúngica, dentre elas o aumento no uso das biotecnologias reprodutivas (exemplo: transferência de embriões). É de suma importância a identificação do agente, o conhecimento da suscetibilidade farmacológica e a comprovação da produção de biofilme em casos de endometrite, estas ferramentas podem fornecer subsídios ainda mais importantes para melhorar a eficiência reprodutiva e sanitária dos rebanhos equinos.

Palavras-chave: equino, bactéria, biofilme, endometrite, fungo.

ABSTRACT

Endometritis is the main cause of infertility in mares, besides generating major economic and productive disorders. The objective was to characterize the cytology, microbiological and fungal culture, as well as the identification of biofilm formation in mares with endometritis. Samples of seventy mares were collected for uterine cytology and microbiological examination. The determination of biofilm formation was performed using the violet crystal technique. Of

the seventy mares diagnosed with endometritis 43 (61.4%) presented bacterial and / or fungal infection. Of the 43 mares, 30.2% (13/43) presented fungal infection, the most evidenced were *Aspergillus spp* and *Candida albicans*, *Curvalaria spp*, *Cladosporium spp* and *Zygomices spp*. Of the identified fungi, 9/13 (69.2%) formed biofilm. These results reveal above average numbers of fungal infection compared to the literature. Several causes are related to the increase in cases of fungal endometritis, among them the increase in the use of reproductive biotechnologies (example: embryo transfer). Identification of the agent, knowledge of pharmacological susceptibility and evidence of biofilm production in endometritis cases are extremely important. These tools can provide even more important subsidies to improve the reproductive and sanitary efficiency of equine herds.

Keywords: equine, bacterium, biofilm, endometritis, fungus.

INTRODUÇÃO

A espécie equina possui várias particularidades em comparação a outras espécies. Com relação a características reprodutivas, na maioria das espécies domésticas o sêmen é depositado na vagina e os espermatozoides se direcionam ao útero. Já nos equinos devido às peculiaridades anatômicas da cérvix, os espermatozoides e demais componentes do sêmen são depositados no interior do útero. Este fato, torna a ocorrência das endometrites tão comuns (TRAUB-DARGATZ et al., 1991).

A endometrite é uma inflamação do endométrio que pode ser caracterizada de forma aguda, crônica, crônica degenerativa ou até induzida pós-cobertura. As endometrites são uma das principais causas de infertilidade na espécie e reprodução equina (Leblanc, 2010). Esta enfermidade surge devido a contaminação do aparelho reprodutivo por microrganismos, em especial os bacterianos, considerados em sua maior parte como agentes patogênicos oportunistas, porém alguns fungos podem ser potencialmente patogênicos (LEBLANC, 2008; WITTENBRINK, 2012). A enfermidade pode ainda estar associadas a fatores ligados a falhas nos mecanismos de defesa uterina, diminuindo o potencial da fertilidade na fêmea (TROEDSSON, 2011). Mattos et al. (2003), ressalta que as endometrites de uma forma geral, causam relevantes prejuízos na reprodução de equinos por acarretarem baixa fertilidade, morte embrionária e abortos.

Segundo Frontoso et al. (2008), em endometrites fúngicas, os fungos comumente isolados são *Candida* spp. por assim dizer como os fungos filamentosos dos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor* e *Trichosporon* (AMARAL et al., 2007).

Desta forma, a fim de elucidar a importância de enfermidade reprodutivas como a endometrite e seus agentes etiológicos, objetivou-se caracterizar a citologia e cultura microbiológica e fúngica, além da identificação da formação de biofilme em éguas com endometrite.

MATERIAL e MÉTODO

ASPECTOS ÉTICOS E BIOSSEGURANÇA

Os procedimentos desta pesquisa foram encaminhados para a Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural de Pernambuco, obtendo a licença de número.

COLETA DE AMOSTRAS E PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

Foram examinadas 70 éguas por palpação retal e ultrassonografia após pelo menos 3 inseminações artificiais sem prenhez diagnosticada ou 3 coletas negativas de transferência de embriões. As amostras foram coletadas para citologia uterina e exame microbiológico. Na coleta, foi utilizado *swab* coletor estéril acoplado a escova ginecológica (PROVAR®) para cada animal. Posteriormente, as amostras foram fixadas em metanol por 10 minutos em lâminas com os *swabs* sendo acondicionados em tubos contendo meio de transporte (PBS), imediatamente lacrados, identificados e encaminhados ao Laboratório de Reprodução Animal (LABRAPE - UFRPE/UAG) para posterior processamento e análise.

METODOLOGIA BIOFILME LEVEDURA

A formação do biofilme foi avaliada por metodologia com adaptada (3, 10, 19). Avaliada por métodos visuais e espectrofotométricos. O caldo utilizado foi o *Sabouraud dextrose* (SBD) suplementado com 60 g de glicose por litro (concentração final de glicose, 80 g / litro ou 8%). Organismos foram cultivados por 24 horas a 35 ° C. Utilizou-se uma cepa ATCC como controles em cada teste. A turbidez de cada suspensão foi ajustada para o equivalente de 3×10^7 CFU / ml com SDB, por leituras espectrofotométricas. Sendo inoculado

a suspensão em tubo Falcon contendo 9 ml de *Agar Sabourand*. Posteriormente cada poço de placas de microtitulação foi inoculado com alíquotas de 20µl de suspensão de levedura e 180µl de SDB. O material foi incubado a 35 °C durante 24 h sem agitação. Observando que todos os isolados de *Cândida* testados cresceram bem neste meio. Nas placas de microtitulação, os isolados de *Cândida* cultivados em *Sabourand* tiveram valores de > 1,0 às 24 h para todas as espécies com um inóculo inicial de 10⁶ CFU / ml. Após 24 h de incubação, o caldo foi retirado por aspiração e os tubos foram lavados uma vez com água destilada. As células de meios e leveduras foram descartadas. Como é classificado por Pfaller et al. (2019), o biofilme que ficou aderido foi classificado como negativa, fraco (1+), moderado (2++ ou 3+++), ou fortemente (4++++). Cada isolado foi avaliado em triplicata de dias diferentes. As leituras espectrofotométricas foram realizadas a 405 nm com leitor de placa de microtitulação, Como a porcentagem de transmitância (% T) estava sendo medida, um comprimento de onda de 405 nm foi selecionado para leitura das placas para minimizar a absorbância (7). O valor de % de Transmitância para cada amostra de teste foi subtraído do valor de % T para o reagente em branco para obter uma medida da quantidade de luz bloqueada ao passar pelos poços (% T bloc). A produção de biofilme de cada isolado foi classificada como negativo (% T bloc, 5), 1 (% T bloc, 5 a 20), 2 (% T bloc, 20 a 35), 3 (% T bloc, 35 a 50), ou 4 (% T bloc, 50). Cada isolado foi testado pelo menos duas vezes. Nenhuma grande discrepância ocorreu entre os resultados obtidos pelo método de leitura visual e aqueles obtidos pelo método espectrofotométrico.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Empregou-se a técnica de estatística descritiva por meio da distribuição das frequências relativa e absoluta para os achados microbiológicos e fúngicos, identificação dos agentes assim como para a formação de biofilme.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 70 éguas diagnosticadas com endometrite 43 (61,4%) apresentaram infecção bacteriana e/ou fúngica. Dessas, 30,2% (13/43) apresentaram infecção fúngica, e dentre os fungos mais evidenciados foram encontrado o *Aspergillus spp.* e *Candida albicans*, que são descritos como agentes altamente virulentos e formadores de biofilme, seguido de *Curvalaria*

spp, *Cladosporium spp* e *Zygomices spp*. Dos fungos identificados, 9/13 (69,2%) formaram biofilme e foram observados alguns microrganismos (Tab. 1).

Tabela 1: Microrganismo encontrados e a produção de biofilme das 70 éguas.

Microrganismo	Produção de Biofilme
Aspergillus	Neg
C.albicans	P+++
Zygomices sp.	P+++
Aspergillus	P++
Curvalaria spp	Neg
Curvalaria spp	Neg
N identificado	Neg
C.albicans	P+++
C.albicans	P++++
Curvalaria spp	P+
C.albicans	P++++
C.albicans	P++++
Aspergillus	P++++

Neg (Negativo); P(positivo), fraco (1+), moderado (2++ ou 3+++), ou fortemente (4++++).

A infecção fúngica nas éguas, podem estar relacionadas com diversos fatores, dentre eles uma maior exposição das fêmeas à colonização fúngica em decorrência da intensa manipulação do trato reprodutivo, tratamento intrauterinos, uso prolongado de hormônios (progesterona e corticoides), enfermidades cervicais e contaminação fecal. Estas possibilidades já foram descritas pela literatura por vários autores (ALVARENGA, 2008; LEBLANC, 2008; LIU E TROEDSSON, 2008). Outro fator predisponente é a associação da enfermidade com antibioticoterapia uterina, pneumovagina/uovagina e grande quantidade de fluido intrauterino, como relatado por (STOUT, 2008).

Segundo Fumuso et al. (2007), uma grande parte das endometrites de origem fúngica tem caráter crônico, o que na maioria das vezes é diagnosticado em animais que apresentam endometrites persistentes. Tal cronicidade pode sugerir que algumas metodologias das biotecnologias da reprodução, assim como tratamentos e outras enfermidades atuem diminuindo a capacidade de eliminação dos agentes do ambiente uterino e predispondo-o a persistência. Porém, Petrites-Murphy et al. (1996), afirmam que alguns casos podem ser de caráter agudos em decorrência de abortos com etiologia micótica.

Os resultados encontrados, mostram uma maior identificação e participação da *Candida albicans*, estando de acordo com a literatura em animais com endometrites fúngicas, como descritos por Amaral et al. (2007), Frontoso et al. (2008), Liu e Troedson (2008), fato justificado pela presença naturalmente no trato reprodutivo animal por este grupo de microrganismos. Scofield et al. (2013), afirmam que os principais agentes em endometrites fúngicas são *Candida spp.*, *Aspergillus spp.* e *Mucor spp.* Em ordem de importância, a *Candida albicans* é a considerada o agente que mais acomete o trato reprodutivo da égua (PETRITES-MURPHY et al., 1996). Seguido em segundo lugar pelos agentes do gênero *Aspergillus spp.*, estes agentes por sua vez são capazes de produzir e liberar enzimas (elastase) e provocar uma infecção mais profunda por penetrar nos tecidos (ALVARENGA, 2008).

Segundo Tongu (2015), embora haja a possibilidade de serem encontrados todas as espécies de fungos no trato reprodutor de éguas. Os mais comumente identificados em quadros de endometrites são os do gênero *Candida spp.* e *Aspergillus spp.* O que para Novelo et al. (2017), são considerados como os principais causadores da enfermidade. Curiosamente os microrganismos *Curvalaria spp.*, *Cladosporium spp.* e *Zygomices spp.* foram identificados no presente trabalho. Tais microrganismos são agentes rotineiramente associados a dermatites fúngicas, no caso da *Curvalaria spp.* encontrados como contaminantes e agentes de deterioração em alimentos, produtos industriais, solo, pedras, tijolos, papel e couro no caso do *Cladosporium spp.* e danos traumáticos ao tecido ou supressão do sistema imunológico, como o *Zygomices spp.*, o que nos leva a hipotetizar que houve contaminação em algum momento, prática realizada com o animal ou diminuição da resposta imunológica do animal (HIROMOTO et al., 2008; GUTAROWSKA, 2014).

Ribas, Carvalho e Stussi (2014), ao avaliarem 85 éguas, encontraram apenas cinco animais com endometrite fúngica, o que corresponde a 5,9% dos casos. Este resultado é bem inferior ao encontrado no presente estudo [30,2% (13/43)]. A porcentagem de endometrites relatadas por alguns trabalhos na literatura variam de 2,0 a 13,5% (COLLINS; 1964; DASCANIO et al., 2001; AMARAL et al., 2007; LEBLANC et al., 2007; RIDDLE et al., 2007; FRONTOSO et al., 2008). Estas variações podem sugerir que endometrites fúngicas ocorrem com mais frequência em regiões tropicais, fato atribuído principalmente ao ambiente e demais condições mais propícias ao desenvolvimento micótico.

Além disso, as biotecnologias utilizadas envolvem a participação hormonal, e neste quesito há a utilização da progesterona. Este hormônio diminui a capacidade de identificação leucocitária e conseqüentemente a fagocitose e a lise dos agentes patogênicos, o que predispõe as infecções fúngicas (TROEDSSON, 2011).

A porcentagem encontrada em maior quantidade neste estudo pode ser explicada por duas vertentes, a primeira sugere uma maior exposição dos animais a esporos dos fungos, o que já foi relatado por Carter e Chenpaga (1995), como um importante fator predisponente para a endometrite micótica e persistência dos animais com tal enfermidade, já que o desenvolvimento fúngico pode ocorrer em todos o ano em países tropicais. A segunda, sugere um maior e melhor identificação e controle das condições laboratoriais para a cultura e isolamento. Segundo Amaral et al. (2007), vários problemas no diagnóstico de endometrites fúngicas são atrelados a falhas ou problemas com a cultura e o isolamento do fungo. Por outro lado, Ribas, Carvalho e Stussi (2014), reiteram que para um diagnóstico correto, devem-se utilizar meios específicos para o crescimento fúngico, principalmente com antibióticos, já que estes suprimem o crescimento de bactérias e possibilitam o crescimento fúngico, já que este é mais lento.

No que se refere a formação de biofilme, Carneiro et al. (2018), considera a formação de biofilme no trato reprodutivo equino como uma causa significativa de endometrite crônica na égua. Os agentes encontrados no presente estudo como a *Candida albicans* e *Aspergillus spp* são considerados como formadores de biofilme por dificultar a limpeza uterina devido ao aumento da adesão às superfícies epiteliais, o que de acordo com Buczkowska et al. (2015), impede a remoção física e estimula a produção de exsudato inflamatório. Alvarenga (2008), no entanto, acrescenta que a formação do biofilme interfere diretamente nos mecanismos imunológicos de defesa do útero, aumentando ainda mais a resistência dos agentes a eliminação uterina.

A formação de biofilme e identificação de agentes em éguas com endometrites já foram descritas por Zhang (2012), como *Cladosporium sphaerospermum*, por Siqueira e Lima (2013), como *Aspergillus sp.*, *Botrytis sp.*, *Alternaria sp.*, *Cladosporium sp.* e por Carneiro et al. (2019), como *Aspergillus spp.*, corroborando com os achados no presente estudo e evidenciando a participação do *Aspergillus ssp* como um dos principais agentes.

De uma forma geral, a formação de biofilmes, torna os microrganismos resistentes a conduta terapêutica e conseqüentemente pode ocasionar infecções crônicas (LEBLANC, 2010). Vários são os métodos para sobreviver à degradação ou tentativa de eliminação pelo sistema imunológico do hospedeiro e pela antibioticoterapia.

Assim, os biofilmes permitem que os microrganismos não sejam reconhecidos pelo sistema imunológico, impedem a exposição a antibióticos e permitem à resistência a antibioticoterapia pela troca de material genético (DONLAN; COSTERTON, 2002).

CONCLUSÃO

As endometrites de uma forma geral, são enfermidades muito importantes para o agronegócio equino, quer seja de origem bacteriana ou fúngica, o seu diagnóstico torna-se imprescindível, porém muitas vezes complexo e conseqüentemente agravante para a resolução do quadro clínico, tornando-o crônico e comprometendo a vida produtiva e reprodutiva do animal. A caracterização, identificação do agente e a formação de biofilme são metodologias fundamentais no diagnóstico e terapia de tais enfermidades. Pôde-se identificar os agentes *Aspergillus spp* e *Candida albicans*, *Curvalaria spp*, *Cladosporium spp* e *Zygomices spp* em animais com endometrite fúngica. Além disso, os fungos isolados demonstram uma necessidade em melhorias nas biotecnologias da reprodução, bem como os devidos cuidados assépticos destas ações.

REFERÊNCIAS

- Alvarenga, M.A. Diagnóstico e tratamento de endometrite fúngica em éguas. In: IX CONFERÊNCIA ANUAL DA ABRAVEQ, 2008. São Paulo, Brasil. **Anais...** São Paulo. 2008.
- Amaral MG, Pimentel CA, Meireles M, Fiala SM, Schramm R, Xavier EG, Mendonça M. Endometrite eqüina. Fungos e bactérias. **Arch. Zootec.**, v.216, v.875-884, 2007.
- Buczowska J, Kozdrowski R, Sikora M, Dzieciol M, Matusz A. Non-traditional treatments for endometritis in mares. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, 2015.
- Carneiro, G. F., Nascimento Júnior, J. A. A., Correia, M. T. S. Identificação fúngica e formação de biofilme provenientes de amostras endometriais de éguas. Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 23, Gramado, RS, **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 2019. Recife, 2019.
- Carneiro, G. F., Vargas, H., Nascimento Júnior, J. A. A., de Sobral, G. G., Viana, A. R., Vilar, I. J. **Intrauterine Infusion of Ozone in susceptible mare. ISABR**, 2018.
- Carter GR, Chengappa MM. Introduction to de fungi and fungous infeccion. In: CARTER, G.R.; CHENGAPPA, M.M; ROBERTS, G.H.C.; RIKIHISA, Y. (Eds), **Essentials of Veterinary Microbiology**. Philadelphia: Williams and Wilkins, 1995. p.251-256.
- Collins SM. Study of incidence of cervical uterine infections in Thoroughbred mares in Ireland. **Vet. Rec.**, v. 66, p. 673-676, 1964.
- Dascanio JJ, Schweizer C, Ley W. Equine fungal endometritis. **Equine Veterinary Education**, 13, 324–329. 2001.

- Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: Survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin Microbiol Rev**, v.15, p.167-193, 2002.
- Frontoso R, DE Carlo E, Pasolini MP, Van Der Meulen K, Pagnini U, Iovane G, De Martino L. Retrospective study of bacterial isolates and their antimicrobial susceptibilities in equine uteri during fertility problems. **Res. Vet. Sci.**, v. 84, p. 1-6, 2008.
- Fumuso EA, Aguilar J, Giguère S, Rivulgo M, Wade J, Rogan D. Immune parameters in mares resistant and susceptible to persistent post-breeding endometritis: Effects of immunomodulation. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 1, p. 830-39, 2007.
- Gutarowska, B. 2014. Moulds in biodeterioration of technical materials. **Folia Biologica et Oecologica**, 10(1): 27-39.
- Hiromoto A., Nagano T. & Nishigori C. 2008. Cutaneous infection caused by *Curvularia* species in an immunocompetent patient. **British Journal of Dermatology**. 158(6): 1374-1375.
- Leblanc MM, Magsig J, Stromberg AJ. Use of a lowvolume uterine flush for diagnosing endometrites in chronically infertile mares. **Theriogenology**, v. 68, p. 403-412, 2007.
- Leblanc MM. Advances in the Diagnosis and Treatment of Chronic Infectious and Post-Mating-Induced Endometritis in the Mare. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin. v.45. n.2. p.21-27. Jun. 2010.
- Leblanc MM. When to refer an infertile mare to a theriogenologist. **Theriogenology**, v. 70, p. 421-429, 2008.
- Liu KM, Troedsson MHT. The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: Yesterday and today. **Theriogenology**, v. 70, p. 415-420, 2008.
- Mattos RC, Malschitzky E, Jobim MIM. Endometrite na égua. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.27, n.2, p.150-157, 2003.
- Novello, G., Martins, G. V., França, R. T., Bandeira, R. S., Pauletti, G. F., Delamare, A. P. L., Lisboa, F. P. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre *Candida* sp, isolada do útero de égua. XVIII – Conferência Anual ABRAVEQ. **Rev. Acad. Ciênc. Anim.**;15(Supl.1): S233-234. Águas de Lindóia, 2017.
- Petrites-Murphy MB, Robbins LA, Donahue JM, Smith B. Equine cryptococcal endometritis and placentitis with neonatal cryptococcal pneumonia. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 8, p. 383-386, 1996.
- Ribas JA, Carvalho EQ, Stussi JP. Endometrite fúngica em éguas: diagnóstico e implicações clínico-patológicas. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 21, n. 3, p. 204-212, jul./set. 2014
- Riddle WT, Leblanc MM, Stromberg AJ. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. **Theriogenology**, v. 68, p. 395-402, 2007.

Scofield DB, Wittenburg LA, Ferris RA, Gustafson DL, Mccue PM. Equine Endometrial Tissue Concentration of Fluconazole Following Oral Administration. **Journal of Equine Veterinary Science**, 33, 44–50. 2013.

Siqueira, V. M., LIMA, N. Biofilm Formation by Filamentous Fungi Recovered from a Water System. **Hindawi Publishing Corporation Journal of Mycology**, 2013.

Stout TAE. Fungal endometrites in the mare. **Pferdeheikunde**, 24 83-87. 2008.

Tongu, E. A. O, et al. Sensibilidade do Laminocultivo Dermatobac® para o diagnóstico da Endometrite Fúngica em Éguas. **Ciência Animal Brasileir**, Goiânia, 16, n.4, 598-607 out. / dez. 2015.

Traub-Dargatz JL, Salman MD, Voss JL. Medical problems of adult horses, as ranked by equine practitioners. **Journal of American Veterinary Association**. v.198 p.1745-1747. 1991.

Troedsson MHT. Endometritis. In: MCKINNON, A. O. et al. (Ed.) **Equine Reproduction**. Philadelphia: Wiley- Blackwell, 2011. cap. 271, p. 2608 – 2619.

Wittenbrink MM. Bacterial infections of the equine genital tract. **Pferdehellkunde**, 28, p.30-32, 2012.

Zhang, X.; Sun, X.; Wan, Z.; Zhang, Y.; Hou, W. Keratitis-Associated Fungi Form Biofilms with Reduced Antifungal Drug Susceptibility. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, 53, No. 12, Novembro 2012.

4 CONCLUSÃO

Pode-se concluir que as plantas utilizadas nos diferentes estudos mostraram atividades que melhoram o perfil reprodutivo dos animais envolvidos, independentemente de sua peculiaridade, como a função espermicida direcionada aos Homens, a função de melhoramento do meio de cultura de FIV auxiliando na reprodução bovina e a melhora na hiperativação espermática pós descongelamento na espécie de caprinos, os estudos ainda estão passando por validações dentro dos parâmetros necessários para que possamos gerar ao fim do trabalho a patente dos produtos oferecidos nos artigos descritos no contexto do trabalho, entretanto, comprova-se o potencial metabólico das plantas utilizadas, enriquecendo ainda mais a distribuição de atividades para plantas do bioma caatinga.

REFERÊNCIAS

- AISEN, E. et al. Ultramicroscopic and biochemical changes in ram spermatozoa cryopreserved with trehalose-based hypertonic extenders. **Cryobiology**, v. 50, p. 239 – 249, 2005.
- ALMEIDA, V. M. Biotecnologia em reprodução humana assistida. **Revista Portuguesa de Clínica Geral**, p. 505 – 508, 2005.
- ALVARENGA, C. et al. Fertility preservation in young men with cancer: current concepts and future. **Revista de Medicina USP**, v. 91, n. 3, p. 223 – 228, Jul/Set 2012.
- ANDRADE, E. R. et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 34, n. 2, p. 79 – 85, 2010.
- ARRUDA, R. P. et al. Importância da qualidade do sêmen em programas de IATF e TETF. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 33, p. 145 – 150, 2005.
- ASSUNÇÃO, C. M. **Efeito do resveratrol na criopreservação do sêmen bovino**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) — UFJF.
- AURICH, J. E. et al. Effects of antioxidants motility and membrane integrity of chilled-stored stallion semen. **Theriogenology**, v. 48, p. 185 – 192, 1997.
- BALL, B. A. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. **Animal Reproduction Science**, v. 107, p. 257 – 267, 2008.
- BANSAL, A. K.; BILASPURI, G. Impacts of Oxidative Stress and Antioxidants on Semen Functions. SAGE-Hindawi **Access to Research**, 2010.
- BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, Jul/Ago 2010.
- BAUMBER, J. et al. Generation of reactive oxygen species by equine neutrophils and their effect on motility of equine spermatozoa. **Theriogenology**, v. 57, p. 1025 – 1033, 2002.
- BOITÉ, M. C. **Comportamento osmótico e criopreservação de embriões bovinos produzidos in vitro**. 2008. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) — UFF.
- BRAGA, M. F. C. **Efeito de diferentes concentrações de antioxidantes na proteção contra o stress oxidativo e na viabilidade espermática durante a criopreservação do sêmen equino**. 2014. Dissertação (mestrado em Engenharia Zootécnica) — Universidade dos Açores.
- BRANCO, S. C. et al. Resveratrol and ascorbic acid prevent DNA damage induced by cryopreservation in human semen. **Cryobiology**, v. 60, p. 235 – 237, 2009.
- BRUEMMER, J. E. et al. Effect of pyruvate on the function of stallion spermatozoa stored for up to 48h. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 12 – 18, 2002.

BUCAK, M. N. et al. Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. **Andrologia**, p. 1 – 8, 2014.

BUCAK, M. N. et al. Effect of antioxidants on microscopic semen parameters, lipid peroxidation and antioxidant activities in Angora goat semen following cryopreservation. **Small Ruminant Research**, v. 81, p. 90 – 95, 2009.

CARREIRA, J. T. **Qualidade espermática e danos de DNA em espermatozoides criopreservados de touros nelore jovens, adultos e senis**. 2012. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) — UNESP.

CARVALHO, P. S. R. **Preservação da fertilidade masculina em doentes oncológicos**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biologia Humana e Ambiente) — Universidade de Lisboa.

CIPRIANO, V. T. F.; FREITAS, G. C. O impacto da criopreservação na qualidade seminal. **Reprodução e Climatério**, v. 28, n. 3, p. 112 – 116, 2013.

COSTA, J. M. S. **Efeito da adição de antioxidantes no sêmen de carneiros sobre a qualidade espermática após descongelamento**. 2015. Dissertação (mestrado em Ciência Animal) — UNIVASF.

FAUSTINO, L. R. et al. Estado atual e desafios da criopreservação de tecido ovariano em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 1, p. 3 – 15, Jan/Mar 2011.

FERREIRA, I. C. F. R.; ABREU, R. M. V. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Revista Bioanálise**, n. 2, Jul 2007.

GARCIA, B. et al. Membrane lipids of the stallion spermatozoon in relation to sperm quality and susceptibility to lipid peroxidation. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 1, p. 141 – 148, 2011.

GASDA, E. E. Human embryo cryopreservation in the context of sexual and reproductive health. **Revista Pistis Praxis**, v. 7, n. 3, p. 635 – 661, Set/Dez 2015.

GUIMARÃES, C. O. **Efeito da adição de antioxidantes na qualidade do sêmen bovino criopreservado**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) — UFG.

HOLT, W. V. The roles of cryobiology and reproductive technology in the conservation of biodiversity. **Cryoletters**, v. 1, p. 47 – 46, 1998.

KRYZOSIAK, J. et al. Changes in susceptibility of bovine sperm to in situ DNA denaturation, during prolonged incubation at ambient temperature under conditions of exposure to reactive oxygen species and nuclease inhibitor. **CSIRO PUBLISHING**, v. 12, p. 251 – 261, 2000.

LEITE, P. A. et al. Criopreservação do Sêmen Bovino. UNOPAR Científica. **Ciências biológicas e da saúde**, v. 13, n. 4, p. 279 – 286, 2011.

LIMA, F. T. R. **Avaliação da crioinjúria em ovócitos imaturos e maturados in vitro e produção de embriões a partir de ovócitos bovinos vitrificados em Open Pulled Straw (OPS) e Cryotop**. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) — UnB.

LORENZONI, S. L. G. **Criopreservação de sêmen equino envasado em criotubo**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) — UFRGS.

LUZ, H. K. M. et al. Role of antioxidants agents in germ cells and embryos cryopreservation. **Acta Scientiae Veterinarie**, v. 39, 2011.

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.

MAPA – MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO: **Revisão do estudo do complexo do agronegócio cavalo**. 2016.

MUKHOPADHYAY, C. S. et al. Effect of cryopreservation on sperm chromatin integrity and fertilizing potential in bovine semen. **Livestock Science**, v. 136, p. 114 – 121, 2011.

NUNES, E.; OLIVEIRA, S. C.; MORAIS, R. N. Radicais livres: conceito, doenças, estresse oxidativo e antioxidantes. **Open Journal Systems**, v. 1, n. 6, p. 1 – 32, 2006.

OBEROI, S. L. B.; KUMAR, S. V. A. S.; TALWAR, C. P. Study of human sperm motility post cryopreservation. **Medical journal armed Forces India**, v. 70, p. 349 – 353, 2014.

OLIVEIRA, E. C. S. Criopreservação de tecido testicular. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 39, n. 1, p. 109 – 110, Jan/Mar 2015.

OURIQUE, G. M. **Resveratrol aumenta a motilidade espermática, previne a lipoperoxidação e melhora as defesas antioxidantes em testículos de ratos hipertireóideos**. 2012. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) — UFSM.

PENA, F. J. et al. Mitochondria in mammalian sperm physiology and pathology: a review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 2, p. 345 – 349, 2009.

PEREIRA, D. M. et al. Phenolics: From Chemistry to Biology. **Molecules**, v. 14, p. 2202–2211, 2009.

PEREIRA, M. M. C. **Visões sobre a duração da criopreservação de embriões em utilizadores de Procriação Medicamente Assistida**. 2014. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) — UP.

POULOS, A.; DARIN-BENNET, A.; WHITE, I. G. The phospholipid-bound fatty acids and aldehydes of mammalian spermatozoa. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 46, p. 541 – 549, 1973.

PRIEN, S.; LACOVIDES, S. Cryoprotectants & Cryopreservation of Equine Semen: A Review of Industry Cryoprotectants and the Effects of Cryopreservation on Equine Semen Membranes. **Journal of Dairy, Veterinary & Animal Research**, v. 3, n. 1, 2016.

PYLES, E. S. C. S. **Criopreservação de embriões bovinos**. 2003. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) — UNESP.

RIBAS-MAYNOU, J. et al. Human sêmen cryopreservation: a sperm DNA fragmentation study with alkaline and neutral Comet assay. **American Society of Andrology and European Academy of Andrology**, v. 2, p. 83 – 87, 2014.

RODRIGO, R.; GUICHARD, C.; CHARLES, R. Clinical pharmacology and therapeutic use of antioxidant vitamins. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 21, n. 2, p. 111 – 127, 2007.

RÔLO, J. L. J. P. **Estudo da população e criopreservação de folículos ovarianos pré-antrais de cadelas**. 2012. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) — UnB.

SAID, T. M.; GAGLANI, A.; AGARWAL, A. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 21, p. 456 – 462, 2010.

SANTOS, B. E. de S.; BRANDI, R. A.; GAMEIRO, A. H. Estudo do mercado e produção do cavalo brasileiro de hipismo no estado de São Paulo. **PUBVET**, p. 1 – 11, 2018.

SILVA, A. M. S. **Expressão das conexinas 37 e 43 em folículos ovarianos ovinos, frescos, vitrificados ou cultivados in vitro**. 2015. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) — UECE.

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

SILVA, R. O. C. **Efeito da adição de antioxidantes enzimáticos na criopreservação do sêmen caprino**. 2011. Dissertação (Mestrado) — USP.

SILVA, S. V.; GUERRA, M. M. P. Efeitos da criopreservação sobre as células espermáticas e alternativas para redução das crioinjúrias. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 35, n. 4, p. 370 – 384, 2011.

SOUZA, P. C. **Estudo dos danos morfofuncionais causados pela criopreservação no sêmen de tatu-peba, Euphractus sexcinctus Wagler, 1830**. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) — UFERSA.

SOUZA, W. L. et al. Efeito de diferentes concentrações de melatonina em espermatozoides de carneiros sobre estresse oxidativo após criopreservação. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, p. 657 – 664, 2016.

SOUZA, W. L.; MORAIS, E. A. Atividade antioxidante da melatonina sobre o estresse oxidativo em espermatozoides: revisão de literatura. **Nutritime Revista Eletrônica**, on-line, v. 13, n. 5, p. 4831 – 4839, Set/Out 2016.

TONIOLLI, R. Utilização de antioxidantes na preservação seminal em suínos. **Revista de Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 365 – 375, 2012.

TREVIZAN, J. T. **Influência dos danos oxidativos na qualidade espermática em bovinos de diferentes idades**. 2013. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) — UNESP.

UPRETI, G. C. et al. Studies on aromatic amino acid oxidase activity in ram spermatozoa: role of pyruvate as an antioxidant. **Animal Reproduction Science**, v. 51, p. 275 – 287, 1998.

VALENÇA, R. M. B.; GUERRA, M. M. P. Espécies Reativas ao Oxigênio (ROS) e a utilização de antioxidantes na criopreservação do sêmen suíno. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 31, n. 1, p. 47 – 53, 2007.

VIEIRA, R. J. Biotécnicas aplicadas à reprodução bovina: generalidades. **Ciência Animal**, v. 22, n. 1, p. 55 – 65, 2012.

WATSON, P. F. The causes of reduced fertility with cryopreserved semen. **Animal Reproduction Science**, v. 60/61, p. 481 – 492, 2000.

YELUMALAI, S. et al. Clinician-induced (iatrogenic) damage incurred during human infertility treatment: Detrimental effects of sperm selection methods and cryopreservation upon the viability, DNA integrity, and function of human sperm. **Asian Pacific Journal of Reproduction**, v. 1, n. 1, p. 69 – 75, 2012.

APÊNDICE A – ARTIGOS PUBLICADOS

ARTIGOS PUBLICADOS E EM COLABORAÇÃO

JOSÉ, ADELSON ALVES DO NASCIMENTO JUNIOR; CLOVIS, MACÊDO BEZERRA FILHO ; THIAGO, HENRIQUE FLORENCIO DE OLIVEIRA ; ALEXANDRE, GOMES DA SILVA ; PATRICIA, CRISTINA BEZERRA-SILVA ; PATRICIA, MARIA GUEDES PAIVA ; MARCIA, VANUSA DA SILVA ; DANIELA, MARIA DO AMARAL FERRAZ NAVARRO ; LUIS, CLAUDIO NASCIMENTO DA SILVA ; MARIA, TEREZA DOS SANTOS CORREIA . Spermostatic activity of *Eugenia brejoensis* and *Myroxylon peruiferum* essential oils toward human spermatozoa. JOURNAL OF MEDICINAL PLANT RESEARCH, v. 12, p. 264-269, 2018.

NASCIMENTO JÚNIOR, J.A.A.; OLIVEIRA, E.R.G. ; LIMA, A.V.A. ; SILVA, T.D. ; CORREIA, M.T.S. ; CARNEIRO, G.F. . Identification by MALDI-TOF Mass Spectrometry and Biofilm Formation of Bacteria Isolated From Mare Uterus. JOURNAL OF EQUINE VETERINARY SCIENCE, v. 66, p. 122, 2018.

DO NASCIMENTO JÚNIOR, JAA; DOS SANTOS, BS ; DE ARAÚJO, LCA ; LIMA, AVA ; DA SILVA, TD ; DA SILVA, LCN ; NAPOLEÃO, TH ; PAIVA, PMG ; DA SILVA, MV ; DOS SANTOS CORREIA, MT . Anti-biofilm potential of some plant volatile compounds against *Proteus mirabilis*. PLANTA MEDICA, v. 81, p. S1-S381, 2016.

NASCIMENTO JUNIOR, J. A. A.; MACIEL, N. G. P. ; SANTOS, B. S. ; SILVA, E. S. N. ; OLIVEIRA, V. A. ; FERNANDES, L. L. N. ; OLIVEIRA, P. M. S. ; GOIS, A. M. ; FALCAO, R. E. A. ; SILVA, M. V. ; SILVA, T. D. ; CARNEIRO, G. F. ; CORREIA, M. T. S. . Evaluation of the antibiofilm activity of the essential oil of *Syagrus coronata* against *Proteus mirabilis* isolates. In: A. Méndez-Vilas. (Org.). Exploring Microorganisms: Recent Advances in Applied Microbiology. 1ed.Irvine: BrownWalker Press, 2018, v. , p. 252-255.

NASCIMENTO JUNIOR, J. A. A.; MACIEL, N. G. P. ; SANTOS, B. S. ; OLIVEIRA, M. B. M. ; NAPOLEAO, T. ; PAIVA, P. M. G. ; SILVA, M. V. ; CORREIA, M. T. S. . Antibiofilm activity of major compounds of essential oils against *Salmonella enteritidis*. In: A. Méndez-

Vilas. (Org.). Microbes in the spotlight: recent progress in the understanding of beneficial and harmful microorganisms. 1ed. Berlin: BrownWalker Press, 2016, v. , p. 240-244.

APÊNDICE B – PATENTE 1

Ao Núcleo de Inovação Tecnológica – NIT

Universidade Federal Rural de Pernambuco

Rua Dom Manoel de Medeiros, s/nº, Dois Irmãos – CEP: 52171-900

Recife/PE

Prezado Coordenador:

Eu, Gustavo Ferrer Carneiro, CPF: 361.157.034-68, lotado e com exercício no Departamento de Medicina Veterinária, encaminho a este Escritório os documentos abaixo relacionados, a fim de dar início à avaliação de pertinência do pedido de depósito da Patente de invenção denominada “MÉTODO DIAGNÓSTICO PARA ENDOMETRITE EQUINA ASSOCIANDO CITOLOGIA, CULTURA BACTERIOLÓGICA E FÚNGICA AO PROTOCOLO DE PRODUÇÃO E GRADUAÇÃO DE BIOFILME *IN VITRO*”.

Relação de documentos anexos:

	Material	Nº de páginas
(X)	Relatório de Invenção	
()	Desenhos, se necessário	
()	Publicações relacionadas ao presente invento	
()	Cópia de material de divulgação e/ou atestados de participação em eventos e/ou cópia de anais, onde o invento tenha sido divulgado/apresentado.	
()	Cópia do contrato de Direitos de Propriedade Industrial firmado entre a UFRPE e Empresa(s) participante(s), quando for o caso.	
(X)	Outros documentos julgados pertinentes:	
	- Quadro reivindicatório	1
	- Resumo	1

Recife, 23 de Agosto de 2019.

Atenciosamente,

Assinatura do Professor Orientador

Recebido no NIT em

DADOS DO(S) TITULAR(ES)

(Preencha somente se a patente for em co-titularidade com Empresas, órgãos públicos ou pessoas físicas sem vínculo com a UFRPE)

Nome da Instituição	CNPJ ou CPF
Universidade Federal Rural de Pernambuco	24416174000106

DADOS DO(S) INVENTOR(ES)

Nome civil completo: Gustavo Ferrer Carneiro

Unidade: UFRPE

Departamento: Medicina Veterinária

Fone comercial:

Fax:

E-mail:

carneirogustavo1@gmail.com

Identidade N°: 1288696

Órgão expedidor: SSP/PE

Data de emissão: 04/12/1974

CPF: 36115703468

Data nascimento: 29/10/1962

Estado Civil: Casado

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Recife – PE

Endereço Residencial Completo: Av. Bernardo Vieira de Melo, 3119 Apto. 902 – Jaboatão-PE

Bairro: Piedade

CEP: 54.420-010

Telefone Residencial: (81) 3361-2160

Celular: (81) 99974-6663

Vínculo com a UFRPE

(X) Professor

() Aluno Especialização

() Técnico-administrativo

() Aluno Mestrado

() Aluno Graduação

() Aluno Mestrado

Profissionalizante

() Aluno Doutorado

Participante Externo UFRPE

() Professor

Informe Instituição:

() Técnico-administrativo

() Aluno Graduação

() Aluno Pós-Graduação

% Contribuição no presente invento: 25%

DADOS DO(S) INVENTOR(ES)

Nome civil completo: José Adelson A Nascimento Júnior

Unidade: UFPE

Departamento:

Fone comercial: (87) 98133-0904 **Fax:**

E-mail:

juniior.aalves@live.com

Identidade N°: 7.334.123

Órgão expedidor: SDS/PE

Data de emissão:

CPF: 101.528.604-60

Data nascimento: 03/03/93

Estado Civil: Casado

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Garanhuns

Endereço Residencial Completo: Av. Gonçalves Maia, 375 – Garanhuns, PE

Bairro: Heliópolis

CEP: 55.295-490

Telefone Residencial:

Celular: (87) 98133-0904

Vínculo com a UFRPE

() Professor

() Aluno Especialização

() Técnico-administrativo

() Aluno Mestrado

() Aluno Graduação

() Aluno Mestrado

Profissionalizante

() Aluno Doutorado

Participante Externo UFRPE

() Professor

Informe Instituição:

() Técnico-administrativo

() Aluno Graduação

(X) Aluno Pós-Graduação

% Contribuição no presente invento: 10,0%

DADOS DO(S) INVENTOR(ES)

Nome civil completo: Antonio Brito da Silva Filho

Unidade: UFRPE

Departamento: PPGCAT

Fone comercial: (81) 99844-3850 **Fax:**

E-mail:

anttonio_sjm@hotmail.com

Identidade Nº: 8.601.365

Órgão expedidor: SDS/PE

Data de emissão: 25/09/2013

CPF: 096.220.054-97

Data nascimento: 06/07/1993

Estado Civil: Solteiro

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: São Joaquim do Monte - PE

Endereço Residencial Completo: Loteamento Canaã, Rua 01 N. 210 - São Joaquim do Monte, PE

Bairro: Centro

CEP: 55.670-000

Telefone Residencial:

Celular: (81) 99844-3850

Vínculo com a UFRPE	☐ Professor	☐ Aluno Especialização
	☐ Técnico-administrativo	☒ Aluno Mestrado
	☐ Aluno Graduação	☐ Aluno Mestrado Profissionalizante
		☐ Aluno Doutorado

Participante Externo UFRPE	☐ Professor	Informe Instituição:
	☐ Técnico-administrativo	
	☐ Aluno Graduação	
	☐ Aluno Pós-Graduação	

% Contribuição no presente invento: 10,0%

DADOS DO(S) INVENTOR(ES)

Nome civil completo: Gilvannya Gonçalves Sobral

Unidade: UFRPE

Departamento: PPGCAT

Fone comercial:

Fax:

E-mail:

gilvannyasobral@hotmail.com

Identidade N°: 8.638.322

Órgão expedidor: SDS/PE

Data de emissão: 20/08/2008

CPF: 100.975.154-93

Data nascimento: 04/01/1995

Estado Civil: Solteira

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Taquaritinga do Norte - PE

Endereço Residencial Completo: Rua Professor Guaraná, 105, Lajedo - PE

Bairro: Centro

CEP: 55.385-000

Telefone Residencial:

Celular: (81) 99968-2524

Vínculo com a UFRPE	☐ Professor	☐ Aluno Especialização
	☐ Técnico-administrativo	☒ Aluno Mestrado
	☐ Aluno Graduação	☐ Aluno Mestrado Profissionalizante
		☐ Aluno Doutorado

Participante Externo UFRPE	☐ Professor	Informe Instituição:
	☐ Técnico-administrativo	
	☐ Aluno Graduação	
	☐ Aluno Pós-Graduação	

% Contribuição no presente invento: 10,0%

DADOS DO(S) INVENTOR(ES)

Nome civil completo: Breno Barros de Santana

Unidade: UFRPE

Departamento: PGCAT

Fone comercial:

Fax:

E-mail:

brenobarrossantana@hotmail.com

Identidade N°:

Órgão expedidor:

Data de emissão:

CPF: 077.650.174-70

Data

Estado Civil: Solteiro

nascimento: 18/07/1990

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade:

Endereço Residencial Completo:

Bairro:

CEP:

Telefone Residencial:

Celular:

Vínculo com a UFRPE	☐ Professor	☐ Aluno Especialização
	☐ Técnico-administrativo	☐ Aluno Mestrado
	☐ Aluno Graduação	☐ Aluno Mestrado Profissionalizante
		☒ Aluno Doutorado

Participante Externo UFRPE	☐ Professor	Informe Instituição:
	☐ Técnico-administrativo	
	☐ Aluno Graduação	
	☐ Aluno Pós-Graduação	

% Contribuição no presente invento: 10,0%

DADOS DO(S) INVENTOR(ES)

Nome civil completo: Aldo Gimendis Pereira de Melo

Unidade: UFAPE

Departamento: UAG

Fone comercial:

Fax:

E-mail:

aldomelo_t.a@hotmail.com

Identidade N°: 7.710.597

Órgão expedidor: SDS/PE

Data de emissão: 18/10/2004

CPF: 066.701.374-19

Data nascimento: 08/09/1988

Estado Civil: Solteiro

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Tacaratu - PE

Endereço Residencial Completo: Av. Cônego Frederico, 170 – Tacaratu - PE

Bairro: Centro

CEP: 56.480-000

Telefone Residencial:

Celular: (87) 99916-6785

Vínculo com a UFRPE

() Professor

() Aluno Especialização

() Técnico-administrativo

() Aluno Mestrado

(x) Aluno Graduação

() Aluno Mestrado

Profissionalizante

() Aluno Doutorado

Participante Externo UFRPE

() Professor

Informe Instituição:

() Técnico-administrativo

() Aluno Graduação

() Aluno Pós-Graduação

% Contribuição no presente invento: 10,0%

DADOS DO(S) INVENTOR(ES)

Nome civil completo: Elizabete Rodrigues da Silva

Unidade: UFRPE

Departamento: UAG

Fone comercial: 87 37645501

Fax:

E-mail:

beteers@hotmail.com

Identidade Nº: 3074883

Órgão expedidor: SSP/PE

Data de emissão: 18/10/1984

CPF: 697 122 804-97

Data nascimento: 28/03/1968

Estado Civil: Solteira

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: SÃO BENEDITO DO SUL

Endereço Residencial Completo: AV, DR CELSO GALVÃO, 130

Bairro: HELIÓPOLIS

CEP: 55296-120

Telefone Residencial:

Celular: (87) 99914-9320

Vínculo com a UFRPE	☒ Professor	☐ Aluno Especialização
	☐ Técnico-administrativo	☐ Aluno Mestrado
	☐ Aluno Graduação	☐ Aluno Mestrado
		Profissionalizante
		☐ Aluno Doutorado

Participante Externo UFRPE	☐ Professor	Informe Instituição:
	☐ Técnico-administrativo	
	☐ Aluno Graduação	
	☐ Aluno Pós-Graduação	

% Contribuição no presente invento: 12,5%

DADOS DO(S) INVENTOR(ES)

Nome civil completo: Marcelo Mendonça

Unidade: UFAPE

Departamento: UAG

Fone comercial:

Fax:

E-mail:

marcelomendoncavet@gmail.com

Identidade N°:

Órgão expedidor:

Data de emissão:

CPF: 972.610.760-15

Data

Estado Civil: Casado

nascimento: 29/07/1979

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade:

Endereço Residencial Completo:

Bairro:

CEP:

Telefone Residencial:

Celular: (87) 99988-0815

Vínculo com a UFRPE

☒ Professor

☐ Aluno Especialização

☐ Técnico-administrativo

☐ Aluno Mestrado

☐ Aluno Graduação

☐ Aluno Mestrado

Profissionalizante

☐ Aluno Doutorado

Participante Externo UFRPE

☐ Professor

Informe Instituição:

☐ Técnico-administrativo

☐ Aluno Graduação

☐ Aluno Pós-Graduação

% Contribuição no presente invento: 12,5%

DADOS DA(S) INSTITUIÇÃO(ÕES) EXTERNA ENVOLVIDAS

Nome completo: Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

CNPJ: 24.134.488/0001-08

CONTATO: Maria Tereza dos Santos Correia

Fone: (81) 2126-8576

Fax: (81) 2126-8576

E-mail:
mtscorreia@gmail.com

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, 1235 – Cidade Universitária – Recife, PE – 50.670-901

INFORMAÇÕES SOBRE A INSTITUIÇÃO(ÕES) EXTERNA(S)

1. OCORREU DESENVOLVIMENTO DE ALGUMA DAS ETAPAS DA INVENÇÃO NESTA INSTITUIÇÃO? EM QUE MOMENTO? NÃO
2. EXISTIU AJUDA FINANCEIRA POR PARTE DESTA INSTITUIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DA INVENÇÃO? NÃO
3. QUAL O VÍNCULO DO INVENTOR EXTERNO (SE HOUVER) COM ESTA INSTIUIÇÃO? DESDE QUE DATA EXISTE ESTE VÍNCULO? ALUNO DE PÓS-GRADUAÇÃO (DOUTORADO)
4. EM ALGUM MOMENTO ESTE INVENTOR EXTERNO ESTEVE VINCULADO A UFRPE? QUAL FOI O VÍNCULO? FOI CO-ORIENTADO DO PROF. GUSTAVO FERRER CARNEIRO

(PARA ESTA SEÇÃO, SE NECESSITAR DE FOLHA ADICIONAL, IDENTIFIQUE-A COMO ANEXO 1)

• **TÍTULO DO INVENTO**

“MÉTODO DIAGNÓSTICO PARA ENDOMETRITE EQUINA ASSOCIANDO CITOLOGIA, CULTURA BACTERIOLÓGICA E FÚNGICA AO PROTOCOLO DE PRODUÇÃO E GRADUAÇÃO DE BIOFILME *IN VITRO*”

• **PALAVRAS-CHAVE RELACIONADAS AO PRESENTE INVENTO:**

1.	Endometrite	5.	Fungo
2.	Citologia	6.	Biofilme
3.	Equino	7.	Biotécnicas da reprodução
4.	Bacteriologia	8.	Reprodução animal

• **DESCREVA OBJETIVAMENTE O CAMPO DE INVENÇÃO**

(Exemplo: novo uso do equipamento, processo para tratamento de efluentes, equipamento para, etc.)

Método diagnóstico associando diferentes técnicas com uma maior precisão e consequente possibilidades de tratamentos mais eficazes. A presente invenção se situa no campo da Biotecnologia aplicada à Reprodução Animal e produtos de uso veterinário.

• **DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO**

(Apresente seu invento com suficiência descritiva e indique, quando for o caso, a melhor forma de execução. Dependendo da área de invenção, descreva composição, processo de preparação, posologia, forma de administração, efeitos adversos, direção do fluxo, descrição detalhada das peças, passo-a-passo do processo, etc.) (Se necessário anexe descrição adicional)

É objeto da presente invenção estabelecer um protocolo eficaz para diagnósticos de afecções uterinas em éguas, particularmente as endometrites por se tratar da patologia que leva a maior perda econômica na Equideocultura. Essa afecção uterina pode acometer éguas de qualquer idade e em qualquer categoria reprodutiva. Existem éguas mais susceptíveis e situações as quais também levam a uma maior taxa de ocorrência da patologia. Além da

infertilidade, a endometrite também podem causar perdas embrionárias, irritações recorrentes e introdução de microrganismos. Podem ser classificadas segundo a sua etiologia e fisiopatologia em aguda, crônica, ativa, subclínica, pós-parto, bacteriana, fúngica, viral, persistente associada à cópula ou inseminação artificial. É necessário que se diferencie as endometrites causadas por infecção uterina das reações inflamatórias fisiológicas associada à cópula ou inseminação artificial, resultante do desafio da exposição uterina ao sêmen. Em ambos casos ocorre uma reação inflamatória por parte do útero que se caracteriza por acúmulo de fluido intrauterino. As falhas no mecanismo de defesa uterina em eliminar antígenos como bactérias, espermatozoides ou produtos inflamatórios do útero resultam em uma endometrite persistente, a qual é a maior causa de redução da fertilidade em éguas em reprodução. O útero é normalmente bem protegido pelas barreiras físicas que consistem na vulva, no vestíbulo, vagina e cérvix. Entretanto, qualquer comprometimento dessas barreiras pode predispor a égua a uma endometrite crônica. A endometrite induzida pela cópula ou inseminação artificial (IA), é um evento fisiológico que ocorre algumas horas após a deposição do sêmen no trato reprodutivo da égua. Esse processo é considerado necessário para efetiva remoção de bactérias e excesso de espermatozoide introduzidos no lúmen uterino. Em éguas resistentes, a inflamação uterina ocorre e a limpeza uterina ocorre antes do oócito fertilizado cair no útero após a passagem pelo oviduto aproximadamente seis dias após a ovulação, enquanto que o útero de éguas susceptíveis persiste com o processo inflamatório. Quando essa falha na limpeza fisiológica pelo organismo dos agentes causadores da inflamação ocorre, resulta em um ambiente intrauterino favorável ao crescimento bacteriano ou fúngico; no entanto desfavorável para quando ocorrer a chegada do embrião no útero. Paralelo a esse processo inflamatório intrauterino, ocorre um aumento na produção e secreção de prostaglandina $F2\alpha$ proporcionando luteólise prematura do corpo lúteo, seguido de perda embrionária. A endometrite bacteriana é um dos principais problemas em éguas cíclicas com baixa resistência a inflamações persistentes. As bactérias mais comumente isoladas são: *Streptococcus* β -hemolítico (*Streptococcus equi* ssp. *zooepidemicus*), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Outras bactérias aeróbicas isoladas do trato reprodutivo de éguas incluem *Streptococcus* α -hemolítico, *Corynebacterium* spp., *Actinobacter* spp., *Proteus* spp. e *Citrobacter* spp. Alguns autores ao coletarem amostras intrauterinas com escova ginecológica e biópsia e em seguida passadas em meios de cultura, observaram que as bactérias encontradas foram *Streptococcus* β hemolítico, *Streptococcus* α -hemolítico, *E. coli*, *Micrococcus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Corynebacterium* spp e *Staphylococcus aureus*. Os mesmos autores identificaram também culturas fúngicas como *Aspergillus* spp. e *Candida* spp. espécies leveduriformes que podem ser

identificadas através de exame microscópico direto realizado a partir de citologia esfoliativa endometrial. A incidência de endometrite fúngica é significativamente menor em comparação com as endometrites bacterianas. Apesar de sua menor incidência, também é reconhecida como uma importante causa de subfertilidade em éguas, uma vez que as infecções micóticas são de difíceis tratamento quando comparada as infecções bacterianas, apresentando prognóstico reservado. Os microrganismos mais isolados nas endometrites fúngicas são a *Candida* spp., *Aspergillus* spp. e *Mucor* spp. Entretanto, a *Candida albicans* é o agente fúngico que mais acomete o trato reprodutivo da égua. *Aspergillus* é o segundo fungo mais importante relatado em éguas com endometrite micótica. Aparentemente é capaz de causar maior prejuízo ao endométrio por produzir e liberar algumas enzimas, tais como a elastase, e por se tratar de um fungo filamentoso tem uma maior facilidade para penetrar tecidos, provocando, consequentemente uma infecção mais profunda. Vale ressaltar que, a maioria das endometrites causadas por fungos possuem caráter crônico, e sua incidência é maior em éguas que são susceptíveis a endometrites persistentes. Além disso, éguas susceptíveis que apresentam deficiente defesa uterina apresentam risco de desenvolver endometrite fúngica. Ambientes úmidos, presença de focos necróticos, isquêmicos ou infectados e tratamentos prolongados com antibióticos, também favorece ao aparecimento de endometrite fúngica. Além disso, é sabido que antibióticos drenados do útero alteram a flora bacteriana normal na vagina, predispondo a um crescimento excessivo de organismos fúngicos, tornando a vagina e genitália externa o reservatório primário desses patógenos. Alguns autores sugerem que a maioria das éguas que apresentam crescimento fúngico tem histórico de frequentes infusões de antibióticos intrauterinos.

Infecções uterinas crônicas resistentes a agentes antimicrobianos, assim como infecções uterinas subclínicas podem ser causadas devido à produção de biofilme. O tratamento dessas infecções representa um desafio para microbiologistas e clínicos. As infecções bacterianas que atuam no endométrio das éguas estão constantemente associadas à capacidade de produção de biofilme. Estudos comprovam que mais de 80% das bactérias isoladas de útero equino são capazes de formar biofilme *in vitro*.

O biofilme trata-se de uma agregação complexa de microrganismos crescendo em um substrato sólido. Biofilmes são caracterizados por terem uma estrutura heterogenia, diversidade, interações complexas com a comunidade e matriz extracelular de substâncias poliméricas, que aumentar significativamente a resistência à terapia antibiótica (Troedsson, 2011). A formação de biofilme no trato reprodutivo equino é teorizada como uma causa significativa de endometrite crônica na égua (Carneiro, et al. 2018). Biofilmes são nichos de proteção para

microrganismos, fornecendo resistência e criando uma fonte de persistência para infecção. Biofilmes também fornecem aos microorganismos a capacidade de aderir fortemente qualquer superfície (Coutinho da Silva & Alvarenga, 2011). Tais biofilmes constituem potenciais reservatórios de patógenos, que servem como uma fonte contínua de infecções e contaminações cruzadas (Abdallah, 2014).

A identificação do agente, assim como o conhecimento da suscetibilidade farmacológica são de fundamental importância, devido ao aumento da resistência bacteriana pelo uso indiscriminado de drogas antibacterianas sem o devido diagnóstico. Assim como a formação prevalente de infecções fúngicas. A formação de biofilme possivelmente é responsável pela infertilidade momentânea e pela refratariedade aos tratamentos prescritos. O desenvolvimento de um Sistema diagnóstico que contemple a identificação dos agentes, susceptibilidade farmacológica associadas a comprovação da produção de biofilme em que extensão, são necessários para o sucesso da terapia. A correlação desses testes pode fornecer subsídios ainda mais importantes para melhorar a eficiência reprodutiva dos rebanhos equinos.

• DIÁRIO DE LABORATÓRIO

Importante apresentar a descrição do invento. Informe alguns exemplos de ensaios realizados até chegar às faixas ideais, inclusive informando os valores trabalhados e identificando a faixa preferencial ou ideal.

CITOLOGIA UTERINA: Os neutrófilos polimorfonucleares migram para o lúmen uterino em resposta à inflamação. Dessa forma a endometrite é diagnosticada de forma rápida e precisa através da identificação dessas células endometriais esfoliadas. Esse exame é realizado a partir da coleta de raspado uterino por uso de escova ginecológica e esfregaço em lâmina estéril para posteriormente realizar a coloração através do mergulho da lâmina em panótico rápido ou em qualquer outro corante. A amostra também pode ser coletada utilizando-se um swab ou através de células recuperadas do líquido do útero. Em seguida, a amostra seja em swab ou escova ginecológica é mergulhada em meio *Phosphate-Buffered Saline* (PBS) e armazenado em meio *Brain Heart Infusion* (BHI). No esfregaço corado, pode-se observar células epiteliais do endométrio e em alguns casos células de defesa, principalmente neutrófilos polimorfonucleares. Sendo assim, a endometrite é estabelecida baseada na presença de neutrófilos encontrados nas lâminas.

CULTURA BACTERIANA UTERINA: No laboratório, utilizando-se uma capela de fluxo laminar, as amostras coletadas são semeadas pela técnica de esgotamento em placas com ágar

sangue de carneiro a 5%, e em seguida incubadas em estufa à temperatura de 37 °C por 24 a 48h. Após identificação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC), as placas são classificadas em: (1) sem crescimento, (2) crescimento isolado (apenas uma espécie de microrganismo) ou de (3) crescimento misto (duas ou mais espécies diferentes de microrganismos). Placas com crescimento misto são repicadas, isolando cada microrganismo em um cultivo, com intuito do crescimento e isolamento para cultura pura. Com 48 horas de incubação, as placas sem crescimento são descartadas e as com crescimento das culturas isoladas são, com auxílio de uma alça de platina estéril em capela de fluxo laminar, transportadas para dois tubos de ensaio de vidro com tampa rosqueável, estéreis contendo caldo BHI (Brain Heart Infusion - Becton Dickinson - BD®, Heidelberg, Alemanha), e incubadas em estufa a 37 °C por 24 horas. Após a verificação do crescimento, as bactérias são armazenadas a temperatura de -70°C em caldo BHI contendo 20% de glicerol (v/v). Os microrganismos são identificados e o teste de susceptibilidade a antimicrobianos pelo método Método Kirby Bauer realizado utilizando as concentrações padrões de cada antimicrobiano. A leitura e interpretação dos resultados são feitas de acordo com as recomendações do CLSI (2009).

CULTURA FÚNGICA UTERINA: Após a colheita, o swab para a cultura é transportado sob refrigeração até o laboratório e o material semeado em duas placas de ágar Sabouraud com cloranfenicol a 10%, duas com ágar seletivo para fungos patogênicos (cicloheximida). Incubam-se as placas à temperatura ambiente (25°C), por até 15 dias, inspecionando-se diariamente o crescimento fúngico. Para identificação de fungos filamentosos artrosporados e leveduras, realiza-se a semeadura em profundidade e provas de fermentação (glicose, galactose, sacarose, maltose e lactose) e assimilação de carboidratos (glicose, galactose, sacarose, maltose, lactose, rafinose, trealose, melibiose, celobiose, xilose, ramanose e sorbose), e assimilação de fontes nitrogenadas (peptona e KNO₃), sendo a identificação da espécie realizada como descrito por McGinnis (1980). A prova de formação do tubo germinativo em meio de leite é utilizada para a identificação da *Candida albicans* (Jitsurong et al., 1993). Já para fungos filamentosos e esporulados, utiliza-se o preconizado por Looder e Van Rij (1970) microcultivo, confecção de lâminas com lactofenol-azul de algodão para identificação do gênero do fungo através de suas características morfológicas e da espécie por provas específicas, dependendo do gênero.

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO BIOFILME: A caracterização da produção de biofilme é avaliada quantitativamente pelo teste de aderência em microplaca, com modificações

na metodologia proposta por Christensen et al. (1985) e Cucarella et al. (2001). As bactérias são inoculadas na concentração de 1UFC/mL, em caldo Triptona de Soja (TSB) (Kasvi), e incubadas a 37°C por 24h. Posteriormente, a suspensão de bactérias diluídas em 1:40 em TSB, são inoculadas em triplicata em microplacas de poliestireno estéreis com 96 poços, incubadas por 24 horas a 37°C. Após incubação, os poços são lavados duas vezes com 200 µL de solução salina estéril, secos em estufa a 60°C e deixados até a secagem da placa, durante 30 minutos. Adiciona-se, então, 200 µL de cristal violeta a 1% por 15 minutos. Em seguida, os poços são lavados três vezes com água destilada e secos em temperatura ambiente. A absorbância é determinada a 490nm em leitor de ELISA (Analítica, Asys UVM 340). Poços contendo apenas meio TSB servem como controle negativo. A interpretação dos resultados é realizada de acordo com a média aritmética da absorbância das densidades óticas (ODs) das amostras testes (ODt) e do controle negativo (ODc), onde foram utilizadas para classificar cada amostra de acordo com as categorias a seguir: Não produtora de biofilme = $OD_t \leq OD_c$; Fraca produtora de biofilme = $OD_c < OD_t \leq (2 \times OD_c)$; Moderadamente produtora de biofilme = $(2 \times OD_c) < OD_t \leq (4 \times OD_c)$; Forte produtora de biofilme = $(4 \times OD_c) < OD_t$.

INFORMAÇÕES SOBRE O INVENTO

(PARA ESTA SEÇÃO, SE NECESSITAR DE FOLHA ADICIONAL, IDENTIFIQUE-A COMO ANEXO 2)

• DETALHE A INOVAÇÃO DO PRESENTE INVENTO

Trata-se de um método diagnóstico inovador contemplando diferentes técnicas tais como a identificação do agente, o conhecimento da suscetibilidade farmacológica e a formação e caracterização da produção de biofilme. O desenvolvimento de um Sistema diagnóstico completo é necessário para o sucesso da terapia.

• PROBLEMAS QUE O INVENTO RESOLVE OU VANTAGENS QUE APRESENTA (Exemplo: Eficiência, Produtividade, Custo, Qualidade do produto, Redução de resíduos, etc)

Um dos graves problemas de endometrite em éguas é a dificuldade e o custo do tratamento. Biofilmes são um nicho de proteção para micro-organismos, fornecendo também, resistência antibacteriana, antifúngica e criando uma fonte de persistência para infecção. Tais biofilmes constituem potenciais reservatórios de patógenos, que servem como uma fonte

contínua de infecções e contaminações cruzadas. O presente invento possui a vantagem de identificar a presença desses Biofilmes podendo assim entrar com tratamentos específicos para realizar a remoção ou modificação desse biofilme possibilitando a ação das medicações.

- **COMPARE O PRESENTE INVENTO COM A TECNOLOGIA ATUALMENTE UTILIZADA** (Há produtos similares no mercado? Em caso positivo, quais as vantagens desta nova tecnologia?)

A tecnologia altamente utilizada não contempla a medição da produção de Biofilmes, fazendo com que o produtor tenha um custo maior com tratamentos ineficazes. Sabe-se que a resistência microbiana é uma preocupação para a medicina veterinária no mundo (Carneiro et al., 2018a). Uma vez que, a égua após ser infectada por patógenos resistentes, não só o tratamento se torna mais difícil, mas também o diagnóstico pode ser de certa forma mascarado ocasionando uma disseminação das bactérias resistentes em todo o rebanho (Carneiro et al., 2018b).

- **DESVANTAGENS E/OU LIMITAÇÕES DO INVENTO**

Inexistente.

- **USO PRESENTE E FUTURO DO INVENTO**

O desenvolvimento desse Sistema diagnóstico contemplando a identificação dos agentes, susceptibilidade farmacológica associadas a comprovação da produção de biofilme, são atuais e necessários para o sucesso da terapia. A correlação desses testes certamente fornecerá subsídios ainda mais importantes para melhorar a eficiência reprodutiva dos rebanhos equinos.

- **NA SUA OPINIÃO, QUAL O ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO DE SEU INVENTO COM RELAÇÃO A COMERCIALIZAÇÃO?**

() Teórico

() Pesquisa preliminar

- () Estágio avançado da pesquisa
- (x) Finalizada completa em laboratório
- () Protótipo de trabalho

• **TIPO DA INVENÇÃO**

- () Processo
- () Produto
- (x) Método
- () Outro

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

(PARA ESTA SEÇÃO, SE NECESSITAR DE FOLHA ADICIONAL, IDENTIFIQUE-A COMO ANEXO 3)

- **COMO A PRESENTE INVENÇÃO DIFERE DO ATUALMENTE CONHECIDO NO ESTADO DA TÉCNICA?** (Faça um comparativo com o presente pedido de patente de invenção)

As técnicas de identificação dos agentes são estabelecidas, entretanto os resultados de tratamento com essas técnicas são muitas vezes ineficazes pela falta do conhecimento da produção de Biofilmes, possibilitando um custo-benefício para os Veterinários e Produtores envolvidos na cadeia produtiva da Equinocultura.

- **FOI FEITA ALGUMA BUSCA DE PATENTES? EM CASO POSITIVO, INFORME AS PATENTES E O DIFERENCIAL EM RELAÇÃO À NOVA TECNOLOGIA ORA PROPOSTA.** (O NIT - UFRPE realiza busca nos bancos de patente nacional e internacionais, e encaminha aos inventores para análise.)

Foi realizada buscas nos seguintes Sites:

- Spacenet (link is external)
- INPI (link is external)
- USPTO (link is external)
- Google patents (link is external)

- Latpat (Patentes da América Latina) (link is external)
- OMPI (link is external)
- Lens

- DATAS DE EVENTOS NO DESENVOLVIMENTO DO INVENTO:**

EVENTO	DATA APROXIMADA
Concepção	JANEIRO / 2019
Início das Atividades	MARÇO / 2019
Croquis e Desenhos	
Primeira Descrição (relato)	
Modelo (protótipo) em operação	MARÇO / 2019
Primeira Publicação	
Primeira Apresentação Oral	
Prova de validade do princípio	
Conclusão do protótipo	

- NOVIDADE DO INVENTO**

	<i>Sim</i>	Não sei
1. Conhece um outro invento com característica similar?		X
2. Houve alguma patente depositada/requerida de um invento similar		X
3. Há pesquisa bibliográfica relacionada com o invento		X

- Se 1 for afirmativo, indique as principais referências bibliográficas relacionadas ao presente invento, anexando, se possível, cópia:

- EXPERIÊNCIA COM REGISTRO DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

	<i>Sim</i>	Não
1. A presente invenção já foi revelada fora da Universidade?		X
2. Esteve pessoalmente envolvido em outro processo de patente?	X	
3. Há alguma proteção de propriedade intelectual aplicada a esta invenção?		X

- Se 1 for afirmativo, informe detalhadamente, as circunstâncias e anexe cópia do trabalho. (Exemplo: Apresentação em conferências, publicações científicas em revistas, comunicações informais, patentes, normas).

• **Alertamos que a divulgação de aspectos da invenção que por ventura não tenham sido comunicados a este Escritório podem prejudicar a expedição da carta-patente no Brasil, assim como eventuais solicitações de patenteamento no Exterior.**

• APLICAÇÃO INDUSTRIAL

	<i>Sim</i>	Não
1. O presente invento já foi revelado à indústria?		X
2. Foi demonstrado interesse comercial?		X

- Se 1 for afirmativo, informe quando, onde, e que tipo de invento:
- Se 2 for afirmativo, informe nome, contato e telefone da empresa:

FINANCIAMENTO DA PESQUISA

- Foi feito contrato com órgão financiador ou gerido de acordo com um *Termo de Confidencialidade*? Não
- Nome do agente financiador (órgão de fomento/empresa/etc.)
- Número do contrato (**anexar cópia**):
- Contato no órgão
- O órgão financiador foi informado do invento?
- Contrato via Fundação de Apoio da Universidade () sim () não

TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA

- **COMENTE A POTENCIALIDADE DE COMERCIALIZAÇÃO DA PRESENTE INVENÇÃO.** (Especifique áreas de aplicação e/ou produtos que imaginas que possam utilizar esta nova tecnologia)

A presente invenção pode ser comercializada para laboratórios veterinários que apresentem interesse em desenvolver uma técnica mais moderna e eficaz. Pode ser ainda comercializada por entidades e ou profissionais liberais que atuam na área de reprodução equina, desempenhando atividades como inseminação artificial, transferência de embriões, micro injeção intracitoplasmática de espermatozoide.

- **CITE MERCADOS OU EMPRESAS QUE PODERIAM TER INTERESSE EM CONHECER ESTA NOVA TECNOLOGIA** (setores industriais/farmacêuticos/ médicos /agronegócios)

MINITUBE®, HEBRON®, Botupharma®, MSD Saúde Animal®, Zoetis®, Ouro Fino®,

APÊNDICE C – PATENTE 2

Ao Núcleo de Inovação Tecnológica - NIT

Universidade Federal de Pernambuco**Av. Prof. Moraes Rego, 1235 - Cidade Universitária, Recife - PE, 50670-901**

Prezado Coordenador:

Eu, José Adelson Alves do Nascimento Junior, CPF: 101.528.604-60, lotado e com exercício no Departamento de Ciências da Saúde, encaminho a este Escritório os documentos abaixo relacionados, a fim de dar início à avaliação de pertinência do pedido de depósito da Patente de invenção denominada “GEL ESPERMICIDA NATURAL DE ÓLEO ESSENCIAL DE PLANTAS DA CAATINGA”.

Relação de documentos anexos:

	Material	Nº de páginas
(X)	Relatório de Invenção	
()	Desenhos, se necessário	
()	Publicações relacionadas ao presente invento	
()	Cópia de material de divulgação e/ou atestados de participação em eventos e/ou cópia de anais, onde o invento tenha sido divulgado/apresentado.	
()	Cópia do contrato de Direitos de Propriedade Industrial firmado entre a UFPE e Empresa(s) participante(s), quando for o caso.	
(X)	Outros documentos julgados pertinentes:	
	- Quadro reivindicatório	1
	- Resumo	1

Recife, 02 de Janeiro de 2020

Atenciosamente,

Assinatura do Professor Orientador

Recebido no NIT em

DADOS DO(S) TITULAR(ES)

(Preencha somente se a patente for em co-titularidade com Empresas, órgãos públicos ou pessoas físicas sem vínculo com a UFRPE)

Nome da Instituição	CNPJ ou CPF
Universidade Federal Pernambuco	24.134.488/0001-08

DADOS DO(S) INVENTOR(ES)

Nome civil completo: José Adelson Alves do Nascimento Junior

Unidade: UFPE

Departamento: Bioquímica

Fone comercial:

Fax:

E-mail:

Junior.aalves@live.com

Identidade N°: 7334123

Órgão expedidor: SDS/PE

Data de emissão: 04/12/1974

CPF: 101.528.604-60

Data nascimento: 03/03/1993

Estado Civil: Casado

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Garanhuns – PE

Endereço Residencial Completo: Av. Manoel Camelo, n26, Ap301, Garanhuns-PE

Bairro: Francisco figueira

CEP: 55.295-270

Telefone Residencial:

Celular: (87) 98133-0904

Vínculo com a UFPE

() Professor

() Aluno Especialização

() Técnico-administrativo

() Aluno Mestrado

() Aluno Graduação

() Aluno Mestrado

Profissionalizante

(X) Aluno Doutorado

Participante Externo UFPE

() Professor

Informe Instituição:

() Técnico-administrativo

() Aluno Graduação

() Aluno Pós-Graduação

% Contribuição no presente invento: 30%

DADOS DO(S) INVENTOR(ES)

Nome civil completo: Gustavo Ferrer Carneiro

Unidade: UFPE

Departamento:

Fone comercial: (87) 98133-0904 **Fax:**

E-mail:

junior.aalves@live.com

Identidade N°: 1288696

Órgão expedidor: SSP/PE

Data de emissão: 04/12/1974

CPF: 36115703468

Data nascimento: 29/10/1962

Estado Civil: Casado

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Recife

Endereço Residencial Completo: Av. Bernardo Vieira de Melo, 3119 Apto.902, Jaboatão-PE

Bairro: Piedade

CEP: 54.420-010

Telefone Residencial:

Celular: (81) 99974-6663

Vínculo com a UFPE	☐ Professor	☐ Aluno Especialização
	☐ Técnico-administrativo	☐ Aluno Mestrado
	☐ Aluno Graduação	☐ Aluno Mestrado Profissionalizante
		☐ Aluno Doutorado

Participante Externo UFPE	☒ Professor	Informe Instituição:
	☐ Técnico-administrativo	
	☐ Aluno Graduação	
	☐ Aluno Pós-Graduação	

% Contribuição no presente invento: 15,0%

DADOS DO(S) INVENTOR(ES)

Nome civil completo: Nadine Gabryella Pontes Maciel

Unidade:

Departamento:

Fone comercial:

Fax:

E-mail:

Nadine__pontes@live.com

Identidade Nº: 9047057

Órgão expedidor: SDS/PE

Data de emissão: 25/09/2013

CPF: 097.563.894-78

Data nascimento: 23/12/1995

Estado Civil: Casada

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Garanhuns – PE

Endereço Residencial Completo: Avenida Manoel Camelo,n26 ap301, Garanhuns-PE

Bairro: Francisco Figueira

CEP: 55.295-270

Telefone Residencial:

Celular: (87)99639-3006

Vínculo com a UFPE

() Professor

() Aluno Especialização

() Técnico-administrativo

() Aluno Mestrado

() Aluno Graduação

() Aluno Mestrado

Profissionalizante

() Aluno Doutorado

Participante Externo UFPE

() Professor

Informe Instituição:

() Técnico-administrativo

() Aluno Graduação

(X) Aluno Pós-Graduação

% Contribuição no presente invento: 15,0%

DADOS DO(S) INVENTOR(ES)

Nome civil completo: José Guedes da Silva Junior

Unidade: UFPE

Departamento: PPGCB

Fone comercial:

Fax:

E-mail:

gilvannyasobral@hotmail.com

Identidade N°: 7893259

Órgão expedidor: SDS/PE

Data de emissão: 20/08/2008

CPF: 07427403401

Data

Estado Civil: Casado

nascimento: 04/01/1995

Nacionalidade: Brasileiro

Naturalidade: RECIFE - PE

Endereço Residencial Completo: Rua Luiza Bezerra Mota 120,,ap 802, Campina Grande-PB

Bairro: Catole

CEP: 58104-600

Telefone Residencial:

Celular: (81) 99793-8572

Vínculo com a UFPE

() Professor

() Aluno Especialização

() Técnico-administrativo

() Aluno Mestrado

() Aluno Graduação

() Aluno Mestrado

Profissionalizante

(X) Aluno Doutorado

Participante Externo UFPE

() Professor

Informe Instituição:

() Técnico-administrativo

() Aluno Graduação

() Aluno Pós-Graduação

% Contribuição no presente invento: 15,0%

DADOS DO(S) INVENTOR(ES)

Nome civil completo: Maria Tereza dos Santos Correia

Unidade: UFPE

Departamento: PPGCB

Fone comercial:

Fax:

E-mail: mtscorreia@gmail.com

Identidade N°:

Órgão expedidor:

Data de emissão:

CPF: 13854755449

Data nascimento:

Estado Civil: Casada

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Recife-PE

Endereço Residencial Completo:

Bairro:

CEP:

Telefone Residencial:

Celular:

Vínculo com a UFPE	☒ Professor	☐ Aluno Especialização
	☐ Técnico-administrativo	☐ Aluno Mestrado
	☐ Aluno Graduação	☐ Aluno Mestrado
		Profissionalizante
		☐ Aluno Doutorado

Participante Externo UFPE	☐ Professor	Informe Instituição:
	☐ Técnico-administrativo	
	☐ Aluno Graduação	
	☐ Aluno Pós-Graduação	

% Contribuição no presente invento: 15,0%

DADOS DO(S) INVENTOR(ES)

Nome civil completo: Tulio Diego da Silva

Unidade: UFPE

Departamento: Ciências Biológicas

Fone comercial:

Fax:

E-mail:

Diegotulio1@gmail.com

Identidade N°: 7802242

Órgão expedidor: SDS/PE

Data de emissão:

CPF: 06507967483

Data nascimento: 18/08/1989

Estado Civil: Casado

Nacionalidade: Brasileira

Naturalidade: Recife – PE

Endereço Residencial Completo: Rua Maria Rita Barradas, 350 Bloco A apt 101, Jaboatão-PE

Bairro: Piedade

CEP:

Telefone Residencial:

Celular: (81) 99707-8513

Vínculo com a UFPE

() Professor

() Aluno Especialização

() Técnico-administrativo

() Aluno Mestrado

() Aluno Graduação

() Aluno Mestrado

Profissionalizante

() Aluno Doutorado

Participante Externo UFRPE

() Professor

Informe Instituição:

() Técnico-administrativo

() Aluno Graduação

() Aluno Pós-Graduação

% Contribuição no presente invento: 10,0%

DADOS DA(S) INSTITUIÇÃO(ÕES) EXTERNA ENVOLVIDAS

Nome completo: Universidade Federal Rural de Pernambuco – UFPE

CNPJ: 24.416.174/0001-06

CONTATO: Gustavo Ferrer Carneiro

Fone: (81) 3320-6000

Fax: (81)

E-mail:

carneirogustavo1@gmail.com

Endereço: Rua Dom Manuel de Medeiros, s/n - Dois Irmãos, Recife - PE, 52171-900

INFORMAÇÕES SOBRE A INSTITUIÇÃO(ÕES) EXTERNA(S)

5. OCORREU DESENVOLVIMENTO DE ALGUMA DAS ETAPAS DA INVENÇÃO NESTA INSTITUIÇÃO? EM QUE MOMENTO? NÃO
6. EXISTIU AJUDA FINANCEIRA POR PARTE DESTA INSTITUIÇÃO PARA O DESENVOLVIMENTO DA INVENÇÃO? NÃO
7. QUAL O VÍNCULO DO INVENTOR EXTERNO (SE HOUVER) COM ESTA INSTITUIÇÃO? DESDE QUE DATA EXISTE ESTE VÍNCULO? PROFESSOR ORIENTADOR
EM ALGUM MOMENTO ESTE INVENTOR EXTERNO ESTEVE VINCULADO A UFPE? QUAL FOI O VÍNCULO? NÃO.

(PARA ESTA SEÇÃO, SE NECESSITAR DE FOLHA ADICIONAL, IDENTIFIQUE-A COMO ANEXO 1)

- TÍTULO DO INVENTO**

“GEL ESPERMICIDA NATURAL DE ÓLEO ESSENCIAL DE PLANTAS DA CAATINGA”

- PALAVRAS-CHAVE RELACIONADAS AO PRESENTE INVENTO:**

1.	Espermicida
2.	GRAVIDEZ
3.	Humano
4.	Anticoncepção

5.	Produto Natural
6.	Citotoxicidade
7.	Biotécnicas da reprodução
8.	Reprodução Humana

- DESCREVA OBJETIVAMENTE O CAMPO DE INVENÇÃO**

Formulação de gel base contendo óleo essencial de plantas da caatinga (*Eugenia Brejoensis*) como meio de imobilizar espermatozoides humanos. A presente invenção se situa no campo da Biotecnologia aplicada à Reprodução Humana e produtos de uso reprodutivo.

- DESCRIÇÃO DETALHADA DO INVENTO**

A presente invenção utiliza um produto eficaz para imobilização espermática em tempo hábil para prevenção de uma gravidez. Diversos métodos contraceptivos são descritos na literatura médica como alternativas para evitar gravidez não planejada. Estas abordagens incluem compostos diferentes de várias categorias de produtos químicos, de vários mecanismos de ação e com diferentes níveis de eficácia. Os métodos de barreira, por exemplo, consistem na utilização de substâncias que impedem a fertilização do óvulo pelo esperma através do estabelecimento de barreiras físicas ou químicas. (KUMAR, 2012) espermicidas vaginais, incluindo cremes, geis e espumas aerossóis são exemplos de barreiras químicas. (Batár, 2010) espermicida são substâncias projetados para evitar a gravidez por morte ou imobilização de espermatozoides para que eles são incapazes de alcançar o óvulo e fecundá-lo. (Schreiber, 2006).

Apesar de suas vantagens, eles são baseados principalmente em nonoxynol-9, um composto que é capaz de causar efeitos como irritabilidade vaginal e cervical e, favorecendo o surgimento de microorganismos infecciosos e alterar a presença de lactobacilos. (Ojha,2003) Há uma necessidade urgente para a substituição desses agentes por alternativas mais seguras e mais eficazes, tais como contraceptivos naturais, como o óleo da eugenia brejoensis que apresentou uma característica de imobilização do espermatozoide levando em concentrações de 30 microgramas a uma ação espermicida para todos os espermatozoides presentes na amostra.

O Novo compostos espermicidas é constituído de plantas, especialmente aquelas endêmicas a diferentes ecossistemas sub- explorados, como a Caatinga (um bioma exclusivo do Brasil).

O Presente invento é uma formulação que pode ser feita a base de um gel com adição de óleo essencial de eugenia brejoensis, a utilização deve ser feita pré-coito quando o veículo for o gel vaginal, ou quando o veículo for espermicida anexado a camisinha, o tempo de ação do gel é de até 60 minutos e a ação espermicida se dá imediatamente ao contato com as células espermáticas, o tempo de ação do espermicida acoplado a camisinha não perde o efeito com o passar das horas, a concentração do presente invento é de 30 microgramas para ação de imobilização de 100% em tempo imediato, a via de ação começa com redução da atividade mitocondrial com posterior lesão acrossomal, seguida de rompimento de membrana e extravasamento do material genético celular, nos testes realizados o presente protótipo não apresentou nenhuma condição de toxicidade, assim como não perdeu a atividade em 4 h com exposição de elevadas temperaturas.

• DIÁRIO DE LABORATÓRIO

ANÁLISE DAS PROPRIEDADES DOS EXTRATOS SOBRE AS AMOSTRAS DE SÊMEN

Foram utilizados 30 µL de cada extrato/composto marjoritario de diferentes plantas e 30 µL de sêmen; Depois foi retirado 10 µL da mistura e foi determinado a motilidade e a viabilidade usando um microscópio de luz (40x), em um intervalo entre 0 e 5 minutos. O tempo entre a coleta do sêmen e a execução da análise com o extrato da planta foi realizado em um prazo máximo de 30 minutos. Os ensaios foram realizados usando três amostras diferentes de sêmen e em triplicata para cada amostra. Esta análise inicial permitiu classificar os extratos segundo sua capacidade de afetar a motilidade e a viabilidade espermática e de mantê-la por um tempo prolongado (GALLEGO et al. 2012).

ANÁLISE DA ATIVIDADE ESPERMICIDA OU IMOBILIZANTE

Os extratos/composto majoritário que apresentaram efeitos deletérios sobre os parâmetros espermáticos tiveram nova avaliação onde foi utilizada outras amostras de sêmen, este segundo momento do experimento ocorreu em quintuplicata e o tempo foi ampliado a 10 minutos.

ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Para linhagens HeLa (não tem capacidade de metabolizar moléculas exógenas) e HEPG2 (apresenta tal capacidade). A atividade citotóxica dos compostos foi avaliada através do método do MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] [24, 25]. O meio de cultura DMEM foi suplementado com 10 % de soro fetal bovino, 1 % de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/mL + estreptomicina 250 mg/mL) e 1% de L-glutamina (200µM). As células foram cultivadas em placas de 96 poços na concentração de 1×10^6 células/mL e incubadas em estufa a 37 °C em atmosfera úmida enriquecida com 5 % de CO₂, durante 24 h. Em seguida, os compostos foram dissolvidos em concentração estoque de 10 mg/mL(extrato) e 5 mg/mL(composto puro) de DMSO (0,5 %), respectivamente, e adicionados aos poços nas concentrações seriadas (0.195 - 25 µg/mL) para os compostos puros e (0,39 - 50 µg/mL) para os extratos orgânicos. O fármaco doxorrubicina (0,009 - 5 µg/mL) foi utilizado como controle positivo e DMSO (10 mg/mL) como controle negativo. Após 72 h de reincubação, foi adicionado em cada poço 25 µL de MTT (5 mg/mL) e após 3 h de incubação, o meio de cultura com o MTT foi aspirado e 100 µL de DMSO foi adicionado a cada poço para a dissolução dos cristais de formazan. A absorbância dos compostos foi mensurada em um leitor de microplacas no comprimento de onda de 560 nm. Para triagem inicial dos compostos, o percentual de inibição do crescimento celular (IC%) foi determinado considerando a média do controle negativo como 100% de proliferação. Uma escala de intensidade auxiliou a avaliação do potencial citotóxico das amostras testadas. Amostras sem atividade (inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%), com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 50 a 70%), com moderada atividade (inibição de crescimento celular variando de 70 a 90%) e com alta atividade (inibição de crescimento variando de 90 a 100%). As substâncias que causaram uma inibição maior que 70% foram submetidas ao ensaio de determinação da concentração que inibe 50% do crescimento celular em relação ao controle negativo (CI50). A

porcentagem de inibição x log da concentração foi registrada, e suas CI50 e os respectivos intervalos de confiança (IC 95%) foram calculados a partir da regressão não linear no programa GraphPad Prism 5.0. (Mosmann,1983)(Alley, 1988)(Rodrigues, 2014)

CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM):

A determinação da CIM foi realizada de acordo com a técnica descrita por Koo et al. (2000) e Duarte et al. (2003), sendo utilizadas microplacas de 96 poços contendo meio de cultura Mueller Hinton caldo para bactérias da microbiota normal e patógenos com importância ginecológica.

CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM):

Para a determinação da Concentração Bactericida Mínima, segundo a técnica descrita por Koo et al. (2000) e Duarte et al. (2003), serão utilizadas placas de Petri contendo meio de cultura Mueller Hinton Ágar. Baseando-se nos resultados obtidos no teste da CIM, serão utilizadas como inóculo as suspensões provenientes dos tubos que apresentaram resultado de leitura de absorbância, a 660 nm, inferior a 0,05.

INFORMAÇÕES SOBRE O INVENTO

(PARA ESTA SEÇÃO, SE NECESSITAR DE FOLHA ADICIONAL, IDENTIFIQUE-A COMO ANEXO 2)

• DETALHE A INOVAÇÃO DO PRESENTE INVENTO

Trata-se de um Gel espermicida que pode ser utilizada pré-coito, como também pode ser utilizado em conjunto com a camisinha, sendo um produto que utiliza compostos de origem vegetal e não dispõe de nenhuma contra indicação em relação aos componentes da formula, além de ser um método anticoncepcional também auxilia a prevenção de algumas patologias que podem ser adquiridas sexualmente, por possuir uma atividade antimicrobiana, e não dispõe de nenhuma atividade de irritabilidade a células vaginais.

• PROBLEMAS QUE O INVENTO RESOLVE OU VANTAGENS QUE APRESENTA

Uma das vantagens do invento frente aos produtos usuais no mercado é a comprovada ação espermicida com tempo imediato, não sendo assim necessário o contato prévio de 30

minutos do espermatozoide com o produto, assim como a presença de uma substância que não causa irritação na vagina, sendo uma das situações de complicação pós coito que é irritabilidade de mucosa vaginal, favorecendo infecções, como também possui uma atividade antimicrobiana que auxiliaria na prevenção de futuras infecções, assim como também auxiliaria no processo de combate as DST's.

- **COMPARE O PRESENTE INVENTO COM A TECNOLOGIA ATUALMENTE UTILIZADA**

O agente químico frequentemente utilizado nessa associação é o composto biodetergente de ação enzimática denominado Nonoxynol-9 (N-9) (SCHILL; WOLFF, 1981). Sua atuação está evidenciada sobre o metabolismo celular, agindo também como um microbicida, uma vez que este tem a capacidade de romper membranas celulares e envelopes virais (BIRD, K.D, 1991). N-9 é um agente surfactante não iônico e tem como principal ação a redução da tensão superficial na membrana do acrossoma do espermatozóide, causando uma alteração na sua permeabilidade, perda da motilidade e a diminuição de seu potencial frutolítico (FORBES; HEISE, 2003).

As atividades espermicidas destes surfactantes estão associadas com sua afinidade estrutural com a membrana lipídica (SCHILL; WOLFF, 1981). No entanto, diversos estudos demonstram que tais biodetergentes espermicidas não fornecem nenhuma proteção contra doenças sexualmente transmissíveis (DSTs) e que seus efeitos no controle da transmissão do HIV ainda são bastante controversos (RODDY et al. 2002).

A principal desvantagem descrita no uso do N-9 e outros biodetergentes espermicidas usados atualmente de mesma atividade tensoativa é seu efeito sobre as células epiteliais da vagina e na sua microbiota normal (KLEBANOFF, 1992). O uso de tais surfactantes repetidamente como contraceptivos vaginais ou microbicidas está associado com um aumento do risco de infecções vaginais ou cervicais e de irritações ou ulcerações (WEIR et al. 1995); (REKART, 1992); (NIRUTHISARD; RODDY; CHUTIVONGSE, 1991). Tais perturbações são capazes de desencadear processos infecciosos por patógenos oportunistas, aumentando as chances de contrair o HIV ou outras DSTs (D'CRUZ ; UCKUN, 2001). Mediante tais efeitos adversos justifica-se a importância na avaliação e pesquisa de uma nova geração de agentes contraceptivos que tenham diferentes mecanismos de ação e possam ser usados pelos mesmos propósitos através da administração de doses eficazes, sem causar danos irritativos ou tóxicos.

Em contrapartida o espermicida a base de plantas da caatinga (*eugenia brejoensis*) não detém de atividade citotóxica, e apresenta uma atividade superior a do n9, tendo como principal ação a redução de atividade mitocondrial e fragilidade acrossomal, assim como a deterioração do material genético presente no espermatozoide.(Nascimento Junior et al., 2018)

- **DESVANTAGENS E/OU LIMITAÇÕES DO INVENTO**

Inexistente.

- **USO PRESENTE E FUTURO DO INVENTO**

A utilização desse invento nas camisinhas contempla a possibilidade de inviabilizar gravidezes que não fossem desejadas, tendo em vista que o alto índice de gravidez indesejada ainda é grande o que leva a diversos problemas sociais e econômicos, assim como problemas de saúde, podendo assim ser evitado via uso do óleo na camisinha ou em pomadas aplicáveis antes do ato sexual.

- **NA SUA OPINIÃO, QUAL O ESTÁGIO DE DESENVOLVIMENTO DE SEU INVENTO COM RELAÇÃO A COMERCIALIZAÇÃO?**

- () Teórico
- () Pesquisa preliminar
- () Estágio avançado da pesquisa
- (x) Finalizada completa em laboratório
- () Protótipo de trabalho

- **TIPO DA INVENÇÃO**

- () Processo
- (x) Produto
- () Método
- () Outro

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

(PARA ESTA SEÇÃO, SE NECESSITAR DE FOLHA ADICIONAL, IDENTIFIQUE-A COMO ANEXO 3)

- **COMO A PRESENTE INVENÇÃO DIFERE DO ATUALMENTE CONHECIDO NO ESTADO DA TÉCNICA?** (Faça um comparativo com o presente pedido de patente de invenção)

O Atual espermicida conhecido no mercado se chama nonoxynol-9 o qual é ineficaz contra espermatozoides pois sua ação exige um contato prévio com a amostra espermática de no mínimo 5 minutos para poder ter uma ação de imobilização de 10-15% enquanto a utilização do óleo tem potencial de contato imediato com imobilização de 100% das células viáveis na amostra, onde também podemos evidenciar que as concentrações são deveras muito diferentes, enquanto o nonoxynol-9 utiliza de 400 microgramas pra obter um mínimo de resultado, o óleo tem atividade de inibição a partir de 3 microgramas, por fim a diferença entre os dois se dá também no contexto de atividade citotóxica, o óleo não apresentou toxicidade quanto a células humanas, porém o nonoxynol-9 apresenta alta toxicidade contra células do endotélio vaginal.

- **FOI FEITA ALGUMA BUSCA DE PATENTES? EM CASO POSITIVO, INFORME AS PATENTES E O DIFERENCIAL EM RELAÇÃO À NOVA TECNOLOGIA ORA PROPOSTA.**

Foi realizada buscas nos seguintes Sites:

- Spacenet (link is external)
- INPI (link is external)
- USPTO (link is external)
- Google patents (link is external)
- Latpat (Patentes da América Latina) (link is external)
- OMPI (link is external)
- Lens

- **DATAS DE EVENTOS NO DESENVOLVIMENTO DO INVENTO:**

EVENTO	DATA APROXIMADA
Concepção	JANEIRO / 2017
Início das Atividades	FEVEIREIRO/ 2017
Croquis e Desenhos	MARÇO/2017
Primeira Descrição (relato)	MARÇO/2017
Modelo (protótipo) em operação	MARÇO / 2018
Primeira Publicação	ABRIL/2018
Primeira Apresentação Oral	
Prova de validade do principio	NOVEMBRO/2019
Conclusão do protótipo	

- **NOVIDADE DO INVENTO**

-

	<i>Sim</i>	Não sei
1. Conhece um outro invento com característica similar?		X
2. Houve alguma patente depositada/requerida de um invento similar		X
3. Há pesquisa bibliográfica relacionada com o invento		X

- Se 1 for afirmativo, indique as principais referências bibliográficas relacionadas ao presente invento, anexando, se possível, cópia:

- **EXPERIÊNCIA COM REGISTRO DE PROPRIEDADE INDUSTRIAL**

	<i>Sim</i>	Não
1. A presente invenção já foi revelada fora da Universidade?		X
2. Esteve pessoalmente envolvido em outro processo de patente?	X	
3. Há alguma proteção de propriedade intelectual aplicada a esta invenção?		X

- Se 1 for afirmativo, informe detalhadamente, as circunstâncias e anexe cópia do trabalho. (Exemplo: Apresentação em conferências, publicações científicas em revistas, comunicações informais, patentes, normas)

Alertamos que a divulgação de aspectos da invenção que por ventura não tenham sido comunicados a este Escritório podem prejudicar a expedição da carta-patente no Brasil, assim como eventuais solicitações de patenteamento no Exterior.

• APLICAÇÃO INDUSTRIAL

	<i>Sim</i>	Não
1. O presente invento já foi revelado à indústria?		X
2. Foi demonstrado interesse comercial?		X

- Se 1 for afirmativo, informe quando, onde, e que tipo de invento:
- Se 2 for afirmativo, informe nome, contato e telefone da empresa:

FINANCIAMENTO DA PESQUISA

- Foi feito contrato com órgão financiador ou gerido de acordo com um *Termo de Confidencialidade*? Não
- Nome do agente financiador (órgão de fomento/empresa/etc.)
- Número do contrato (**anexar cópia**):
- Contato no órgão
- O órgão financiador foi informado do invento?
- Contrato via Fundação de Apoio da Universidade () sim () não

PRÁTICA DE TECNOLOGIA

- **COMENTE A POTENCIALIDADE DE COMERCIALIZAÇÃO DA PRESENTE INVENÇÃO.**

A presente invenção pode ser comercializada para laboratórios humanos que apresentem interesse em desenvolver uma camisinha ou um gel com um espermicida com atividade de imobilização espermática assim como a não toxicidade a células vaginais e atividade antimicrobiana.

- **CITE MERCADOS OU EMPRESAS QUE PODERIAM TER INTERESSE EM CONHECER ESTA NOVA TECNOLOGIA**

EROS, BLONTEX, JONTEX, OLLA.